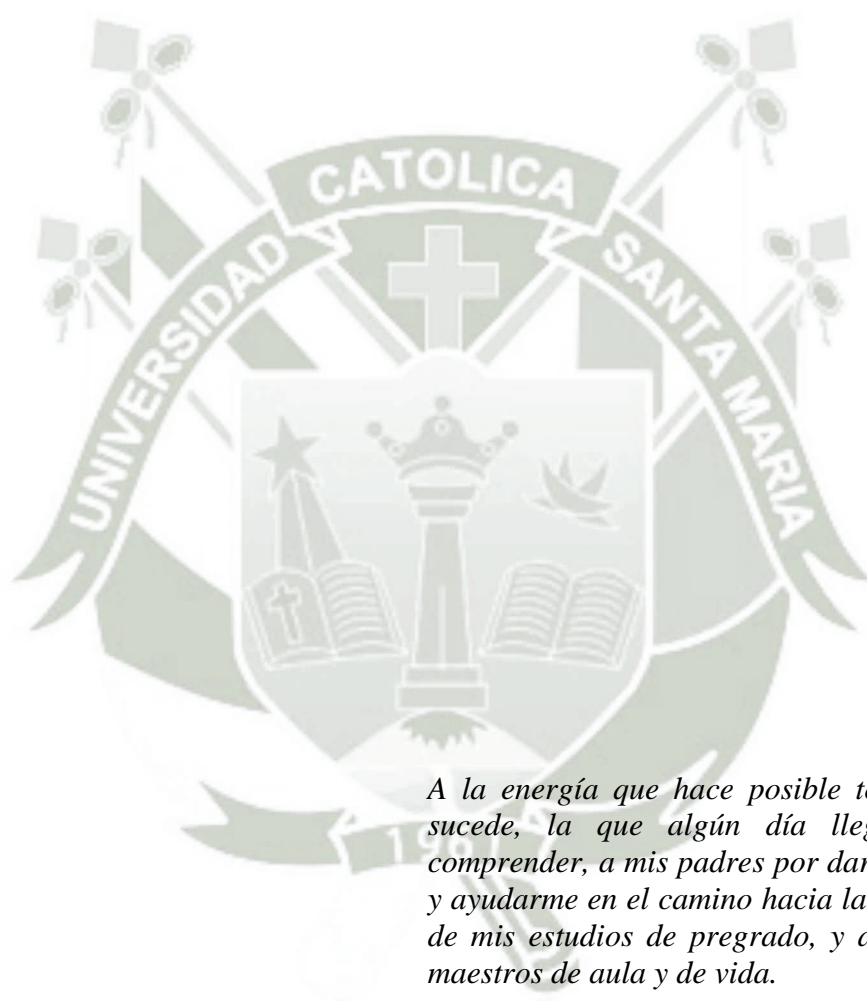


“It is not the strongest of the species that survives, nor the most intelligent. It is the one that is the most adaptable to change.”

Charles Darwin



A la energía que hace posible todo cuanto sucede, la que algún día llegaremos a comprender, a mis padres por darme la vida, y ayudarme en el camino hacia la conclusión de mis estudios de pregrado, y a todos mis maestros de aula y de vida.

INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hipótesis.....	3
1.2 Objetivos	3
CAPÍTULO II: MARCO TEORICO.....	4
2.1 Celulosa.....	4
2.2 Celulosa Vegetal	6
2.3 Celulosa Bacteriana.....	7
2.4 Genero <i>Gluconacetobacter sp.</i>	9
2.4.1 <i>Gluconacetobacter Diazotrophicus</i>	9
2.4.2 <i>Gluconacetobacter Hansenii</i>	10
2.4.3 <i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	10
2.4.4 <i>Gluconacetobacter xylinus</i>	11
2.5 Identificación bacteriana	11
2.6 Conservación de cepas	13
2.7 Biosíntesis de celulosa bacteriana.....	14
2.8 Efectos de los componentes del medio y factores ambientales en el crecimiento de <i>Gluconacetobacter sp.</i>	16
2.9. Medio Hestrin-Schramm.....	18
2.10 Medio de piña.....	18
2.11 Otros medios de cultivo	19
2.12 Cultivo de Cb Up Stream	20
1.12.1 Cultivo estático	20
1.12.1 Cultivo dinámico.....	20
2.13 Purificación - down stream	21
2.14 Reproducción y cinética de crecimiento bacteriano.....	22

2.14.1	Ciclo celular procariótico.....	22
2.14.2	Crecimiento poblacional.....	23
2.14.3	Fases del crecimiento microbiano.....	23
2.14.4	Modelamiento matemático	24
2.15	Caracterización de celulosa.....	25
2.15.1	Caracterización estructural de la celulosa.....	25
2.15.2	Propiedades mecaánicas y de transporte.....	27
2.15.3	Identificación microbiológica de celulosa bacteriana.....	29
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS		30
3.1	Lugar de investigación	30
3.2	Materiales.....	30
3.2.1	Material biológico.....	30
3.2.2	Material de vidrio.....	31
3.2.3	Instrumentación y equipos	31
3.2.4	Medios de cultivo.....	32
3.2.5	Reactivos químicos	32
3.2.6	Otros materiales	33
3.3	Métodos.....	34
3.3.1	Obtención de fuentes potenciales de cepa nativa.....	34
3.3.2	Aislamiento de cepas	36
3.3.3	Selección de cepas	36
	A. Identificación Macro y Microscopica	36
	B. Caracterización bioquímica de las cepas.....	36
3.3.4	Preparación del preinóculo	38
3.3.5	Prueba preliminar de formación de celulosa.....	38
3.3.6	Determinación del parámetro de absortividad molar de las cepas VM y K	38
3.3.6	Preparación del inóculo	39
3.3.8	Determinación de la concentración del inóculo.....	39

3.3.9 Determinación del parámetro cinético de crecimiento de las cepas VM y K de <i>Gluconacetobacter SP.</i>	40
3.3.10 Cultivo estático por lotes de celulosa (Batch)	40
3.3.11 Cálculo de Coeficientes de rendimiento $Y_{p/x}$ y $Y_{x/s}$ $Y_{s/p}$	41
3.3.12 Recuperación del producto o Down Stream	41
3.3.13 Determinación de características de la celulosa producida	42
A. Caracterización Estructural de las membranas.....	42
B. Propiedades mecánicas y de transporte	44
C. Identificación microbiológica de celulosa bacteriana	45
Flujograma.....	46
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSION.....	46
4.1 Obtención de fuentes potenciales:.....	47
4.2 Aislamiento de cepas.....	49
4.3 Evaluación de cepas aisladas	52
4.4 Prueba preliminar de producción de celulosa	57
4.5 Determinación de absortividad molar de las cepas VM y K.....	59
4.6 Preparación y determinación de la concentración del inóculo.....	60
4.7 Determinación del parámetro cinético de crecimiento de las cepas vm y k. ...	60
4.8 Cultivo estático por lotes de celulosa (batch)	64
4.9 Determinación de Coeficientes de rendimiento $Y_{p/x}$, $Y_{x/s}$ $Y_{s/p}$	67
4.10. Recuperación del producto o Down Stream.....	68
4.11. Determinación de características de la celulosa producida.....	71
A. Caracterización Estructural de las membranas.....	71
B. Propiedades mecánicas y de transporte	88
C. Identificación microbiológica de celulosa bacteriana	93
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS.....	96
5.1 Conclusiones	96
5.2 Sugerencias	98
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
ANEXOS	105

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1	Propiedades Fisicoquímicas de la celulosa	6
Tabla N° 2	Clasificación taxonómica del genero <i>Gluconacetobacter</i>	9
Tabla N° 3	Características diferenciales de los géneros <i>Gluconacetobacter</i> , <i>Acetobacter</i> y <i>Pseudomonas</i>	13
Tabla N° 4	Clasificación Taxonómica de la piña (<i>Ananas comosus</i> L.)	18
Tabla N° 5	Características de las colonias obtenidas a partir de los cultivos de las fuentes potenciales.....	52
Tabla N° 6	Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas.	53
Tabla N° 7	Absortividad molar a partir de absorbancias.....	59
Tabla N° 8	Concentración del inoculo en cel./ ml.....	60
Tabla N° 9	Cuadro concentración y biomasa para un tiempo y volumen determinado.....	61
Tabla N° 10	Valores de u y u_{max} para las cepas VM y K	633
Tabla N° 11	Promedio de producción de celulosa formada	635
Tabla N° 12	Producción en g/L para el cultivo de celulosa en 30 días	636
Tabla N° 13	Valores promedios de $Y_{x/s}$, $Y_{p/x}$, $Y_{s/p}$	637
Tabla N° 14	Cuadro que muestra las características de tracción de las probetas de celulosa.....	89
Tabla N° 15	Grado de hinchamiento de las membranas VM en HS VM en piña K en HS y K en piña	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1	A. Estructura molecular de la CB. B. microestructuras de CB. 1 Cadena Lineal de CB. 2. Microfibrilla de CB. 3. Paquete de microfibrillas.	5
Figura N° 2	Celdas cristalizadas de celulosa I, II, III y IV.	6
Figura N° 3	Microfotografía de <i>Gluconacetobacter xylinus</i>	11
Figura N° 4	Ruta Bioquímica para la síntesis de celulosa por <i>Gluconacetobacter sp.</i>	15
Figura N° 5	Gráfica Log de la concentración celular vs tiempo.	24
Figura N° 6	Modelo matemático de crecimiento celular	244
Figura N° 7	Ecuación de Malthus	255
Figura N° 8	Velocidad de crecimiento de biomasa.	25
Figura N° 9	Probeta sometida a tracción las flechas rojas indican el sentido de la tracción.	28
Figura N° 10	Ley de Beer – Lambert.	399
Figura N° 11	Coefficiente Y_p/x	41
Figura N° 12	Coefficiente Y_x/s	41
Figura N° 13	Coefficiente Y_s/p	41
Figura N° 14	Area de la membrana	44
Figura N° 15	Grado de hinchamiento	45
Figura N° 16	Flujograma de actividades.	46
Figura N° 17	A. Recipiente vinagre de manzana. B. Vinagre de manzana después de la fermentación.	48
Figura N° 18	Frasco con el fermento de arándanos después de la fermentación y después de sacar la muestra.	48
Figura N° 19	Recipiente con 200 ml de vino en proceso de acetificación.	49
Figura N° 20	Recipiente que contiene un SCOBY de Kombucha.	49
Figura N° 21	Placa con presencia de colonias muestra bacterias Gram negativas y Gram positivas.	50
Figura N° 22	Placa Muestra Crecimiento De Colonias.	50
Figura N° 23	Placa con colonias obtenidas a partir de vino y tincion Gram	51

Figura N° 24	A. placa con cultivo de la cepa K, a la derecha tinción Gram.	51
Figura N° 25	Análisis bioquímico de cepas (Andelib,2009)	55
Figura N° 26	A. Agar CaCO ₃ , B. Agar SIM, C Catalasa , D. Urea	56
Figura N° 27	Membranas formadas a partir de cepas VM, Ar, V, K	58
Figura N° 28	Beakers con membranas despues del tratamiento con calor y NaOH 0.5N.....	59
Figura N° 29	Crecimiento y log vs tiempo de las cepas VM y K durante 10 días	62
Figura N° 30	Cultivo de celulosa por lotes.....	64
Figura N° 31	Producción de celulosa en gramos vs tiempo en horas.....	65
Figura N° 32	Membranas de celulosa producidas en dos diferentes medios por dos cepas diferentes.....	69
Figura N° 33	Muestra de membrana colocándose en tubo falcon para centrifugar	70
Figura N° 34	Tubos Falcon con muestras listas para centrifugar	70
Figura N° 35	Membrana de celulosa después del secado	70
Figura N° 36	Membranas recortadas a en forma circular de 1 cm de diámetro para su análisis en meb.....	71
Figura N° 37	Muestras fijadas en glutaraldehido y luego deshidratadas con una batería de alcoholes 50 70 90 % y absoluto.	72
Figura N° 38	Muestras conservadas para su transporte en alcohol absoluto listas para desecar.....	73
Figura N° 39	Metalizador y desecador junto con las muestras listas para ser procesadas	73
Figura N° 40	Muestras metalizadas listas para ser observadas.....	73
Figura N° 41	Compartimiento del portamuestras y pantalla de observación del microscopio.	74
Figura N° 42	A. Superficie de la membrana a una distancia de 1 mm, B. imagen de comparación de una membrana (Roldan 2013).....	74
Figura N° 43	A. Microfotografía tamaño de <i>Gluconacetobacter sp.</i>	75
Figura N° 44	A. Microfotografía de la membrana VM en HS B bacterias en formación de microfibrillas C imagen fuente (Bionext, 2015)	76

Figura N° 45	A y B Microfotografías de membrana K en HS C y D comparación (Carreño 2011)	77
Figura N° 46	Compactación membrana KP.....	78
Figura N° 47	Porosidad de membrana	79
Figura N° 48	Espectro edx membrana VM en HS.....	80
Figura N° 49	Espectro edx membrana VM en piña.	81
Figura N° 50	Espectro edx membrana K en HS	82
Figura N° 51	Espectro edx membrana K en piña.....	83
Figura N° 52	Espectros de celulosa fuente (Mazhar, U et al 2013).....	84
Figura N° 53	Espectro FT-IR obtenido membrana VM en medio HS	85
Figura N° 54	Espectro FT-IR obtenido membrana VM medio piña.....	86
Figura N° 55	Espectro FT-IR obtenido membrana K en medio HS.	87
Figura N° 56	Espectro FT-IR obtenido membrana K en medio piña	88
Figura N° 57	Grafica de tracción	90
Figura N° 58	Medición de espesor de probetas de celulosa.	90
Figura N° 59	Dinamómetro digital del PP. Ingenieria Mecanica	91
Figura N° 60	Medición de tracción	91
Figura N° 61	Membranas de 1cm2 para el ensayo de hinchamiento.....	93
Figura N° 62	Membranas inoculadas con Trichoderma y Aspergillus Niger....	94
Figura N° 63	Trichoderma sp. creciendo sobre membrana y membrana con agujero donde antes se ubicaba el hongo A.Niger	95
Figura N° 64	A. Aspergillus niger creciendo sobre la membrana de celulosa KHS, B. Hongo trichoderma creciendo sobre membrana VMHS	95
Figura N° 65	Cultivo de cepas y cultivo en medio piña	111
Figura N° 66	Gráfica producción de celulosa vs tiempo	117
Figura N° 67	Membranas de celulosa produccion en 30 dias	118
Figura N° 68	Recuperación de membranas y tratamiento con NaOH 0.5 N...123	
Figura N° 69	Laboratorio de Equipamiento Especializado de la facultad de biologia de la UNMSM.....	124
Figura N° 70	Espectro FT-IR de la membrana VM en medio Piña.....	127
Figura N° 71	Espectro FT-IR de la membrana VM en medio HS.....	128

Figura N° 72	Espectro FT-IR de la membrana K en medio HS	129
Figura N° 73	Espectro FT-IR de la membrana K en medio HS	130
Figura N° 74	Membranas listas para ser analizar en el espectrofotómetro.....	130
Figura N° 75	Espectrofotómetro FT-IR Shimadzu	130

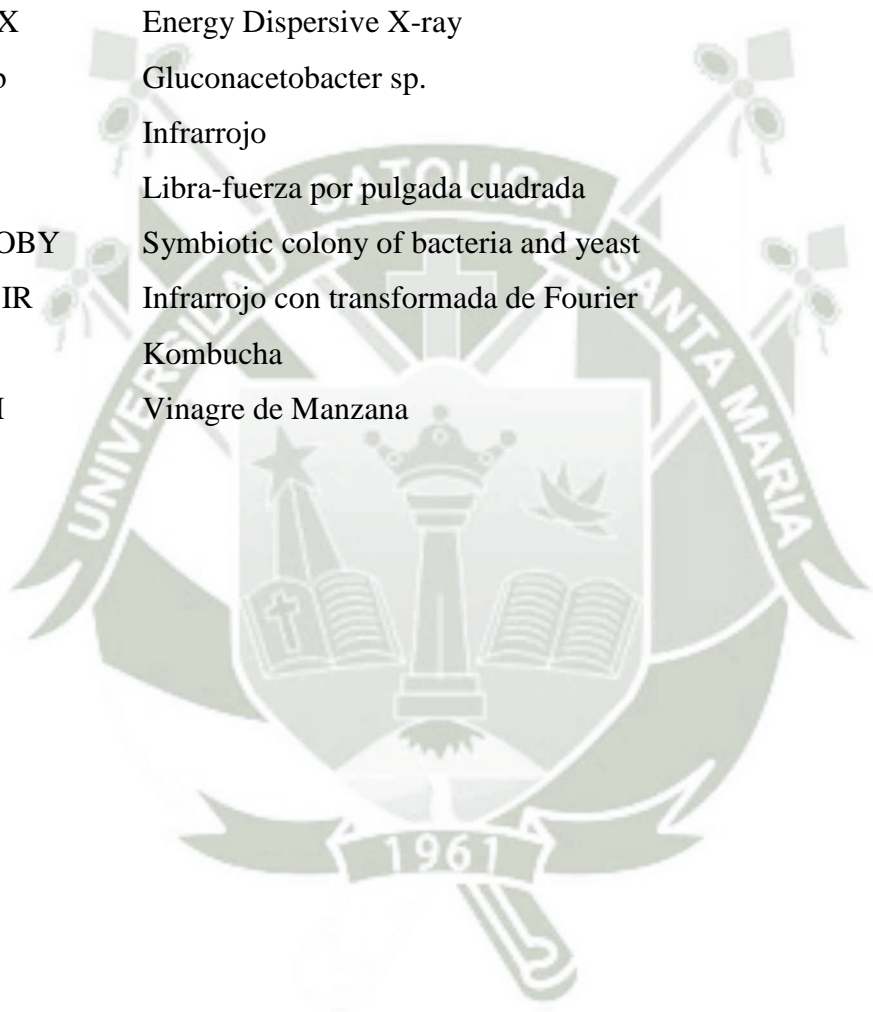


LISTA DE SÍMBOLOS

A	Área
Abs	Absorbancia
B	Amplitud o ancho
b	Longitud de la cubeta
C	Concentración
E	Espesor
ϵ	Coefficiente de absortividad molar
g	Gramos
h	Horas
kg	Kilogramos
kmol	Kilomoles
kV	Kilovoltios
L	Litros
m	minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
m^3	Metro cúbico
N/mm^2	Megapascal
Q	Grado de hinchamiento
rx	Velocidad de crecimiento
s	Segundos
σ_{max}	Tensión máxima
μ	Velocidad específica de crecimiento
μm	Micrómetros
Wh	Peso húmedo
Ws	Peso seco
x	Concentración celular
$Y_{p/x}$	Coefficiente de rendimiento producto - biomasa
$Y_{x/s}$	Coefficiente de rendimiento biomasa - sustrato
$Y_{s/p}$	Coefficiente de rendimiento sustrato – producto

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
CB	Celulosa bacteriana
Cel.	Células
Meb	Microscopía electrónica de barrido
CAS	Chemical Abstracts Service
EDX	Energy Dispersive X-ray
Gab	Gluconacetobacter sp.
IR	Infrarrojo
Psi	Libra-fuerza por pulgada cuadrada
SCOBY	Symbiotic colony of bacteria and yeast
FT-IR	Infrarrojo con transformada de Fourier
K	Kombucha
VM	Vinagre de Manzana



RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se aisló y caracterizó bioquímicamente cepas bacterianas de *Gluconacetobacter* sp. para la producción de celulosa microbiana en medio sintético y un medio de piña formulado a partir de residuos frutales de desecho.

Cuatro cepas bacterianas fueron aisladas a partir de fuentes naturales, vinagre de manzana, jugo de arándano, vino agriado, y una fuente biológica Kombucha con ellas se realizó una serie de cultivos en medio agar HS para su aislamiento, luego de comprobar la presencia de bacterias Gram negativas en cultivos puros se procedió a realizar con estas las pruebas bioquímicas resultando así la cepa K del medio kombucha, la cepa VM de vinagre de manzana las más probables por presentar clarificación en la zona de crecimiento en agar CaCO_3 , crecimiento en manitol y producción de dihidroxiacetona en glicerol entre las más importantes, seguidamente se procedió a realizar la prueba preliminar de producción de celulosa con las cuatro cepas por ser esta definitoria los resultados mostraron producción de una capa flotante sobre el medio HS para las cuatro cepas, se realizó lavados con agua destilada y centrifugado para eliminar residuos de medio y bacterias a continuación se sometieron al calor con NaOH 0.5N, la celulosa es resistente a este tratamiento, las membranas de las cepas VM y K fueron las únicas que resistieron

el tratamiento, por lo que se continuo trabajando con ellas, para la cinética y la producción estática se prepararon inóculos con concentración conocida, y se realizó un cultivo estático en medios HS y Piña por 10 días a 30°C hallando una u_{max} de 0.0143 h⁻¹ para VM y 0.0168 h⁻¹ para K para la producción se encontró los valores de 6.392g/L, 7.580g/L, 9.2526g/L, 8.740g/L para VM en HS, VM en piña, K en HS y K en piña respectivamente para el cultivo en 10 días, así también se halló que el medio donde se produjo mayor biomasa fue HS, con un $Y_{x/s}$ de 0.7311, la cepa que tuvo mayor rendimiento por g de sustrato fue K con un $Y_{s/p}$ de 17.9302 y la cepa con mayor producción por célula fue K en medio piña con un $Y_{p/x}$ de 0.3812. Finalmente las membranas de celulosa fueron caracterizadas estructuralmente mediante microscopia electrónica de barrido, edx, espectroscopia FT-IR, obteniendo microfotografías que muestran cadenas, microfibrillas, el microorganismo *Gluconacetobacter* sp. la estructura en capas y la porosidad de las membranas de CB, edx nos muestra la composición elemental donde predominan C y O, espectroscopia FT-IR nos brindó los espectros de absorción de las moléculas que conforman la celulosa; las propiedades mecánicas mediante ensayos de tracción con lo que se halló que la membrana K en HS soporto una tensión máxima 3.4 N/mm², K en piña 0.8 N/mm², VM en HS 0.2 N/mm² y VM en piña no soporto esfuerzo, las propiedades de transporte mediante el ensayo de grado de hinchamiento donde los resultados de absorción nos dieron Q iguales a 2.12% 4.76%, 9.09% y 4.93 % para para VM en HS, VM en piña, K en HS y K en piña respectivamente demostrando que son membranas absorbentes con múltiples utilidades, y la Identificación microbiológica de celulosa bacteriana mediante hidrolisis enzimática utilizando los hongos *Trichoderma* sp. y *Aspergillus Niger* hongos con conocida actividad celolítica que degrada la celulosa con diversos fines en este caso para su consumo como sustrato lo que les permitió desarrollarse confirmando su identificación microbiológica de la celulosa bacteriana como componente de las membranas obtenidas por las cepas VM y K.

Palabras Clave: *Gluconacetobacter* sp., celulosa bacteriana, cultivo estático, medio HS, medio de residuos de piña.

ABSTRACT

In the present research work bacterial strains of *Gluconacetobacter* sp. were isolated and biochemically characterized for the production of microbial cellulose in a synthetic medium and in a pineapple waste residue fruit formulated.

Four bacterial strains were isolated from natural sources such as Apple vinegar, cranberry juice, sour wine, and the biological source Kombucha, with them a number of crops were performed in an agar HS for isolation. After verifying the presence of negative Gram bacteria in pure crops, we proceeded to perform these biochemical tests resulting the K strain of kombucha medium, the VM strain of apple cider vinegar are the most likely to present significant growth clarification CaCO₃ agar, mannitol growth and production of dihydroxyacetone from glycerol are the most important, then we proceeded to conduct the preliminary pulp production test with the four strains because this defining results showed production of a floating layer on the HS medium. The four strains were washed with distilled water and centrifuged to remove residual medium and then bacteria were subjected to heat with 0.5N NaOH, the cellulose was resistant to this treatment, the membranes of the VM and K strains were the only ones that resisted, so we kept working with them, for kinetic and static production we prepared known inoculum concentration, and static culture was carried out in HS and Pineapple media for 10 days at 30 ° C found one u_{max} of 0.0143 h⁻¹ for VM and 0.0168 h⁻¹ for K

production values 6.392g / L, 7.580g / L, 9.2526g / L, 8.740g / L HS VM, VM pineapple HS K and K was found in pineapple cultivation respectively for 10 days, and we also found that the medium where there was greater biomass was HS, with Y_x / s of 0.7311, the strain that had higher yield per g substrate was K with Y_s / w 17.9302 and the strain with the highest production per cell K was in the pineapple environment with a Y_p/x of 0.3812. Finally cellulose membranes were characterized by structure through electron microscopy scanning, edx, FT-IR spectroscopy, obtaining micrographs showing chains, microfibrils, the microorganism *Gluconacetobacter* sp. the layered structure and porosity of mebranas CB, edx shows the elemental predominating composition C and O, FT-IR spectroscopy gave the absorption spectra of the molecules that make up the cellulose; mechanical properties by tensile tests showed that the K membrane HS endure a maximum stress 3.4 N/mm², K pineapple 0.8 N/mm², VM HS 0.2 N/mm² and VM pineapple did not endure effort. Transport properties by testing degree of swelling showed that absorption Q equal to 2.12% 4.76%, 9.09% and 4.93% for HS VM, VM pineapple HS K and K pineapple proved they are absorbent membranes with multiple utilities, and biotech characterization by enzymatic hydrolysis using fungi *Trichoderma* sp. and fungi *Aspergillus niger* with known cellulolytic activity for various purposes in this case for substrate consumption which allowed them to develop biotechnologically confirmed cellulose as a component of membranes obtained by the VM and K strains.

Keywords: *Gluconacetobacter* sp, bacterial cellulose, static culture, HS medium, pineapple residue formulated.



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La celulosa es la macromolécula biológica más abundante del planeta, forma la estructura básica de la pared celular de plantas, diversos hongos y algunas algas, es utilizada como material de soporte, membranas para filtración, aislantes y acústicas, fibras sintéticas, prendas de vestir entre otras fibras. Actualmente en el mercado internacional se dispone mayoritariamente de celulosa vegetal, este polímero está conformado por tres fracciones: lignina, hemicelulosa y celulosa propiamente dicha, debido a que contiene lignina y hemicelulosa, su obtención para la industria textil, papelera, médica y demás, es complicada, puesto a que estas fracciones hacen que las propiedades estructurales cambien, con la bioingeniería en los últimos años se ha logrado la fabricación de biomateriales entre ellos la celulosa microbiana, en nuestro país no se produce este biopolímero de múltiples aplicaciones, actualmente existe una gran demanda tecnológica en este campo la celulosa microbiana se convierte en una alternativa accesible por poseer características estructurales y propiedades fisicoquímicas únicas de interés en áreas como la medicina, además que su producción es tecnológicamente viable produce

pocos desechos y no contamina el medio ambiente. La producción de celulosa vegetal tiene costos elevados puesto a que se debe separar las fracciones de lignina y hemicelulosa, en dicho proceso además se utiliza cantidades enormes de agua y genera desechos sólidos y líquidos como lo es el licor negro que contamina el medio ambiente, el proceso de producción de celulosa microbiana utiliza cantidades mucho menores de agua además que desechos frutícolas pueden ser utilizados como fuente de carbono y en cuanto a residuos sólidos el de mayor impacto ambiental debido a su cantidad es la biomasa, recordando que es un organismo GRASS. A parte de todas las aplicaciones que se le da a la celulosa vegetal actualmente la CB puede tener nuevas aplicaciones en el área médica puesto a que es biocompatible lo que hace de este biomaterial el ideal para su aplicación en quemaduras, regeneración celular en caso de traumas mecánicos o úlceras crónicas, gracias a funcionar como un sustituto temporal de tejidos y ser permeable a gases, como soporte en ingeniería de tejidos y en odontología, en el área de materiales como recubrimiento, en el área de ingeniería de sonido como membrana acústica, etc. Además de tener todavía mucho por investigar en este campo, todas estas propiedades le confieren a la celulosa amplia visión y alta competitividad en el mercado internacional como biomaterial.

1.1 HIPÓTESIS

Dado que la celulosa vegetal es de baja pureza y genera una cantidad notable de residuos sólidos y líquidos, es posible producir celulosa bacteriana en ambiente controlado utilizando una cepa microbiana de *Gluconacetobacter sp.* aislada de fuentes naturales, con una mínima generación de residuos.

1.2 OBJETIVOS

General

Producir celulosa microbiana a partir de cepas nativas de *Gluconacetobacter sp.* obtenidas de diferentes fuentes en cultivo batch.

Específicos

- Aislar y Caracterizar bioquímicamente cepas bacterianas nativas utilizando fuentes naturales vinagre de manzana, vinagre de vino, macerado de arándanos, y la fuente biológica Kombucha, que presentan elevada probabilidad de contenido microbiano.
- Configurar el sistema de producción microbiana de celulosa en ambiente controlado.
- Comparar la producción de celulosa entre las cepas aisladas.
- Determinar las características estructurales de la celulosa producida.
- Identificar microbiológicamente la celulosa obtenida.



CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 CELULOSA

La celulosa es la molécula orgánica más abundante en la naturaleza y posee gran importancia a nivel industrial. Anualmente se producen 180 billones de toneladas y es uno de los polímeros más antiguos renovables biodegradables y biocompatibles. Este biopolímero es el principal componente estructural de la pared celular de las plantas. (Karahan, 2010). Está formado de residuos de glucosa unidos por enlace covalente entre los carbonos 1 y 4 (β_{1-4}) formando así una cadena lineal, las cadenas lineales normalmente se asocian o cristalizan por puentes hidrogeno y por fuerzas de Van der Waals. Cuando estas cadenas se asocian en un número de al menos 10 conforman una estructura denominada microfibrillas de celulosa. (Chavez, 2004). (Figura 1)

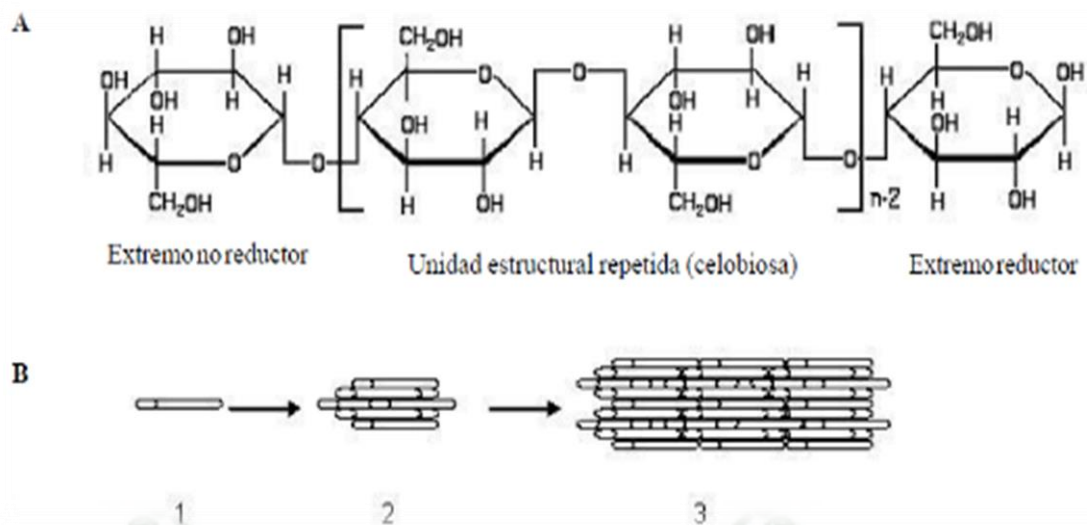


Figura 1. A. Estructura molecular de la CB. B. microestructuras de CB. 1 Cadena Lineal de CB. 2. Microfibrilla de CB. 3. Paquete de microfibrillas.

La microfibrilla de celulosa posee una estructura que alterna entre regiones muy ordenadas (cristalinas) y regiones menos ordenadas (amorfas), la mayor parte de ocasiones una muestra contiene más de una de estas formas. Es así que existen cuatro diferentes tipos: tipo I, II, III y IV que pueden ser convertidas unas en otras (Akerholm, 2004)

De las configuraciones existentes la celulosa I y celulosa II son las más importantes mientras que la III Y IV existen como consecuencia de tratamientos específicos de la celulosa con amoníaco o aminos y glicerol respectivamente.

La estructura de la celulosa I, también conocida como celulosa nativa, se encuentra en una mayor proporción dentro de la naturaleza, coexiste bajo la mezcla de formas cristalinas I α (a) y I β . Las dos estructuras varían en el modo en que sus cadenas se unen por enlaces de puentes hidrogeno, la celulosa I α se convierte por calor en celulosa I β siendo la segunda más estable. La tipo II es obtenida mediante tratamiento de la celulosa tipo I con solución acuosa alcalina (ésta es conocida como celulosa mercerizada) o mediante disolución y regeneración. La transformación de celulosa II a celulosa I no se conoce por lo que podemos decir que es termodinámicamente más estable. (Carrillo, 2002)

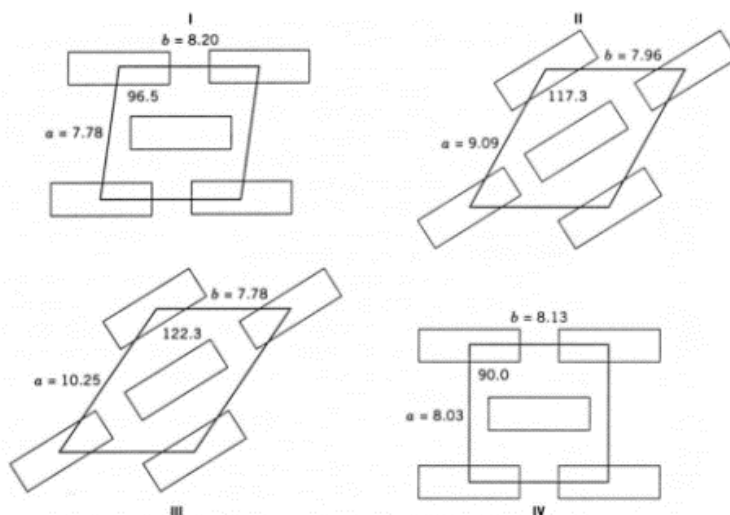


Figura N° 2 Celdas cristalizadas de celulosa I, II, III y IV. La dimensión c (perpendicular al plano del gráfico) es de $1,03 \text{ \AA}$. Las dimensiones a y b en nanómetros. (Carrillo, 2002)

La celulosa posee el número de registro CAS 9004-34-6 se encuentra como celulosa microcristalina y es comercializada en estado sólido como fibras de color blanco inodoras en la **Tabla N°1** se muestran las principales propiedades físico-químicas de la celulosa.

Propiedad (unidad)	Valor
Fórmula semidesarrollada	$(C_6H_{10}O_5)_n$
Masa Molecular(Kg/kmol)	160 – 560
Densidad (Kg/m ³)	1.27 – 1.61
Punto de fusión (°C)	260 - 270
Solubilidad	Insoluble en agua
Degradación (°C)	> 270
pH	6.0 – 8.0

Tabla N°1 Propiedades Físicoquímicas de la celulosa. (Focus Technology Co., 2012)

2.2 CELULOSA VEGETAL

El proceso de obtención de celulosa vegetal llamado Kraft se inicia con la cosecha de árboles donde existen dos métodos de cosecha uno el método tradicional (apeo con motosierra) y el método con cosechadora mecánica donde una maquina corta, saca la corteza, la corta en trozos más pequeños y la transporta. La corteza se utiliza para alimentar calderas, la madera es cortada en trozos pequeños llamados chips que se acopian en pilas, astillas procedentes de las pilas de acopio se impregnan de vapor de agua para eliminar el contenido de aire que puedan tener, luego se llevan a un digestor continuo para la etapa de cocción donde se mezclan los chips con una solución llamada licor blanco que es un producto a base de soda caustica y sulfuro de sodio que ayuda a disolver la lignina, entre la presión la temperatura y el licor blanco se logra la separación de la celulosa resultando licor negro y celulosa, la pasta que sale de la cocción es de color marrón por contener restos de lignina y licor negro los cuales se eliminan en diferentes etapas de lavado en donde se utiliza un tratamiento con oxígeno llamado deslignificación, la pasta se lava y se blanquea con dióxido de cloro luego se lleva a secar por absorción y presión y se embala. (Upm, 2009)

2.3 CELULOSA BACTERIANA

La celulosa microbiana también llamada celulosa bacteriana (CB) es un polímero extracelular sintetizado principalmente por bacterias del género *Acetobacter*, en la naturaleza la celulosa bacteriana es secretada sobre las colonias de microorganismos actuando como una capa protectora contra las condiciones ambientales perjudiciales, ésta juega múltiples roles en su crecimiento y supervivencia. La membrana de celulosa previene la deshidratación de los sustratos naturales como en el caso de la fruta podrida, reteniendo humedad cerca de las células bacterianas, su poca transparencia a la luz ultravioleta proporciona protección contra los efectos dañinos de la radiación solar así como también previene la colonización del sustrato natural por organismos competidores como mohos y otras bacterias. (Jonas, 1998) (Dufresne, 2013).

CB fue descrita por primera vez en 1886 por J. Brown donde expuso el descubrimiento de una película que se formaba en fermentaciones acéticas, cuando aisló el microorganismo y lo cultivó en condiciones apropiadas se produjo una capa gelatinosa translúcida en la superficie del líquido, que por medio de diferentes ensayos de identificación como celulosa así gracias a la habilidad de formar celulosa la “planta del vinagre” fue denominada como bacteria xylinum (del griego Xýlinalína, que significa tejido de madera). A pesar de haber sido descrita en 1886 la CB ha atraído más atención en las décadas recientes, y el creciente interés en este material es debido a sus propiedades y aplicaciones. (Dufresne, 2013)

La CB es preferida sobre la celulosa vegetal a pesar de tener la misma estructura difiere en sus propiedades por su mayor pureza y exhibir un mayor grado de polimerización e índice de cristalinidad, además de contar con mayor resistencia a la tracción y tener mayor capacidad de retención de agua, las fibras de CB son 10 veces más delgadas que las de celulosa vegetal por lo que es un material muy poroso. (Shoda, 2005). Este exopolisacárido es producido por varias especies de bacterias así como el género *Gluconacetobacter* (anteriormente *Acetobacter*), *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina* y *Salmonella*. (Shoda, 2005) entre otras.

Agrobacterium es un microorganismo patogénico que infecta a las plantas, utiliza celulosa para unir sus células a las células de la planta anfitriona. Igual que para *Agrobacterium* la celulosa tiene el mismo rol en especies *Rhizobium* en el proceso de fijación planta microorganismo. (Matthyse, 1995).

Organismos eucariotas como hongos, amebas y los árboles producen celulosa como parte de la estructura básica de sus paredes celulares. En animales capaces de producir celulosa tenemos a los tunicados, y en algas *Valoniaventricosa* un alga verde que produce una de las formas cristalinas más perfectas en la naturaleza. Sin embargo la celulosa hinchada en forma membranosa se sintetiza solo por bacterias y en abundancia por el género *Gluconacetobacter*. (Brown, 2004)

2.4 GENERO GLUCONACETOBACTER

El nombre de *Gluconacetobacter* deriva del nuevo latín: Acidum gluconicum, ácido glucónico, del sustantivo latín: Acetum, que significa vinagre y del nuevo latín: Bacter. (IJSEM, 1998)

La clasificación taxonómica se presenta a continuación:

Reino	Bacteria
División	Proteobacteria
Clase	Alfaproteobacteria
Orden	Rodospirillales
Familia	Acetobacteraceae
Género	Gluconacetobacter

Tabla N°2 Clasificación taxonómica del genero *Gluconacetobacter*.
(Yamada, 2005)

El género *Gluconacetobacter* (*Gab*), fue descrito por primera vez en 1997 nuevas especies han sido descritas desde entonces, los microorganismos pertenecientes a este género son Gram negativos aeróbicos, en la naturaleza las especies de *Gab* son encontradas en vinagres, caña de azúcar, cochinilla, flores y frutas en descomposición. (Dufresne, 2013), no son patógenos para humanos y animales tienen forma de varilla y se pueden encontrar solos o en pares, su tamaño es de aproximadamente 0.8 a 4.5 μm de largo y de 0.4 a 1 μm de ancho (Blasco, 2009), forman colonias blancas cremas a pardas de aspecto mucoso (Andelib, 2009) entre las principales especies tenemos:

2.4.1 GLUCONACETOBACTER DIAZOTROPHICUS

Es una bacteria endófito fijadora de nitrógeno se encontró originalmente en la caña de azúcar, esta bacteria tiene la capacidad de fijar nitrógeno en presencia de NO_3^- (10 mM) hasta pH3 se conoce que produce sustancias que estimulan el crecimiento vegetal, se ha estudiado que *G.diazotrophicus* puede excretar más del 50% del nitrógeno fijado de forma asimilable para la planta. (Rojas, 2007)

Se presenta como un bacilo con un tamaño de 0.7 X 2um con extremos redondeados y flagelos laterales pertenece a las bacterias Gram negativas como toda la familia *Gab*, forma periciclo de polisacáridos y produce colonias carmelitas en agar papa no presenta actividad nitrato reductasa y emplea diferentes azúcares como fuente de carbono. (Loiret, 2004)

2.4.2 GLUCONACETOBACTER HANSENI

Presenta pared celular con polisacáridos, crea colonias blancas opacas lisas y secas, se desarrollan a un pH de 3 a 4, convierten el etanol en ácido acético, sus fuentes de carbono incluyen alcoholes de azúcar como sorbitol, glicerol o manitol y hexosas como fructosa y glucosa. Producen celulosa en pequeñas cantidades lo que puede afectar a las fermentaciones alcohólicas como en el caso del vino, donde por lo general las levaduras producen dióxido de carbono inhibiendo el crecimiento de las bacterias acéticas pero cuando el crecimiento de la levadura disminuye (en el caso de deficiencia de nutrientes) entonces *Gluconacetobacter hansenni* puede crecer con vigor y dominar el medio resultando la formación de ácido acético y la formación de polisacáridos que afectan a nivel del filtrado. (University of California, 2014)

2.4.3 GLUCONACETOBACTER LIQUEFACIENS

En forma de varilla presenta colonias cremas en forma circular, formadora de películas crece en etanol produce ácido acético necesita oxígeno para la conversión, produce ácido ascórbico. Se la encuentra en la naturaleza en frutas, flores, frutas podridas especialmente en ambientes donde la presencia de alcohol prohíbe el crecimiento de otros microorganismos. Es una especie que se presenta como un problema en enología pues se presenta al final de la fermentación alcohólica deteriorando el vino convirtiendo el etanol en ácido acético. (Guillamon, 2008)

2.4.4 GLUCONACETOBACTER XYLINUS

Conocida por muchos años como *Acetobacter Xylinus*, esta bacteria ha pasado por muchos cambios de nombre en los últimos años, su clasificación se hizo en 1997 y es conocida como la especie de mejor capacidad de producción de celulosa. *Gluconacetobacter xylinus* se encuentra naturalmente en las frutas en estado de putrefacción, es una bacteria aerobia estricta en forma de varilla que puede estar sola o agrupada en pares cadenas o pequeños grupos, no presenta flagelo sin embargo se puede apreciar movimiento en algunas cepas durante la formación de celulosa, presenta un tamaño variable mayor a 2 μm , en muchos casos está presente en la interfase aire-medio donde su presencia puede ser detectada si es que produce una película de celulosa. (Gama, 2012).

