

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



Optimización del tiempo de cultivo, concentración de etanol y extracto acuoso de orujo de uva en la producción de celulosa bacteriana en cultivo estático de *Komagataeibacter xylinus*

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTOR:**

Bach. Izquierdo Reyna, Deysi Paola  
ORCID: 0009-0003-0668-5610

**ASESOR:**

Dr. Castillo Calderón, Augusto  
DNI N° 32931123  
ORCID: 0000-0001-9237-8542

**COASESOR:**

M. Sc. Diestra Balta, Jesús Grabiela  
DNI N° 70553964  
ORCID: 0000-0003-2462-2229

**Nuevo Chimbote – Perú  
2025**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



Optimización del tiempo de cultivo, concentración de etanol y extracto acuoso de orujo de uva en la producción de celulosa bacteriana en cultivo estático de *Komagataeibacter xylinus*

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTOR:** Bach. Izquierdo Reyna, Deysi Paola

**Revisado y aprobado por el asesor y coasesor**

---

A blue ink signature of Dr. Augusto Castillo Calderón, which appears to read "Augusto Castillo".

**Dr. Augusto Castillo Calderón**  
ASESOR  
DNI N° 32931123  
ORCID: 0000-0001-9237-8542

---

A blue ink signature of M. Sc. Jesús Graniel Diestra Balta, which appears to read "Jesús Graniel Diestra".

**M. Sc. Jesús Graniel Diestra Balta**  
COASESOR  
DNI N° 70553964  
ORCID: 0000-0003-2462-2229

Nuevo Chimbote – Perú

2025

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA**



**UNS**  
UNIVERSIDAD  
NACIONAL DEL SANTA

Optimización del tiempo de cultivo, concentración de etanol y extracto acuoso  
de orujo de uva en la producción de celulosa bacteriana en cultivo estático de  
*Komagataeibacter xylinus*

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO  
EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTOR:** Bach. Izquierdo Reyna, Deysi Paola

**Revisado y aprobado por el jurado evaluador**

  
**Dr. Ángel Pablo Castro Alvarado**  
**PRESIDENTE**  
**DNI N°: 06451148**  
**ORCID: 0000-0002-5984-0587**

  
**Dr. Augusto Castillo Calderón**  
**INTEGRANTE**  
**DNI N°: 32931123**  
**ORCID: 0000-0001-9237-8542**

  
**José Manuel Villanueva Carlos**  
**INTEGRANTE**  
**DNI N°: 32733772**  
**ORCID: 0000-0002-5056-0001**

## ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE TESIS

En el distrito de Nuevo Chimbote, en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ciencias, siendo las trece y 10 minutos del día veintidós de enero del 2025, se reunió el Jurado Evaluador presidido por: Dr. Ángel Castro Alvarado (presidente), teniendo como miembros a Mag. José Villanueva Carlos (secretario) y Dr. Augusto Castillo Calderón (Integrante) para la sustentación de Tesis, a fin de optar el Título de Licenciado Biotecnología, realizado por la Bachiller Deysi Paola IZQUIERDO REYNA, quien expuso y sustento el trabajo intitulado: "Optimización del tiempo de cultivo, concentración de etanol y extracto acuoso de orujo de uva en la producción de celulosa bacteriana en cultivo estático de *Komagataeibacter xylinus*".

Terminada la sustentación, el graduado respondió las preguntas formuladas por los miembros del Jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes declara la sustentación como **Bueno**..... asignándole un calificativo de 18.puntos.; según el Art. 112º del Reglamento General de Grado Académico de Bachiller y el Título Profesional vigente (Resolución No. 337-2024-CU-R-UNS).

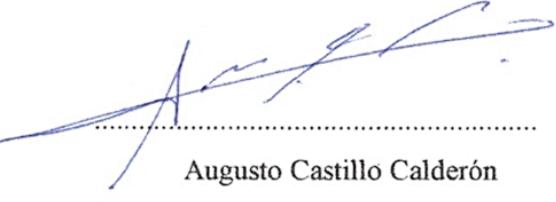
Siendo las 14:00 horas ..... se dio por terminado el acto de sustentación.

  
.....  
Ángel Castro Alvarado

Presidente

  
.....  
José Villanueva Carlos

Secretario

  
.....  
Augusto Castillo Calderón

Integrante

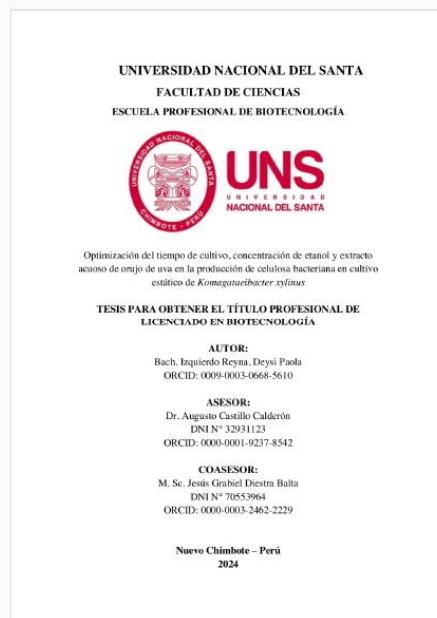


## Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega:	Deysi Paola Izquierdo Reyna
Título del ejercicio:	Informes de tesis E.P. Biotecnología
Título de la entrega:	Optimización de tiempo de cultivo, concentración de etanol ...
Nombre del archivo:	Optimización_de_tiempo_de_cultivo_concentración_de_etano...
Tamaño del archivo:	4.01M
Total páginas:	145
Total de palabras:	35,446
Total de caracteres:	190,325
Fecha de entrega:	20-ene.-2025 08:11p. m. (UTC-0500)
Identificador de la entrega:	2567962930



Derechos de autor 2025 Turnitin. Todos los derechos reservados.

# Optimización de tiempo de cultivo, concentración de etanol y extracto acuoso de orujo de uva en la producción de celulosa bacteriana en cultivo estático de *Komagataeibacter xylinus*.pdf

## INFORME DE ORIGINALIDAD

**13%**

INDICE DE SIMILITUD

**13%**

FUENTES DE INTERNET

**3%**

PUBLICACIONES

**2%**

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="#">repositorio.uns.edu.pe</a>	3%
2	<a href="#">hdl.handle.net</a>	2%
3	<a href="#">repositorio.ucss.edu.pe</a>	1%
4	<a href="#">Submitted to Universidad EAFIT</a>	1%
5	<a href="#">dspace.unitru.edu.pe</a>	<1%
6	<a href="#">recursosbiblio.url.edu.gt</a>	<1%
7	<a href="#">pesquisa.bvsalud.org</a>	<1%
8	<a href="#">es.scribd.com</a>	<1%

## **DEDICATORIA**

*Dedicado a Dios por ser mi apoyo, fortaleza y guía.*

*“Encomienda al Señor tus obras, y tus pensamientos serán afirmados.”*

*Proverbios 16: 3*

*Dedicado a mi madre, Rosa Reyna Polo quien siempre me apoya y ora para que Dios me ayude a cumplir mis metas profesionales.*

*A mi padre, Segundo Elmer Izquierdo por motivarme a seguir creciendo académica y profesionalmente.*

*A mis hermanos, Katheryn y Manuel, son la luz de mi vida y la alegría de mi corazón.*

*A Osito y mis michitos.*

*Deysi Paola Izquierdo Reyna*

## **AGRADECIMIENTO**

A mi asesor Dr. Augusto Castillo Calderón, jefe del Laboratorio de Química Orgánica y Química Analítica, por brindarme su experiencia como investigador y apoyo académico durante la ejecución del presente trabajo.

A mi coasesor M. Sc. Jesús Graniel Diestra Balta, docente del Departamento Académico de Biología, Microbiología y Biotecnología, por compartir su experiencia y consejos a lo largo de la elaboración y ejecución del trabajo de investigación.

A mis docentes Dr. Ángel Castro, M. Sc. Eterio Alva, M. Sc. José Villanueva, Dr. Carlos Azañero, por su aporte durante los años de formación, por sus enseñanzas, consejos y apoyo incondicional.

A mis padres y hermanos por su amor, apoyo y comprensión durante el tiempo de formación y ejecución de este trabajo.

Un agradecimiento especial a Jesús, por su amor, por estar siempre a mi lado, brindándome apoyo incondicional y recordarme que era capaz de lograrlo.

## INDICE

RESUMEN .....	XV
ABSTRACT .....	xvi
I. INTRODUCCIÓN .....	17
1.1. Problema de investigación .....	20
1.2. Objetivos .....	20
1.2.1. Objetivo general .....	20
1.2.2. Objetivos específicos .....	20
1.3. Hipótesis .....	21
1.4. Justificación e importancia .....	21
II. MARCO TEÓRICO .....	23
2.1. Antecedentes .....	23
2.2. Marco conceptual .....	25
2.2.1. Celulosa .....	25
2.2.2. Bacterias productoras de celulosa .....	31
2.2.3. Residuos y subproductos agroindustriales .....	39
2.2.4. Generalidades de la uva .....	40
2.2.5. Medios de cultivo para la producción de celulosa bacteriana .....	42
2.2.6. Producción de etanol en el Perú .....	46
2.2.7. Metodología de superficie de respuesta .....	46
III. METODOLOGÍA .....	48
3.1. Enfoque de la investigación .....	48
3.2. Localización de estudio .....	48
3.3. Materiales .....	48
3.3.1. Microorganismo .....	48
3.3.2. Orujo de uva .....	49

3.4. Métodos .....	50
3.4.1. Activación de la cepa bacteriana y conservación .....	50
3.4.2. Preparación y caracterización de extracto acuoso de orujo de uva .....	50
3.4.3. Cinética bacteriana en medio Hestrin Schramm.....	52
3.4.4. Estudio preliminar de la influencia de la concentración del extracto acuoso de orujo de uva y etanol en la producción de celulosa bacteriana .....	53
3.4.5. Diseño experimental para la optimización de la producción de celulosa.	54
3.4.6. Preparación del inóculo para la ejecución del diseño experimental.....	56
3.4.7. Fermentación de los experimentos del diseño experimental .....	57
3.4.8. Recolección de datos .....	58
3.4.9. Análisis de Datos.....	59
3.4.10. Validez de la optimización estadística .....	59
3.4.11. Cinética bacteriana en medio de cultivo optimizado.....	60
3.4.12. Ajuste de datos a modelos matemáticos .....	60
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	63
4.1. Caracterización fisicoquímica del extracto acuoso de orujo de uva .....	63
4.2. Cinética de crecimiento bacteriano, consumo de sustrato y formación de producto en medio Hestrin Schramm .....	65
4.2.1. Cinética de crecimiento de biomasa en medio Hestrin Schramm .....	65
4.2.2. Cinética de consumo de sustrato en medio Hestrin Schramm.....	69
4.2.3. Cinética de formación de producto en medio Hestrin Schramm.....	72
4.3. Estudio preliminar de la influencia de la concentración del extracto acuoso de orujo de uva y etanol en la producción de celulosa bacteriana.....	76
4.4. Diseño experimental para la optimización de tiempo de cultivo, extracto acuoso de orujo de uva y etanol.....	79
4.4.1. Análisis de variables de respuesta .....	81
4.4.2. Optimización estadística de respuesta múltiple.....	82
4.5. Validación de la optimización estadística de respuesta múltiple .....	86

4.6.	Cinética de crecimiento bacteriano en medio optimizado .....	88
4.6.1.	Cinética de crecimiento de biomasa en medio optimizado .....	88
4.6.2.	Cinética de consumo de sustrato en medio optimizado.....	90
4.6.3.	Perfil de consumo de etanol en medio optimizado.....	92
4.6.4.	Cinética de formación de producto en medio optimizado.....	93
V.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	99
5.1.	Conclusiones .....	99
5.2.	Recomendaciones .....	100
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	101
VII.	ANEXOS .....	119

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Concentración de azúcares principales presentes en el orujo de uva blanca y orujo de uva tinta.....	41
Cuadro 2: Producción de BC a partir de residuos agroindustriales en condiciones estáticas.....	44
Cuadro 3. Valores de las variables independientes de estudio a los diferentes niveles del diseño experimental.....	55
Cuadro 4. Diseño compuesto central rotable $2^3$ con 3 puntos centrales.....	55
Cuadro 5. Propiedades fisicoquímicas del extracto acuoso de orujo de uva.....	63
Cuadro 6. Reporte de Jupyter Colab del ajuste a la ecuación logística y de Gompertz.	69
Cuadro 7. Influencia de 4 concentraciones distintas de extracto acuoso de orujo de uva sin adición de etanol en la producción de BC luego de 10 días de cultivo a 30°C con un pH inicial de 6.0 .....	76
Cuadro 8. Influencia de 4 concentraciones distintas de etanol en la producción de BC luego de 10 días de cultivo a 30°C con un pH inicial de 6.0.....	78
Cuadro 9. Matriz del diseño compuesto central rotable con las variables independientes con el nivel codificado y las respuestas.....	80
Cuadro 10. Valores de los factores que optimizan cada variable de respuesta.....	81
Cuadro 11. Resultados experimentales y deseabilidad del diseño de optimización multifactorial para la producción de celulosa bacteriana. ....	82
Cuadro 12. Valores óptimos de factores y variables de respuestas. ....	84
Cuadro 13. Comparación de respuestas estadísticas y experimentales .....	86
Cuadro 14. Comparación de parámetros de crecimiento de <i>K. xylinus</i> en medio Hestrin-Schramm y medio optimizado según ecuación de Gompertz.....	90
Cuadro 15. Parámetros obtenidos en cinética con medio Hestrin Schramm y medio optimizado con extracto acuoso de orujo de uva y etanol.....	97
Cuadro 16. Datos de concentración y absorbancia de curva de calibrado DNS. ....	119
Cuadro 17. Datos de concentración y absorbancia de curva de calibrado de glucosa mediante kit enzimático de determinación de glucosa marca Valtek. ....	121
Cuadro 18. Determinación de concentración de biomasa en g/L mediante el método gravimétrico.....	124
Cuadro 19. Datos de concentración de biomasa y absorbancia a 600 nm obtenidos del método gravimétrico para determinación de biomasa. ....	125

Cuadro 20: Datos de concentración sustrato inicial, concentración sustrato final, concentración de biomasa final y concentración final de etanol en los experimentos del diseño experimental.....	129
Cuadro 21. Análisis de varianza (ANOVA) para la respuesta celulosa producida (g/L). .....	130
Cuadro 22. Resultados estimados para la respuesta celulosa producida.....	133
Cuadro 23. Análisis de varianza (ANOVA) para la respuesta productividad (g/L*día)	135
Cuadro 24. Resultados estimados para la productividad.....	137
Cuadro 25. Análisis de varianza (ANOVA) para la respuesta Rendimiento de sustrato en producto ( $Y_{P/S}$ ).....	139
Cuadro 26. Resultados estimados para rendimiento de sustrato en producto .....	141

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la celulosa.....	26
Figura 2. Celulosa bacteriana (BC). .....	28
Figura 3. Esquema de la biosíntesis de celulosa bacteriana. ....	33
Figura 4. Celulosa en condiciones estáticas y agitadas. ....	34
Figura 5. Diagrama de flujo metabólico de la producción de celulosa bacteriana por <i>Komagataeibacter xylinus</i> . ....	36
Figura 6. Microfotografía de la cepa <i>Komagataeibacter xylinus</i> NRRL B-758.....	49
Figura 7. Orujo de uva sin tratamiento utilizado en el experimento. ....	49
Figura 8. Activación de <i>Komagataeibacter xylinus</i> NRRL B-758.....	50
Figura 9. Preparación de extracto acuoso de orujo de uva.....	51
Figura 10. Estudio preliminar de condiciones de cultivo.. ....	54
Figura 11. Esquema de inoculación de los experimentos.....	57
Figura 12. Ejecución del diseño experimental para la optimización de las variables de estudio en la producción de BC por <i>K. xylinus</i> .. ....	58
Figura 13. Cinética de formación de biomasa de <i>Komagataeibacter xylinus</i> NRRL B-758 en medio Hestrin Schramm.. ....	66
Figura 14. Crecimiento de biomasa de <i>Komagataeibacter xylinus</i> NRRL B-758 en medio Hestrin Schramm ajustado al modelo de ecuación logística.. ....	67
Figura 15. Crecimiento de biomasa de <i>Komagataeibacter xylinus</i> NRRL B-758 en medio Hestrin Schramm ajustado al modelo de ecuación de Gompertz. ....	68
Figura 16. Cinética de consumo de sustrato y formación de biomasa de <i>Komagataeibacter xylinus</i> NRRL B-758 en medio Hestrin Schramm. ....	70
Figura 17. Consumo de sustrato de <i>Komagataeibacter xylinus</i> NRRL B-758 en medio Hestrin Schramm ajustado al modelo de Monod.. ....	71
Figura 18. Cinética de formación de biomasa, consumo de sustrato y producción de celulosa por <i>Komagataeibacter xylinus</i> NRRL B-758 en medio Hestrin Schramm. ....	72
Figura 19. Producción de BC sintetizada por <i>Komagataeibacter xylinus</i> NRRL B-758 en medio Hestrin Schramm ajustado al modelo de Gompertz. ....	73
Figura 20. Crecimiento de biomasa, consumo de sustrato y formación de celulosa sintetizada por <i>Komagataeibacter xylinus</i> NRRL B-758 en medio Hestrin Schramm ajustado a modelos matemáticos.. ....	75
Figura 21. Influencia de la concentración de extracto acuoso de orujo de uva en el crecimiento de biomasa y síntesis de celulosa.....	77

Figura 22. Influencia de la concentración de etanol en el crecimiento de biomasa y síntesis de celulosa.....	78
Figura 23. Gráficos de contornos y de superficie de respuesta para la deseabilidad de respuestas múltiples.....	85
Figura 24. Cinética de formación de biomasa de <i>K. xylinus</i> en medio optimizado.....	89
Figura 25. Crecimiento de biomasa de <i>Komagataeibacter xylinus</i> NRRL B-758 en medio optimizado ajustado al modelo de ecuación de Gompertz.....	90
Figura 26. Cinética de consumo de sustrato y formación de biomasa de <i>Komagataeibacter xylinus</i> NRRL B-758 en medio optimizado.....	91
Figura 27. Consumo de sustrato de <i>Komagataeibacter xylinus</i> NRRL B-758 en medio optimizado ajustado al modelo de Monod.....	92
Figura 28. Consumo de etanol (% v/v) en el tiempo en el cultivo de <i>K. xylinus</i> a partir de medio optimizado ajustado al modelo de ecuación Logística.....	93
Figura 29. Cinética de formación de biomasa, consumo de azúcares reductores, consumo de etanol y producción de celulosa por <i>Komagataeibacter xylinus</i> NRRL B-758 en medio optimizado.....	94
Figura 30. Producción de BC sintetizada por <i>Komagataeibacter xylinus</i> NRRL B-758 ajustado al modelo de Monod.....	95
Figura 31. Crecimiento de biomasa, consumo de sustrato, consumo de etanol y formación de producto en medio optimizado con extracto acuoso de orujo de uva y etanol ajustado a modelos matemáticos.....	96
Figura 32. Curva de calibración de azúcares reductores mediante el método DNS.....	120
Figura 33. Método DNS para determinación de azúcares reductores.....	120
Figura 34. Curva de calibración de glucosa mediante el kit enzimático de determinación de glucosa marca Valtek.....	122
Figura 35. Determinación de glucosa mediante método enzimático marca Valtek.....	122
Figura 36. Caldo de cultivo de <i>K. xylinus</i> luego de 60 h de cultivo.....	123
Figura 37. Capachos con biomasa seca luego de secado de 24 h.....	124
Figura 38. Curva de calibrado de biomasa mediante el método gravimétrico para determinación de biomasa.....	125
Figura 39. Extracción y cuantificación de celulosa (BC).....	126
Figura 40. Curva de calibrado de etanol (% v/v) por Cromatografía de gases.....	128
Figura 41. Diagrama de Pareto de los factores y sus efectos estandarizados para la celulosa producida (g/L).....	131

Figura 42. Contorno de superficie de respuesta estimada.....	133
Figura 43. Superficie de respuesta estimada.....	134
Figura 44. Diagrama de Pareto de los factores y sus efectos estandarizados para la productividad de celulosa en el tiempo (g/L*día).....	136
Figura 45. Contorno de superficie de respuesta estimada.....	138
Figura 46. Superficie de respuesta estimada.....	138
Figura 47. Diagrama de Pareto de los factores y sus efectos estandarizados para el rendimiento de sustrato en producto ( $Y_{P/S}$ ).....	140
Figura 48. Contorno de superficie de respuesta estimada.....	142
Figura 49. Superficie de respuesta estimada.....	143

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N° 01: Determinación de azúcares reductores .....	119
Anexo N° 02: Determinación de glucosa .....	121
Anexo N° 03: Determinación de concentración de biomasa.....	123
Anexo N° 04: Método de extracción y cuantificación de celulosa .....	126
Anexo N°05: Cuantificación de etanol.....	127
Anexo N°06: Datos de biomasa y sustrato de matriz experimental .....	129
Anexo N°07: Análisis estadísticos del efecto de los factores en la celulosa producida	130
Anexo N°08: Análisis estadísticos del efecto de los factores en la productividad.....	135
Anexo N°09: Análisis estadísticos del efecto de los factores en el rendimiento .....	139

## RESUMEN

La celulosa bacteriana es un biopolímero de gran interés debido a sus propiedades únicas, como alta pureza, resistencia mecánica y biocompatibilidad, lo que la convierte en un material valioso en diversas industrias. El uso de sustratos alternativos, como residuos agroindustriales, en su producción permite reducir costos y mejorar la sostenibilidad del proceso.

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo la optimización del tiempo de cultivo, concentración de etanol y extracto acuoso de orujo de uva en la producción de celulosa bacteriana en cultivo estático de *Komagataeibacter xylinus*. El estudio se llevó a cabo utilizando un diseño compuesto central rotacional, evaluando tres variables independientes: la concentración de extracto de orujo de uva (% v/v), la concentración de etanol (% v/v) y el tiempo de cultivo (días). Las variables respuesta consideradas incluyeron la producción de celulosa (g/L), la productividad (g/L\*día) y el rendimiento de sustrato en producto ( $\frac{\text{g producto}}{\text{g sustrato}}$ ).

Los resultados mostraron una producción máxima de 9.37 g/L de celulosa bacteriana, con una productividad de 0.46 g/L\*día y un rendimiento de sustrato en producto de 0.94  $\frac{\text{g producto}}{\text{g sustrato}}$  bajo las condiciones optimizadas de 20.25 días de cultivo, 3.29% de etanol y 38.56% de extracto acuoso de orujo de uva. Además, los resultados validaron la optimización estadística como una herramienta eficaz para maximizar la producción en condiciones estáticas. Se concluyó que el uso de extracto acuoso de orujo de uva y etanol en el medio de cultivo representa una alternativa viable para la producción de celulosa bacteriana.

**Palabras clave:** Celulosa bacteriana, *Komagataeibacter xylinus*, optimización estadística, producción sostenible, biopolímeros

## ABSTRACT

Bacterial cellulose is a biopolymer of great interest due to its unique properties, such as high purity, mechanical strength, and biocompatibility, making it a valuable material in various industries. The use of alternative substrates, such as agro-industrial residues, in its production helps reduce costs and improve the sustainability of the process.

The objective of this research was to optimize the cultivation time, ethanol concentration, and aqueous grape pomace extract concentration in the production of bacterial cellulose under static conditions using *Komagataeibacter xylinus*. The study was carried out using a central composite rotatable design, evaluating three independent variables: grape pomace extract concentration (% v/v), ethanol concentration (% v/v), and cultivation time (days). The response variables considered included cellulose production (g/L), productivity (g/L\*day), and substrate-to-product yield ( $\text{g product/g substrate}$ ).

The results showed a maximum production of 9.37 g/L of bacterial cellulose, with a productivity of 0.46 g/L\*day and a substrate-to-product yield of 0.94  $\text{g product/g substrate}$  under optimized conditions of 20.25 days of cultivation, 3.29% ethanol, and 38.56% aqueous grape pomace extract. Additionally, the results validated statistical optimization as an effective tool for maximizing production under static conditions. It was concluded that the use of aqueous grape pomace extract and ethanol in the culture medium represents a viable alternative for bacterial cellulose production.

Keywords: Bacterial cellulose, *Komagataeibacter xylinus*, statistical optimization, sustainable production, biopolymers

## I. INTRODUCCIÓN

La celulosa es uno de los biopolímeros más abundantes y renovables en la naturaleza, destaca por su creciente relevancia en diversas industrias debido a sus múltiples aplicaciones (Choi & Shin, 2020). Naturalmente presente en las paredes celulares vegetales junto a la lignina, hemicelulosa y pectina, la celulosa requiere métodos de extracción químicos y enzimáticos, los cuales suelen ser costosos y no siempre logran una recuperación completa (Naomi et al., 2020; O'Neill et al., 2022). Además, diversos microorganismos, principalmente bacterias, también pueden sintetizar celulosa, denominada en este caso celulosa bacteriana (BC) (Lahiri et al., 2021).

La celulosa bacteriana (BC) se excreta en forma de microfibras que forman membranas de espesor variable en el medio de cultivo (Chávez-Pacheco et al., 2004). La BC posee propiedades como resistencia a la tracción, alta cristalinidad, gran absorción, maleabilidad y biocompatibilidad, cualidades que la convierten en un biomaterial ideal para aplicaciones en la industria biomédica, ambiental, alimentaria, textil y cosmética (Atta et al., 2021; Choi et al., 2022; Rachtanapun et al., 2021).

El género *Komagataeibacter* se destaca entre las bacterias productoras de celulosa por su alta capacidad para generar grandes cantidades de este polímero (Barud et al., 2016). Por ejemplo, se han reportado producciones de 7.5 g/L y 8.45 g/L en cultivos estáticos (Rodrigues et al., 2019; Yilmaz & Goksungur, 2024).

Además, la composición del medio de cultivo juega un papel clave, ya que la producción depende directamente de la cantidad de azúcares presentes. De hecho, se ha observado que las mayores producciones de celulosa coinciden con el consumo de hasta el 87% de los azúcares iniciales (Rodrigues et al., 2019). Por último, *Komagataeibacter xylinus* fue originalmente descrita por Brown (1886) como *Acetobacter xylinum* durante su investigación de bacterias productoras de celulosa. Posteriormente, esta especie fue

reclasificada como *Gluconacetobacter xylinus* (Liu et al., 2018). Recientemente, Yamada et al., (2012) identificaron nuevos genes de *Komagataeibacter* con 12 combinaciones basadas en sus características taxonómicas, lo que llevó a la reclasificación de *Gluconacetobacter xylinus* como *Komagataeibacter xylinus*.

Además de un modelo bacteriano eficiente, la biosíntesis del biopolímero depende de la composición del medio. Asimismo, alcanzar una alta productividad exige concentraciones elevadas de nutrientes, principalmente fuentes de carbono, lo cual incrementa el costo del proceso (Fernandes et al., 2020). En la producción de BC, la mayor inversión se destina al medio de cultivo, que representa entre el 30% y el 60% del costo total de producción, restringiendo la comercialización del biopolímero (Raiszadeh-Jahromi et al., 2020).

Asimismo, la adición de etanol al medio de cultivo en la producción de celulosa bacteriana se ha demostrado como una estrategia efectiva para mejorar significativamente el rendimiento de este biopolímero. Estudios como el de Sharma et al. (2024), evidenciaron un incremento en la producción de celulosa de 0.73 g a 3.7 g de peso seco utilizando etanol como aditivo. Este efecto se debe a que el etanol actúa tanto como fuente de energía alternativa como inductor metabólico, promoviendo la formación de UDP-glucosa y reprimiendo la glucólisis, lo que redirige el metabolismo hacia la biosíntesis de celulosa en lugar de la adquisición de energía (Rezazadeh et al., 2020; Ryngajllo et al., 2019).

El uso de residuos agrícolas, ricos en azúcares fermentables, es una alternativa prometedora para reducir los costos de producción y mejorar la viabilidad económica del proceso (Carreira et al., 2011), y el etanol, como inductor metabólico, aumenta el rendimiento de producción (Ryngajllo et al., 2019), ambos factores resultan prometedores para optimizar el bioprocreso.

Estudios han evaluado la optimización de parámetros en la producción de BC, destacando el uso de residuos agrícolas frutales como fuente de carbono y tiempo de cultivo, tal es el caso de Khan et al. (2021), quienes utilizaron un extracto de cáscaras de piña como fuente carbonada, y evaluaron la concentración del extracto junto con el tiempo de cultivo como factores importantes de la producción de BC. Del mismo modo, Barshan et al. (2019), evaluaron la vinaza, un subproducto de la industria vinícola, como fuente de carbono y el tiempo de cultivo en la producción de BC, ambas variables determinantes para la producción, y logran la optimización del bioproceso.

Además, se ha estudiado el uso de etanol como inductor analizando el comportamiento de la cepa bacteriana productora a nivel transcripcional (Ryngajllo et al., 2019), y en diferentes concentraciones para evaluar qué tanto puede aumentar la producción de celulosa (Cielecka et al., 2021a). Aún con la información disponible por las recientes investigaciones solo se registra el trabajo de Calderón Toledo (2022) que evalúa las tres variables presentes en el estudio, una fuente de carbono alterna como es extracto de mango, la concentración de etanol como inductor de la producción de celulosa, y el tiempo de cultivo como variable determinante del proceso. Sin embargo, no se ha registrado un estudio evaluando el potencial del extracto acuoso de orujo de uva como fuente de carbono en combinación con etanol como inductor y el tiempo de cultivo como variable clave del proceso.

La relevancia de las variables estudiadas radica en su impacto previamente reportado en la biosíntesis de celulosa bacteriana (CB) y en la viabilidad económica de su producción. El etanol ha demostrado mejorar significativamente la producción de CB al actuar como precursor metabólico (Cielecka et al., 2021b), mientras que el orujo de uva, por su riqueza en nutrientes esenciales, se presenta como un sustrato económico y sostenible (López-Astorga et al., 2023; Núñex Aravena, 2019). Este estudio se llevó a cabo bajo condiciones

de cultivo estático, una metodología que ofrece ventajas como simplicidad operativa y menor costo, siendo adecuada para aplicaciones industriales. Finalmente, se evaluó la influencia del tiempo de cultivo, la concentración de etanol y el extracto acuoso de orujo de uva en el rendimiento de CB utilizando cultivos estáticos de *Komagataeibacter xylinus*.

Este estudio tuvo como objetivo optimizar las condiciones de cultivo para maximizar la producción de BC mediante un diseño experimental de superficie de respuesta (RSM). Al establecer la combinación óptima de tiempo de cultivo, concentración de etanol y extracto de orujo de uva, no solo se mejoró la eficiencia del proceso, sino también se validó un enfoque de viabilidad y aprovechamiento de residuos agroindustriales.

Por tanto, este estudio amplió el conocimiento sobre la producción de BC en condiciones estáticas y propone una metodología viable para la integración de desechos agroindustriales en procesos biotecnológicos sostenibles.

### **1.1. Problema de investigación**

¿Cuáles son los valores óptimos del tiempo de cultivo, concentración de etanol y extracto acuoso de orujo de uva que maximizan la producción de celulosa bacteriana en cultivo estático de *Komagataeibacter xylinus*?

### **1.2. Objetivos**

#### ***1.2.1. Objetivo general***

Determinar los valores óptimos del tiempo de cultivo, concentración de etanol y extracto acuoso de orujo de uva que maximizan la producción de celulosa bacteriana en cultivo estático de *Komagataeibacter xylinus* NRRL B-758.

#### ***1.2.2. Objetivos específicos***

- Realizar la caracterización fisicoquímica del extracto acuoso de orujo de uva.

- Evaluar la cinética de formación de biomasa, consumo de sustrato y producción de celulosa bacteriana por *K. xylinus* en cultivo estático en matraces a nivel de laboratorio, utilizando medio comercial Hestrin-Schramm, evaluando los parámetros cada 24 horas, y determinando el parámetro cinético de crecimiento ( $\mu$ ).
- Evaluar el efecto del tiempo de cultivo (días), concentración de etanol (% v/v) y extracto acuoso de orujo de uva (% v/v) en la producción de celulosa bacteriana por *Komagataeibacter xylinus* en cultivo estático a nivel de laboratorio.
- Determinar la producción de celulosa (g/L), el coeficiente de rendimiento de sustrato en producto ( $Y_{P/S}$ ), y la productividad volumétrica de la celulosa ( $Q_P$ ) en las corridas que indican la matriz de diseño experimental.
- Determinar los valores óptimos de las variables para maximizar la producción de celulosa mediante la Metodología de Superficie de Respuesta.
- Validar el óptimo estadístico experimentalmente en cultivo estático.
- Ajustar los resultados obtenidos a modelos matemáticos.

### **1.3. Hipótesis**

Los niveles de tiempo de cultivo, concentración de etanol y extracto acuoso de orujo de uva, determinados mediante la metodología de superficie de respuesta, para optimizar la producción de celulosa bacteriana por *Komagataeibacter xylinus* NRRL B-758 en condiciones estáticas, serán 20 días, 3.0% (v/v) y 35% (v/v), respectivamente.

### **1.4. Justificación e importancia**

La producción de celulosa bacteriana (CB), generada por bacterias como *Komagataeibacter xylinus*, destaca por su biocompatibilidad, resistencia y capacidad de absorción, cualidades esenciales para su aplicación en sectores como el biomédico, textil y alimentario. Sin embargo, su producción enfrenta un desafío económico significativo,

ya que los nutrientes del medio de cultivo pueden representar hasta el 60% del costo total, limitando su uso comercial y su integración en la economía circular. El orujo de uva, un subproducto agroindustrial generado en grandes cantidades durante la producción de vino, representa un problema ambiental debido a su disposición inadecuada, que puede causar contaminación del suelo y del agua. No obstante, este residuo tiene el potencial de convertirse en una fuente de carbono renovable, rica en nutrientes, que podría ser aprovechada para la producción de CB, disminuyendo así los costos de producción y ofreciendo una solución más sostenible. Por otro lado, el etanol ha demostrado ser un inductor eficaz en la síntesis de CB, pero su efectividad depende de optimizar tanto su concentración como el tiempo de cultivo. Estas variables son clave, ya que el tiempo de cultivo influye directamente en la actividad metabólica del microorganismo y en el rendimiento del proceso. En este contexto, esta investigación busca maximizar la producción de CB mediante un diseño experimental de superficie de respuesta (RSM), explorando la combinación óptima de tiempo de cultivo, concentración de etanol y extracto acuoso de orujo de uva. Este enfoque contribuye al desarrollo de un proceso más rentable y sostenible en cultivos estáticos de *K. xylinus*.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

La presente investigación busca la optimización de la producción de celulosa bacteriana a partir del orujo de uva, como un sustrato de bajo costo; el etanol, como inductor de la producción de celulosa, y el tiempo, que es un parámetro que influye en la producción. En este contexto, diversos autores han realizado múltiples investigaciones sobre estas variables, entre ellas se encuentran investigaciones nacionales como la presentada por Cruz Zúñiga (2015), propuso el aislamiento y caracterización bioquímica de 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, utilizando un diseño factorial, el autor determinó la mayor cepa productora de celulosa y comparó la producción en medio comercial Hestrin-Schramm y el medio alternativo formulado con desecho de piña. Se obtuvo una producción de 7.58 g/L de celulosa bacteriana de la cepa denominada VM, y la cepa denominada K, produjo 8.74 g/L de celulosa, ambas producciones se realizaron en medio alternativo de piña en cultivo estático por 10 días. Asimismo, Quiñones (2021), planteó obtener celulosa bacteriana por *Komagataeibacter xylinus* a partir de residuos hidrolizados de brácteas de alcachofa y peladilla de espárrago, usando un diseño factorial comparó la producción de celulosa usando medio de cultivo de residuo hidrolizado de brácteas de alcachofa y residuo hidrolizado de peladilla de espárrago, además, evaluó el tiempo de cultivo como variable influyente. Se logró obtener 1,73 g/L de celulosa en 21 días de cultivo estático a partir de peladilla de espárrago que inicialmente tuvo 13.53 g/L de azúcares reductores. Del mismo modo, Quiñones-Cerna et al. (2024), ahondaron en la investigación buscando evaluar la producción de celulosa bacteriana a partir residuos de cáscara de espárrago por *Komagataeibacter rhaeticus* QK23, estudió diferentes dosis de inóculo y tiempo de incubación, utilizando la

metodología de superficie de respuesta para determinar dosis de inóculo y tiempo de incubación en valores óptimos para la producción de celulosa a partir de residuos de cáscara de espárrago. Se obtuvo como resultado una producción de 2,57 g/L en una producción que tuvo un inóculo inicial del 10.5% del volumen de reacción, y en un tiempo de incubación de 25 días.

Calderón Toledo (2022), realizó un trabajo de optimización de la producción de celulosa bacteriana por *Komagataeibacter* sp. SU12 utilizando extracto de *Mangifera indica* como medio de cultivo, etanol como un aditivo en el medio y buscando el tiempo de fermentación óptimo. La optimización la logró utilizando un diseño Plackett Burman, y se determinó que los valores óptimos fueron 50% v/v de extracto de mango respecto al total del volumen de fermentación, 3% de etanol y un tiempo de fermentación de 21 días para alcanzar una producción de 25.34 g/L de celulosa bacteriana.

En el ámbito internacional se tienen investigaciones como la realizada por Barshan et al. (2019), quienes realizaron su investigación en la producción de celulosa bacteriana por *Komagataeibacter xylinus* PTCC 1734 a partir de vinaza como medio de cultivo de bajo costo, utilizaron un diseño compuesto central con diferentes concentraciones de vinaza y distintos niveles de tiempo de cultivo buscando los valores óptimos, determinaron que para la producción óptima de celulosa se utilizó 49% de vinaza en 10 días de cultivo.

Khan et al. (2021), investigaron la producción de celulosa sintetizada por *Komagataeibacter xylinus* IITR DKH20 influenciada por variables como concentración de extracto de cáscaras de piña y tiempo de incubación, mediante el diseño de Plackett-Burman de la metodología de superficie de respuesta, como resultado obtuvieron 11.44 g/L de celulosa bacteriana en medio de cultivo compuesto por el 70% de extracto de cáscara de piña en un cultivo estático durante 384 horas o 16 días.

Asimismo, Cazón et al. (2022), realizaron un estudio para evaluar la viabilidad de un medio de cultivo alternativo a base de orujo de uva o bagazo de vino y desechos de papa para la biosíntesis de celulosa bacteriana, mediante un diseño factorial se determinó que la producción máxima de celulosa bacteriana por *Komagataeibacter xylinus* se alcanzó en medio de cultivo de orujo de uva y residuos de papa hidrolizados, logrando una producción de 4.0 g/L de celulosa en 6 días de cultivo estático, siendo 5 veces superior a la producida en medio Hestrin-Schramm

Del mismo modo, Mardawati et al. (2023), evaluaron el potencial del núcleo de piña de los desechos industriales de enlatado, y el tiempo de cultivo en la producción de celulosa bacteriana, utilizaron un diseño factorial con diferentes concentraciones de azúcares presentes en el extracto de núcleo de piña y diferentes tiempos de cultivo. Se logró la mayor producción de 2.55 g/L de celulosa bacteriana con una concentración de 2.5 g/L de azúcares presentes en el medio de núcleo de piña en 15 días de cultivo estático.

