UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

ESCUELA DE POSGRADO

Programa de Doctorado en Ingeniería Agroindustrial

Efecto del medio y condiciones de cultivo en el rendimiento y calidad de celulosa para obtención de cuero biológico

Tesis para optar el grado de
Doctor en Ingeniería Agroindustrial

Autor:

MSc. Velásquez Ccosi, Percy Fermín
DNI. N° 01345293
Código ORCID: 0000-0001-7006-7583
Asesor:

Dr. Peña Rojas, Gilmar
DNI. N° 10459624
Código ORCID: 0000-0002-1888-4989

Línea de investigación
Desarrollo de nuevos productos agroindustriales

Nuevo Chimbote - PERÚ
2024

UNS
ESCUELA DE POSGRADO

CONSTANCIA DE ASESORAMIENTO DE TESIS

Yo, Dr. Peña Rojas, Gilmar, a través del presente documento, hago constar el asesoramiento de la Tesis de Doctorado que lleva por título: **Efecto del medio y condiciones de cultivo en el rendimiento y calidad de celulosas para obtención de cuero biológico,** elaborado por el **MSc. Velásquez Ccosi, Percy Fermín,** para optar el Grado de **Doctor en Ingeniería Agroindustrial,** en la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional del Santa.

Nuevo Chimbote, setiembre del 2024.

Dr. Peña Rojas, Gilmar
ASESOR
Código ORCID: 0000-0002-1888-4989
DNI N°. 10459624

UNS
ESCUELA DE POSGRADO

CONFORMIDAD DEL JURADO EVALUADOR

Efecto del medio y condiciones de cultivo en el rendimiento y calidad de celulosa para obtención de cuero biológico

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR EN INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

Revisado y Aprobado por el Jurado Evaluador:

.....

Dra. Elza Berta Aguirre Vargas
PRESIDENTE
CÓDIGO ORCID: 0000-0003-1659-9874
DNI N° 19096335

.....

Dr. Carlos Alberto Azañero Díaz
SECRETARIO
CÓDIGO ORCID: 0000-0002-5612-4104
DNI N° 18093785

.....

Dr. Gilmar Peña Rojas
ASESOR
CÓDIGO ORCID: 0000-0002-1888-4989
DNI N° 10459624

UNS
ESCUELA DE POSGRADO

ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

A los dieciséis días del mes de setiembre del año 2022, siendo las 16:00 horas, en el aula multimedia N° 01 de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional del Santa, se reunieron los miembros del Jurado Evaluador, designados mediante Resolución Directoral N° 352-2022-EPG-UNS de fecha 09 de agosto de 2022, conformado por los docentes: Dra. Elza Berta Aguirre Vargas (Presidente), Dr. Carlos Alberto Azañero Díaz (Secretario) y Dr. Gilmar Peña Rojas (Vocal), con la finalidad de evaluar la tesis titulada: ***EFECTO DEL MEDIO Y CONDICIONES DE CULTIVO EN EL RENDIMIENTO Y CALIDAD DE CELULOSA PARA LA OBTENCIÓN DE CUERO BIOLÓGICO,*** presentado por el tesista **Percy Fermín Velasquez Ccosi**, egresado del programa de **Doctorado en Ingeniería Agroindustrial**.

Sustentación autorizada mediante Resolución Directoral N° 476-2022-EPG-UNS de fecha 13 de setiembre de 2022.

El presidente del jurado autorizó el inicio del acto académico; producido y concluido el acto de sustentación de tesis, los miembros del jurado procedieron a la evaluación respectiva, haciendo una serie de preguntas y recomendaciones al tesista, quien dio respuestas a las interrogantes y observaciones.

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 la calificación de: Dieciocho (18)

Siendo las 18:00 horas del mismo día se da por finalizado el acto académico, firmando la presente acta en señal de conformidad.