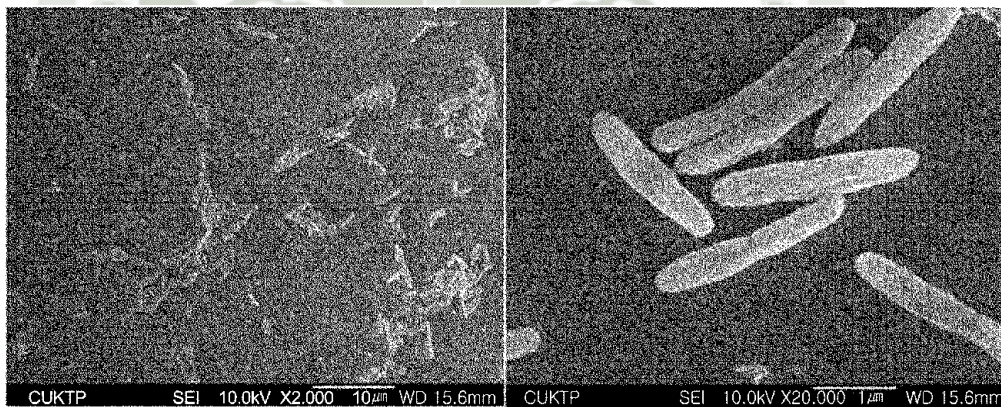


Figura N° 3 Microfotografía de *Gluconacetobacter xylinus*
(Jeonju - Korea Patente n° WO2013073722 A1, 2013)

2.5 IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

Los métodos de identificación bacteriana nos permiten determinar a qué especie pertenece una determinada cepa para ello se determinan y comparan diferentes características en el laboratorio. (Diaz, 2012).

La identificación puede realizarse mediante el estudio de características morfológicas, respuesta a tinciones y resultados de pruebas bioquímicas que se aplican a los microorganismos. (Gamazo,C., López-Goñi, I. y Diaz, R., 2005)

Al observar las bacterias en el microscopio se puede evidenciar el tamaño, forma y determinadas características de los principales grupos de bacterias. Según la forma pueden ser esféricas o cocos, alargadas o bacilos, y curvadas o espirilos. (Díaz, 2012). La técnica de tinción por excelencia para diferenciar morfología y taxonomía es la coloración de Gram, un sistema de dos tinciones simples sucesivas, separadas por una fase de decoloración selectiva que permite diferenciar las bacterias que retienen el primer color (Gram positivas) de las que no (Gram negativas) con lo que evidencia diferencias estructurales y fisiológicas entre ambos grupos de bacterias. (Pisabarro, 2009)

La identificación bioquímica de las bacterias se basa en la habilidad de las bacterias de modificar su medio ambiente absorbiendo sustancias necesarias para su desarrollo producir enzimas o liberar metabolitos como exotoxinas. (Gamazo, C., López-Goñi, I. y Díaz, R., 2005) Las bacterias del ácido acético son Gram negativas, se pueden ver Gram positivas en cultivos viejos, son bacilares y estrictamente aerobias y se las puede diferenciar en los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*, según tengan capacidad o no de oxidar el acetato (presencia del ciclo de Krebs funcional) pueden considerarse filogenéticamente próximas al grupo *Pseudomonas*. (Parés, R., Juárez, A., 2012)

Características	<i>Gluconobacter</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>
Flagelación	Polar o ninguna	Perítrica o ninguna	Polar
Crecimiento a pH 4.5	Positivo	Positivo	Negativo
Oxidación de:			
Etanol a ácido acético a pH 4.5	Positivo moderado	Positivo	Negativo
Ácido acético a CO ₂	Negativo	Positivo	Según la cepa
Lactato a CO ₂	Negativo	Positivo	Positivo
Glucosa a gluconato	Positivo	Según la cepa	Según la cepa
Cetogénesis	Positivo	Según la cepa	-
Quinonas Q1	Positivo	Negativo	-
Quinonas Q9	Negativo	Positivo	-
Hidrolisis de:			
Lactosa y almidón	Negativo	Negativo	Según la cepa
Gelatina	Negativo/D	Negativo	Según la cepa
Pigmentos verdosos y/o fluorescentes	Negativo	Negativo	Según la cepa

Tabla N°3 Características diferenciales de los géneros *Gluconacetobacter*, *Acetobacter* y *Pseudomonas*. (Parés, R., Juárez, A., 2012)

Las bacterias acéticas pueden aislarse de la cerveza, vinagre, vino o zumos de fruta agriados y sembrar suspensiones en agar CaCO₃ después de una incubación a 30°C de 2 a 7 días las colonias pueden ser reconocidas por clarificar el medio a su alrededor.

Las bacterias positivas para este test pueden ser sometidas a otras pruebas bioquímicas como son catalasa, oxidasa, indol, fermentación de azúcares, urea, utilización de citrato, crecimiento en glutamato y manitol, hidrolisis de gelatina, glicerol.

2.6 CONSERVACIÓN DE CEPAS

La conservación se puede dar a diferentes temperaturas, almacenamiento a 37°C, hibernación a 4°C y criopreservación a -130 o más, la criogenia según la

RAE se define como el estudio de los procesos que se producen a temperaturas extremadamente bajas, en este caso la conservación de bacterias se plantea a una temperatura de 4°C la cual no es muy difícil de conseguir por contar con el equipo necesario, se debe tener en cuenta los siguientes objetivos: que el cultivo sea puro para que no existan contaminaciones durante el proceso de conservación, que al proceso de conservación sobrevivan al menos 70 a 80% de las células y que dichas células permanezcan genéticamente estables es por ello que existen varios métodos de conservación para microorganismos en búsqueda de estos objetivos, en el caso del congelamiento existen algunos factores que influyen en la viabilidad que son la edad de las células, es conveniente utilizar las que se encuentren en fase estacionaria, velocidad de congelamiento la cual debe ser preferiblemente no muy rápida, la temperatura de almacenamiento que debe ser lo más baja posible incluso se utiliza nitrógeno líquido a una temperatura de -195°, y el empleo de criopreservantes como el glicerol que penetra pared y membrana celular y cuya afinidad por el agua molecular hacen que esta quede atrapada en su interior impidiendo el daño a la célula por la formación de cristales de agua. (Garcia, 2005) (Sanchez, 2005)

2.7 BIOSÍNTESIS DE CELULOSA BACTERIANA

La celulosa bacteriana es producida en condiciones aerobias, pH bajo (3.5 – 6.0), temperatura alrededor de 30°C, y recursos de nutrientes adecuados. La biosíntesis de celulosa por *Gab* es un proceso complejo que involucra la polimerización de monómeros de glucosa y su excreción al medio ambiente externo, la ruta metabólica para la síntesis de celulosa microbiana comienza con la conversión del sustrato, usualmente una fuente de carbono como glucosa que es fosforilada a glucosa-6-fosfato (Glc-6-P) reacción catalizada por glucoquinasa, seguida de la isomerización de este intermedio a Glc-a-1-P, catalizada por fosfoglucmutasa y la conversión de este metabolito por UDP Glc pirofosforilasa a uridina difosfato glucosa (UDP Glucosa) precursor de la celulosa, UDP glucosa es el sustrato para la enzima celulosa sintasa, UDP glucosa sufre la acción catalítica de la celulosa sintasa, resultando en la

formación de enlaces β - 1,4 entre los monómeros de glucosa. (Chawla, 2009) (Ross, 1991).

El complejo enzimático celulosa sintasa está asociada con los poros en la superficie de la membrana externa de la célula bacteriana donde se lleva a cabo la polimerización, después de la polimerización la celulosa es secretada por los poros. Cada poro expulsa cerca de 16 cadenas, o fibrillas elementales con un grosor de 1.5 nm hacia el medio de cultivo las fibrillas elementales se agregan entre si posiblemente a través de enlaces puente hidrogeno para formar una red tridimensional con otras fibrillas elementales promoviendo la formación de microfibrillas. La agregación de microfibrillas produce una cinta ensamblada con un ancho de 40 – 60 nm los extremos de la cinta se curvan sobre si misma debido a la viscosidad del medio esto combinado al desplazamiento de bacterias este movimiento envuelve la cinta y crea fibras que son arrastradas por las bacterias a través del medio de cultivo. El paso cruzado de estas bacterias produce enredo creando así tales fibras. (Dufresne, 2013).

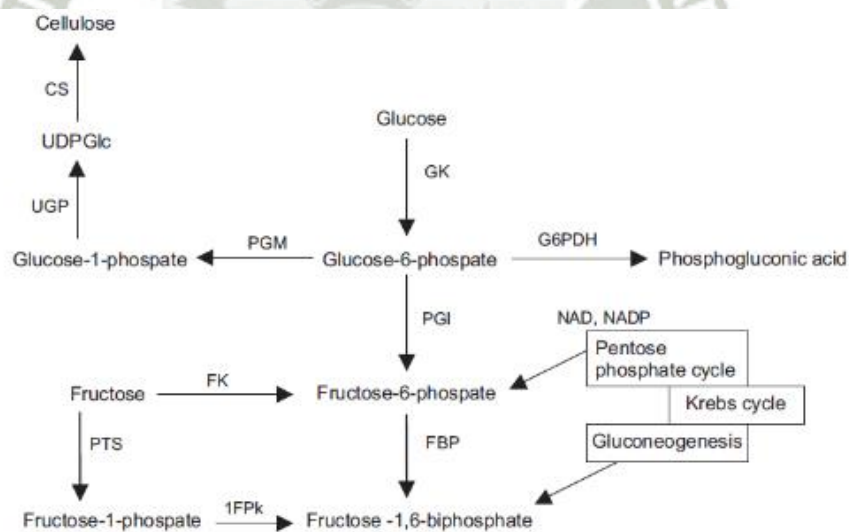


Figura N°4 Ruta Bioquímica para la síntesis de celulosa por *Gluconacetobacter sp.*

CS Celulosa sintasa, GK glucoquinasa, FBP fructosa-1,6-bi-fosfato fosfatasa, FK fructoquinasa, 1FPk fructosa-1-fosfato quinasa, PGI fosfoglucoisomerasa, PGM fosfoglucomutasa PTS sistema de fosfotransferasa, UDP pyrofosforilasa

uridina difosfoglucosa UDPGlc uridina difosfoglucosa G6PDH glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, NAD nicotinamida adenina dinucleotido, NADP nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (Chawla, 2009)

El proceso de biosíntesis y de polimerización le confiere a la celulosa microbiana una estructura de red tridimensional. La estructura de celulosa microbiana es responsable de algunas propiedades como la resistencia mecánica, alto contenido de agua, alto grado de cristalinidad, y de alta pureza, además de estas propiedades la estructura nano y microfibrilar dota a la membrana mojada de un aspecto de gel hinchado, la membrana húmeda está compuesta de entre 0.5 y 1% en peso en masa de celulosa y 99% o más en peso puro en masa de agua. (Dufresne, 2013)

2.8 EFECTOS DE LOS COMPONENTES DEL MEDIO Y FACTORES AMBIENTALES EN EL CRECIMIENTO DE *GLUCONACETOBACTER SP.*

El crecimiento de *Gab* y la producción de celulosa depende de optima combinación de fuentes de nutrientes incluyendo carbono, nitrógeno, sales minerales, grandes cantidades de celulosa bacteriana son producidos por diferentes cepas en sustratos como glucosa, fructosa, manitol, sucrosa y glicerol. (Dufresne, 2013). El efecto de la concentración inicial de glucosa en la producción de celulosa es importante ya que la formación de ácido glucónico como un subproducto en el medio disminuye el pH del cultivo y en última instancia disminuye la producción de celulosa. Se ha estudiado el rendimiento de celulosa en diferentes concentraciones iniciales de glucosa 6, 12, 24 y 48 g/L para los cuales se encontró que el consumo fue de 100, 100, 68 y 28 % de la concentración inicial respectivamente. (Chawla, 2009)

El etanol se puede utilizar como fuente de carbono adicional y también puede ayudar a degenerar las células no productoras de celulosa, la adición de etanol incrementa la producción de celulosa de 1,30 a 2,31 g/L en *Gab Hansenii*. (Chawla, 2009)

El nitrógeno es un componente principal de las proteínas necesarias en el metabolismo celular y comprende de 8 a 14 % de la masa seca de las bacterias se ha reportado que utilizando hidrolizado de caseína se obtiene 5g/L de CB y cuando se usa peptona se obtiene 4.8g/L de CB en *Gab Xylinus*. (Chawla, 2009). La adición de nitrógeno extra favorece la producción de biomasa, pero disminuye la producción de celulosa. La masa de CB producida a partir de diferentes medios de cultivo está relacionada a la las limitantes del sustrato de la vía metabólica de biosíntesis de celulosa. (Dufresne, 2013)

Ha sido estudiado también el efecto de las concentraciones de extracto de levadura en el crecimiento microbiano y la producción de celulosa en medios con diferentes fuentes de carbono; el extracto de levadura se añade al medio en un rango de 5 a 60 g/L mientras las fuentes de carbono esta alrededor de 20g/L el medio que contuvo 40 g/L de extracto de levadura arrojó la máxima concentración de celulosa 6.7g/L. (Yang, 1998).

En general la estructura y morfología características de la CB no son afectadas drásticamente por la fuente de nutrientes. Se puede observar algunos pequeños cambios cuando se utiliza glicerol como sustrato, en particular en el grado de cristalinidad y capacidad de retención de agua. Cuando se utiliza glicerol como sustrato en cultivos agitados, los pellets de CB presentan una estructura más densa y reticulada que los del medio con glucosa. Esto probablemente debido a las diferencias en cristalinidad y grado medio de polimerización. Sin embargo mediante difracción de rayos x se evidencia la preservación del espaciado en las regiones cristalinas.

Los microorganismos responden rápidamente a los cambios medioambientales en el caso de la temperatura que es un parámetro crucial afecta tanto el crecimiento como la producción de celulosa, en la mayoría de casos la producción máxima de celulosa fue obtenida entre 28 y 30 °C.

En el caso del pH el ratio optimo se encuentra en el rango entre 4.0 a 6.0, el rendimiento de producción de celulosa disminuirá por debajo de pH 4, el pH disminuye durante la producción fermentativa a causa de la acumulación de

ácido glucónico acético o láctico en el medio de cultivo por lo que es importante controlar este parámetro durante la fermentación aunque esto es bastante complicado por tratarse de un medio viscoso donde a menudo al hacer la lectura este se adhiere al sensor ocasionando lecturas de pH inexactas. (Carreño, 2011)

2.9. MEDIO HESTRIN-SCHRAMM

Medio descrito por Hestrin y Schramm, contiene glucosa 2.0 % como fuente de carbono, peptona 0.5%, extracto de levadura 0.5%, ácido cítrico 0.115 %, Na₂HPO₄ 0.27% y en el caso del medio solido 1.5% de agar. (Hestrin, 1954). Las principales fuentes de nitrógeno en este medio para los microorganismos son peptona, extracto de levadura y NH₄SO₄ este último actúa como buffer.

2.10 MEDIO DE PIÑA

La piña (*Ananas comosus* L.) es originaria de una amplia zona de América tropical y una de las frutas tropicales más importantes en el mercado mundial.

A continuación se presenta la clasificación taxonómica de esta fruta.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Bromeliaceae
Familia	Bromeliaceae
Género	Ananas Mill
Especie	Comosus (L.)

Tabla N°4 Clasificación Taxonómica de la piña (*Ananas comosus* L.)
(SIOVM, 2011)

Entre los componentes de nutritivos de la piña se destacan los ácidos orgánicos cítrico y málico responsables de su sabor ácido, además contiene bromelina, y si la fruta es madura contiene alrededor de 11% de hidratos de carbono la vitamina más abundante es la C también es importante su contenido en yodo y algo menos apreciable el de potasio magnesio y hierro, la porción comestible de la fruta es de 57 gramos por cada 100 gramos de producto fresco. (Consenso de la sociedad española de nutrición comunitaria, 2010)

El medio está compuesto por 1.7 kg/L, té verde 7 g/L, sacarosa 100g/L, este medio de cultivo es utilizado como medio para obtención de celulosa debido a su valor de pH adecuado además de producir ácido cítrico que en concentración adecuada aumenta la producción de celulosa, contiene también bromelina enzima que le puede adicionar propiedades cicatrizantes. (Moretti, 2013).

2.11 OTROS MEDIOS DE CULTIVO

Algunos subproductos y residuos a partir de la industria maderera y agroforestal pueden ser usados para la producción de CB proveyendo los nutrientes esenciales para los microorganismos. La CB puede ser obtenida de agua residual de lavado de papas, jugo de uva, jugo de naranja, melazas y otras fuentes.

Además del alto rendimiento de celulosa producida a partir de estas materias primas, algunas propiedades como el contenido de agua las propiedades térmica y mecánica, y el grado de cristalinidad están muy conservadas en comparación con la celulosa producida usando medios de cultivo como HS.

La producción de celulosa microbiana a partir de medios compuestos de desechos residuos o subproductos pueden disminuir costos y contribuir con el medio ambiente, sin embargo un análisis más detallado debe ser llevado a cabo sobre la composición de los residuos y los posibles contaminantes sobre todo cuando el producto se aplica a campos biomédicos. En el caso de residuos oscuros se obtiene membranas oscuras. (Dufresne, 2013)

2.12 CULTIVO DE CB UP STREAM

La forma y la estructura de la celulosa bacteriana permiten su aplicación en campos específicos y altamente tecnológicos la producción industrial de CB con agitación podría ser una ventaja para ciertos propósitos industriales puesto que los pellets formados en este tipo de cultivo evita la molienda y ahorra energía en cambio el costo de producción en cultivo estático a menudo no es aplicable a gran escala sin embargo algunas aplicaciones son dependientes de su forma membranosa es así que la decisión del proceso de producción debe estar en relación con la aplicación de la celulosa bacteriana. (Dufresne, 2013)

2.12.1 CULTIVO ESTÁTICO

En este tipo de cultivo una película es producida en la superficie del caldo de fermentación su producción se ve afectada por la relación de área y volumen, puesto a que el área por encima del cultivo tiene relación con el aumento del espesor de la capa, si el oxígeno disuelto se ve reducido la producción de CB será inhibida. La CB sintetizada por el método estático se puede lograr a través de un proceso de uno o dos pasos. En el proceso de un solo paso el medio se inocula y luego se cultiva estáticamente por los días establecidos. En el método de dos pasos antes del cultivo estático se obtienen cepas con crecimiento masivo y de alta vitalidad a través de un cultivo con incubación aerobia. Este proceso hará mejorar el rendimiento de celulosa y acortar el ciclo de fermentación. (Chen, 2014)

2.12.2 CULTIVO DINÁMICO

En cultivos agitados la CB se presenta como filamentos, flóculos estrellados irregulares o bultos en el caldo de fermentación, pero debido a la aglomeración de celulosa es que la bacteria no es capaz de producir en un cultivo bajo agitación y aireación pues resulta en una declinación de la producción final de celulosa. Bajo este contexto se busca mejorar el rendimiento de la producción de celulosa, varios tipos de reactores han sido probados en un intento de reducir el estrés en las células bacterianas y aumentar la tasa de transferencia de oxígeno

así tenemos en un fermentador con agitación mecánica, se ha reportado que en este tipo de reactores con impeler se obtiene un micro filamento baboso, en reactores de 50 L con gas de circulación se ha encontrado que se puede obtener 3.8 g/L en 67 h de fermentación que es el doble que en el cultivo agitado por impeler, aquí la celulosa bacteriana se presenta como micelas ovaladas individuales, y si el aire es enriquecido la producción se duplica. (Chen, 2014)

En este tipo de cultivo se toma en cuenta el ajuste de parámetros tales como la velocidad de agitación, velocidad de transferencia de oxígeno, el número inicial de células viables, pH, la temperatura, estrés bacteriano el volumen y el diseño del reactor. Actualmente se sigue en la búsqueda de un tipo de reactor que pueda brindar las ventajas necesarias para una producción mayor. El desarrollo de reactores a gran escala para pellets resulta ventajoso económicamente si se requiere de grandes cantidades de celulosa como en la industria textil. (Dufresne, 2013)

2.13 PURIFICACIÓN DOWN STREAM

La purificación de celulosa bacteriana se encuentra en ventaja comparada con la celulosa vegetal, BC es de alta pureza es más amigable con el medio ambiente y demanda menos energía que la purificación de celulosa vegetal.

La celulosa bacteriana es una sustancia que tiene apariencia de gel hinchado los microorganismo que la producen se encuentran libres en el medio o unidos a la superficie de las fibras de la membrana. La purificación de este tipo de celulosa se basa en matar a los microorganismos y la eliminación de desechos celulares y los residuos del medio de cultivo líquido de la matriz de celulosa. Constituye un paso crítico para la calidad de la celulosa y sus derivados.

La purificación se realiza mediante lavado múltiple con solución de hidróxido de sodio caliente seguido de lavado con agua hasta la neutralización del pH, el proceso de lavado debe adecuado estará en relación a la aplicación deseada de la celulosa. Los contaminantes normalmente se encuentran en la membrana son bacterias sales y residuos del medio de cultivo estos contaminantes pueden

cambiar algunas propiedades de la celulosa bacteriana como el comportamiento mecánico o térmico. La esterilización con vapor de agua puede ser un proceso útil para el acabado de la purificación en membranas que tendrán aplicaciones médicas también se realiza irradiación gamma ambos métodos son eficientes y no cambian significativamente la estructura y propiedad del material. (Dufresne, 2013)

2.14 REPRODUCCIÓN Y CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO

En el estudio de los microorganismos, el crecimiento se define como el incremento del número de células (Madigan, 2003) desde el punto de vista individual se hace referencia al ciclo celular y desde el punto de vista poblacional incluye la cinética del crecimiento.

2.14.1 CICLO CELULAR PROCARIÓTICO

Es la secuencia de acontecimientos que en la mayoría de los procariotas comienza con la formación de una célula nueva y termina cuando dicha célula se divide para formar dos células hijas. (Granada, 2005) Este proceso se denomina fisión binaria, durante el ciclo de crecimiento la totalidad de constituyentes celulares aumenta de modo que cada célula hija obtiene de la madre un cromosoma completo y una copia de todas las macromoléculas monómeras e iones inorgánicos que hacen que pueda existir como célula independiente. (Madigan, 2003) . La fisión binaria comienza con la replicación del ADN cromosómico, en procariotas es una sola molécula circular que se abre en el punto de origen de replicación formando una burbuja de replicación, luego de que esto ocurre el ADN duplicado migra hacia el polo opuesto de la célula que aumenta de tamaño hasta casi el doble del original, se forma un anillo reclutando las proteínas necesarias que a su vez dirigen la pared celular y la membrana plasmática hacia el interior formando un septo mediante el cual la célula se divide en dos. (Weiss, 2004)

2.14.2 CRECIMIENTO POBLACIONAL

Está definido por el aumento de la masa bacteriana de una población, la velocidad de crecimiento es el cambio en el número de células por unidad de tiempo, el intervalo para la formación de dos células a partir de una supone una generación, y el tiempo transcurrido para que esto ocurra se denomina tiempo de generación. Durante cada generación se duplican, la masa y el número de células, y todos los componentes estructurales, este tiempo varía para los diferentes microorganismos. (Madigan, 2003)

2.14.3 FASES DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

En la figura N°5 se puede observar las fases del crecimiento microbiano así tenemos:

- a) Fase I (lag phase) o también conocida como fase de adaptación en la que no hay crecimiento microbiano pero si se presenta metabolismo microbiano activo eso quiere decir que asimilan el sustrato y lo procesan según sus necesidades.
- b) Fase II (log phase) es la fase exponencial en donde se da duplicación en forma acelerada, en el caso de bacterias este tiempo va de 20 min a 20 h y el intervalo de tiempo es menor a 1h.
- c) Fase III (estacionaria) en esta la velocidad de división celular decrece de tal forma que el número de muertes microbianas compensa el de células nuevas y la población se estabiliza la actividad metabólica disminuye durante esta fase.
- d) Fase IV (fase de muerte celular) también llamada fase de declive donde el número de muertes supera el nacimiento de nuevas células, en esta etapa ya no es posible la división celular por lo tanto las células mueren y su población decrece exponencialmente. (Fogler, 2004)

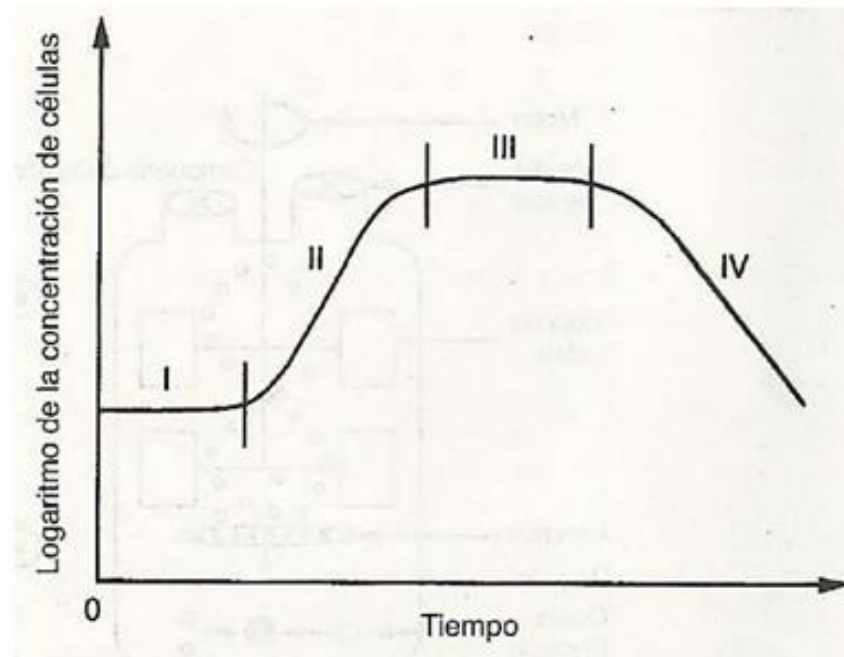


Figura N° 5 Gráfica Log de la concentración celular vs tiempo

2.14.4 MODELAMIENTO MATEMÁTICO

El crecimiento celular se puede modelar matemáticamente a modo de predecir el incremento de población en un cultivo microbiano, los microorganismos presentan un crecimiento con una elevada capacidad catalítica que puede ser descrita por el modelo matemático:

$$\frac{dx}{dt} = \mu \quad (1)$$

Figura N°6 Ecuación modelo matemático de crecimiento celular

Donde:

x: Concentración celular

μ : Velocidad específica de crecimiento

t: Tiempo de crecimiento

La representación gráfica de dicha ecuación diferencial se puede apreciar en la Figura N°5. La velocidad específica de crecimiento μ se puede obtener por medio de la ecuación de Malthus. (Fogler, 2004)

$$\mu = \frac{rx}{x} \quad (2)$$

Figura N°7 Ecuación de Malthus

Donde:

rx: biomasa

x : Concentración celular

u: Velocidad específica de crecimiento

Y rx se halla mediante la ecuación:

$$rx = \frac{x_2 - x_1}{t_2 - t_1} \quad (3)$$

Figura N°8 Velocidad de crecimiento de biomasa

Donde:

x1 es la biomasa en un tiempo t1

x2 es la biomasa en un tiempo t2

2.15 CARACTERIZACIÓN DE CELULOSA

2.15.1 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA CELULOSA

A) MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

La microscopia electrónica de barrido MEB es una técnica de análisis superficial que consiste en enfocar sobre una muestra electrodensa un fino haz de electrones excitados con energía que va desde 0.1 kV hasta 30 kV este haz es producido por una fuente de electrones que puede ser un cañón termoiónico (filamento de tungsteno o de hexaboruro de lantano o un cañón de emisión de campo FEG de las siglas Field Emission Gun). Al cañón se le aplica un potencial eléctrico que acelera el haz de electrones hacia la columna, éste es

focalizado por medio de lentes electromagnéticas sobre la muestra (toda la trayectoria de los electrones debe estar en vacío, de lo contrario, los electrones colisionarían con las moléculas de aire y serán absorbidos). Los electrones chocan e interactúan con la muestra produciendo varias señales que podrán ser recogidas de acuerdo a los detectores presentes, este haz se desplaza sobre la superficie de la muestra realizando un barrido que obedece a una trayectoria de líneas paralelas la variación morfológica de la muestra emite diversas señales (electrones secundarios, electrones retrodispersados, emisión de rayos X, etc.) que son recogidas por distintos detectores; los cuales permiten la observación, caracterización y microanálisis superficial es de materiales tanto orgánicos como inorgánicos. La amplificación de la imagen se produce por un conjunto de lentes electromagnéticas que mediante un tratamiento adecuado de las señales electrónicas son proyectadas en un tubo de rayos catódicos (CRT) Para analizar una muestra se debe realizar los siguientes procedimientos Fijación, deshidratación, metalización con oro. A muestras de aproximadamente 1x1 cm (Valencia, 2012)

B) ESPECTROSCOPIA DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X (EDX)

EDX siglas en ingles de X-Ray Energy Dispersive Spectrometry; cuando un electrón impacta con una muestra se pueden dar varios sucesos, uno de los cuales es que el electrón incidente choque con uno de los electrones locales de los orbitales internos y termine expulsándolo del átomo, el lugar que este ocupaba será ocupado por otro electrón de algún orbital externo, esta reestructuración deja al átomo con un excedente de energía y para solucionar esto el átomo emitirá un fotón de rayos X. La radiación producida tiene una propiedad fundamental y es que la energía de los fotones emitidos se encuentra directamente relacionada con el peso atómico del elemento emisor esto porque la diferencia de energía entre orbitales aumenta según el peso atómico debido principalmente al incremento del número de protones en el núcleo es así que se puede asociar el valor de la energía emitida con un elemento de la tabla periódica, si bien el análisis arroja resultados bastante confiables de análisis

cualitativo con un margen de error menor a 5% el margen de error para el cuantitativo es de 20% comparando los resultados con tablas de constantes previamente determinadas experimentalmente. (Martinez, 2010)

C) ESPECTROSCOPIA FT-IR

La espectroscopia IR ayuda a comprender la estructura química de la celulosa puesto a que esta absorbe la radiación infrarroja a una longitud específica característica de diferentes grupos químicos, , además FTIR es una de las más poderosas herramientas para el estudio de puentes hidrogeno y ayuda a identificar los enlaces intramoleculares de la celulosa y sus derivados.

El espectro FT IR de CB revela el perfil típico similar al que se presenta en la celulosa vegetal, las bandas de absorción alrededor de 3300 / cm se asocian con las vibraciones del grupo OH y las bandas a 22890 / cm se atribuyen a los enlaces C-H Las bandas en 1600 y 1100 / cm se asocian con la vibración de los grupos C-O-C , bandas en 1157 / cm se deben al estiramiento anti simétrico del enlace C-O, la banda a 1642 / cm se origina a partir de la flexión H-O-H del agua absorbida, de los espectros FT IR es posible inferir el grado de cristalinidad de la celulosa Las bandas de 4000-2995 / cm, 2900 / cm, 1430 / cm, 1375 / cm y 900 / cm son especialmente sensibles al orden molecular de la celulosa. La forma de estas bandas se relaciona con el orden o desorden en la morfología del polisacárido y está relacionada con la cantidad de celulosa cristalina frente a fracciones amorfas. (Dufresne, 2013)

2.15.2 PROPIEDADES MECÁNICAS Y DE TRANSPORTE

A) TRACCIÓN

El ensayo de tracción mide la resistencia a la tracción de un material que es la resistencia de una tira del material denominada probeta, tomada entre dos mordazas que se separan entre ellas como indica la Figura N°9. El dinamómetro digital controla la velocidad del aumento de fuerza y registra la fuerza que se aplica durante todo el ensayo. (Nuñez, 2004)

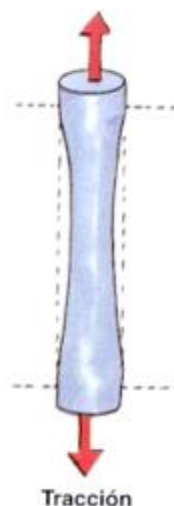


Figura N° 9 Probeta sometida a tracción las flechas rojas indican el sentido de la tracción. (Moreno, 2007)

B) GRADO DE HINCHAMIENTO

Una red polimérica tridimensional absorbe grandes cantidades de agua o fluido con el que se pone en contacto, durante el hinchamiento las cadenas que conforman la red sufren elongación, esta dilatación es acompañada de una fuerza retráctil en oposición al hinchamiento donde las cadenas de la malla ejercen una fuerza sobre el líquido contenido en ella. A medida que la malla se hincha con el líquido esta presión aumentara hasta alcanzar el valor máximo de hinchamiento o de equilibrio cuando ambas fuerzas estarán balanceadas. La capacidad de esta membrana de absorber tiene múltiples utilidades como la absorción de ciertas sustancias de uso médico para quemaduras o heridas, incluso para absorción de residuos líquidos. (Infante, 2006)

2.15.3 IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA DE CELULOSA BACTERIANA

A) HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE CELULOSA

El mecanismo para explicar la hidrólisis de celulosa involucra la acción enzimática de tres enzimas: endo β 1,4 glucanasa, exo β 1,4 celobiohidrolasa y la β 1,4glucosidasa (Gaitan, 2007)

La endo β 1,4 glucanasa hidroliza aleatoriamente los enlaces β 1,4 glucosídicos intramoleculares accesibles de cadenas de celulosa para producir oligosacáridos de varias longitudes la β 1,4 celobiohidrolasa cliva los extremos no reductores del sustrato generando unidades de celobiosa o glucosa y por último la β 1,4 glucosidasa, que completa el proceso hidrolítico convirtiendo los fragmentos de celobiosa a glucosa o removiendo glucosa desde los extremos no reductores de pequeños celoligosacáridos (Gaitan, 2007)





CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo de investigación fue ejecutado en las instalaciones de los laboratorios H101 y H302 de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa, laboratorio R-102 del Programa Profesional de Ingeniería Mecánica Facultad de Ciencias e Ingenierías Físicas y Formales, Laboratorio de Equipamiento Especializado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, y en la Unidad de Servicios de Análisis Químicos (USAQ) de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.2 MATERIALES

2.2.1 Material biológico

- Arándanos
- Té

- Té verde
- Papa Blanca
- Piña Golden
- Manzana Israel
- Vino de uva

3.2.2 Material de vidrio

- Bagueta
- Beakers de 50 250 ml
- Cubreobjetos
- Frasco pírrex con tapa rosca 100 ml
- Frasco pírrex con tapa rosca 2 l
- Gotero
- Laminas portaobjetos
- Matraces Erlenmeyer : 250, 500ml
- Pipetas 1 ml, 5 ml
- Placas Petri 90 x 15 mm
- Probeta: 100 ml
- Recipientes pírrex 17cm x 20cm
- Tubos de ensayo 13 x 100 mm
- Tubo de ensayo 13 x 100 tapa rosca

3.2.3 Instrumentación y equipos

- | | |
|--------------------------------|-------------------------|
| • Autoclave | Tuttnauer 1730 M |
| • Balanza analítica | Ohaus Pionner |
| • Centrifuga para tubos Falcon | Mikro 120 |
| • Desecador | Electro M.S. EM 5850 |
| • Dinamómetro Digital | Liyi- Tech |
| • Espectrofotómetro | Shimadzu 160 A |
| • Espectrofotómetro FT-IR | Shimadzu IR Affinity -1 |
| • Sistema EDX | FEI Inspect S 50 |

- Estufa JP Selecta 200210
- Incubadora JP Selecta 200210
- Metalizador SPI 1143D3-AX
- Micrómetro Engels Merkel 40ER
- Microscopio Óptico PrimoStar Zeiss
- Microscopio Electrónico de Barrido FEI Inspect S50
- PH metro HI 2212
- Refrigeradora Coldex E-162

3.2.4 Medios de cultivo

- Medio HS
- Medio piña sacarosa
- Urea agar
- Citrato Simmons
- Caco3 agar
- Manitol agar
- Glutamato agar
- Gelatina
- Hugh Liefson
- SIM agar
- LIA
- TSI

3.2.5 Reactivos químicos

- Ácido cítrico C6H8O7
- Alcohol acetona CH3COCH3
- Agua H2O
- Agua destilada H2Od
- Agar-agar C12H18O9

• Carbonato de calcio	CaCO ₃
• Cloruro de potasio	KCl
• Cristal Violeta	C ₂₄ H ₂₈ N ₃ Cl
• D-glucosa	C ₆ H ₁₂ O ₆
• Dextrosa	C ₆ H ₁₂ O ₆
• Etanol	C ₂ H ₆ O
• Extracto de levadura	
• Fosfato de sodio dibásico	Na ₂ HPO ₄
• Fosfato de potasio monobásico	KH ₂ PO ₄
• Gelatina	
• Glicerol 10%	C ₃ H ₈ O ₃
• Glutamato de Sodio	C ₅ H ₈ NO ₄ Na
• Glutaraldehído 2%	C ₅ H ₈ O ₂
• Hidróxido de sodio 0.5 N	NaOH
• Lugol	
• Manitol	C ₆ H ₁₄ O ₆
• N,N-Dimetil-p-fenilendiamina (DMFD)	
• Peptona	
• Peróxido de hidrogeno	H ₂ O ₂
• Reactivo de Kovacs	HCl
• Sacarosa	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁
• Safranina	C ₂₀ H ₁₉ N ₄ Cl
• Solución de Benedict	
• Suero fisiológico	ClNa 0.9%
• Sulfato de magnesio	MgSO ₄ .7H ₂ O

2.2.6 Otros materiales

- Algodón medicinal
- Asa de Kolle
- Cortador
- Cubeta de cuarzo

- Espátula
- Jeringa hipodérmica 5ml
- Paños Absorbentes
- Papel aluminio
- Papel Kraft
- Pernos de ¼
- Plastifilm rollo 5m x 15 cm
- Recipiente de plástico 20cm x 20cm x 5cm
- Soporte de láminas portaobjeto
- Tijera
- Tubos Eppendorf
- Tubos Falcon 15 ml
- Tela de talega
- Placas Petri de plástico

3.3 MÉTODOS

2.3.1 OBTENCIÓN DE FUENTES POTENCIALES DE CEPA NATIVA

En la búsqueda de la cepa nativa de *Gab sp.* Se preparó 4 fuentes potenciales: Se realizó un remojo de arándanos, se preparó vinagre de manzana, se obtuvo una acidificación de vino de uva y se preparó te de Kombucha.

A) FUENTE DE ARÁNDANOS:

Se obtuvieron arándanos del mercado San Camilo de la marca El Majeñito se procedió a remojar 50 gr en 50 ml de agua hervida fría y se colocaron en frascos de vidrio autoclavados de 100 ml, los frascos fueron tapados con el fin de que ocurra una fermentación para potenciar el crecimiento de los microorganismos y luego se retiró la tapa de plástico y se colocó una tela que permitiera el paso del aire para que se obtuviera una acetificación de este fermento con el fin de incrementar la probabilidad de encontrar *Gab* estos frascos fueron colocados al medio ambiente en sombra por 25 días. El arándano fue seleccionado por

referencias bibliográficas al poseer una gran cantidad de carbohidratos 6.5 g/100 g. Lo que le permite al microorganismo usarla como fuente de carbono para su desarrollo.

B) FUENTE DE VINAGRE DE MANZANA

El vinagre de manzana es una fuente potencial de bacterias acéticas por contener los sustratos y el pH necesario para el crecimiento de este tipo de bacterias.