Patel et al. (2024), evaluaron niveles de etanol y días de incubación para obtener una mayor producción de celulosa bacteriana a partir de *Komagataeibacter saccharivorans* APPK1 en cultivo estático. Utilizando el diseño de Plackett-Burman de la metodología de superficie de respuesta se determinó que la mayor producción (38 g/100 mL) se obtuvo con el medio de cultivo de cáscara de piña suplementado con 3 mL de etanol en 10.5 días de cultivo.

## **2.2. Marco conceptual**

### **2.2.1. Celulosa**

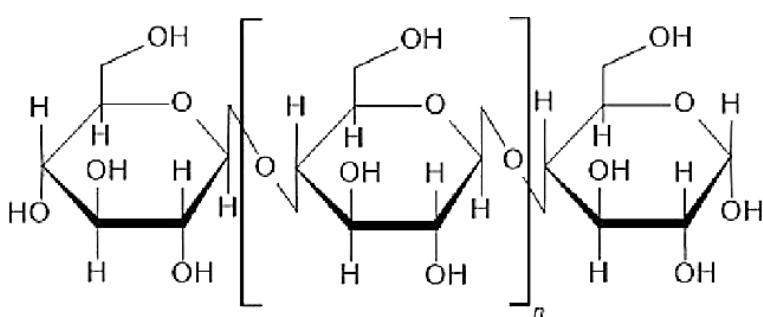
#### **2.2.1.1. Definición**

La celulosa es considerada uno de los compuestos orgánicos más abundantes en la tierra, ya que constituye aproximadamente el 40% de la materia vegetal, formando parte de la estructura celular junto con hemicelulosa, lignina, pectina y otras moléculas que se

adhieren entre sí (Elsayed et al., 2020), también es sintetizada por microorganismos, en su mayoría, bacterias (Blanco et al., 2021). Se trata de un biopolímero natural compuesto de moléculas de glucosa unidas en largas cadenas lineales, que, debido a sus propiedades físicas y mecánicas, tiene aplicaciones en sectores industriales, como la fabricación de papel, textiles, materiales de construcción y bioplásticos, además de su potencial en biotecnología (Aldosari et al., 2023; Naomi et al., 2020).

### 2.2.1.2. Estructura

La celulosa está compuesta por unidades de celobiosa (disacárido de glucosa) enlazadas a través de enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 (Lebrilla et al., 2022). Este polímero cuenta con un grupo terminal que presenta un extremo reductor y otro no reductor (Thomas et al., 2018). Su fórmula molecular es  $(C_6H_{10}O_5)_n$  (ver Figura 1). Además de las plantas, la celulosa puede obtenerse de organismos de los reinos fungí, monera, animal y de ciertas especies bacteriana (Heinze, 2016; Molina-Ramírez et al., 2017). La celulosa bacteriana destaca por su alta pureza, ya que no se encuentra unida a otras sustancias, y se produce como un metabolito extracelular insoluble, lo que facilita su extracción del medio de cultivo (Heinze, 2016; Yi et al., 2020).



**Figura 1. Estructura química de la celulosa.** (Molina & Flórez-Castillo, 2020)

### 2.2.1.3. Celulosa vegetal

La pared celular de las plantas se compone principalmente de celulosa, lignina, hemicelulosa y pectina, y en una menor proporción contiene proteínas, enzimas, fenoles de bajo peso molecular y minerales (O'Neill et al., 2022; Ye et al., 2020). La biomasa

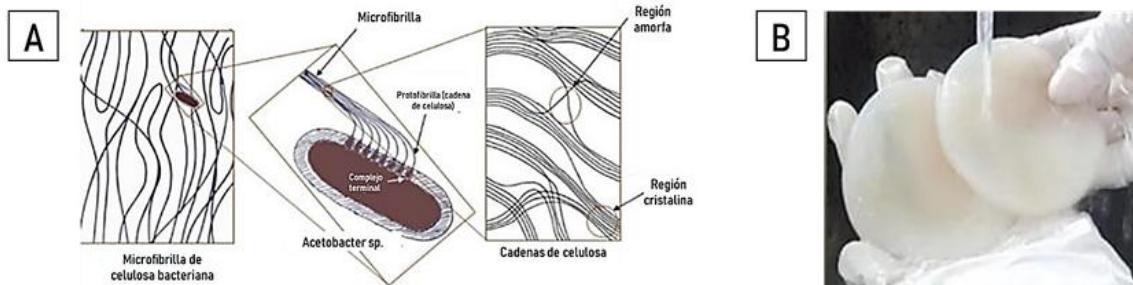
vegetal se compone de aproximadamente el 45% de moléculas de celulosa, las cuales se encuentran unidas por enlaces de hidrógeno intermoleculares en estado nativo (Anwar et al., 2014). La presencia de celulosa en la pared celular vegetal permite la restricción de la presión de turgencia, protección contra patógenos y herbívoros, y cohesión estructural, lo que permite que la planta mantenga una interfaz adhesiva entre las células (Pedersen et al., 2023).

En las plantas, las características de la celulosa y la proporción de ella, presente en la estructura vegetal, se encuentran estrictamente reguladas. La variabilidad en el contenido de celulosa depende el tipo de célula vegetal, así como la etapa de desarrollo en la cual se encuentra el vegetal (Li et al., 2014). La extracción de celulosa vegetal requiere de procedimientos químicos de purificación, cuyo objetivo es eliminar la hemicelulosa, la lignina y otros compuestos adheridos a la celulosa en las células vegetales (Naomi et al., 2020). Estos procedimientos requieren del uso de sustancias químicas como el tolueno, etanol, peróxido de hidrógeno, óxido de titanio, ácido sulfúrico, etc., y requieren de temperaturas de hasta 250°C (Gupta et al., 2019). Asimismo, se ha reportado la utilización de líquidos iónicos y disolventes eutécticos (Verdía Barbará et al., 2023), así como métodos biológicos con microorganismos conocidos como biodesignificación (Anwar et al., 2014).

#### **2.2.1.4. Celulosa bacteriana**

La celulosa bacteriana o BC (Bacterial Cellulose), es producida por bacterias, especialmente por el género *Komagataeibacter* (Barud et al., 2016). Formada por cadenas de moléculas de β-D glucosa unidas por enlaces β (1→4)-O-glucosídico, se forma como microfibrillas, las cuales presentan una región amorfa y una región cristalina (Figura 2 (A)). Las microfibrillas fortalecen la pared celular, favorecen la retención de agua y biocompatibilidad (Mishra et al., 2018). Asimismo, el tamaño y forma de la celulosa

bacteriana depende de la cepa productora, tiempo de cultivo, la forma del reactor y tipo de fermentación, y en condiciones estáticas tiene una apariencia de cinta transparente gelatinosa (Figura 2 (B)) (Aditya et al., 2022).



**Figura 2. Celulosa bacteriana (BC).** (A) Región cristalina y amorfa (Adaptada de Aditya et al., 2022). (B) Vista macroscópica (Costa et al., 2017).

La BC es libre de componentes simbióticos, a diferencia de la celulosa vegetal que se encuentra adherida a hemicelulosa, lignina y pectina (Naomi et al., 2020). Al formarse la celulosa en la interfaz líquido-aire del fermentador se pueden adherir células bacterianas, nutrientes residuales del medio y subproductos metabólicos de las células, sin embargo, estos componentes son fácilmente removidos obteniendo un biopolímero puro (Chávez-Pacheco et al., 2004).

La celulosa producida por fermentación bacteriana generalmente presenta un grado de polimerización más alto a comparación de la celulosa vegetal (Lahiri et al., 2021; Peng et al., 2020), esta, junto a otras propiedades y características del biopolímero dependen de la cepa bacteriana y de factores propios del bioproceso. La cristalinidad es otra característica que varía entre la BC y la celulosa vegetal, llegando hasta 90% en la BC (Nie et al., 2022) y sin superar 77% en la celulosa vegetal (Aldosari et al., 2023). Asimismo, la porosidad, llega hasta un 60% en la BC presentando uniformidad en la distribución y tamaño de poros (Pereira et al., 2020), mientras que, en la celulosa vegetal no supera el 24% debido al poco espacio entre fibrillas de celulosa incrustada entre otros componentes (Andy Huatatoca, 2020).

#### **2.2.1.5. Aplicaciones Industriales de la celulosa bacteriana**

La BC tiene el estatus GRAS (generalmente reconocido como seguro) emitido por la FDA desde el año 1992, desde entonces se ha involucrado el uso del compuesto en diversos papeles dentro de la industria alimentaria (Shi et al., 2014). Un uso muy prometedor de ello es como suplemento de fibra dietética, Zhai et al. (2018), descubrieron que la BC, empleada como suplemento de fibra dietética, logró reducir la obesidad inducida por una dieta rica en grasas en ratones. Esto se logra mediante la disminución de la resistencia a la insulina, la protección contra el daño hepático y la reducción de la inflamación, además de mejorar el sistema antioxidante y regular la secreción de adipocitoquinas y proteínas relacionadas con la formación de tejido adiposo.

Además, la BC es la base de alimentos tradicionales, uno de ellos es la nata de coco, se trata de celulosa formada en la fermentación del agua de coco, un postre muy popular en China y el sudeste asiático por su agradable sabor, alto contenido de fibra y bajas calorías (Qin et al., 2024). Otro producto es la kombucha, una bebida que resulta de la fermentación del té endulzado, la fermentación del té es producto de una comunidad simbiótica de bacterias y levaduras (SCOBY) que se encuentran instaladas en una película de celulosa (Coelho et al., 2020). También la BC se emplea como aditivo alimentario funcional, como un agente espesante y estabilizador, estos aditivos patentados por CPKelco, San-Ei Gen y Kusano Sakko han tenido gran éxito en el mercado mundial (Zhong, 2020).

También se considera un compuesto importante en la industria cosmética actual debido a que la celulosa logra reemplazar las materias primas derivadas del petróleo que han mostrado propiedades tóxicas en pieles sensibles, y, además, su obtención causa un impacto negativo en el ecosistema (Oliveira et al., 2022). La BC actúa como un sistema de suministro de nutrientes y compuestos beneficiosos para la piel, debido a su alta

capacidad de adherencia y absorción de agua (Almeida et al., 2021). Se ha utilizado para la administración de vitamina B (Chantereau et al., 2020), y administración de antioxidantes provenientes de *Epilobio angustifolium*, mostrando resultados satisfactorios y casi nula citotoxicidad (Nowak et al., 2021).

El mismo biopolímero en sí ha demostrado beneficiar la textura de la piel, (Perugini et al., 2020) aplicaron mascarillas de BC durante un mes, el resultado fue la mejora de la firmeza y elasticidad de la piel. Estas propiedades de hidratación junto con la administración de compuestos beneficiosos para la regeneración de la piel han demostrado resultados eficientes, desarrollándose así parches de BC cargados de ácido hialurónico que demostraron resultados satisfactorios (Fonseca et al., 2021).

En la misma línea de la administración de compuestos, la industria biomédica ha utilizado la BC para la administración de medicamentos tópicos y agentes bioactivos, esta aplicación se dio cargando membranas de BC con antibióticos y antiinflamatorios para el cuidado de heridas y tratamientos postoperatorios (Maver et al., 2020; Ossowicz-rupniewska et al., 2021). Una aplicación más avanzada de la BC en la industria biomédica es la regeneración de tejido óseo, se trata de utilizar la BC como soporte junto a otros compuestos que sirven de material para impresión 3D, material aceptable debido a la biocompatibilidad que presenta la BC (Aki et al., 2020; Bayir et al., 2019); las mismas propiedades descritas son la base para la aplicación de utilizar la BC para injertos vasculares (Hobzova et al., 2018), desarrollo de vasos sanguíneos artificiales (Ma et al., 2022), regeneración de órganos (Gonçalves et al., 2016) y córneas artificiales (Jia et al., 2018).

Dentro de la industria de materiales electrónicos, la BC ha demostrado potencial en la mejora de materiales de interferencia electromagnética al desarrollar compuestos de BC magnetizada (Da et al., 2023), además se ha demostrado que la misma película de BC sin

adicción de compuestos metálicos puede servir como diodos flexibles orgánicos emisores de luz (Rahmadiawan et al., 2023). En la industria ambiental, se ha estudiado el potencial de la BC como soporte de portadores de afinidad para la eliminación de estradiol, eliminación de *Escherichia coli* presente en aguas residuales mediante biofiltros de celulosa bacteriana modificada, hidrogel de BC como floculante (Koç et al., 2023; Rini et al., 2023).

### **2.2.2. *Bacterias productoras de celulosa***

Las bacterias productoras de celulosa son aeróbicas y no patógenas pertenecientes a géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Sarcina* y *Komagataeibacter* que requieren una fuente de carbono, generalmente azúcares, para la acumulación de celulosa (Choi et al., 2022; Faria et al., 2022; Kadier et al., 2021), siendo las bacterias del género *Komagataeibacter* las que han obtenido resultados más satisfactorios (Barud et al., 2016; Fernandes et al., 2020).

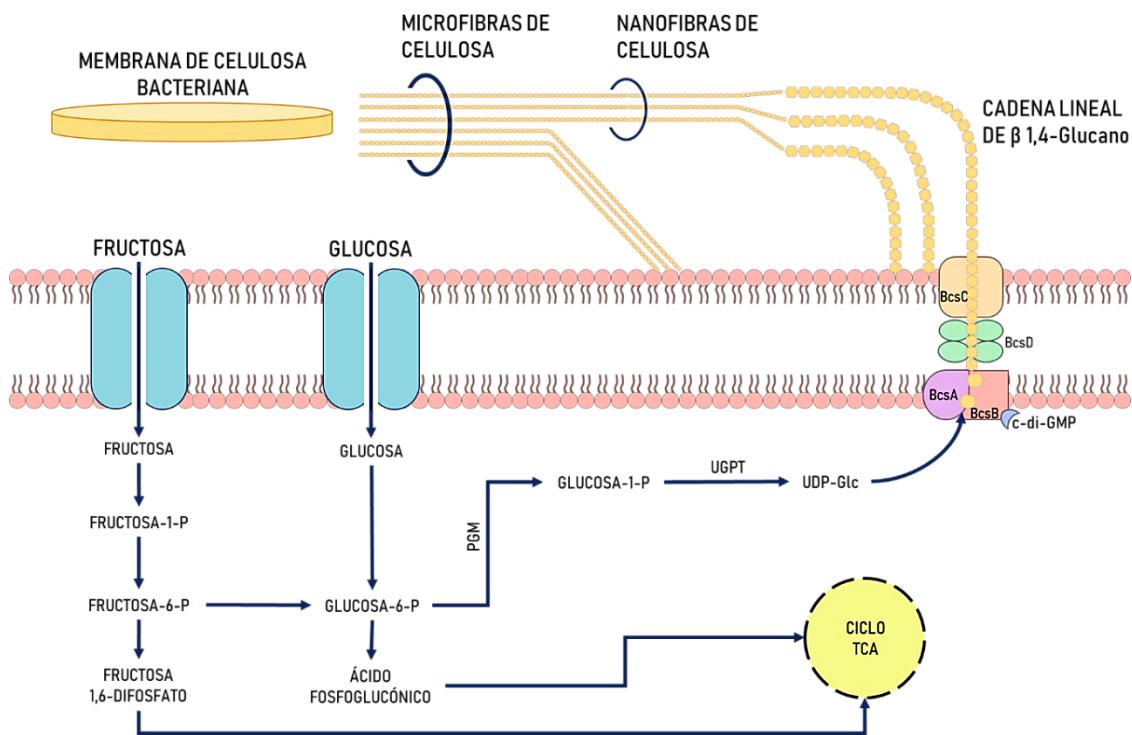
La BC producida en los cultivos bacterianos cumple la función de proteger a las células. En el caso de las bacterias del ácido acético que producen ácidos que disminuyen el pH del medio que llega a inhibir su crecimiento, la BC debilita el efecto de reducción de pH por los ácidos orgánicos alargando la vida de las bacterias (Nascimento et al., 2021). Asimismo, en aquellas bacterias que crecen en la superficie de frutas expuestas al sol, las membranas de celulosa producida las protegen de los rayos UV y promueven su crecimiento (Li et al., 2022).

La biosíntesis de celulosa inicia en el interior de las células bacterianas generando moléculas de β-D-glucosa. Estas moléculas se van uniendo por enlaces β(1→4)-O-glucosídicos, y de este modo se forman cadenas de β-1,4-glucano, las cuales se exportan de la célula a través de poros de membrana. Las cadenas de β-1,4-glucano se unen en el exterior de la célula formando nanofibras de celulosa con un diámetro aproximado de 2 a

4 nanómetros. Al unirse las nanofibras formadas se ensamblan microfibras de celulosa que poseen diámetros de aproximadamente 80 nanómetros, al seguir la producción bacteriana de celulosa se llega a formar la membrana o película que consiste en una red tridimensional en la superficie del medio de cultivo (Moniri et al., 2017; Popa et al., 2022).

La producción y transporte de celulosa a través de la membrana se logra debido al complejo celulosa sintasa, un complejo proteico multicomponente que consta de cuatro subunidades, BcsA, BcsB, BcsC y BcsD. Las subunidades BcsA y BcsB se encuentran entre la membrana plasmática interna y el periplasma celular, al unirse con el activador monofosfato de diguanosina cíclico (c-di-GMP), regulador alostérico positivo, estas subunidades polimerizan cadenas de  $\beta$ -1,4-glucano. BcsC se encarga de la formación de poros en la membrana celular externa para expeler las cadenas de  $\beta$ -1,4-glucano que formarán la celulosa, mientras que BcsD se encarga de expulsar las cadenas de  $\beta$ -1,4-glucano (Blanco et al., 2021; Lustri et al., 2015; Nascimento et al., 2021; Ramírez-Mata et al., 2014).

Al interior de la célula bacteriana, la celulosa se sintetiza implicando actividad catalítica de diferentes enzimas, tales como la enzima glucoquinasa, que cataliza la conversión de glucosa en glucosa-6-fosfato (Glucosa-6-P) y la enzima fosfoglucomutasa que cataliza la conversión de glucosa-6-fosfato (Glucosa-6-P) en glucosa-1-fosfato (Glucosa-1-P). La siguiente reacción es la conversión de glucosa-1-fosfato (Glucosa-1-P) en uridina difosfato glucosa (UDP-glc) que se lleva a cabo por la enzima UDP-glucosa pirofosforilasa (UGPT). La UDP-glc es el precursor directo de la celulosa, se sintetiza por el complejo celulosa sintasa que se activa por la presencia de c-di-GMP como se mencionó anteriormente (Moniri et al., 2017; Singhania et al., 2021; Swingler et al., 2021).

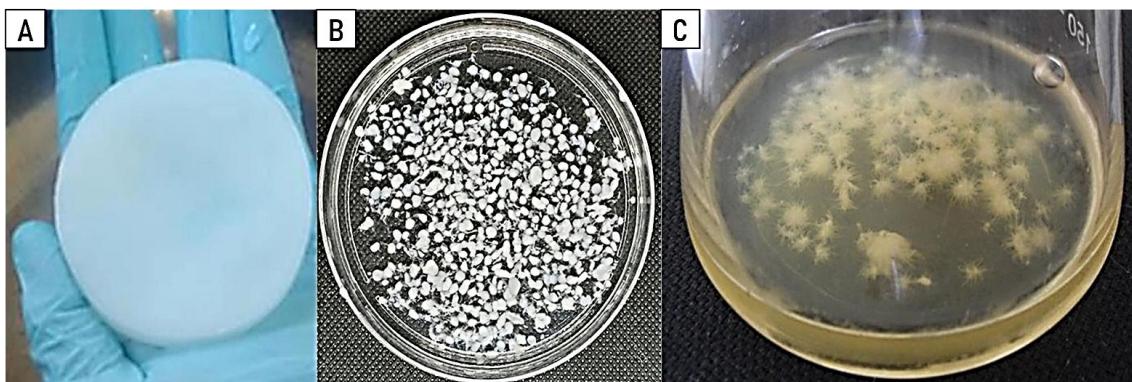


**Figura 3. Esquema de la biosíntesis de celulosa bacteriana.**

#### 2.2.2.1. Factores que influyen en la producción

Para la producción de BC se emplean dos métodos de fermentación, la fermentación en condiciones estáticas y en condiciones agitadas. La fermentación en condiciones estáticas produce celulosa en forma de membrana o hidrogel formada en la interfaz líquido-aire del reactor, mientras que en condiciones agitadas se obtienen pellets de forma y tamaño irregular que varían de acuerdo con la velocidad de agitación del cultivo (Wang et al., 2019).

Generalmente, los cultivos estáticos, se llevan a cabo en períodos de 5 a 21 días llegando a superar los 13 g/L de BC (Machado et al., 2018; Saavedra-Sanabria et al., 2021; Soemphol et al., 2018). Mientras que, los cultivos agitados se desarrollan en períodos de 3 y 16 días y su rendimiento no supera los 7 g/L (Akintunde et al., 2022; Andritsou et al., 2018; Ye et al., 2019).



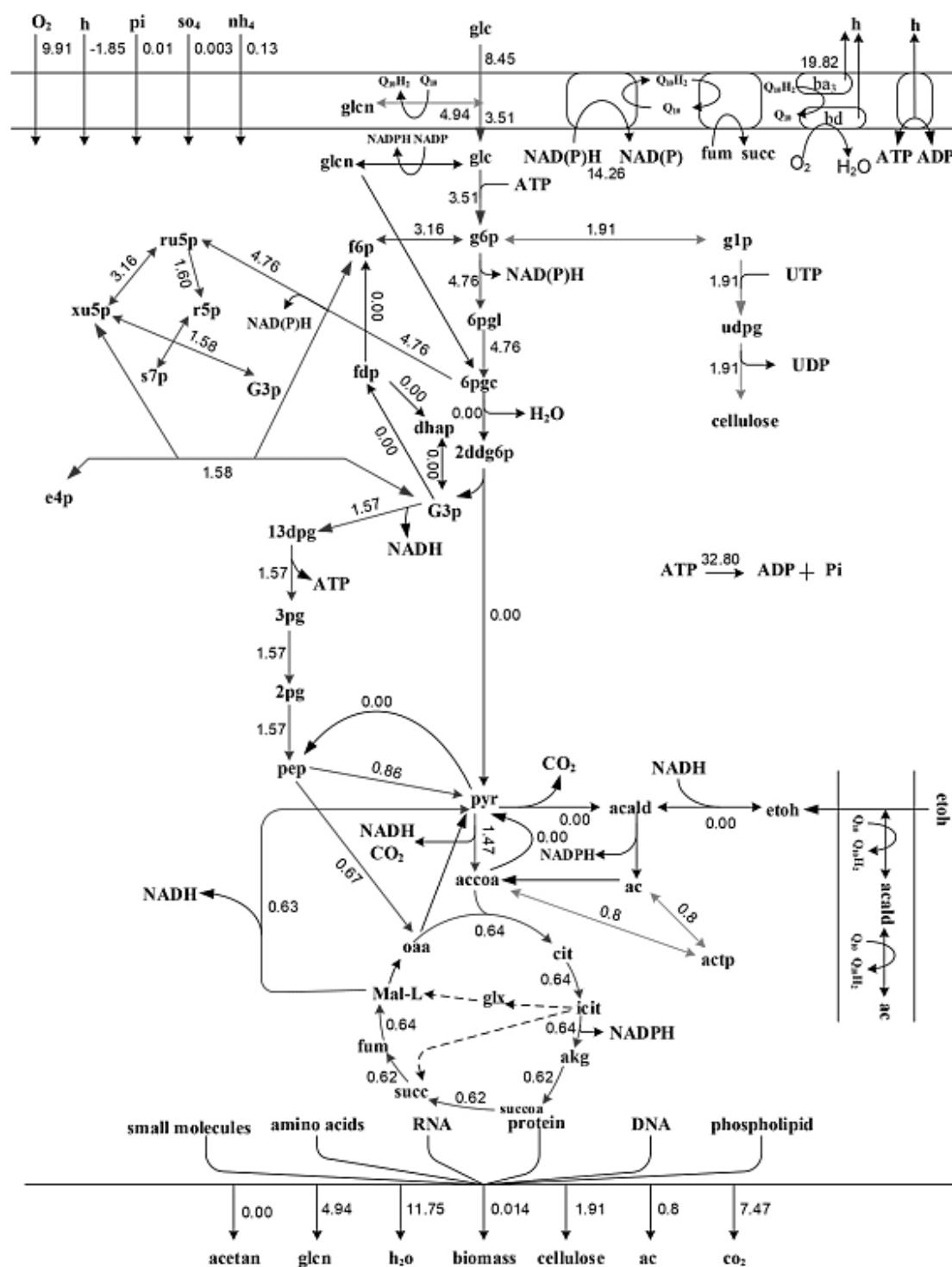
**Figura 4. Celulosa en condiciones estáticas y agitadas.** (A) BC obtenida en condiciones estáticas (Costa et al., 2017), (B, C) BC obtenida en condiciones agitadas (Revin et al., 2018; Zhong, 2020).

Además del microorganismo productor y los métodos de fermentación, existen diversos factores que influyen en el rendimiento de la producción de celulosa bacteriana. Las cepas del género *Komagataeibacter* producen ácido glucónico y/o ácido acético, dependiendo de la fuente carbonada presente en el medio de cultivo, como subproductos de la producción de celulosa, estos en el medio disminuyen el pH y como resultado se han evidenciado rendimientos de producción bajos (Fernandes et al., 2020; Li et al., 2021). Hutchens et al. (2007), estudiaron la influencia de diferentes factores en la producción de celulosa bacteriana en cultivo estático, se concluyó que el pH por sí solo no afecta significativamente la producción, sin embargo, la interacción del pH con la fuente de carbono influye en los rendimientos de producción, esto se evidenció también en el trabajo realizado por Ye et al. (2019).

Asimismo, se ha demostrado que la adición de etanol al medio de cultivo en la producción de celulosa bacteriana mejora significativamente el rendimiento de la celulosa bacteriana. Esto se evidencia en trabajos como el de Sharma et al. (2024), quienes adicionaron etanol en el medio de cultivo en la producción de celulosa bacteriana por *Gluconacetobacter kombuchae*, y lograron aumentar la producción de celulosa de 0.73 g a 3.7 g de peso seco.

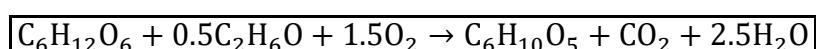
Del mismo modo Mohammad et al. (2021), determinaron que al utilizar etanol como aditivo en el medio de cultivo, aumentó la producción de celulosa en un 115% en comparación con la producción de celulosa en el medio Hestrin-Schramm estándar. El etanol actúa como una fuente de energía alternativa e inductor metabólico que induce genes relacionados con la formación de UDP-glucosa y reprime los genes relacionados con la glucólisis, dirigiendo así la glucosa hacia la biosíntesis de la celulosa (Ryngajllo et al., 2019), es decir, redirige el metabolismo hacia la biosíntesis de la celulosa en lugar de hacia la adquisición de energía.

La figura 5 muestra el diagrama de flujo metabólico de *Komagataeibacter xylinus* durante la producción de celulosa bacteriana en condiciones de cultivo estático. Se destacan las principales vías metabólicas involucradas, como la glucólisis, la vía de las pentosas fosfato (PPP), el ciclo de Krebs y las reacciones asociadas al metabolismo del etanol. El etanol es convertido en acetaldehído y luego en acetato, actuando como una fuente de energía alternativa que redirige el metabolismo hacia la síntesis de celulosa. Además, se muestran los balances de NADH, NADPH y ATP, junto con los precursores claves como UDP-glucosa, necesarios para la biosíntesis de celulosa. También se indica la distribución de los flujos hacia la formación de biomasa, celulosa y otros productos secundarios como el acetato y el dióxido de carbono (Rezazadeh et al., 2020).



**Figura 5. Diagrama de flujo metabólico de la producción de celulosa bacteriana por *Komagataeibacter xylinus* (Rezazadeh et al., 2020).**

A partir de los datos observados, se planteó la ecuación estequiométrica del bioproceso:



Donde se observan los elementos de entrada: Glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ), etanol ( $C_2H_6O$ ) y oxígeno ( $O_2$ ); asimismo los productos de la reacción: dióxido de carbono ( $CO_2$ ), celulosa ( $C_6H_{10}O_5$ ), y agua ( $H_2O$ ). A partir de la ecuación estequiométrica se realizó el cálculo del coeficiente estequiométrico de rendimiento teórico de sustrato en producto ( $Y_{P/S}$ ), obteniendo un rendimiento de 0.9 g/g.

El tiempo de cultivo y temperatura también se consideran factores ambientales que afectan la producción de celulosa, inicialmente se determinó que la temperatura óptima para la producción de celulosa bacteriana se encontraba entre los 20°C y 30°C (Teoh et al., 2004), sin embargo, en un estudio realizado por Aswini et al. (2020), donde se evaluaron diferentes factores en la producción de BC con la cepa *A. senegalensis* se alcanzó con 37°C una producción de BC de aproximadamente el 200% en comparación con temperaturas entre los 25 y 30°C, la temperatura influye directamente en la célula debido a que una temperatura superior a la temperatura máxima de incubación bacteriana puede provocar una desnaturización de ácidos nucleicos y proteínas necesarias para el metabolismo . Respecto al tiempo, AL-Kalifawi & Hassan (2014) concluyeron que entre los días 17 y 18 se agota por completo la fuente de carbono, sin embargo en múltiples trabajos se ha evidenciado que el tiempo de cultivo va a depender de la fuente de carbono, la afinidad de la bacteria hacia el sustrato disponible en el medio y la disponibilidad de oxígeno, teniendo tiempo de cultivo que varía desde los 5 hasta los 21 días (Güzel & Akpinar, 2019; Machado et al., 2018; Rodrigues et al., 2019; Saavedra-Sanabria et al., 2021).

#### **2.2.2.2. *Komagataeibacter xylinus***

Nombre y clasificación taxonómica

Dominio : Bacteria

Familia : *Acetobacteraceae*

Género : *Komagataeibacter*  
Especie : *Komagataeibacter xylinus*  
Nombre científico : *Komagataeibacter xylinus* (Brown  
completo (PNU) 1886) Yamada et al. 2013  
  
Sinónimos : *Komagatabacter xylinus*,  
*Acetobacter xylinus*,  
*Bacterium xylinum*,  
*Acetobacter aceti* subsp. *xylinum*,  
*Gluconoacetobacter xylinus*,  
*Gluconacetobacter xylinus*

Fuente: Reimer et al., 2022.

*Komagataeibacter xylinus* fue descrita por primera vez por Brown (1886), quien se dedicó a la búsqueda de cepas bacterianas productoras de celulosa y la describió como *Acetobacter xylinum*, años más adelante esta bacteria sería reconocida como *Gluconacetobacter xylinus* (Liu et al., 2018), y posteriormente Yamada et al., (2012) descubrió nuevos genes de *Komagataeibacter* con 12 combinaciones en base a sus características taxonómicas, clasificando a *Gluconacetobacter xylinus* como *Komagataeibacter xylinus*.

*K. xylinus* es una bacteria aeróbica, gran-negativa, no patógena, en forma de bastoncillos que puede crecer en el suelo, agua, flores, miel, frutas y verduras podridas, y otras fuentes que contengan azúcares fermentables (Raiszadeh-Jahromi et al., 2020). Esta especie tiene gran capacidad de producir altas cantidades de BC a partir de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno en medio líquido (Liu et al., 2018), esto debido a que una sola bacteria es capaz de polimerizar 200,000 moléculas de glucosa en cadenas de β-1,4

glucanos, mientras organiza las cadenas de polímeros en nanofibras de celulosa en tan solo un segundo (Zhong, 2020).

*Komagataeibacter xylinus* produce celulosa como un mecanismo de supervivencia debido a que es aerobia estricta, y la formación de una membrana de celulosa le permite la retención de células cercanas a la interfaz aire-líquido donde la concentración de oxígeno es alta y existe acceso a los nutrientes del medio, esto se puede observar claramente en los cultivos estáticos (Ryngajllo et al., 2020), además, la celulosa también le confiere protección frente al acceso de bacterias competidoras, los rayos UV y ambientes no propicios (Rezazadeh et al., 2020).

### **2.2.3. Residuos y subproductos agroindustriales**

En la industria agroindustrial solo entre el 9 y 30% de la materia prima es utilizada para la producción principal, obteniéndose un elevado porcentaje de material lignocelulósico cuya disposición final representa un reto tecnológica y ambiental (Grande Tovar, 2016; Morón Guillén & Zamora Fuentes, 2018). Los residuos generados en la agroindustria se componen de hojas, cáscaras, pulpas, semillas, raíces y tallos, y constituyen una valiosa fuente de azúcares fermentables, los cuales pueden utilizarse como fuentes de carbono y energía para procesos fermentativos (Montagner et al., 2022). Asimismo, cuentan con proteínas, fibras, antioxidantes vitaminas, minerales, polifenoles, etc., en cantidades significativas (Tomar et al., 2023). A partir de estos residuos ricos en diferentes compuestos se puede obtener una gran cantidad de productos, tales como la producción de etanol de segunda generación (Penalva Santos et al., 2023), la extracción de pectina (Sabater et al., 2022), producción de biogás (De Oliveira & Negro, 2019), producción de hidrocarburos (Alcazar-Ruiz et al., 2021), desarrollo de envases biodegradables (Fuentes et al., 2021), entre otros.

#### **2.2.4. Generalidades de la uva**

La uva (*Vitis vinifera*) es uno de los frutos más cultivados a nivel mundial y es fundamental en la industria agroalimentaria, especialmente para la producción de vino, jugos, pasas y otros productos derivados (Fernandes et al., 2013). Debido a su alto contenido en azúcares, vitaminas y antioxidantes, la uva es valorada tanto en la alimentación humana como en aplicaciones industriales (Esser et al., 2024). Esta fruta contiene diversos compuestos beneficiosos como antocianinas, taninos y ácidos fenólicos, los cuales han sido ampliamente estudiados por sus propiedades antioxidantes y sus posibles aplicaciones en la salud y la biotecnología (Pereira et al., 2020).

##### **2.2.4.1. Residuos derivados de la actividad industrial de la uva**

La industria vitivinícola genera una cantidad significativa de subproductos en cada etapa de su proceso productivo. La transformación de uva en vino resulta en la generación de diversos residuos sólidos y líquidos, cuya composición y cantidad varían según el proceso de vinificación empleado. En términos cuantitativos, por cada 100 kilogramos de uva procesada, se generan entre 20-25 kilogramos de residuos sólidos, distribuidos aproximadamente de la siguiente manera, orujo (55-65% del total de residuos): compuesto por hollejos, semillas y restos de pulpa, escobajos (15-20%): estructura leñosa del racimo, lías (15-20%): sedimentos de levaduras y otros materiales sólidos, Otros residuos (5-10%): incluyen materiales de filtración y lodos de clarificación (Amaya Chantaca et al., 2021; Bertran et al., 2004; Evtuguin et al., 2024). La valorización de estos residuos no solo contribuye a la sostenibilidad ambiental de la industria vitivinícola, sino que también representa una oportunidad para el desarrollo de bioprocessos de bajo costo (Evtuguin et al., 2024; Frincu et al., 2023).

#### **2.2.4.2. Características del orujo de uva**

El orujo de uva es el principal residuo sólido de las industrias vitivinícolas, se obtiene después que las uvas han sido prensadas para extraer el mosto (jugo de las uvas) durante la producción de vino o jugo, siendo compuesto de hollejos, semillas, restos de pulpa y, en algunos casos, tallos (Pereira et al., 2019), se ha demostrado que constituyen alrededor del 60% de los residuos generados en la vinificación y representan entre el 20 y 25% del peso inicial de las uvas utilizadas en la producción, las características físico-químicas del orujos de uva depende de la variedad de uva producido, tipo de vino producido y el proceso de elaboración (Gorostiza Sáez de Abad, 2022).

En un estudio realizado por Salgado-Ramos et al. (2023), se demostró la presencia de hexosas en el orujo de uva, principalmente glucosa, pero también se vio presencia de sacarosa y fructosa en menor concentración. Además, en la investigación realizada por Canalejo et al. (2022) se determinaron las concentraciones de azúcares principales en extractos de orujo de uva blanca y tinta como se observa en el Cuadro 1.

**Cuadro 1: Concentración de azúcares principales presentes en el orujo de uva blanca y orujo de uva tinta.**

Azúcares (mg carbohidratos/g de extracto)	Extracto de orujo de uva blanca	Extracto de orujo de uva tinta
Arabinosa	3.9	16.1
Ramnosa	2.4	9.9
Fructosa	0.14	0.65
Xilosa	1.1	6.3
Manosa	2.9	19.3
Galactosa	120.3	70.1
Glucosa	224.3	126.7

FUENTE: Adaptado de (Canalejo et al., 2022).

## **2.2.5. *Medios de cultivo para la producción de celulosa bacteriana***

### **2.2.5.1. *Medios de cultivo comerciales***

En la producción de BC, la elección del medio de cultivo es esencial debido a que la composición del medio, definirá el rendimiento de la producción (Hussain et al., 2019).

Comercialmente, existen medios de cultivo testeados en la producción de BC que generan altos rendimientos, puesto que contienen las cantidades necesarias de nutrientes para la síntesis de la BC. En el mercado se pueden encontrar medios como Hestrin-Schramm, Heo & Son, Souza. H&S alterado y H&S con ácido ascórbico que utilizan glucosa como fuente de carbono y energía llegando a tener 50 g/L de dicho compuesto (de Souza et al., 2019; Heo & Son, 2002; Hestrin & Schramm, 1954; Hussain et al., 2019; Keshk, 2014).

Sin embargo, los medios comerciales utilizados actualmente representan un inconveniente en la producción de BC puesto que representa entre el 30% y 60% del costo de producción total (Fernandes et al., 2020; Kadier et al., 2021), por ello en las últimas décadas se han realizado estudios sobre la utilización de residuos agroindustriales como medios de cultivo para reducir los costos de producción (Fernandes et al., 2020).

### **2.2.5.2. *Medios de cultivo a partir de residuos agroindustriales***

Los residuos agroindustriales que se generan a partir del procesamiento de alimentos, en este caso se pueden obtener frutas y hortalizas residuales, y cáscaras u orujos; para estos residuos su tratamiento es diferente y más simple, debido a que contienen los azúcares fermentables listos para su utilización como sustrato y los tratamientos para la fermentación constan de homogeneizar los residuos con una porción de agua y calentarlos para obtener un clarificado con los azúcares presentes en el residuo sin la parte sólida, de este modo se prepara un extracto acuoso del residuo. De este modo Güzel & Akpinar (2019), realizaron extractos acuosos a partir cáscaras de limón, mandarina, naranja y pomelo, y evaluaron la producción de celulosa bacteriana con cada uno de los extractos

preparados sin adición de ningún otro nutriente en el medio obteniendo un rendimiento máximo de 3,92 g de BC/g de cáscara con el extracto acuoso de cáscaras de mandarina. También se generan residuos líquidos, como la vinaza que fue usada por Nasresfahani et al. (2024), sin realizar ningún tipo de tratamiento previo, y suplementándolo con jarabe de glucosa comercial, logró producir 13,3 g/L de BC.

Su alto volumen de generación, la disponibilidad de nutrientes de los mismos y la facilidad de obtención, por ser materias primas renovables, convierten a los residuos agroindustriales en fuentes de carbono y energía de interés para la producción de BC mediante procesos fermentativos, tal como se detalla en el cuadro 2.