Dra. Elza Berta Aguirre Vargas
Presidente

Dr. Carlos Alberto Azañero Díaz
Secretario

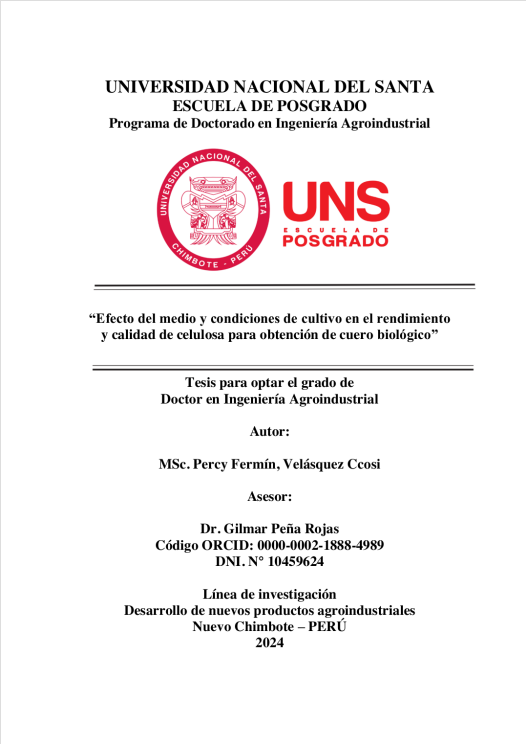
Dr. Gilmar Peña Rojas
Vocal

Recibo digital

Este recibo confirma quesu 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:	Percy Fermín VELÁSQUEZ CCOSI
Título del ejercicio:	Doctorado Ingeniería Agroindustrial
Título de la entrega:	“Efecto del medio y condiciones de cultivo en el rendimiento...
Nombre del archivo:	Informe_tesis_doctorado_Agroindustrial_Velasquez_Final.pdf
Tamaño del archivo:	4.78M
Total páginas:	119
Total de palabras:	27,700
Total de caracteres:	144,352
Fecha de entrega:	06-sept.-2024 10:25a. m. (UTC-0500)
Identificador de la entre...	2446628866



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
ESCUELA DE POSGRADO
Programa de Doctorado en Ingeniería Agroindustrial

“Efecto del medio y condiciones de cultivo en el rendimiento y calidad de celulosa para obtención de cuero biológico”

Tesis para optar el grado de
Doctor en Ingeniería Agroindustrial

Autor:

MSc. Percy Fermín, Velásquez Ccosi

Asesor:

Dr. Gilmar Peña Rojas
Código ORCID: 0000-0002-1888-4989
DNI. N° 10459624

Línea de investigación
Desarrollo de nuevos productos agroindustriales
Nuevo Chimbote – PERÚ
2024

Derechos de autor 2024 Turnitin. Todos los derechos reservados.

“Efecto del medio y condiciones de cultivo en el rendimiento y calidad de celulosa para obtención de cuero biológico”

INFORME DE ORIGINALIDAD

6%	4%	1%	4%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Trabajo del estudiante	3%
2	www.sinapsis-peru.org Fuente de Internet	2%
3	repositorio.uns.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet	<1%
5	ingenieria.ute.edu.ec Fuente de Internet	<1%
6	repositorio.autonoma.edu.pe Fuente de Internet	<1%

Excluir citas	Activo	Excluir coincidencias	< 30 words
Excluir bibliografía	Activo		

DEDICATORIA

A mi madre Justina Nicanora Ccosi Ticona porque soy el resultado de lo que ella quiso hacer de mi formación

A Lady F. compañera de batallas, por su sana comprensión y apoyo constante a fin de cumplir nuestras metas

A Marcelo, Gustavo, Micaela y Rodrigo la razón de mi lucha permanente

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional del Santa, gracias por brindarme la oportunidad de cursar la especialidad. Mi más profundo agradecimiento se extiende también a todos los profesionales que, de manera directa o indirecta, contribuyeron a mi perfeccionamiento académico, durante mi permanencia en la Escuela de Posgrado.

Gracias a mi madre, quien ha sido mi mayor promotora a lo largo de mi desarrollo. También quiero agradecer a Dios por su constante providencia y respaldo durante cada día de este largo y desafiante proceso.

Expreso mi sincero agradecimiento al asesor de esta tesis, Dr. Gilmar Peña Rojas, por su invaluable apoyo brindado a esta investigación. Agradezco especialmente el respeto que ha mostrado hacia mis ideas, así como la orientación y el rigor con los que ha guiado el desarrollo de este trabajo académico.

Gracias a mis colegas catedráticos, egresados, alumnos y personal administrativo de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, quienes siempre me han prestado un gran apoyo moral y humano, necesarios en los momentos difíciles del presente trabajo y esta noble profesión.

Sobre todo, gracias a mi esposa y a mis hijos, por su paciencia, comprensión y solidaridad con este proyecto, por el tiempo que me han concedido, un tiempo quitado a la historia familiar. Sin su soporte esta investigación nunca se habría culminado; por lo tanto, su contribución también forma parte de este logro.

ÍNDICE GENERAL

		Pág.
	CONSTANCIA DE ASESORAMIENTO DE TESIS	ii
	CONFORMIDAD DEL JURADO EVALUADOR	iii
	DEDICATORIA	vii
	AGRADECIMIENTOS	viii
	ÍNDICE GENERAL	ix
	RESUMEN	1
	ABSTRACT	2
	INTRODUCCIÓN	3
	CAPÍTULO I	
	PROBLEMÁTICA DE INVESTIGACIÓN	4
1.1	Planteamiento de fundamentación del problema de investigación	4
1.2	Antecedentes de la investigación	5
1.3	Formulación del problema de investigación	11
1.4	Delimitación del estudio	11
1.5	Justificación e importancia de la investigación	11
1.6	Objetivos de la investigación	12
1.6.1	Objetivo general	12
1.6.2	Objetivos específicos	12
	CAPÍTULO II	
	MARCO TEÓRICO	
2.1	Fundamentos teóricos de la investigación	13
2.1.1	Celulosa bacteriana (CB)	13
2.1.2	Composición química	14
2.1.3	Características de la celulosa bacteriana	15
2.1.4	Factores que influyen en la fermentación de Kombucha	16
2.1.5	Influencia de la composición del medio de cultivo sobre la macro producción de celulosa bacteriana	19
2.2	Marco conceptual	20
	CAPÍTULO III	
	MARCO METODOLÓGICO	
3.1	Hipótesis central de la investigación	25
3.2	Variables e indicadores de la investigación	27
3.3	Métodos de la investigación	27
3.3.1	Según el método científico	27
3.3.2	Según el método frente al objeto de estudio	27
3.4	Diseño o esquema de la investigación	27
3.4.1	Diseño óptimo de experimentos (DOE) en la evaluación de datos	28
3.4.2	Modelización del experimento	28
3.5	Población y muestra	31
3.5.1	Población	31
3.5.2	Muestra	31
3.6	Actividades del proceso investigativo	31
3.6.1	Obtención de las fuentes de carbono	32
3.6.1.1	Obtención del suero de leche en polvo	32