Se obtuvo 1kg de manzana de la variedad Israel y 1 kg de sacarosa del mercado san camilo se procedió a lavar la manzana se descorazonó y se trozó hasta obtener un tamaño de 1 cm luego se introdujo en un recipiente junto con la sacarosa y 3 litros de agua se revolvió y se procedió a tapar este envase con un globo para que se expandieran los gases de la fermentación esto por 10 días, después de este periodo se eliminó el mosto y se procedió a tapar con una tela que permitiera el intercambio de gases para poder obtener el ácido acético esto por 15 días revolviendo todos los días con una cuchara de madera. (Mundonatural, 2015)

C) FUENTE DE VINO

Se obtuvo vino Señorío Najar del supermercado plaza vea y se vertió 200 ml en un recipiente de vidrio, se colocó una cucharada de vinagre y se procedió a tapar con un paño para evitar que ingresen los insectos y permitir el intercambio gaseoso, después de 15 días se obtuvo una acetificación del vino.

D) FUENTE DE KOMBUCHA

Se obtuvo té de Kombucha y un SCOBY (Symbiotic colony of bacteria and yeast) de “Kombucha” de una persona que prepara esta bebida se procedió a realizar un cultivo de este colocándolo en una infusión fría hecha a base de 6 bolsas filtrantes de té con 50 g de azúcar rubia, se tapó y dejó en un lugar oscuro a temperatura ambiente por 15 días. (Illana, 2007)

3.3.2 AISLAMIENTO DE CEPAS

Una vez terminado el tiempo de acetificación, se procedió a tomar una muestra de cada una de las fuentes potenciales, utilizando un asa de Kolle, en el caso de la fuente de arándanos, vinagre de manzana y kombucha se formó una película en la superficie del líquido, de la cual se obtuvo una pequeña porción y en el caso del vino se tomó una gota de la muestra con el asa y se procedió a sembrar en placas de 90 x 15 mm que contenían medio agar Hestrin Schramm estéril, las placas fueron rotuladas de la siguiente forma Ar 1 Ar 2 Ar3 para arándanos, VM1 VM2 VM3 para vinagre de manzana, V1 V2 V3 para vino y K1 K2 K3 para Kombucha las placas fueron llevadas a la incubadora a 37°C por 7 días.

3.3.3 SELECCIÓN DE CEPAS

A) IDENTIFICACIÓN MACRO Y MICROSCÓPICA

Una vez obtenido el crecimiento de bacterias se seleccionaron las colonias con las características deseadas, colonias lisas regulares de color crema a beige y se realizó una primera tinción Gram con la cual se constató la presencia de bacterias Gram negativas en el caso de vinagre de manzana y vino, en el caso de arándanos se encontró colonias Gram positivas y negativas, en el caso de la cepa de kombucha se observó bacterias Gram negativas y Cianobacterias en los últimos 2 casos se repico dos veces más para purificar el cultivo.

Una vez obtenidos los cultivos puros, se sembró cada cepa por duplicado en placas con medio agar HS estas placas fueron llevadas a la incubadora por otros 7 días a 37 °C terminado el tiempo de incubación se procedió a realizar una nueva tinción de Gram que en la que se observó bacterias en forma de varillas Gram negativas para todos los casos.

B) CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS CEPAS

Después de la identificación macro y microscópica se obtuvo 4 cepas, Ar, VM, V y K, con potenciales características a las cuales a partir de un cultivo de 72 horas

se les realizo pruebas bioquímicas por triplicado en los siguientes medios:
(Andelib, 2009)

- AGAR CACO3 Se sembró en placas por estría durante 7 días, la presencia de ácido acético es revelada por la formación de una zona clara como un halo alrededor del crecimiento microbiano.
- SIM: Se sembró por punción con aguja de inoculación en línea recta a dos tercios de profundidad del medio de cultivo y se incubó verticalmente a 37° C por 48 horas.
- UREA: Se sembró por estría la superficie del pico de flauta y se incubó por 48 horas a 37 °C.
- TSI: Se sembró por picadura y estría a 37°C durante 48 horas
- CITRATO SIMMONS: Se sembró en tubos por estría en la superficie del medio y se incubo a 37°C durante 5 días
- OF: Se inoculo 2 tubos por cada muestra uno abierto y otro sellado con 2ml vaselina se sembró por picadura hasta aproximadamente 0.6 mm del fondo, se incubo por 5 días a 37°C
- CRECIMIENTO EN MANITOL se tomara una muestra de la colonia escogida con el asa de kolle y se hará un estriado en la placa
- CRECIMIENTO EN GLUTAMATO al igual que en manitol se tomara la muestra y se sembrara con el asa de kolle por estría.
- CATALASA Se colocó una gota de agua oxigenada sobre un portaobjetos con una pipeta Pasteur, se tomó una muestra con el asa de kolle y se suspendió en el agua oxigenada.
- OXIDASA Se colocó pedazos de papel filtro sobre la tapa de una placa Petri y se añadió una gota del reactivo de oxidasa (solución al 1% de NNN'N tetrametil, 1-4 fenilendiamina) en agua destilada.

- GLICEROL Se suspendió la muestra tomada con asa de kolle en un tubo con glicerina se tapó y se incubo estáticamente a 30°C por 10 días.
- GELATINA se inoculo por picadura hasta el fondo del medio tubos con gelatina nutritiva y fueron incubados por 5 días a 37°C

3.3.4 PREPARACIÓN DEL PREINOCULO

Se preparó medio liquido HS, se repartió en matraces de 250 ml, estos se llevaron al autoclave a 121°C por 20 minutos, se tomó una muestra a partir de las 4 cepas puras aisladas e identificadas en medio HS solido con asa de Kolle estéril y se procedió a inocular el medio líquido, el cual se encontró a pH 6.0 luego se llevó a incubación por 7 días a 30°C. Este inóculo se llevó a cabo con el fin de incrementar la biomasa y adaptar a las cepas para continuar con los siguientes pasos del proyecto, en este se controló la temperatura el pH y la concentración inicial de nutrientes lo que permite el crecimiento óptimo de la bacteria.

3.3.5 PRUEBA PRELIMINAR DE FORMACIÓN DE CELULOSA

Como parte de la caracterización de las bacterias se evaluó la capacidad de producción de celulosa de cada una de estas 4 cepas aisladas, esto se llevó a cabo preparando medio liquido HS a pH 6.0 esterilizándolo y llevándolo a recipientes de producción, pírex de 17 x 16.5 x 5 cm que contuvieron 300 ml de medio HS, estos fueron esterilizados a 121°C por 20 minutos, e inoculados con 10 ml del preinoculo, se taparon con Papel aluminio y se incubaron a 30°C por 10 días.

3.3.6 DETERMINACIÓN DEL PARÁMETRO DE ABSORTIVIDAD MOLAR DE LAS CEPAS VM Y K

Se procedió a realizar una escala de Mc Farland el patrón de turbidez se preparó añadiendo ácido sulfúrico a una solución acuosa de cloruro de bario en cantidades de 9.7 y 0.3 ml respectivamente, luego se suspendieron de 3 a 4 colonias seleccionadas de un cultivo puro de 72 horas en 50 ml de suero

fisiológico este caso para la cepa VM y la cepa K inmediatamente después se ajustó cada suspensión a la escala 3 de Mc Farland ambas suspensiones fueron llevadas al espectrofotómetro y medidas a 540 nm para poder hallar su absorbancia y coeficiente de absortividad molar (ϵ) con este último, utilizando la Ley Beer - Lambert se podrá calcular la concentración de muestras del cultivo para poder realizar la curva de crecimiento y hallar los parámetros correspondientes. (Escalante, 2002)

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C \quad (4)$$

Donde:

A= Absorbancia

ϵ = Coeficiente de absortividad molar

b = longitud de la cubeta en cm

C = Concentración de soluto en cel/ml

Figura N°10 Ley de Beer – Lambert

3.3.7 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Conociendo los resultados de las pruebas de formación de celulosa se procedió a preparar inóculos de las cepas VM y K, a partir de las placas del cultivo sólido, se realizó una suspensión bacteriana con turbidez igual al patrón 0.5 de la escala de Mc. Farland en matraces de 250 ml que contenían el medio líquido HS esterilizado a 121°C por 20 minutos, a pH 6.0, este inóculo se llevó a cabo con el fin de obtener un cultivo fresco y determinar la concentración para poder inocular el cultivo estático de producción de celulosa y poder evaluar la cinética de crecimiento de los microorganismos.

3.3.8 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL INÓCULO

Una vez preparado se procedió a verificar la concentración del inóculo de las cepas VM y K se tomó una muestra de 5 ml en tubos Falcon del matraz de 250 ml del inóculo y se leyó en el espectrofotómetro a 540 nm, con la ayuda de la ecuación de la Figura N°10 se procedió a calcular la concentración de los inóculos.

3.3.9 DETERMINACIÓN DEL PARÁMETRO CINÉTICO DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS VM Y K DE *GLUCONACETOBACTER SP.*

Cada sistema (sistema cepa VM y sistema cepa K) fue llenado con 250 ml de medio HS y suplementado con el antimicótico fluconazol para evitar el crecimiento de hongos, se inoculó con 10% o 25 ml, se llevó a incubación a temperatura controlada de 30°C, a pH 6.0, el tiempo de crecimiento fue de 10 días durante los cuales se tomaron muestras de 10 ml en tubos falcon, posteriormente los tubos falcon fueron llevados a centrifugación por 5 minutos a 2000 rpm, una vez eliminado el sobrenadante se obtuvo precipitados que fueron pesados, cada tubo fue pesado anteriormente para obtener el dato de biomasa por diferencia de pesos entre el tubo con pellet y el tubo vacío. Esto se realizó para la cepa VM, para la cepa K.

3.3.10 CULTIVO ESTÁTICO POR LOTES DE CELULOSA (BATCH)

Para cada una de las cepas se configuró un sistema con el medio HS y otro con el sistema de medio de piña (fruta de piña de desecho), el sistema consistía en 10 biorreactores (pirex) con un volumen de 250 ml de medio suplementado con fluconazol a pH inicial de 6, estos fueron llevados a incubación a 30°C durante 10 días, se tomaron lecturas diariamente así como también fueron controlados los parámetros de temperatura y pH además se midieron los grados brix y el peso de la membrana de celulosa que se formaba diariamente a partir del segundo día en este último caso, estos datos sirven para obtener la producción de cada cepa en cada medio en g/L, los coeficientes de rendimiento $Y_{p/x}$, $Y_{x/s}$ y $Y_{s/p}$. Este procedimiento se realizó por triplicado y tanto el rendimiento como los coeficientes se trabajaron con el promedio de producción.

3.3.11 CÁLCULO DE COEFICIENTES DE RENDIMIENTO $Y_{p/x}$ Y $Y_{x/s}$ $Y_{s/p}$

Para el cálculo de $Y_{p/x}$, se retiró cuidadosamente la membrana producida a partir del segundo día pues el primer día no existía membrana sino una especie

de telaraña que al contacto se deshacía, la membrana se llevó a pesar en balanza analítica este procedimiento se repitió durante los siguientes días hasta el día 10. Utilizando la ecuación de la Figura N° 11 con el dato de biomasa previamente hallado se procedió a hallar el promedio de $Y_{p/x}$ de los días de evaluación.

$$Y_{p/x} = \frac{\text{g de producto}}{\text{g de biomasa producida}} \quad (5)$$

Figura N°11 Coeficiente $Y_{p/x}$ g producto con respecto a g biomasa

Para el cálculo de $Y_{x/s}$ se midió los grados brix utilizando el refractómetro ABBE y calculando los g de glucosa consumidos, utilizando la ecuación de la Figura N° 12 y con el dato de biomasa se procedió a hallar el promedio de $Y_{x/s}$ de los días evaluados.

$$Y_{x/s} = \frac{\text{g de biomasa producida}}{\text{g de sustrato consumido}} \quad (6)$$

Figura N°12 Coeficiente $Y_{x/s}$ g de biomasa con respecto a g de sustrato consumido. +Para el cálculo de $Y_{s/p}$

Con los datos obtenidos de los pesos de celulosa y los g de glucosa se hallara el parámetro $Y_{s/p}$ con la ecuación de la Figura N° 13

$$Y_{s/p} = \frac{\text{g de producto}}{\text{g de sustrato consumido}} \quad (7)$$

Figura N°13 $Y_{s/p}$ g producto con respecto a los g sustrato consumido.

3.3.12 RECUPERACIÓN DEL PRODUCTO O DOWN STREAM

Una vez realizada la fermentación de las cepas VM y K en los medios HS y piña durante 10 días, se procedió a retirar la membrana de celulosa obtenida esta membrana se lavó con agua destilada y se procedió a centrifugar durante 5

minutos a 2000 rpm luego de esto se lavó nuevamente con ayuda de la pizeta de agua destilada y luego se sometió a calentamiento con NaOH 0.5 N en beakers de 100ml. (Andelib, 2009). Estas membranas fueron secadas al medio ambiente para poder ser caracterizadas.

3.3.13 DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS DE LA CELULOSA PRODUCIDA

A) CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA CELULOSA BACTERIANA

- **MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)**

Para determinar la microestructura de las membranas de celulosa se utilizó el microscopio electrónico de barrido marca FEI modelo InspectS50 del Laboratorio de Equipamiento Especializado de la Facultad de Biología – Universidad Nacional Mayor de San Marcos Lima Perú, para lo cual se recortó un círculo de 1cm de diámetro, cada muestra se fijó con glutaraldehído al 2% durante 30 minutos y a continuación se deshidrató con una batería de alcoholes de 30%, 50%, 70%, 90% y absoluto, con este último se guardaron en viales para su transporte hasta que se realizó el examen una hora después, el examen comenzó con una desecación al vacío con CO₂ para esto se utilizó el desecador marca Electro Microscopy Science modelo EMS850, se pegó las muestras en un stub con una cinta de carbono de doble cara, se enfrió la cámara de desecado a 5°C y las muestras fueron introducidas, se llenó la cámara de CO₂ se llevó el nivel del gas hasta que el menisco quede dentro de la ventana que posee el aparato luego se permitiera que el gas se mezcle con el líquido y a continuación se purgo la cámara siempre manteniendo el menisco en el medio esta operación se repitió hasta que la manguera de salida no expulsara más que gas, luego de comprobar la sustitución total del disolvente se llenó la cámara con CO₂ y se calentó hasta 35°C, luego se despresurizó y finalmente se retiraron las muestras este proceso permitió reemplazar por CO₂ toda el agua y alcohol contenido en la muestra para que la estructura quede como estaba y no se

deforme o sufra descomposición.

A continuación las muestras pasaron a una cámara de recubrimiento o metalizado de muestras, se colocaron las muestras y a continuación se procedió a hacer vacío hasta que la presión descendió a aproximadamente 600 – 400 mtorr. Luego se abrió la válvula del gas argón para limpiar la cámara durante 15 s y se esperó a que la presión descienda a 80 mtorr luego se procedió a bañar las muestras en oro por 120 s aproximadamente luego de esto se recuperó el argón y se dejó entrar aire en la cámara luego se procedió a retirar las muestras metalizadas.

Las muestras metalizadas fueron introducidas en la cámara del microscopio electrónico de barrido y se realizó alto vacío de 4×10^{-5} psi así las muestras quedaron listas para poder ser observadas en un rango de 5000 a 30000 veces operando de 0.1kvV a 10kV.

- **ESPECTROSCOPIA DE DISPERSIÓN DE RAYOS X (EDX)**

Se utilizó el equipo de microanálisis EDX que se encuentra incorporado en el Microscopio electrónico de barrido del Laboratorio Especializado de la Facultad de Biología - Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Las muestras fueron colocadas dentro de la cámara de observación del microscopio electrónico de barrido y fueron evaluadas mediante espectroscopia de dispersión de rayos x la cual mediante un haz de electrones ataca la muestra para esta poder responder enviando fotones desde los orbitales del átomo con equivalencia al peso molecular de cada uno de estos con los que interactúa el electrón es así que se puede obtener datos principalmente cualitativos de las muestras observadas.

- **ESPECTROSCOPIA FT-IR**

La técnica de espectroscopia IR se llevó a cabo mediante un espectroscopio FT - IR marca Shimadzu modelo IR Affinity -1, de rango medio ($400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$), equipo de la Unidad de Servicios de Análisis Químicos (USAQ) de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional

Mayor de San Marcos. Las cuatro membranas fueron puestas en el portamuestras luego la punta de diamante fue bajada hasta tener contacto con la muestra y un rayo monocromo de luz infrarroja fue transmitido a través de la muestra, la energía absorbida por esta fue registrada, este proceso es repetido varias veces para formar la gráfica que emite los espectros que permiten finalmente determinar el compuesto por comparación con una bases de datos del software.

B) PROPIEDADES MECÁNICAS Y DE TRANSPORTE

• TRACCIÓN

El ensayo de tracción se llevó a cabo con un dinamómetro digital marca Liyi Tech, para el ensayo se confeccionaron probetas de 10 cm de largo por 1 cm de ancho se midió el grosor de cada una con un micrómetro digital marca Engels Merkel 40ER y luego se procedió a colocar la probeta en el dinamómetro el cual aplico la fuerza de tracción hasta que la probeta se rasgó, registrando los resultados y continuando con las siguientes probetas. El cálculo de la tensión máxima (σ_{max}) se obtuvo a partir de la gráfica de carga vs desplazamiento y el área de la membrana se halló mediante la ecuación de la Figura N° 14 (Carreño, 2011)

$$A = E \cdot B \quad (8)$$

Figura N°14 Área de la membrana

Donde

A = Área
E = Espesor
B = Ancho

• GRADO DE HINCHAMIENTO

Una muestra de 1cm^2 fue tomada de cada una de las membranas se pesó y se sometió a remojo con agua durante 24 horas esto dentro de una placa Petri luego fueron pesadas nuevamente para calcular el grado de hinchamiento se utilizó la ecuación de la Figura N°15. (Carreño, 2011)

$$Q = \frac{W_h - W_s}{W_h} * 100 \quad (9)$$

Figura N°15 Ecuación de grado de hinchamiento

Donde

Ws = Peso seco de la membrana

Wh = Peso húmedo de la membrana

C) IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA DE CELULOSA BACTERIANA

- **HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE CELULOSA**

Para comprobar mediante identificación microbiológica que las membranas obtenidas son de celulosa se utilizó hongos con capacidad celulolítica estos fueron *Trichoderma sp.* y *Aspergillus Niger* el primero fue donado por el Laboratorio de investigación y asesoría de tesis de la facultad de biología de la Universidad Nacional de San Agustín y el segundo se obtuvo gracias a una tesis que se llevó a cabo en la Universidad Católica de Santa María en el momento que se realiza esta investigación, en la que se utilizó el hongo *Aspergillus Níger*, se procedió a preparar medio PDA suplementado con cloranfenicol para evitar el crecimiento de bacterias, se sembraron los hongos incubándolos a la temperatura de 30°C por 10 días, luego se procedió a colocar membranas de cada una de las muestras en placas Petri para poder ser evaluadas incubándolas por 15 días.

FLUJOGRAMA

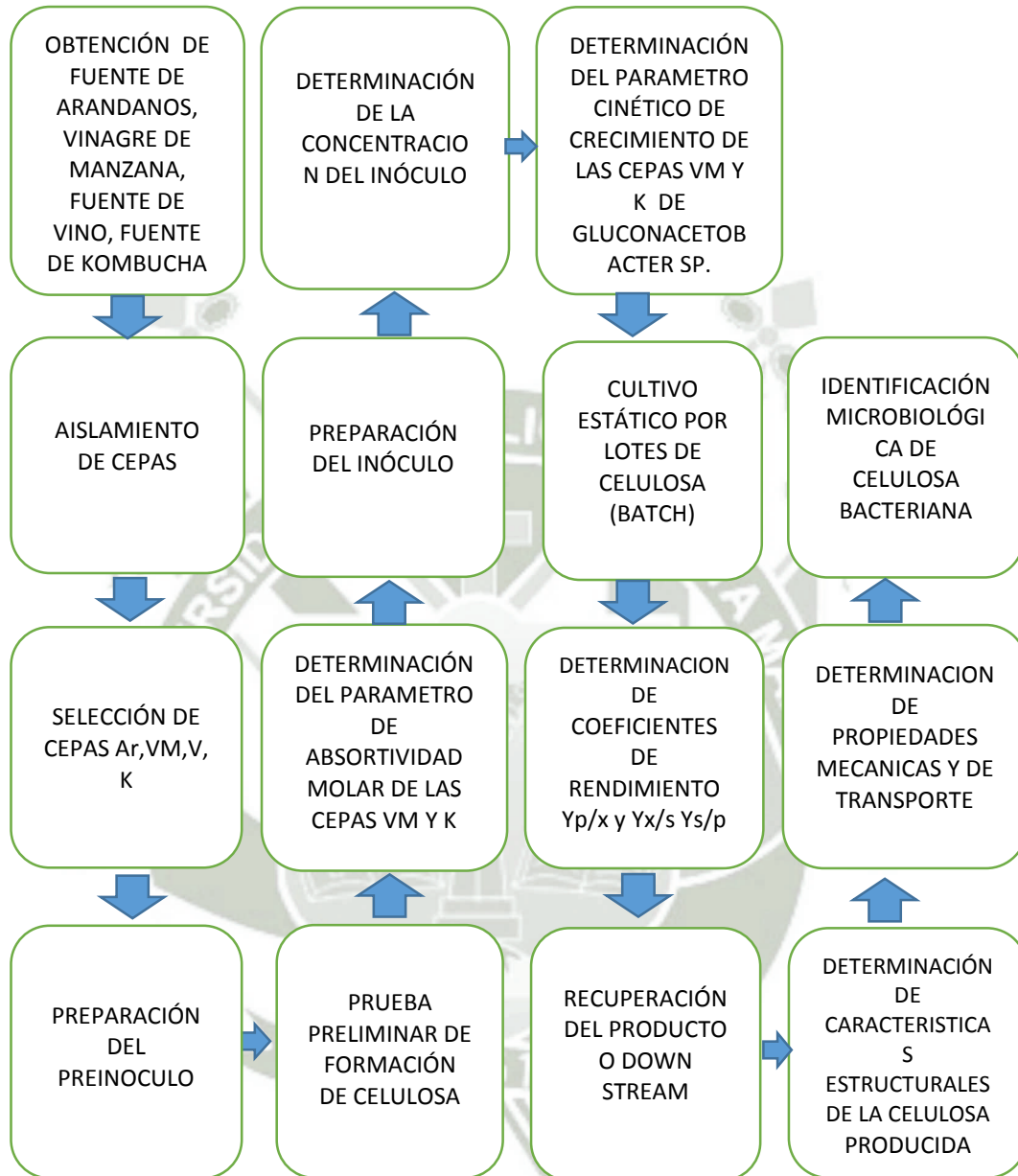


Figura N° 16 Flujograma de actividades

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 OBTENCIÓN DE FUENTES POTENCIALES:

Se obtuvo exitosamente vinagre de manzana casero, jugo agriado de arándanos, vino acetificado, y el té de kombucha, en el caso del vinagre de manzana casero después de una fermentación de 30 días a partir de manzana Israel lavada y picada agua hervida y azúcar rubia se formó una especie de nata en la superficie de la cual se extrajo la muestra. Así también fue obtenido el jugo acetificado de arándanos a partir de 50 g de arándanos remojados en 50ml agua en un frasco pírrex del cual la muestra fue obtenida de la parte superficial al haberse formado una nata, en el caso del vino acetificado, se obtuvieron 200 ml, de un acetificado de vino cuyo recipiente estuvo tapado con tela durante los 15 días, la muestra que se extrajo fue de una gota del acetificado, y por último después de 15 días se obtuvo el té de kombucha en donde al igual que en el vinagre y en los arándanos se formó una capa superficial muy delgada la muestra se tomó de esta capa. Estas fuentes se prepararon porque según referencias bibliográficas las bacterias ácido acéticas se encuentran distribuidas extensamente en la naturaleza y se pueden encontrar en plantas y frutos

ricos en azúcar, en este caso *G. Xylinus* ha sido frecuentemente recuperada de procesos fermentativos tradicionales. (Vegas, 2011)

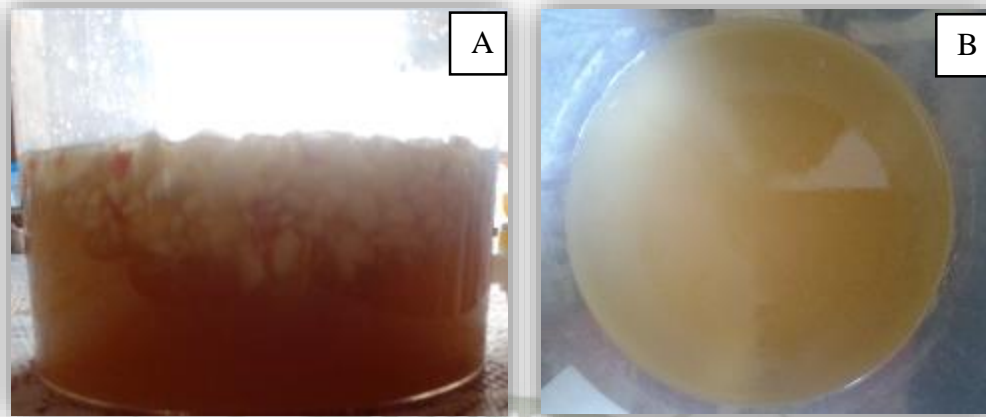


Figura N°17. A. Recipiente en la parte inicial del proceso de obtención de vinagre de manzana. B. Vinagre de manzana después de la fermentación de 30 días visto desde la parte superior.



Figura N°18. Frasco con el fermento de arándanos después de la fermentación y después de sacar la muestra.



Figura N° 19 Recipiente con 200 ml de vino en proceso de acetificación.



Figura N°20 Recipiente que contiene un SCOBY de Kombucha

4.2 AISLAMIENTO DE CEPAS

Después de 7 días de cultivo a partir de los acetificados de vinagre de manzana, arándanos, vino y kombucha, se obtuvo los siguientes resultados:

En las placas de arándanos se obtuvo colonias cremas, opacas, circulares algunas de 2 a 5 mm de diámetro, de borde ondulado, convexas y de consistencia cremosa, el análisis al microscopio con tinción Gram reveló bacterias Gram positivas y Gram negativas posiblemente debido a que en los

arándanos se encontraban estas bacterias aunque las bacterias de este género también se pueden observar como Gram positivas en el caso de cultivos viejos, se procedió a realizar varios repiques y así se pudo obtener la bacteria Gram negativa pura.

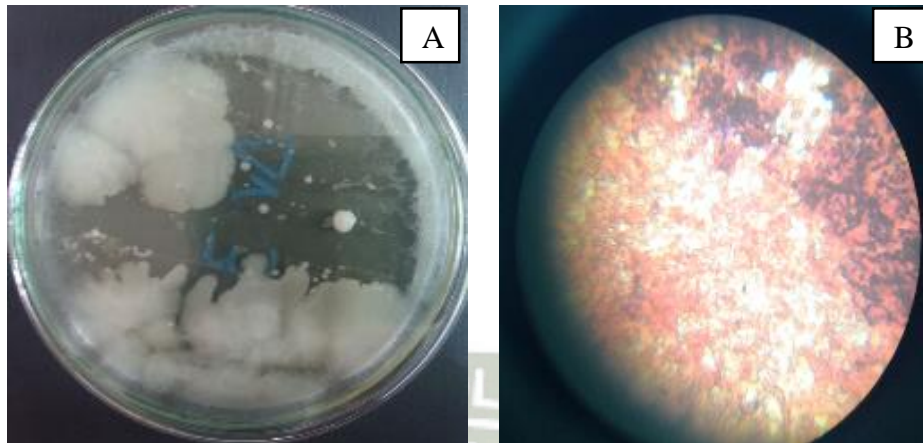


Figura N°21 A. Placa con presencia de colonias cremas. B Fotografía con un aumento de 100x muestra bacterias Gram negativas a la izquierda y Gram positivas.

A partir la muestra de vinagre de manzana se obtuvo colonias circulares de color crema ligeramente cafés de 2 a 3 mm de diámetro, no translúcidas, brillantes, convexas, de borde liso y de consistencia cremosa, en la tinción Gram se pudo observar bastones Gram negativos.

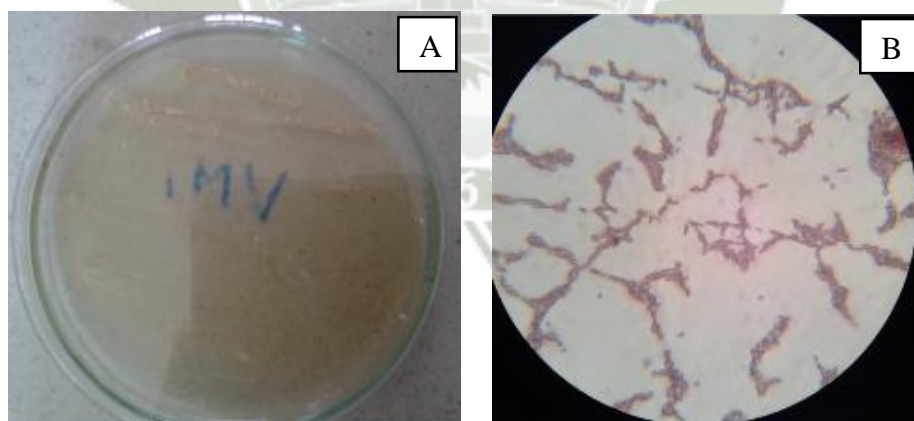


Figura N° 22 A. Placa que muestra crecimiento de colonias cremas a café claro y la fotografía B. muestra la tinción Gram a 40x, se pueden apreciar bacilos Gram negativos.

De la muestra de Vino se obtuvo colonias circulares beige oscuro de 2mm de diámetro de borde liso y consistencia cremosa, color beige, no translúcidas, brillante, en la tinción Gram se observó bacilos Gram negativos algunos formando cadenas. Como muestra la Figura N°23.

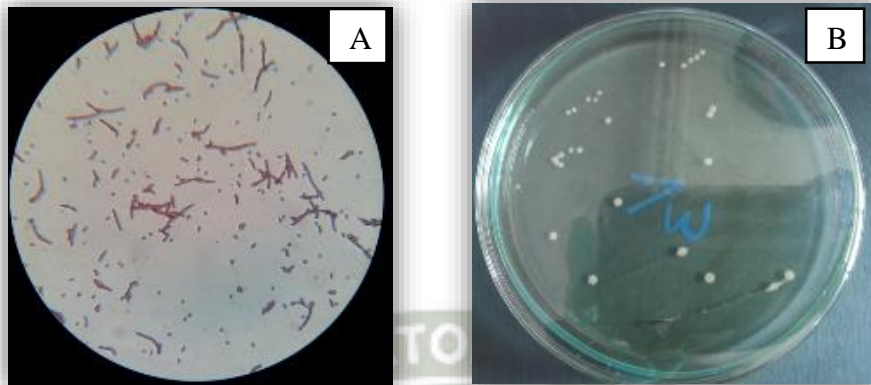


Figura N°23 La figura A muestra la placa Petri con colonias obtenidas a partir de vino y en la imagen B se muestra la tinción Gram de estas colonias, bacilos gramnegativos en aumento de 100x.

A partir de la muestra de Kombucha se obtuvo un crecimiento masivo, pocas colonias de 2mm de color blanco a crema, consistencia cremosa, medio plastificada, de borde liso, opacas, y convexas, la tinción Gram demostró bacilos Gram negativos con presencia de uno que otro cuerpo extraño que al parecer eran restos de cianobacterias.

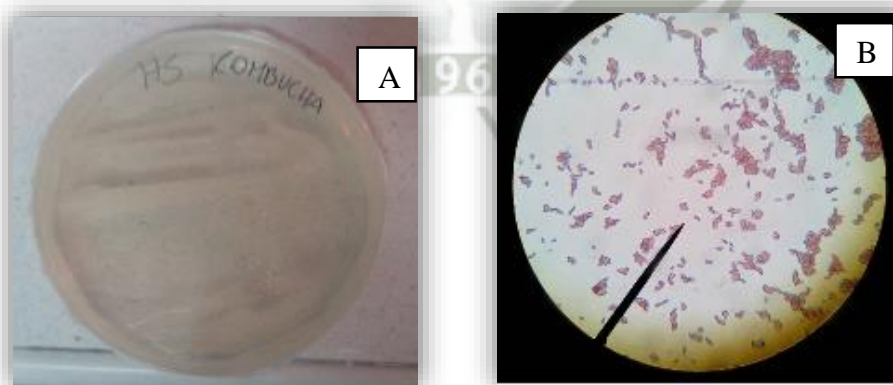


Figura N°24 A placa con cultivo de la cepa K, a la derecha tinción Gram en 100x donde se aprecian bacilos Gram negativos y otros artefactos que al parecer serian fragmentos de celulosa.

Las características encontradas se encuentran en la Tabla N°5 que se muestra a continuación.

CARACTERÍSTICA	VM	Ar	V	K
TAMAÑO COLONIAS	2-5 mm	2- 3 mm	2 mm	2 mm
COLOR	Crema ligeramente café	Blanco beige	Beige	Blanco a crema
BORDE	ondulado	liso	liso	liso
CONSISTENCIA	cremosa	cremosa	cremosa	cremosa
OPACIDAD	opacas	opacas	opacas	opacas
FORMA	convexa	convexa	convexa	convexa
TINCIÓN GRAM	Gram -	Gram -	Gram -	Gram -

Tabla N° 5 Características de las colonias obtenidas a partir de los cultivos de las fuentes potenciales.

4.3 EVALUACIÓN DE CEPAS AISLADAS

Después del aislamiento y repique se procedió a realizar la caracterización bioquímica mediante pruebas seleccionadas primero se sembró las cuatro cepas en agar CaCO₃ para confirmar la producción de ácido e investigar la sobre oxidación de ácido acético por la formación de zonas claras alrededor de las colonias, en este caso 3 de las muestras dieron positivo y una un positivo sospechoso y se continuó con las otras pruebas, Los resultados se muestran en la Tabla N°6. (**Anexo N°1**)

PRUEBA	CEPA				
		Ar	VM	V	K
SIM	Motilidad	positiva+3	positiva +2	positiva+ 1	positiva +2
	H ₂ S	negativa	negativa	negativa	negativa
	Indol	negativa	negativa	negativa	negativa
UREA	Ureasa	negativa	negativa	negativa	negativa
TSI:	fermentación	pico rojo fondo anaranjado	Pico rojo fondo amarillo	pico rojo fondo anaranjado	pico rojo fondo amarillo
	producción de gas	negativa	positiva	negativa	positiva
	ennegrecimiento	negativo	negativo	negativo	negativo
CITRATO SIMMONS	citrato permeasa	azul	verde	verde	verde
OF	oxidación /fermentación glucosa	T. abierto verde /T cerrado verde	T. abierto pico amarillo/T cerrado verde	T. abierto pico amarillo/T cerrado verde	T. abierto amarillo/T cerrado verde
Crecimiento en MANITOL		muy poco	positivo	negativo	positivo
Crecimiento en GLUTAMATO		negativo	negativo	positivo	negativo
CaCO₃ agar	sobre oxidación ácido acético	positivo+1	positivo+2	positivo+-	positivo+2
GELATINA	licuefacción	negativo	negativo	negativo	negativo
CATALASA		positivo	positivo	positivo	positivo
OXIDASA		negativo	negativo	negativo	negativo
GLICEROL	producción de dihidroxiacetona	negativo	positivo	Positivo (poca producción)	positivo

Tabla N°6 Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas.

Con el resultado de 3 cepas positivas y una con un positivo sospechoso para CaCO_3 , se procedió a realizar las demás pruebas, consumo de sustrato, producción de ácido a partir de glucosa, lactosa y sacarosa mediante el medio TSI que contiene un indicador que vira de color al fermentar los azúcares, para el caso de las bacterias acéticas estas no consumen lactosa pero si otros azúcares, en este caso pico rojo fondo amarillo nos indica un pico alcalino y un fondo ácido significa que el microorganismo fermenta glucosa en el caso del fondo naranja podría significar un consumo de sacarosa en algunos casos se presentó rajadura del medio podría deberse a la producción de gas, al no haber ennegrecimiento del tubo sabemos que este microorganismo no produce ácido sulfhídrico. Urea para investigar sobre la actividad Ureasa, algunas bacterias pueden utilizar el nitrógeno proveniente de la urea, la hidrolizan, liberando amoníaco y dióxido de carbono, los cuales alcalinizan el medio, virando el indicador rojo fenol del amarillo al rojo, en este caso es negativa puesto a que el tubo no cambio de color, el uso de citrato mediante el medio Citrato Simmons, en donde el indicador azul de bromotimol vira de color cuando el medio se alcaliniza esto sucede si la bacteria posee citrato permeasa a través del ácido tricarbóxico desdoblado el citrato en oxalacetato y piruvato este último al encontrarse en un medio alcalino da origen a ácidos orgánicos que al ser utilizados producen carbonatos y bicarbonatos alcalinos que hacen que el medio vire a azul, en este caso los tubos permanecieron verdes con excepción del tubo de arándanos cuyo pico se puso ligeramente azul. Para el medio OF uno de los tubos inoculados se tapó con parafina para observar el metabolismo oxidativo o fermentativo de la bacteria los microorganismos oxidantes presentaran cambio de color en el tubo abierto el tubo cerrado permanecerá verde, los fermentadores producen una reacción ácida en ambos tipos de tubos y los no fermentadores no oxidantes producen cambios en ninguno de los dos tubos que permanecerán verdes, (Britanialab, 2015) el crecimiento en agar glutamato y manitol, que es positivo para bacterias acéticas pero varía en algunas especies, hidrólisis de gelatina para investigar su capacidad proteolítica, catalasa positivo y oxidasa negativo resultados para bacterias acéticas, la producción de dihidroxiacetona mediante la adición del reactivo de benedict a tubos con glicerol inoculados esta prueba nos permite diferenciar una bacteria del género acetobacter del género *Gluconacetobacter* en

este caso las pruebas dieron negativo para Ar y para todas las demás dieron positivo, todas estas pruebas se realizaron por triplicado. (UNER, 2010)

Estos resultados fueron comparados con los obtenidos en otra investigación (Andelib, 2009) donde AS6 Y AS7 AS14 Fueron cepas a comprobar del genero *Gab sp.*, DSM 46604 *Gab xilinus*, DSM 5602 *Gab hansenni*

TABLE I. COMPARISON OF THE CHARACTERISTICS OF ISOLATES AND REFERENCE STRAINS

Characteristics	AS6	AS7	AS14	DSM 46604	DSM 5602
Catalase	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-
Indole production	-	-	-	-	-
Brown pigmentation	-	-	-	-	-
H ₂ S formation	-	-	-	-	-
Urea utilization	-	-	-	-	-
Cellulose production	+	+	+	+	+
Sodium citrate utilization	-	-	-	-	± ^a
Oxidation of ethanol	+	+	+	+	+
Overoxidation of acetic acid	+	+	+	+	+
Lactate oxidation	-	-	-	+	+
Gelatin liquefaction	-	-	-	-	-
Ketogenesis of glycerol	-	+	+	+	+
Growth on mannitol agar	+	+	+	+	±
Growth on glutamate agar	-	-	w ^b	-	-
Acid production from:					
D-glucose	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	-	±
Fructose	-	w	-	-	±
Lactose	-	-	-	-	-
Galactose	+	+	w	+	±
Maltose	-	-	-	±	-
Mannose	+	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+	+

^a ± :variable response.

^b w: weak response.

Figura N°25 Análisis bioquímico de cepas (Andelib, 2009)

Como resultado de las pruebas bioquímicas podemos decir que las cepas que presentan mayor probabilidad de pertenecer al género *Gab sp.*, son la cepas VM y K la cepa Ar y la cepa V tienen una probabilidad baja por haber presentado muy

poca o nula producción de dihidroxiacetona cabe destacar que podrían pertenecer al género *Gluconobacter sp.* y *Acetobacter sp.* respectivamente pero no se descartan hasta realizar la prueba preliminar de producción de celulosa.