**Cuadro 2: Producción de BC a partir de residuos agroindustriales en condiciones estáticas.**

Cepa bacteriana productora	Producción de BC	Tiempo de cultivo	Temperatura	Residuo agroindustrial	Nutrientes adicionales	Referencia
<i>Komagataeibacter hansenii</i> GA2016	2,06 g BC/100 g de cáscara	21 días	28-32°C	Cáscaras de limón	Sin nutrientes adicionales.	(Güzel & Akpınar, 2019)
<i>Komagataeibacter hansenii</i> GA2016	3.92 g BC/100 g de cáscara	21 días	28-32°C	Cáscaras de mandarina	Sin nutrientes adicionales.	(Güzel & Akpınar, 2019)
<i>Komagataeibacter hansenii</i> GA2016	2,33 g BC/100 g de cáscara	21 días	28-32°C	Cáscaras de naranja	Sin nutrientes adicionales.	(Güzel & Akpınar, 2019)
<i>Komagataeibacter hansenii</i> GA2016	2,68 g BC/100 g de cáscara	21 días	28-32°C	Cáscaras de pomelo	Sin nutrientes adicionales.	(Güzel & Akpınar, 2019)
<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	4,11 g/L	8 días	30°C	Cáscara de naranja	Peptona y extracto de levadura	(Kuo et al., 2019)

<i>Komagataeibacter xylinus</i> BPR 200	7,5 g/L	9 días	30°C	Melaza y licor de maíz	Sulfato de amonio, fosfato disódico, ácido cítrico, etanol.	(Rodrigues et al., 2019)
<i>Komagataeibacter xylinus</i>	4 g/L	10 días	30°C	Bagazo de vino	Sin nutrientes adicionales.	(Cazón et al., 2022)
<i>Komagataeibacter xylinus</i>	2,52 g/L	15 días	Temperatura ambiente	Centro de piña	Sin nutrientes adicionales	(Mardawati et al., 2023)
<i>Komagataeibacter rhaeticus</i> QK23	2,57 g/L	25 días	30°C	Cáscara de espárrago	Peptona, extracto de levadura, fosfato disódico y ácido cítrico, ácido acético	(Quiñones-Cerna et al., 2024)
<i>Acetobacter xylinum</i> BPR2001	13,3 g/L	7 días	30°C	Vinaza	Jarabe de glucosa comercial	(Nasresfahani et al., 2024)

### ***2.2.6. Producción de etanol en el Perú***

La producción de etanol en el Perú se fundamenta principalmente en el cultivo de caña de azúcar, una actividad con gran tradición en la costa peruana. Según la FAO (2010), la producción de etanol a partir de caña de azúcar en el Perú utiliza un modelo participativo donde el 40% de la materia prima proviene de pequeños agricultores y el 60% de la producción comercial de ingenios. Este enfoque permite integrar a los pequeños productores en la cadena de valor, generando empleo y fortaleciendo la economía rural. Los costos de producción de etanol en el país oscilan entre 0.27 y 0.51 USD por litro, dependiendo de la escala de producción y la procedencia de la materia prima (FAO, 2010). Un aspecto relevante de la producción de etanol en el Perú es el aprovechamiento de los residuos agrícolas, como el bagazo de caña de azúcar, que tiene un alto potencial energético. Según estudios, el bagazo puede ser utilizado como fuente complementaria de energía en el proceso de producción, mejorando su eficiencia y reduciendo su impacto ambiental (Marcelo Aldana et al., 2016). Esta práctica no solo refuerza la sostenibilidad del sistema productivo, sino que también maximiza el uso de los recursos disponibles, alineándose con los principios de la economía circular y, a la implementación de políticas públicas, como la Ley de Promoción de los Biocombustibles Líquidos, lo cual, ha sido clave para impulsar la producción de etanol en el país (FAO, 2010).

### ***2.2.7. Metodología de superficie de respuesta***

La metodología de superficie de respuesta (MSR) constituye una herramienta estadística avanzada que ha revolucionado la optimización de procesos biotecnológicos (Cox, 2007; Montgomery & St, 2022), esta metodología permite evaluar sistemáticamente las interacciones entre múltiples variables de proceso, facilitando la identificación de condiciones óptimas de operación, en el contexto de la producción de celulosa bacteriana, la MSR ha demostrado ser particularmente valiosa para optimizar factores críticos, la

capacidad de esta metodología para generar modelos predictivos robustos ha permitido mejorar significativamente la eficiencia de los procesos de producción, reduciendo el tiempo y los recursos necesarios para la experimentación (Manojkumar et al., 2022). La aplicación de MSR no solo facilita la optimización de procesos existentes, sino que también proporciona un entendimiento sobre las interacciones entre diferentes variables de proceso, contribuyendo al desarrollo de procesos más eficientes y económicamente viables (Cox, 2007; Montgomery & St, 2022).

Esta metodología consta principalmente de dos diseños, el Diseño Compuesto Central (CCD), que utiliza 5 niveles; y el Diseño Box-Behnken (BBD) que utiliza tres niveles (Manojkumar et al., 2022). El Diseño Compuesto Central (CCD) es un diseño factorial estándar a dos niveles que tiene como extra dos corridas adicionales para cada factor, las corridas adicionales se localizan a la misma distancia del nivel bajo y nivel alto permitiendo la estimación de la curvatura con respecto a cada factor, los niveles se denominan -1 para el nivel bajo del factor, +1 para el nivel alto del factor, y,  $-\alpha$  y  $+\alpha$  para los puntos axiales de los niveles bajo y alto (Manojkumar et al., 2022; STATGRAPHICS, 2006). Un Diseño Compuesto Central Rotacional es uno de los diseños más eficientes, cuenta con una excelente previsibilidad, mayor eficiencia, menor número de ensayos experimentales y cuenta con el mismo número de factores que otros diseños experimentales de la metodología de superficie respuesta (Joshi et al., 2018).

### **III. METODOLOGÍA**

#### **3.1. Enfoque de la investigación**

Este estudio fue experimental y cuantitativo, ya que se basó en la medición objetiva de la producción de celulosa bacteriana, productividad y rendimiento de sustrato en producto, bajo diferentes condiciones de cultivo y en la manipulación de variables independientes (tiempo de cultivo, concentración de etanol y extracto acuoso de orujo de uva) para observar su efecto en las variables dependientes.

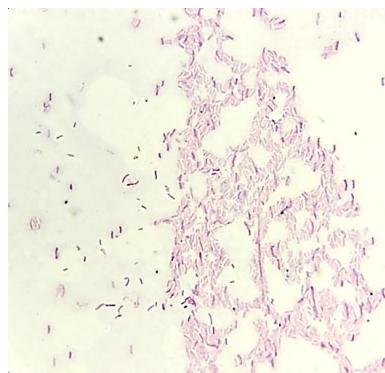
#### **3.2. Localización de estudio**

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Química Orgánica del Departamento de Agroindustria y Agronomía; y, en el laboratorio de Bioprocessos y el laboratorio de nutrición y toxicología del Instituto de Investigación Tecnológico Agroindustrial de la Universidad Nacional del Santa en el distrito de Nuevo Chimbote, departamento de Ancash, Perú.

#### **3.3. Materiales**

##### **3.3.1. Microorganismo**

La cepa bacteriana fue seleccionada y proporcionada por la colección de cultivos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos USDA-ARS (NRRL). La cepa bacteriana *Komagataeibacter xylinus* (*Gluconacetobacter xylinus* – Brown 1886) con el código NRRL B-758 y código de acceso ATCC 4939, es una cepa Gram negativa, del género *Acetobacter* y la especie *Acetobacter xylinum* estudiada inicialmente por Brown (1886). Se realizó una tinción Gram convencional para observar su morfología. La cepa bacteriana se obtuvo liofilizada, con lo cual se rehidrató con solución salina 5% y se activó en medio Hestrin-Schramm (García Hernández, 2019).



**Figura 6. Microfotografía de la cepa *Komagataeibacter xylinus* NRRL B-758.**

Donada por la colección de cultivos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos USDA-ARS. (Aumento 100x con aceite de inmersión en microscopio óptico).

### **3.3.2. *Orujo de uva***

El orujo de uva utilizado en este estudio fue obtenido del viñedo Abuelo Severo, ubicado en la localidad de Moro, región Áncash, Perú. Este orujo proviene específicamente de la producción de vino tinto de cosecha joven elaborado a partir de uvas de tipo Borgoña, variedad característica de la zona. El orujo fue recolectado inmediatamente después del proceso de prensado para asegurar la máxima conservación de sus propiedades fisicoquímicas, especialmente en cuanto a su contenido de azúcares, que resultan de interés para la producción de celulosa bacteriana. El material recolectado se procesó inmediatamente y se refrigeró hasta su utilización en los experimentos.

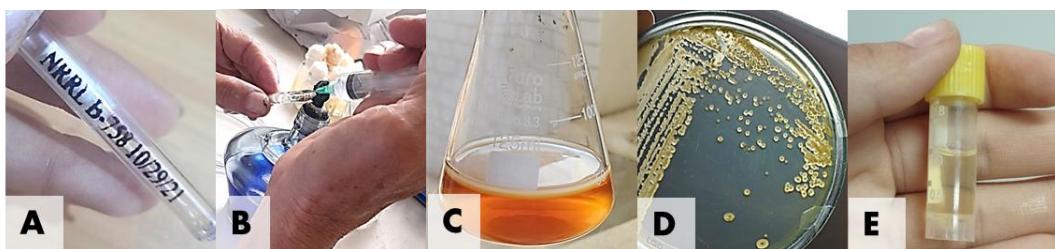


**Figura 7. Orujo de uva sin tratamiento utilizado en el experimento.**

### 3.4. Métodos

#### 3.4.1. Activación de la cepa bacteriana y conservación

La activación de la cepa bacteriana se llevó a cabo rehidratando el liofilizado con solución salina al 5%, para ello se rompió la ampolla en un área desinfectada y con un mechero cerca, con la ayuda de una jeringa se hidrató el liofilizado. Luego se inoculó un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de medio Hestrin-Schramm y en placas de Agar Hestrin-Schramm, se incubó a 30°C. Al cabo de 72 horas se observó el crecimiento. Finalmente se preparó cultivo crio-conservado siguiendo la metodología de crioconservación de García Hernández (2019).

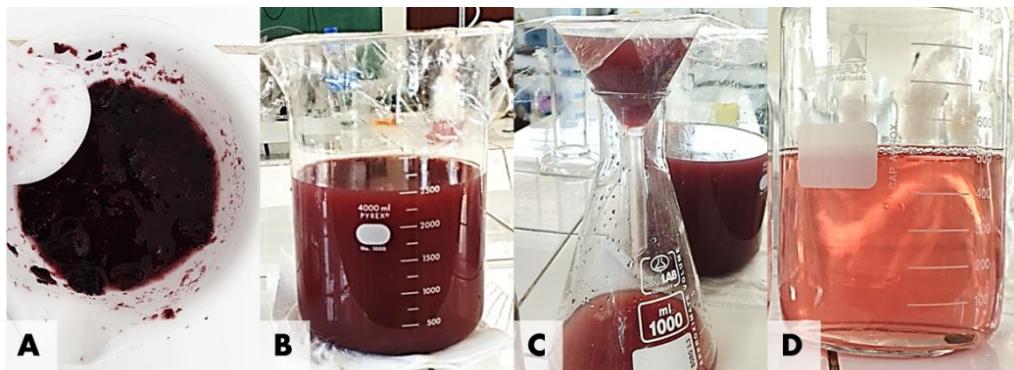


**Figura 8. Activación de *Komagataeibacter xylinus* NRRL B-758.** A) Ampolla con cepa deshidratada. B) Hidratación de la cepa bacteriana. C) Cultivo después de 72 h de siembra. D) Placa Petri con la cepa activada. E) Criovial con cultivo de *K. xylinus*.

#### 3.4.2. Preparación y caracterización de extracto acuoso de orujo de uva

Para obtener una sustancia líquida fermentable a partir del orujo de uva se preparó un extracto acuoso de orujo de uva, este extracto se preparó moliendo 500 g de orujo de uva en un mortero con ayuda de un pilón hasta que se obtuvo una pasta fina, lo que se obtuvo de la molienda se mezcló con agua destilada en una proporción de 1:2 (p:v), una vez unificada la parte sólida y líquida se procedió a filtrar. Se preparó un filtro casero colocando algodón prensado en un embudo de vidrio, el algodón retiene partículas sólidas; el embudo se colocó sobre un matraz limpio de 1000 mL asegurando su apoyo para evitar derrames; luego, se procedió a verter lentamente el extracto de orujo preparado sobre el algodón en el embudo, de este modo se filtró por gravedad. Para lograr precipitar

por completo los sólidos del extracto se utilizó un agente coagulante alimentario (colapiz) que clarificó por completo el extracto, luego se ajustó el pH a 6,0 con NaOH 0.1M; finalmente, se almacenó el líquido completamente clarificado en un frasco con tapa y se esterilizó el extracto clarificado a 121°C durante 15 minutos.



**Figura 9. Preparación de extracto acuoso de orujo de uva.** A) Molienda del orujo de uva. B) Mezcla del orujo con agua destilada. C) Filtrado del extracto de orujo de uva. D) Extracto acuoso de orujo de uva completamente clarificado y esterilizado.

Para la caracterización fisicoquímica del extracto acuoso de orujo de uva preparado, la densidad se determinó utilizando un picnómetro a 21°C. La medición de pH se realizó con un pH-metro digital, previamente calibrado para valores de pH 7.01 y 4.01. La concentración de sólidos solubles totales (°brix) en el extracto acuoso de orujo de uva a 21°C se midió mediante un refractómetro digital. Utilizando la ecuación 1 (Machado et al., 2024), se calculó los sólidos solubles a partir de la medida de °brix.

$$\text{Sólidos solubles } \left( \frac{g}{L} \right) = {}^{\circ}\text{brix} \times \text{Densidad } \left( \frac{g}{mL} \right) \times 10 \quad (1)$$

Para la determinación de azúcares reductores se empleó el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico, cuantificando la concentración de azúcares reductores mediante la curva de calibrado de glucosa previamente realizada (Anexo 01). Además, se determinó la cantidad de glucosa utilizando un test de glucosa enzimático (Valtek test) mediante una curva de calibrado de D-glucosa (Anexo 02). Los análisis de caracterización se realizaron por triplicado para garantizar la fiabilidad de los datos.

### **3.4.3. Cinética bacteriana en medio Hestrin Schramm**

Para determinar los parámetros cinéticos del microorganismo, se realizó una cinética de *Komagataeibacter xylinus* NRRL B-758 en matraces en condiciones estáticas, se determinó la curva de producción de celulosa en el cultivo por lotes, el objetivo fue observar el comportamiento de la producción de celulosa respecto al crecimiento celular en todas sus fases, además, se cuantificó el consumo de la fuente de carbono (glucosa). Se utilizó el medio Hestrin-Schramm para la preparación del inóculo y la cinética en condiciones estáticas.

#### **3.4.3.1. Preparación del inóculo para la cinética bacteriana**

Se realizó un preinóculo que constó de inocular 10 mL de medio Hestrin-Schramm en un matraz de 50 mL con el contenido de un criovial, se dejó crecer por 3 días. Posteriormente, se tomaron 5 mL de cultivo en fase de crecimiento activo y se inocularon en un matraz con 50 mL de medio Hestrin-Schramm, y se dejó crecer por 3 días a 30°C. Al finalizar el tiempo de incubación, se agitó constantemente el matraz para desprender las células bacterianas de la membrana de celulosa, se retiró la celulosa con ayuda de unas pinzas metálicas, y se midió, del caldo de cultivo, la longitud de onda a 600nm, para determinar la concentración de biomasa se utilizó una curva de calibrado de biomasa previamente realizada (Anexo 03) obteniendo una concentración de 0.5 g/L de biomasa. Finalmente, se inoculó los matraces con 5 mL del caldo de cultivo preparado para obtener un volumen final de 50 mL y una concentración inicial de 0.05 g/L de biomasa.

#### **3.4.3.2. Cinética bacteriana en medio comercial Hestrin-Schramm**

La cinética se realizó con el objetivo de conocer el comportamiento de la cinética de crecimiento de biomasa, consumo de sustrato y formación de celulosa de la cepa bacteriana en el medio comercial Hestrin-Schramm. Esto permitió analizar el comportamiento de la cepa en un medio con glucosa pura como fuente de carbono y el

tiempo de mayor formación de celulosa, así se pudo comparar los mismos parámetros respecto con el medio optimizado que se obtuvo.

La cinética se llevó a cabo en 20 matraces de 125 mL con volumen útil de 50 mL, cada uno de ellos con una concentración inicial de biomasa de 0.05 g/L. El medio inicial (Hestrin-Schramm) se compuso de 20 g/L de glucosa, 5 g/L de peptona, 5 g/L de extracto de levadura, 2,7 g/L de fosfato disódico y 1.15 g/L de ácido cítrico, con un pH inicial de 6.0. La temperatura de incubación fue de 30°C en condiciones estáticas durante 20 días donde cada matraz se consideró como una muestra de la cinética tomado una muestra cada 24 horas. A cada muestra tomada se realizó un análisis de cuantificación de biomasa (Anexo 03), DNS para determinar azúcares reductores (Anexo 01) y celulosa (Anexo 04).

#### ***3.4.4. Estudio preliminar de la influencia de la concentración del extracto acuoso de orujo de uva y etanol en la producción de celulosa bacteriana***

Con el objetivo de delimitar los niveles de concentración de orujo de uva y etanol que favorecen el crecimiento de *Komagataeibacter xylinus* NRRL B-758 y la producción de celulosa bacteriana, para el estudio de optimización de los parámetros experimentales en el diseño central compuesto rotacional (DCCR) del estudio principal.

Se realizó una producción previa de celulosa bacteriana probando diferentes concentraciones de extracto acuoso de orujo de uva (10%, 30%, 50%, 70%) y de etanol (1%, 3%, 5%, 7%). El experimento se realizó durante 10 días a 30°C en condiciones estáticas siendo el medio Hestrin-Schramm el medio basal, para evaluar la influencia de la concentración de extracto acuoso de orujo de uva se preparó el medio Hestrin-Schramm sin glucosa; y para el caso del etanol solo se adicionó las concentraciones de etanol sobre el medio Hestrin-Schramm. El experimento se realizó en matraces de 125 mL conteniendo en cada matraz 5 mL de inóculo y 45 mL de medio de cultivo (50 mL de volumen útil), cada matraz inició la fermentación con una concentración de biomasa

inicial de 0.05 g/L. Al finalizar el experimento se cuantificó el crecimiento de biomasa (Anexo 03), consumo de azúcares reductores (Anexo 01) y consumo de etanol mediante cromatografía de gases (Anexo 05).



**Figura 10. Estudio preliminar de condiciones de cultivo.** (A) Matraces correspondientes a la evaluación de distintos niveles de etanol (1, 3, 5, 7% v/v) al finalizar los 10 días de cultivo. (B) Matraces correspondientes a la evaluación de distintos niveles de extracto acuoso de orujo de uva (10, 30, 50, 70% v/v) al finalizar los 10 días de cultivo.

#### ***3.4.5. Diseño experimental para la optimización de la producción de celulosa***

Luego de haber realizado la cinética bacteriana y conocer el comportamiento de su crecimiento en el tiempo, y determinar los niveles más adecuados en un experimento de producción de celulosa con diferentes niveles de extracto acuoso de orujo de uva y etanol individualmente, se procedió a ejecutar el diseño experimental donde se evaluó como influyen las variables de estudio en la producción de celulosa (g/L), productividad de celulosa bacteriana (g/L\*día) y rendimiento de sustrato en producto ( $Y_{P/S}$ ). Se trabajó con

el medio Hestrin-Schramm sustituyendo la glucosa con diferentes variaciones de extracto acuoso de orujo de uva, y con adición de etanol en diferentes tiempos de cultivo.

Se utilizó el Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR) con tres variables independientes: concentración de extracto acuoso de orujo de uva (% v/v), concentración de etanol (%v/v) y tiempo de cultivo (días); y 3 variables respuesta: la producción de celulosa bacteriana (g/L), la productividad de celulosa bacteriana (g/L\*día), rendimiento de sustrato en producto ( $Y_{P/S}$ ); los niveles de las variables independientes se muestran en el Cuadro 3. Teniendo un diseño con 17 experimentos mostrados en el Cuadro 4, de los que corresponden 8 a una factorial  $2^3$ , 3 tratamientos a los puntos centrales y 6 tratamientos a los puntos axiales con  $\alpha = \pm 1.68179$ , los cuales fueron calculados mediante el software Statgraphics 19 Centurion. Se trabajó 3 réplicas de cada uno de los experimentos y las respuestas que se reportaron como el promedio de estos.

**Cuadro 3. Valores de las variables independientes de estudio a los diferentes niveles del diseño experimental.**

Variables independientes	Símbolo	Niveles codificados				
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Tiempo de cultivo (día)	$X_1$	4.89	10.0	17.5	25.0	30.11
Extracto acuoso de orujo de uva (% v/v)	$X_2$	9.77	20.0	35.0	50.0	60.23
Etanol (% v/v)	$X_3$	1.32	2.0	3.0	4.0	4.68

**Cuadro 4. Diseño compuesto central rotable  $2^3$  con 3 puntos centrales.**

Prueba	Variables				Variables Respuesta					
	Nivel codificado		Nivel original		$P$	$Y_{P/S}$	$Q_P$			
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_1$ (día)	$X_2$ v/v)	(%)	$X_3$ v/v)	(%)	(g $g/L$ )	celulosa/g
1	0	0	0	17.5	35	3	-	-	-	-

2	-1	-1	-1	10	20	2	-	-	-
3	+1	-1	-1	25	20	2	-	-	-
4	-1	+1	-1	10	50	2	-	-	-
5	+1	+1	-1	25	50	2	-	-	-
6	-1	-1	+1	10	20	4	-	-	-
7	+1	-1	+1	25	20	4	-	-	-
8	-1	+1	+1	10	50	4	-	-	-
9	0	0	0	17.5	35	3	-	-	-
10	+1	+1	+1	25	50	4	-	-	-
11	- $\alpha$	0	0	4.88655	35	3	-	-	-
12	+ $\alpha$	0	0	30.1134	35	3	-	-	-
13	0	- $\alpha$	0	17.5	9.77311	3	-	-	-
14	0	+ $\alpha$	0	17.5	60.2269	3	-	-	-
15	0	0	- $\alpha$	17.5	35	1.31821	-	-	-
16	0	0	+ $\alpha$	17.5	35	4.68179	-	-	-
17	0	0	0	17.5	35	3	-	-	-

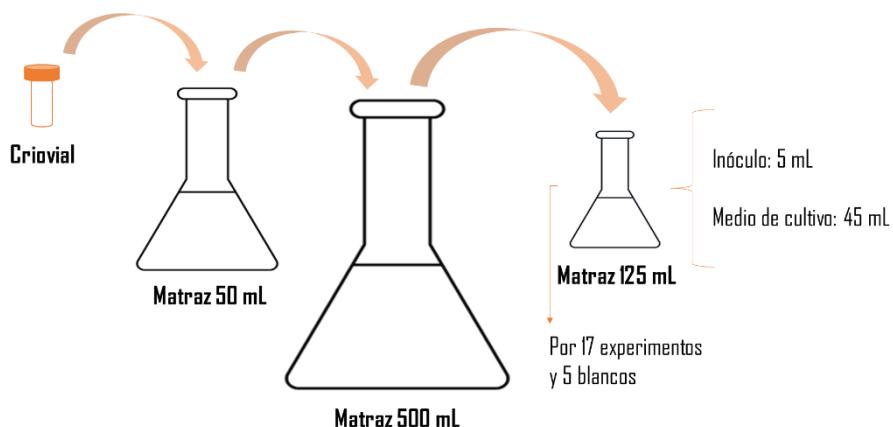
X<sub>1</sub>: Tiempo de cultivo, X<sub>2</sub>: Extracto acuoso de orujo de uva, X<sub>3</sub>: Etanol. P: Producción de celulosa bacteriana (g/L), Q<sub>P</sub>: productividad de celulosa bacteriana (g/L\*día), Y<sub>P/S</sub>: rendimiento de sustrato en producto (g celulosa/g sustrato).

#### **3.4.6. Preparación del inóculo para la ejecución del diseño experimental**

El inóculo para los experimentos se preparó a partir de las muestras crio conservadas en los crioviales y almacenadas a -20°C.

Para los experimentos se realizó primero un preinóculo, se vertió el contenido del criovial en un matraz de 50 mL con 10 mL de medio Hestrin-Schramm, se dejó crecer 3 días a 30°C en condiciones estáticas; luego se inoculó 2 matraces de 500 mL con 200 mL de

medio de cultivo Hestrin-Schramm, y se sembró el 10% de inóculo y se dejó crecer durante 3 días a 30°C en condiciones estáticas hasta que se obtuvo una concentración de 0.5 g/L de biomasa. Cada matraz de 125 mL se agregó 5 mL de inóculo y 45 mL de medio de cultivo (50 mL de volumen útil), cada experimento inició con una concentración de 0.05 g/L de biomasa. Además de los 17 experimentos descritos en el Cuadro 4, se preparó 5 blancos correspondientes a 1 blanco por cada nivel de tiempo de cultivo, los cuales se prepararon con medio Hestrin-Schramm para comparar la producción en medio comercial con las variaciones del medio modificado en cada experimento.

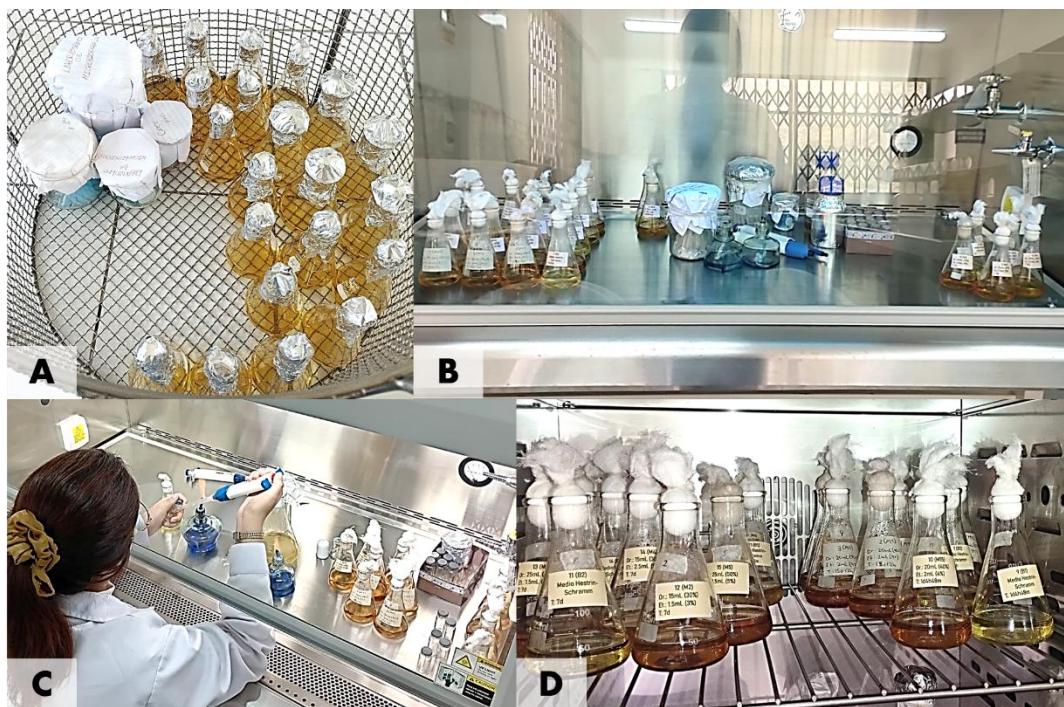


**Figura 11. Esquema de inoculación de los experimentos.**

### **3.4.7. Fermentación de los experimentos del diseño experimental**

Para la ejecución del diseño experimental se utilizó matraces de 125 mL con 50 mL de volumen útil, cada uno con las concentraciones de extracto acuoso de orujo de uva y etanol que se muestran en el Cuadro 4, el etanol fue agregado al inicio de la fermentación, y fueron suplementados con 5 g/L de peptona, 5 g/L de extracto de levadura, 2,7 g/L de fosfato disódico y 1.15 g/L de ácido cítrico (medio comercial Hestrin-Schramm sin glucosa). Se preparó 5 blancos, cada uno correspondiente a cada nivel de tiempo de cultivo, los cuales se prepararon con medio Hestrin-Schramm para comparar la producción en medio comercial con las variaciones del medio modificado en cada experimento. Cada experimento fue inoculado con 5 mL de inóculo con una

concentración de 0.5 g/L de biomasa completando los 50 mL de volumen útil de fermentación y generando una biomasa inicial de 0.05 g/L cumpliendo una relación del 10% entre el inóculo y el volumen útil de la fermentación. Finalmente, se inició la fermentación con un pH de 6,0, y se dejó incubar a 30°C en condiciones estáticas durante los tiempos de cultivo indicados en el Cuadro 4.



**Figura 12. Ejecución del diseño experimental para la optimización de las variables de estudio en la producción de BC por *K. xylinus*.** A) Esterilización de componentes de medio de cultivo para cada experimento del diseño experimental. B) Preparación de medios de cultivo. C) Inoculación de experimentos. D) Incubación de experimentos.

### 3.4.8. Recolección de datos

Al finalizar el periodo de incubación de cada matraz se agitó constantemente para desprender las células bacterianas de la membrana de celulosa, se retiró la celulosa con ayuda de unas pinzas metálicas, y se midió, del caldo de cultivo la longitud de onda a 600nm para determinar la concentración de biomasa (Anexo 03). Luego, se centrifugó el caldo de cultivo a 4500 rpm por 15 minutos, y del sobrenadante se determinó la concentración de azúcares reductores por el método DNS (Anexo 01) y la concentración

de etanol por cromatografía de gases, para lo que se filtró el sobrenadante de la centrifugación con un filtro para jeringa de Nylon con poros de 0.22  $\mu\text{m}$ , la muestra filtrada se colocó en viales ámbar de 2mL para cromatografía y se analizó en el cromatógrafo de gases (Anexo 05). La membrana de celulosa retirada de cada matraz se cuantificó por gravimetría luego de su purificación (Anexo 04).

#### ***3.4.9. Análisis de Datos***

Los datos recolectados se analizaron en Microsoft Excel 2019, donde se procedió a calcular los datos de producción de celulosa (g/L), productividad de celulosa bacteriana (g/L\*día) y rendimiento de sustrato en producto ( $Y_{P/S}$ ). Los cálculos obtenidos se procesaron en el Software Statgraphics 19 Centurion, a través de la prueba t de Student, se determinó el valor de las significancias estadísticas de los coeficientes de regresión, además, se determinó la ecuación que describe el proceso. Además, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) y un coeficiente de determinación múltiple  $R^2$  aceptable.

Finalmente, se determinó el valor óptimo para cada una de las variables del experimento, y se determinó también, el valor óptimo de variables múltiples mediante el Software Statgraphics 19 Centurion. Finalmente, se utilizó la función de deseabilidad para obtener el valor óptimo de respuestas múltiples para las 3 variables de respuesta.

#### ***3.4.10. Validez de la optimización estadística***

Para validar la optimización estadística que se obtuvo del diseño experimental se realizó un experimento donde se utilizó el nivel óptimo de las variables de estudio: concentración de extracto acuoso de orujo de uva (% v/v), concentración de etanol (%v/v) y tiempo de cultivo (días). El experimento se realizó a 30°C y con un pH inicial de 6.0 en condiciones estáticas. Se recolectaron datos de cuantificación de biomasa, azúcares reductores, celulosa y etanol, mediante la medición de densidad óptica, método del ácido dinitrosalicílico (DNS), gravimetría y cromatografía de gases respectivamente.

Este experimento se realizó con el objetivo de verificar que los niveles óptimos de las variables en el Software estadístico resultan el nivel predictivo de las variables de respuesta.

#### ***3.4.11. Cinética bacteriana en medio de cultivo optimizado***

Para analizar el comportamiento de la bacteria *K. xylinus* en el medio de cultivo con niveles óptimos de extracto acuoso de orujo de uva y etanol se realizó una cinética de crecimiento bacteriano. La cinética del medio con niveles óptimos de extracto acuoso de orujo de uva y etanol se realizó a una temperatura de 30°C con un pH inicial de 6.0, este experimento se llevó a cabo en 20 matraces de 125mL con volumen útil de 50 mL, cada uno de ellos con una concentración inicial de biomasa de 0.05 g/L. En la cinética bacteriana se analizó el crecimiento de biomasa, consumo de sustrato y formación de celulosa.

#### ***3.4.12. Ajuste de datos a modelos matemáticos***

Para analizar los datos obtenidos en la producción de celulosa bacteriana bajo condiciones estáticas, se ajustaron los resultados experimentales a modelos matemáticos ampliamente utilizados en cinética microbiana. El crecimiento de biomasa se modeló empleando los modelos, logístico y de Gompertz, los cuales describen adecuadamente el comportamiento sigmoidal del crecimiento microbiano. La ecuación logística (Verhulst, 1845) descrita mediante la ecuación 2.

$$\mu = \mu_{max} \left( 1 - \frac{X}{X_{max}} \right) \quad (2)$$

Donde  $\mu$  expresa la velocidad específica de crecimiento bacteriano. Al derivar la ecuación (2) se puede expresar de la siguiente manera (Kargi, 2009).

$$X = \frac{X_0 e^{\mu_{max} t}}{1 - \frac{X_0}{X_{max}} (1 - e^{\mu_{max} t})} \quad (3)$$

Donde  $X_0$  representa a la concentración de biomasa inicial,  $X_{max}$  a la biomasa máxima obtenida,  $\mu_{max}$  a la velocidad máxima crecimiento bacteriano, y  $t$  al tiempo de incubación.

La ecuación de Gompertz aplicada a crecimiento bacteriano es la siguiente (Hussein et al., 2017):

$$C = C_{max} e^{-ae^{-\mu t}} \quad (4)$$

Donde  $C_{max}$  es la producción máxima de biomasa o producto,  $a$  es un parámetro relacionado con la condición inicial del cultivo,  $\mu$  a la velocidad máxima crecimiento bacteriano, y  $t$  al tiempo de incubación.

El consumo de sustrato fue evaluado mediante el modelo de Monod (Monod, 1978), que permite relacionar la velocidad de consumo con la concentración de sustrato disponible mediante la ecuación 5 (Kargi, 2009).

$$S = S_0 - \frac{X - X_0}{Y_{X/S}} \quad (5)$$

Donde  $S$  es el sustrato,  $S_0$  es el sustrato inicial,  $X$  es la biomasa,  $X_0$  es la biomasa inicial, y  $Y_{X/S}$  es el rendimiento de biomasa en sustrato.

Además, el consumo de etanol se modeló de acuerdo a la ecuación del modelo logístico de estudios de dinámica poblacional y bioquímica cinética, en función a la tasa de consumo (Verhulst, 1845), como se muestra en la ecuación 6:

$$C(t) = \frac{C_{max}}{1 + e^{-r(t-t_{lag})}} \quad (6)$$

Donde  $C(t)$  es la concentración de etanol en función del tiempo,  $C_{max}$  es la concentración de etanol máxima,  $r$  es la tasa de consumo de etanol y  $t_{lag}$  es el tiempo en que dura la fase lag.

Por último, la producción de celulosa bacteriana se ajustó al modelo de Gompertz previamente descrito, dado su capacidad para describir procesos de acumulación de

productos secundarios en función del tiempo. El ajuste de los datos experimentales a estos modelos permitió identificar los parámetros cinéticos clave y evaluar la dinámica del proceso, validando la efectividad de las condiciones óptimas obtenidas a través del diseño experimental. Los ajustes a modelos matemáticos fueron realizados utilizando Python versión 3.11.11 en el entorno Google Colab.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Caracterización fisicoquímica del extracto acuoso de orujo de uva

En el Cuadro 5 se presenta la caracterización fisicoquímica del extracto acuoso de orujo de uva.

**Cuadro 5. Propiedades fisicoquímicas del extracto acuoso de orujo de uva.**

Parámetros	Cuantificación
pH	4.11 ± 0.04
Sólidos solubles (°brix)	3.44 ± 0.1
Densidad (g/mL)	1.015 ± 0.005
Azúcares reductores (g/L)	32.1 ± 1.77
Glucosa (g/L)	20.9 ± 1.49

La caracterización fisicoquímica del extracto acuoso de orujo de uva revela que presenta una cantidad significativa de azúcares reductores como de glucosa, elementos importantes para su aplicación biotecnológica como medio de cultivo para la obtención de biopolímeros. El valor del pH del extracto acuoso de orujo de uva en este estudio se clasifica como ácido (pH de 4.11). Este resultado coincide con lo obtenido por Machado et al. (2024) que obtuvo pH 3.69, y por los resultados obtenidos por Nicolai et al. (2018), que obtuvo pH entre 3.77 y 4.52. El pH ácido del orujo de uva se debe a la presencia de ácidos naturales propios de los subproductos derivados de la uva.

La cantidad de sólidos solubles del extracto acuoso de orujo de uva de este estudio es de 3,44 °brix, lo que corresponde a una concentración de 3,44 g de sólidos solubles por cada 100 g de solución. Que, teniendo en cuenta la densidad del extracto que midió en 1.015 g/mL, se obtuvo una cantidad de 34.9 g/L de sólidos solubles. Estos sólidos solubles incluyen tanto azúcares como otros compuestos disueltos como ácidos orgánicos, minerales, entre otros, presentes en el orujo de uva (Machado et al., 2024).

La cantidad de glucosa determinada (20.9 g/L) coincide con lo reportado por Carreira et al. (2011) quienes encontraron 26.0 g/L de glucosa únicamente el hollejo del orujo de uva, para obtener este resultado utilizó la cuantificación por HPLC. Sin embargo, estos resultados difieren con los obtenidos por Jin et al. (2019) que obtuvieron niveles entre 2.09 g/kg y 6.18 g/kg de glucosa presente en el orujo de uva post-fermentación, teniendo en cuenta que utilizaron orujo de uva roja, y se cuantificó por HPLC; además de glucosa se detectó la presencia de sacarosa y fructosa, la sacarosa osciló entre 1.15 g/kg y 1.70 g/kg, mientras que la cantidad de fructosa llegó hasta los 10.9 g/kg.

El presente estudio muestra una cantidad de 32.1 g/L de azúcares reductores totales, y una cantidad de 20.9 g/L de glucosa. De acuerdo con lo establecido por Jin et al. (2019), y Machado et al. (2024), los azúcares fermentables predominantes en el orujo de uva son la glucosa y fructosa, debido a que las uvas tienen baja concentración de sacarosa, y la presente, en el proceso de vinificación llega a hidrolizarse; debido a ello se considera que los azúcares reductores totales del presente estudio son la glucosa y fructosa.

La diferencia de las concentraciones de azúcares presentes en el orujo de uva depende de diferentes factores, uno de ellos es el tipo de uva, se ha reportado mayor concentración de azúcares en orujo de uva blanca respecto al orujo de uva roja (Carreira et al., 2011; Jin et al., 2019; Machado et al., 2024), sin embargo, el factor predominante es el tipo de vino que se produce al obtener el orujo de uva, dependiendo del tipo de vino habrá un mayor o menor consumo de azúcares, el vino joven suele tener una cantidad alta concentración de azúcares residuales debido a que se mantiene el dulzor y el sabor afrutado en el vino, por el contrario, el vino añejo tiene un tiempo de fermentación más prolongado que permite a las levaduras consumir los azúcares por completo volviendo su sabor más seco (Yıldırım, 2020). En este estudio se utilizó un orujo de uva producto del proceso de

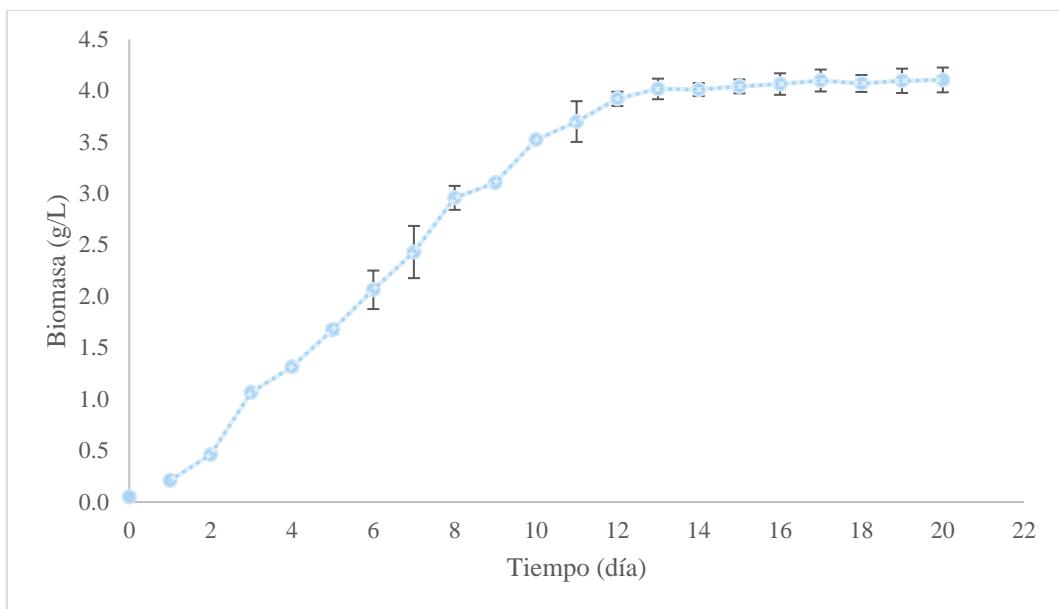
elaboración de vino tinto de cosecha joven, debido a ello contiene una cantidad moderada de azúcares.

#### **4.2. Cinética de crecimiento bacteriano, consumo de sustrato y formación de producto en medio Hestrin Schramm**

Se evaluó el crecimiento de *K. xylinus*, el consumo del sustrato, y la producción de celulosa en medio Hestrin Schramm durante 20 días de cultivo estático a 30°C con un pH inicial de 6.0.

##### ***4.2.1. Cinética de crecimiento de biomasa en medio Hestrin Schramm***

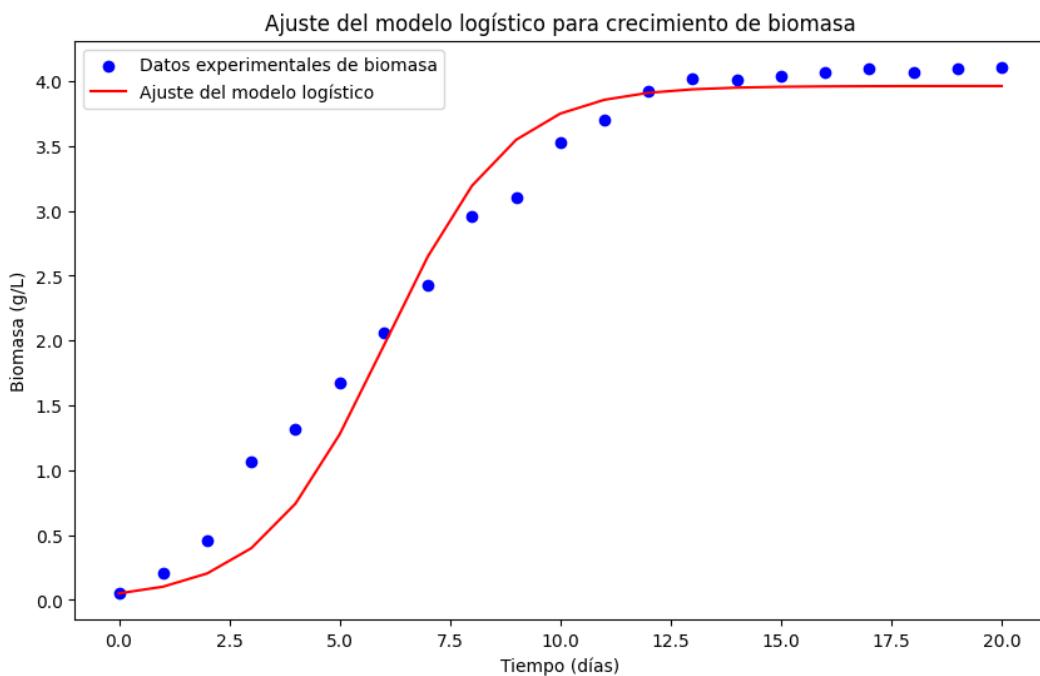
Para evaluar el crecimiento de biomasa en el tiempo, se realizó una cinética durante un periodo de 20 días (Figura 13) en medio Hestrin Schramm. El crecimiento celular inició con una concentración de 0.05 g/L de biomasa. Teniendo en cuenta que se utilizó glucosa como fuente principal de carbono, *K. xylinus* logró un crecimiento máximo de 4.11 g/L. En los resultados obtenidos se puede apreciar una fase lag corta de 2 días, en este tiempo las bacterias se adaptan al medio y sintetizan las enzimas necesarias para su crecimiento. A partir de este tiempo comenzó la fase exponencial hasta el día 10 donde las condiciones de cultivo son óptimas y las bacterias se dividen a una tasa máxima alcanzando un crecimiento de 3.524 g/L. Finalmente, se puede observar la fase estacionaria del cultivo donde la curva se aplana indicando que la tasa de crecimiento celular se asemeja a la tasa de muerte, debido a la limitación de nutrientes, disminución de oxígeno o sobreproducción de metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento celular, durante esta fase hubo un crecimiento bajo hasta que se alcanzó una concentración de biomasa de 4.11 g/L (Maier & Pepper, 2015).



**Figura 13.** Cinética de formación de biomasa de *Komagataeibacter xylinus* NRRL B-758 en medio Hestrin Schramm. Ajustando pH inicial de 6.0, temperatura de 30°C en condiciones estáticas durante 20 días.

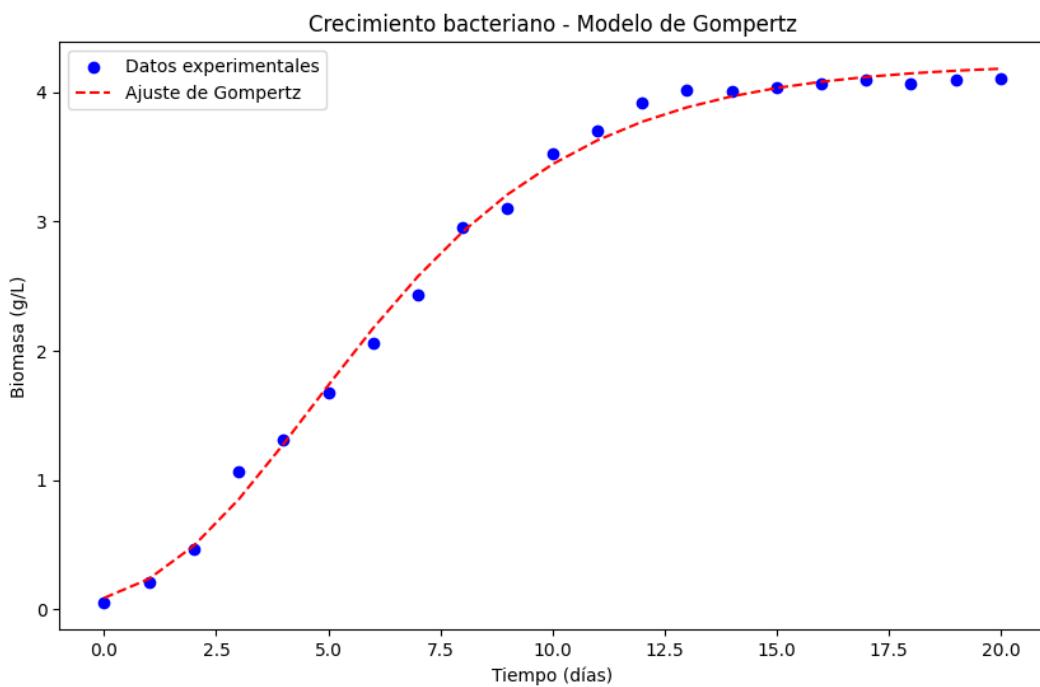
Cruz Zúñiga (2015), identificó dos cepas productoras de celulosa de los géneros *Gluconacetobacter* y *Acetobacter*, estas cepas alcanzaron el crecimiento máximo a los 10 días de cultivo en medios complejos, un resultado muy similar al obtenido, debido a que las acetobacterias que son productoras de celulosa presentan un crecimiento relativamente lento, en comparación con otras bacterias, por ello el tiempo de su crecimiento se mide en días.

A partir de los datos obtenidos experimentalmente, se realizó un ajuste al modelo matemático de ecuación logística (Verhulst, 1845) y ecuación de Gompertz (Xu, 1987). La ecuación logística es un modelo matemático formulado por Pierre François Verhulst como una ecuación que describe el crecimiento poblacional de un sistema biológico dinámico que crece en un ambiente bajo ciertas restricciones (Kalman, 2023).



**Figura 14. Crecimiento de biomasa de *Komagataeibacter xylinus* NRRL B-758 en medio Hestrin Schramm ajustado al modelo de ecuación logística.** (—) Crecimiento de biomasa en medio Hestrin Schramm de acuerdo con el modelo matemático de ecuación logística. (●) Datos de crecimiento de biomasa en medio Hestrin Schramm experimentales en condiciones estáticas a 30°C con un pH inicial de 6.0.

La ecuación de Gompertz es un modelo matemático que, al igual que la ecuación logística, se formuló para describir el crecimiento de sistemas biológicos, sin embargo, se caracteriza por seguir comportamiento asimétrico que inicia con un crecimiento rápido pero luego, se desacelera de manera progresiva (Wang & Guo, 2024).



**Figura 15. Crecimiento de biomasa de *Komagataeibacter xylinus* NRRL B-758 en medio Hestrin Schramm ajustado al modelo de ecuación de Gompertz. (---)**  
 Crecimiento de biomasa en medio Hestrin Schramm de acuerdo con el modelo matemático de ecuación de Gompertz. (●) Datos de crecimiento de biomasa en medio Hestrin Schramm experimentales en condiciones estáticas a 30°C con un pH inicial de 6.0.

Teniendo en cuenta las implicaciones de la ecuación logística y ecuación de Gompertz, se procedió a modelar el crecimiento de *K. xylinus* con ambos modelos. El perfil de crecimiento ajustado al modelo de la ecuación logística y de la ecuación de Gompertz se presenta en la figura 14 y figura 15, respectivamente. Realizando el modelamiento matemático, a partir de los datos obtenidos experimentalmente (figura 13), en Python versión 3.11.11 en el entorno Google Colab, se obtuvieron datos estimados de  $X_{max}$  y  $\mu_{max}$ . Además, se obtuvo el  $R^2$ , el cual se comparó para establecer el modelo que se ajusta mejor a los datos experimentales, el cual fue el modelo de la ecuación de Gompertz. Los datos mencionados se observan en el cuadro 6.

**Cuadro 6. Reporte de Jupyter Colab del ajuste a la ecuación logística y de Gompertz.**

Parámetro	Modelo matemático	
	Ecuación logística	Ecuación de Gompertz
$X_{max}$ ( $g/L$ )	3.96	4.229
$\mu_{max}$ ( $día^{-1}$ )	0.723	0.457
$R^2$	0.965	0.996

$X_{max}$ : Biomasa máxima alcanzada.  $\mu_{max}$ : velocidad específica de crecimiento bacteriano.  $R^2$ : coeficiente de determinación.

Además de un  $R^2$  mayor, el ajuste al modelo de Gompertz se asemeja más a los datos experimentales en comparación con el ajuste al modelo de la ecuación logística. El modelo de la ecuación de Gompertz permite también obtener un estimado del tiempo que dura la fase lag del cultivo, de acuerdo con el modelo la fase lag dura del tiempo cero hasta los 1.205 días, este dato coincide con lo observado en los datos experimentales mostrados en la figura 13, donde se evidencia que la fase lag dura hasta antes de los 2 días de cultivo.

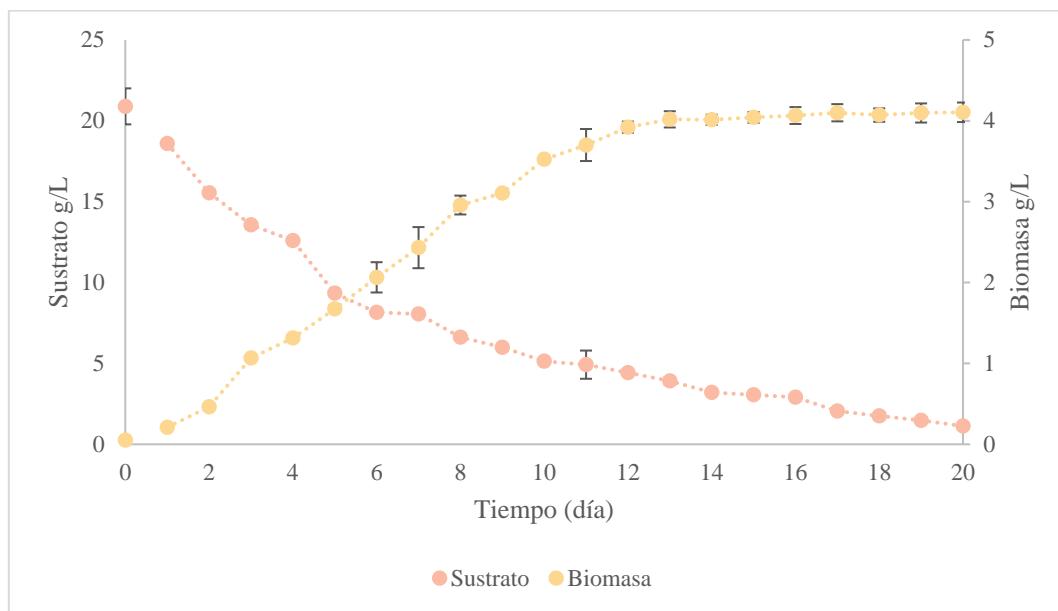
El parámetro de  $\mu_{max}$  obtenido en este estudio fue en condiciones estáticas, concuerda con el obtenido por Cruz Zúñiga (2015) quien utilizó dos cepas productoras de celulosa bacteriana: VM, aislada de vinagre de manzana, y K, aislada de kombucha; las cuales obtuvieron un  $\mu_{max}$  de  $0.0143\ h^{-1}$  y  $0.0168\ h^{-1}$ , respectivamente, lo cuales corresponden a  $0.3432\ día^{-1}$  y  $0.4032\ día^{-1}$ . Ambas cepas fueron caracterizadas como del género *Gluconacetobacter*, y el cálculo del  $\mu_{max}$  experimental se realizó a partir de cinéticas individuales en condiciones estáticas en medio Hestrin-Schramm.

#### **4.2.2. Cinética de consumo de sustrato en medio Hestrin Schramm**

Se utilizó el medio Hestrin-Schramm sin modificación con una concentración de glucosa de 20 g/L, adicionalmente a la glucosa residual del inóculo, se inició la fermentación con

una concentración de sustrato inicial ( $S_0$ ) de 20.89 g/L de glucosa. Pasados los 20 días de cultivo se llegó a una concentración de sustrato ( $S_f$ ) de 1.129 g/L, representando un consumo de sustrato del 95% de la fuente de carbono, un total de 19.76 g/L de sustrato consumido. Se observó que la mayoría del sustrato se consumió en los primeros 8 días de cultivo, a partir del día 8 hasta 16 días existe un crecimiento lento, y desde el día 16 hasta el día 20 se mantiene casi estático el consumo, como se describe en la figura 16.

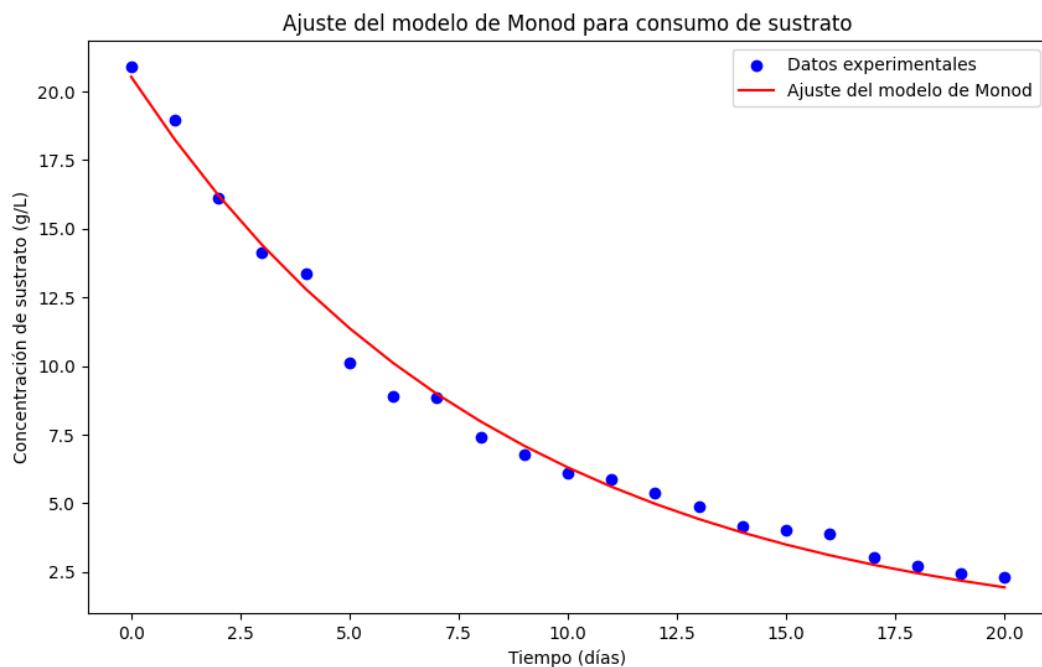
Se han reportado estudios similares como el realizado por Lasagni et al. (2024), quienes registraron un consumo de sustrato de 17 g/L en el día 11 de cultivo, teniendo en cuenta que utilizaron el medio Hestrin-Schramm y la cepa *Komagataeibacter xylinus* K2G30 para obtener estos resultados. Otras cepas bacterianas productoras de celulosa han mostrado un consumo de sustrato del 80% en 15 días de cultivo (Mardawati et al., 2023), y el 90% para el día 12 de cultivo (Andritsou et al., 2018), esto demuestra que la capacidad de consumo de sustrato depende de la cepa bacteriana utilizada en la síntesis de celulosa.



**Figura 16. Cinética de consumo de sustrato y formación de biomasa de *Komagataeibacter xylinus* NRRL B-758 en medio Hestrin Schramm. (●) Concentración de sustrato en el tiempo. (○) Concentración de biomasa en el tiempo.**

Ajustando pH inicial de 6.0, temperatura de 30°C en condiciones estáticas durante 20 días.

A partir de los datos experimentales (Figura 16), se relacionó la velocidad de consumo de sustrato con la biomasa y las concentraciones de sustrato de acuerdo con el Modelo de Monod (Monod, 1978).

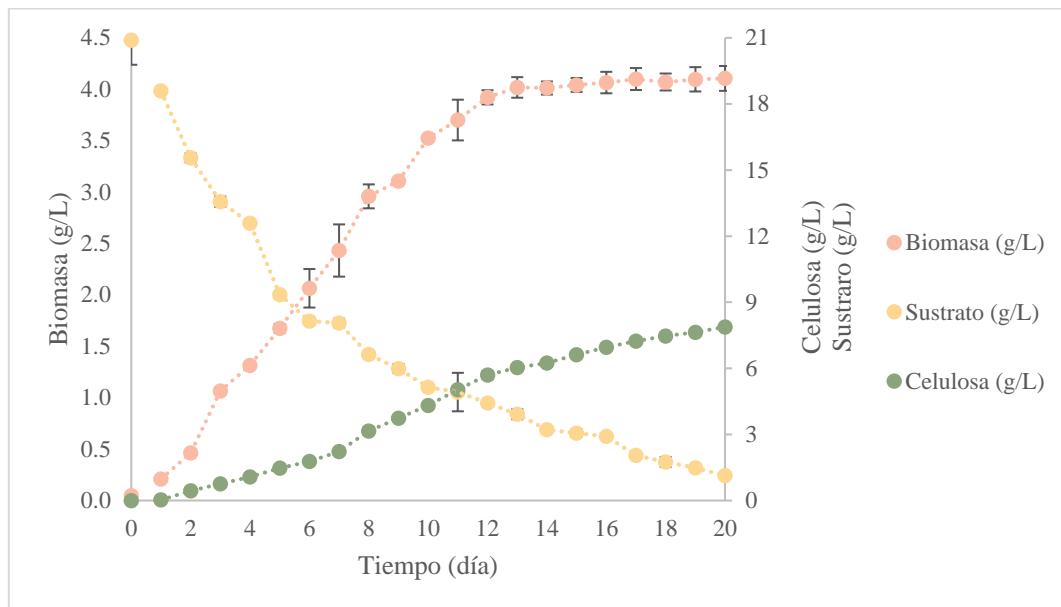


**Figura 17. Consumo de sustrato de *Komagataeibacter xylinus* NRRL B-758 en medio Hestrin Schramm ajustado al modelo de Monod.** (—) Sustrato de acuerdo con el modelo de Monod. (●) Datos de sustrato obtenidos experimentalmente en condiciones estáticas a 30°C con un pH inicial de 6.0 en condiciones estáticas.

El ajuste realizado mediante el modelo de Monod obtuvo un  $R^2$  de 0.99, lo cual es aceptable debido a que se encuentra por encima del 0.95, y, además, se muestra claramente en el gráfico descriptivo del modelo de Monod (Figura 17). El ajuste mostrado se realizó mediante un código de programación en Jupyter Colab, donde se determinó un  $K_S$  de 0.1 g/L.

#### 4.2.3. Cinética de formación de producto en medio Hestrin Schramm

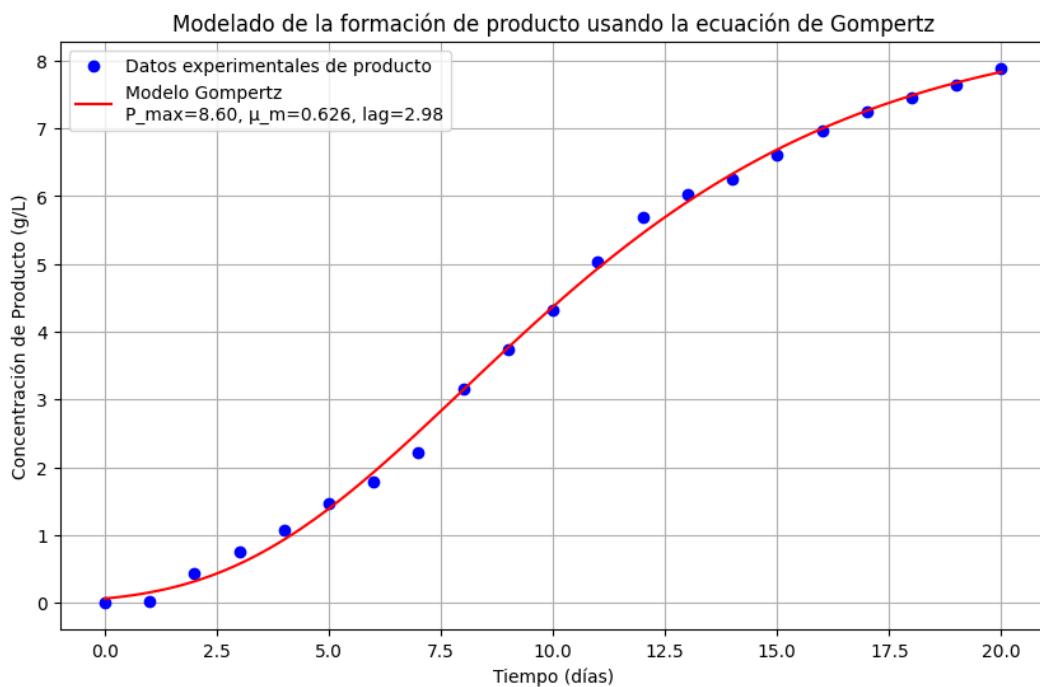
Además del crecimiento de biomasa, y el consumo de sustrato, se cuantificó la formación de producto en el tiempo. La evaluación se realizó midiendo la celulosa producida cada día durante 20 días de cultivo. Se determinó la concentración del biopolímero mediante el método gravimétrico, mostrando resultados de gramos de celulosa bacteriana seca por cada litro de cultivo. La formación de producto se ve en aumento durante los 20 días de cultivo, se puede notar que la celulosa se produce de manera exponencial, siendo los primeros 15 días en donde se produce la mayor parte de la celulosa, y en los siguientes días hasta el día 20 la producción es lenta, tal como se muestra en la Figura 18. Al concluir los 20 días de cultivo en medio Hestrin Schramm se logró una concentración de celulosa de 7.88 g/L de celulosa bacteriana, con una productividad de 0.394 g/L\*día, y un rendimiento de sustrato en producto de 0.399 g/g.



**Figura 18. Cinética de formación de biomasa, consumo de sustrato y producción de celulosa por *Komagataeibacter xylinus* NRRL B-758 en medio Hestrin Schramm.**  
(●) Concentración de biomasa. (○) Concentración de sustrato. (●) Concentración de celulosa. Ajustando pH inicial de 6.0, temperatura de 30°C en condiciones estáticas durante 20 días.

La producción de celulosa bacteriana (BC) con el medio Hestrin Schramm sintetizada por *Komagataeibacter xylinus* NRRL B-758 alcanzó una producción máxima de 7.88 g/L. Lasagni et al. (2024), reportaron una producción de 4 g/L de BC sintetizada por *Komagataeibacter xylinus* K3G30 a partir del medio Hestrin Schramm durante 11 días, no existen otros reportes de síntesis de BC por *K. xylinus* a partir del medio Hestrin-Schramm, sin embargo, Mohammad et al. (2021), al aislar *K. rhaeticus* N1MW32270 obtuvo una producción de 4.3 g/L de BC a partir del medio Hestrin-Schramm en el día 10 de cultivo. Teniendo en cuenta que en presente estudio se obtuvo una producción de 4.320 y 5.027 g/L de BC en el día 10 y 11 de cultivo, respectivamente, se considera que a pesar de ser diferentes cepas de *Komagataeibacter* el medio Hestrin-Schramm genera resultados homogéneos respecto a la formación de producto.

La formación de celulosa se modeló mediante la ecuación de Gompertz anteriormente descrita, donde se obtuvo el comportamiento mostrado en la Figura 19.



**Figura 19. Producción de BC sintetizada por *Komagataeibacter xylinus* NRRL B-758 en medio Hestrin Schramm ajustado al modelo de Gompertz.** (–) Formación de producto según modelo de Gompertz. (●) Datos de producto obtenidos

experimentalmente en condiciones estáticas a 30°C con un pH inicial de 6.0 en condiciones estáticas.

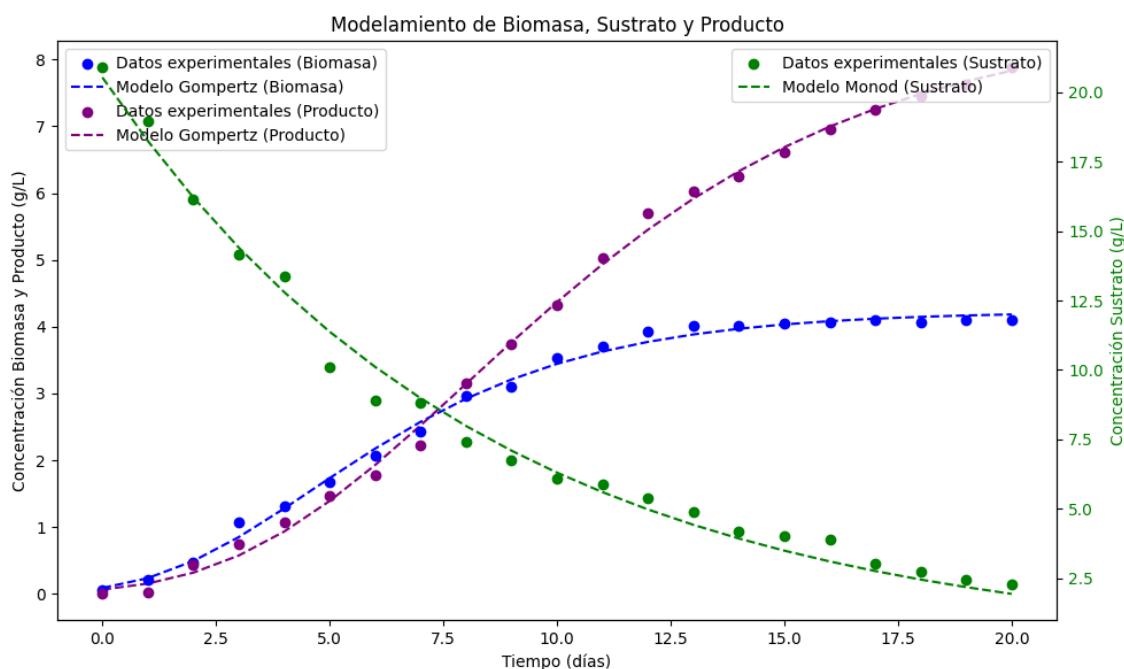
El ajuste matemático a la ecuación de Gompertz mostró que se puede llegar a una producción de 8.6 g/L, además que existe una fase lag de producción durante 2.98 días, con un valor de  $R^2$  de 0.998, se determinó que el modelo se ajusta a los datos experimentales. El modelamiento de producto en el tiempo ajustado a la ecuación de Gompertz también fue utilizado por Lasagni et al. (2024), debido a ello se puede determinar que la ecuación de Gompertz es el mejor modelo que puede ajustarse a la producción celulosa sintetizada por *Komagataeibacter*.

En la figura 20, se presenta la modelización de biomasa, sustrato y producto. La biomasa, ajustada con el modelo de Gompertz, muestra un decrecimiento rápido al principio, seguido por una fase de estabilización que refleja un crecimiento bacteriano que se va limitando por la disponibilidad de nutrientes y otras condiciones del entorno. Los puntos experimentales muestran un comportamiento coherente con esta tendencia, ya que la biomasa se incrementa de manera exponencial al principio y luego se nivela, lo que es típico en los procesos de crecimiento microbiano.

En cuanto al sustrato, ajustado con el modelo de Monod, la curva refleja la disminución de la concentración de este a medida que las células lo consumen para su crecimiento. Los puntos experimentales siguen esta tendencia, confirmando que el consumo de sustrato es un factor clave para el crecimiento bacteriano. La caída en la concentración de sustrato es gradual, lo cual es característico cuando el sustrato se agota parcialmente y las células microbianas comienzan a entrar en una fase de limitación.

El producto, ajustado mediante el modelo Gompertz, muestra una acumulación más lenta al principio, pero su concentración crece de manera sostenida a medida que avanza el bioproceso. Aunque el aumento en la concentración del producto está correlacionado con

el crecimiento de la biomasa, no es un crecimiento paralelo, ya que la acumulación de producto está asociada a la actividad metabólica de las células, la cual continúa incluso después de que el crecimiento de la biomasa se estabiliza. Los puntos experimentales también siguen esta tendencia, sugiriendo que la producción del producto está directamente vinculada al metabolismo de las células durante su fase de crecimiento y mantenimiento.



**Figura 20. Crecimiento de biomasa, consumo de sustrato y formación de celulosa sintetizada por *Komagataeibacter xylinus* NRRL B-758 en medio Hestrin Schramm**

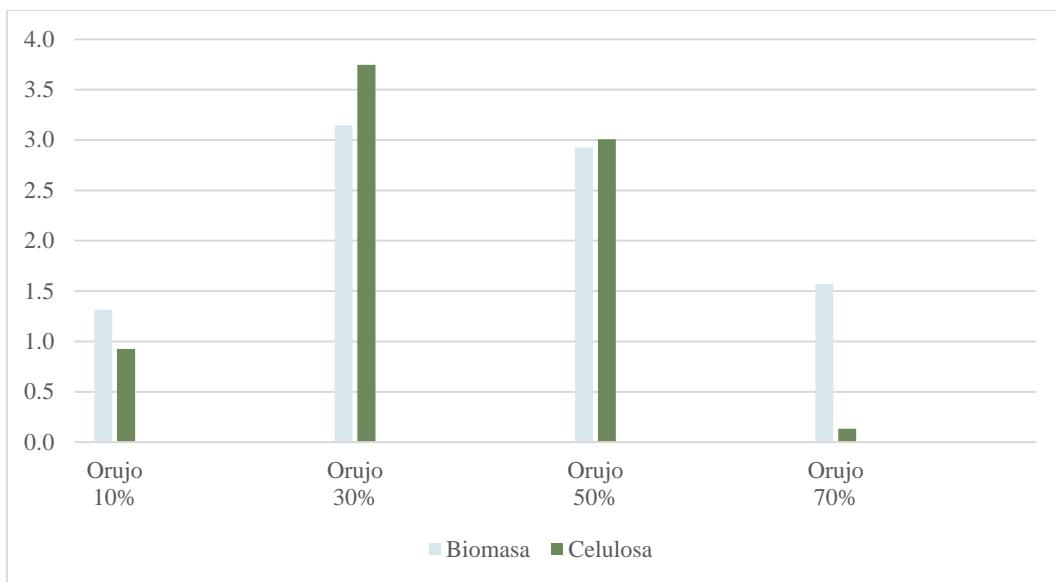
**ajustado a modelos matemáticos.** (●) Datos experimentales de crecimiento de biomasa. (---) Ajuste a modelo matemático de biomasa según el modelo de Gompertz. (●) Datos experimentales de consumo de sustrato. (---) Ajuste a modelo matemático de consumo de sustrato según el modelo de Monod. (●) Datos experimentales de formación de producto. (---) Ajuste a modelo matemático de producto según el modelo de Gompertz.

#### **4.3. Estudio preliminar de la influencia de la concentración del extracto acuoso de orujo de uva y etanol en la producción de celulosa bacteriana**

Al evaluarse la influencia de diferentes concentraciones de etanol y extracto acuoso de orujo de uva, se recolectaron datos de consumo de sustrato (g/L), biomasa final ( $X_f$ ) y producto en g/L. El cuadro 7 muestra los datos recogidos de la influencia de distintas concentraciones de extracto acuoso de orujo de uva en la producción de celulosa bacteriana en 10 días de cultivo, se puede observar que las mayores producciones se alcanzaron con las concentraciones del 30% y 50% llegando a 3.74 g/L y 3.007 g/L de BC, respectivamente. Con la concentración de 70% de extracto acuoso de orujo de uva se muestra una producción muy baja (0.13 g/L), esto se debe a la presencia de otros compuestos que contiene el orujo de uva, se puede notar que en altas concentraciones de dichos compuestos existe una inhibición tanto de la biomasa como de la producción de celulosa. En la Figura 21 se puede mostrar claramente que las concentraciones del 30% y 50% del extracto acuoso de orujo de uva fueron las que dieron mejores resultados, con lo obtenido se determinó que los niveles a evaluar en el diseño experimental principal se encuentran entre el 20% v/v de extracto acuoso de orujo de uva como nivel bajo y 50% v/v de extracto acuoso de orujo de uva como nivel alto.

**Cuadro 7. Influencia de 4 concentraciones distintas de extracto acuoso de orujo de uva sin adición de etanol en la producción de BC luego de 10 días de cultivo a 30°C con un pH inicial de 6.0.**

Concent.	Sustrato inicial (g/L azúcares red.)	Sustrato final (g/L azúcares red.)	Biomasa final (g/L)	Producto (g/L)
10% v/v	3.34 ± 0.47	1.06 ± 0.13	1.31 ± 0.03	0.92 ± 0.13
30% v/v	9.71 ± 0.17	3.23 ± 0.36	3.14 ± 0.13	3.74 ± 0.19
50% v/v	16.28 ± 0.39	10.72 ± 0.73	2.92 ± 0.19	3.00 ± 0.48
70% v/v	22.83 ± 0.58	20.84 ± 0.15	1.57 ± 0.25	0.13 ± 0.14



**Figura 21. Influencia de la concentración de extracto acuoso de orujo de uva en el crecimiento de biomasa y síntesis de celulosa.**

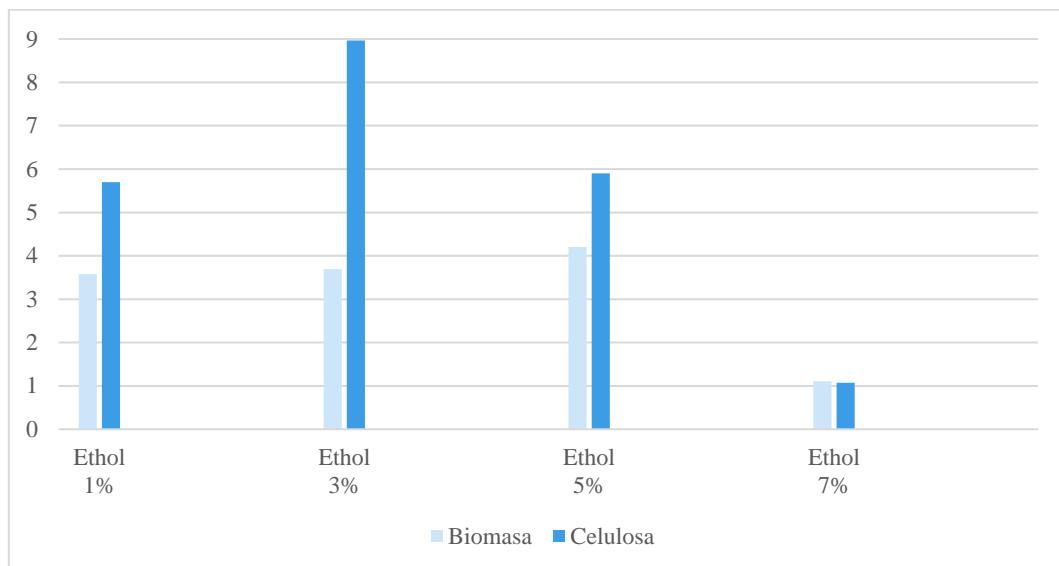
Los niveles elegidos se determinaron también por referencia de trabajos previos como el realizado por Carreira et al. (2011), quienes determinaron que una concentración del extracto de orujo de uva del 25% v/v (1:4) es el nivel óptimo para la producción de celulosa sintetizada por *Gluconacetobacter sacchari* llegando a obtener 0.68 g/L de BC en 4 días de cultivo. A pesar de no haber mayores referencias del uso de orujo de uva en diferentes concentraciones para la producción de BC, se tuvieron en cuenta trabajos como el realizado por Navarro Zurita (2018) quien trabajó con un extracto de arándano de descarte como medio alternativo, y se determinó que la concentración óptima de producción fue de 30% v/v.