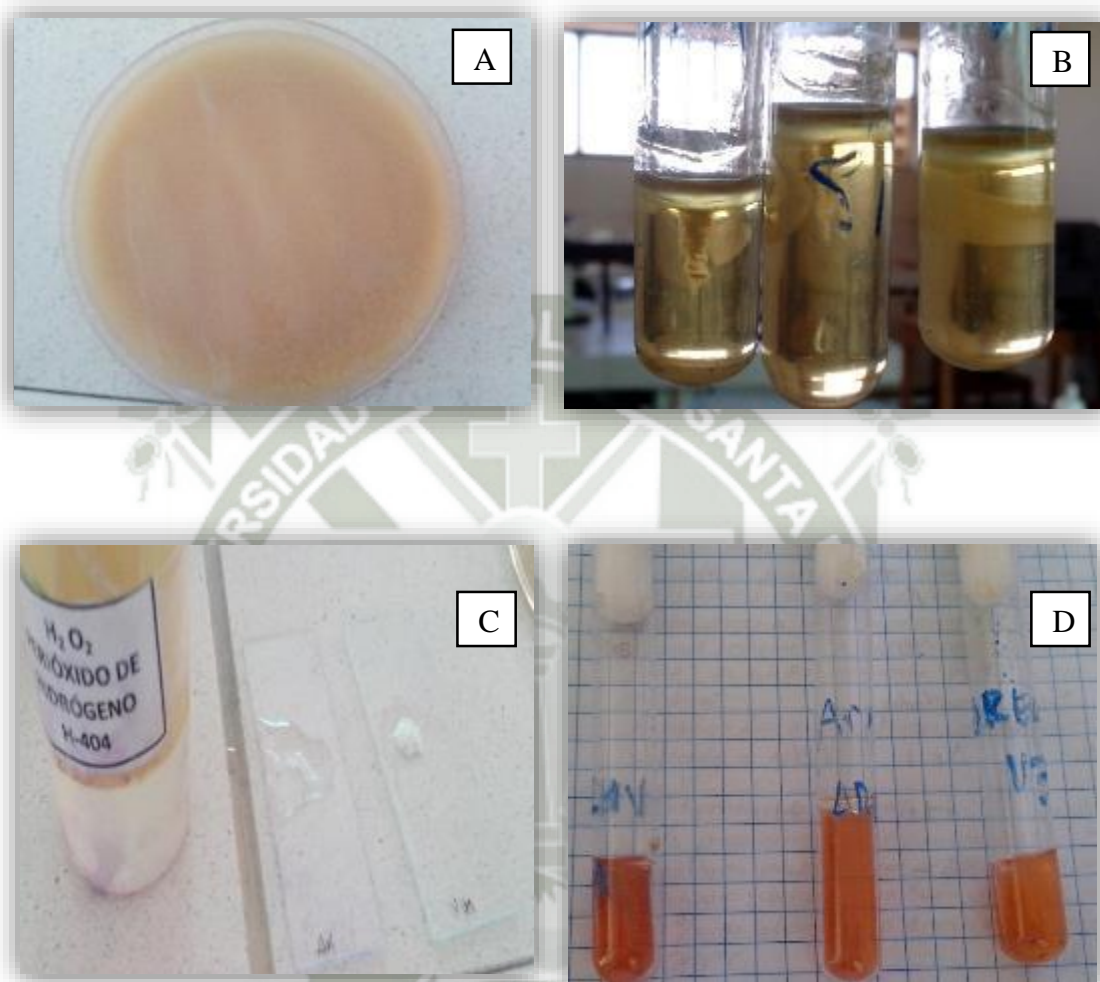


Figura N° 26 A. Agar CaCO₃ notese presencia de halo blanquecino alrededor del crecimiento B. Agar SIM donde se puede preciar la motilidad, C. Prueba de catalasa positiva, D. Agar urea negativa sin cambio de color.

4.4 PRUEBA PRELIMINAR DE PRODUCCIÓN DE CELULOSA

Para la producción de celulosa se preparó un pre inóculo en medio líquido HS con el fin de incrementar la biomasa para ser utilizada en la prueba, esto para las 4 cepas, se utilizó 10 ml del pre inóculo de cada cepa para inocular los recipientes de preproducción.

Después de 10 días de fermentación a 30 °C se verificó que los 4 recipientes de producción tuvieron resultados positivos para la formación de membranas, estas 4 membranas obtenidas inmediatamente después de retirarlas con mucho cuidado para que no se dañen, fueron sometidas a lavado con agua destilada y centrifugado luego a calentamiento con NaOH 0.5 N para lo cual los resultados fueron los siguientes:

- Membrana obtenida por cepa VM: se sometió a calentamiento durante aproximadamente 10 minutos y soporto 60°C.
- Membrana obtenida por cepa Ar: se sometió a calentamiento durante aproximadamente 7 minutos y soporto 45°C después de lo cual se fue desintegrando.
- Membrana obtenida por cepa V: se sometió a calentamiento durante aproximadamente 7 minutos y soporto 45°C después de lo cual se desintegro.
- Membrana obtenida por cepa K: se sometió a calentamiento durante 15 minutos soportando temperaturas de hasta 91°C después de lo cual la membrana no sufrió daños y fue retirada.

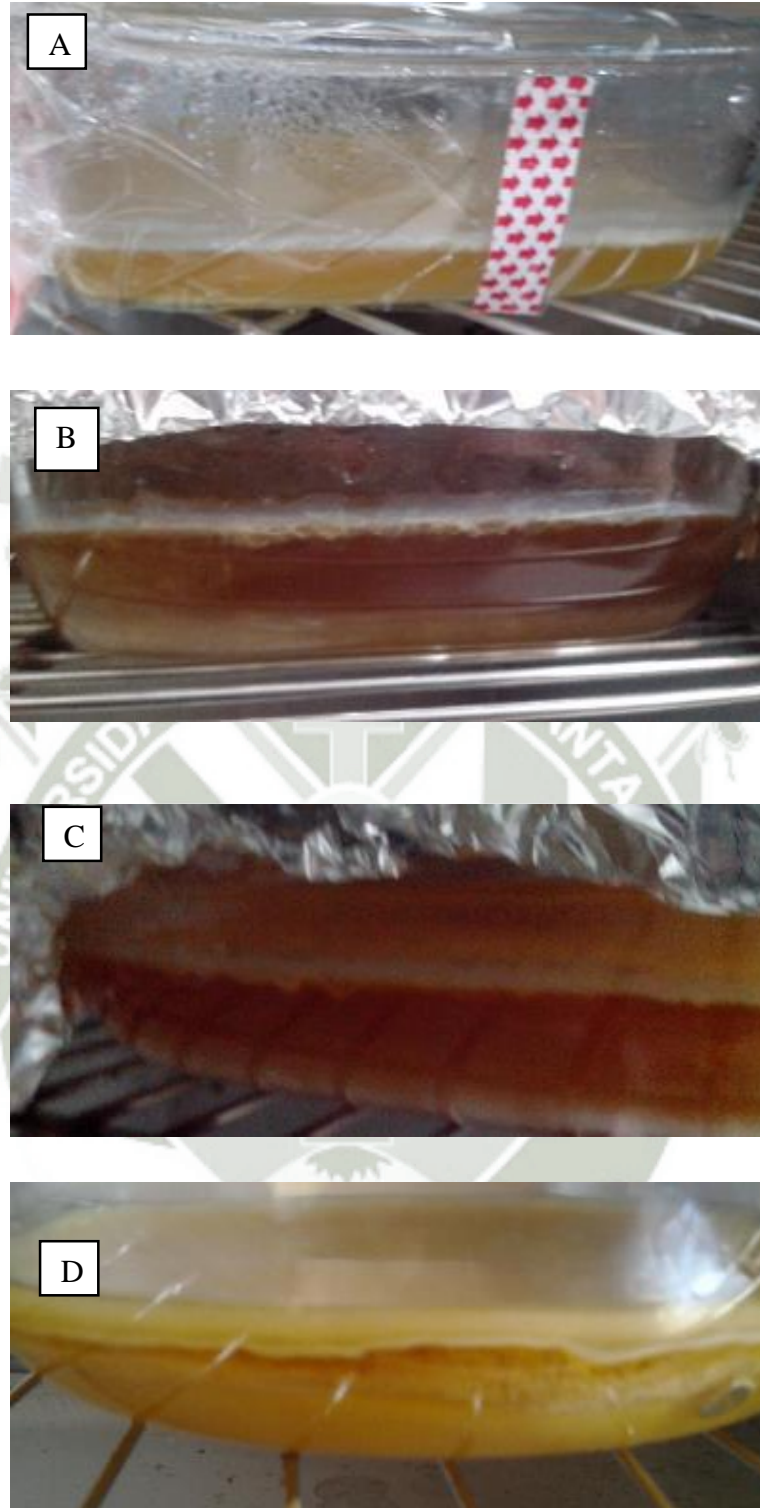


Figura N°27 Membranas formadas a partir de las 4 cepas. A. Cultivo de cepa vinagre de manzana (VM), B. Cultivo de cepa de arándanos (Ar), C. Cultivo de cepa de vino (V), D. Cultivo de cepa Kombucha (K).

Las membranas formadas a partir de las cepas Ar y V soportaron temperaturas de hasta 45°C relativamente bajas en comparación a las membranas de VM y K que soportaron temperaturas de más de 60 y 90 ° C respectivamente además fueron las que produjeron membranas más resistentes por ello se tomó la decisión de continuar produciendo solo con estas dos cepas.



Figura N° 28 Beakers con membranas después del tratamiento con calor y NaOH 0.5N

4.5 DETERMINACIÓN DE ABSORTIVIDAD MOLAR DE LAS CEPAS VM Y K

Para conocer las concentraciones a partir de las absorbancias es necesario conocer la absorptividad molar del soluto en este caso la aplicación inmediata fue para hallar la concentración del inóculo mediante el método espectrofotométrico para ello se hicieron suspensiones con la turbidez de la escala de Mc Farland N°3, una vez obtenidas las suspensiones bacterianas se leyeron al espectro los resultados se muestran en la tabla N°7 (**Anexo N°3**),

Cepa	ABS	ϵ
VM	0.895	$9.94 \times 10^{-10} \frac{ml}{cel \cdot cm}$
K	0.653	$7.26 \cdot x 10^{-10} \frac{ml}{cel \cdot cm}$

Tabla N°7 Absortividad molar a partir de absorbancias.

4.6 PREPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL INÓCULO

A partir de un cultivo puro de 72 horas de las cepas VM y K se inoculó matraces de 250 ml con medio HS, ajustando la turbidez a una escala de Mc Farland 0.5, se procedió a leer las absorbancias para hallar las respectivas concentraciones utilizando la ecuación de la Figura N°10 (**Anexo N°4**),

Cepa	Abs	[C]
VM	0.145	1.46×10^8 cel./ml
K	0.115	1.59×10^8 cel./ml

Tabla N°8 Concentración del inóculo en cel/ ml

4.7 DETERMINACIÓN DEL PARAMETRO CINÉTICO DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS VM Y K DE *GLUCONACETOBACTER SP.*

Los sistemas de las cepas VM y K fueron conformados por biorreactores con 250 ml de medio y 10% o 25 ml de inóculo de la cepa *Gab*. Fueron incubados durante diez días a 30°C durante los cuales se extrajeron muestras cada 24 horas durante el tiempo total de incubación, las muestras fueron de 10 ml extraídas en un tubo Falcon cada una, el peso del tubo fue de 5.897g, después de centrifugar y decantar el líquido sobrenadante, la masa fue pesada junto con el tubo y el peso hallado por diferencia entre el tubo vacío y el que contenía el pellet así para las diez muestras, en la Tabla N°9 se muestran el sistema y la biomasa producida en los diez días. (**Anexo N°5**).

Tiempo h	Volumen ml	VM				K			
		Concentración g/ml		Biomasa g		Concentración g/ml		Biomasa g	
		HS	PIÑA	HS	PIÑA	HS	PIÑA	HS	PIÑA
0	275	0.0008	0.0006	0.2090	0.1705	0.0007	0.0004	0.1925	0.1100
24	265	0.0012	0.0010	0.3207	0.2571	0.0011	0.0009	0.2915	0.2491
48	255	0.0022	0.0019	0.5712	0.4845	0.0021	0.0014	0.5355	0.3647
72	245	0.0040	0.0038	0.9849	0.9286	0.0046	0.0021	1.1270	0.5194
96	235	0.0072	0.0063	1.6897	1.4805	0.0089	0.0025	2.0915	0.5969
120	225	0.0120	0.0088	2.7000	1.9800	0.0169	0.0043	3.8025	0.9563
144	215	0.0161	0.0127	3.4615	2.7305	0.0228	0.0064	4.9020	1.3760
168	205	0.0203	0.0165	4.1615	3.3825	0.0261	0.0157	5.3505	3.2144
192	195	0.0241	0.0218	4.6995	4.2510	0.0296	0.0247	5.7720	4.8165
216	185	0.0264	0.0242	4.8840	4.4770	0.0321	0.0301	5.9385	5.5685
240	175	0.028	0.0253	4.9000	4.4275	0.0338	0.0326	5.9150	5.7050

Tabla N°9 Cuadro concentración y biomasa para un tiempo y volumen determinado

En el cuadro aparecen los valores de biomasa y concentración celular para el tiempo de 0 a 216 horas, el volumen que fue decreciendo mientras se tomaban las muestras, estos datos fueron hallados a partir de la medición en muestras, para hallar la concentración el peso del pellet fue dividido entre los ml de muestra 10ml y para hallar la biomasa total del sistema el peso para 10ml fue llevado al volumen de fermentación que es de 250ml para, esto para cepa en cada medio para conocer el comportamiento de la cepa, los resultados de curvas de crecimiento se muestran para el medio HS por ser este un medio que provee todos los nutrientes necesarios para el desarrollo óptimo de *Gab.* (Anexo N°6)

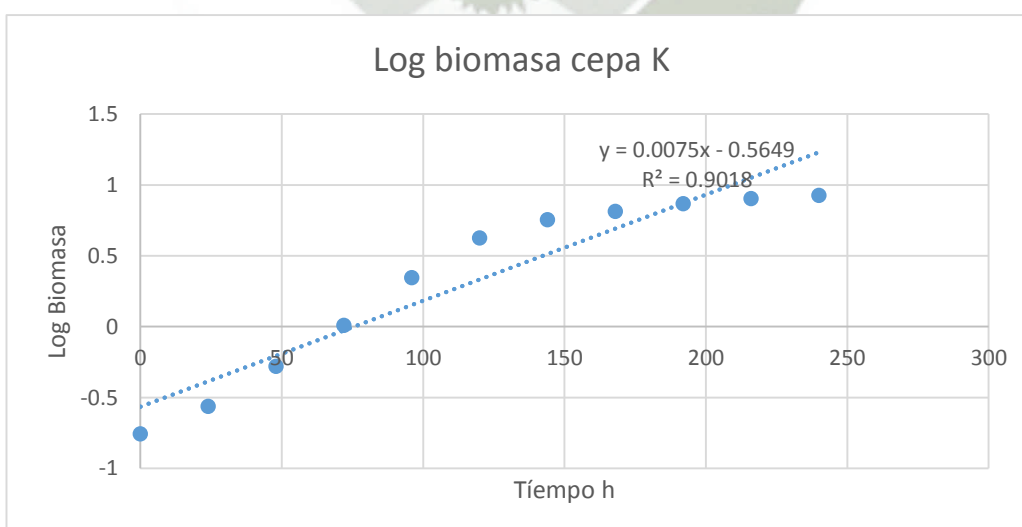
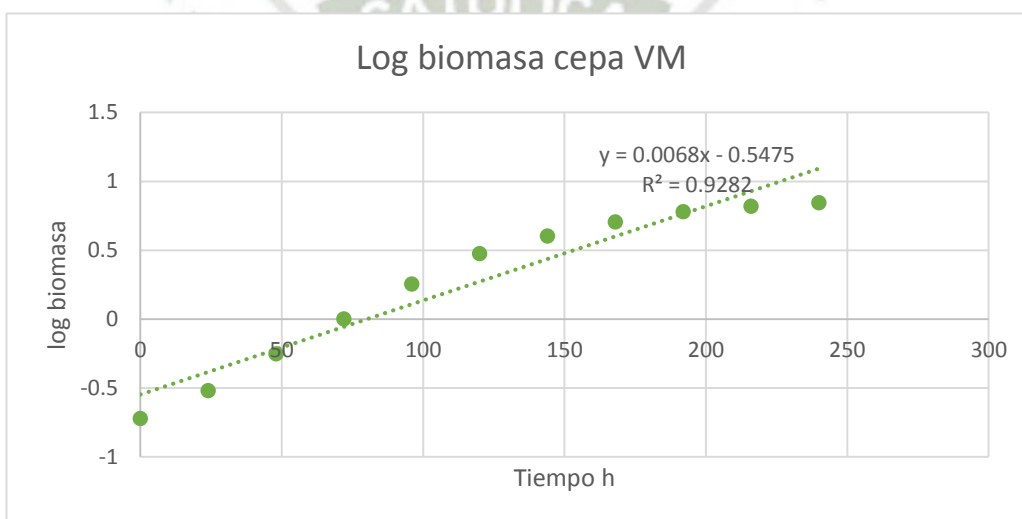
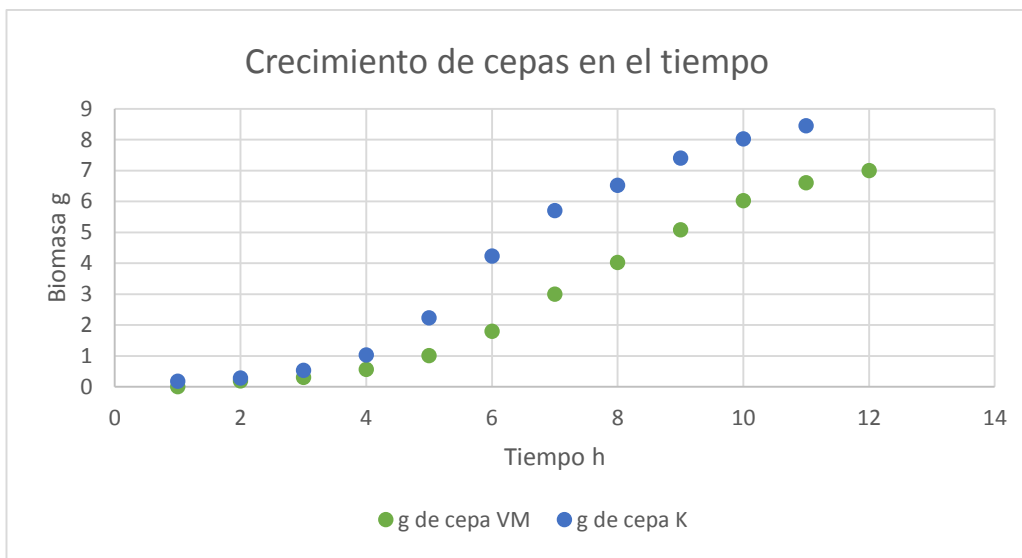


Figura N°29 Crecimiento y log vs tiempo de las cepas VM y K durante 10 días.

Como podemos ver el crecimiento de biomasa aumenta en proporción directa con el tiempo se da de forma lenta al principio, luego la población tiene una etapa de crecimiento exponencial que se da entre las 100 y 180 horas para finalmente llegar a la fase estacionaria que se da alrededor de las 200 horas aproximadamente, existe una ligera diferencia en el crecimiento entre las 50 y 150 horas entre las cepas pero en general el crecimiento es bastante similar, considerando que son cepas del mismo género pero de fuentes diferente podría ser un resultado esperado.

Las gráficas de log biomasa vs tiempo nos muestran una ecuación lineal con la que podemos predecir la biomasa para un tiempo determinado en un cultivo por lotes, esta ecuación es muy útil para escalar nuestro proceso y además que también nos en el caso que quisiéramos llevar a cabo un cultivo continuo.

Los datos nos permiten hallar la velocidad específica de crecimiento para cada tiempo u y con estos, u_{max} , que es la constante de velocidad máxima de crecimiento, esto para un lapso de tiempo determinado, los datos fueron procesados con la ecuación de la Figura N°7 mediante la cual se halló los u y con estos datos u_{max} , para poder obtener u primero se halló rx con la ecuación de la Figura N°8.

(Anexo 7)

Cepa	Vm-HS	K-HS
Tiempo h	u h-1	u h-1
0	-	-
24	0.0109	0.0104
48	0.0137	0.0134
72	0.0132	0.0128
96	0.0138	0.0155
120	0.0143	0.0168
144	0.0094	0.0101
168	0.0079	0.0049
192	0.0063	0.0047
216	0.0035	0.0065
240	0.0048	0.0042
u_{max} h-1	0.0143	0.0168

Tabla N° 10 Valores de u y u_{max} para las cepas VM y K

4.8 CULTIVO ESTÁTICO POR LOTES DE CELULOSA (BATCH)

El cultivo estático batch de 10 días permite estudiar la producción de celulosa relacionada al consumo de sustrato, para conocer estos datos la membrana de celulosa formada por *Gab* en los sistema conformados fue retirada y pesada diariamente a partir del segundo día, puesto que al primer día solo se puede observar una especie de maraña celular sin consistencia, la Tabla N°11 nos muestra concentración del producto CP para el volumen de cultivo 250 ml y finalmente podemos hallar la producción de las cepas en g/L los resultados obtenidos para el ensayo se muestran en la Figura N°31. Cabe resaltar que este ensayo se realizó por triplicado y se trabajó con un promedio.



Figura N°30 Cultivo de celulosa por lotes recipientes con medio HS

Cepa Tiempo, h	VM		K	
	HS	PIÑA	HS	PIÑA
0	-	-	-	-
24	-	-	-	-
48	0.1002	0.0800	0.1340	0.1800
72	0.2260	0.1270	0.2570	0.2600
96	0.3970	0.3880	0.5170	0.3760
120	0.6890	0.5190	0.6900	0.4840
144	0.9700	0.7610	0.8620	0.5620
168	1.2660	0.9800	1.3480	0.9980
192	1.4240	1.3810	1.8530	1.6110
216	1.6810	1.4700	2.1710	1.9100
240	1.8980	1.5950	2.3131	2.1850
Produccion g/L	7.5920	6.3800	9.2526	8.7400

Tabla N°11 Promedio de producción de celulosa formada por las cepas VM y K en los medios HS y Piña.

Como se puede apreciar la tabla N°11 muestra los valores de producción obtenidos para las cepa VM y K en ellos podemos diferenciar la cepa con mayor producción K en medio HS con un promedio de 9.2526g/L de celulosa en un cultivo por lotes de 10 días a 30 °C

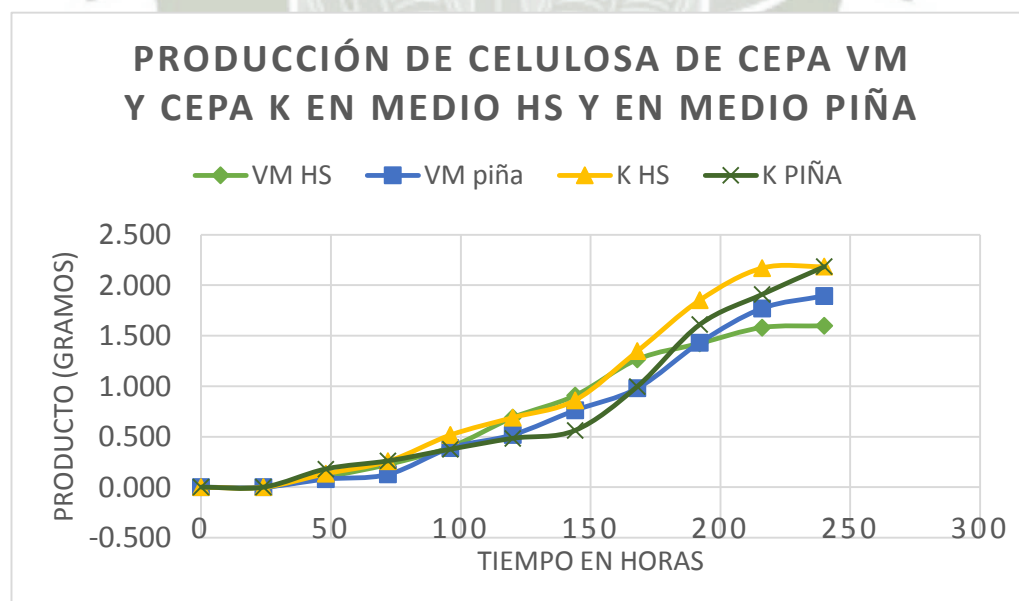


Figura N°31 Producción de celulosa en gramos vs tiempo en horas.

En la Figura N°31 se puede apreciar que la producción en medio de piña es más lenta que en la del medio HS es posible que este comportamiento se deba a que el microorganismo no sintetiza invertasa, que es una enzima encargada de convertir la sacarosa en glucosa + fructosa y esto le lleve un tiempo en desarrollar la ruta metabólica necesaria para consumir el sustrato sacarosa para producir celulosa. **(Tonouchi, 2011)** Investigaciones de Tonouchi Y col encontraron que diferentes microorganismos *Acetobacter* (después *Gluconacetobater*) sintetizan celulosa a partir de sacarosa por medio de la enzima levansacarasa que hidroliza la sacarosa en glucosa + levana el ultimo polímero de fructosa. **(Mikkelsen, 2009)** reporta que en un cultivo estático a las 48 horas la cantidad de celulosa producida a partir del sustrato sacarosa es menor que el de glucosa pero a partir de 96 horas la producción de es mayor a partir de sacarosa en este caso la producción en sacarosa es un poco lenta al principio sin embargo a partir de las 150 horas se puede decir que es mayor puesto a que alcanza una mayor velocidad de producción en ambos medios, en el gráfico se puede apreciar que la cepa K en medio HS es la que produce mayor cantidad de celulosa durante las 216 horas, es posible que la cepa K presente una mejor adaptación al medio HS, pero a simple vista podemos decir que produce mayor cantidad de celulosa que la cepa VM tanto en el medio HS como en el medio de Piña.

Con el fin de conocer los valores de producción máximos que pueden llegar a alcanzar las cepas en cada uno de los medios se continuó con la producción y se pudo hallar la producción máxima de las cepas en 30 días. Cabe resaltar que los tiempos de producción dependen del producto final que se requiera, teniendo en cuenta que a mayor tiempo mayor probabilidad de contaminación. **(Anexo N°8)**

	VM		K	
	HS	PIÑA	HS	PIÑA
Producción g/L	53.16	46.072	73.068	57.6

Tabla N°12 Producción en g/L para el cultivo de celulosa en 30 días.

Los valores obtenidos se encuentran en un rango de 53.16 y 73.068 g/L para 30 días, (**Jaramillo R. T., 2012**) reporto en su investigación sobre el efecto de sacarosa en la producción de celulosa bacteriana que en la cuarta semana los valores de producción fueron de 32.5 a 39.5 g/L otros reportes (**Jaramillo R. P., 2013**) cuya investigación con fructosa como sustrato de cultivo de celulosa bacteriana en la primera semana a concentraciones de 1% p/v reporto 36 y 32,5 g/L respectivamente pero a concentraciones menores 10 y 15% la producción disminuyo a 18 y 3 g/L de CB esto indica que a menor concentración de fructosa la producción es mayor, la producción con glucosa por la cepa IFO 113772 utilizada en la investigación de Keshk y Samejima 2006 citado en (**Carreño, 2011**) nos muestra que para un tiempo de 6 días la producción es de 3.33 g/L de celulosa en medio HS, en los resultados obtenidos en este trabajo con las cepas VM y K la mayor producción se produjo con glucosa mostrando hasta 8.640 g/L en 10 días, para la cepa K, el medio de piña que contiene tanto fructosa como sacarosa reporto valores menores de producción, la concentración de sacarosa estuvo en un 10% y se alcanzó 16g/L, recordemos que existen otros factores como la adaptación de la cepa o la relación ancho altura del biorreactor. (**Anexo N°9**)

4.9 DETERMINACIÓN DE COEFICIENTES DE RENDIMIENTO $Y_{p/x}$ y $Y_{x/s}$ $Y_{s/p}$

Con los datos de biomasa, consumo de sustrato, formación de producto, se halló los valores de $Y_{p/x}$, $Y_{x/s}$ $Y_{s/p}$ **Tabla N°13** utilizando las ecuaciones de las figuras N°11 N°12 y N°13 respectivamente. (**Anexo 10**)

	VM HS	VM Piña	K HS	K Piña
$Y_{x/s}$	0.6214	0.0960	0.7311	0.0938
$Y_{p/x}$	0.2341	0.2234	0.2266	0.3812
$Y_{s/p}$	22.177	107.8374	17.9302	69.8205

Tabla N°13 Valores $Y_{x/s}$, $Y_{p/x}$, $Y_{s/p}$ y sus promedios.

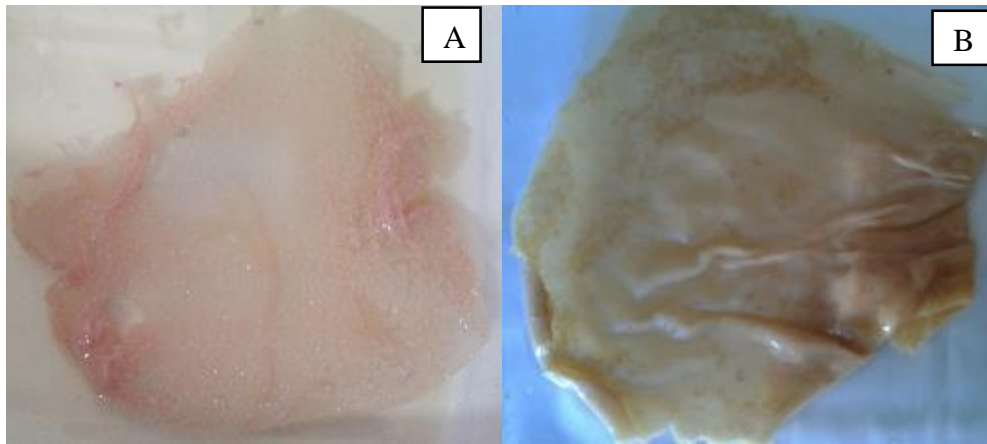
En el caso de VMHS $Y_{x/s}$ nos indica que por cada gramo de sustrato se genera 0.6214g de biomasa, $Y_{p/x}$ por cada gramo de biomasa producida se genera 0.2341

g de producto y Ys/p por cada 22.1531g de sustrato se genera un gramo de producto esta interpretación se da de igual forma para las demás cepas, con respecto a la producción de biomasa en cada medio vemos que hubo mayor crecimiento celular en el medio HS probablemente esto se deba a la cantidad de oxígeno en el medio por la misma constitución de estos, podemos afirmar también que la cepa más eficaz es K, los valores 0.2341, 0.2234, 0.2266 no son muy lejanos, entre sí, pero 0.3812g de producto por gramo de biomasa podría indicarnos que la cepa individualmente tiene una mayor capacidad para producir en este caso pudo ser que tuvo mayor necesidad ya sea para su uso como reserva y posterior consumo o por condiciones de estrés, lo cierto es que esta cepa tiene un mayor potencia, con respecto al sustrato inferimos el medio HS es mejor aprovechado por la bacteria en este caso el sustrato (glucosa), pues se necesitan menores cantidades de esta 22.1531 y 17.9302 g respectivamente, para producir 1g de producto a comparación de la sacarosa y fructosa que se encuentran a disposición en el medio de piña, inferimos también el medio de piña si bien no ha demostrado ser el medio en el que hay mayor producción podría ser estudiado a mayor profundidad pues un mayor rendimiento celular con el sustrato necesario podría derivar en mayores cantidades de producto.

4.10. RECUPERACIÓN DEL PRODUCTO O DOWN STREAM

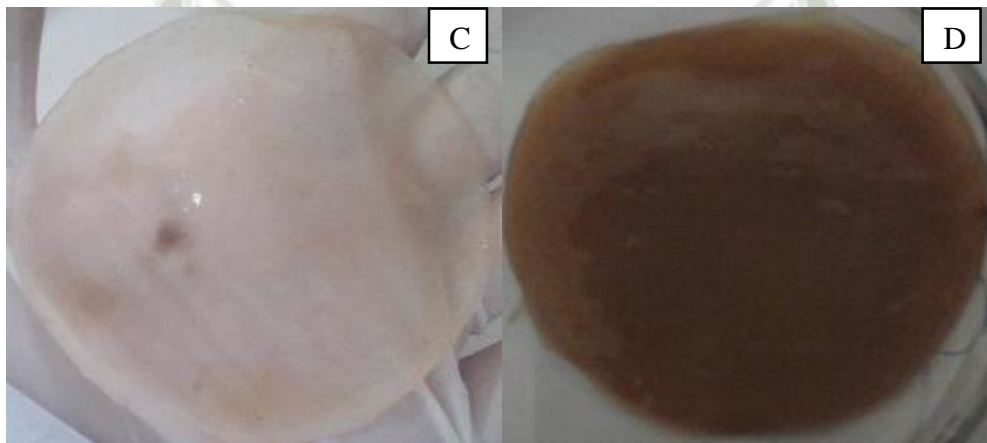
Para fines de caracterización de las membranas después de 10 días de incubación a 30°C se procedió a extraer las membranas a ser evaluadas, el procedimiento comprendió el lavado, centrifugado y calentamiento con NaOH 0.5 por 10 minutos, las membranas fueron retiradas y secadas a 60°C hasta alcanzar un peso constante.

(Anexo N°11)



Membrana VM HS

Membrana VM Piña



Membrana K- HS

Membrana K Piña

Figura N°32 A membrana producida por la cepa VM en medio HS, B membrana VM en medio piña, C membrana producida por K en medio HS, D membrana K producida en medio piña

Las membranas VM en HS presentaron de mediana a buena consistencia, el color fue de crema a salmón que con el paso de las horas se acentuó, el grosor vario de 1 a 2mm, aproximadamente, las membranas VM en Piña presentaron mediana consistencia, también mostraron variación de color de crema a caqui su grosor fue de 1.5 mm aproximadamente, las membranas K en HS presentaron mayor consistencia, algunas fueron translucidas y claras pero otras presentaron un color ligeramente crema, su grosor vario entre 1.5 a 2.5 mm y las membranas de K en piña presentaron buena consistencia, un color salmón a café pero que con el paso

de las horas y el tratamiento con NaOH se acentuó mucho más, el grosor que presentaron fue de 1 a 2.5 mm.



Figura N° 33 Muestra de membrana K-HS en tubo Falcon para centrifugar



Figura N° 34 Tubos Falcon con muestras listas para centrifugar



Figura N° 35 Membrana de celulosa después del secado

4.11 DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS DE LA CELULOSA PRODUCIDA

A) CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS MEMBRANAS

- MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

La caracterización mediante microscopia electrónica de barrido tiene varios procesos antes de ser sometida a continuación se muestran los resultados por cada una de estas y la observación. (Anexo N°12)

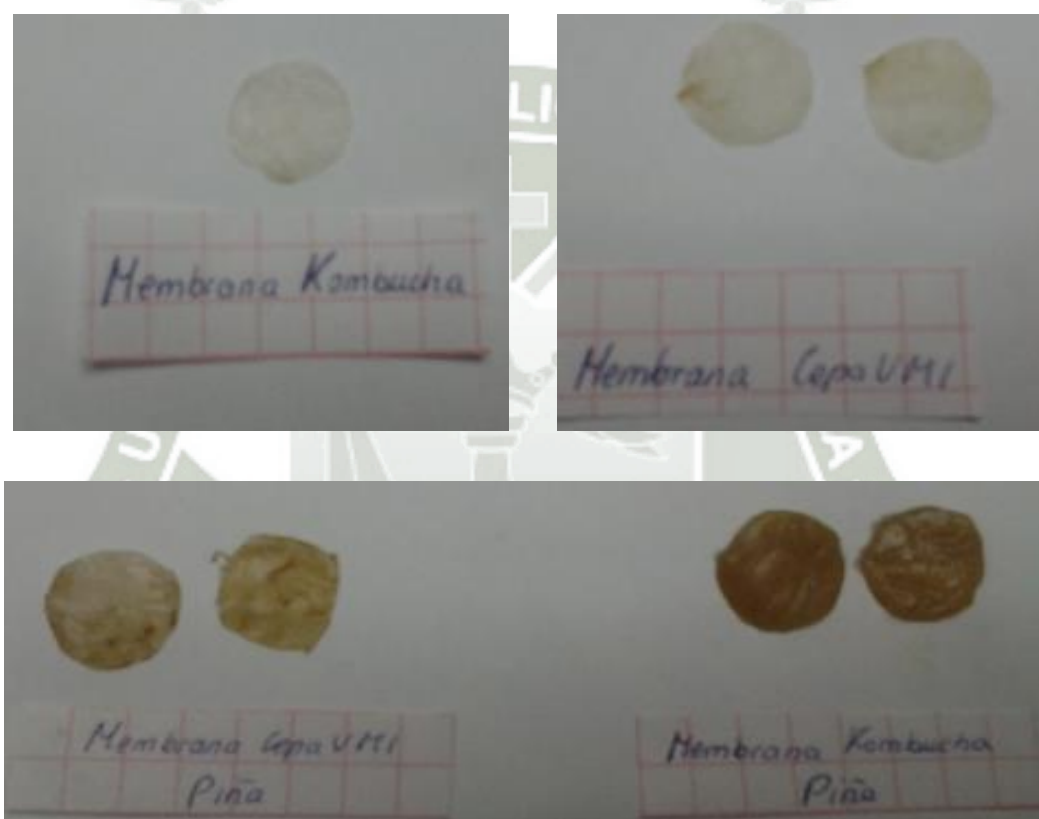


Figura N° 36 Membranas recortadas a en forma circulas de 1 cm de diámetro para su análisis en meb.

Se obtuvo el diámetro del Stub, de 1 cm de diámetro y con este se procedió a recortar muestras de esto se realizó con una tijera intentando no dañar el resto de la muestra que servía para los demás análisis, con ellas se comenzó el tratamiento de deshidratación.

FIJACIÓN Y DESHIDRATACION

El objetivo de la fijación es detener la función del tejido, estabilizando su estructura, en este caso se utilizó glutaraldehído al 2% este fijador protege las estructuras celulares durante la deshidratación y la congelación de la muestra, luego de colocar la muestra durante 30 min en el fijador se procedió a deshidratar las muestras con la batería de alcoholes de 50, 70, 90 y 100% por 15 minutos por cada concentración y finalmente se colocaron en frascos con alcohol absoluto para su transporte.



Figura N° 37 Muestras fijadas en glutaraldehído y luego deshidratadas con una batería de alcoholes 50 70 90 % y absoluto.

DESECADO Y METALIZADO

Para que las muestras puedan ser visualizadas en alto vacío deben estar secas y ser conductoras por lo que se realizó el desecado con CO₂ a 5°C hasta su completa deshidratación y luego se metalizaron con oro.

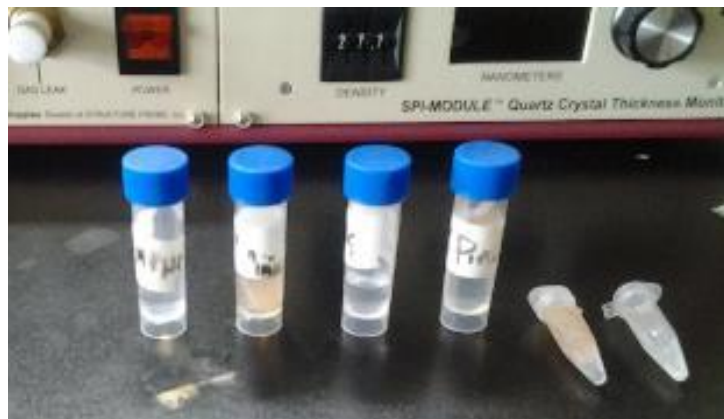


Figura N°38 Muestras conservadas para su transporte en alcohol absoluto listas para desecar.



Figura N°39 Metalizador y desecador junto con las muestras listas para ser procesadas



Figura N°40 Muestras metalizadas listas para ser observadas

Después metalizar las muestras estas fueron colocadas en la cámara de observación en vacío luego se procedió a ajustar la distancia para su observación.



Figura N° 41 Compartimiento del portamuestras y pantalla de observación del microscopio.

En la Figura N°43 podemos observar la superficie de las membranas se puede ver bastante compacta esto se debe a los procesos de secado y también a la desecación que sufrió la muestra al igual que en la imagen de comparación donde se realizó el mismo tratamiento.

VMP

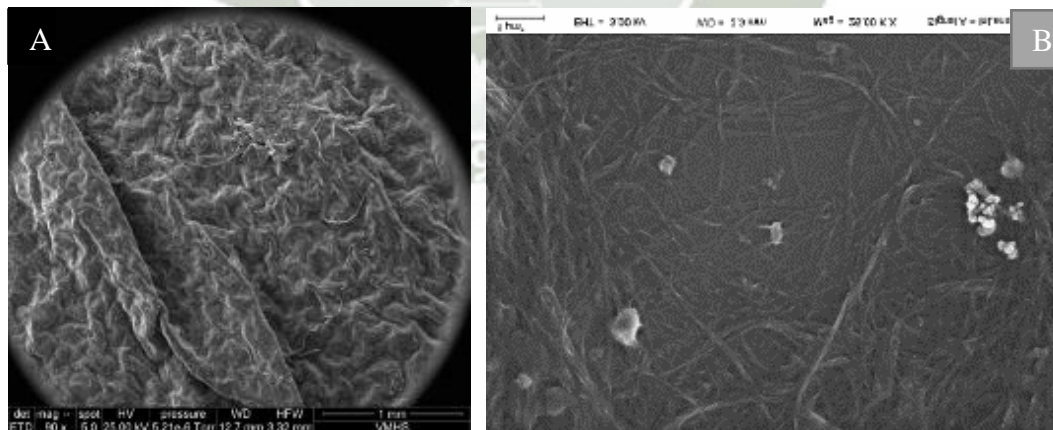


Figura N° 42 A. En esta imagen se puede apreciar la imagen a, la superficie de la membrana a una distancia de 1 mm y la imagen B es una imagen de comparación de una membrana a 2.3 mm tomada de la fuente (**Roldán, 2013**)

Las bacterias del genero *Gab sp.* presentan forma de varilla y la bibliografía reporta tamaños a partir de 2 μm dependiendo de la especie, se puede observar que se distribuyen sobre la superficie formando capas de celulosa, Figura N°43, la estructura alterna entre regiones ordenadas y otras con menor orden o amorfas en las regiones con mayor orden la membrana suele ser más cristalina, así mismo se puede observar las microfibrillas que le dan la resistencia a la membrana. En la microfotografía Figura N°44 A se puede observar el desnivel de la membrana en el que se encuentra una cantidad considerable de bacterias a una distancia de 100 μm , en la Figura N°44 B se observa claramente un enmarañado de cadenas de celulosa entre las células bacterianas que se encontraban en plena producción cuando se produjo la fijación lo que permite obtener esta imagen comparable con la microfotografía de la fuente (Bionext, 2015) donde la misma manera se encuentran las bacterias en medio de las cadenas de celulosa que van sintetizando.