De acuerdo con los datos mostrados en el cuadro 8, la adición de 3% v/v de etanol en el medio fue la concentración que obtuvo una mayor producción de celulosa, llegando a 8.96 g/L de BC luego de los 10 días de cultivo. Comparando lo obtenido con lo producido en medio Hestrin-Schramm sin adición de etanol, el etanol al 3% v/v logró maximizar la producción en un 150%. Otras concentraciones como la de 1% v/v y 5% v/v también muestran un aumento de la producción de celulosa, pero en menor proporción, por el

contrario, un nivel de 7% v/v de etanol inhibe tanto el crecimiento de biomasa y la síntesis de celulosa.

**Cuadro 8. Influencia de 4 concentraciones distintas de etanol en la producción de BC luego de 10 días de cultivo a 30°C con un pH inicial de 6.0.**

Concentración	Biomasa final (g/L)	Producto (g/L)
1% v/v	3.58 ± 0.13	5.70 ± 0.33
3% v/v	3.69 ± 0.11	8.96 ± 0.30
5% v/v	4.20 ± 0.14	5.90 ± 0.27
7% v/v	1.11 ± 0.05	1.07 ± 0.12



**Figura 22. Influencia de la concentración de etanol en el crecimiento de biomasa y síntesis de celulosa.**

El nivel de etanol tolerable por las cepas productoras de celulosa depende de cada especie, la especie *K. xylinus* K2G30 llega a la máxima producción de celulosa cuando se adiciona 1% v/v de etanol en el medio llegando a duplicar la producción de BC (Lasagni et al., 2024), al igual que la cepa *K. xylinus* E25 (Cielecka et al., 2021b). Por otro lado, la cepa *K. rhaeticus* presenta una mayor producción cuando se adiciona 1.5% de etanol

(Mohammad et al., 2021), y se ha reportado que la cepa *K. uvacei* FXV3 tolera niveles de etanol de hasta 7.5% v/v (Nascimento et al., 2021).

A partir de lo obtenido, se determinó que los niveles de etanol ideales a evaluar en el diseño experimental principal se encuentran entre 2% v/v de etanol como nivel bajo y 4% v/v de etanol como nivel alto.

#### **4.4. Diseño experimental para la optimización de tiempo de cultivo, extracto acuoso de orujo de uva y etanol**

Dados los resultados de los estudios previos, cinética de cepa bacteriana y estudio preliminar de la influencia del extracto acuoso de orujo de uva y etanol en la producción de celulosa bacteriana, se procedió a ejecutar el diseño experimental del estudio con el objetivo de optimizar las variables independientes (tiempo de cultivo, extracto acuoso de orujo de uva y etanol) que influyen directamente en las variables de respuesta (celulosa producida, productividad y rendimiento de sustrato en producto).

La biotecnología ha avanzado significativamente gracias a la incorporación de métodos matemáticos y estadísticos que permiten optimizar procesos microbiológicos (Panke & Wubbolts, 2002). Uno de los procedimientos más destacados para la optimización de procesos biotecnológicos es el diseño experimental de superficie de respuesta, siendo el diseño compuesto central uno de los más empleados y efectivos (Cox, 2007; Montgomery & St, 2022). Este método facilita la identificación de condiciones óptimas que maximizan o minimizan una respuesta de interés, permitiendo predicciones sistemáticas y una alta capacidad de validación en procesos fermentativos (Manojkumar et al., 2022).

En el presente trabajo, se investigó la optimización simultánea del tiempo de cultivo, la concentración de etanol y el extracto acuoso de orujo de uva para la producción de celulosa bacteriana en cultivos estáticos de *Komagataeibacter xylinus*. Este enfoque metodológico es ampliamente utilizado en estudios relacionados con la optimización de

la producción de biopolímeros microbianos como la celulosa bacteriana, ya que permite evaluar la interacción entre variables clave como fuentes de carbono y coadyuvantes en el medio de cultivo (Patel et al., 2024).

Los experimentos fueron diseñados utilizando un modelo compuesto central rotacional, con el objetivo de describir y optimizar la producción de celulosa bacteriana, lo que permitió identificar las condiciones óptimas que favorecen la producción de celulosa bacteriana, demostrando la utilidad del diseño experimental en el desarrollo de procesos biotecnológicos más eficientes y sostenibles. Los resultados obtenidos de la ejecución del diseño experimental se muestran en el cuadro 9.

**Cuadro 9. Matriz del diseño compuesto central rotable con las variables independientes con el nivel codificado y las respuestas.**

Prueba	Variables			Respuestas		
	Nivel codificado			P (g/L)	Q <sub>P</sub> (g/L*día)	Y <sub>P/S</sub> (g/g)
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>			
1	0	0	0	7.980	0.456	1.051
2	-1	-1	-1	2.040	0.204	0.461
3	+1	-1	-1	2.320	0.093	0.401
4	-1	+1	-1	2.960	0.296	0.393
5	+1	+1	-1	6.980	0.279	0.500
6	-1	-1	+1	2.360	0.236	0.682
7	+1	-1	+1	3.360	0.134	0.611
8	-1	+1	+1	2.940	0.294	0.413
9	0	0	0	8.320	0.475	1.074
10	+1	+1	+1	8.960	0.358	0.684
11	-α	0	0	0.960	0.196	0.301
12	+α	0	0	9.460	0.314	0.836
13	0	-α	0	1.100	0.063	0.351
14	0	+α	0	4.120	0.235	0.516
15	0	0	-α	5.500	0.314	0.726
16	0	0	+α	7.100	0.406	0.857

17	0	0	0	9.060	0.518	1.133
----	---	---	---	-------	-------	-------

X<sub>1</sub>: Tiempo de cultivo, X<sub>2</sub>: Extracto acuoso de orujo de uva, X<sub>3</sub>: Etanol. P: Producción de celulosa bacteriana (g/L), Q<sub>P</sub>: productividad de celulosa bacteriana (g/L\*día), Y<sub>P/S</sub>: rendimiento de sustrato en producto (g celulosa/g sustrato).

A partir de los datos obtenidos de la ejecución del diseño experimental, se realizaron estimaciones de los efectos lineales y cuadráticos de las variables mediante el software Statgraphics 19 Centurion.

#### **4.4.1. Análisis de variables de respuesta**

Al analizar las variables de respuesta del diseño experimental mediante Statgraphics 19 Centurion se mostró la influencia de los factores de estudio (tiempo de cultivo, concentración de extracto acuoso de orujo de uva y concentración de etanol) en las variables de respuesta (celulosa producida, productividad y rendimiento de sustrato en producto), se realizaron análisis ANOVA, diagrama de Pareto, modelo de regresión, estimación de resultados y gráficas de superficie de respuesta de cada una de las variables de respuesta detallados en los anexos N° 7, 8 y 9. Los análisis realizados permitieron optimizar cada variable de respuesta como se observa en el cuadro 10.

**Cuadro 10. Valores de los factores que optimizan cada variable de respuesta individualmente.**

Factores	Variables de respuesta		
	P (g/L)	Q <sub>P</sub> (g/L*día)	Y <sub>P/S</sub> (g/g)
X <sub>1</sub> (días)	25.42	18.15	19.27
X <sub>2</sub> (% v/v)	43.37	39.11	35.46
X <sub>3</sub> (% v/v)	3.48	3.26	3.29
Valor óptimo*	9.92	0.49	1.11

X<sub>1</sub>: Tiempo de cultivo, X<sub>2</sub>: Extracto acuoso de orujo de uva, X<sub>3</sub>: Etanol. P: Producción de celulosa bacteriana (g/L), Q<sub>P</sub>: productividad de celulosa bacteriana (g/L\*día), Y<sub>P/S</sub>: rendimiento de sustrato en producto (g celulosa/g sustrato). \*Los datos de valor óptimo corresponden a los valores óptimos por cada variable de respuesta.

Los valores óptimos mostrados en el cuadro 10 representa un análisis individual de cada variable de respuesta, sin embargo, en la presente investigación se busca tener una optimización de las 3 variables de respuesta en simultáneo, para ello se procedió a realizar una optimización de respuesta múltiple.

#### ***4.4.2. Optimización estadística de respuesta múltiple***

Tomando en cuenta el análisis estadístico realizado por cada una de las respuestas, se realizó un estudio de optimización de múltiples respuestas. La presente investigación se enfoca en optimizar simultáneamente tres parámetros críticos: la celulosa producida ( $\text{g/L}$ ), la productividad ( $\text{g/L}^*\text{día}$ ), y el rendimiento de sustrato en producto ( $\text{g producto/g sustrato}$ ), utilizando un diseño experimental que evalúa la influencia del tiempo de cultivo, concentración de extracto de orujo de uva y etanol.

Los rangos experimentales observados muestran valores significativos para las tres variables respuesta: la celulosa producida oscila entre 0.96 y 9.46  $\text{g/L}$ , la productividad entre 0.063 y 0.518  $\text{g/L}^*\text{día}$ , y el rendimiento de sustrato en producto entre 0.301 y 1.133  $\text{g producto/g sustrato}$ . El estudio establece objetivos de maximización para las tres respuestas, asignándoles igual importancia (peso 1.0) y un impacto de 3.0, lo que indica un enfoque balanceado en la optimización del proceso.

Los resultados experimentales, presentados en el cuadro 11, revelan patrones interesantes. Se alcanzaron valores óptimos en varias corridas, destacando la número 17 con los mejores resultados globales (celulosa: 9.06  $\text{g/L}$ , productividad: 0.518  $\text{g/L}^*\text{día}$ , rendimiento: 1.133  $\text{g producto/g sustrato}$ ). La deseabilidad prevista y observada muestra una buena correlación, particularmente en las corridas con mayor producción, lo que valida la robustez del modelo de optimización.

**Cuadro 11. Resultados experimentales y deseabilidad del diseño de optimización multifactorial para la producción de celulosa bacteriana.**

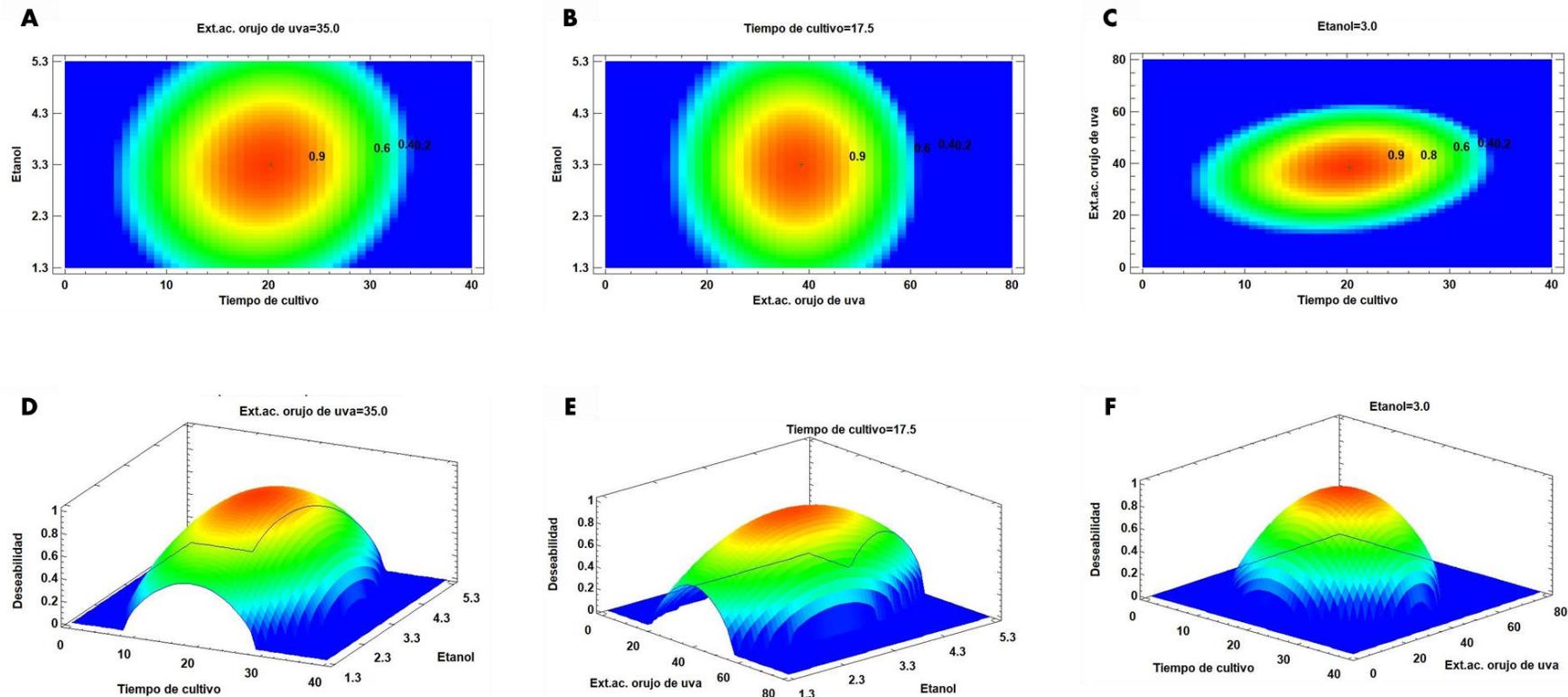
<i>Fila</i>	<i>Celulosa producida</i>	<i>Productividad</i>	<i>Rendimiento</i>	<i>Deseabilidad Prevista</i>	<i>Deseabilidad Observada</i>
1	7.98	0.456	1.051	0.918416	0.863136
2	2.04	0.204	0.461	0.188387	0.196368
3	2.32	0.093	0.401	0.164694	0.108235
4	2.96	0.296	0.393	0.186028	0.237068
5	6.98	0.279	0.5	0.548858	0.431635
6	2.36	0.236	0.682	0.254985	0.30609
7	3.36	0.134	0.611	0.355943	0.254151
8	2.94	0.294	0.413	0.232032	0.251563
9	8.32	0.475	1.074	0.918416	0.899774
10	8.96	0.358	0.684	0.706166	0.654916
11	0.96	0.196	0.301	0.166783	0.0
12	9.46	0.314	0.836	0.546573	0.707888
13	1.1	0.063	0.351	0.0	0.0
14	4.12	0.235	0.516	0.28778	0.331157
15	5.5	0.314	0.726	0.497805	0.531931
16	7.1	0.406	0.857	0.69807	0.713939
17	9.06	0.518	1.133	0.918416	0.984061

En la figura 23, se muestran los gráficos de contornos de superficie de respuesta y superficie de respuesta estimada en función a la concentración de etanol y tiempo de cultivo (24.A y 24.D), en función a la concentración de etanol y concentración de extracto acuoso de orujo de uva (24.B y 24.E), y en función a la concentración de extracto acuoso de orujo de uva y tiempo de cultivo (24.C y 24.F). En los gráficos mostrados se confirma la existencia de una región óptima bien definida donde las 3 respuestas alcanzan sus valores máximos simultáneamente. Esta optimización multiobjetivo es crucial para el escalamiento industrial del proceso, ya que no solo considera la cantidad de producto final, sino también la eficiencia del proceso (productividad) y la conversión de sustrato en producto (rendimiento), factores determinantes para la viabilidad económica de la producción de celulosa bacteriana a escala comercial. El cuadro 12 muestra la

combinación de niveles de los factores que maximiza la función de deseabilidad (0.95), asimismo, muestra los valores máximos de las variables respuesta que pueden ser obtenidos al utilizar los valores óptimos de los factores.

**Cuadro 12. Valores óptimos de factores y variables de respuestas.**

Factores		Respuestas	
Descripción	Valor óptimo	Descripción	Valor óptimo
Tiempo de cultivo (día)	20.25	Celulosa producida (g/L)	9.36
Ext. Acuoso de orujo de uva (% v/v)	38.56	Productividad (g/L*día)	0.48
Etanol (% v/v)	3.29	Rendimiento ( $\frac{\text{g producto}}{\text{g sustrato}}$ )	1.09



**Figura 23. Gráficos de contornos y de superficie de respuesta para la deseabilidad de respuestas múltiples.** (A y D) Gráfico de contorno y de superficie de respuesta en función a la concentración de etanol y tiempo de cultivo. (B y E) Gráfico de contornos y de superficie de respuesta en función a la concentración de etanol y concentración de extracto acuoso de orujo de uva. (C y F) Gráfico de contornos y de superficie de respuesta en función a la concentración de extracto acuoso de orujo de uva y tiempo de cultivo.

#### **4.5. Validación de la optimización estadística de respuesta múltiple**

Una vez determinados los valores óptimos de los factores, se procedió a realizar un experimento para corroborar la obtención de las respuestas calculadas por la función de deseabilidad. En el cuadro 13 se muestra las respuestas maximizadas estadísticamente, así como los resultados obtenidos experimentalmente en las condiciones optimizadas.

**Cuadro 13. Comparación de respuestas estadísticas y experimentales**

Respuesta	Maximización estadística	Resultados experimentales
Celulosa producida (g/L)	9.36	9.375
Productividad (g/L*día)	0.48	0.463
Rendimiento de sustrato en producto ( <sup>g producto/g sustrato</sup> )	1.09	0.942

Los resultados obtenidos demuestran una notable correlación entre los valores predichos por el modelo estadístico y los resultados experimentales en la producción de celulosa bacteriana por *Komagataeibacter xylinus*.

Para la celulosa producida, el modelo estadístico predijo 9.36 g/L, obteniéndose experimentalmente 9.375 g/L, mostrando una precisión excepcional con una diferencia de solo 0.16%. Estos valores son significativamente superiores a los reportados por Quiñones-Cerna et al. (2024), quienes obtuvieron una producción de 2.57 g/L de BC en 25 días de cultivo utilizando un extracto acuoso hidrolizado de cáscaras de espárrago. Del mismo modo, los resultados superaron los obtenidos por Cerrutti et al. (2016), quienes obtuvieron 6.7 g/L de BC en un tiempo de 25 días de cultivo utilizando orujo de uva sin aditivo de etanol. Los resultados obtenidos son comparables con los de Mohammad et al. (2021), que alcanzaron 9.2 g/L suplementando el medio H-S con una concentración de 1.5% v/v de etanol en el medio, y Cruz Zúñiga (2015), quien obtuvo una producción de 8.74 g/L de BC. Sin embargo, los resultados fueron superados por los reportados por Cazón et al. (2022) quienes obtuvieron una producción de 11.44 g/L de BC.

La productividad mostró valores de 0.48 g/L\*día (predicho) y 0.463 g/L\*día (experimental), con una variación del 3.5%. Estos resultados superan los obtenidos por Cerrutti et al. (2016), con una productividad de 0.31 g/L\*día, son comparables con los resultados de Aswini et al. (2020), quienes obtuvieron 0.48 g/L\*día, y fueron superados por lo obtenido por Cazón et al. (2022), que obtuvieron 0.71 g/L\*día, y por Rodrigues et al. (2019), que obtuvieron 0.73 g/L\*día experimentalmente. La productividad lograda sugiere que el extracto de orujo de uva proporciona nutrientes esenciales para la producción, y el etanol es un aditivo que acelera el metabolismo bacteriano.

El rendimiento de sustrato en producto alcanzó 1.09 g/g (predicho) y 0.942 g/g (experimental), con una diferencia del 13.6%. Aunque esta variación es mayor, los valores obtenidos son notables comparados con los reportados por Quiñones-Cerna et al. (2024), quienes reportaron un rendimiento de 0.21 g/g, y los reportados por Guimarães et al. (2023), con 0.447 g/g. No existen muchos trabajos que reporten la conversión de sustrato en producto con rendimiento de sustrato en producto, sin embargo, la eficiencia de conversión superior a 0.9 g/g indica un excelente aprovechamiento del sustrato. El alto nivel de rendimiento de la fuente de carbono se debe a la adición de etanol, estudios realizados por Ryngajllo et al. (2019) demuestra que la adición de etanol influye en la expresión génica global de las cepas *Komagataeibacter*, influyendo en la vías del metabolismo central con un efecto positivo en la síntesis de proteínas y las reacciones de aceptación de electrones, pero con un impacto negativo en la glucólisis/gluconeogénesis, el ciclo del TCA, las reacciones de donación de electrones, la degradación de proteínas y la respuesta al estrés. Esto ejerce un fuerte efecto positivo sobre el rendimiento de sustrato en producto, debido a que cuando el etanol está presente en el medio de cultivo, el metabolismo de la glucosa se dirige hacia la producción de celulosa debido a la inducción

de genes relacionados con la formación de UDP-glucosa y la represión de genes implicados en la glucólisis.

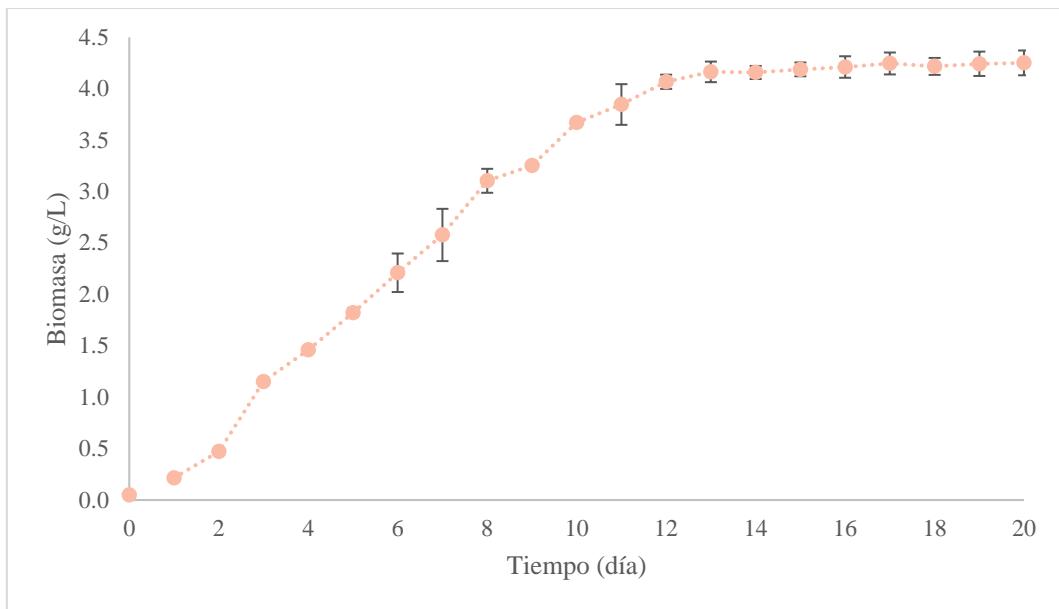
La precisión general del modelo estadístico se valida por las pequeñas diferencias entre valores predichos y experimentales, especialmente en celulosa producida y productividad. Se considera aceptables las variaciones de hasta 15% en bioprocesos optimizados (Aswini et al., 2020; Cielecka et al., 2021a; Rodrigues et al., 2019). El uso de orujo de uva como sustrato alternativo no solo optimiza la producción, sino que también contribuye a la valorización de residuos agroindustriales, alineándose con principios de economía circular (Blanco et al., 2021; Már Mol et al., 2021).

#### **4.6. Cinética de crecimiento bacteriano en medio optimizado**

Con el objetivo de evaluar el comportamiento de *K. xylinus* en el tiempo en el medio optimizado, y compararlo con su comportamiento en medio comercial Hestrin-Schramm, se realizó una cinética de crecimiento de *K. xylinus* en medio optimizado (38.56 % v/v de extracto acuoso de orujo de uva, y 3.29% v/v de etanol).

##### ***4.6.1. Cinética de crecimiento de biomasa en medio optimizado***

La cinética para evaluar el crecimiento de biomasa en el tiempo se realizó en un plazo de 20 días (Figura 24). La concentración de biomasa inicial fue de 0.05 g/L, llegando hasta 4.25 g/L de biomasa en el día 20 de cultivo. En los resultados obtenidos se aprecia una fase lag de 2 días, lo cual se considera corta, luego, se puede apreciar la fase de crecimiento exponencial que dura hasta el día 12, en esta fase se observó que el crecimiento llegó hasta 4.0688 g/L de biomasa. Finalmente, la fase estacionaria se evidencia con un crecimiento casi nulo debido a que la tasa de crecimiento es semejante a la tasa de muerte celular, en esta fase el crecimiento llegó hasta los 4.252 g/L.

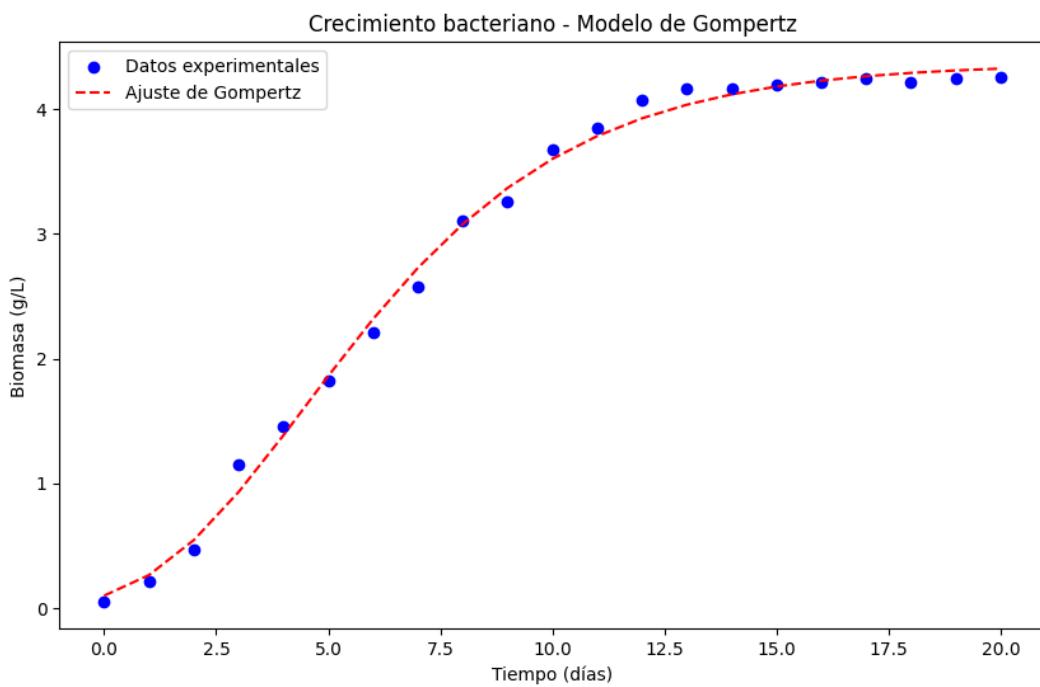


**Figura 24. Cinética de formación de biomasa de *K. xylinus* en medio optimizado.**

Ajustando pH inicial a 6.0, temperatura de 30°C en condiciones estáticas durante 20 días.

Los resultados presentados se asemejan al obtenido en la cinética de crecimiento bacteriano de *K. xylinus* en medio comercial Hestrin-Schramm. Debido a la similitud del comportamiento del crecimiento se realizó un ajuste al modelo matemático según la ecuación Gompertz (Figura 25). Asimismo, en el cuadro 14 se observa la comparación de los principales parámetros obtenidos del ajuste al modelo matemático según Gompertz de la cinética de crecimiento bacteriano en medio comercial Hestrin-Schramm y medio optimizado, ambos obtenidos por el mismo código elaborado en Jupyter Colab.

Al comparar los parámetros obtenidos por el modelo matemático según Gompertz en ambos medios de cultivo, se observa que no existe diferencia significativa entre los resultados, aunque la cantidad máxima de biomasa y la velocidad específica de crecimiento tienden a ser mayores en el medio optimizado.



**Figura 25. Crecimiento de biomasa de *Komagataeibacter xylinus* NRRL B-758 en medio optimizado ajustado al modelo de ecuación de Gompertz.** (--) Biomasa de acuerdo con el modelo matemático de ecuación de Gompertz. (●) Datos de crecimiento de biomasa experimentalmente en condiciones estáticas a 30°C.

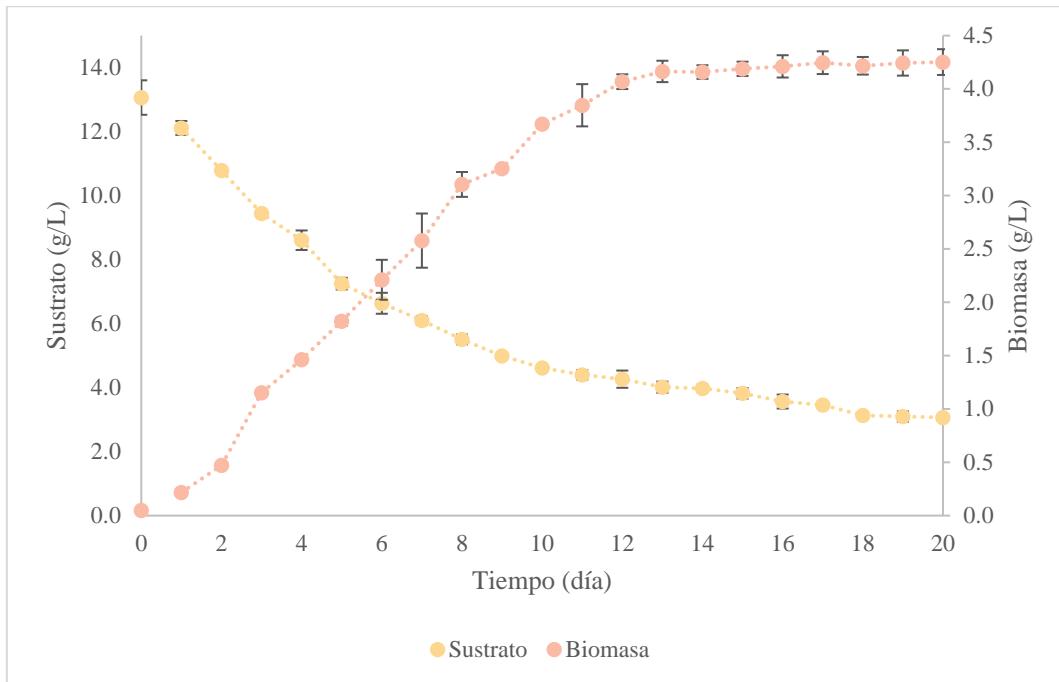
**Cuadro 14. Comparación de parámetros de crecimiento de *K. xylinus* en medio Hestrin-Schramm y medio optimizado según ecuación de Gompertz.**

Parámetro	Medio Hestrin-Schramm (20 g/L de glucosa)	Medio optimizado (13.06 g/L de azúcares reductores)
$C_{max}$ (g/L)	4.229	4.366
$\mu_{max}$ (día <sup>-1</sup> )	0.457	0.477
$R^2$	0.996	0.996

#### 4.6.2. Cinética de consumo de sustrato en medio optimizado

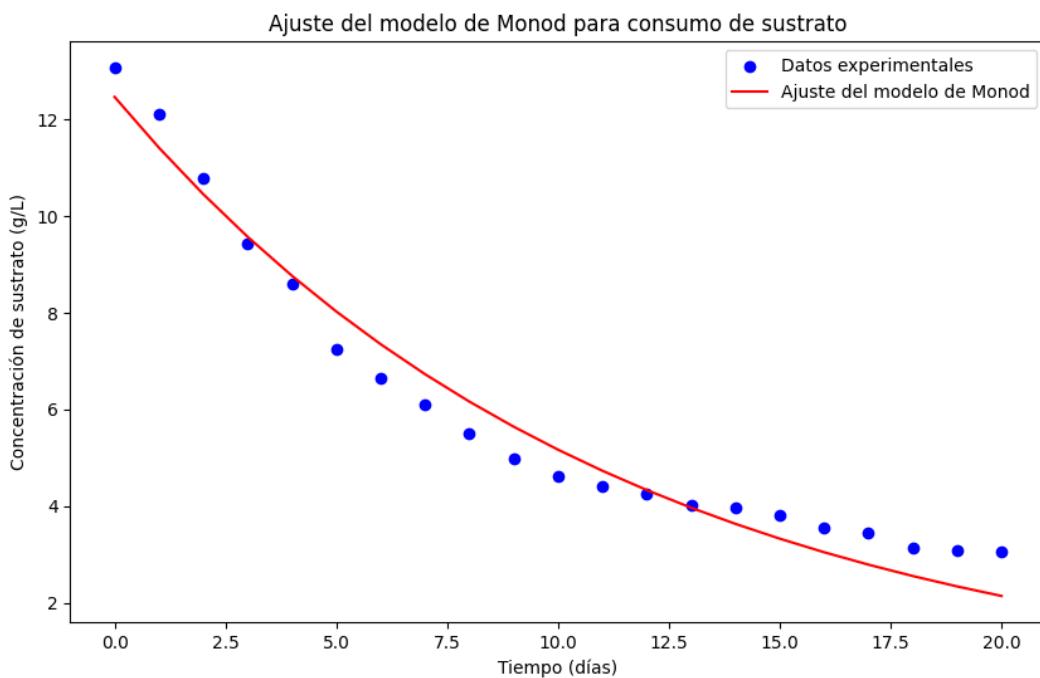
La cinética en el medio optimizado inició con una concentración de azúcares reductores de 13.064 g/L, al finalizar la cinética se registró una concentración de azúcares reductores de 3.065 g/L. La mayor parte del sustrato se consumió hasta el día 10 llegando a 4.616 g/L, luego se consumió lentamente hasta que llegó a los 3.065 g/L de azúcares reductores.

Se mostró un consumo de sustrato del 76.54% del sustrato total, este resultado es más bajo que el reportado en la cinética de consumo de sustrato en medio Hestrin-Schramm.



**Figura 26. Cinética de consumo de sustrato y formación de biomasa de *Komagataeibacter xylinus* NRRL B-758 en medio optimizado.** (●) Concentración de sustrato. (●) Concentración de biomasa. Ajustando pH inicial de 6.0, temperatura de 30°C en condiciones estáticas durante 20 días.

Se realizó el ajuste a modelo matemático de acuerdo al modelo de Monod descrito anteriormente (Figura 27), asimismo, se determinó que el  $K_s$  fue de 1.84 g/L, resultando mayor al que se obtuvo en medio Hestrin-Schramm, además el modelo obtuvo un coeficiente de correlación  $R^2$  de 0.965, lo cual es aceptable debido a que es mayo de 0.95, sin embargo, el ajuste de los resultados obtenidos en el medio Hestrin-Schramm es mayor (0.99).

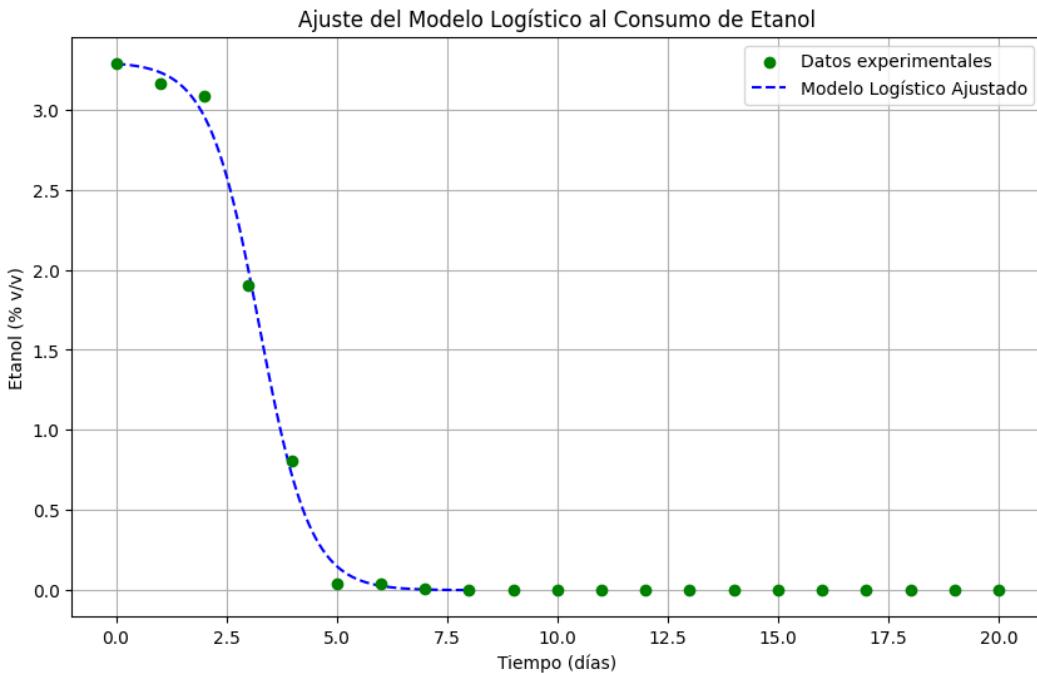


**Figura 27. Consumo de sustrato de *Komagataeibacter xylinus* NRRL B-758 en medio optimizado ajustado al modelo de Monod.** (—) Sustrato de acuerdo con el modelo de Monod. (●) Datos de sustrato obtenidos experimentalmente en condiciones estáticas a 30°C.

#### 4.6.3. Perfil de consumo de etanol en medio optimizado

El perfil de consumo de etanol observado durante el experimento evidenció una dinámica de utilización eficiente del sustrato por parte del microorganismo. Inicialmente, la concentración de etanol en el medio de cultivo fue de 3.284 % v/v, proporcionando una fuente clave de carbono y energía para el desarrollo bacteriano. A lo largo de los días de cultivo, se registró un consumo gradual de etanol, hasta que al octavo día el sustrato fue completamente agotado. Este resultado sugiere un proceso metabólico activo y eficiente durante el periodo de cultivo estático, indicando que las condiciones establecidas fueron favorables para la utilización del etanol como sustrato principal. Estos datos proporcionan una base relevante para entender la cinética de consumo de recursos en el sistema y su relación con la producción de celulosa bacteriana, tal como se observa en la figura 28.

Además, se realizó el ajuste al modelo matemático de ecuación Logística que obtuvo un  $R^2$  de 0.997, que es aceptable debido a que se encuentra por encima de 0.95.



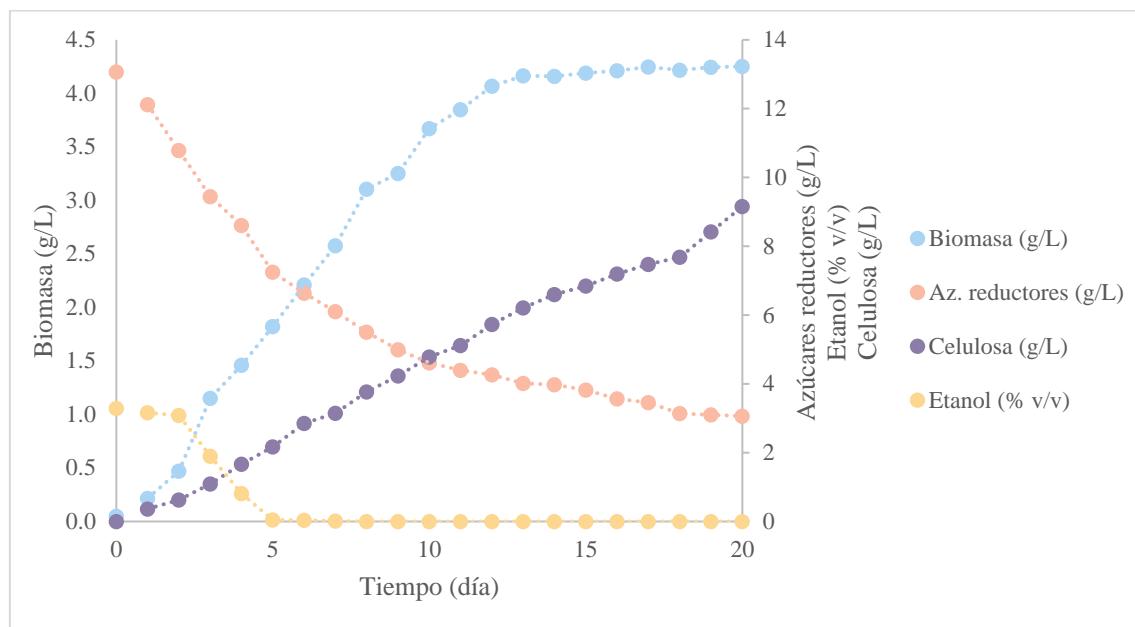
**Figura 28. Consumo de etanol (% v/v) en el tiempo en el cultivo de *K. xylinus* a partir de medio optimizado ajustado al modelo de ecuación Logística. (---)**  
Concentración de etanol ajustado al modelo de ecuación Logística. (●) Datos de concentración de etanol obtenidos experimentalmente en condiciones estáticas a 30°C.

El etanol en el medio se consumió por completo el día 8, siendo entre los días 2 y 5 que se dio el mayor consumo de etanol disminuyendo hasta 0.044% v/v. Estos resultados son similares a los obtenidos por Ryngajllo et al. (2019), quienes reportaron un consumo casi por completo de etanol entre los días 5 y 6.

#### 4.6.4. Cinética de formación de producto en medio optimizado

La evaluación de formación de producto en el tiempo se realizó midiendo la producción de celulosa por cada día, durante 20 días de cultivo. En la figura 29, se puede observar que, en los primeros días, la tasa de producción es moderada, posiblemente debido al periodo de adaptación del microorganismo al medio de cultivo. Sin embargo, a partir del día 2, se observa una tendencia más pronunciada de acumulación de celulosa, indicando

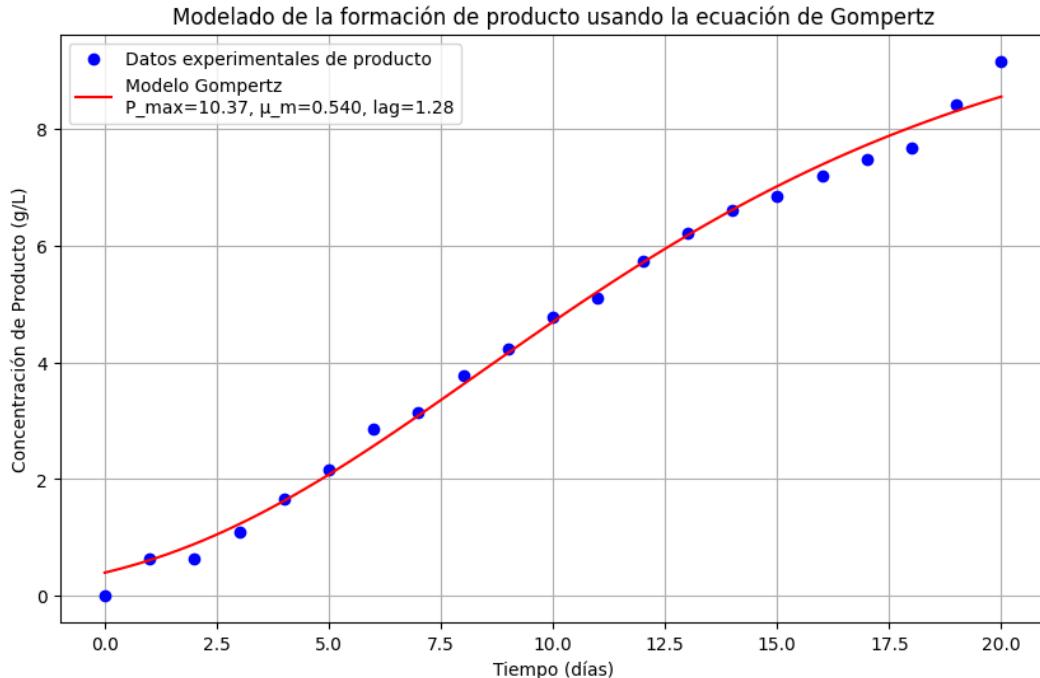
que las células bacterianas han entrado en una fase de producción sostenida. Esta tendencia persiste hasta el día 20, con un aumento lineal continuo. Los errores estándar representados por las barras de error muestran una variabilidad mínima en los datos, lo que sugiere una alta reproducibilidad y consistencia en las condiciones experimentales.



**Figura 29. Cinética de formación de biomasa, consumo de azúcares reductores, consumo de etanol y producción de celulosa por *Komagataeibacter xylinus* NRRL B-758 en medio optimizado.** (●) Concentración de biomasa. (○) Concentración de azúcares reductores. (○) Concentración de etanol. (●) Concentración de celulosa. Ajustando pH inicial de 6.0, temperatura de 30°C en condiciones estáticas durante 20 días.

A partir de los datos obtenidos, la formación de celulosa se modeló mediante la ecuación Gompertz que se realizó en Jupyter Colab. La figura 30 muestra el ajuste al modelo matemático de acuerdo con la ecuación de Gompertz. De acuerdo con el modelo matemático se determinó una fase lag de 1.28 días donde la formación de producto se da de manera moderada, y el modelo determinó que puede existir una formación de producto máxima de 10.37 g/L. Con un coeficiente de correlación de 0.993, se aceptó el ajuste al modelo matemático debido a que supera en 0.95. La formación de celulosa fue

significativamente mayor que la obtenida en medio Hestrin-Schramm, además la fase lag fue más corta en el medio optimizado (1.28), en comparación con la del medio Hestrin-Schramm (2.98)

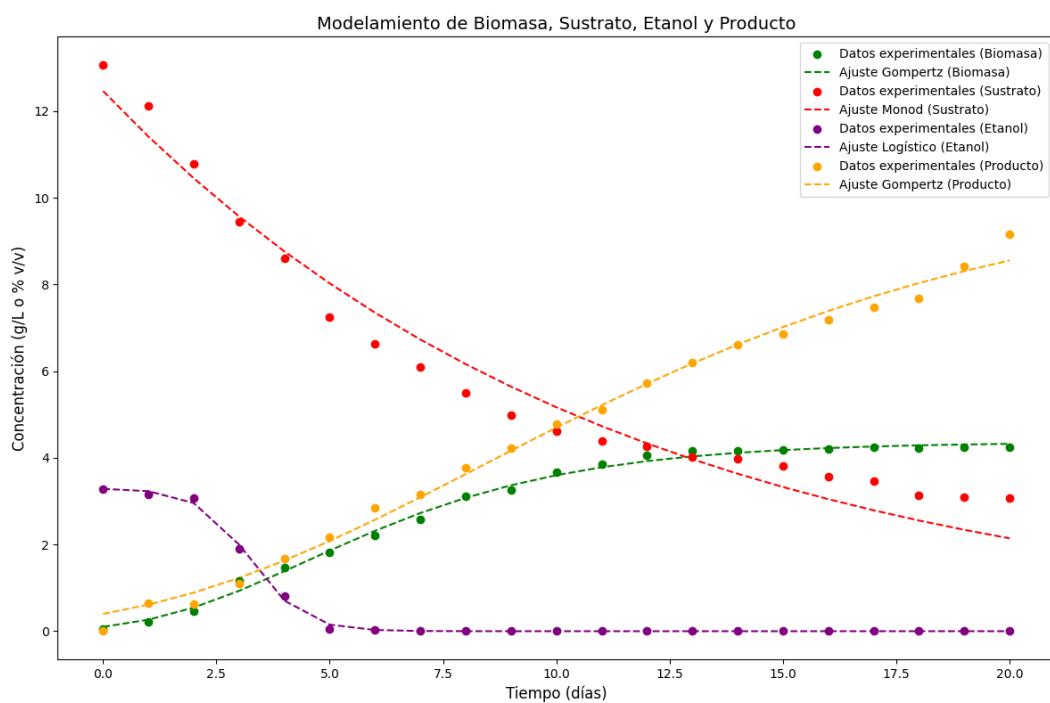


**Figura 30. Producción de BC sintetizada por *Komagataeibacter xylinus* NRRL B-758 ajustado al modelo de Monod.** (–) Formación de producto según modelo de Gompertz. (●) Datos de producto obtenidos experimentalmente en condiciones estáticas a 30°C.

En la figura 31, se observa una relación dinámica entre la biomasa, el sustrato, el etanol y el producto, que permite inferir cómo se vinculan estos parámetros en el bioproceso. El crecimiento de biomasa (representado por la curva de Gompertz) muestra un comportamiento sigmoideo, típico de los procesos microbianos. Este crecimiento parece estar directamente relacionado con el consumo de sustrato, dado que la concentración de este último (ajustada con el modelo de Monod) disminuye a medida que la biomasa aumenta, lo cual indica que el sustrato es utilizado como fuente principal de carbono y energía para la proliferación celular.

En cuanto al producto, su acumulación (modelada también con Gompertz) muestra una tendencia que sigue el crecimiento de la biomasa, lo que sugiere que su producción podría estar asociada a la actividad metabólica del microorganismo durante su fase de crecimiento. Esto indica que la formación del producto podría depender de la viabilidad y el metabolismo activo de las células.

Por otro lado, la curva de etanol, ajustada mediante un modelo logístico, muestra un que se consumió rápidamente. Esto sugiere que el etanol podría estar actuando como un inductor en el metabolismo bacteriano. Su consumo temprano podría estar relacionado con una regulación metabólica que permitió a las células optimizar el uso del sustrato.



**Figura 31. Crecimiento de biomasa, consumo de sustrato, consumo de etanol y formación de producto en medio optimizado con extracto acuoso de orujo de uva y etanol ajustado a modelos matemáticos.** (●) Datos experimentales de crecimiento de biomasa. (—) Ajuste a modelo matemático de biomasa según el modelo de Gompertz. (●) Datos experimentales de consumo de sustrato. (—) Ajuste a modelo matemático de consumo de sustrato según el modelo de Monod. (●) Datos experimentales de consumo de etanol. (—) Ajuste a modelo matemático de consumo de etanol según el modelo

Logístico. (●) Datos experimentales de formación de producto. (---) Ajuste a modelo matemático de producto según el modelo de Gompertz.

Al concluir los 20 días de cultivo del medio optimizado se logró una concentración de celulosa de 9.154 g/L de celulosa bacteriana, con una productividad de 0.458 g/L\*día, y un rendimiento de sustrato en producto de 0.915 g/g, estos parámetros son distintos a los obtenidos en la validación de la optimización debido a que la cinética se realizó hasta el día 20 de cultivo, mientras que, la validación del óptimo se realizó en 20.25 días que se determinó como el tiempo óptimo de acuerdo con el diseño estadístico. Al comparar estos parámetros de la cinética con medio Hestrin Schramm y la cinética del medio optimizado con extracto acuoso de orujo de uva y etanol (Cuadro 15), se pudo observar que, el medio optimizado aún sin tener una alta cantidad de azúcares reductores (13 g/L) en comparación con el medio Hestrin Schramm (20 g/L de glucosa), logró mejores parámetros esto debido a la adición de etanol en el medio. Los altos rendimientos obtenidos se le atribuyen al uso de etanol y otros compuestos carbonados presentes en el orujo de uva. A partir del análisis DNS se puede inferir que existen más azúcares además de la glucosa presente en el extracto acuoso de orujo de uva, debido a las referencias se trataría de fructosa, un azúcar reductor que puede ser usado por *Komagataeibacter xylinus* en la producción de celulosa (Jin et al., 2019; A. R. Machado et al., 2024).

**Cuadro 15. Parámetros obtenidos en cinética con medio Hestrin Schramm, medio sin optimización y medio optimizado con extracto acuoso de orujo de uva y etanol.**

Parámetros	Medio HS sin etanol (20 días, 20 g/L glucosa)	Medio sin optimización (30.11 días, 11.35 g/L azúcares red., 3% v/v etanol)	Medio optimizado (20 días, 13.06 g/L azúcares red., 3.29% v/v etanol)
$\mu$ (día <sup>-1</sup> )	0.457	-	0.477
P (g/L)	7.88	9.46	9.154

$Q_P$ (g/L*día)	0.394	0.314	0.458
$Y_{P/S}$ (g/g)	0.399	0.836	0.915

$\mu$ : Parámetro cinético de velocidad específica de crecimiento, P: Producción de celulosa bacteriana (g/L),  $Q_P$ : productividad de celulosa bacteriana (g/L\*día),  $Y_{P/S}$ : rendimiento de sustrato en producto (g celulosa/g sustrato).

## V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

- Se determinaron los valores óptimos de tiempo de cultivo (20.25 días), concentración de etanol (3.29% v/v) y extracto acuoso de orujo de uva (38.56% v/v) que permitieron maximizar la producción de celulosa bacteriana en cultivos estáticos de *Komagataeibacter xylinus*, demostrando que estos factores tienen un impacto significativo en bioproceso.
- La caracterización fisicoquímica del extracto acuoso de orujo de uva reveló 32.1 g/L de azúcares reductores y 20.9 g/L de glucosa.
- El análisis cinético mostró que la formación de biomasa, el consumo de sustrato y la producción de celulosa bacteriana por *K. xylinus* en medio Hestrin Schramm mostró una velocidad específica de crecimiento de  $0.457 \text{ día}^{-1}$ , un consumo del 95% de la fuente de carbono, y una producción de celulosa máxima de 7.88 g/L a los 20 días de cultivo.
- El tiempo de cultivo, la concentración de etanol y el extracto acuoso de orujo de uva influyeron significativamente en la producción de celulosa bacteriana.
- Los resultados obtenidos en el diseño experimental alcanzaron niveles óptimos de cada variable de respuesta en diferentes combinaciones de los niveles llegando a 9.06 g/L de celulosa,  $0.518 \text{ g/L} \cdot \text{día}$  en productividad y  $1.133 \frac{\text{g producto}}{\text{g sustrato}}$  en rendimiento, evidenciando la viabilidad del uso del orujo de uva como alternativa al medio comercial estándar.
- Los valores óptimos de las variables determinadas mediante el diseño experimental de superficie de respuesta (RSM) mostraron una alta correlación con los datos experimentales, validando la robustez del modelo propuesto.

- La validación experimental confirmó la precisión del óptimo estadístico, obteniéndose valores semejantes a los previstos por el modelo, lo que respalda la aplicabilidad del diseño experimental para optimizar el proceso.
- Los datos experimentales se ajustaron con éxito a modelos de Gompertz para biomasa, Monod para sustrato y de Gompertz para la producción de celulosa. Estos modelos describieron de manera adecuada la dinámica del proceso, proporcionando parámetros clave para comprender y optimizar la producción de celulosa bacteriana en cultivos estáticos ya sea a partir de medio comercial Hestrin-Schramm y medio alternativo optimizado.

## **5.2. Recomendaciones**

- Realizar estudios de escalamiento del proceso, los prometedores resultados permiten que se realice un escalamiento del proceso para hacerlo más rentable industrialmente.
- Realizar un análisis de viabilidad económica y ambiental, de este modo se puede determinar el impacto de costos a partir del reemplazo de fuente de carbono por sustratos alternativos, además, un análisis ambiental permite que se concientice sobre el impacto ambiental de utilizar residuos como materia prima de producción de biopolímeros.
- Explorar aplicaciones de la celulosa bacteriana en nuevos campos que puedan aplicarse en el Perú, de esta manera se podría generar una industria biotecnológica sostenible nacional.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aditya, T., Allain, J. P., Jaramillo, C., & Restrepo, A. M. (2022). Surface Modification of Bacterial Cellulose for Biomedical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2). <https://doi.org/10.3390/ijms23020610>
- Aki, D., Ulag, S., Unal, S., Sengor, M., Eken, N., Lin, C. C., Yilmazer, H., Ustundag, C. B., Kalaskar, D. M., & Gunduz, O. (2020). 3D printing of PVA/hexagonal boron nitride/bacterial cellulose composite scaffolds for bone tissue engineering. *Materials & Design*, 196, 109094. <https://doi.org/10.1016/J.MATDES.2020.109094>
- Akintunde, M. O., Adebayo-Tayo, B. C., Ishola, M. M., Zamani, A., & Horváth, I. S. (2022). Bacterial Cellulose Production from agricultural Residues by two *Komagataeibacter* sp. Strains. *Bioengineered*, 13(4), 10010. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2062970>
- AL-Kalifawi, E. J., & Hassan, I. A. (2014). Factors Influence on the yield of Bacterial Cellulose of Kombucha (Khubdat Humza). *Baghdad Science Journal*, 11(3), 1420–1428. <https://doi.org/10.21123/BSJ.2014.11.3.1420-1428>
- Alcazar-Ruiz, A., Dorado, F., & Sanchez-Silva, L. (2021). Fast pyrolysis of agroindustrial wastes blends: Hydrocarbon production enhancement. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 157, 105242. <https://doi.org/10.1016/J.JAAP.2021.105242>
- Aldosari, O. F., Jabli, M., & Morad, M. H. (2023). Chemical Extraction of Cellulose from Ligno-cellulosic *Astragalus armatus* Pods: Characterization, and application to the biosorption of methylene blue. *Arabian Journal of Chemistry*, 105019. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2023.105019>
- Almeida, T., Silvestre, A. J. D., Vilela, C., & Freire, C. S. R. (2021). Bacterial Nanocellulose toward Green Cosmetics: Recent Progresses and Challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 22. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:232380525>
- Amaya Chantaca, D., Flores-Gallegos, A. C., Iliná, A., Aguilar, C., Sepúlveda, L., Ascacio-Valdés, J., Prado, L. A., & Chávez, M. L. (2021). *La industria vinícola como fuente de valiosos residuos agroindustriales*. 123–145.
- Andritsou, V., De Melo, E. M., Tsouko, E., Ladakis, D., Maragkoudaki, S., Koutinas, A. A., & Matharu, A. S. (2018). Synthesis and Characterization of Bacterial Cellulose from Citrus-Based Sustainable Resources. *ACS Omega*, 3(8), 10365–10373. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01315>

- Andy Huatatoca, L. S. (2020). *Elaboración de papel artesanal a base de los residuos vegetales de los tallos de maíz (*Zea Mays L.*) y cáscara de plátano (*Musa Paradisiaca L.*) utilizando métodos químicos de Jayme-Wise, Kurshner y Hoffner*. Universidad Nacional de Chimborazo.
- Anwar, Z., Gulfraz, M., & Irshad, M. (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(2), 163–173. <https://doi.org/10.1016/J.JRRAS.2014.02.003>
- Aswini, K., Gopal, N. O., & Uthandi, S. (2020). Optimized culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter senegalensis* MA1. *BMC Biotechnology*, 20(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S12896-020-00639-6/TABLES/4>
- Atta, O. M., Manan, S., Ahmed, A. A. Q., Awad, M. F., Ul-Islam, M., Subhan, F., Ullah, M. W., & Yang, G. (2021). Development and Characterization of Yeast-Incorporated Antimicrobial Cellulose Biofilms for Edible Food Packaging Application. *Polymers* 2021, Vol. 13, Page 2310, 13(14), 2310. <https://doi.org/10.3390/POLYM13142310>
- Barshan, S., Rezazadeh-Bari, M., Almasi, H., & Amiri, S. (2019). Optimization and characterization of bacterial cellulose produced by *Komagataeibacter xylinus* PTCC 1734 using vinasse as a cheap cultivation medium. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 1188–1195. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.06.192>
- Barud, H. S., Gutierrez, J., Lustri, W. R., Peres, M. F. S., Ribeiro, S. J. L., Saska, S., & Tercjak, A. (2016). Bacterial Cellulose. *Biomaterials from Nature for Advanced Devices and Therapies*, 384–399. <https://doi.org/10.1002/9781119126218.CH21>
- Bayir, E., Bilgi, E., Hames, E. E., & Sendemir, A. (2019). Production of hydroxyapatite–bacterial cellulose composite scaffolds with enhanced pore diameters for bone tissue engineering applications. *Cellulose*, 26(18), 9803–9817. <https://doi.org/10.1007/S10570-019-02763-9/METRICS>
- Bertran, E., Sort, X., Soliva, M., & Trillas, I. (2004). Composting winery waste: sludges and grape stalks. *Bioresource Technology*, 95(2), 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.07.012>
- Blanco, F. G., Hernández, N., Rivero-Buceta, V., Maestro, B., Sanz, J. M., Mato, A., Hernández-Arriaga, A. M., & Prieto, M. A. (2021). From Residues to Added-Value Bacterial Biopolymers as Nanomaterials for Biomedical Applications. *Nanomaterials*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/NANO11061492>

- Brown, A. J. (1886). XLIII.—On an acetic ferment which forms cellulose. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 49(0), 432–439.  
<https://doi.org/10.1039/CT8864900432>
- Calderón Toledo, S. V. (2022). *Producción de celulosa por Komagataeibacter sp. SU12 usando extracto de Mangifera indica (mango) para su potencial aplicación biotecnológica* [Universidad Nacional Mayor de San Marcos].  
<https://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/3101466>
- Canalejo, D., Guadalupe, Z., Martínez-Lapuente, L., Ayestarán, B., Pérez-Magariño, S., & Doco, T. (2022). Characterization of polysaccharide extracts recovered from different grape and winemaking products. *Food Research International*, 157, 111480. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2022.111480>
- Carreira, P., Mendes, J. A. S., Trovatti, E., Serafim, L. S., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., & Neto, C. P. (2011). Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. *Bioresource Technology*, 102(15), 7354–7360. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2011.04.081>
- Cazón, P., Puertas, G., & Vázquez, M. (2022). Production and Characterization of Active Bacterial Cellulose Films Obtained from the Fermentation of Wine Bagasse and Discarded Potatoes by *Komagataeibacter xylinus*. *Polymers*, 14(23).  
<https://doi.org/10.3390/POLYM14235194>
- Cerrutti, P., Roldán, P., García, R. M., Galvagno, M. A., Vázquez, A., & Foresti, M. L. (2016). Production of bacterial nanocellulose from wine industry residues: Importance of fermentation time on pellicle characteristics. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(14). <https://doi.org/10.1002/APP.43109>
- Chantereau, G., Sharma, M., Abednejad, A., Vilela, C., Costa, E. M., Veiga, M., Antunes, F., Pintado, M. M., Sèbe, G., Coma, V., Freire, M. G., Freire, C. S. R., & Silvestre, A. J. D. (2020). Bacterial nanocellulose membranes loaded with vitamin B-based ionic liquids for dermal care applications. *Journal of Molecular Liquids*, 302, 112547. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112547>
- Chávez-Pacheco, J. L., Martínez-Yee, S., Contreras-Zentella, M., & Escamilla-Marván, E. (2004). Celulosa bacteriana en gluconacetobacter xylinum: biosíntesis y aplicaciones. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 7(1), 18–25.  
[http://repositorio.pediatrica.gob.mx:8180/bitstream/20.500.12103/3137/1/artinvest2004\\_36.pdf](http://repositorio.pediatrica.gob.mx:8180/bitstream/20.500.12103/3137/1/artinvest2004_36.pdf)
- Choi, S. M., Rao, K. M., Zo, S. M., Shin, E. J., & Han, S. S. (2022). Bacterial Cellulose

- and Its Applications. *Polymers*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/POLYM14061080>
- Choi, S. M., & Shin, E. J. (2020). The Nanofication and Functionalization of Bacterial Cellulose and Its Applications. *Nanomaterials*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/NANO10030406>
- Cielecka, I., Ryngajłło, M., Maniukiewicz, W., & Bielecki, S. (2021a). Response surface methodology-based improvement of the yield and differentiation of properties of bacterial cellulose by metabolic enhancers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 187, 584–593. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.07.147>
- Cielecka, I., Ryngajłło, M., Maniukiewicz, W., & Bielecki, S. (2021b). Highly stretchable bacterial cellulose produced by komagataeibacter hansenii si1. *Polymers*, 13(24), 4455. <https://doi.org/10.3390/POLYM13244455/S1>
- Coelho, R. M. D., Almeida, A. L. de, Amaral, R. Q. G. do, Mota, R. N. da, & Sousa, P. H. M. de. (2020). Kombucha: Review. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 22, 100272. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100272>
- Costa, A. F. S., Almeida, F. C. G., Vinhas, G. M., & Sarubbo, L. A. (2017). Production of bacterial cellulose by Gluconacetobacter hansenii using corn steep liquor as nutrient sources. *Frontiers in Microbiology*, 8(OCT), 282716. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.02027/BIBTEX>
- Cox, D. (2007). Response Surfaces, Mixtures, and Ridge Analyses, 2nd Edition by George E.P. Box, Norman R. Draper. *International Statistical Review*, 75, 265–266. [https://doi.org/10.1111/j.1751-5823.2007.00015\\_17.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-5823.2007.00015_17.x)
- Cruz Zúñiga, K. A. (2015). *Producción de celulosa microbiana a partir de cepas nativas de Gluconacetobacter sp . obtenidas de diferentes fuentes en cultivo batch (Tesis de bachiller)*. Universidad Católica de Santa María. <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/3423>
- Da, Y., Qu, Q., Kong, L., Liu, Q., Zhu, M., Du, Y., Tian, X., Liu, Y., & Wang, H. (2023). A high-performance, oxidation resistance and flexible Zn@MXene/cellulose nanofibers electromagnetic shielding film. *RSC Advances*, 13(10), 6619. <https://doi.org/10.1039/D2RA07791D>
- De Oliveira, L. G. S., & Negro, S. O. (2019). Contextual structures and interaction dynamics in the Brazilian Biogas Innovation System. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 107, 462–481. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2019.02.030>
- de Souza, S. S., Berti, F. V., de Oliveira, K. P. V., Pittella, C. Q. P., de Castro, J. V.,

- Pelissari, C., Rambo, C. R., & Porto, L. M. (2019). Nanocellulose biosynthesis by *Komagataeibacter hansenii* in a defined minimal culture medium. *Cellulose*, 26(3), 1641–1655. <https://doi.org/10.1007/S10570-018-2178-4/METRICS>
- Elsayed, I. G., Tokareva, M. I., & Mironov, M. A. (2020). *Preparation of modified microbial polysaccharides and their use for microencapsulation*. Актуальные вопросы органической химии и биотехнологии.—Екатеринбург.
- Esser, V. M. B., Dacechen, D. G., Aparecido, L., Souza, A. G. de, & Krause, R. (2024). Caracterização química e atividade antioxidante em diferentes cultivares de uva. *Anais Da Feira Do Conhecimento Tecnológico e Científico*, 1(24 SE-Ciências Agrárias-Agronomia).
- <https://publicacoes.ifc.edu.br/index.php/fetec/article/view/5108>
- Evtuguin, D., Aniceto, J. P. S., Marques, R., Portugal, I., Silva, C. M., Serafim, L. S., & Xavier, A. M. R. B. (2024). Obtaining Value from Wine Wastes: Paving the Way for Sustainable Development. *Fermentation*, 10(1), 24. <https://doi.org/10.3390/fermentation10010024>
- FAO. (2010). *Bioenergía y seguridad alimentaria BEFS*. <https://www.fao.org/4/i1712s/i1712s.pdf>
- Faria, M., Cunha, C., Gomes, M., Mendonça, I., Kaufmann, M., Ferreira, A., & Cordeiro, N. (2022). Bacterial cellulose biopolymers: The sustainable solution to water-polluting microplastics. *Water Research*, 222, 118952. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2022.118952>
- Fernandes, F., Ramalhosa, E., Pires, P., Verdial, J., Valentão, P., Andrade, P., Bento, A., & Pereira, J. A. (2013). *Vitis vinifera* leaves towards bioactivity. *Industrial Crops and Products*, 43, 434–440. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.031>
- Fernandes, I., Pedro, A. C., Ribeiro, V. R., Bortolini, D. G., Ozaki, M. S. C., Maciel, G. M., & Haminiuk, C. W. I. (2020). Bacterial cellulose: From production optimization to new applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 2598–2611. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.07.255>
- Fonseca, D. F. S., Vilela, C., Pinto, R. J. B., Bastos, V., Oliveira, H., Catarino, J., Faísca, P., Rosado, C., Silvestre, A. J. D., & Freire, C. S. R. (2021). Bacterial nanocellulose-hyaluronic acid microneedle patches for skin applications: In vitro and in vivo evaluation. *Materials Science and Engineering: C*, 118, 111350. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111350>

- Frincu, M., Dumitache, C., Petre, A., Mot, A., Teodorescu, R., BARBULESCU, D., Tudor, V., & (Radoi) Matei, F. (2023). Physico-chemical characterization of some sources of grape marc from pietroasa vineyard. *AgroLife Scientific Journal*, 12, 81–86. <https://doi.org/10.17930/AGL2023110>
- Fuentes, R. A., Berthe, J. A., Barbosa, S. E., & Castillo, L. A. (2021). Development of biodegradable pots from different agroindustrial wastes and byproducts. *Sustainable Materials and Technologies*, 30, e00338. <https://doi.org/10.1016/J.SUSMAT.2021.E00338>
- García Hernández, N. (2019). *Estudio cuantitativo y composicional sobre biofilms (Tesis de maestría)* [Universidad Autónoma de Barcelona]. [https://ddd.uab.cat/pub/trerecpro/2019/hdl\\_2072\\_366008/TFM\\_ngarciahernandez.pdf](https://ddd.uab.cat/pub/trerecpro/2019/hdl_2072_366008/TFM_ngarciahernandez.pdf)
- Gonçalves, S., Rodrigues, I. P., Padrão, J., Silva, J. P., Sencadas, V., Lanceros-Mendez, S., Girão, H., Gama, F. M., Dourado, F., & Rodrigues, L. R. (2016). Acetylated bacterial cellulose coated with urinary bladder matrix as a substrate for retinal pigment epithelium. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 139, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2015.11.051>
- Gorostiza Sáez de Abad, A. (2022). *Valorización de residuos de la vinificación: semillas de uva como fuente de productos de interés para la industria alimentaria*. [Universidad del País Vasco]. <http://addi.ehu.es/handle/10810/60182>
- Grande Tovar, C. D. (2016). *Valoración biotecnológica de residuos agrícolas y agroindustriales*. Editorial Bonaventuriana. <https://bibliotecadigital.usb.edu.co/server/api/core/bitstreams/5baac6ba-065e-4f8f-822d-4a9f0b82441d/content>
- Guimarães, D. T., de Oliveira Barros, M., de Araújo e Silva, R., Silva, S. M. F., de Almeida, J. S., de Freitas Rosa, M., Gonçalves, L. R. B., & Brígida, A. I. S. (2023). Superabsorbent bacterial cellulose film produced from industrial residue of cashew apple juice processing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 242, 124405. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.124405>
- Gupta, P. K., Raghunath, S. S., Prasanna, D. V., Venkat, P., Shree, V., Chithananthan, C., Choudhary, S., Surender, K., & Geetha, K. (2019). *An Update on Overview of Cellulose, Its Structure and Applications* (M. E. E. Martín (ed.); p. Ch. 4). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84727>
- Güzel, M., & Akpinar, Ö. (2019). Production and Characterization of Bacterial Cellulose

- from Citrus Peels. *Waste and Biomass Valorization*, 10(8), 2165–2175. <https://doi.org/10.1007/S12649-018-0241-X>/METRICS
- Heinze, T. (2016). Cellulose: Structure and Properties. In O. J. Rojas (Ed.), *Cellulose Chemistry and Properties: Fibers, Nanocelluloses and Advanced Materials* (pp. 1–52). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/12\\_2015\\_319](https://doi.org/10.1007/12_2015_319)
- Heo, M.-S., & Son, H.-J. (2002). Development of an optimized, simple chemically defined medium for bacterial cellulose production by Acetobacter sp. A9 in shaking cultures. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 36(1), 41–45. <https://doi.org/10.1042/BA20020018>
- Hestrin, S., & Schramm, M. (1954). Synthesis of cellulose by Acetobacter xylinum. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemical Journal*, 58(2), 345–352. <https://doi.org/10.1042/BJ0580345>
- Hobzova, R., Hrib, J., Sirc, J., Karpushkin, E., Michalek, J., Janouskova, O., & Gatenholm, P. (2018). Embedding of Bacterial Cellulose Nanofibers within PHEMA Hydrogel Matrices: Tunable Stiffness Composites with Potential for Biomedical Applications. *Journal of Nanomaterials*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5217095>
- Hussain, Z., Sajjad, W., Khan, T., & Wahid, F. (2019). Production of bacterial cellulose from industrial wastes: a review. In *Cellulose* (Vol. 26, Issue 5, pp. 2895–2911). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s10570-019-02307-1>
- Hussein, S., Halmi, M. I. E., & Ling, A. P. K. (2017). The modified Gompertz model demonstrates a variable growth rate between two Centella asiatica phenotypes. *Journal of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology*, 5(1 SE-Articles), 18–20. <https://doi.org/10.54987/jobimb.v5i1.335>
- Hutchens, S. A., León, R. V., O'Neill, H. M., & Evans, B. R. (2007). Statistical analysis of optimal culture conditions for Gluconacetobacter hansenii cellulose production. *Letters in Applied Microbiology*, 44(2), 175–180. <https://doi.org/10.1111/J.1472-765X.2006.02055.X>
- Jia, Y., Zhu, W., Zheng, M., Huo, M., & Zhong, C. (2018). Bacterial cellulose/hyaluronic acid composite hydrogels with improved viscoelastic properties and good thermodynamic stability. <Https://Doi.Org/10.1080/14658011.2018.1447340>, 47(4), 165–175. <https://doi.org/10.1080/14658011.2018.1447340>
- Jin, Q., O'Hair, J., Stewart, A. C., O'Keefe, S. F., Neilson, A. P., Kim, Y. T., McGuire, M., Lee, A., Wilder, G., & Huang, H. (2019). Compositional characterization of

- different industrial white and red grape pomaces in Virginia and the potential valorization of the major components. *Foods*, 8(12). <https://doi.org/10.3390/foods8120667>
- Joshi, S. M., Gogate, P. R., & Suresh Kumar, S. (2018). Intensification of esterification of karanja oil for production of biodiesel using ultrasound assisted approach with optimization using response surface methodology. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 124, 186–198. <https://doi.org/10.1016/J.CEP.2017.12.010>
- Kadier, A., Ilyas, R. A., Huzaifah, M. R. M., Harihastuti, N., Sapuan, S. M., Harussani, M. M., Azlin, M. N. M., Yuliasni, R., Ibrahim, R., Atikah, N., Wang, J., Chandrasekhar, K., Islam, A., Sharma, S., Punia, S., Rajasekar, A., Asyraf, M. R. M., Ishak, M. R., & Puglia, D. (2021). *polymers Use of Industrial Wastes as Sustainable Nutrient Sources for Bacterial Cellulose (BC) Production: Mechanism, Advances, and Future Perspectives*. <https://doi.org/10.3390/polym>
- Kalman, D. (2023). Verhulst Discrete Logistic Growth. *Mathematics Magazine*, 96(3), 244–258. <https://doi.org/10.1080/0025570X.2023.2199676>
- Kargi, F. (2009). Re-interpretation of the logistic equation for batch microbial growth in relation to Monod kinetics. *Letters in Applied Microbiology*, 48(4), 398–401. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02537.x>
- Keshk, S. M. A. S. (2014). Vitamin C enhances bacterial cellulose production in *Gluconacetobacter xylinus*. *Carbohydrate Polymers*, 99, 98–100. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2013.08.060>
- Khan, H., Saroha, V., Raghuvanshi, S., Bharti, A. K., & Dutt, D. (2021). Valorization of fruit processing waste to produce high value-added bacterial nanocellulose by a novel strain *Komagataeibacter xylinus* IITR DKH20. *Carbohydrate Polymers*, 260, 117807. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2021.117807>
- Koç, İ., Şarkaya, K., Türkmen, D., Aşır, S., & Denizli, A. (2023). Preparation of Immobilised 17 $\beta$ -Estradiol-Imprinted Nanoparticles onto Bacterial Cellulose Nanofibres to Use for the Removal of 17 $\beta$ -Estradiol from Wastewater. *Polymers*, 15(5). <https://doi.org/10.3390/POLYM15051201>
- Kuo, C. H., Huang, C. Y., Shieh, C. J., Wang, H. M. D., & Tseng, C. Y. (2019). Hydrolysis of Orange Peel with Cellulase and Pectinase to Produce Bacterial Cellulose using *Gluconacetobacter xylinus*. *Waste and Biomass Valorization*, 10(1), 85–93. <https://doi.org/10.1007/S12649-017-0034-7/METRICS>

- Lahiri, D., Nag, M., Dutta, B., Dey, A., Sarkar, T., Pati, S., Edinur, H. A., Abdul Kari, Z., Mohd Noor, N. H., & Ray, R. R. (2021). Bacterial Cellulose: Production, Characterization, and Application as Antimicrobial Agent. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222312984>
- Lasagni, F., Cassanelli, S., & Gullo, M. (2024). How carbon sources drive cellulose synthesis in two *Komagataeibacter xylinus* strains. *Scientific Reports*, 14(1), 20494. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-71648-0>
- Lebrilla, C. B., Liu, J., Widmalm, G., & Prestegard, J. H. (2022). Oligosaccharides and Polysaccharides. In *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/GLYCOBIOLOGY.4E.3>
- Li, G., Wang, L., Deng, Y., & Wei, Q. (2022). Research progress of the biosynthetic strains and pathways of bacterial cellulose. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 49(1). <https://doi.org/10.1093/jimb/kuab071>
- Li, Y., Qing, S., Zhou, J., & Yang, G. (2014). Evaluation of bacterial cellulose/hyaluronan nanocomposite biomaterials. *Carbohydrate Polymers*, 103(1), 496–501. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2013.12.059>
- Li, Z., Chen, S. Q., Cao, X., Li, L., Zhu, J., & Yu, H. (2021). Effect of pH Buffer and Carbon Metabolism on the Yield and Mechanical Properties of Bacterial Cellulose Produced by *Komagataeibacter hansenii* ATCC 53582. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 31(3), 429–438. <https://doi.org/10.4014/JMB.2010.10054>
- Liu, M., Liu, L., Jia, S., Li, S., Zou, Y., & Zhong, C. (2018). Complete genome analysis of *Gluconacetobacter xylinus* CGMCC 2955 for elucidating bacterial cellulose biosynthesis and metabolic regulation. *Scientific Reports*, 8(1), 6266. <https://doi.org/10.1038/S41598-018-24559-W>
- López-Astorga, M., Molina-Domínguez, C. C., Ovando-Martínez, M., & Leon-Bejarano, M. (2023). Orujo de Uva: Más que un Residuo, una Fuente de Compuestos Bioactivos. *EPISTEMUS*, 16(33 SE-Ciencia, Tecnología y Sociedad), 115–122. <https://doi.org/10.36790/epistemus.v16i33.283>
- Lustri, W. R., Barud, H. G. de O., SilvaBarud, H. da, Peres, M. F. S., Gutierrez, J., Tercjak, A., Junior, O. B. de O., Ribeiro, S. J. L., Lustri, W. R., Barud, H. G. de O., SilvaBarud, H. da, Peres, M. F. S., Gutierrez, J., Tercjak, A., Junior, O. B. de O., & Ribeiro, S. J. L. (2015). Microbial Cellulose — Biosynthesis Mechanisms and Medical Applications. *Cellulose - Fundamental Aspects and Current Trends*. <https://doi.org/10.5772/61797>