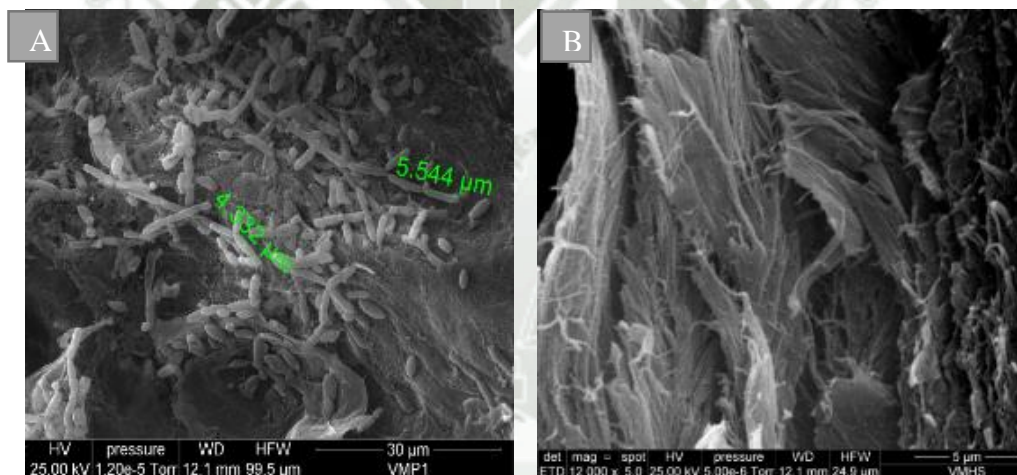


Figura N°43 A. Microfotografía donde se muestra el tamaño de la bacteria *Gluconacetobacter sp.* de 4.332 μm y 5.544 μm de largo y aproximadamente 1.5 μm de ancho. Microfotografía a una altura de 5 μm donde se muestran las fibras de celulosa de la muestra VMHS formando capas.

VMHS

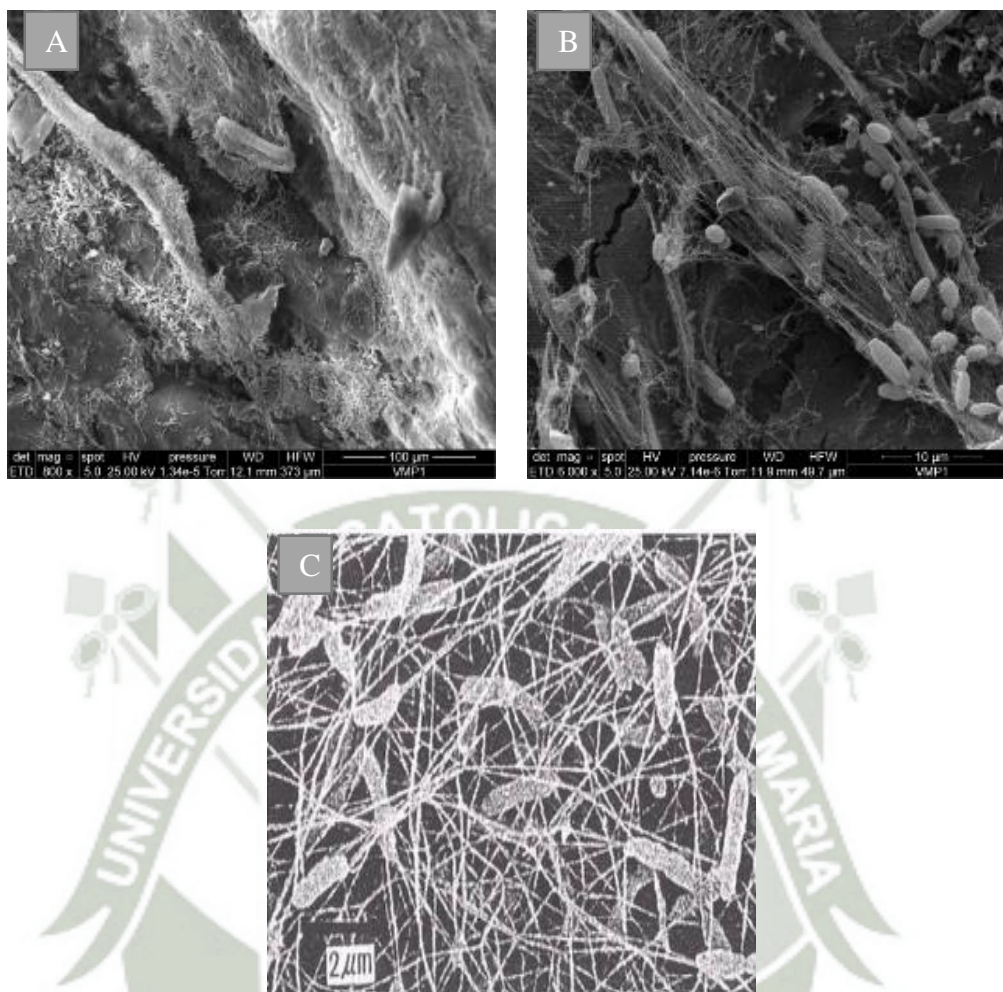


Figura N° 44 A. Microfotografía membrana VMHS B. Bacterias en el proceso de formación de microfibrillas de celulosa. C Microfotografía tomada de la fuente (Bionext, 2015)

Las imágenes de las membranas de K muestran membranas mucho más compactas, también muestran celulosa en capas muy finas y homogéneas lo que nos da una idea de lo estable de la estructura, la membrana en el medio de paña se ve un poco más deshidratada probablemente sufrió más este proceso, tanto las membranas VM como K muestran estructuras similares a las obtenidas en otros trabajos de investigación considerando que las fuentes son diferentes los resultados nos indican claramente que las muestras son de celulosa por la forma en la que se muestran las cadenas y microfibrillas .

KHS

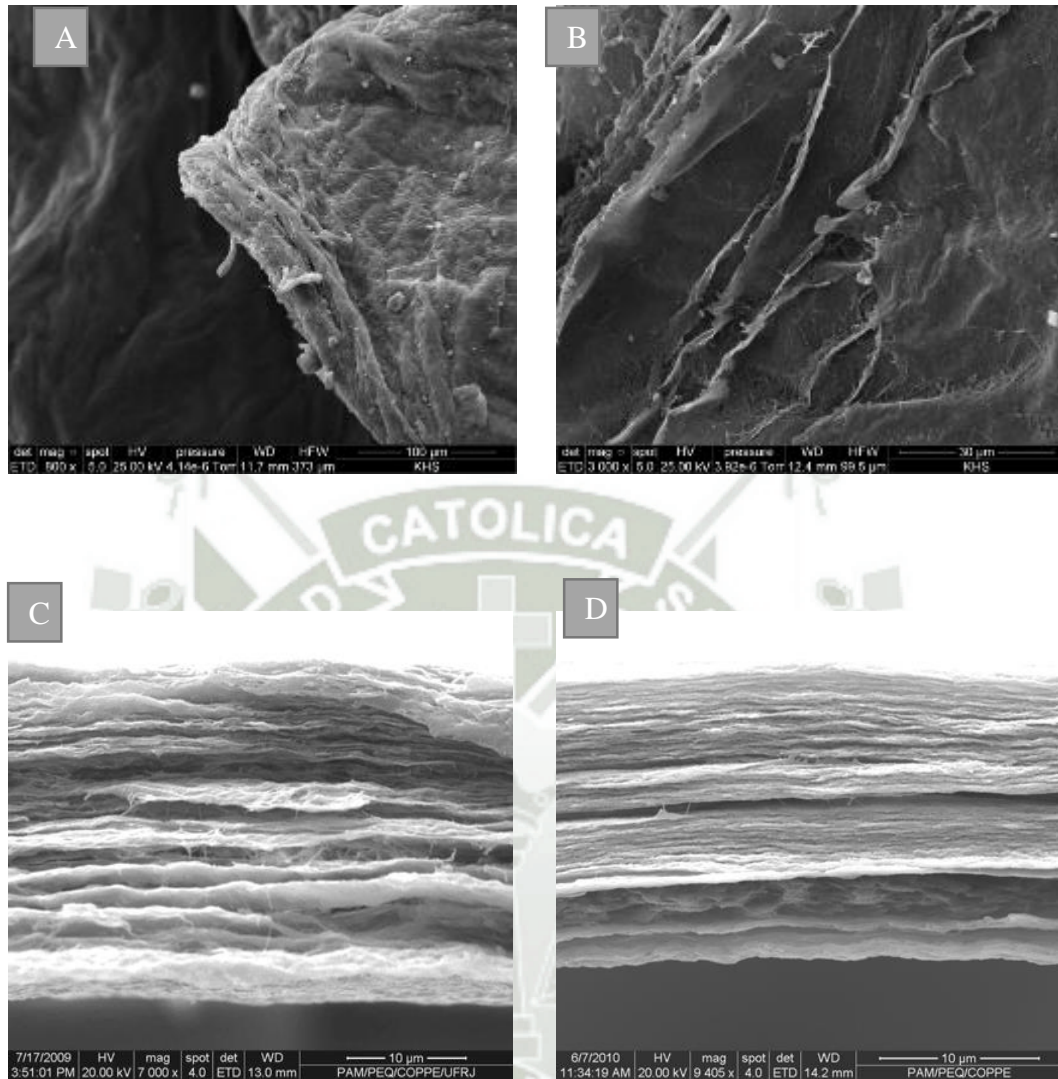


Figura N°45 A. muestra un borde la membrana KHS donde se aprecia la deshidratación que sufrió, B capas de la membrana K HS. C y D sección transversal de membranas obtenidas en la investigación de Carreño 2011.

En la figura N°45 Se puede apreciar la superficie bastante regular y compacta esto se debe a que la membrana fue tratada con NaOH 0.5 por 10 min a 60°C lo cual suele compactar mucho más las capas, la figura 44 B. muestra las capas de la membrana, fuente propia . Las C y D (Carreño, 2011) muestran una comparación de la sección transversal de membranas de celulosa bacteriana obtenidas a partir de glucosa a 30°C la 45C. Es una membrana tratada con agua

destilada y la 45 D pertenece a una membrana tratada con NaOH 1N por 10 minutos a 60 °C.

KP

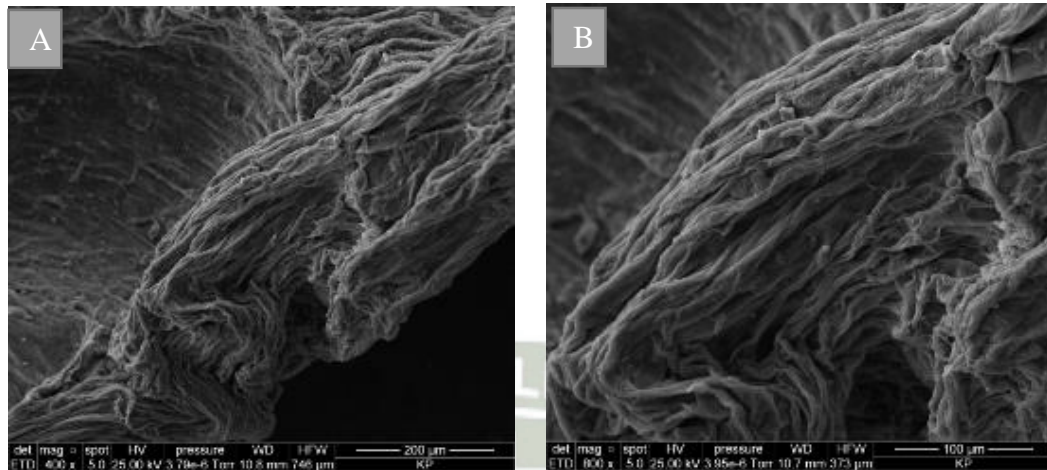


Figura N°46 Compactación de membrana de la muestra KP

En la Figura N°46 se muestra una superficie irregular estas muestran la compactación que sufren las muestras al pasar por el calentamiento con el NaOH 0.5 N además de los procesos previos a la observación al microscopio electrónico como son la deshidratación y la desecación.

POROSIDAD DE LAS MEMBRANAS

La microscopia electrónica de barrido también nos permite observar muestras húmedas pero con menor calidad de imagen, en este caso se observó una muestra no desecada y fue observada a bajo vacío en la Figura N°47 A y C se pueden observar que a comparación de las muestras desecadas en esta existen espacios entre las cadenas y fibras que le confieren a la celulosa bacteriana su capacidad de absorción y permeabilidad de gases lo que la hace un material muy usado en medicina como apósito en quemaduras y heridas donde se utilizan incluso antibióticos y otras sustancias que ayudan a curar y regenerar los tejidos. La Figura 47 B es una imagen de comparación de la fuente (Blaker, 2009) en

donde también se puede apreciar la porosidad de la membrana de celulosa de su investigación.

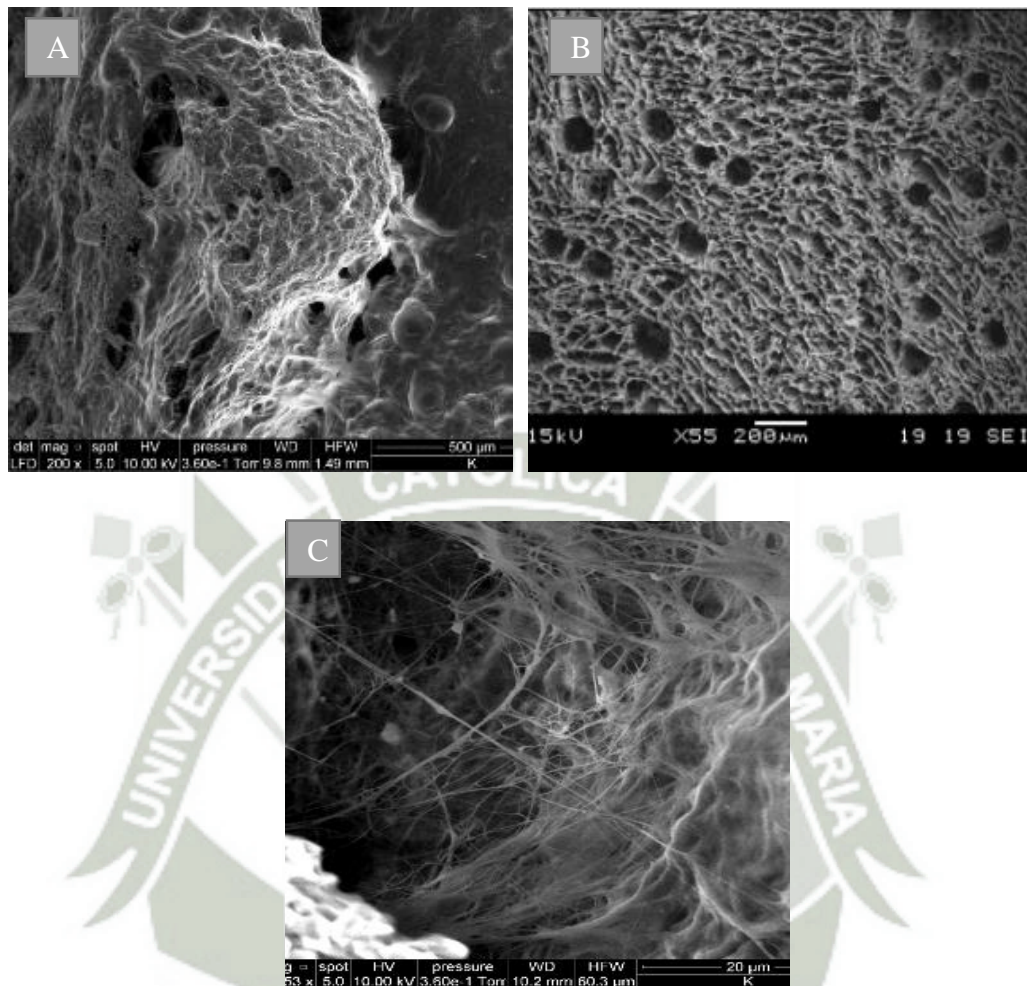


Figura N°47 A. En la imagen se puede apreciar la porosidad de la membrana por ser una membrana que no sufrió desecación. B. Microfotografía tomada de la fuente (Blaker, J., Lee, Y., Mantalaris, A y Bismarck, A., 2009) en donde se muestra la porosidad de la membrana de celulosa bacteriana. C. fibras que componen la membrana haciéndola porosa.

- **ESPECTROSCOPIA DE DIFRACCION DE RAYOS X (EDX)**

Mediante la aplicación conjunta de ambas técnicas (SEM-EDX) es posible obtener la distribución de los elementos químicos seleccionados en áreas definidas de interés, el análisis cualitativo está basado en la discriminación de las energías de los rayos x captados por el detector estas energías pertenecen al

tránsito orbital de los electrones en un elemento dado, en elementos más pesados es más complicado puesto a que el número de energías emitidas aumenta con el número de orbitales, el software del equipo detecta e identifica los distintos elementos, en algunas ocasiones ese puede presentar solapamiento de picos en el espectro esto se da por la similitud de energía en orbitales de distintos elementos.

VM en HS

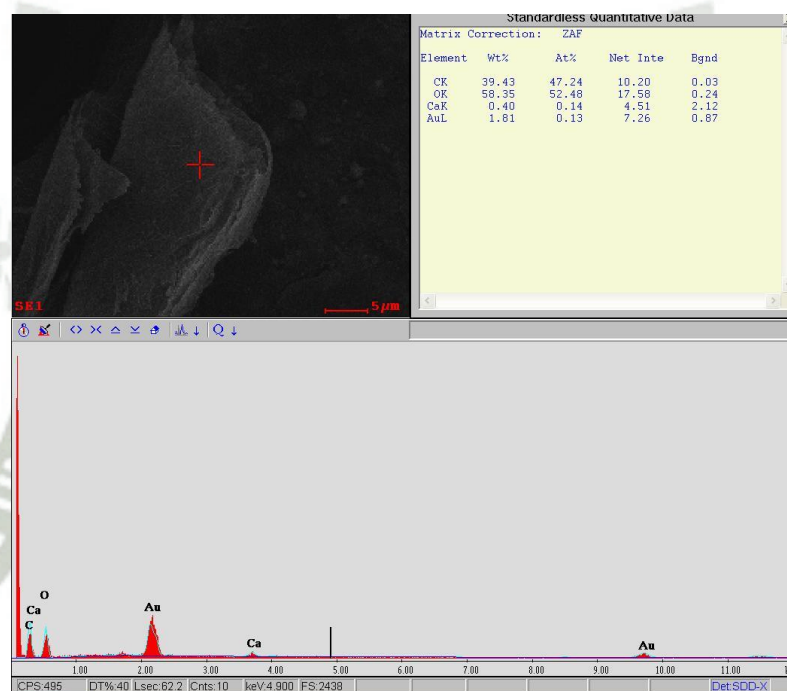


Figura N°48 Espectro Edx membrana VMHS, en la esquina superior muestra el punto de l muestra que se tomó para el análisis, a la derecha los porcentajes del análisis cuantitativo y abajo los picos de los elementos encontrados.

En la Figura N°48 se aprecia los picos que son señalados a partir del punto seleccionado en la pantalla la caracterización cualitativa y cuantitativa de los elementos presentes en la muestra en este caso se puede notar la presencia de carbono 39.43 % en peso total, oxígeno 58.35 % peso total y 1.81% de oro presente por el metalizado.

VM en piña

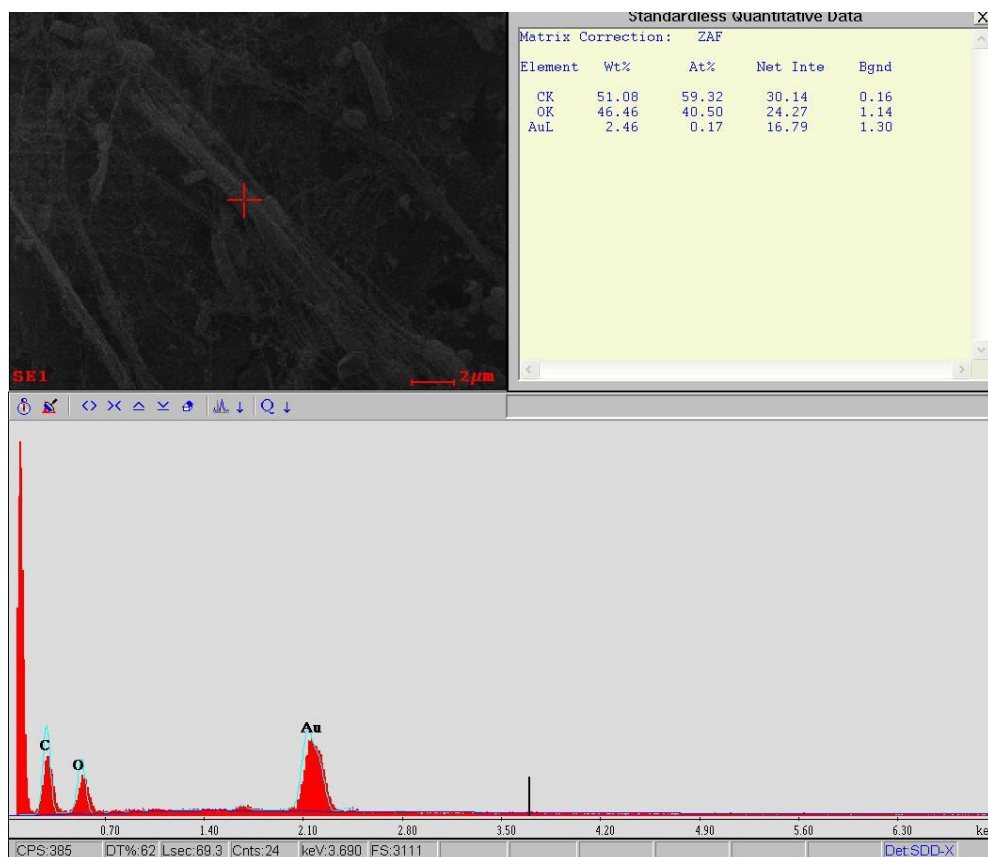


Figura N° 49 Espectro de Edx membrana VM piña. Se muestra el punto de toma de muestra, los porcentajes de cuantificación y los picos de los elementos presentes.

En la figura N°49 se aprecia que el punto de muestreo fue tomado a partir de las membranas en formación en este caso se observa un 51.08% de Carbono, 46.46% de Oxígeno y 2.46% oro existen otros picos que se pueden presentar como son el ruido o elementos en trazas que provienen de las sustancias con las que la membrana tuvo contacto como es el agua.

K en HS

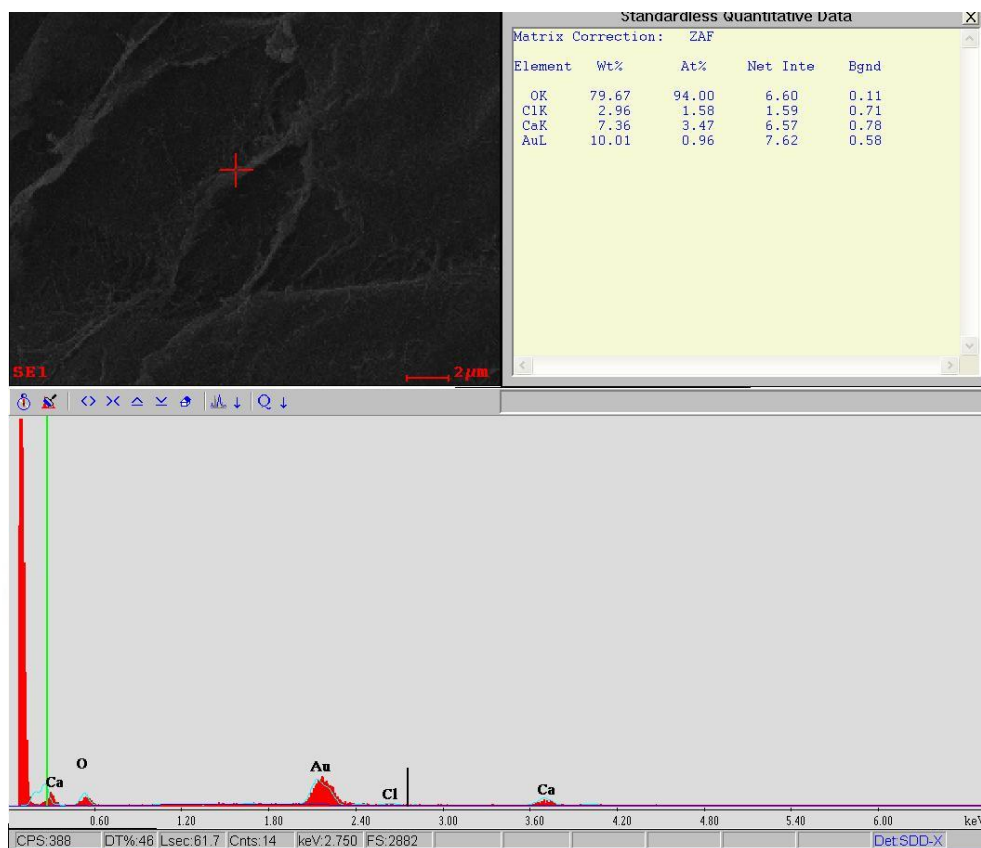


Figura N° 50 Espectro Edx de la membrana K-HS. Se muestra el punto de toma de muestra, los porcentajes de cuantificación y los picos de los elementos presentes.

En la Figura N°50 se aprecia un peso del oxígeno en un 79.67% del peso total el carbono aparece desplazado por lo que no fue cuantificado, en esta sección de la membrana se advierte la presencia de calcio y cloro en trazas que al parecer se encontraban en el agua.

K en piña

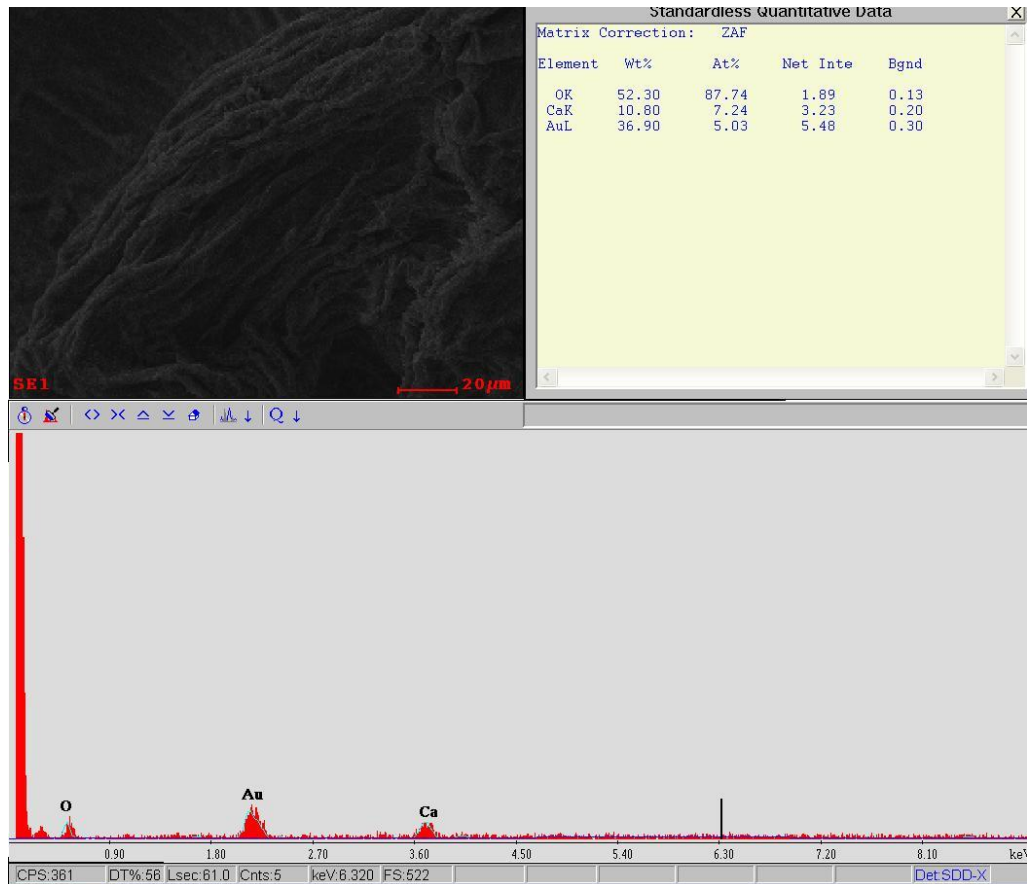


Figura N° 51 Espectro Edx obtenido a partir de la membrana K piña

Esta membrana presenta oxígeno al parecer el carbono se encontraría desplazado, también contiene trazas de calcio probablemente el agua no estuvo muy bien destilada.

En los puntos señalados en el análisis se observa que la señal de los elementos C y O es muy clara para las cuatro muestras a pesar de que para las muestras K el espectro se encuentra desplazado por lo que no pudo ser cuantificado, recordemos la fórmula de la celulosa es $(C_6H_{10}O_5)_n$ el hidrogeno no puede ser detectado mediante esta técnica por poseer un solo electrón, el análisis también detecta otros elementos en trazas como son calcio y cloro, es probable que estos elementos se encuentren presentes por el contacto de las muestras con agua destilada que lamentablemente no alcanza una pureza al 100%, además de esto también observamos la presencia de oro (Au) debido a la metalización.

• ESPECTROSCOPIA IR

Las membranas de celulosa obtenidas fueron analizadas por un espectrofotómetro FT-IR Shimadzu del laboratorio USAQ de la Facultad de Química e Ingeniería Química de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el rango de trabajo fue de 400 – 4000 cm^{-1} . Algunos autores (Dufresne, 2013), (Carreño, 2011) reportan espectros en 1000, 1015, 1030 cm^{-1} para deformaciones axiales de los enlaces C-C y 1090 cm^{-1} para C-O, la vibración de los grupos C-O-C se asocia a las bandas entre 1600 y 1100 cm^{-1} , la banda a 1642 cm^{-1} se da por la flexión H-O-H del agua absorbida, las bandas a 2890 cm^{-1} son atribuidas a los enlaces C-H, y la absorción alrededor de 3330 cm^{-1} se asocia al enlace OH, además la forma de las bandas de 4000-2995, 2900, 1430, 1375 y 900 cm^{-1} se relaciona con el orden o desorden en la morfología del polisacárido y está relacionada con la cantidad de celulosa cristalina frente a fracciones amorfas.

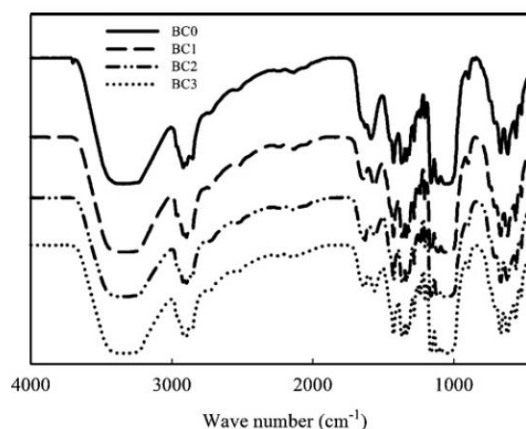


Figura N°52 Espectros de celulosa de la fuente (Mazhar, U. et al 2013)

Los espectros de las Figuras N°53, 54, 55 y 56 fueron obtenidos en un cultivo estático a 30°C por 10 días.

En el análisis para las muestras de esta investigación se puede observar picos reportados en la literatura así tenemos 3300 cm^{-1} para OH, 2890 cm^{-1} para la deformación axial del enlace C-H, la banda de 1680 cm^{-1} perteneciente al enlace carbonilo C=O, la absorción en 1540 cm^{-1} aproximadamente y que se

presenta en las membranas VM piña, VM HS y K piña según (Carreño, 2011) este pico corresponde al enlace amida NH que tendría relación con las proteínas remanentes de la biomasa presente en la muestra, los picos entre 1300 y 1500 cm^{-1} se deben a la deformación angular de CH, el pico a 1090 cm^{-1} designa el enlace C-O, y la absorción entre 897 y 1429 cm^{-1} pertenece al “tijereteo del enlace CH₂ y confirman la presencia de la estructura de la celulosa tipo I. Los picos a 1372 cm^{-1} perteneciente a la deformación angular del enlace C-H y 2900 cm^{-1} perteneciente a la deformación de los enlaces C-H se utilizan para determinar el grado de cristalinidad. Espectro de absorción de la muestra VMP Piña. (AnexoN°13)

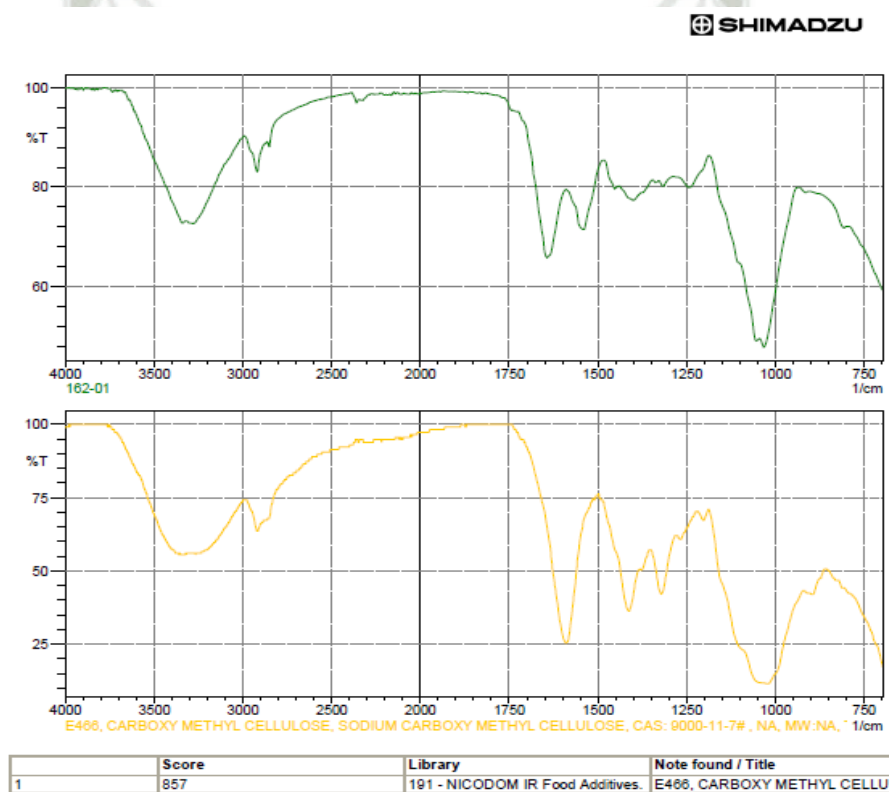


Figura N°53 Espectro obtenido en el análisis FT IR de la muestra VM en HS (verde) y su comparación (amarillo) con el espectro de Carboximetil celulosa con el que tuvo una similitud de 85.7 %.

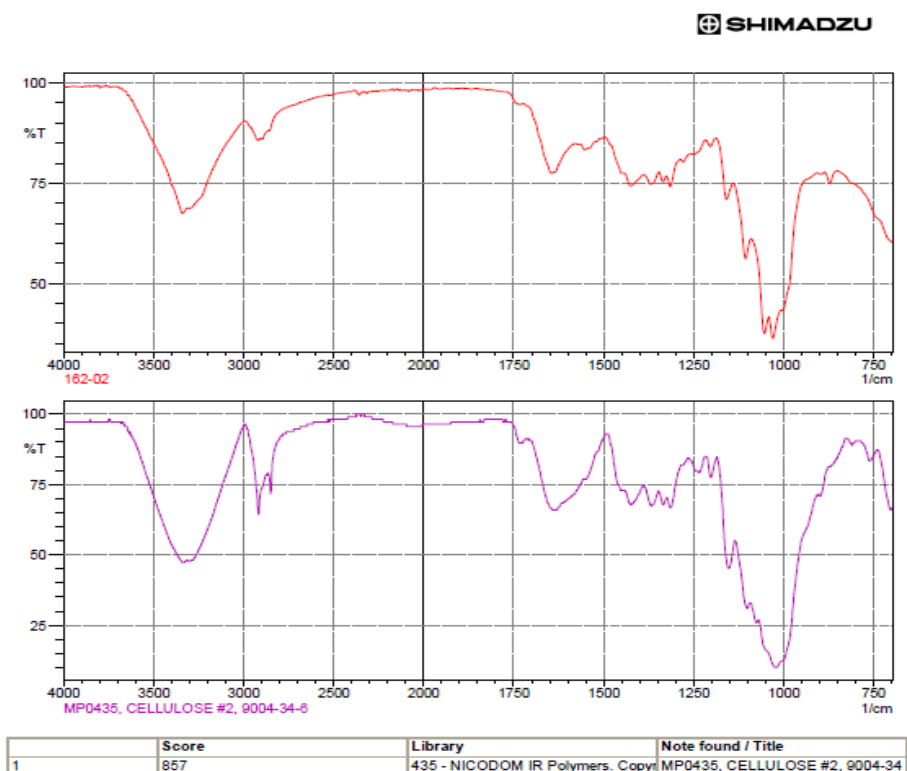


Figura N°54 Espectro obtenido en el análisis FT-IR de la muestra VM en piña (rojo) y su comparación (morado) con el espectro de Celulosa tipo 2 con el que tuvo una similitud de 85.7 %.

Los espectros presentados en las Figuras 53, 54, 55 y 56 fueron comparados con una base de datos del software estos se encuentran debajo de cada uno de los obtenidos por las muestras. En el espectro de la membrana VM en piña se compara con carboximetilcelulosa, con el que presenta una similitud de 85.7%. VM en HS la muestra presenta un 85.7 % de similitud con celulosa tipo 2, la membrana K en HS presenta un 91.4 % de similitud con celulosa tipo 1, y el espectro de la membrana K en piña muestra 84.7% de similitud con la celulosa tipo 2.

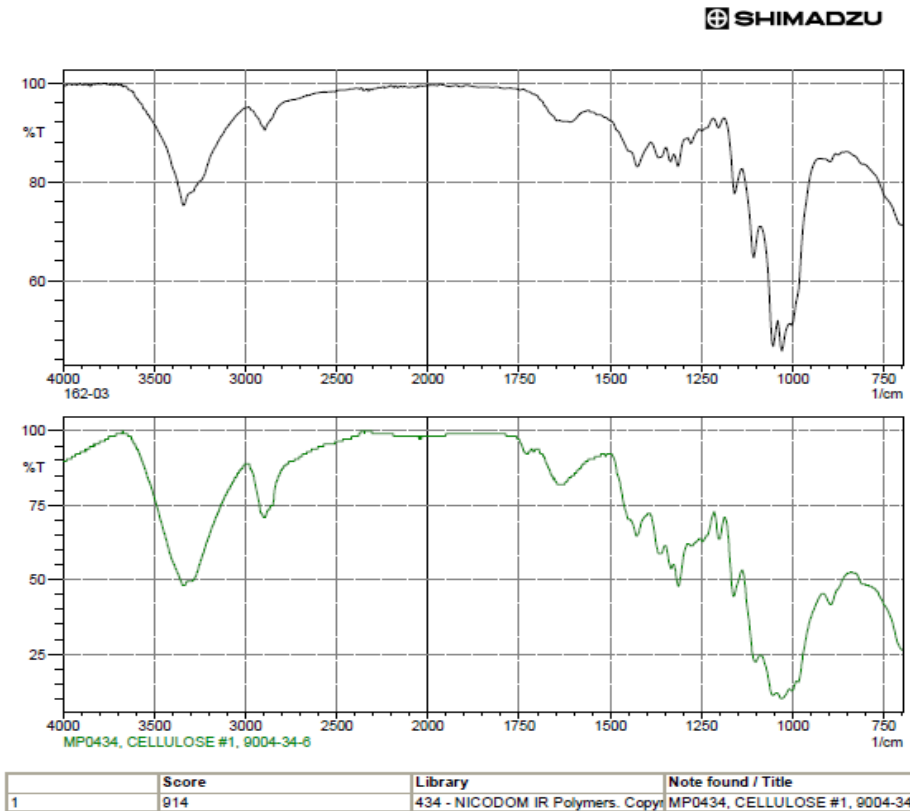


Figura N°55 Espectro obtenido en el análisis FT-IR de la muestra K en HS (plomo) y su comparación (verde) con el espectro de Celulosa tipo 1 con el que tuvo una similitud de 85.7 %.

Una de las características de la CB es su alto grado de cristalinidad mayor a 60% según literatura, esta celulosa cristalina estaría compuesta de celulosa tipo Ia y I β la relación de las formas cristalinas depende del microorganismo y de las condiciones de cultivo pero la celulosa tipo I es la más cristalina y como vemos en la muestra K en HS cuya similitud con la celulosa tipo I está en un 91.4% podemos decir que es la muestra más cristalina que tenemos además de la apreciación a simple vista. La figura N°56 muestra la similitud de la membrana K en piña con celulosa tipo II esta es una estructura estable al parecer esta se adquiere al ser tratada con NaOH y en este caso es la que predomina, no presenta mucha cristalinidad es por ello su comparación con el espectro de celulosa tipo II y no del tipo I.

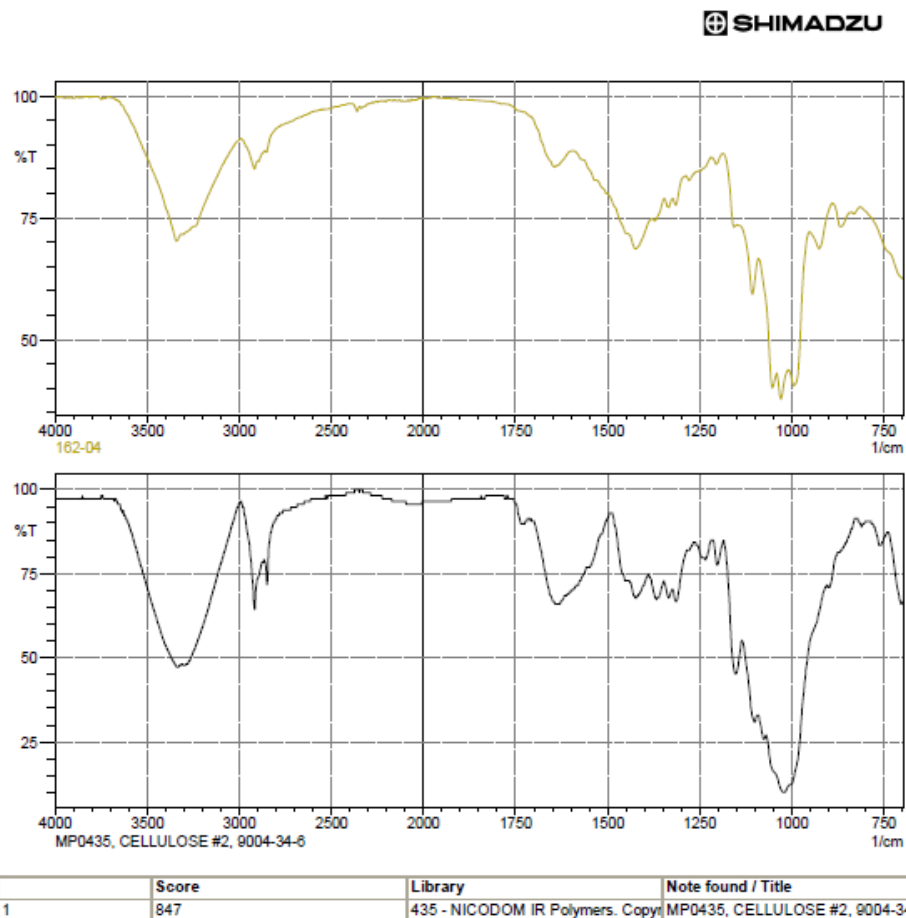


Figura N°56 Espectro obtenido en el análisis FT-IR de la muestra K en piña (beige) y su comparación (negro) con el espectro de Celulosa tipo 2 con el que tuvo una similitud de 84.7 %.

B) PROPIEDADES MECÁNICAS Y DE TRANSPORTE

• TRACCIÓN

El ensayo de tracción se llevó a cabo con un dinamómetro digital marca Liyi Tech, del laboratorio R102 del programa profesional de Ingeniería Mecánica de la Universidad Católica de Santa María, para el ensayo se confeccionaron probetas de 10 cm de largo por 1 cm de ancho se midió el grosor de cada una con un micrómetro digital marca Engels Merkel 40ER y luego se procedió a colocar la probeta en el dinamómetro el cual aplico la fuerza de tracción hasta

que la probeta se rasgó, registrando los resultados y continuando con las siguientes probetas. El cálculo de la tensión máxima (σ_{max}) se obtuvo a partir de la gráfica de carga vs desplazamiento y el área de la membrana se halló mediante la ecuación de la Figura N°11 (**Anexo N°14**)

$$A = E \cdot B$$

Donde

A = Área

E = Espesor

B = Ancho

Muestra	Espesor promedio (mm)	Área (mm ²)	Tensión máxima (N/mm ²)
VM HS	0.06	0.6	0.8
VM piña	0.036	0.36	0
K HS	0.224	2.24	3.4
K Piña	0.167	1.67	0.2

Tabla N°14 Cuadro que muestra las características de tracción de las probetas de celulosa

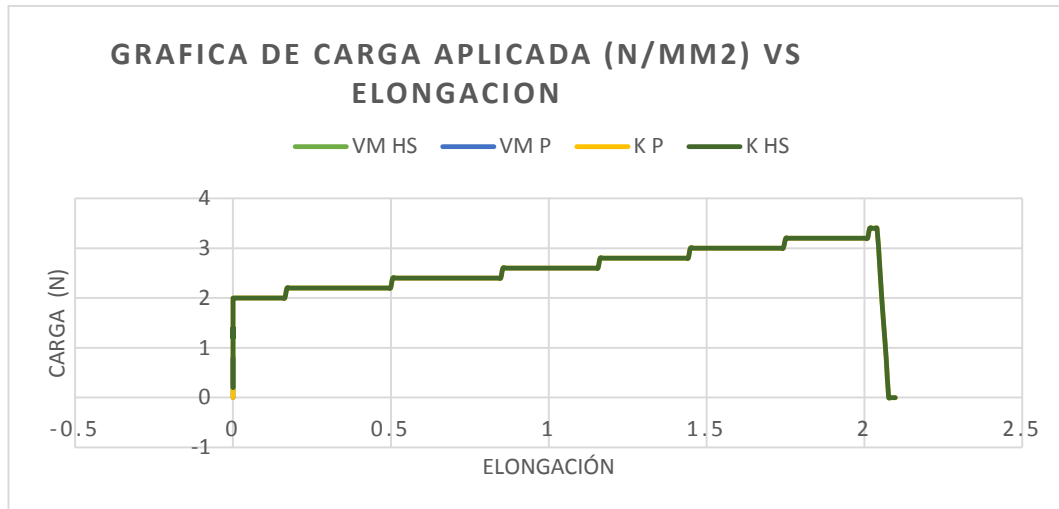


Figura N°57 Grafica de tracción de las muestras VM en HS VM en piña K en HS y K en piña donde se muestra la carga aplicada vs la elongación

Las biomembranas fueron sometidas a fuerzas que aumentaban en cada segundo, el análisis permitió conocer que la membrana K en HS es 4 veces más resistente y flexible que la membrana de la cepa VM en HS, la biomembrana menos flexible fue la VM en piña y la membrana K en piña resistió muy poco 4 veces menos que la membrana K en HS aunque también podemos decir que esto se debe al estado de secado de las membranas las más delgadas secan más rápido y si las sometemos al mismo tiempo estas se encontrarán mucho más secas por lo que se romperán más rápido.



Figura N° 58 Medición de espesor de probetas de celulosa.

El espesor es un parámetro muy importante como podemos observar la membrana con mayor espesor fue la que soporto mayor fuerza, aunque según esto la membrana de K en piña debió soportar más, probablemente la razón de los resultados sea el secado del que hablábamos anteriormente.

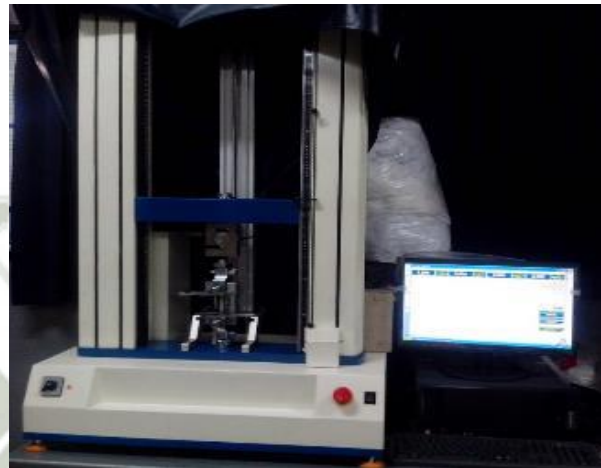


Figura N° 59 Dinamómetro digital del PP. Ing. Mecánica de la Universidad Católica de Santa María.



Figura N°60 Medición de tracción simultáneamente al estiramiento se va dando la lectura de los datos con el software.

Otro dato importante es que si la membrana presenta algún daño previo pueda ser al recortar la probeta o tal vez algún agujero o rasgadura esta tendera a romperse por este y no soportara fuerza o reportara datos erróneos pues se romperá antes de tiempo.

- **GRADO DE HINCHAMIENTO**

Una muestra de 1cm² fue tomada de cada una de las membranas se pesó y se sometió a remojo con agua durante 24 horas esto dentro de una placa Petri luego fueron pesadas nuevamente para calcular el grado de hinchamiento se utilizó la ecuación de la Figura N°15.

$$Q = \frac{Wh - Ws}{Wh} * 100$$

Donde

Ws = Peso seco de la membrana

Wh = Peso húmedo de la membrana

Muestra	Ws g	Wh g	Q %
VM HS	17.10	17.47	2.12
VM Piña	2.40	2.52	4.76
K HS	4.30	4.73	9.09
K Piña	13.50	14.20	4.93

Tabla N°15 Grado de hinchamiento de las membranas VMHS VM Piña K HS y K Piña

Las membranas de celulosa absorbieron de 2.12 a 9.09 % en agua esto se puede mejorar con las técnicas de secado que no sean muy abrasivas ya que dañan las capas perdiendo porosidad, los resultados indican que la membrana de la cepa K en medio HS es la que tiene mayor grado de absorción esta propiedad le permite tener a la celulosa aplicaciones médicas en donde puede mantener la humedad en heridas de quemaduras por ejemplo.



Figura N°61 Membranas de 1cm² las que fueron sometidas al ensayo de grado de hinchamiento.

C) IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA DE CELULOSA BACTERIANA

• HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE CELULOSA

Para comprobar mediante identificación microbiológica que las membranas obtenidas son de celulosa se utilizó hongos con capacidad celulolítica estos fueron *Trichoderma* sp y *Aspergillus Niger* el primero fue donado por el laboratorio de la facultad de biología de la Universidad Nacional de San Agustín y el segundo se obtuvo gracias a una tesis en la que se utilizaba el hongo *Aspergillus Níger* que se lleva a cabo en la Universidad Católica de Santa María en el momento que se realiza esta tesis, se procedió a preparar medio PDA suplementado con cloranfenicol para evitar el crecimiento de bacterias, se sembraron los hongos incubándolos a la temperatura de 30°C y por 10 días luego se procedió a colocar membranas de cada una de las muestras en placas Petri para poder ser evaluadas incubándolas por 15 días.



Figura N°62 Membranas inoculadas con hongos *Trichoderma sp.* y *Aspergillus niger* respectivamente.

Los hongos inoculados son conocidos por poseer enzimas que degradan la celulosa. Muchos hongos filamentosos están naturalmente adaptados al crecimiento sobre superficies, estos requieren contacto cercano con el sustrato debido a su nutrición heterótrofa, secreción de enzimas extracelulares, absorción de nutrientes a través de la pared celular y el crecimiento apical de sus hifas (Villena, G., Gutierrez, C., 2003) (Jones, 1994). Estos fueron inoculados directamente sobre las membranas, comenzaron a crecer en algunos casos y en otros simplemente se mantuvieron, las membranas donde el hongo no creció fueron enjuagadas con agua, estas membranas presentaron un orificio en el lugar donde estuvo el hongo, esto quiere decir que el hongo consumió como sustrato la celulosa utilizando las celulasas para degradar la celulosa a un sustrato más simple como la glucosa, quedando en evidencia que el producto obtenido ha sido caracterizado por el microorganismo. En este caso los hongos *Aspergillus niger* y *Trichoderma* hidrolizando enzimáticamente la celulosa y utilizándola como único sustrato.

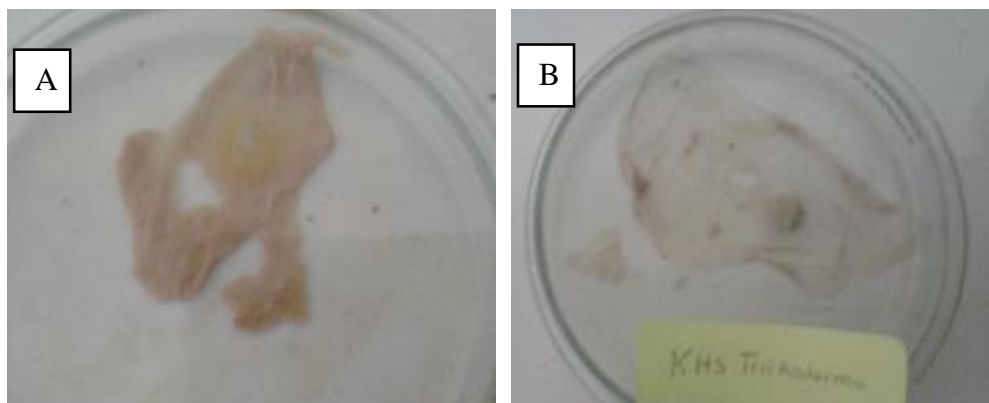


Figura N°63 A. *Trichodermas sp.* Creciendo sobre una membrana de celulosa en medio de piña B. Membrana que presenta un orificio en el medio que se produjo al momento de enjuagarla con agua en el lugar del orificio se inoculo el hongo previamente.

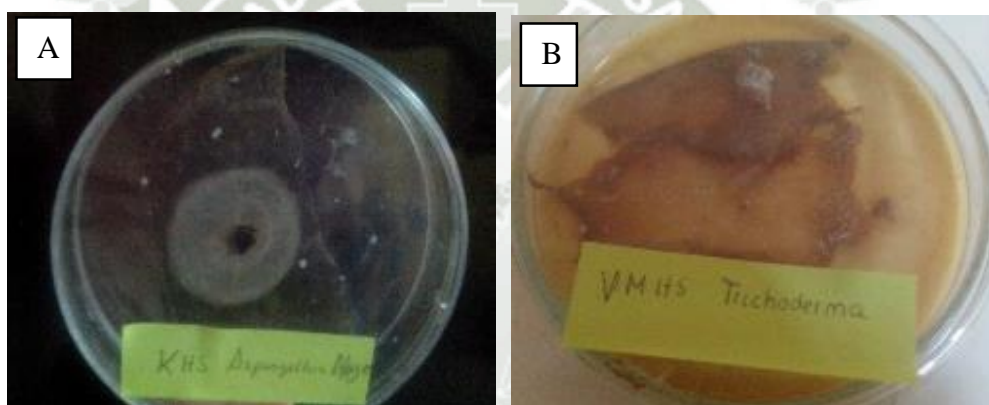


Figura N°64 A *Aspergillus Níger* creciendo sobre la membrana de celulosa KHS, B. Hongo trichoderma creciendo sobre membrana VMHS.

CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

5.1 CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en la presente investigación se puede concluir:

Primera: La celulosa microbiana fue obtenida de fuente bacteriana determinando su carácter pluricelular que evidencia su obtención de diferentes fuentes microbianas.

Segunda. Se aisló y caracterizo bioquímicamente las cepas bacterianas nativas a partir de Vinagre de manzana y Kombucha.

Tercera. Se configuró el sistema estático de producción de celulosa en un ambiente controlado.

Cuarta. Se comparó la producción de celulosa entre las cepas de Vinagre de Manzana VM y la cepa de Kombucha K. Obteniéndose como resultado los valores de u_{max} de 0.0143 h^{-1} para la cepa VM y 0.0168 h^{-1} para la cepa K junto con una producción de 9.2526 g/L y 7.5920 g/L para la cepa VM en medio HS, así también se comparó la producción en el medio de residuos de piña con los valores de 6.3800 y 8.7400 g/L para VM y K respectivamente, esto nos permite concluir que la cepa

que presenta mayor producción es K y que el medio sintético HS es mejor que el medio de piña por ser donde se obtuvo mayor producción en ambas cepas.

Quinta. Se determinó las características estructurales de la celulosa mediante microscopia electrónica de barrido, edx, FT-IR, se confirmó la microestructura fibrilar, la forma de varilla de la cepa *Gluconacetobacter sp.* la síntesis de celulosa, la diferencia de las membranas más compactas o menos compactas según el proceso de secado y tratamiento previo con NaOH 0.5N, y la porosidad de las membranas. Con edx se confirmó la composición elemental de C y O principalmente, FT-IR nos muestra la composición molecular comparando la muestra VM en piña con Carboximetil celulosa en un 85.7 %, la muestra VM en HS con celulosa tipo II con una semejanza de 85.7%, la muestra K en HS comparada con celulosa tipo I con una semejanza de 91.4% y la muestra K en piña comparada con celulosa tipo 2 con un porcentaje de similitud de 84.7%, El ensayo de determinación de propiedades mecánicas de tracción determino que K en HS fue la membrana con mayor resistencia con 3.4 N/mm² de tensión máxima soportada en el ensayo con dinamómetro digital, y las propiedades de transporte mediante el análisis de grado de hinchamiento le confieren a la membrana K en HS la muestra con mayor absorción con un hinchamiento de 9.09%.

Sexta. Se identificó microbiológicamente la celulosa bacteriana mediante el uso de hongos con capacidad celulolítica, *Aspergillus Niger* y *Trichoderma sp.* demostrando que el producto obtenido es celulosa.

5.2 SUGERENCIAS

- Se puede optimizar el sistema de producción utilizado con sistemas de control automatizados de medición de temperatura y pH que lean en tiempo real sin necesidad de hacerlo manualmente.
- El sistema batch si bien es recomendable para la producción de membranas se puede probar un sistema de cultivo agitado claro que para esto se necesita una mayor inversión por la cantidad de controles que tiene este cultivo, puesto a que las aplicaciones para este cultivo son variadas y en algunos casos diferentes.
- En este caso se logró una producción de hasta 73.068 g/L en K en HS esto se puede mejorar puesto a que existen relaciones de altura y ancho estudiadas que pueden presentar mejores rendimientos y pueden ser aplicadas en un estudio posterior.
- El medio de residuos de piña es un medio que si bien no tuvo rendimiento en producción como el medio en HS se puede seguir estudiando combinando o cambiando sustratos puesto a que esto puede generar menores costos de producción, así como también se pueden estudiar medios preparados a base de otros residuos frutales con los mismos fines.
- Se puede realizar un estudio de escalamiento tanto de producción como económico.
- Realizar una caracterización molecular para la identificación de la cepa *Gluconacetobacter sp.* con el fin de identificar la especie a la que pertenece.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akerholm, y. c. (2004).
- Andelib, Y. D. (2009). Isolation of Cellulose Producing Bacteria from Wates of Vinegar Fermentation. *Proceedings of the World Congress on Engineering and Computer Science, I*, 978-988.
- Bionext. (2015). *Bionext technology*. Obtenido de <http://bionext.com.br/english/tecnologia/celuloseBacteriana.php>
- Blaker, J. L. (2009). Nanocomposite scaffolds based on bacterial cellulose and polylactide towards the 3D culture of haemopoietic stem cells. *ICCM*.
- Blaker, J., Lee, Y., Mantalaris, A y Bismarck, A. (2009). Nanocomposite scaffolds based on bacterial cellulose and polylactide towards the 3D culture of haemopoietic stem cells. *ICCM*.
- Blasco, L. (2009). *Aplicacion de las técnicas fish, pcr especifica y 16S-ARDRA al estudio de la población bacteriana asociada al proceso de vinificación*. Valencia.
- Britanialab. (2 de Junio de 2015). *Laboratorios Britania*. Obtenido de <http://www.britanialab.com/productos.php>
- Brown, R. (2004). Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21 century? *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 487-495.
- Carreño, L. (2011). *Efecto de las condiciones de cultivo y purificacion sobre las propiedades fisicoquimicas y de transporte en membranas de celulosa bacteriana*. Bogotá.
- Carrillo, F. (2002). Caracterizacion estructural de fibras lyocell y su comportamiento frente a procesos de degradación. *Tesis*.
- Chavez, J. M. (2004). Celulosa Bacteriana en gluconacetobacter xylinum: biosíntesis y aplicaciones. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biologicas*, 18-25.

- Chawla, P. B. (2009). Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. *Food Technol. Biotechnology*, 107-124.
- Chen, H. (2014). *Biotechnology of lignocellulose*. Beijing: Springer.
- Consenso de la sociedad española de nutrición comunitaria. (2010). http://www.magrama.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/pi%C3%B1a_tcm7-315342.pdf.
- Díaz, M. (13 de setiembre de 2012). *Pruebas de identificación bacteriana*. Obtenido de Microbioweb: <http://chopo.pntic.mec.es/~gdiaz3/temas/b3/tema16.html>
- Dufresne, A. T. (2013). *Biopolymer Nanocomposites processing, properties and applications*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Escalante, R. (2002). *Tesis Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios*. Lima, Perú.
- Festucci-Buselli. (2007).
- Focus Technology Co., L. (2012). *Hefei Joye Import & Export Co., Ltd*. Obtenido de http://es.made-in-china.com/co_chinahefeijoye/product_Microcrystalline-Cellulose-MCC-CAS-No-9004-34-6-pH101-pH102-Pharma-Grade_esrrgiyug.html
- Fogler, S. (2004). *Elementos de ingeniería de las reacciones químicas*. Nueva Delhi: Prentice-Hall.
- Gama, M. G. (2012). *Bacterial Nano Cellulose: A Sophisticated Multifunctional Material*. Boca Raton: Taylor & Francis Group.
- Gamazo, C., López-Goñi, I. y Díaz, R. (2005). *Manual práctico de Microbiología*. Barcelona: Masson, S.A.
- García, M. U. (2005). *Conservación de cepas microbianas*. Obtenido de www.uv.es/cect.
- Granada, U. u. (09 de Mayo de 2005). *Ciclo celular y crecimiento*. Obtenido de <http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/12crecimiento.htm>

- Guillamon, J. M. (2008). *Acetic Acid Bacteria*.
- Hestrin, S. S. (1954). Synthesis of cellulose by *Acetoacter xylinum*. *Biochemical Journal*, 345-352.
- Hun Choi, Y. e. (2013). *Jeonju - Korea Patente n° WO2013073722 A1*.
- IJSEM. (1998). Validation List N° 64. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 327-328.
- Illana, C. (2007). *El hongo Kombucha*. Madrid.
- Infante, R., Cebrián, A. y Vara, A. (2006). *Recurso virtual: Los polímeros en medicina*. Obtenido de Universidad de Valladolid: <http://www.eis.uva.es/~macromol/curso05-06/medicina/hidrogeles.htm>
- Jaramillo, R. P. (2013). Efecto de diferentes concentraciones de fructosa sobre la producción de celulosa bacteriana en cultivo estático. *Rev. Colombiana Cienc. Anim.*, 116-130.
- Jaramillo, R. T. (2012). Efecto de la sacarosa en la producción de celulosa por *Gluconacetobacter xylinus* en cultivo estático. *MVZ Córdoba*.
- Jonas, R. F. (1998). Production and application of microbial cellulose. *Elsevier Science Limited*, 101- 106.
- Karahan, A. (2010). Some properties of bacterial cellulose produced by new native strain *Gluconacetobacter* sp A06O2 obtained from turkish vinegar. *Wiley Online Library*.
- Kroschwitz, J. H.-G. (1993). *Encyclopedia of Chemical Technology* (4ta Ed ed.). Wiley Interscience publication.
- Loiret, F. O. (2004). *Gluconacetobacter diazotrophicus* Es todavía un dilema para la ciencia. *Revista Biología*, 113-122.
- Madigan, M. M. (2003). *Brock Biología de los Microorganismos*. Illinois: Pearson.
- Martinez, A. (2010). *Microanálisis por dispersión de energías de rayos-X (XEDS) Conceptos básicos*. Málaga: Universidad de Málaga.

- Matthysse, A. T. (1995). Mechanism of cellulose synthesis in agrobacterium-tumefaciens. *Journal of Bacteriology*, 1076-1081.
- Mazhar, U. J. (2013). Effects of glucuronic acid oligomers on the production structure and properties of bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 360-366.
- Mikkelsen, y. c. (2009). *citado en Efecto de las Condiciones de Cultivo y Purificación sobre las Propiedades Físicoquímicas y de Transporte en Membranas de Celulosa Bacteriana*. Bogotá.
- Moreno, J. S. (2007). *Recurso Virtual Uv*. Obtenido de <http://www.uv.es/ocw/ocwsecundaria/estructuras.html>
- Moretti, D. (2013). *Producao de biofilme (membrana de biocelulose) por Gluconacetobacter xylinus em meio de resíduos de frutas e folhas de chá verde*. Sao Paulo.
- Mundonatural. (2015). Como hacer vinagre de manzana en casa. *Mundo Natural*.
- Núñez, C. (2004). *Programa de investigacion de celulosa y papel*. Obtenido de Facultad de Ciencias exactas, Químicas y Naturales: <http://www.aulavirtual-exactas.dyndns.org>
- Parés, R., Juárez, A. (2012). *Bioquímica de los microorganismos*. Barcelona: Reverté S.A.
- Pisabarro, A. (2009). *Microbiología Clínica*. Obtenido de Diplomatura en enfermería- Universidad de Navarra: <http://www.unavarra.es/genmic/microclinica/tema01.pdf>
- Rojas, M. G. (2007). Interacciones entre Gluconacetobacter diazotrophicus y la comunidad bacteriana endófito de la caña de azucar. *Cultivos Tropicales*, 28, 11-16.
- Roldán, P. C. (2013). Optimización de la producción y caracterización de nanocelulosa bacteriana obtenida a partir de residuos agroindustriales. *Consejo Nacional de Investigaciones*.

- Ross, P. M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Reviews*, 35-58.
- Sanchez, L. ., (2005). Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso. *Nova*, 109-113.
- Shoda, M. S. (2005). Recent advances in bacterial cellulose production. *Biotechnol, Bioprocess Eng*, 1-8.
- SIOVM, S. d. (2011). *CONABIO*. Obtenido de http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/21273_sg7.pdf
- Tonouchi, y. c. (2011). *citado en efecto de las Condiciones de Cultivo y Purificación sobre las Propiedades Físicoquímicas y de Transporte en Membranas de Celulosa Bacteriana*. Bogotá.
- UNER. (2010). Arándanos. En F. d. alimentacion. Entre Rios: UNER.
- University of California, U. (2014). *Viticulture & Enology*. Obtenido de <http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/winebacteria>
- UPCT. (2010). *Fundamentos difraccion de rayos x*. Barcelona.
- Upm, E. d. (2009). <http://www.upm.com/uy/planta/celulosa/elaboracion/Pages/default.aspx>.
- Valencia, U. p. (2012). <http://www.upv.es/entidades/SME/info/859071normalc.html>.
- Vegas, C. (2011). Metodos moleculares para el estudio de las bacterias implicadas en la elaboración de vinagre de vino tradicional. *Universidad Rovira I Virgili*, 185.
- Villena,G., Gutierrez,C. (2003). Biopelículas de *Aspergillus Niger* para la producción de celulasas: Algunos aspectos estructurales y fisiológicos. *Perú Biol.*, 78-87.
- Weiss, D. (2004). Bacterial cell division and the septal ring. *Molecular Microbiology*, 588-597.

Yamada, Y. Y. (2005). Genera and species in acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 15-24.

Yang, Y. P. (1998). Cellulose production by *Acetobacter Xylinum* BRC5 under agitated condition . *Ferment. Bioeng.*, 312-317.



ANEXO 1

*Composición de medios para un Litro.

COMPOSICIÓN DE MEDIO CaCO₃

Glucosa	0.5 g
Peptona	3.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
CaCO ₃	15 g
Agar	12 g
Etanol	1.5 ml

COMPOSICIÓN DE MEDIO SIM

Tripteina	20 g
Peptona	6.1 g
Sulfato de hierro y amonio	0.2 g
Tiosulfato de sodio	0.2 g
Agar	3.5 g

COMPOSICIÓN DE MEDIO UREA

Peptona de carne	1.0 g
D-Glucosa	1.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g

Fosfato de potasio monobásico	2.0 g
Rojo fenol	0.0012 g
Agar	12 g

COMPOSICIÓN DE MEDIO TSI

Sulfato ferroso	0.2 g
Tiosulfato de sodio	0.3 g
Rojo fenol	0.024 g
Agar	12 g

COMPOSICIÓN DE MEDIO CITRATO SIMMONS

Cloruro de sodio	5.0 g
Fosfato dipotásico	1.0 g
Fosfato monoamónico	1.0 g
Sulfato de magnesio	0.2 g
Azul de bromotimol	0.08 g
Agar	15.0 g

COMPOSICIÓN DE MEDIO MANITOL

Glucosa	10 g
Glutamato de sodio	5 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g

KCl 0.1 g

Agar 20 g

COMPOSICIÓN DE MEDIO GLUTAMATO

Manitol 25 g

Extracto de levadura 5 g

Peptona 3 g

Agar 20 g

COMPOSICIÓN DE MEDIO GLICEROL

Glicerol 3%

COMPOSICIÓN DE MEDIO GELATINA

Extracto de carne 3.0 g

Gelatina 120.0 g

Peptona 5.0 g

ANEXO 2

COMPOSICIÓN DE MEDIO PDA

Papa	200 g
Dextrosa	20 g
Agar	20 g
Cloranfenicol	0.05 g



ANEXO 3

CALCULO DE ϵ

Una vez obtenidas las absorbancias, con el valor de la concentración de la escala de Mc Farland N°3 y la Ley de Beer - Lambert se halló ϵ .

ϵ para VM

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C$$

$$0.895 = \epsilon \cdot \left(\frac{9 \times 10^8 \text{ cel}}{\text{ml}} \right) \cdot 1 \text{ cm}$$

$$\epsilon = \left(\frac{9.94 \times 10^{-10} \text{ cel}}{\text{cel} \times \text{cm}} \right)$$

ϵ para K

$$0.653 = \epsilon \cdot \left(\frac{9 \times 10^8 \text{ cel}}{\text{ml}} \right) \cdot 1 \text{ cm}$$

$$\epsilon = \left(\frac{7.26 \times 10^{-10} \text{ cel}}{\text{cel} \times \text{cm}} \right)$$

ANEXO 4

CALCULO DE CONCENTRACIÓN DEL INOCULO

Con las lecturas de las absorbancias que fueron

Cepa	Abs	Abs Blanco	Abs Neta
VM	0.151	0.006	0.145
K	0.121		0.115

Concentración del inculo para VM

$$0.145 = (9.94 \times 10^{-10} \text{ ml/cel.cm}) \times 1 \text{ cm} \times C$$

$$C = 1.46 \times 10^8 \text{ cel/ml}$$

Concentración del inculo para K

$$0.115 = (9.94 \times 10^{-10} \text{ ml/cel.cm}) \times 1 \text{ cm} \times C$$

$$C = 1.59 \times 10^8 \text{ cel/ml}$$

ANEXO 5



Figura N°65 Cultivo de cepas y cultivo en medio de piña

ANEXO 6**PESOS DE BIOMASA PARA VM Y K EN LOS MEDIOS HS Y PIÑA**

Loa pesos corresponden a muestras de 10 ml.

<i>Tiempo, h</i>	<i>VM</i>		<i>K</i>	
	<i>HS</i>	<i>PIÑA</i>	<i>HS</i>	<i>PIÑA</i>
	<i>X, g</i>	<i>X, g</i>	<i>X, g</i>	<i>X, g</i>
0	0.0008	0.0062	0.0070	0.0040
24	0.0012	0.0097	0.0090	0.0094
48	0.0224	0.0190	0.0160	0.0143
72	0.0402	0.0379	0.0310	0.0212
96	0.0719	0.0630	0.0640	0.0254
120	0.1200	0.0880	0.1090	0.0425
144	0.1610	0.1270	0.1890	0.0640
168	0.2030	0.1650	0.2510	0.1568
192	0.2410	0.2180	0.2710	0.2470
216	0.2640	0.2420	0.2850	0.3010
240	0.2800	0.2530	0.0338	0.3260

ANEXO 7

CALCULO DE u y u_{max}

Haciendo uso de la ecuación de la Figura N°8 hallamos r_x

$$r_x = \frac{x_2 - x_1}{t_2 - t_1}$$

Para el dato a 24 horas de la cepa VM en medio HS

$$r_x = \frac{0.0012g/ml - 0.0008g/ml}{24h - 0h}$$

$$r_x = 0.00002 \frac{g}{ml}/h$$

<i>Tiempo,</i> <i>h</i>	<i>X, g/ml</i>	<i>r_x,</i> <i>(g/ml)/h</i>
0	0.0008	-
24	0.0012	0.00002
48	0.0022	0.00004
72	0.0040	0.00007
96	0.0072	0.00013
120	0.0120	0.00020
144	0.0161	0.00017
168	0.0203	0.00018
192	0.0241	0.00016
216	0.0264	0.00010
240	0.0280	0.00007

Así para todos los datos obtenemos los r_x

<i>Tiempo,</i> <i>h</i>	<i>VM HS</i> <i>rx,</i> <i>(g/ml)/h</i>	<i>VM PIÑA</i> <i>rx,</i> <i>(g/ml)/h</i>	<i>KHS</i> <i>rx, (g/ml)/h</i>	<i>KPIÑA</i> <i>rx, (g/ml)/h</i>
0	-			
24	0.00002	0.00001	0.00002	0.00002
48	0.00004	0.00004	0.00004	0.00002
72	0.00007	0.00008	0.00008	0.00003
96	0.00013	0.00010	0.00020	0.00002
120	0.00020	0.00010	0.00033	0.00007
144	0.00017	0.00016	0.00025	0.00009
168	0.00018	0.00016	0.00014	0.00039
192	0.00016	0.00022	0.00015	0.00038
216	0.00010	0.00010	0.00010	0.00023
240	0.00007	0.00005	0.00007	0.00010

Con rx obtenemos μ y μ_{max} haciendo uso de la ecuación de Malthus Figura N°7, siendo x el promedio de la biomasa en gramos.

$$\mu = \frac{rx}{x}$$

Para el dato a 24 horas de VM en HS sería

$$\mu = \frac{0.0002 \left(\frac{g}{ml}\right)/h}{0.0022g/ml - 0.0012g/ml}$$

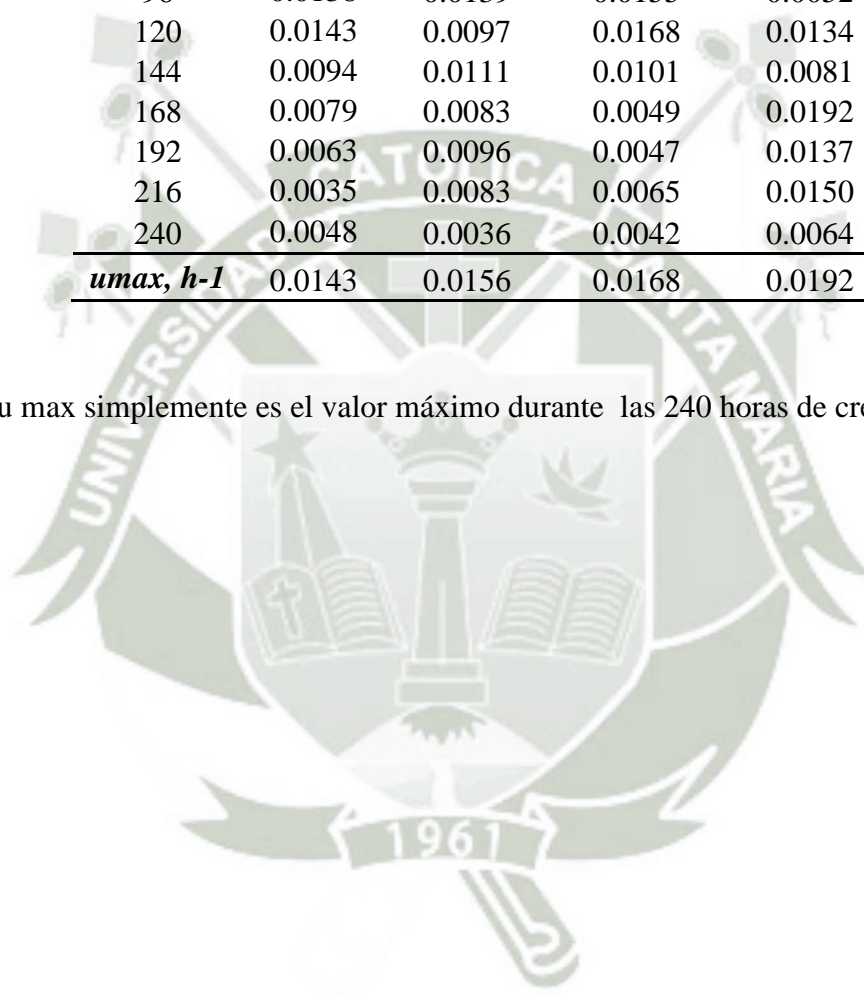
$$\mu = 0.01087 h^{-1}$$

<i>Tiempo,</i> <i>h</i>	<i>X, g/ml</i>	<i>rx,</i> <i>(g/ml)/h</i>
0	0.0008	-
24	0.0012	0.00002
48	0.0022	0.00004

Así para hasta la hora 240

<i>Tiempo, h</i>	<i>VM HS</i> <i>u, h-1</i>	<i>VM PIÑA</i> <i>u, h-1</i>	<i>KHS</i> <i>u, h-1</i>	<i>KPIÑA</i> <i>u, h-1</i>
0	-	-	-	-
24	0.0109	0.0102	0.0104	0.0190
48	0.0137	0.0136	0.0134	0.0115
72	0.0132	0.0156	0.0128	0.0123
96	0.0138	0.0139	0.0155	0.0052
120	0.0143	0.0097	0.0168	0.0134
144	0.0094	0.0111	0.0101	0.0081
168	0.0079	0.0083	0.0049	0.0192
192	0.0063	0.0096	0.0047	0.0137
216	0.0035	0.0083	0.0065	0.0150
240	0.0048	0.0036	0.0042	0.0064
<i>u_{max, h-1}</i>	0.0143	0.0156	0.0168	0.0192

La u_{max} simplemente es el valor máximo durante las 240 horas de crecimiento.



ANEXO 8

CALCULO DE PRODUCCION MAXIMA DE LAS CEPAS VM Y K

Para poder obtener la producción máxima de celulosa por las cepas de *Gluconacetobacter* VM y K el cultivo fue de 30 días.

<i>Cepa</i> <i>Tiempo, d</i>	<i>VM</i>		<i>K</i>	
	<i>HS</i>	<i>PIÑA</i>	<i>HS</i>	<i>PIÑA</i>
0	-	-	-	-
5	0.689	0.519	0.690	0.484
10	1.598	1.895	2.313	2.185
15	4.200	4.012	6.534	5.151
20	8.510	7.805	11.854	9.576
25	12.389	10.223	15.914	12.680
30	13.290	11.518	18.267	14.400

	<i>VM</i>		<i>K</i>	
	<i>HS</i>	<i>PIÑA</i>	<i>HS</i>	<i>PIÑA</i>
<i>Producción</i> <i>g/L</i>	53.16	46.072	73.068	57.6

Tabla N° 13 Promedios de producción en 30 días para las cepas VM y K en los medios HS y Piña.