- Ma, N., Cheung, D. Y., & Butcher, J. T. (2022). Incorporating nanocrystalline cellulose into a multifunctional hydrogel for heart valve tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 110(1), 76–91. <https://doi.org/10.1002/JBM.A.37267>
- Machado, A. R., Voss, G. B., Machado, M., Paiva, J. A. P., Nunes, J., & Pintado, M. (2024). Chemical characterization of the cultivar ‘Vinhão’ (*Vitis vinifera L.*) grape pomace towards its circular valorisation and its health benefits. *Measurement: Food*, 15, 100175. <https://doi.org/10.1016/j.meafoo.2024.100175>
- Machado, R. T. A., Meneguin, A. B., Sábio, R. M., Franco, D. F., Antonio, S. G., Gutierrez, J., Tercjak, A., Berretta, A. A., Ribeiro, S. J. L., Lazarini, S. C., Lustri, W. R., & Barud, H. S. (2018). *Komagataeibacter rhaeticus* grown in sugarcane molasses-supplemented culture medium as a strategy for enhancing bacterial cellulose production. *Industrial Crops and Products*, 122, 637–646. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2018.06.048>
- Maier, R. M., & Pepper, I. L. (2015). *Chapter 3 - Bacterial Growth* (I. L. Pepper, C. P. Gerba, & T. J. B. T.-E. M. (Third E. Gentry (eds.); pp. 37–56). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00003-X>
- Manojkumar, N., Muthukumaran, C., & Sharmila, G. (2022). A comprehensive review on the application of response surface methodology for optimization of biodiesel production using different oil sources. *Journal of King Saud University - Engineering Sciences*, 34(3), 198–208. <https://doi.org/10.1016/J.JKSUES.2020.09.012>
- Marcelo Aldana, M. D., Bizzo, W. A., & Alamo Viera, M. V. (2016). Evaluación Del Potencial Energético De Los Residuos De La Caña De Azúcar En El Perú. *XXIII Simposio Peruano de Energía Solar y Del Ambiente (XXIII-SPES)*, Huancayo, 14–19. [https://www.researchgate.net/publication/318020087\\_evaluacion\\_del\\_potencial\\_en\\_ergetico\\_de\\_los\\_residuos\\_de\\_la\\_cana\\_de\\_azucar\\_en\\_el\\_peru](https://www.researchgate.net/publication/318020087_evaluacion_del_potencial_en_ergetico_de_los_residuos_de_la_cana_de_azucar_en_el_peru)
- Mardawati, E., Rahmah, D. M., Rachmadona, N., Saharina, E., Pertiwi, T. Y. R., Zahrad, S. A., Ramdhani, W., Srikanth, Y., Ratnasingham, D., Endah, E. S., Andriani, D., Khoo, K. S., Pasaribu, K. M., Satoto, R., & Karina, M. (2023). Pineapple core from the canning industrial waste for bacterial cellulose production by *Komagataeibacter xylinus*. *Heliyon*, 9(11), e22010. <https://doi.org/10.1016/J.HELION.2023.E22010>
- Mármol, I., Quero, J., Ibarz, R., Ferreira-Santos, P., Teixeira, J. A., Rocha, C. M. R.,

- Pérez-Fernández, M., García-Juiz, S., Osada, J., Martín-Belloso, O., & Rodríguez-Yoldi, M. J. (2021). Valorization of agro-food by-products and their potential therapeutic applications. *Food and Bioproducts Processing*, 128, 247–258. <https://doi.org/10.1016/J.FBP.2021.06.003>
- Maver, U., Xhanari, K., Žižek, M., Gradišnik, L., Repnik, K., Potočnik, U., & Finšgar, M. (2020). Carboxymethyl cellulose/diclofenac bioactive coatings on AISI 316LVM for controlled drug delivery, and improved osteogenic potential. *Carbohydrate Polymers*, 230. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2019.115612>
- Mishra, R. K., Sabu, A., & Tiwari, S. K. (2018). Materials chemistry and the futurist eco-friendly applications of nanocellulose: Status and prospect. *Journal of Saudi Chemical Society*, 22(8), 949–978. <https://doi.org/10.1016/J.JSCS.2018.02.005>
- Mohammad, N. H., El-Sherbiny, G. M., Hammad, A. A., El-Nour, S. A. A., & Askar, A. A. (2021). Optimization of bacterial cellulose production using Plackett-Burman and response surface methodology. *Egyptian Journal of Medical Microbiology (Egypt)*, 30(4), 93–101. <https://doi.org/10.21608/EJMM.2021.197467>
- Molina-Ramírez, C., Castro, M., Osorio, M., Torres-Taborda, M., Gómez, B., Zuluaga, R., Gómez, C., Gañán, P., Rojas, O. J., & Castro, C. (2017). Effect of Different Carbon Sources on Bacterial Nanocellulose Production and Structure Using the Low pH Resistant Strain *Komagataeibacter Medellinensis*. *Materials*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/MA10060639>
- Molina, A. B., & Flórez-Castillo, J. M. (2020). Biopolímeros como sistemas de encapsulación. *Research, August*, 130–136. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.19521.17767/1>
- Moniri, M., Moghaddam, A. B., Azizi, S., Rahim, R. A., Ariff, A. Bin, Saad, W. Z., Navaderi, M., & Mohamad, R. (2017). Production and Status of Bacterial Cellulose in Biomedical Engineering. *Nanomaterials 2017, Vol. 7, Page 257*, 7(9), 257. <https://doi.org/10.3390/NANO7090257>
- Monod, J. (1978). *Selected Papers in Molecular Biology by Jacques Monod* (A. Lwoff & A. Ullmann (eds.)). ACADEMIC PRESS, INC. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-460482-7.X5001-5>
- Montagner, G. E., Wingert, N. R., Stein, C. dos S., Moresco, R. N., Fogaça, A. de O., & Gomes, P. (2022). Optimization of the extraction of antioxidant compounds from grape seed from winemaking waste. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 30, 100856. <https://doi.org/10.1016/J.SCP.2022.100856>

- Montgomery, D., & St, C. (2022). *Design and {Analysis} of {Experiments}*, 9th {Edition}.
- Morón Guillén, M., & Zamora Fuentes, J. C. (2018). *Sostenibilidad de los residuos agroindustriales*. [https://issuu.com/citeagroindustrialica/docs/in-18-002\\_sostenibilidad\\_de\\_los\\_residuos\\_agroindus](https://issuu.com/citeagroindustrialica/docs/in-18-002_sostenibilidad_de_los_residuos_agroindus)
- Naomi, R., Bt Hj Idrus, R., & Fauzi, M. B. (2020). Plant- vs. Bacterial-Derived Cellulose for Wound Healing: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(18). <https://doi.org/10.3390/ijerph17186803>
- Nascimento, F. X., Torres, C. A. V., Freitas, F., Reis, M. A. M., & Crespo, M. T. B. (2021). Functional and genomic characterization of *Komagataeibacter uvaceti* FXV3, a multiple stress resistant bacterium producing increased levels of cellulose. *Biotechnology Reports*, 30, e00606. <https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2021.E00606>
- Nasresfahani, M., Babaeipour, V., & Imani, M. (2024). Development of a Cost-Effective Culture Medium for the Bacterial Cellulose Production Using Food Industry Wastes. *Applied Food Biotechnology*, 11(1), e11–e11. <https://doi.org/10.22037/AFB.V11I1.43875>
- Navarro Zurita, M. (2018). *Obtención de celulosa bacteriana a partir de Gluconacetobacter sp. mediante fermentación de extractos de frutas de descarte*. [https://repositorio.ucss.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14095/606/Navarro\\_Maciel\\_tesis\\_bachiller\\_2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.ucss.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14095/606/Navarro_Maciel_tesis_bachiller_2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Nicolai, M., Pereira, P., Rijo, P., Amaral, O., Amaral, A., & Palma, L. (2018). *Vitis vinifera L. pomace: chemical and nutritional characterization*. *Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 15(2), 156–166. <https://doi.org/10.19277/bbr.15.2.182>
- Nie, W., Zheng, X., Feng, W., Liu, Y., Li, Y., & Liang, X. (2022). Characterization of bacterial cellulose produced by *Acetobacter pasteurianus* MGC-N8819 utilizing lotus rhizome. *LWT*, 165, 113763. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2022.113763>
- Nowak, A., Ossowicz-Rupniewska, P., Rakoczy, R., Konopacki, M., Perużyńska, M., Droździk, M., Makuch, E., Duchnik, W., Kucharski, Ł., Wenelska, K., & Klimowicz, A. (2021). Bacterial Cellulose Membrane Containing *Epilobium angustifolium* L. Extract as a Promising Material for the Topical Delivery of Antioxidants to the Skin. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12). <https://doi.org/10.3390/ijms22126269>
- Núñex Aravena, Y. A. (2019). *Producción de pbh en azotobacter vinelandii op, utilizando orujo de uva como fuente de carbono a distintas razones*

*carbono/nitrógeno*. Universidad Técnica Federico Santa María.

- O'Neill, M. A., Darvill, A. G., Etzler, M. E., Mohnen, D., Perez, S., Mortimer, J. C., & Pauly, M. (2022). Viridiplantae and Algae. In *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/GLYCOBIOLOGY.4E.24>
- Oliveira, T., Segato, T. C. M., Machado, G. P., Grotto, D., & Jozala, A. F. (2022). Evolution of Bacterial Cellulose in Cosmetic Applications: An Updated Systematic Review. *Molecules*, 27(23). <https://doi.org/10.3390/molecules27238341>
- Ossowicz-rupniewska, P., Rakoczy, R., Nowak, A., Konopacki, M., Klebeko, J., Świątek, E., Janus, E., Duchnik, W., Wenelska, K., Kucharski, Ł., & Klimowicz, A. (2021). Transdermal delivery systems for ibuprofen and ibuprofen modified with amino acids alkyl esters based on bacterial cellulose. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12). <https://doi.org/10.3390/ijms22126252>
- Panke, S., & Wubbolts, M. G. (2002). Enzyme technology and bioprocess engineering. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(2), 111–116. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00302-6](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00302-6)
- Patel, A., Patel, P., Parmar, M., & Gosai, H. (2024). Employing RSM and ANN-based applications for modelling enhanced bacterial cellulose production from pineapple peel waste using *Komagatibacter saccharivorans* APPK1. *Chemical Engineering Journal*, 480, 148057. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2023.148057>
- Pedersen, G. B., Blaschek, L., Frandsen, K. E. H., Noack, L. C., & Persson, S. (2023). Cellulose synthesis in land plants. *Molecular Plant*, 16(1), 206–231. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molp.2022.12.015>
- Penalva Santos, D., Correa, C., Amaral Alves, Y., Gomes Souza, C., & A. Mancebo Boloy, R. (2023). Brazil and the world market in the development of technologies for the production of second-generation ethanol. *Alexandria Engineering Journal*, 67, 153–170. <https://doi.org/10.1016/J.AEJ.2022.09.004>
- Peng, B., Yao, Z., Wang, X., Crombeen, M., Sweeney, D. G., & Tam, K. C. (2020). Cellulose-based materials in wastewater treatment of petroleum industry. *Green Energy & Environment*, 5(1), 37–49. <https://doi.org/10.1016/J.GEE.2019.09.003>
- Pereira, A., Feitosa, J. P. A., Morais, J. P. S., & Rosa, M. de F. (2020). Bacterial cellulose aerogels: Influence of oxidation and silanization on mechanical and absorption properties. *Carbohydrate Polymers*, 250, 116927. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116927>
- Pereira, D., Tarone, A. G., Cazarin, C. B. B., Barbero, G. F., & Martínez, J. (2019).

- Pressurized liquid extraction of bioactive compounds from grape marc. *Journal of Food Engineering*, 240, 105–113.  
<https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2018.07.019>
- Perugini, P., Bleve, M., Redondi, R., Cortinovis, F., & Colpani, A. (2020). In vivo evaluation of the effectiveness of biocellulose facial masks as active delivery systems to skin. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 19(3), 725–735.  
<https://doi.org/10.1111/jocd.13051>
- Popa, L., Ghica, M. V., Tudoroiu, E. E., Ionescu, D. G., & Dinu-Pîrvu, C. E. (2022). Bacterial Cellulose—A Remarkable Polymer as a Source for Biomaterials Tailoring. *Materials* 2022, Vol. 15, Page 1054, 15(3), 1054.  
<https://doi.org/10.3390/MA15031054>
- Qin, X., Yuan, Y., Fei, S., Lin, X., Shi, S., Wang, X., Pang, Q., Kang, J., Li, C., & Liu, S. (2024). Exploring the biotic and abiotic drivers influencing nata de coco production by *Komagataeibacter nataicola* in pre-fermented coconut water. *International Journal of Food Microbiology*, 414, 110620.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110620>
- Quiñones-Cerna, C., Rodríguez-Soto, J. C., Barraza-Jáuregui, G., Huanes-Carranza, J., Cruz-Monzón, J. A., Ugarte-López, W., Hurtado-Butrón, F., Samanamud-Moreno, F., Haro-Carranza, D., Valdivieso-Moreno, S., Salirrosas-Fernández, D., & Quiñones, M. C. (2024). Bioconversion of Agroindustrial Asparagus Waste into Bacterial Cellulose by *Komagataeibacter rhaeticus*. *Sustainability* 2024, Vol. 16, Page 736, 16(2), 736. <https://doi.org/10.3390/SU16020736>
- Quiñones, C. (2021). *Residuos agroindustriales de alcahoba y espárrago como sustrato para la producción de celulosa bacteriana por K. Xylinus*. 95.  
[http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/14465/Aguilar Ramos Cesar Hilton.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/14465/Aguilar%20Ramos%20Cesar%20Hilton.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Rachtanapun, P., Klunklin, W., Jantrawut, P., Leksawasdi, N., Jantanasakulwong, K., Phimolsiripol, Y., Seesuriyachan, P., Chaiyaso, T., Ruksiriwanich, W., Phongthai, S., Sommano, S. R., Punyodom, W., Reungsang, A., & Ngo, T. M. P. (2021). Effect of Monochloroacetic Acid on Properties of Carboxymethyl Bacterial Cellulose Powder and Film from Nata de Coco. *Polymers*, 13(4), 1–13.  
<https://doi.org/10.3390/POLYM13040488>
- Rahmadiawan, D., Abral, H., Kotodeli, R. A., Sugiarti, E., Muslimin, A. N., Admi, R. I., Arafat, A., Kim, H.-J., Sapuan, S. M., & Kosasih, E. A. (2023). A Novel Highly

- Conductive, Transparent, and Strong Pure-Cellulose Film from TEMPO-Oxidized Bacterial Cellulose by Increasing Sonication Power. *Polymers*, 15(3), 643. <https://doi.org/10.3390/POLYM15030643>
- Raiszadeh-Jahromi, Y., Rezazadeh-Bari, M., Almasi, H., & Amiri, S. (2020). Optimization of bacterial cellulose production by *Komagataeibacter xylinus* PTCC 1734 in a low-cost medium using optimal combined design. *Journal of Food Science and Technology*, 57(7), 2524–2533. <https://doi.org/10.1007/S13197-020-04289-6/METRICS>
- Ramírez-Mata, A., Fernández-Domínguez, I. J., Nuñez-Reza, K. J., Xiqui-Vázquez, M. L., & Baca, B. E. (2014). Redes de señalización en la producción de biopelículas en bacterias: quorum sensing, di-GMPc y óxido nítrico. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(3), 242–255. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70079-3](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70079-3)
- Reimer, L. C., Sardà Carbasse, J., Koblitz, J., Ebeling, C., Podstawka, A., & Overmann, J. (2022). BacDive in 2022: The knowledge base for standardized bacterial and archaeal data. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D741–D746. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB961>
- Revin, V., Liyaskina, E., Nazarkina, M., Bogatyreva, A., & Shchankin, M. (2018). Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, 151–159. <https://doi.org/10.1016/J.BJM.2017.12.012>
- Rezazadeh, M., Babaeipour, V., & Motamedian, E. (2020). Reconstruction, verification and in-silico analysis of a genome-scale metabolic model of bacterial cellulose producing *Komagataeibacter xylinus*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(6), 1017–1026. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02299-4>
- Rini, Suryanto, H., Hari, P. D., Syukri, D., Jaswandi, Kurniawan, F., & Makky, M. (2023). Application of Nanocellulose Biofilter from Pineapple Peel Waste for Water Microbes Removal. *Journal of Environmental and Public Health*, 2023, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2023/5823207>
- Rodrigues, A. C., Fontão, A. I., Coelho, A., Leal, M., Soares da Silva, F. A. G., Wan, Y., Dourado, F., & Gama, M. (2019). Response surface statistical optimization of bacterial nanocellulose fermentation in static culture using a low-cost medium. *New Biotechnology*, 49, 19–27. <https://doi.org/10.1016/J.NBT.2018.12.002>
- Ryngajło, M., Jacek, P., Cielecka, I., Kalinowska, H., & Bielecki, S. (2019). Effect of ethanol supplementation on the transcriptional landscape of bionanocellulose

- producer *Komagataeibacter xylinus* E25. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(16), 6673–6688. <https://doi.org/10.1007/S00253-019-09904-X/FIGURES/5>
- Ryngajłło, M., Jędrzejczak-Krzepkowska, M., Kubiak, K., Ludwicka, K., & Bielecki, S. (2020). Towards control of cellulose biosynthesis by *Komagataeibacter* using systems-level and strain engineering strategies: current progress and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(15), 6565. <https://doi.org/10.1007/S00253-020-10671-3>
- Saavedra-Sanabria, O. L., Durán, D., Cabezas, J., Hernández, I., Blanco-Tirado, C., & Combariza, M. Y. (2021). Cellulose biosynthesis using simple sugars available in residual cacao mucilage exudate. *Carbohydrate Polymers*, 274, 118645. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2021.118645>
- Sabater, C., Villamiel, M., & Montilla, A. (2022). Integral use of pectin-rich by-products in a biorefinery context: A holistic approach. *Food Hydrocolloids*, 128, 107564. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2022.107564>
- Salgado-Ramos, M., Martí-Quijal, F. J., Huertas-Alonso, A. J., Sánchez-Verdú, M. P., Moreno, A., & Barba, F. J. (2023). A preliminary multistep combination of pulsed electric fields and supercritical fluid extraction to recover bioactive glycosylated and lipidic compounds from exhausted grape marc. *LWT*, 180, 114725. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2023.114725>
- Sharma, P., Sharma, R., Ahuja, S., Yadav, A., Arora, S., & Aggarwal, N. K. (2024). Enhancement of bacterial cellulose production by ethanol and lactic acid by using *Gluconacetobacter kombuchae*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 54(5), 700–708. <https://doi.org/10.1080/10826068.2023.2276188>
- Shi, Z., Zhang, Y., Phillips, G. O., & Yang, G. (2014). Utilization of bacterial cellulose in food. *Food Hydrocolloids*, 35, 539–545. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2013.07.012>
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Tsai, M. L., Chen, C. W., & Di Dong, C. (2021). Genetic modification for enhancing bacterial cellulose production and its applications. *Bioengineered*, 12(1), 6793. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1968989>
- Soemphol, W., Hongsachart, P., & Tanamool, V. (2018). Production and characterization of bacterial cellulose produced from agricultural by-product by *Gluconacetobacter* strains. *Materials Today: Proceedings*, 5(5), 11159–11168. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2018.01.036>
- STATGRAPHICS. (2006, September 14). *Diseño de Experimentos - Diseño de*

- Superficie*                    *Respuesta.*                    <https://www.statgraphics.net/wp-content/uploads/2011/12/tutoriales/DDE - Diseno de Superficies de Respuesta.pdf>
- Swingler, S., Gupta, A., Gibson, H., Kowalcuk, M., Heaselgrave, W., & Radecka, I. (2021). Recent Advances and Applications of Bacterial Cellulose in Biomedicine. *Polymers*, 13(3). <https://doi.org/10.3390/polym13030412>
- Teoh, A. L., Heard, G., & Cox, J. (2004). Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 95(2), 119–126. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2003.12.020>
- Thomas, B., Raj, M. C., Athira, B. K., Rubiyah, H. M., Joy, J., Moores, A., Drisko, G. L., & Sanchez, C. (2018). Nanocellulose, a Versatile Green Platform: From Biosources to Materials and Their Applications. *Chemical Reviews*, 118(24), 11575–11625. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.7B00627>
- Tomar, G. S., Gundogan, R., Can Karaca, A., & Nickerson, M. (2023). Valorization of wastes and by-products of nuts, seeds, cereals and legumes processing. *Advances in Food and Nutrition Research*. <https://doi.org/10.1016/BS.AFNR.2023.03.004>
- Verdá Barberá, P., Abouelela Rafat, A., Hallett, J. P., & Brandt-Talbot, A. (2023). Purifying cellulose from major waste streams using ionic liquids and deep eutectic solvents. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 41, 100783. <https://doi.org/10.1016/J.COOGSC.2023.100783>
- Verhulst, P. F. (1845). *Recherches mathématiques sur la loi d'accroissement de la population* (18th ed.). Hayez.
- Wang, J., & Guo, X. (2024). The Gompertz model and its applications in microbial growth and bioproduction kinetics: Past, present and future. *Biotechnology Advances*, 72, 108335. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108335>
- Wang, J., Tavakoli, J., & Tang, Y. (2019). Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods – A review. *Carbohydrate Polymers*, 219, 63–76. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2019.05.008>
- Xu, X. (1987). The biological foundation of the Gompertz model. *International Journal of Bio-Medical Computing*, 20(1), 35–39. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0020-7101\(87\)90012-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0020-7101(87)90012-2)
- Yamada, Y., Yukphan, P., Lan Vu, H. T., Muramatsu, Y., Ochaikul, D., Tanasupawat, S., & Nakagawa, Y. (2012). Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*). *The Journal of General and Applied*

*Microbiology*, 58(5), 397–404. <https://doi.org/10.2323/jgam.58.397>

- Ye, D., Rongpipi, S., Kiemle, S. N., Barnes, W. J., Chaves, A. M., Zhu, C., Norman, V. A., Liebman-Peláez, A., Hexemer, A., Toney, M. F., Roberts, A. W., Anderson, C. T., Cosgrove, D. J., Gomez, E. W., & Gomez, E. D. (2020). Preferred crystallographic orientation of cellulose in plant primary cell walls. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18449-x>
- Ye, J., Zheng, S., Zhang, Z., Yang, F., Ma, K., Feng, Y., Zheng, J., Mao, D., & Yang, X. (2019). Bacterial cellulose production by Acetobacter xylinum ATCC 23767 using tobacco waste extract as culture medium. *Bioresource Technology*, 274, 518–524. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECH.2018.12.028>
- Yi, T., Zhao, H., Mo, Q., Pan, D., Liu, Y., Huang, L., Xu, H., Hu, B., & Song, H. (2020). From Cellulose to Cellulose Nanofibrils—A Comprehensive Review of the Preparation and Modification of Cellulose Nanofibrils. *Materials 2020, Vol. 13, Page 5062*, 13(22), 5062. <https://doi.org/10.3390/MA13225062>
- Yilmaz, M., & Goksungur, Y. (2024). Optimization of Bacterial Cellulose Production from Waste Figs by Komagataeibacter xylinus. *Fermentation*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/fermentation10090466>
- Yıldırım, H. K. (2020). *Wine Maturation and Aging* (pp. 520–544). <https://doi.org/10.1201/9781351034265-22>
- Zhai, X., Lin, D., Zhao, Y., Li, W., & Yang, X. (2018). Effects of Dietary Fiber Supplementation on Fatty Acid Metabolism and Intestinal Microbiota Diversity in C57BL/6J Mice Fed with a High-Fat Diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(48), 12706–12718. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05036>
- Zhong, C. (2020). Industrial-Scale Production and Applications of Bacterial Cellulose. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(December), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.605374>

## VII. ANEXOS

### Anexo N° 01: Determinación de azúcares reductores

La determinación de azúcares reductores se llevó a cabo mediante el método DNS.

Se preparó 100mL de reactivo DNS mezclando agua destilada con 1.6g de NaOH a 38°C, luego, se añadió a la mezcla 30g de tartrato de sodio-potasio, una vez disuelto el tartrato de sodio-potasio, se agregó 1g de ácido dinitrosalicílico, y se agitó constantemente hasta que se obtuvo una mezcla homogénea. Finalmente se aforó en una fiola ámbar de 100mL, y se almacenó el reactivo preparado en un frasco ámbar.

Una vez preparado el reactivo DNS, se procedió a realizar una curva de calibrado. Se preparó una solución de 2 g/L de glucosa, a partir de ella se realizaron diluciones de 1.6, 1.2, 0.8 y 0.4 g/L de glucosa. De cada dilución se tomó 500 µL, y se adicionó 500 µL de reactivo DNS. Cada dilución se llevó a ebullición por 5 minutos, luego, se retiró y colocó en agua helada durante 3 minutos para cortar la reacción. Finalmente, se adicionó 5 mL de agua destilada a cada dilución, se dejó reposar 15 minutos, y se midió la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro UV-VIS. Los datos de absorbancia obtenidos se utilizaron para realizar la curva de calibración (Figura 32). La ecuación que se obtuvo fue la siguiente.

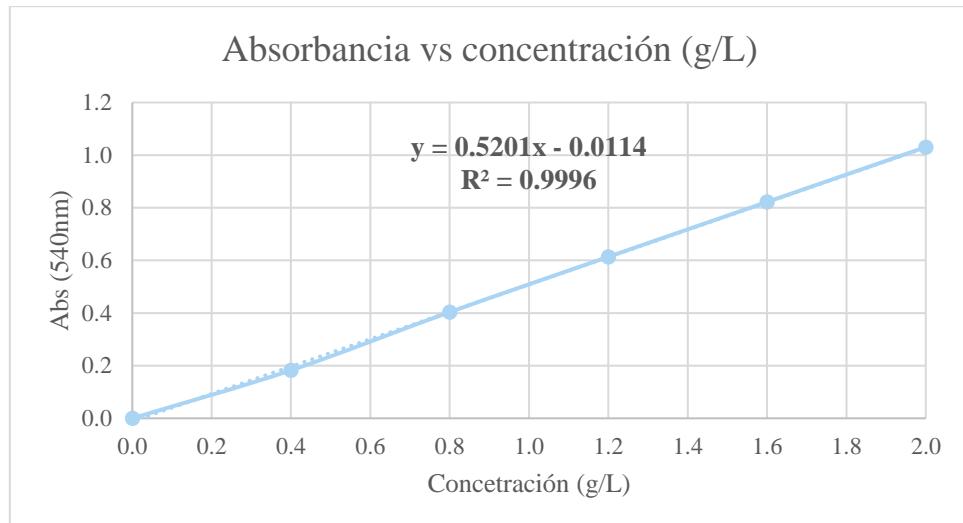
$$y = 0.5201x - 0.0114$$

Co un coeficiente de correlación, R<sup>2</sup> de 0.9996. En el cuadro 16 se muestran los datos de concentración y absorbancia que se obtuvo.

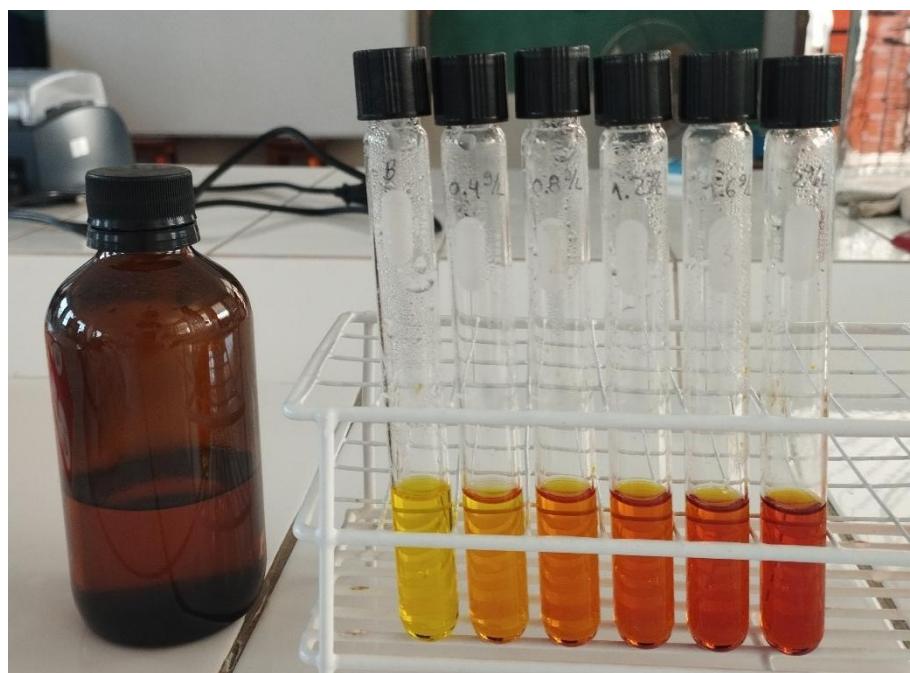
**Cuadro 16. Datos de concentración y absorbancia de curva de calibrado DNS.**

Concentración (g/L)	Absorbancia (540 nm)
2.0	1.031
1.6	0.822
1.2	0.614

0.8	0.404
0.4	0.183
0 (blanco)	0



**Figura 32.** Curva de calibración de azúcares reductores mediante el método DNS.



**Figura 33.** Método DNS para determinación de azúcares reductores. Se observa la intensidad de color que va en aumento cuando la concentración de azúcares es más alta.

## **Anexo N° 02: Determinación de glucosa**

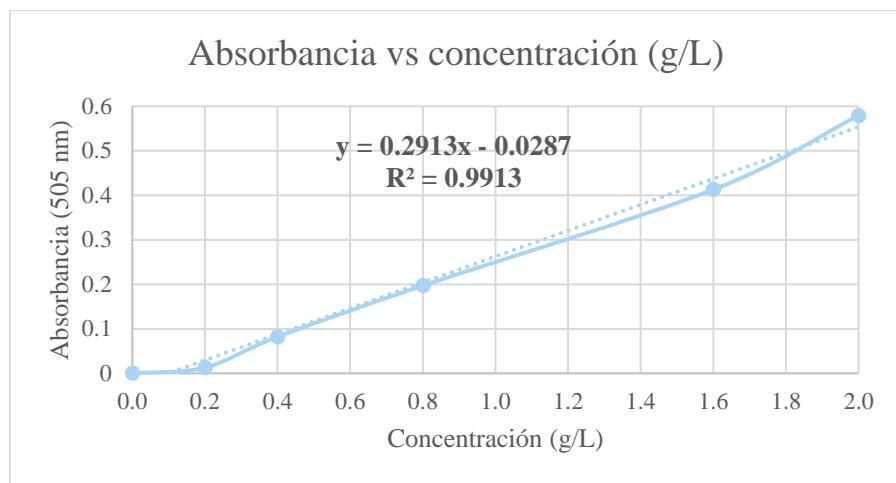
Se utilizó el kit enzimático de determinación de glucosa marca Valtek. Se preparó una solución de glucosa de 2 g/L, a partir de ella, se realizaron diluciones en concentraciones de 1.6, 1.2, 0.8, 0.4 y 0.2 g/L de glucosa. Se tomó 30 µL de cada concentración de glucosa, se añadió 3mL del reactivo enzimático Valtek a cada muestra y se llevó a incubar a 37°C durante 10 minutos. Se retiraron las muestras en agua helada, y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS a 505 nm. Con los datos obtenidos se realizó una curva de calibración (Figura 34). La ecuación que se obtuvo se muestra a continuación.

$$y = 0.2913x - 0.0287$$

Con un coeficiente de correlación, R<sup>2</sup> de 0.9913. En el cuadro 17 se muestran los datos de concentración y absorbancia que se obtuvo.

**Cuadro 17. Datos de concentración y absorbancia de curva de calibrado de glucosa mediante kit enzimático de determinación de glucosa marca Valtek.**

Concentración (g/L)	Absorbancia (540 nm)
2.0	0.579
1.6	0.413
1.2	0.197
0.8	0.082
0.4	0.013
0 (blanco)	0



**Figura 34. Curva de calibración de glucosa mediante el kit enzimático de determinación de glucosa marca Valtek.**



**Figura 35. Determinación de glucosa mediante método enzimático marca Valtek.**

Se puede observar que la intensidad de color aumenta cuando aumenta la concentración de glucosa.

### Anexo N° 03: Determinación de concentración de biomasa

Se realizó una curva de calibrado de biomasa mediante el método gravimétrico. Se preparó un cultivo líquido de *Komagataeibacter xylinus* en medio Hestrin-Schramm (20 g/L de glucosa, 5 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de peptona, 2.7 g/L de fosfato disódico, 1.15 g/L de ácido cítrico) en condiciones estáticas con un pH inicial de 6.0, y con un inóculo inicial de 0.05 g/L de biomasa previamente preparado. Se llevó a incubación durante 60 h. El caldo de cultivo, al cabo del tiempo de incubación se mostró turbio, lo que indicó un crecimiento bacteriano, además de la formación de una película de celulosa en la superficie (Figura 36).



**Figura 36. Caldo de cultivo de *K. xylinus* luego de 60 h de cultivo.** Se observa que al cabo de 60 h de cultivo existe turbidez de medio, así como la presencia de la membrana de celulosa, lo que evidencia el crecimiento bacteriano.

El método gravimétrico consistió en determinar la concentración de biomasa por diferencia de pesos (Cuadro 18). Se tomó 10mL de caldo de cultivo, y se centrifugó a 4500 rpm durante 15 minutos. Se desechó el sobrenadante y se conservó el pellet formado, el pellet se sumergió en agua destilada y se centrifugó, este proceso se realizó 3 veces para eliminar medio de cultivo y conservar solo biomasa celular. El pellet final se colocó en capachos previamente pesados y secados. Se dejó secar a 60°C durante 24 horas en la estufa y, finalmente, se pesó cada capacho con la biomasa seca (Figura 37).



**Figura 37.** Capachos con biomasa seca luego de secado de 24 h.

**Cuadro 18.** Determinación de concentración de biomasa en g/L mediante el método gravimétrico.

Capacho vacío (g)	Capacho + Biomasa (g)	Biomasa seca (g)	Volumen de muestra (L)	Biomasa (g/L)	(g/L) Promedio	Desv. media estándar
70.594	70.5979	0.0039		0.39		
47.1538	47.1579	0.0041	0.01	0.41	0.45	0.08
39.9266	39.9321	0.0055		0.55		

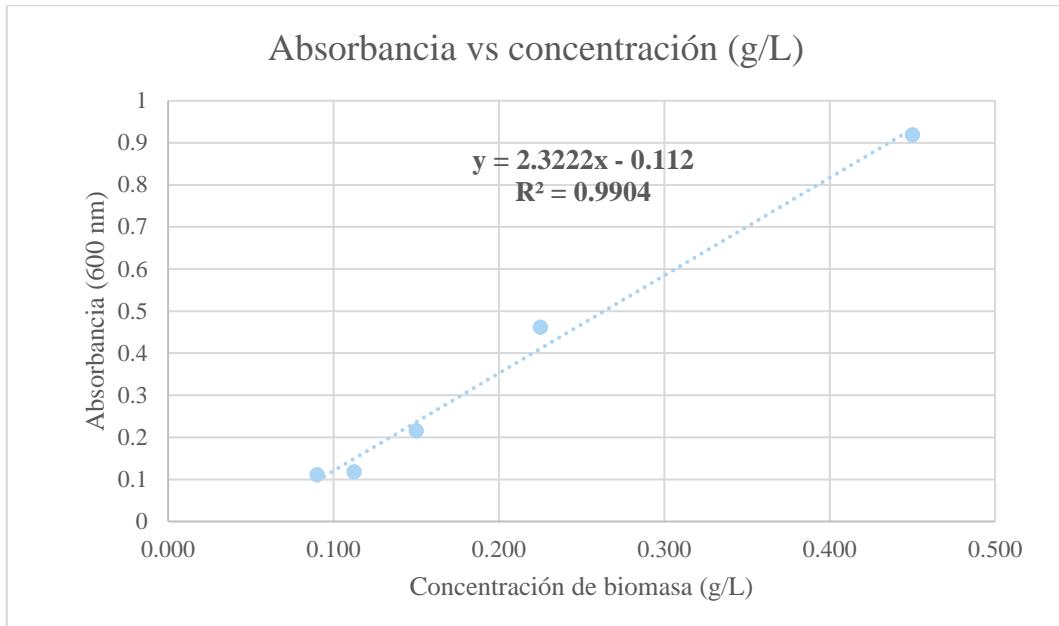
Simultáneamente, se realizó diluciones del caldo de cultivo, las cuales se midieron en el espectrofotómetro UV-VIS a 600 nm (Cuadro 19) utilizando medio de cultivo estéril como blanco. Al conocer la concentración de biomasa en g/L, se calculó, mediante una relación simple, la concentración de las diluciones realizadas. Los datos obtenidos permitieron obtener una curva de calibra de biomasa (Figura 38), obteniendo la siguiente ecuación.

$$y = 2.3222x - 0.112$$

Con un coeficiente de correlación, R<sup>2</sup> de 0.9904. En el cuadro 19 se muestran los datos de la concentración de biomasa y sus respectivas absorbancias.

**Cuadro 19. Datos de concentración de biomasa y absorbancia a 600 nm obtenidos del método gravimétrico para determinación de biomasa.**

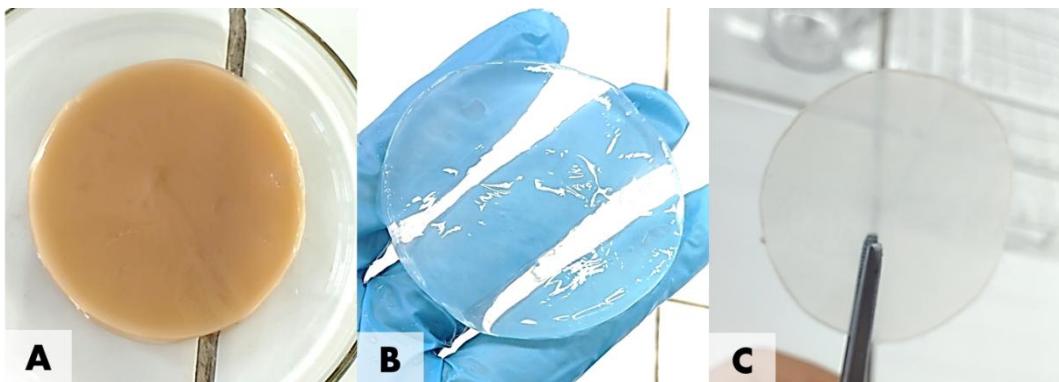
Factor de dilución	1/FD	Absorbancia (600 nm)	Biomasa (g/L)
1	1.00	0.919	0.450
2	0.50	0.462	0.225
3	0.33	0.216	0.150
4	0.25	0.118	0.113
5	0.20	0.111	0.090



**Figura 38. Curva de calibrado de biomasa mediante el método gravimétrico para determinación de biomasa.**

#### **Anexo N° 04: Método de extracción y cuantificación de celulosa**

La extracción de celulosa consistió en retirar la membrana de celulosa de cada matraz al finalizar su tiempo de incubación. Cada membrana fue colocada en placas Petri codificadas donde se realizaron tres lavados con agua destilada para eliminar restos de caldo de cultivo. Luego, cada membrana fue llevada a un vaso de precipitado con 20mL de NaOH 0.1 M, y fue llevado a la estufa a 80°C durante 24 h. Pasado el tiempo, se procedió a realizar constantes lavados con agua destilada hasta obtener un pH neutro (7.0), esto fue indicador de la eliminación completa de medio de cultivo y restos de NaOH en la membrana. Seguido de ello, se colocó cada membrana de celulosa en placas previamente pesadas, codificadas y secadas. Se llevaron a secar las membranas de celulosa a 60°C hasta peso constante, y finalmente, se determinó la concentración de celulosa por diferencia de pesos.



**Figura 39. Extracción y cuantificación de celulosa (BC).** A) Celulosa retirada de la fermentación. B) Celulosa tratada y purificada. C) Celulosa después del secado.