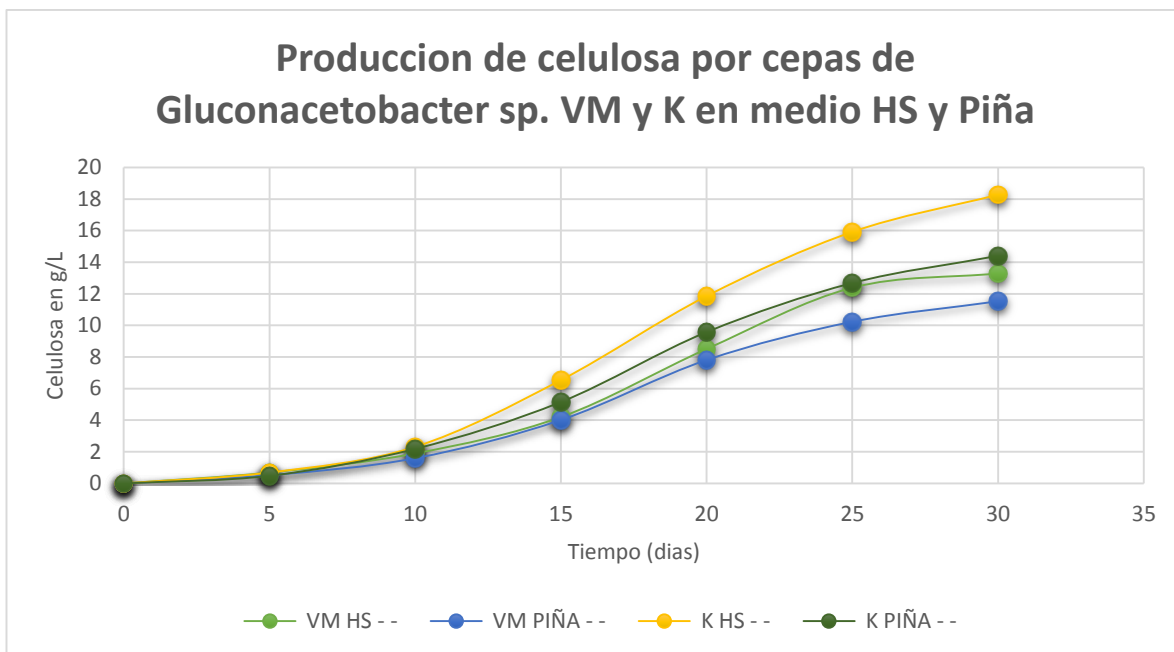


Figura N° 66 Grafica producción de celulosa vs tiempo



ANEXO 9

PRODUCCION DE 30 DIAS

VM



K



Figura N°67 Membranas de celulosa producción en 30 días

ANEXO 10

CALCULO DE COEFICIENTES $Y_{p/x}$, $Y_{x/s}$, $Y_{s/p}$

Con los datos de biomasa sustrato y producto en gramos utilizamos las ecuaciones N°5 N°6 Y N°7

$$Y_{p/x} = \frac{g \text{ de producto}}{g \text{ de biomasa producida}}$$

$$Y_{x/s} = \frac{g \text{ de biomasa producida}}{g \text{ de sustrato consumido}}$$

$$Y_{s/p} = \frac{g \text{ de producto}}{g \text{ de sustrato consumido}}$$

<i>Tiempo, h</i>	<i>Biomasa, g</i>	<i>Sustrato, g</i>	<i>Producto, g</i>
0	0.190	12.500	-
24	0.303	12.000	-
48	0.560	11.000	0.100
72	1.005	9.250	0.226
96	1.798	8.250	0.397
120	3.000	6.500	0.689
144	4.025	5.750	0.970
168	5.075	5.000	1.266
192	6.025	5.000	1.424
216	6.600	4.750	1.681
240	7.000	4.250	1.898

Para VM HS tenemos

$$Y^{p/x} = \frac{0.100}{0.560}$$

$$Y^{p/x} = 0.179$$

$$Y^{x/s} = \frac{0.560}{11}$$

$$Y^{x/s} = 0.051$$

$$Y^{s/p} = \frac{11}{0.100}$$

$$Y^{s/p} = 110.000$$

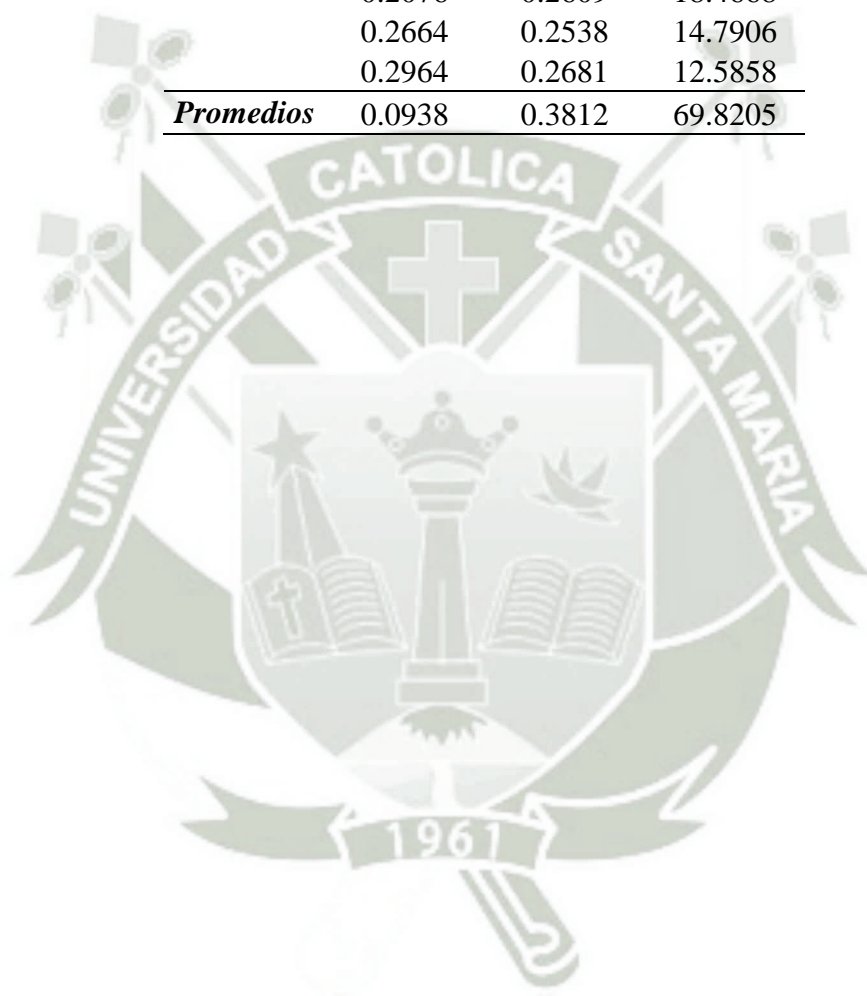
Y así para todos los tiempos tenemos:

<i>VM</i>	<i>HS</i>		
<i>Yx/s</i>	<i>Yp/x</i>	<i>Ys/p</i>	
0.0152	-	-	
0.0252	-	-	
0.0509	0.1789	110.0000	
0.1086	0.2249	40.9292	
0.2179	0.2209	20.7809	
0.4615	0.2297	9.4340	
0.7000	0.2410	5.9278	
1.0150	0.2495	3.9494	
1.2050	0.2363	3.5112	
1.3895	0.2547	2.8257	
1.6471	0.2711	2.2392	
Promedios	0.6214	0.2341	22.1775

<i>VM</i>	<i>PIÑA</i>	
<i>Yx/s</i>	<i>Yp/x</i>	<i>Ys/p</i>
0.0041	-	-
0.0068	-	-
0.0136	0.1684	437.5000
0.0287	0.1340	259.8425
0.0485	0.2463	83.7629
0.0682	0.2359	62.1387
0.1033	0.2397	40.4074
0.1375	0.2376	30.6122
0.1912	0.2534	20.6372
0.2200	0.2430	18.7075
0.2343	0.2522	16.9279
<i>Promedios</i>	0.0960	107.8374

<i>K</i>	<i>HS</i>	
<i>Yx/s</i>	<i>Yp/x</i>	<i>Ys/p</i>
0.0140	-	-
0.0229	-	-
0.0477	0.2552	82.0896
0.1108	0.2507	35.9922
0.2697	0.2324	15.9574
0.6500	0.1633	9.4203
0.9913	0.1512	6.6705
1.3050	0.2066	3.7092
1.4800	0.2504	2.6983
1.6895	0.2705	2.1879
1.4613	0.2586	2.6465
<i>Promedios</i>	0.7311	17.9302

<i>K</i>	<i>PIÑA</i>	
<i>Yx/s</i>	<i>Yp/x</i>	<i>Ys/p</i>
0.0027	-	-
0.0064	-	-
0.0099	0.5035	201.3889
0.0150	0.4906	135.5769
0.0187	0.5921	90.4255
0.0327	0.4555	67.1488
0.0500	0.3513	56.9395
0.1265	0.2546	31.0621
0.2076	0.2609	18.4668
0.2664	0.2538	14.7906
0.2964	0.2681	12.5858
<i>Promedios</i>	0.0938	69.8205



ANEXO 11

RECUPERACION DEL PRODUCTO

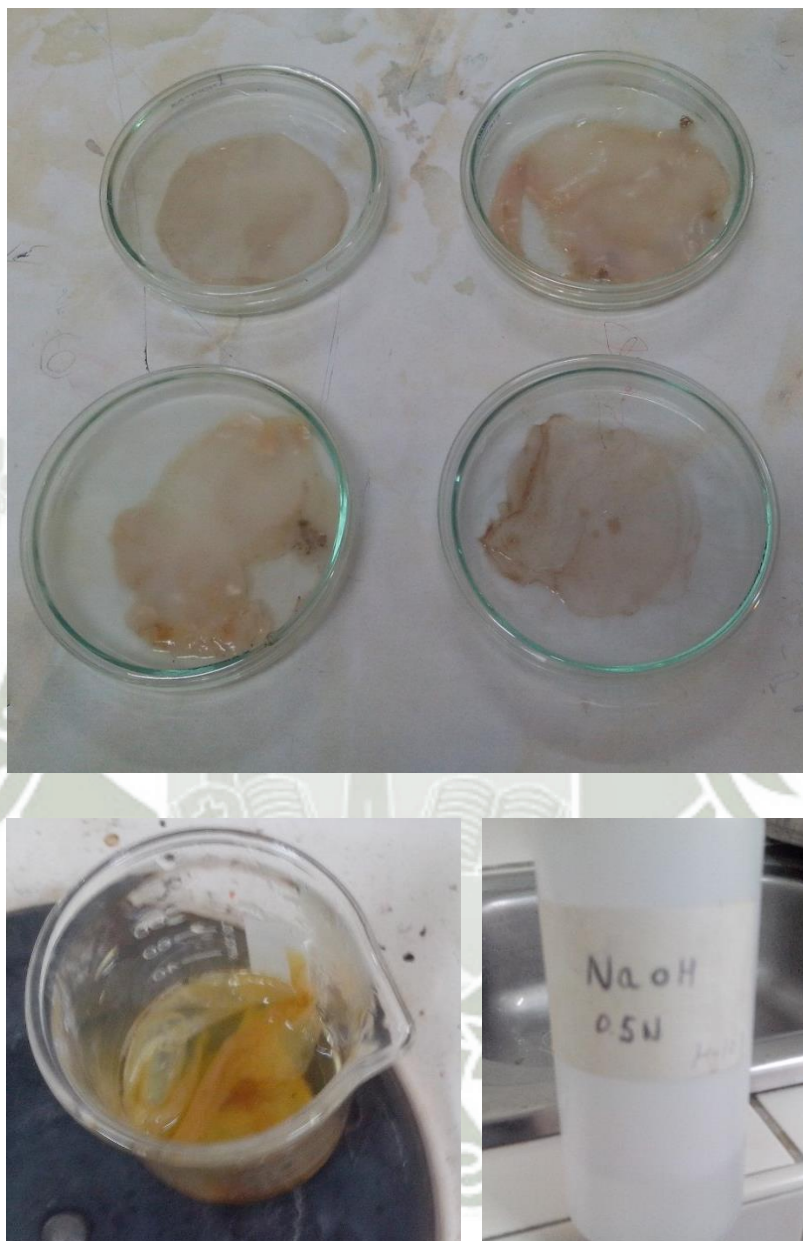


Figura N° 68 Membranas recuperadas y tratamiento con NaOH 0.5 N

ANEXO 12

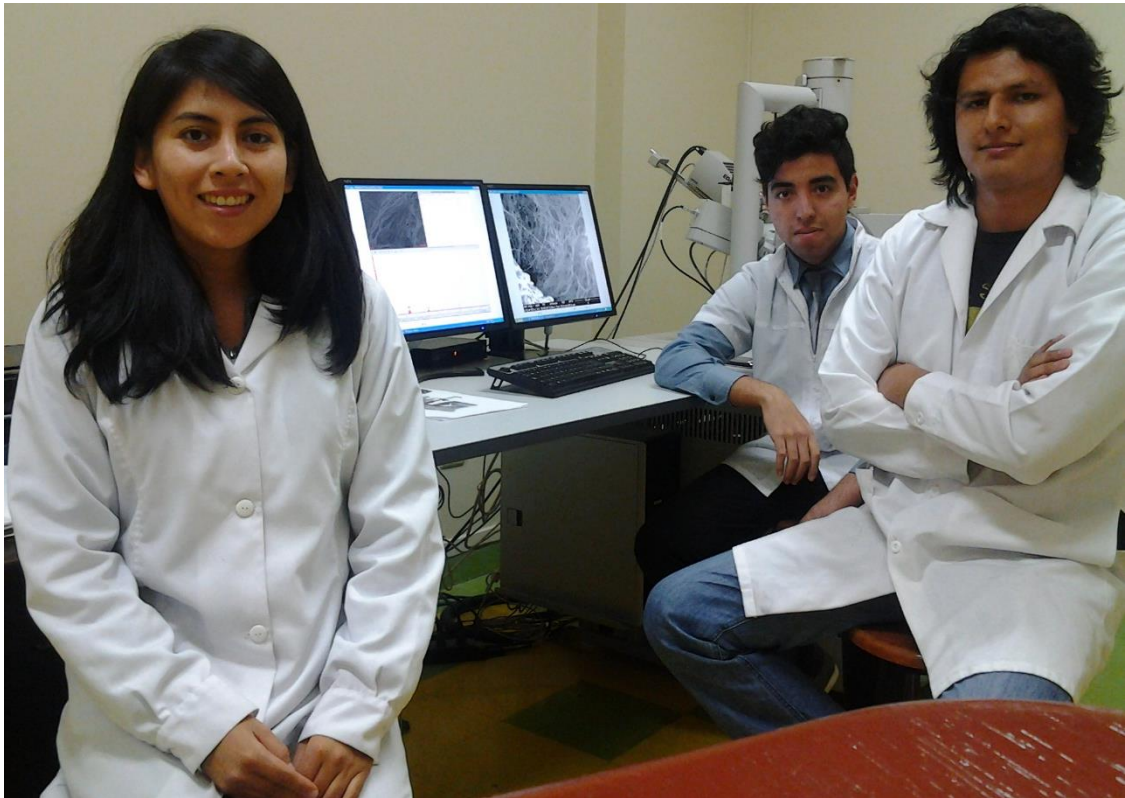




Figura N°69 Laboratorio de equipamiento especializado de la Facultad de Biología de la UNMSM

ANEXO 13

ESPECTROSCOPIA FT-IR

	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA</p> <p>UNIDAD DE SERVICIOS DE ANÁLISIS QUÍMICOS</p>	
---	--	---

INFORME DE ENSAYO N° 199-2015

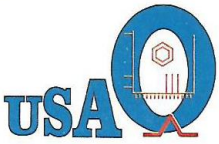

Cliente : UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
 Dirección : Arequipa
 Atención : Srta. Karla Alejandra Cruz Zúñiga
 Referencia USAQ : 162-01/04
 Muestras : MEMBRANAS
 Cotización : 210-2015/USAQ-FQIQ
 Fecha de Recepción : 16/06/2015
 Fecha de Emisión : 19/06/2015

RESULTADO DE ANALISIS DE: ESPECTROFOTOMETRIA INFRARROJA

Código USAQ.	Código Cliente	Observaciones
162-01	MEMBRANA CEPA VMI PIÑA	<p>Del análisis FT-IR se observa que el espectro de la muestra presenta los siguientes picos: (cm⁻¹) 806.25 914.26 1033.85 1053.13 1242.16 1315.45 1400.32 1454.33 1543.05 1643.35 2360.87 2850.79 2920.23 3278.99 3340.71</p> <p>El espectro de la muestra es similar al espectro de CARBOXY METHYL CELLULOSE en 85.70% de probabilidad según la biblioteca espectral</p> <ul style="list-style-type: none"> 141-Nicodóm IR Polymers
162-02	MEMBRANA CEPA VMI	<p>Del análisis FT-IR se observa que el espectro de la muestra presenta los siguientes picos: (cm⁻¹) 871.82 894.97 999.13 1029.99 1053.13 1107.14 1161.15 1203.58 1249.87 1280.73 1315.45 1334.74 1369.46 1423.47 1454.33 1535.34 1554.63 1643.35 1732.08 2858.51 2920.23 3340.71</p> <p>El espectro de la muestra es similar al espectro de CELLULOSE #2 en 85.70% de probabilidad según la biblioteca espectral</p> <ul style="list-style-type: none"> 435-Nicodóm IR Polymers

Muestra Proporcionada por el Cliente.

II-199-2015 UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA (Página 1 de 2)

	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA UNIDAD DE SERVICIOS DE ANÁLISIS QUÍMICOS</p>	
---	---	---

RESULTADO DE ANALISIS DE: ESPECTROFOTOMETRIA INFRARROJA

Código USAQ.	Código Cliente	Observaciones
162-03	MEMBRANA KAMBUCHA CLARA	<p>Del análisis FT-IR se observa que el espectro de la muestra presenta los siguientes picos: (cm⁻¹) 898.83 1002.98 1029.99 1053.13 1107.14 1161.15 1203.58 1249.87 1280.73 1315.45 1334.74 1361.74 1427.32 1608.63 2893.22 3340.71 El espectro de la muestra es similar al espectro de CELLULOSE #1 en 91.40% de probabilidad según la biblioteca espectral</p> <ul style="list-style-type: none"> 434-Nicodom IR Polymers
162-04	MEMBRANA KAMBUCHA OSCURA	<p>Del análisis FT-IR se observa que el espectro de la muestra presenta los siguientes picos: (cm⁻¹) 833.25 867.97 925.83 995.27 1029.99 1053.13 1107.14 1157.29 1207.44 1249.87 1280.73 1315.45 1334.74 1373.32 1423.47 1535.34 1643.35 2360.87 2854.65 2920.23 3240.41 3340.71 El espectro de la muestra es similar al espectro de CELLULOSE #2 en 84.70% de probabilidad según la biblioteca espectral</p> <ul style="list-style-type: none"> Nicodom IR Polymers

Muestra Proporcionada por el Cliente.

Método: USAQ-ME-10 DETERMINACION DE COMPUESTOS POR FT-IR


 Quím. María Angélica Rodríguez Best
 Directora de la USAQ
 COP: 597

Nota: El presente informe sólo es válido en su estado original y se refiere únicamente a la muestra analizada, cualquier corrección o enmienda en el contenido del presente informe lo anula automáticamente.

Observ.: La muestra podrá ser devuelta después del plazo de 15 días calendarios de entregado el Informe de Ensayo, pasado el tiempo indicado no se aceptarán reclamos ni devoluciones.

IE-199-2015 UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARIA(Página 2 de 2)

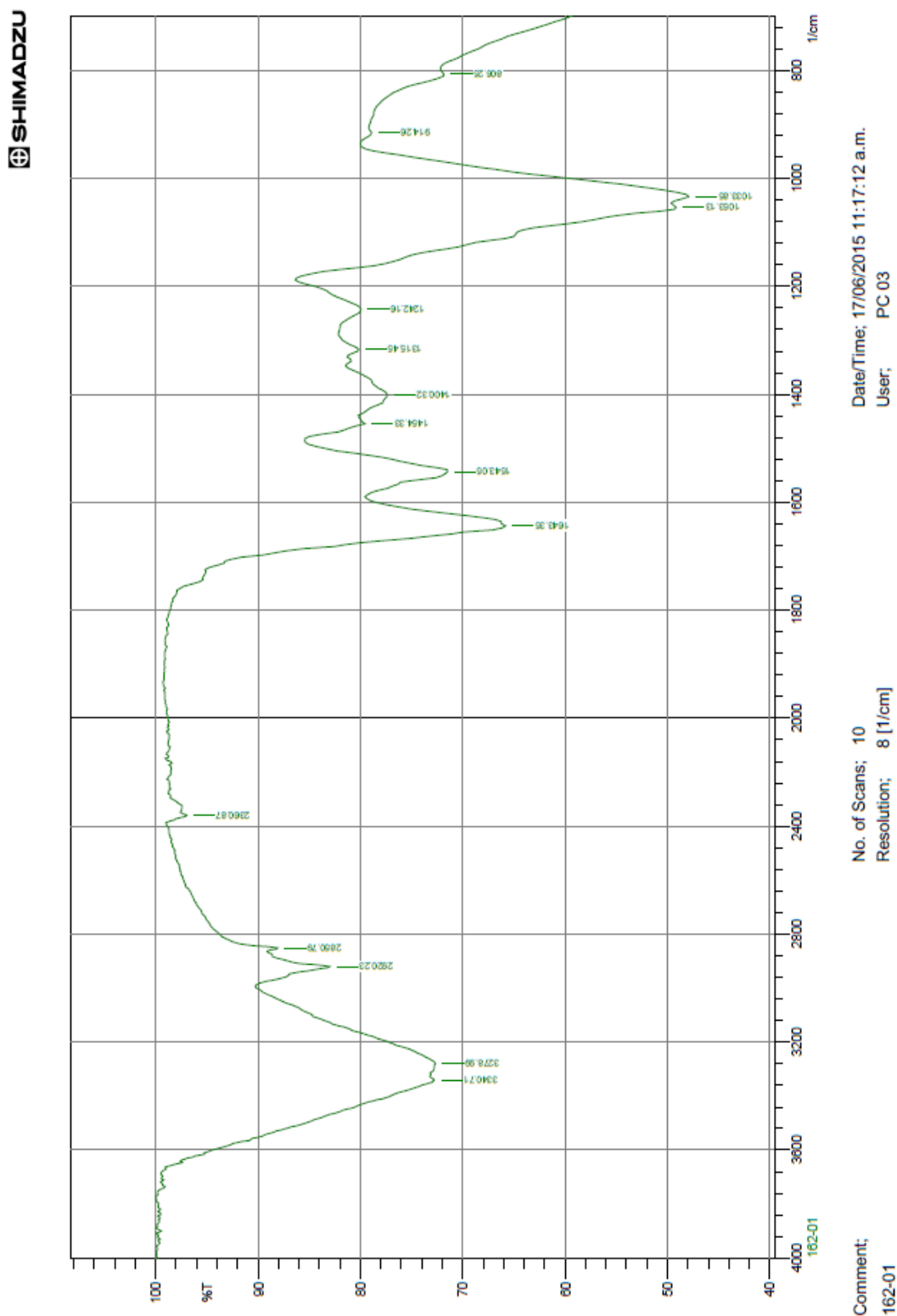


Figura N°70 Espectro FT-IR de la membrana VM en medio Piña

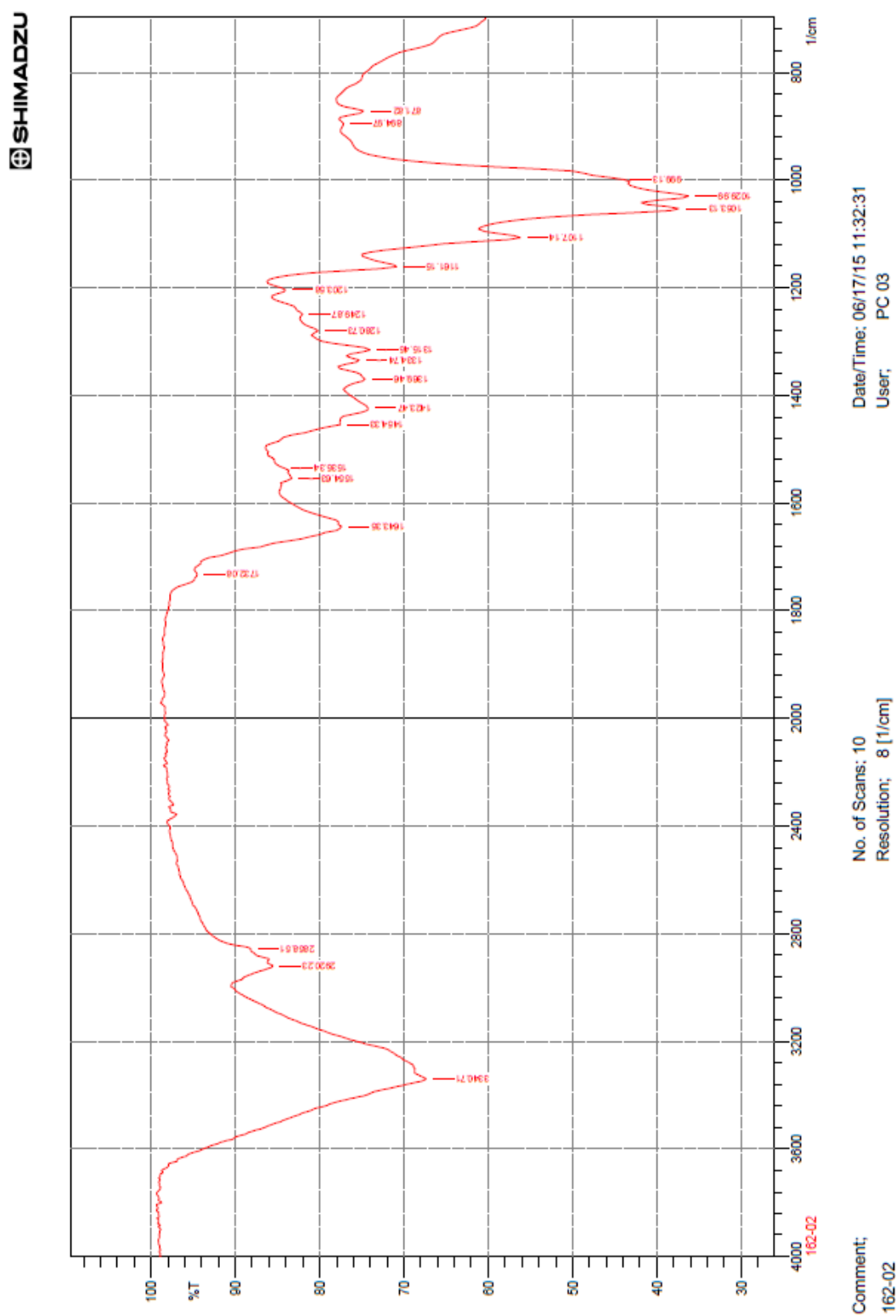


Figura N°71 Espectro FT-IR de la membrana VM en medio HS

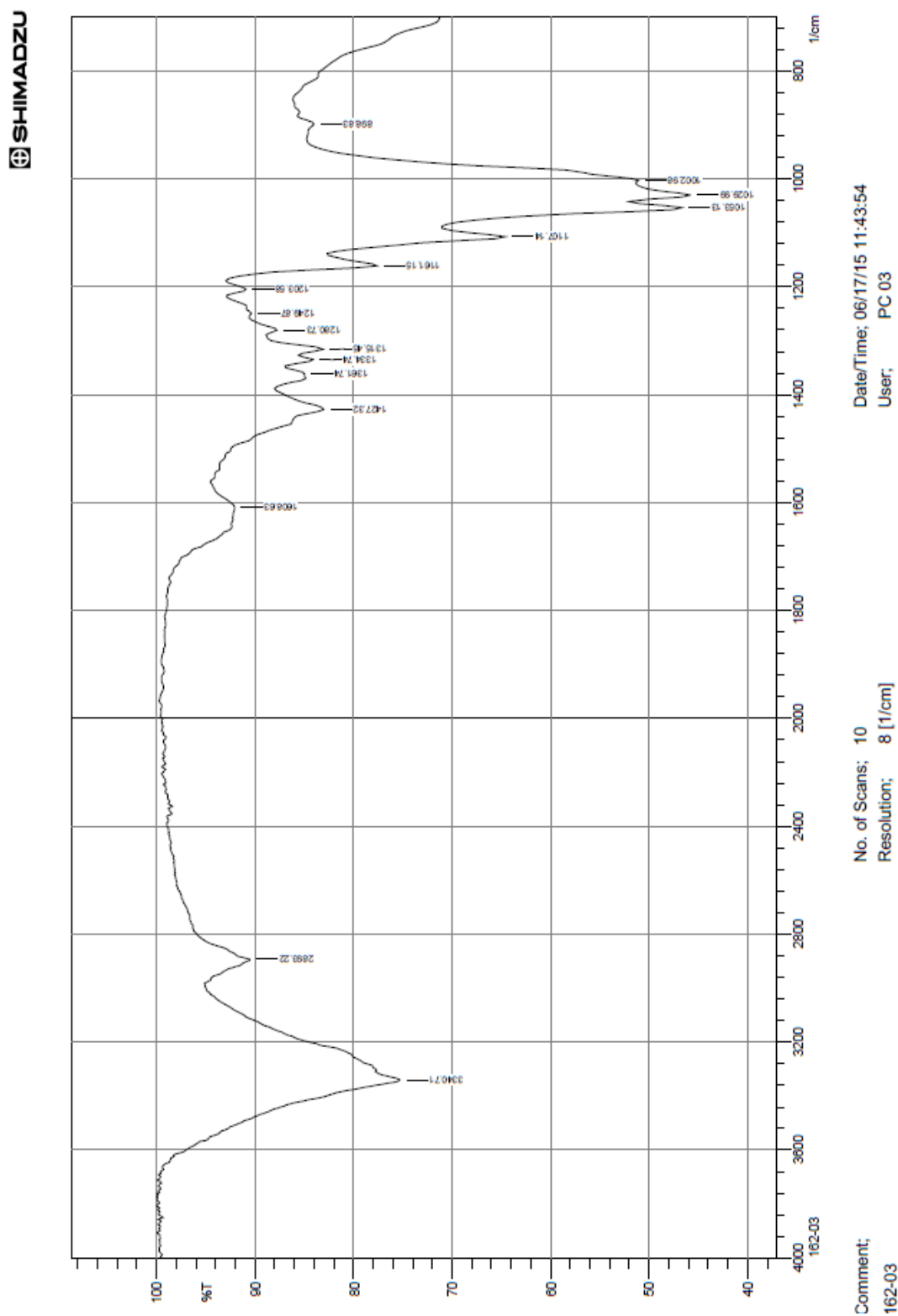


Figura N°72 Espectro FT-IR de la membrana K en medio HS

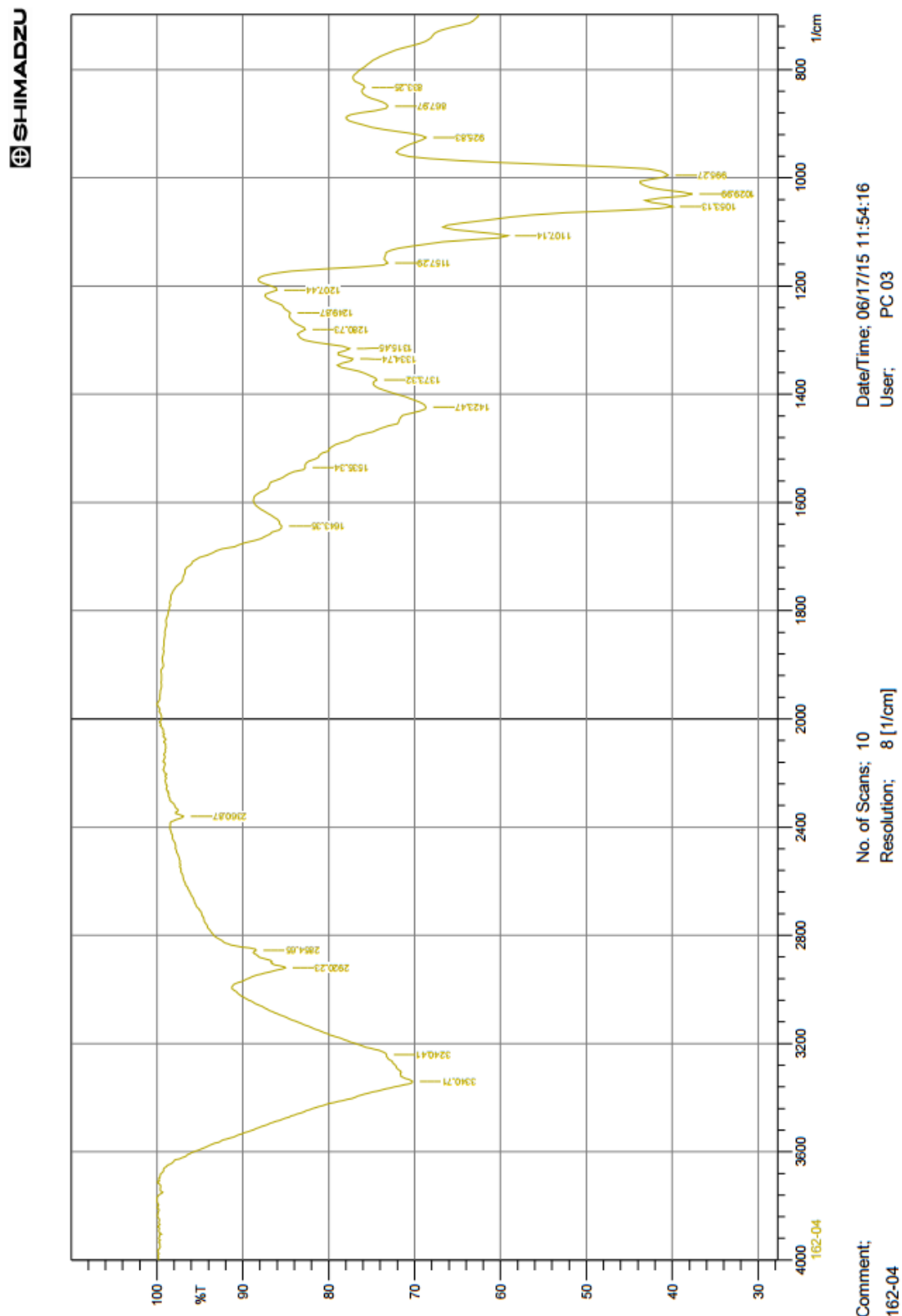


Figura N°73 Espectro FT-IR de la membrana K en medio Piña

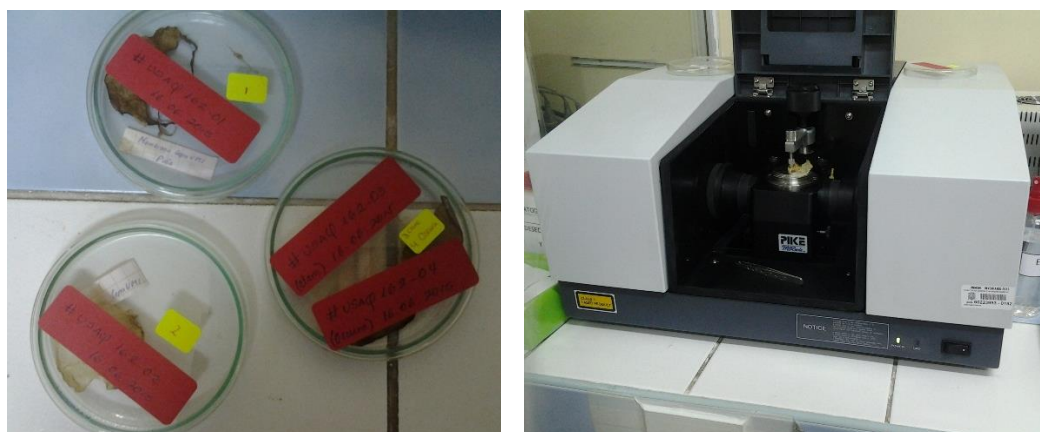


Figura N°74 Muestras de membranas listas para ser analizadas en espectro FT-IR, espectrofotómetro FT-IR con una membrana en medio del análisis

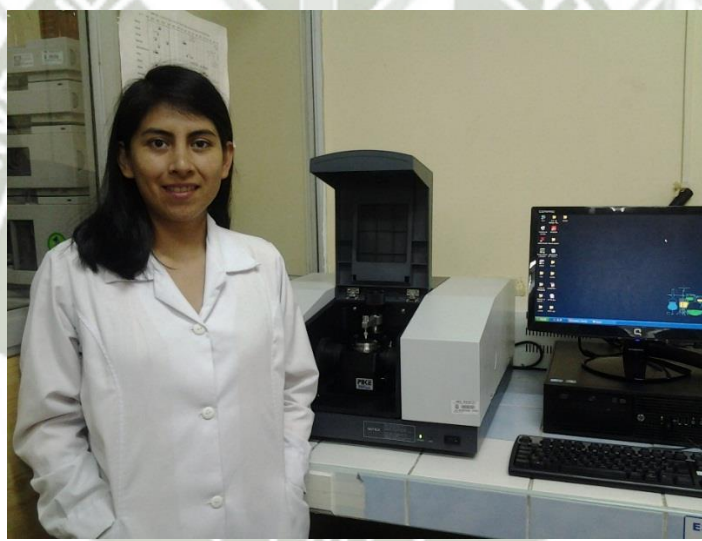


Figura N° 75 Espectrofotómetro FT-IR shimadzu

ANEXO 14

RESULTADOS REGISTRADOS POR EL DINAMOMETRO DIGITAL DURANTE EL ENSAYO

Membrana VMHS

No.	Time(min)	Elongation(mm)	Force(kgf)	Stress(MPa)	Strain(%)
1	0	0	0	0	0
2	0.004	0	0	0	0
3	0.005	0	0	0	0
4	0.007	0	0	0	0
5	0.008	0	0	0	0
6	0.009	0	0	0	0
7	0.01	0	0	0	0
8	0.013	0	0	0	0
9	0.014	0	0	0	0
10	0.015	0	0	0	0
11	0.016	0	0	0	0
12	0.018	0	0	0	0
13	0.019	0	0	0	0
14	0.021	0	0	0	0
15	0.022	0	0	0	0
16	0.023	0	0	0	0
17	0.025	0	0	0	0
18	0.026	0	0	0	0
19	0.027	0	0	0	0
20	0.029	0	0	0	0
21	0.03	0	0	0	0
22	0.032	0	0	0	0
23	0.033	0	0	0	0
24	0.034	0	0	0	0
25	0.035	0	0	0	0
26	0.037	0	0	0	0
27	0.039	0	0	0	0
28	0.04	0	0	0	0
29	0.041	0	0	0	0
30	0.043	0	0	0	0
31	0.044	0	0	0	0
32	0.045	0	0	0	0

33	0.047	0	0	0	0
34	0.048	0	0	0	0
35	0.05	0	0	0	0
36	0.051	0	0	0	0
37	0.052	0	0	0	0
38	0.054	0	0	0	0
39	0.055	0	0	0	0
40	0.057	0	0	0	0
41	0.058	0	0	0	0
42	0.059	0	0	0	0
43	0.061	0	0	0	0
44	0.062	0	0	0	0
45	0.064	0	0	0	0
46	0.065	0	0	0	0
47	0.066	0	0	0	0
48	0.068	0	0	0	0
49	0.069	0	0	0	0
50	0.07	0	0	0	0
51	0.072	0	0	0	0
52	0.073	0	0	0	0
53	0.075	0	0	0	0
54	0.076	0	0	0	0
55	0.077	0	0	0	0
56	0.079	0	0	0	0
57	0.08	0	0	0	0
58	0.082	0	0	0	0
59	0.083	0	0	0	0
60	0.084	0	0	0	0
61	0.086	0	0	0	0
62	0.087	0	0	0	0
63	0.088	0	0	0	0
64	0.09	0	0	0	0
65	0.091	0	0	0	0
66	0.092	0	0	0	0
67	0.094	0	0	0	0
68	0.095	0	0.2	1.175	0
69	0.097	0	0.2	1.174	0
70	0.099	0	0.2	1.174	0
71	0.1	0	0.2	1.174	0
72	0.102	0	0.2	1.174	0
73	0.103	0	0.2	1.174	0
74	0.104	0	0.2	1.174	0
75	0.106	0	0.2	1.174	0

76	0.107	0	0.2	1.174	0
77	0.109	0	0.2	1.174	0
78	0.11	0	0.2	1.174	0
79	0.111	0	0.2	1.174	0
80	0.113	0	0.2	1.174	0
81	0.114	0	0.2	1.174	0
82	0.116	0	0.2	1.174	0
83	0.117	0	0.2	1.174	0
84	0.118	0	0.2	1.174	0
85	0.12	0	0.2	1.174	0
86	0.121	0	0.2	1.174	0
87	0.122	0	0.2	1.174	0
88	0.124	0	0.2	1.174	0
89	0.125	0	0.2	1.174	0
90	0.127	0	0.2	1.174	0
91	0.128	0	0.4	2.349	0
92	0.13	0	0.4	2.349	0
93	0.131	0	0.4	2.349	0
94	0.132	0	0.4	2.349	0
95	0.134	0	0.4	2.349	0
96	0.135	0	0.4	2.349	0
97	0.136	0	0.4	2.349	0
98	0.138	0	0.4	2.349	0
99	0.139	0	0.4	2.349	0
100	0.14	0	0.4	2.349	0
101	0.142	0	0.4	2.349	0
102	0.143	0	0.4	2.349	0
103	0.145	0	0.4	2.349	0
104	0.146	0	0.4	2.349	0
105	0.147	0	0.4	2.349	0
106	0.149	0	0.4	2.349	0
107	0.15	0	0.4	2.349	0
108	0.151	0	0.6	3.524	0
109	0.153	0	0.6	3.523	0
110	0.154	0	0.6	3.523	0
111	0.156	0	0.6	3.523	0
112	0.157	0	0.6	3.523	0
113	0.159	0	0.6	3.523	0
114	0.16	0	0.6	3.523	0
115	0.161	0	0.6	3.523	0
116	0.163	0	0.6	3.523	0
117	0.164	0	0.6	3.523	0
118	0.165	0	0.6	3.523	0

119	0.167	0	0.6	3.523	0
120	0.168	0	0.6	3.523	0
121	0.17	0	0.6	3.523	0
122	0.171	0	0.6	3.523	0
123	0.172	0	0.6	3.523	0
124	0.174	0	0.8	4.698	0
125	0.176	0	0.8	4.698	0
126	0.177	0	0.8	4.698	0
127	0.178	0	0.8	4.698	0
128	0.179	0	0.8	4.698	0
129	0.181	0	0.8	4.698	0
130	0.182	0	0.8	4.698	0
131	0.184	0	0.8	4.698	0
132	0.185	0	0.6	3.524	0
133	0.186	0	0.6	3.523	0
134	0.188	0	0.4	2.349	0
135	0.189	0	0.2	1.174	0
136	0.191	0	0.2	1.174	0
137	0.192	0	0	0	0
138	0.193	0	0	0	0
139	0.195	0	0	0	0
140	0.196	0	0	0	0
141	0.198	0	0	0	0
142	0.199	0	0	0	0
143	0.2	0	0	0	0
144	0.202	0	0	0	0
145	0.203	0	0	0	0
146	0.204	0	0	0	0
147	0.206	0	0	0	0
148	0.207	0	0	0	0
149	0.209	0	0	0	0
150	0.21	0	0	0	0

Membrana VM Piña

No soporto esfuerzo medible.