## Anexo N°05: Cuantificación de etanol

La metodología para la determinación de etanol mediante cromatografía de gases se realizó utilizando una columna STABILWAX-DA de la marca RESTEK, con dimensiones de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y un espesor de película de 0.5 µm (Catálogo #11038). La temperatura de la columna se mantuvo a 55 °C. Para la inyección, se utilizó un volumen de 1 µL, empleando un modo de inyección tipo split, con una temperatura de 200 °C.

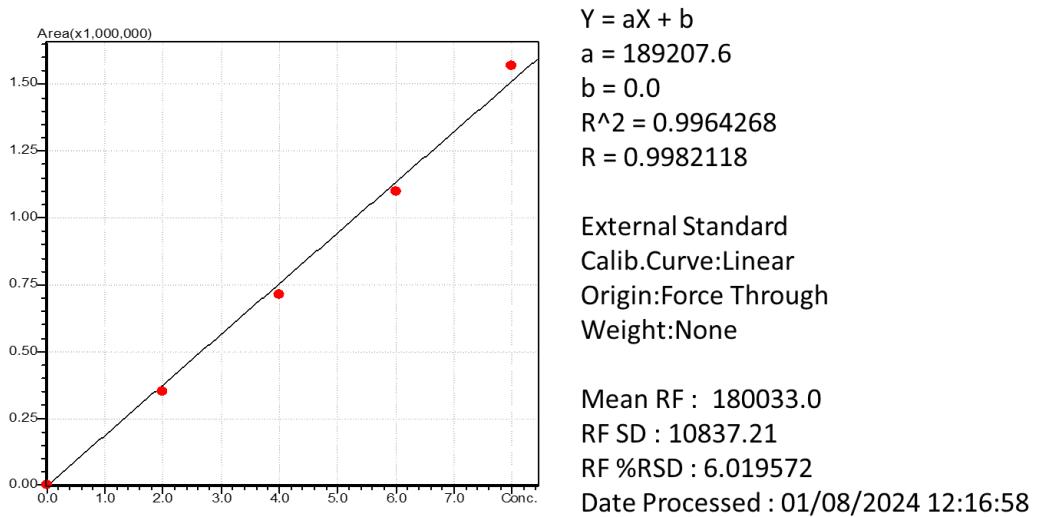
El horno comenzó a una temperatura inicial de 55 °C, la cual se mantuvo durante 3 minutos. Posteriormente, se incrementó a una velocidad de 10 °C/min hasta alcanzar los 120 °C, donde se mantuvo durante 2 minutos. Como gas portador, se utilizó helio con un flujo de 1.4 mL/min y una velocidad lineal de 32.9 cm/seg. El sistema operó con un ratio de split de 300:1 y un flujo de purga de 3.0 mL/min.

El detector utilizado fue un FID (Detector de Ionización de Llama), configurado a una temperatura de 200 °C. Los flujos de gases necesarios para el FID fueron los siguientes: helio a 30 mL/min, hidrógeno (H<sub>2</sub>) a 40 mL/min y aire a 400 mL/min. Esta configuración garantizó una adecuada separación y detección del etanol en las muestras analizadas.

Cada muestra llevada a su análisis en el cromatógrafo de gases, fue previamente centrifugada a 4500 rpm por 15 minutos y filtrada con un filtro para jeringa de Nylon con poros de 0.22 µm. Se colocó en viales ámbar de 2mL para cromatografía y se analizó con la metodología descrita. Previo a la cuantificación de etanol de las muestras del cultivo, se realizó una curva de calibrado con concentraciones entre 0.02% v/v hasta 8% v/v. La curva se analizó con la función Calib. Curve: Linear del cromatógrafo de gases, lo que resultó en la siguiente ecuación.

$$y = 189207.6 x + 0.0$$

Con un coeficiente de correlación,  $R^2$  de 0.996. La curva de calibrado realizada se muestra en la figura 40.



**Figura 40. Curva de calibrado de etanol (% v/v) por Cromatografía de gases.**

## Anexo N°06: Datos de biomasa y sustrato de matriz experimental

**Cuadro 20: Datos de concentración sustrato inicial, concentración sustrato final, concentración de biomasa final y concentración final de etanol en los experimentos del diseño experimental.**

Prueba	Variables			Datos cuantificados			
	Nivel codificado			$S_i$ (g/L)	$S_f$ (g/L)	$X_f$ (g/L)	Ethol (% v/v)
	$X_1$	$X_2$	$X_3$				
1	0	0	0	11.256	3.661	3.867	0
2	-1	-1	-1	6.468	2.046	1.779	0
3	+1	-1	-1	6.430	0.642	2.001	0
4	-1	+1	-1	16.076	8.545	1.935	0
5	+1	+1	-1	16.074	2.123	3.089	0
6	-1	-1	+1	6.487	3.026	1.645	0
7	+1	-1	+1	6.430	0.931	2.588	0
8	-1	+1	+1	16.066	8.948	2.001	0
9	0	0	0	11.236	3.488	3.909	0
10	+1	+1	+1	16.074	2.969	4.053	0
11	$-\alpha$	0	0	11.198	8.006	1.410	0.045
12	$+\alpha$	0	0	11.352	0.037	3.944	0
13	0	$-\alpha$	0	3.161	0.024	1.436	0
14	0	$+\alpha$	0	19.681	11.698	2.797	0
15	0	0	$-\alpha$	11.256	3.680	2.808	0
16	0	0	$+\alpha$	11.275	2.988	3.853	0
17	0	0	0	11.236	3.238	3.912	0

$X_1$ : Tiempo de cultivo,  $X_2$ : Extracto acuoso de orujo de uva,  $X_3$ : Etanol,  $S_i$ : Concentración de azúcares reductores inicial provenientes del extracto acuoso de orujo de uva,  $S_f$ : Concentración de azúcares reductores final provenientes del extracto acuoso de orujo de uva,  $X_f$ : Concentración de biomasa final, Ethol: Concentración final de etanol.

## Anexo N°07: Análisis estadísticos del efecto de los factores en la celulosa producida

### Análisis ANOVA

**Cuadro 21. Análisis de varianza (ANOVA) para la respuesta celulosa producida (g/L).**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Tiempo de cultivo	48.0446	1	48.0446	49.65	0.0002
B: Ext.ac. orujo de uva	20.7627	1	20.7627	21.46	0.0024
C: Etanol	2.6456	1	2.6456	2.73	0.1422
AA	17.7655	1	17.7655	18.36	0.0036
AB	9.5922	1	9.5922	9.91	0.0162
AC	0.9248	1	0.9248	0.96	0.3608
BB	53.3097	1	53.3097	55.10	0.0001
BC	0.045	1	0.045	0.05	0.8354
CC	8.5322	1	8.5322	8.82	0.0208
Error total	6.77302	7	0.967574		
Total (corr.)	146.838	16			

R-cuadrada = 95.3874 porcento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 89.457 porcento

Error estándar del est. = 0.983653

Error absoluto medio = 0.530137

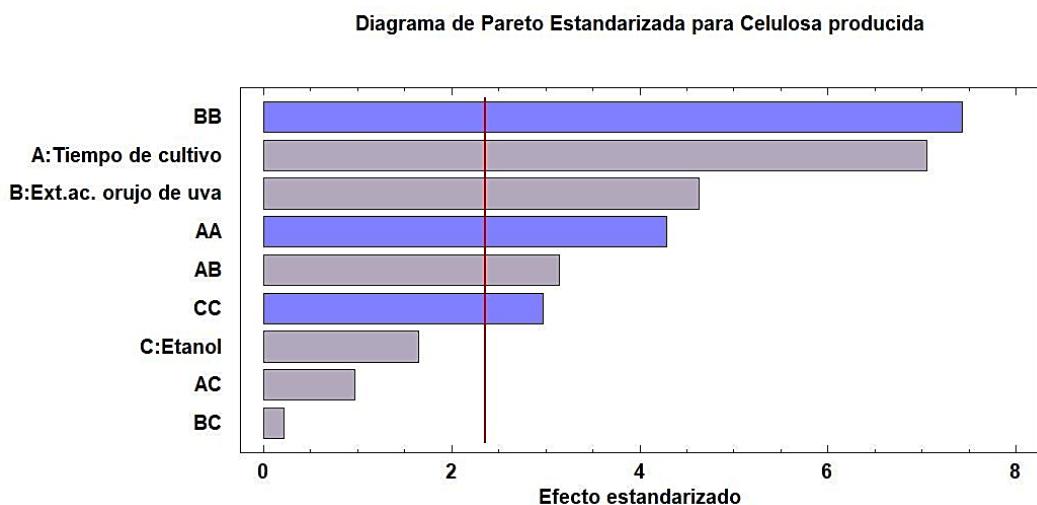
Estadístico Durbin-Watson = 2.24775 (P=0.7265)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.16711

### Diagrama de Pareto

En la figura 41 se muestra el diagrama de Pareto estandarizado muestra la influencia de los factores de estudio (tiempo de cultivo, concentración de extracto acuoso de orujo de uva y concentración de etanol) en su efecto lineal, cuadrático y de sus interacciones sobre la celulosa producida (g/L) con un nivel de significancia de 0.05. En primer lugar, se observa que el efecto cuadrático del extracto acuoso de orujo de uva (BB) tiene el mayor impacto significativo en la producción de celulosa, esto implica que la relación entre la concentración de extracto acuoso de orujo de uva y la respuesta no es lineal, sugiriendo la existencia de un punto óptimo para este factor en el rango evaluado. Además, el efecto lineal del factor tiempo de cultivo (A) es el segundo más importante, indicando que este factor afecta directamente la cantidad de celulosa producida de manera significativa y

positiva. Del mismo modo el efecto lineal del factor extracto acuoso de orujo de uva (B) se muestra como un efecto que influye directa y significativamente en la cantidad de celulosa producida. El efecto cuadrático del tiempo de cultivo (AA) muestra que, así como el tiempo de cultivo afecta de manera directa la cantidad de celulosa producida, la relación cuadrática de la misma también genera un impacto en la variable respuesta. El efecto de la interacción de tiempo de cultivo con extracto acuoso de orujo de uva (AB) también afecta significativamente la cantidad de celulosa producida, al igual que sus efectos individuales por separado. El efecto cuadrático del etanol (CC) también logró cruzar el umbral de significancia, demostrando que a pesar de que el efecto individual no fuere significativo, llega a influir la variable respuesta de una manera no lineal. En contraste, las interacciones AC y BC no cruzan el umbral de significancia, esto indica que su influencia es menos relevante en comparación con los efectos principales y cuadráticos mencionados anteriormente. Asimismo, el efecto de etanol (C), no llega a influir de manera directa en la celulosa producida, sin embargo, su efecto cuadrático si influye como se mencionó previamente.



**Figura 41. Diagrama de Pareto de los factores y sus efectos estandarizados para la celulosa producida (g/L).** Los factores a evaluar fueron el tiempo de cultivo en días (A), la concentración de extracto acuoso de orujo de uva en % v/v (B) y la

concentración de etanol en % v/v (C), además de sus efectos cuadráticos y las interacciones entre las variables. Gráfico obtenido con Statgraphics 19 Centurion.

Los resultados observados en el diagrama de Pareto se confirmaron en el análisis de varianza (ANOVA). Se mostraron significantes 6 efectos, 3 de ellos no se mostraron significantes y se obtuvo un  $R^2$  de 95.389%.

#### Modelo de regresión

El modelo de regresión para la producción de celulosa revela que el etanol es el factor más influyente (4.69), aunque su fuerte efecto cuadrático negativo (-0.86) indica un punto óptimo crítico. Las tres variables principales (tiempo de cultivo, extracto de orujo de uva y etanol) muestran efectos lineales positivos, pero sus términos cuadráticos negativos sugieren la existencia de máximos específicos para cada una. Las interacciones positivas entre variables (AB, AC, BC) indican sinergias en el proceso, donde la combinación de factores potencia la producción. La ecuación resultante, con una constante de -17.72, permite predecir la producción de celulosa y optimizar las condiciones operativas, confirmando las observaciones visualizadas en las superficies de respuesta anteriores.

$$\begin{aligned} \text{celulosa producida} = & -17.72 + 0.55X_1 + 0.57X_2 + 4.69X_3 - 0.02X_1^2 \\ & + 0.009X_1X_2 + 0.009X_2^2 - 0.86X_3^2 \end{aligned}$$

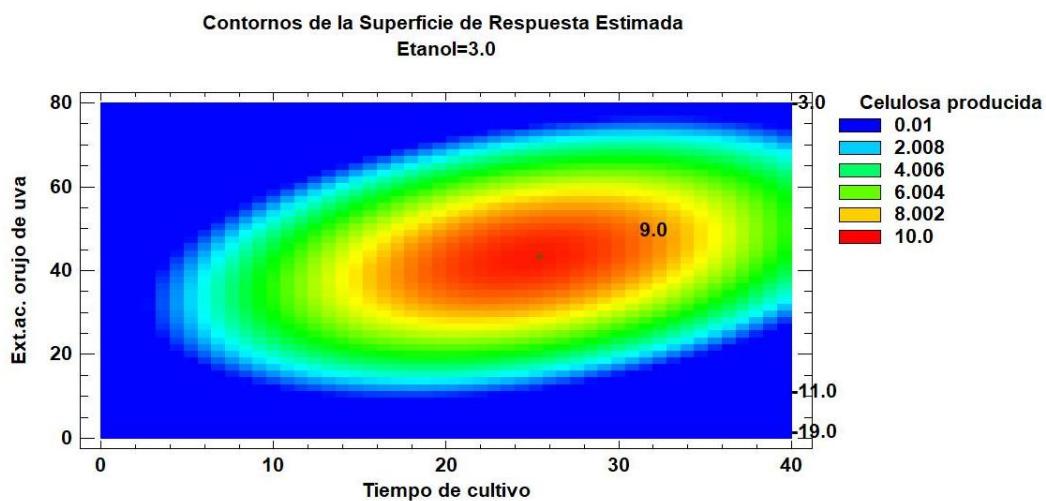
Donde  $X_1$  corresponde al tiempo de cultivo,  $X_2$  corresponde extracto acuoso de orujo de uva,  $X_3$  corresponde al etanol,  $X_1^2$  corresponde al efecto cuadrático del tiempo de cultivo,  $X_2^2$  corresponde al efecto cuadrático del extracto acuoso de orujo de uva,  $X_3^2$  corresponde al efecto cuadrático del etanol, y  $X_1X_2$  corresponde a la interacción de tiempo de cultivo y extracto acuoso de orujo de uva.

## Resultados estimados

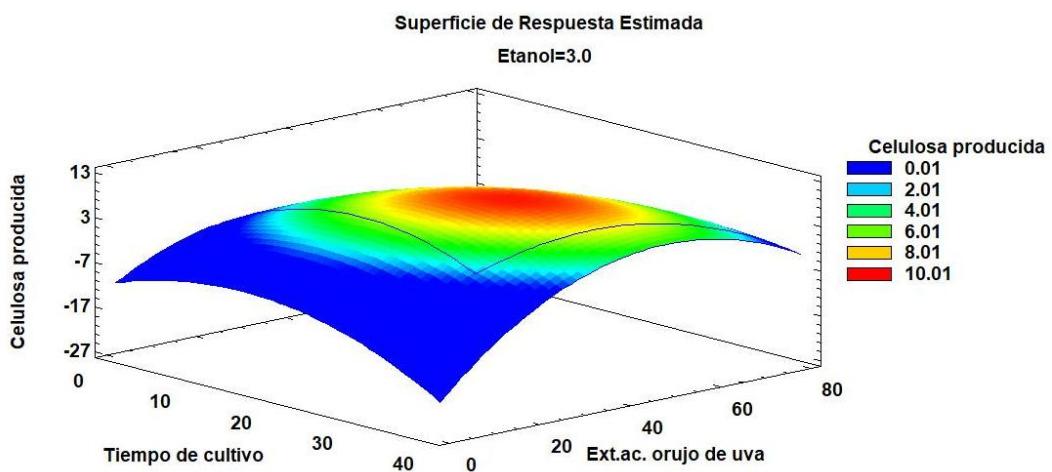
**Cuadro 22. Resultados estimados para la respuesta celulosa producida.**

Fila	Observados Valores	Ajustados Valores	Inferior 95.0% para Media	Superior 95.0% para Media
1	7.98	8.48488	7.1446	9.82515
2	2.04	2.14621	0.242512	4.04992
3	2.32	3.02747	1.12377	4.93118
4	2.96	2.27223	0.36853	4.17593
5	6.98	7.53349	5.62979	9.43719
6	2.36	2.19649	0.292784	4.10019
7	3.36	4.43775	2.53404	6.34145
8	2.94	2.6225	0.718802	4.52621
9	8.32	8.48488	7.1446	9.82515
10	8.96	9.24376	7.34006	11.1475
11	0.96	1.77981	-0.0331082	3.59273
12	9.46	8.08867	6.27576	9.90158
13	1.1	0.26058	-1.55234	2.0735
14	4.12	4.40791	2.59499	6.22082
15	5.5	5.28403	3.47111	7.09694
16	7.1	6.76446	4.95154	8.57737
017	9.06	8.48488	7.1446	9.82515

## Gráficas de Contorno y de Superficie de Respuesta Estimada



**Figura 42. Contorno de superficie de respuesta estimada.** Se muestra una transición gradual desde las zonas de baja producción (azul) hasta la zona óptima (zona roja), las zonas verdes y amarillas representan niveles intermedios de la variable de respuesta.



**Figura 43. Superficie de respuesta estimada.** Se muestra una transición gradual desde las zonas de baja producción (azul) hasta la zona óptima (zona roja), las zonas verdes y amarillas representan niveles intermedios de la variable de respuesta

## Anexo N°08: Análisis estadísticos del efecto de los factores en la productividad

### Análisis ANOVA

**Cuadro 23. Análisis de varianza (ANOVA) para la respuesta productividad (g/L\*día)**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo de cultivo	0.0001	1	0.0001	0.04	0.8524
B:Ext.ac. orujo de uva	0.0528	1	0.0528	25.54	<b>0.0015</b>
C:Etanol	0.0067	1	0.0067	3.29	0.1126
AA	0.0749	1	0.0749	36.23	<b>0.0005</b>
AB	0.0084	1	0.0084	4.09	0.0829
AC	0.0010	1	0.0010	0.49	0.5066
BB	0.1596	1	0.1596	77.20	<b>0.0000</b>
BC	0.000002	1	0.000002	0.00	0.9761
CC	0.0222	1	0.0222	10.74	<b>0.0135</b>
Error total	0.0144	7	0.0020		
Total (corr.)	0.2698	16			

R-cuadrada = **94.6362** porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = **87.7398** porciento

Error estándar del est. = **0.0454694**

Error absoluto medio = **0.0246702**

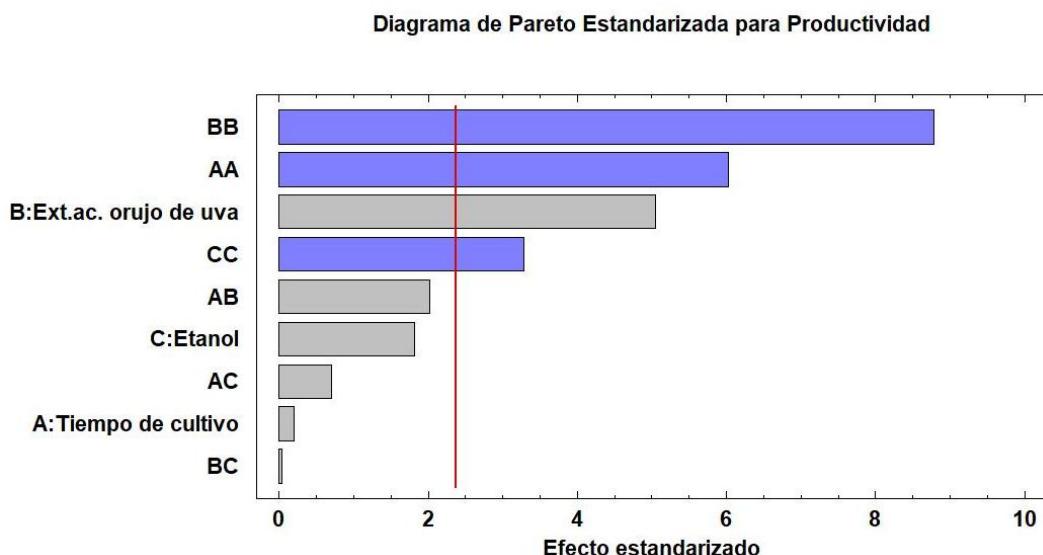
Estadístico Durbin-Watson = 2.61226 (P=0.8993)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.373497

### Diagrama de Pareto

En la figura 44 se presenta el diagrama de Pareto que evalúa la influencia de los factores de estudio (tiempo de cultivo, concentración de extracto acuoso de orujo de uva y concentración de etanol) en su efecto lineal, cuadrático y de sus interacciones sobre la productividad de la producción de celulosa bacteriana (g/L\*día) con un nivel de significancia de 0.05. El efecto cuadrático del extracto acuoso de orujo de uva (BB) demostró tener el mayor impacto positivo en la productividad, esto indica que la relación no lineal del extracto acuoso de orujo de uva es altamente relevante. El efecto cuadrático del tiempo de cultivo (AA) también es significativo, lo que implica que la relación no lineal importante con la productividad. El efecto principal de extracto acuoso de orujo de uva (B) afecta la productividad de forma lineal debido a que cruza el umbral de

significancia estadística. El efecto cuadrático del etanol (CC) es relevante, mostrando que el etanol también tiene un impacto significativo de forma no lineal. Los efectos principales de tiempo de cultivo (A) y etanol (C) no llegan a sobrepasar el umbral de significancia, debido a ello se considera que, aunque la relación cuadrática de los factores mencionados es importante, su efecto lineal no es significativo. Del mismo modo, las interacciones de los factores entre sí (AB, AC, BC) no llega a cruzar la línea de significancia, indicando que, en el rango de condiciones evaluadas, las interacciones de estos factores no son determinantes para la productividad. Se observan los 4 efectos que tienen un P-valor menor que 0.05, indicando que son significativos con un  $R^2$  de 94.63%.



**Figura 44. Diagrama de Pareto de los factores y sus efectos estandarizados para la productividad de celulosa en el tiempo (g/L\*día).** Los factores a evaluar fueron el tiempo de cultivo en días (A), la concentración de extracto acuoso de orujo de uva en % v/v (B) y la concentración de etanol en % v/v (C), además de sus efectos cuadráticos y las interacciones entre las variables. Gráfico obtenido con Statgraphics 19 Centurion.

#### Modelo de regresión

El modelo de regresión para la productividad muestra que el etanol ejerce la mayor influencia positiva (0.26), aunque todos los efectos lineales son positivos, pero de menor

magnitud para el tiempo de cultivo (0.03) y extracto de orujo (0.03). Los términos cuadráticos negativos, especialmente para el etanol (-0.04), indican puntos óptimos definidos, mientras que las interacciones entre variables, aunque positivas, son relativamente débiles. La ecuación, con una constante de -0.96, sugiere que la productividad requiere un mínimo de condiciones iniciales para ser efectiva, y que la optimización debe enfocarse principalmente en el control preciso del nivel de etanol mientras se mantienen las otras variables en sus rangos óptimos.

$$\begin{aligned} \text{Productividad} = & -0.96 + 0.03X_1 + 0.03X_2 + 0.26X_3 \\ & -0.001X_1^2 - 0.0005X_2^2 - 0.04X_3^2 \end{aligned}$$

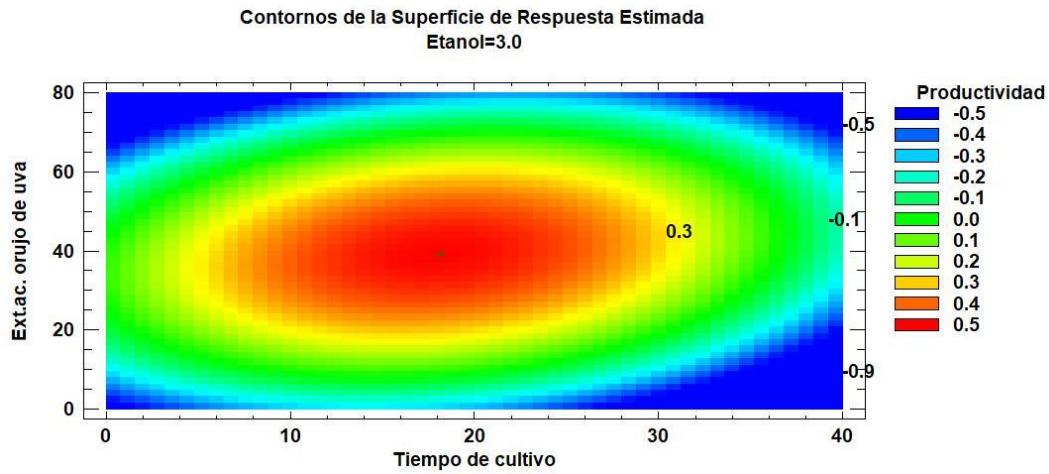
Donde  $X_1$  corresponde al tiempo de cultivo,  $X_2$  corresponde extracto acuoso de orujo de uva,  $X_3$  corresponde al etanol,  $X_1^2$  corresponde al efecto cuadrático del tiempo de cultivo,  $X_2^2$  corresponde al efecto cuadrático del extracto acuoso de orujo de uva, y  $X_3^2$  corresponde al efecto cuadrático del etanol.

#### Resultados estimados

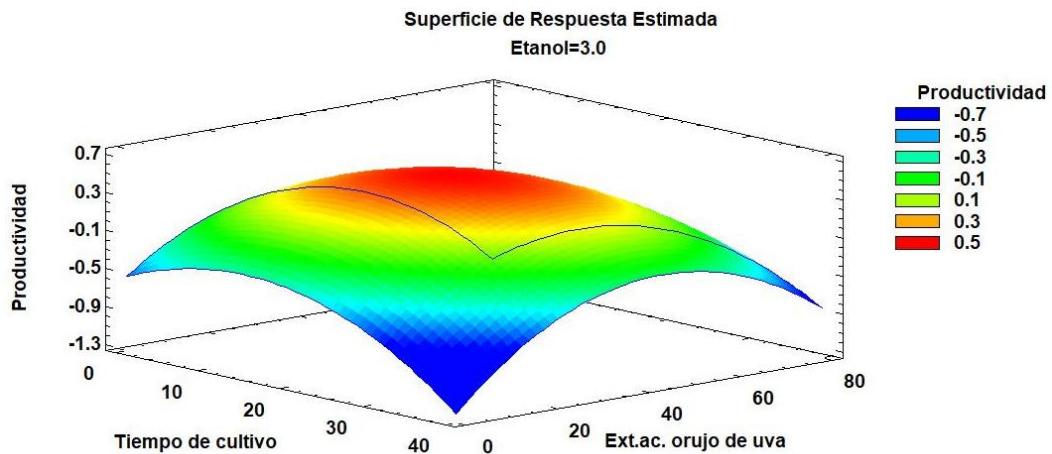
**Cuadro 24. Resultados estimados para la productividad.**

Fila	Observados Valores	Ajustados Valores	Inferior 95.0% para Media	Superior 95.0% para Media
1	0.456	0.483262	0.421308	0.545216
2	0.204	0.195745	0.107746	0.283743
3	0.093	0.112997	0.0249979	0.200995
4	0.296	0.254117	0.166118	0.342116
5	0.279	0.301369	0.21337	0.389368
6	0.236	0.216871	0.128872	0.304869
7	0.134	0.179122	0.0911238	0.267121
8	0.294	0.277243	0.189244	0.365242
9	0.475	0.483262	0.421308	0.545216
10	0.358	0.369495	0.281496	0.457494
11	0.196	0.248712	0.16491	0.332514
12	0.314	0.256706	0.172904	0.340508
13	0.063	0.0421249	-0.0416771	0.125927
14	0.235	0.251294	0.167491	0.335096
15	0.314	0.320183	0.236382	0.403985
16	0.406	0.395235	0.311433	0.479037
17	0.518	0.483262	0.421308	0.545216

## Gráficas de Contorno y de Superficie de Respuesta Estimada



**Figura 45. Contorno de superficie de respuesta estimada.** Se muestra una transición gradual desde las zonas de baja producción (azul) hasta la zona óptima (zona roja), las zonas verdes y amarillas representan niveles intermedios de la variable de respuesta.



**Figura 46. Superficie de respuesta estimada.** Se muestra una transición gradual desde las zonas de baja producción (azul) hasta la zona óptima (zona roja), las zonas verdes y amarillas representan niveles intermedios de la variable de respuesta.

## Anexo N°09: Análisis estadísticos del efecto de los factores en el rendimiento

### Análisis ANOVA

**Cuadro 25. Análisis de varianza (ANOVA) para la respuesta Rendimiento de sustrato en producto ( $Y_{P/S}$ )**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo de cultivo	0.0962914	1	0.0962914	7.38	<b>0.0299</b>
B:Ext.ac. orujo de uva	0.000926679	1	0.000926679	0.07	0.7976
C:Etanol	0.0535675	1	0.0535675	4.10	0.0824
AA	0.424661	1	0.424661	32.54	<b>0.0007</b>
AB	0.0323851	1	0.0323851	2.48	0.1592
AC	0.00292613	1	0.00292613	0.22	0.6503
BB	0.659208	1	0.659208	50.51	<b>0.0002</b>
BC	0.00644112	1	0.00644112	0.49	0.5050
CC	0.149722	1	0.149722	11.47	<b>0.0116</b>
Error total	0.0913552	7	0.0130507		
Total (corr.)	1.13217	16			

R-cuadrada = **91.931** porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = **81.5566** porciento

Error estándar del est. = **0.11424**

Error absoluto medio = **0.0584239**

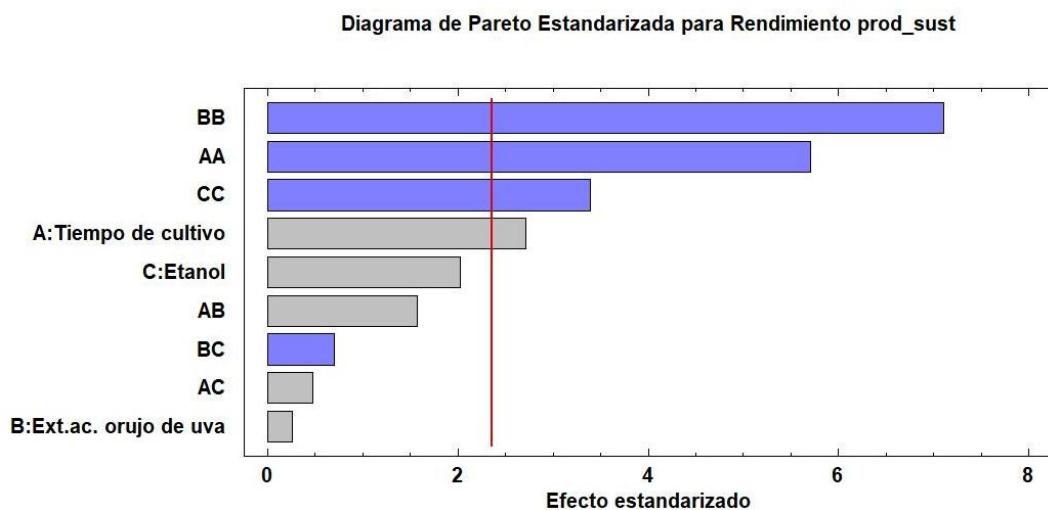
Estadístico Durbin-Watson = 2.73776 (P=0.9361)

Autocorrelación residual de Lag 1 = -0.387364

### Diagrama de Pareto

El diagrama de Pareto mostrado en la figura 47, evalúa la influencia del tiempo de cultivo, concentración de extracto acuoso de orujo de uva y concentración de etanol, en su efecto lineal, cuadrático y de sus interacciones sobre el rendimiento de sustrato en producto ( $Y_{P/S}$ ) con un nivel de significancia de 0.05. El efecto cuadrático del extracto acuoso de orujo de uva (BB) fue el que tuvo una influencia significativa mayor en el rendimiento de sustrato en producto, lo que indica que la relación no lineal del extracto acuoso de orujo

de uva es de gran importancia. En segundo lugar, se encuentra el efecto cuadrático del tiempo de cultivo (AA), demostrando que el factor es crucial, sin embargo, su influencia, en los niveles utilizados en este estudio, no es lineal. Asimismo, el efecto cuadrático del etanol (CC) es fundamental para el rendimiento de sustrato en producto, mostrando que su influencia no es lineal, pero si afecta el rendimiento. El efecto principal tiempo de cultivo (A) fue el único factor que demostró tener una significancia estadística de manera lineal. Los efectos principales etanol (C) y extracto acuoso de orujo de uva (B) no mostraron tener una influencia lineal en el rendimiento de sustrato en producto, sin embargo, como se mencionó anteriormente, si mantienen un efecto cuadrático significativo. Las interacciones entre las variables AB, AC y BC, llegaron a cruzar el umbral de significancia, debido a ello se consideran que no existe una influencia de la interacción de las variables entre sí. Se reflejan 4 efectos que tienen un P-valor menor que 0.05 indicando que son significativos, con un  $R^2$  de 91.93%.



**Figura 47. Diagrama de Pareto de los factores y sus efectos estandarizados para el rendimiento de sustrato en producto ( $Y_{P/S}$ ).** Los factores a evaluar fueron el tiempo de cultivo en días (A), la concentración de extracto acuoso de orujo de uva en % v/v (B) y la concentración de etanol en % v/v (C), además de sus efectos cuadráticos y las interacciones entre las variables. Gráfico obtenido con Statgraphics 19 Centurion.

## Modelo de regresión

El modelo de regresión para el rendimiento de sustrato en producto muestra que el etanol como el factor más influyente (0.77), seguido por el tiempo de cultivo (0.10) y el extracto de orujo (0.07), todos con efectos lineales positivos. Los términos cuadráticos negativos, especialmente para el etanol (-0.11), indican puntos máximos definidos. La interacción tiempo-etanol (AC = 0.002) es la más significativa entre las interacciones positivas, mientras que las interacciones que involucran al extracto de orujo con etanol (BC = -0.001) muestran efectos antagonistas. La constante negativa (-2.44) sugiere que se requiere un umbral mínimo de condiciones para iniciar el rendimiento efectivo, confirmando el patrón observado en la superficie de respuesta.

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento} = & -2.44 + 0.10X_1 + 0.07X_2 + 0.77X_3 - 0.003X_1^2 \\ & -0.001X_2^2 - 0.11X_3^2 \end{aligned}$$

Donde  $X_1$  corresponde al tiempo de cultivo,  $X_2$  corresponde extracto acuoso de orujo de uva,  $X_3$  corresponde al etanol,  $X_1^2$  corresponde al efecto cuadrático del tiempo de cultivo,  $X_2^2$  corresponde al efecto cuadrático del extracto acuoso de orujo de uva, y  $X_3^2$  corresponde al efecto cuadrático del etanol.

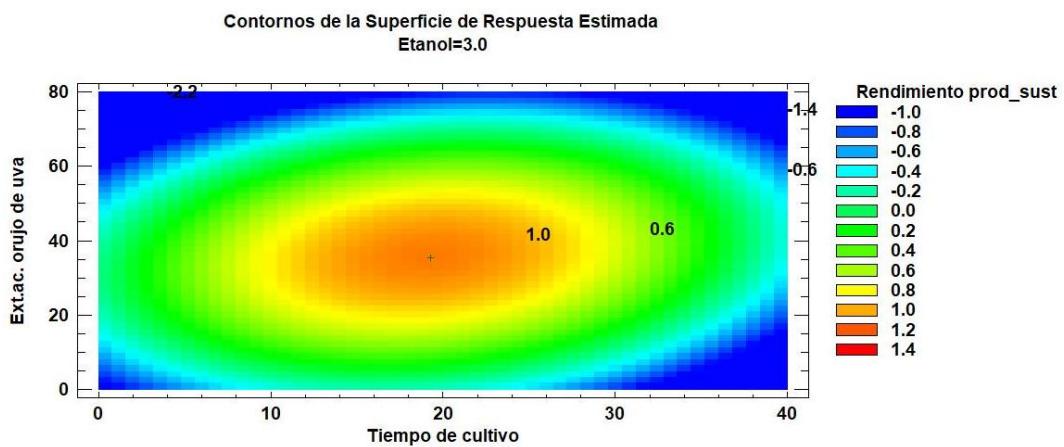
## Resultados estimados

**Cuadro 26. Resultados estimados para rendimiento de sustrato en producto**

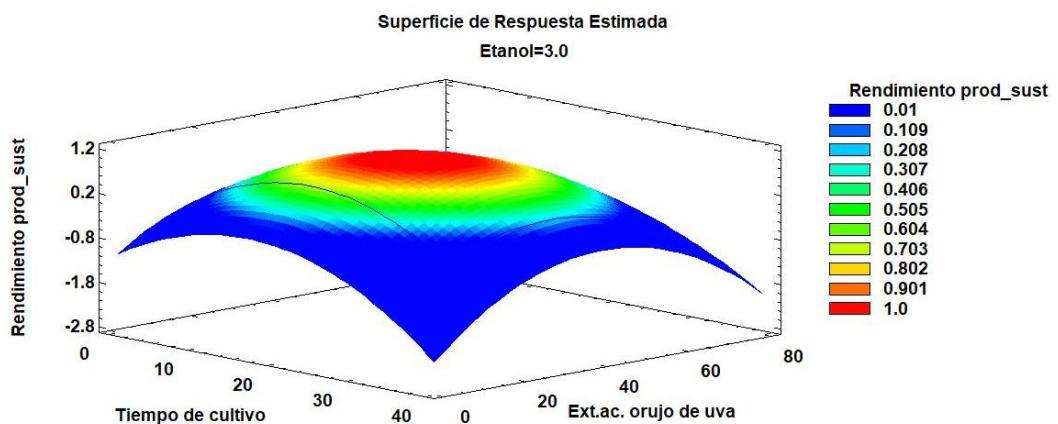
Fila	Observados	Ajustados	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
	Valores	Valores	para Media	para Media
1	1.051	1.08923	0.933572	1.24489
2	0.461	0.437624	0.216531	0.658717
3	0.401	0.440062	0.218969	0.661155
4	0.393	0.383599	0.162506	0.604692
5	0.5	0.640537	0.419444	0.86163
6	0.682	0.581382	0.360289	0.802475

7	0.611	0.66032	0.439227	0.881413
8	0.413	0.413857	0.192764	0.63495
9	1.074	1.08923	0.933572	1.24489
10	0.684	0.747295	0.526202	0.968388
11	0.301	0.399052	0.188503	0.609601
12	0.836	0.681493	0.470944	0.892041
13	0.351	0.39142	0.180871	0.601969
14	0.516	0.419126	0.208577	0.629675
15	0.726	0.657944	0.447395	0.868493
16	0.857	0.868602	0.658053	1.07915
17	1.133	1.08923	0.933572	1.24489

#### Gráficas de Contorno y de Superficie de Respuesta Estimada



**Figura 48. Contorno de superficie de respuesta estimada.** Se muestra una transición gradual desde las zonas de baja producción (azul) hasta la zona óptima (zona roja), las zonas verdes y amarillas representan niveles intermedios de la variable de respuesta.



**Figura 49. Superficie de respuesta estimada.** Se muestra una transición gradual desde las zonas de baja producción (azul) hasta la zona óptima (zona roja), las zonas verdes y amarillas representan niveles intermedios de la variable de respuesta