Membrana K HS

No.	Time(min)	Elongation(mm)	Force(kgf)	Stress(MPa)	Strain(%)
370	0.516	0	0	0	0
371	0.517	0	0	0	0
372	0.519	0	0	0	0
373	0.52	0	0	0	0
374	0.522	0	0	0	0
375	0.523	0	0	0	0
376	0.524	0	0	0	0
377	0.526	0	0	0	0
378	0.527	0	0	0	0
379	0.529	0	0	0	0
380	0.53	0	0	0	0
381	0.531	0	0	0	0
382	0.533	0	0	0	0
383	0.534	0	0	0	0
384	0.536	0	0	0	0
385	0.537	0	0	0	0
386	0.538	0	0	0	0
387	0.54	0	0	0	0
388	0.541	0	0	0	0
389	0.542	0	0	0	0
390	0.544	0	0.2	0.876	0
391	0.546	0	0.2	0.876	0
392	0.547	0	0.2	0.876	0
393	0.549	0	0.2	0.876	0
394	0.55	0	0.2	0.876	0
395	0.552	0	0.2	0.876	0
396	0.553	0	0.2	0.876	0
397	0.554	0	0.2	0.876	0
398	0.556	0	0.2	0.876	0
399	0.557	0	0.2	0.876	0
400	0.558	0	0.2	0.876	0
401	0.56	0	0.2	0.876	0
402	0.561	0	0.2	0.876	0
403	0.562	0	0.2	0.876	0
404	0.564	0	0.2	0.876	0
405	0.565	0	0.2	0.876	0
406	0.567	0	0.2	0.876	0
407	0.568	0	0.2	0.876	0
408	0.57	0	0.2	0.876	0

409	0.571	0	0.2	0.876	0
410	0.572	0	0.2	0.876	0
411	0.574	0	0.2	0.876	0
412	0.575	0	0.2	0.876	0
413	0.577	0	0.2	0.876	0
414	0.578	0	0.2	0.876	0
415	0.579	0	0.2	0.876	0
416	0.581	0	0.2	0.876	0
417	0.582	0	0.2	0.876	0
418	0.584	0	0.2	0.876	0
419	0.585	0	0.2	0.876	0
420	0.586	0	0.2	0.876	0
421	0.588	0	0.2	0.876	0
422	0.589	0	0.2	0.876	0
423	0.591	0	0.2	0.876	0
424	0.592	0	0.2	0.876	0
425	0.593	0	0.2	0.876	0
426	0.595	0	0.2	0.876	0
427	0.596	0	0.2	0.876	0
428	0.597	0	0.2	0.876	0
429	0.599	0	0.2	0.876	0
430	0.6	0	0.2	0.876	0
431	0.602	0	0.2	0.876	0
432	0.603	0	0.2	0.876	0
433	0.604	0	0.2	0.876	0
434	0.606	0	0.2	0.876	0
435	0.607	0	0.2	0.876	0
436	0.609	0	0.2	0.876	0
437	0.61	0	0.2	0.876	0
438	0.611	0	0.2	0.876	0
439	0.613	0	0.2	0.876	0
440	0.614	0	0.2	0.876	0
441	0.615	0	0.2	0.876	0
442	0.617	0	0.2	0.876	0
443	0.618	0	0.2	0.876	0
444	0.62	0	0.2	0.876	0
445	0.621	0	0.2	0.876	0
446	0.622	0	0.2	0.876	0
447	0.624	0	0.2	0.876	0
448	0.625	0	0.2	0.876	0
449	0.627	0	0.2	0.876	0
450	0.628	0	0.2	0.876	0
451	0.629	0	0.2	0.876	0

452	0.631	0	0.2	0.876	0
453	0.632	0	0.2	0.876	0
454	0.633	0	0.4	1.751	0
455	0.635	0	0.4	1.751	0
456	0.636	0	0.4	1.751	0
457	0.638	0	0.4	1.751	0
458	0.639	0	0.4	1.751	0
459	0.641	0	0.4	1.751	0
460	0.642	0	0.4	1.751	0
461	0.643	0	0.4	1.751	0
462	0.645	0	0.4	1.751	0
463	0.646	0	0.4	1.751	0
464	0.648	0	0.4	1.751	0
465	0.649	0	0.4	1.751	0
466	0.651	0	0.4	1.751	0
467	0.652	0	0.4	1.751	0
468	0.653	0	0.4	1.751	0
469	0.654	0	0.4	1.751	0
470	0.656	0	0.4	1.751	0
471	0.657	0	0.4	1.751	0
472	0.659	0	0.4	1.751	0
473	0.66	0	0.4	1.751	0
474	0.662	0	0.4	1.751	0
475	0.663	0	0.4	1.751	0
476	0.664	0	0.4	1.751	0
477	0.666	0	0.4	1.751	0
478	0.667	0	0.4	1.751	0
479	0.668	0	0.4	1.751	0
480	0.67	0	0.4	1.751	0
481	0.671	0	0.4	1.751	0
482	0.673	0	0.4	1.751	0
483	0.674	0	0.4	1.751	0
484	0.676	0	0.4	1.751	0
485	0.677	0	0.4	1.751	0
486	0.678	0	0.4	1.751	0
487	0.68	0	0.4	1.751	0
488	0.682	0	0.4	1.751	0
489	0.683	0	0.4	1.751	0
490	0.684	0	0.4	1.751	0
491	0.686	0	0.4	1.751	0
492	0.687	0	0.4	1.751	0
493	0.688	0	0.6	2.627	0
494	0.69	0	0.6	2.627	0

495	0.691	0	0.6	2.627	0
496	0.693	0	0.6	2.627	0
497	0.694	0	0.6	2.627	0
498	0.695	0	0.6	2.627	0
499	0.697	0	0.6	2.627	0
500	0.698	0	0.6	2.627	0
501	0.699	0	0.6	2.627	0
502	0.701	0	0.6	2.627	0
503	0.703	0	0.6	2.627	0
504	0.704	0	0.6	2.627	0
505	0.705	0	0.6	2.627	0
506	0.707	0	0.6	2.627	0
507	0.708	0	0.6	2.627	0
508	0.71	0	0.6	2.627	0
509	0.711	0	0.6	2.627	0
510	0.713	0	0.6	2.627	0
511	0.714	0	0.6	2.627	0
512	0.715	0	0.6	2.627	0
513	0.717	0	0.6	2.627	0
514	0.718	0	0.6	2.627	0
515	0.72	0	0.6	2.627	0
516	0.721	0	0.6	2.627	0
517	0.722	0	0.6	2.627	0
518	0.724	0	0.6	2.627	0
519	0.725	0	0.6	2.627	0
520	0.727	0	0.6	2.627	0
521	0.728	0	0.6	2.627	0
522	0.729	0	0.6	2.627	0
523	0.731	0	0.6	2.627	0
524	0.732	0	0.6	2.627	0
525	0.733	0	0.6	2.627	0
526	0.735	0	0.6	2.627	0
527	0.736	0	0.6	2.627	0
528	0.738	0	0.6	2.627	0
529	0.739	0	0.6	2.627	0
530	0.741	0	0.6	2.627	0
531	0.742	0	0.6	2.627	0
532	0.743	0	0.8	3.503	0
533	0.745	0	0.8	3.502	0
534	0.747	0	0.8	3.502	0
535	0.748	0	0.8	3.502	0
536	0.749	0	0.8	3.502	0
537	0.751	0	0.8	3.502	0

538	0.752	0	0.8	3.502	0
539	0.753	0	0.8	3.502	0
540	0.755	0	0.8	3.502	0
541	0.757	0	0.8	3.502	0
542	0.758	0	0.8	3.502	0
543	0.759	0	0.8	3.502	0
544	0.76	0	0.8	3.502	0
545	0.762	0	0.8	3.502	0
546	0.763	0	0.8	3.502	0
547	0.765	0	0.8	3.502	0
548	0.766	0	0.8	3.502	0
549	0.768	0	0.8	3.502	0
550	0.769	0	0.8	3.502	0
551	0.77	0	0.8	3.502	0
552	0.772	0	0.8	3.502	0
553	0.773	0	0.8	3.502	0
554	0.774	0	0.8	3.502	0
555	0.776	0	0.8	3.502	0
556	0.777	0	0.8	3.502	0
557	0.779	0	0.8	3.502	0
558	0.78	0	0.8	3.502	0
559	0.782	0	0.8	3.502	0
560	0.783	0	0.8	3.502	0
561	0.784	0	0.8	3.502	0
562	0.785	0	0.8	3.502	0
563	0.787	0	0.8	3.502	0
564	0.788	0	0.8	3.502	0
565	0.79	0	0.8	3.502	0
566	0.791	0	0.8	3.502	0
567	0.793	0	0.8	3.502	0
568	0.794	0	0.8	3.502	0
569	0.795	0	0.8	3.502	0
570	0.797	0	0.8	3.502	0
571	0.798	0	0.8	3.502	0
572	0.799	0	0.8	3.502	0
573	0.801	0	0.8	3.502	0
574	0.803	0	0.8	3.502	0
575	0.804	0	0.8	3.502	0
576	0.805	0	0.8	3.502	0
577	0.807	0	1	4.378	0
578	0.809	0	1	4.378	0
579	0.81	0	1	4.378	0
580	0.811	0	1	4.378	0

581	0.813	0	1	4.378	0
582	0.814	0	1	4.378	0
583	0.816	0	1	4.378	0
584	0.817	0	1	4.378	0
585	0.818	0	1	4.378	0
586	0.82	0	1	4.378	0
587	0.821	0	1	4.378	0
588	0.823	0	1	4.378	0
589	0.824	0	1	4.378	0
590	0.826	0	1	4.378	0
591	0.827	0	1	4.378	0
592	0.828	0	1	4.378	0
593	0.83	0	1	4.378	0
594	0.831	0	1	4.378	0
595	0.832	0	1	4.378	0
596	0.834	0	1	4.378	0
597	0.835	0	1	4.378	0
598	0.836	0	1	4.378	0
599	0.838	0	1	4.378	0
600	0.839	0	1	4.378	0
601	0.841	0	1	4.378	0
602	0.842	0	1	4.378	0
603	0.843	0	1	4.378	0
604	0.845	0	1	4.378	0
605	0.846	0	1	4.378	0
606	0.848	0	1	4.378	0
607	0.849	0	1	4.378	0
608	0.851	0	1	4.378	0
609	0.852	0	1	4.378	0
610	0.853	0	1	4.378	0
611	0.855	0	1	4.378	0
612	0.856	0	1	4.378	0
613	0.857	0	1	4.378	0
614	0.859	0	1	4.378	0
615	0.86	0	1	4.378	0
616	0.862	0	1	4.378	0
617	0.863	0	1	4.378	0
618	0.865	0	1	4.378	0
619	0.866	0	1	4.378	0
620	0.867	0	1	4.378	0
621	0.869	0	1	4.378	0
622	0.87	0	1	4.378	0
623	0.872	0	1	4.378	0

624	0.873	0	1	4.378	0
625	0.874	0	1.2	5.254	0
626	0.876	0	1.2	5.254	0
627	0.877	0	1.2	5.254	0
628	0.879	0	1.2	5.254	0
629	0.88	0	1.2	5.254	0
630	0.882	0	1.2	5.254	0
631	0.883	0	1.2	5.254	0
632	0.884	0	1.2	5.254	0
633	0.886	0	1.2	5.254	0
634	0.887	0	1.2	5.254	0
635	0.889	0	1.2	5.254	0
636	0.89	0	1.2	5.254	0
637	0.891	0	1.2	5.254	0
638	0.893	0	1.2	5.254	0
639	0.894	0	1.2	5.254	0
640	0.896	0	1.2	5.254	0
641	0.897	0	1.2	5.254	0
642	0.898	0	1.2	5.254	0
643	0.9	0	1.2	5.254	0
644	0.901	0	1.2	5.254	0
645	0.903	0	1.2	5.254	0
646	0.904	0	1.2	5.254	0
647	0.906	0	1.2	5.254	0
648	0.907	0	1.2	5.254	0
649	0.909	0	1.2	5.254	0
650	0.91	0	1.2	5.254	0
651	0.911	0	1.2	5.254	0
652	0.913	0	1.2	5.254	0
653	0.914	0	1.2	5.254	0
654	0.916	0	1.2	5.254	0
655	0.917	0	1.2	5.254	0
656	0.918	0	1.2	5.254	0
657	0.92	0	1.2	5.254	0
658	0.921	0	1.2	5.254	0
659	0.923	0	1.2	5.254	0
660	0.924	0	1.2	5.254	0
661	0.925	0	1.2	5.254	0
662	0.927	0	1.2	5.254	0
663	0.928	0	1.2	5.254	0
664	0.93	0	1.2	5.254	0
665	0.931	0	1.2	5.254	0
666	0.933	0	1.2	5.254	0

667	0.934	0	1.2	5.254	0
668	0.935	0	1.2	5.254	0
669	0.937	0	1.2	5.254	0
670	0.938	0	1.2	5.254	0
671	0.94	0	1.2	5.254	0
672	0.941	0	1.2	5.254	0
673	0.943	0	1.2	5.254	0
674	0.944	0	1.2	5.254	0
675	0.945	0	1.2	5.254	0
676	0.947	0	1.2	5.254	0
677	0.948	0	1.2	5.254	0
678	0.949	0	1.2	5.254	0
679	0.951	0	1.2	5.254	0
680	0.952	0	1.2	5.254	0
681	0.954	0	1.2	5.254	0
682	0.955	0	1.2	5.254	0
683	0.957	0	1.2	5.254	0
684	0.958	0	1.2	5.254	0
685	0.959	0	1.2	5.254	0
686	0.961	0	1.2	5.254	0
687	0.962	0	1.2	5.254	0
688	0.963	0	1.2	5.254	0
689	0.965	0	1.2	5.254	0
690	0.966	0	1.2	5.254	0
691	0.968	0	1.2	5.254	0
692	0.969	0	1.2	5.254	0
693	0.97	0	1.2	5.254	0
694	0.972	0	1.2	5.254	0
695	0.973	0	1.2	5.254	0
696	0.974	0	1.2	5.254	0
697	0.976	0	1.2	5.254	0
698	0.977	0	1.2	5.254	0
699	0.979	0	1.2	5.254	0
700	0.98	0	1.2	5.254	0
701	0.982	0	1.2	5.254	0
702	0.983	0	1.2	5.254	0
703	0.984	0	1.2	5.254	0
704	0.986	0	1.2	5.254	0
705	0.987	0	1.2	5.254	0
706	0.989	0	1.2	5.254	0
707	0.99	0	1.2	5.254	0
708	0.991	0	1.2	5.254	0
709	0.993	0	1.2	5.254	0

710	0.994	0	1.2	5.254	0
711	0.996	0	1.2	5.254	0
712	0.997	0	1.2	5.254	0
713	0.998	0	1.2	5.254	0
714	1	0	1.2	5.254	0
715	1.001	0	1.2	5.254	0
716	1.003	0	1.2	5.254	0
717	1.004	0	1.2	5.254	0
718	1.006	0	1.2	5.254	0
719	1.007	0	1.2	5.254	0
720	1.009	0	1.2	5.254	0
721	1.01	0	1.2	5.254	0
722	1.011	0	1.2	5.254	0
723	1.013	0	1.2	5.254	0
724	1.014	0	1.2	5.254	0
725	1.016	0	1.2	5.254	0
726	1.017	0	1.2	5.254	0
727	1.018	0	1.2	5.254	0
728	1.02	0	1.2	5.254	0
729	1.021	0	1.2	5.254	0
730	1.023	0	1.2	5.254	0
731	1.024	0	1.2	5.254	0
732	1.025	0	1.2	5.254	0
733	1.027	0	1.2	5.254	0
734	1.028	0	1.2	5.254	0
735	1.029	0	1.2	5.254	0
736	1.031	0	1.2	5.254	0
737	1.032	0	1.2	5.254	0
738	1.034	0	1.2	5.254	0
739	1.035	0	1.2	5.254	0
740	1.037	0	1.2	5.254	0
741	1.038	0	1.2	5.254	0
742	1.039	0	1.2	5.254	0
743	1.041	0	1.2	5.254	0
744	1.042	0	1.4	6.13	0
745	1.044	0	1.2	5.254	0
746	1.045	0	1.2	5.254	0
747	1.047	0	1.2	5.254	0
748	1.048	0	1.2	5.254	0
749	1.05	0	1.2	5.254	0
750	1.051	0	1.2	5.254	0
751	1.053	0	1.2	5.254	0
752	1.054	0	1.2	5.254	0

753	1.055	0	1.2	5.254	0
754	1.057	0	1.2	5.254	0
755	1.058	0	1.2	5.254	0
756	1.06	0	1.2	5.254	0
757	1.061	0	1.2	5.254	0
758	1.062	0	1.2	5.254	0
759	1.064	0	1.2	5.254	0
760	1.065	0	1.2	5.254	0
761	1.067	0	1.2	5.254	0
762	1.068	0	1.2	5.254	0
763	1.07	0	1.2	5.254	0
764	1.071	0	1.2	5.254	0
765	1.072	0	1.2	5.254	0
766	1.074	0	1.2	5.254	0
767	1.076	0	1.2	5.254	0
768	1.077	0	1.2	5.254	0
769	1.078	0	1.2	5.254	0
770	1.079	0	1.2	5.254	0
771	1.081	0	1.2	5.254	0
772	1.082	0	1.2	5.254	0
773	1.084	0	1.2	5.254	0
774	1.085	0	1.4	6.129	0
775	1.087	0	1.4	6.129	0
776	1.088	0	1.4	6.129	0
777	1.09	0	1.4	6.129	0
778	1.091	0	1.4	6.129	0
779	1.092	0	1.4	6.129	0
780	1.094	0	1.4	6.129	0
781	1.095	0	1.4	6.129	0
782	1.097	0	1.4	6.129	0
783	1.098	0	1.4	6.129	0
784	1.099	0	1.4	6.129	0
785	1.101	0	1.4	6.129	0
786	1.103	0	1.4	6.129	0
787	1.104	0	1.4	6.129	0
788	1.105	0	1.4	6.129	0
789	1.107	0	1.4	6.129	0
790	1.108	0	1.4	6.129	0
791	1.11	0	1.4	6.129	0
792	1.111	0	1.4	6.129	0
793	1.113	0	1.4	6.129	0
794	1.114	0	1.4	6.129	0
795	1.115	0	1.4	6.129	0

796	1.117	0	1.4	6.129	0
797	1.118	0	1.4	6.129	0
798	1.12	0	1.4	6.129	0
799	1.121	0	1.4	6.129	0
800	1.122	0	1.4	6.129	0
801	1.124	0	1.4	6.129	0
802	1.125	0	1.4	6.129	0
803	1.127	0	1.4	6.129	0
804	1.128	0	1.4	6.129	0
805	1.129	0	1.6	7.005	0
806	1.131	0	1.6	7.005	0
807	1.133	0	1.6	7.005	0
808	1.134	0	1.6	7.005	0
809	1.135	0	1.6	7.005	0
810	1.137	0	1.6	7.005	0
811	1.138	0	1.6	7.005	0
812	1.14	0	1.6	7.005	0
813	1.141	0	1.6	7.005	0
814	1.143	0	1.6	7.005	0
815	1.144	0	1.6	7.005	0
816	1.145	0	1.6	7.005	0
817	1.147	0	1.6	7.005	0
818	1.148	0	1.6	7.005	0
819	1.149	0	1.6	7.005	0
820	1.151	0	1.6	7.005	0
821	1.152	0	1.6	7.005	0
822	1.154	0	1.6	7.005	0
823	1.155	0	1.6	7.005	0
824	1.157	0	1.6	7.005	0
825	1.158	0	1.6	7.005	0
826	1.159	0	1.6	7.005	0
827	1.161	0	1.6	7.005	0
828	1.162	0	1.6	7.005	0
829	1.163	0	1.6	7.005	0
830	1.165	0	1.6	7.005	0
831	1.166	0	1.6	7.005	0
832	1.167	0	1.6	7.005	0
833	1.169	0	1.6	7.005	0
834	1.17	0	1.6	7.005	0
835	1.172	0	1.6	7.005	0
836	1.173	0	1.6	7.005	0
837	1.174	0	1.6	7.005	0
838	1.176	0	1.6	7.005	0

839	1.177	0	1.6	7.005	0
840	1.179	0	1.6	7.005	0
841	1.18	0	1.6	7.005	0
842	1.182	0	1.6	7.005	0
843	1.183	0	1.6	7.005	0
844	1.185	0	1.6	7.005	0
845	1.186	0	1.6	7.005	0
846	1.187	0	1.6	7.005	0
847	1.189	0	1.6	7.005	0
848	1.19	0	1.8	7.881	0
849	1.192	0	1.8	7.88	0
850	1.193	0	1.8	7.88	0
851	1.195	0	1.8	7.88	0
852	1.196	0	1.8	7.88	0
853	1.197	0	1.8	7.88	0
854	1.199	0	1.8	7.88	0
855	1.2	0	1.8	7.88	0
856	1.202	0	1.8	7.88	0
857	1.203	0	1.8	7.88	0
858	1.205	0	1.8	7.88	0
859	1.206	0	1.8	7.88	0
860	1.207	0	1.8	7.88	0
861	1.209	0	1.8	7.88	0
862	1.21	0	1.8	7.88	0
863	1.211	0	1.8	7.88	0
864	1.213	0	1.8	7.88	0
865	1.214	0	1.8	7.88	0
866	1.216	0	1.8	7.88	0
867	1.217	0	1.8	7.88	0
868	1.218	0	1.8	7.88	0
869	1.22	0	1.8	7.88	0
870	1.222	0	1.8	7.88	0
871	1.223	0	1.8	7.88	0
872	1.224	0	1.8	7.88	0
873	1.226	0	1.8	7.88	0
874	1.227	0	1.8	7.88	0
875	1.229	0	1.8	7.88	0
876	1.23	0	1.8	7.88	0
877	1.232	0	1.8	7.88	0
878	1.233	0	1.8	7.88	0
879	1.234	0	1.8	7.88	0
880	1.236	0	1.8	7.88	0
881	1.237	0	1.8	7.88	0

882	1.238	0	1.8	7.88	0
883	1.24	0	1.8	7.88	0
884	1.241	0	1.8	7.88	0
885	1.242	0	1.8	7.88	0
886	1.244	0	1.8	7.88	0
887	1.245	0	1.8	7.88	0
888	1.247	0	1.8	7.88	0
889	1.248	0	1.8	7.88	0
890	1.249	0	1.8	7.88	0
891	1.251	0	1.8	7.88	0
892	1.252	0	2	8.756	0
893	1.254	0	2	8.756	0
894	1.256	0	2	8.756	0
895	1.257	0	2	8.756	0
896	1.259	0	2	8.756	0
897	1.26	0	2	8.756	0
898	1.261	0	2	8.756	0
899	1.263	0	2	8.756	0
900	1.264	0	2	8.756	0
901	1.266	0	2	8.756	0
902	1.267	0	2	8.756	0
903	1.268	0	2	8.756	0
904	1.27	0	2	8.756	0
905	1.271	0	2	8.756	0
906	1.273	0	2	8.756	0
907	1.274	0	2	8.756	0
908	1.276	0	2	8.756	0
909	1.277	0	2	8.756	0
910	1.279	0	2	8.756	0
911	1.28	0.001	2	8.756	0.002
912	1.282	0.011	2	8.756	0.024
913	1.283	0.016	2	8.756	0.036
914	1.284	0.023	2	8.756	0.051
915	1.286	0.03	2	8.756	0.068
916	1.287	0.037	2	8.756	0.082
917	1.289	0.044	2	8.756	0.098
918	1.29	0.051	2	8.756	0.113
919	1.291	0.058	2	8.756	0.129
920	1.293	0.065	2	8.756	0.144
921	1.294	0.072	2	8.756	0.16
922	1.296	0.079	2	8.756	0.176
923	1.297	0.086	2	8.756	0.191
924	1.298	0.093	2	8.756	0.206

925	1.3	0.1	2	8.756	0.222
926	1.301	0.107	2	8.756	0.238
927	1.303	0.115	2	8.756	0.256
928	1.304	0.122	2	8.756	0.272
929	1.305	0.128	2	8.756	0.284
930	1.307	0.135	2	8.756	0.3
931	1.308	0.142	2	8.756	0.315
932	1.31	0.149	2	8.756	0.331
933	1.311	0.157	2	8.756	0.349
934	1.312	0.164	2	8.756	0.364
935	1.314	0.171	2.2	9.632	0.38
936	1.316	0.179	2.2	9.632	0.398
937	1.317	0.186	2.2	9.632	0.413
938	1.318	0.193	2.2	9.632	0.429
939	1.32	0.199	2.2	9.632	0.442
940	1.321	0.207	2.2	9.632	0.46
941	1.323	0.215	2.2	9.632	0.478
942	1.324	0.224	2.2	9.632	0.498
943	1.326	0.229	2.2	9.632	0.509
944	1.327	0.237	2.2	9.632	0.527
945	1.329	0.244	2.2	9.632	0.542
946	1.33	0.251	2.2	9.632	0.558
947	1.332	0.258	2.2	9.632	0.573
948	1.333	0.265	2.2	9.632	0.589
949	1.334	0.272	2.2	9.632	0.604
950	1.336	0.279	2.2	9.632	0.62
951	1.337	0.286	2.2	9.632	0.636
952	1.338	0.293	2.2	9.632	0.651
953	1.34	0.3	2.2	9.632	0.667
954	1.341	0.3	2.2	9.632	0.667
955	1.342	0.314	2.2	9.632	0.698
956	1.344	0.322	2.2	9.632	0.715
957	1.346	0.329	2.2	9.632	0.731
958	1.347	0.336	2.2	9.632	0.747
959	1.348	0.343	2.2	9.632	0.762
960	1.35	0.35	2.2	9.632	0.778
961	1.351	0.357	2.2	9.632	0.793
962	1.353	0.364	2.2	9.632	0.81
963	1.354	0.371	2.2	9.632	0.824
964	1.355	0.378	2.2	9.632	0.84
965	1.357	0.385	2.2	9.632	0.856
966	1.358	0.392	2.2	9.632	0.871
967	1.359	0.399	2.2	9.632	0.887

968	1.361	0.406	2.2	9.632	0.902
969	1.363	0.414	2.2	9.632	0.92
970	1.364	0.421	2.2	9.632	0.935
971	1.365	0.428	2.2	9.632	0.951
972	1.367	0.437	2.2	9.632	0.971
973	1.368	0.443	2.2	9.632	0.984
974	1.37	0.45	2.2	9.632	1
975	1.371	0.457	2.2	9.632	1.016
976	1.373	0.464	2.2	9.632	1.031
977	1.374	0.471	2.2	9.632	1.047
978	1.375	0.478	2.2	9.632	1.062
979	1.377	0.485	2.2	9.632	1.078
980	1.378	0.492	2.2	9.632	1.093
981	1.38	0.499	2.2	9.632	1.109
982	1.381	0.506	2.4	10.507	1.124
983	1.383	0.515	2.4	10.507	1.144
984	1.384	0.522	2.4	10.507	1.16
985	1.385	0.529	2.4	10.507	1.175
986	1.387	0.536	2.4	10.507	1.191
987	1.388	0.543	2.4	10.507	1.206
988	1.39	0.55	2.4	10.507	1.222
989	1.391	0.557	2.4	10.507	1.238
990	1.393	0.564	2.4	10.507	1.253
991	1.394	0.571	2.4	10.507	1.27
992	1.396	0.579	2.4	10.507	1.287
993	1.397	0.586	2.4	10.507	1.302
994	1.398	0.593	2.4	10.507	1.318
995	1.4	0.6	2.4	10.507	1.333
996	1.401	0.607	2.4	10.507	1.349
997	1.403	0.616	2.4	10.507	1.369
998	1.404	0.623	2.4	10.507	1.384
999	1.406	0.63	2.4	10.507	1.4
1000	1.407	0.637	2.4	10.507	1.416
1001	1.409	0.644	2.4	10.507	1.431
1002	1.41	0.651	2.4	10.507	1.446
1003	1.411	0.658	2.4	10.507	1.463
1004	1.413	0.666	2.4	10.507	1.48
1005	1.414	0.673	2.4	10.507	1.496
1006	1.416	0.68	2.4	10.507	1.511
1007	1.417	0.687	2.4	10.507	1.527
1008	1.418	0.695	2.4	10.507	1.544
1009	1.42	0.701	2.4	10.507	1.558
1010	1.422	0.71	2.4	10.507	1.578

1011	1.423	0.717	2.4	10.507	1.593
1012	1.425	0.726	2.4	10.507	1.613
1013	1.426	0.732	2.4	10.507	1.626
1014	1.428	0.739	2.4	10.507	1.642
1015	1.429	0.747	2.4	10.507	1.66
1016	1.43	0.755	2.4	10.507	1.678
1017	1.432	0.76	2.4	10.507	1.689
1018	1.433	0.767	2.4	10.507	1.704
1019	1.435	0.777	2.4	10.507	1.727
1020	1.436	0.782	2.4	10.507	1.738
1021	1.438	0.789	2.4	10.507	1.754
1022	1.439	0.797	2.4	10.507	1.771
1023	1.441	0.804	2.4	10.507	1.787
1024	1.442	0.812	2.4	10.507	1.804
1025	1.443	0.819	2.4	10.507	1.82
1026	1.445	0.827	2.4	10.507	1.838
1027	1.447	0.833	2.4	10.507	1.852
1028	1.448	0.841	2.4	10.507	1.869
1029	1.449	0.848	2.4	10.507	1.884
1030	1.451	0.855	2.6	11.383	1.9
1031	1.453	0.864	2.6	11.383	1.92
1032	1.454	0.871	2.6	11.383	1.936
1033	1.455	0.879	2.6	11.383	1.953
1034	1.457	0.885	2.6	11.383	1.967
1035	1.458	0.893	2.6	11.383	1.984
1036	1.46	0.9	2.6	11.383	2
1037	1.461	0.907	2.6	11.383	2.016
1038	1.463	0.915	2.6	11.383	2.034
1039	1.464	0.923	2.6	11.383	2.051
1040	1.466	0.93	2.6	11.383	2.066
1041	1.467	0.937	2.6	11.383	2.082
1042	1.469	0.945	2.6	11.383	2.1
1043	1.47	0.953	2.6	11.383	2.118
1044	1.472	0.96	2.6	11.383	2.133
1045	1.473	0.967	2.6	11.383	2.149
1046	1.474	0.974	2.6	11.383	2.166
1047	1.476	0.982	2.6	11.383	2.182
1048	1.477	0.988	2.6	11.383	2.197
1049	1.479	0.996	2.6	11.383	2.213
1050	1.48	1.005	2.6	11.383	2.233
1051	1.482	1.012	2.6	11.383	2.249
1052	1.483	1.018	2.6	11.383	2.262
1053	1.485	1.026	2.6	11.383	2.28

1054	1.486	1.033	2.6	11.383	2.297
1055	1.488	1.04	2.6	11.383	2.312
1056	1.489	1.047	2.6	11.383	2.328
1057	1.491	1.057	2.6	11.383	2.349
1058	1.492	1.062	2.6	11.383	2.36
1059	1.493	1.071	2.6	11.383	2.38
1060	1.495	1.077	2.6	11.383	2.393
1061	1.497	1.084	2.6	11.383	2.409
1062	1.498	1.091	2.6	11.383	2.424
1063	1.499	1.098	2.6	11.383	2.44
1064	1.501	1.106	2.6	11.383	2.458
1065	1.502	1.113	2.6	11.383	2.473
1066	1.504	1.12	2.6	11.383	2.489
1067	1.505	1.127	2.6	11.383	2.504
1068	1.507	1.134	2.6	11.383	2.52
1069	1.508	1.141	2.6	11.383	2.537
1070	1.509	1.149	2.6	11.383	2.553
1071	1.511	1.156	2.6	11.383	2.569
1072	1.512	1.163	2.8	12.259	2.584
1073	1.514	1.171	2.8	12.258	2.602
1074	1.515	1.178	2.8	12.258	2.618
1075	1.517	1.186	2.8	12.258	2.636
1076	1.518	1.193	2.8	12.258	2.651
1077	1.52	1.202	2.8	12.258	2.671
1078	1.521	1.208	2.8	12.258	2.684
1079	1.523	1.217	2.8	12.258	2.704
1080	1.524	1.223	2.8	12.258	2.718
1081	1.526	1.23	2.8	12.258	2.733
1082	1.527	1.237	2.8	12.258	2.749
1083	1.529	1.244	2.8	12.258	2.764
1084	1.53	1.252	2.8	12.258	2.782
1085	1.532	1.26	2.8	12.258	2.799
1086	1.533	1.267	2.8	12.258	2.815
1087	1.534	1.274	2.8	12.258	2.831
1088	1.536	1.281	2.8	12.258	2.847
1089	1.538	1.289	2.8	12.258	2.864
1090	1.539	1.296	2.8	12.258	2.88
1091	1.54	1.303	2.8	12.258	2.896
1092	1.542	1.311	2.8	12.258	2.913
1093	1.543	1.318	2.8	12.258	2.929
1094	1.545	1.324	2.8	12.258	2.942
1095	1.546	1.331	2.8	12.258	2.958
1096	1.547	1.339	2.8	12.258	2.976

1097	1.549	1.346	2.8	12.258	2.991
1098	1.551	1.353	2.8	12.258	3.008
1099	1.552	1.36	2.8	12.258	3.022
1100	1.553	1.368	2.8	12.258	3.04
1101	1.555	1.375	2.8	12.258	3.056
1102	1.556	1.383	2.8	12.258	3.073
1103	1.558	1.39	2.8	12.258	3.089
1104	1.559	1.397	2.8	12.258	3.104
1105	1.561	1.405	2.8	12.258	3.122
1106	1.562	1.412	2.8	12.258	3.138
1107	1.564	1.42	2.8	12.258	3.156
1108	1.565	1.427	2.8	12.258	3.171
1109	1.567	1.435	2.8	12.258	3.189
1110	1.568	1.442	2.8	12.258	3.204
1111	1.57	1.449	3	13.134	3.221
1112	1.571	1.459	3	13.134	3.242
1113	1.573	1.466	3	13.134	3.258
1114	1.574	1.473	3	13.134	3.273
1115	1.576	1.48	3	13.134	3.289
1116	1.577	1.488	3	13.134	3.306
1117	1.579	1.495	3	13.134	3.322
1118	1.58	1.504	3	13.134	3.342
1119	1.582	1.51	3	13.134	3.354
1120	1.583	1.517	3	13.134	3.371
1121	1.584	1.524	3	13.134	3.387
1122	1.586	1.531	3	13.134	3.402
1123	1.587	1.538	3	13.134	3.418
1124	1.589	1.545	3	13.134	3.433
1125	1.59	1.553	3	13.134	3.451
1126	1.592	1.56	3	13.134	3.467
1127	1.593	1.567	3	13.134	3.482
1128	1.595	1.574	3	13.134	3.498
1129	1.596	1.581	3	13.134	3.513
1130	1.597	1.589	3	13.134	3.531
1131	1.599	1.596	3	13.134	3.547
1132	1.601	1.603	3	13.134	3.563
1133	1.602	1.612	3	13.134	3.582
1134	1.603	1.62	3	13.134	3.6
1135	1.605	1.626	3	13.134	3.613
1136	1.607	1.634	3	13.134	3.631
1137	1.608	1.641	3	13.134	3.648
1138	1.609	1.649	3	13.134	3.664
1139	1.611	1.656	3	13.134	3.68

1140	1.612	1.663	3	13.134	3.696
1141	1.614	1.67	3	13.134	3.711
1142	1.615	1.677	3	13.134	3.726
1143	1.616	1.684	3	13.134	3.742
1144	1.618	1.691	3	13.134	3.758
1145	1.62	1.699	3	13.134	3.777
1146	1.621	1.707	3	13.134	3.793
1147	1.622	1.714	3	13.134	3.81
1148	1.624	1.721	3	13.134	3.824
1149	1.626	1.729	3	13.134	3.842
1150	1.627	1.736	3	13.134	3.858
1151	1.628	1.743	3	13.134	3.873
1152	1.63	1.751	3.2	14.01	3.891
1153	1.632	1.758	3.2	14.009	3.906
1154	1.633	1.766	3.2	14.009	3.924
1155	1.634	1.773	3.2	14.009	3.941
1156	1.636	1.781	3.2	14.009	3.958
1157	1.637	1.788	3.2	14.009	3.973
1158	1.639	1.796	3.2	14.009	3.991
1159	1.64	1.803	3.2	14.009	4.007
1160	1.642	1.811	3.2	14.009	4.024
1161	1.643	1.818	3.2	14.009	4.04
1162	1.645	1.825	3.2	14.009	4.057
1163	1.646	1.833	3.2	14.009	4.073
1164	1.648	1.84	3.2	14.009	4.089
1165	1.649	1.847	3.2	14.009	4.104
1166	1.651	1.854	3.2	14.009	4.12
1167	1.652	1.861	3.2	14.009	4.136
1168	1.654	1.869	3.2	14.009	4.153
1169	1.655	1.877	3.2	14.009	4.171
1170	1.657	1.886	3.2	14.009	4.191
1171	1.658	1.891	3.2	14.009	4.203
1172	1.659	1.899	3.2	14.009	4.22
1173	1.661	1.906	3.2	14.009	4.236
1174	1.663	1.913	3.2	14.009	4.251
1175	1.664	1.921	3.2	14.009	4.269
1176	1.665	1.928	3.2	14.009	4.284
1177	1.667	1.935	3.2	14.009	4.3
1178	1.668	1.943	3.2	14.009	4.318
1179	1.67	1.95	3.2	14.009	4.333
1180	1.671	1.958	3.2	14.009	4.35
1181	1.673	1.965	3.2	14.009	4.367
1182	1.674	1.973	3.2	14.009	4.384

1183	1.676	1.981	3.2	14.009	4.402
1184	1.677	1.988	3.2	14.009	4.418
1185	1.679	1.995	3.2	14.009	4.433
1186	1.68	2.002	3.2	14.009	4.449
1187	1.682	2.01	3.2	14.009	4.467
1188	1.683	2.017	3.4	14.885	4.482
1189	1.685	2.026	3.4	14.885	4.502
1190	1.686	2.033	3.4	14.885	4.518
1191	1.688	2.04	3.4	14.885	4.533
1192	1.689	2.049	2.6	11.383	4.554
1193	1.691	2.055	2	8.756	4.566
1194	1.692	2.062	1.4	6.129	4.583
1195	1.693	2.069	0.8	3.502	4.598
1196	1.695	2.077	0	0	4.616
1197	1.696	2.083	0	0	4.629
1198	1.698	2.091	0	0	4.647
1199	1.699	2.098	0	0	4.662
1200	1.701	2.106	0	0	4.68
1201	1.702	2.113	0	0	4.695
1202	1.704	2.12	0	0	4.711
1203	1.705	2.128	0	0	4.729
1204	1.707	2.134	0	0	4.742
1205	1.708	2.141	0	0	4.759
1206	1.709	2.149	0	0	4.776
1207	1.711	2.156	0	0	4.791
1208	1.712	2.164	0	0	4.809
1209	1.714	2.171	0	0	4.824
1210	1.715	2.178	0	0	4.84

Membrana K Piña

No.	Time(min)	Elongation(mm)	Force(kgf)	Stress(MPa)	Strain(%)
150	0.204	0	0	0	0
151	0.205	0	0	0	0
152	0.207	0	0	0	0
153	0.208	0	0	0	0
154	0.209	0	0	0	0
155	0.211	0	0	0	0
156	0.212	0	0	0	0

157	0.214	0	0	0	0
158	0.215	0	0	0	0
159	0.216	0	0	0	0
160	0.218	0	0	0	0
161	0.219	0	0	0	0
162	0.221	0	0	0	0
163	0.222	0	0	0	0
164	0.223	0	0	0	0
165	0.224	0	0	0	0
166	0.226	0	0	0	0
167	0.227	0	0	0	0
168	0.229	0	0	0	0
169	0.23	0	0	0	0
170	0.232	0	0	0	0
171	0.233	0	0	0	0
172	0.234	0	0	0	0
173	0.236	0	0	0	0
174	0.237	0	0	0	0
175	0.239	0	0	0	0
176	0.24	0	0	0	0
177	0.241	0	0	0	0
178	0.243	0	0	0	0
179	0.244	0	0	0	0
180	0.245	0	0	0	0
181	0.247	0	0	0	0
182	0.248	0	0	0	0
183	0.249	0	0	0	0
184	0.251	0	0	0	0
185	0.252	0	0	0	0
186	0.254	0	0	0	0
187	0.255	0	0	0	0
188	0.257	0	0	0	0
189	0.258	0	0	0	0
190	0.259	0	0	0	0
191	0.261	0	0	0	0
192	0.262	0	0	0	0
193	0.264	0	0	0	0
194	0.265	0	0	0	0
195	0.266	0	0	0	0
196	0.268	0	0	0	0
197	0.269	0	0	0	0
198	0.271	0	0	0	0
199	0.272	0	0	0	0

200	0.273	0	0	0	0
201	0.275	0	0	0	0
202	0.276	0	0	0	0
203	0.278	0	0.2	3.292	0
204	0.279	0	0.2	3.291	0
205	0.281	0	0.2	3.291	0
206	0.282	0	0.2	3.291	0
207	0.284	0	0.2	3.291	0
208	0.285	0	0.2	3.291	0
209	0.286	0	0.2	3.291	0
210	0.288	0	0.2	3.291	0
211	0.289	0	0	0	0
212	0.291	0	0	0	0
213	0.292	0	0	0	0
214	0.293	0	0	0	0
215	0.295	0	0	0	0
216	0.296	0	0	0	0
217	0.298	0	0	0	0
218	0.299	0	0	0	0
219	0.3	0	0	0	0
220	0.302	0	0	0	0
221	0.303	0	0	0	0
222	0.305	0	0	0	0
223	0.306	0	0	0	0
224	0.307	0	0	0	0
225	0.309	0	0	0	0
226	0.31	0	0	0	0
227	0.311	0	0	0	0
228	0.313	0	0	0	0