3.6.1.2	Descripción de las operaciones para la obtención de suero de leche en polvo	34
3.6.1.3	Obtención del mucilago de cacao	35
3.6.1.4	Descripción de las operaciones para la obtención del mucilago de cacao	37
3.6.2	Formulación de los medios de cultivo	38
3.6.2.1	Obtención de celulosa bacteriana	39
3.6.2.2	Protocolo para la formulación de cultivos productores de celulosa bacteriana	40
3.6.3	Obtención de cuero biológico	42
3.6.3.1	Operaciones para la obtención de cuero biológico	43
3.6.3.2	Descripción de las operaciones para la obtención de cuero biológico	45
3.7	Técnicas e instrumentos de la investigación	47
3.7.1	Medición de la producción de la celulosa bacteriana	47
3.7.2	Determinación del consumo de sustrato por el método DNS	48
3.7.3	Determinación del contenido de celulosa	50
3.7.4	Ensayos mecánicos, determinación de la resistencia a la tracción y del porcentaje de alargamiento	50
	CAPÍTULO IV	
	RESULTADOS Y DISCUSIONES	
4.1	Rendimiento de biomasa	54
4.1.1	Optimización por diseño simplex centroide (DSC)	57
4.1.2	Optimización por función de deseabilidad para el rendimiento de biomasa	60
4.2	Calidad de celulosa	62
4.3	Ensayos físicos y mecánicos del cuero biológico	62
4.3.1	Resistencia a la tracción y porcentaje de alargamiento	66
4.3.2	Optimización por diseño simplex centroide (DSC)	62
4.3.3	Optimización de las propiedades físicas y mecánicas del cuerpo biológico mediante función de deseabilidad	69
	CAPÍTULO V	
	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
5.1	Conclusiones	71
5.2	Recomendaciones	72
	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Formación de la celulosa y su excreción al medio de cultivo a través de la membrana celular del microorganismo *Acetobacter xylinum*	14
Figura 2	Diseño Simplex centroide con puntos axiales	29
Figura 3	Diagrama de flujo de operaciones para la obtención del suero de leche en polvo modificado	31
Figura 4	Hidrolisis de la lactosa con lactasa	35
Figura 5	Diagrama de flujo de operaciones para la obtención del mucilago de cacao	36
Figura 6	Diagrama de flujo del proceso de cultivo de celulosa bacteriana	39
Figura 7	Diagrama de flujo para la obtención de cuero biológico	44
Figura 8	Forma de la probeta	52

Figura 9	Celulosa bacteriana obtenida en forma de gel en cultivo estático	56
Figura 10	Gráfico de contorno de mezcla del rendimiento de biomasa (proporciones de los componentes)	59
Figura 11	Grafica de rastreo de respuesta de Cox	60
Figura 12	Optimización de rendimiento de biomasa mediante función de deseabilidad	57
Figura 13	Obtención del cuero biológico y pruebas físicas mecánicas	63
Figura 14	Gráfico de contorno de mezcla de la resistencia a la tracción del cuero biológico (proporciones de los componentes)	64
Figura 15	Gráfico de contorno de mezcla del porcentaje de elongación del cuero biológico (proporciones de los componentes)	64
Figura 16	Optimización de las pruebas física y mecánicas del cuero biológico	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Composición química general de Kombucha	15
Tabla 2	Contenido de celulosa de fuentes vegetales en comparación con la celulosa bacteriana	16
Tabla 3	Producción de celulosa bacteriana de distintos desechos agroindustriales	20
Tabla 4	Composición química del mucílago de cacao	21
Tabla 5	Composición de lactosuero dulce y ácido	22
Tabla 6	Operacionalización de variables	25
Tabla 7	Matriz experimental para la evaluación del porcentaje de rendimiento de producción de celulosa bacteriana	30
Tabla 8	Matriz experimental para la evaluación de la resistencia a la tracción	31
Tabla 9	Matriz experimental con valores reales para la evaluación del rendimiento de biomasa	38
Tabla 10	Matriz experimental para los ensayos físicos y mecánicos del cuero biológico	42
Tabla 11	Medidas de las probetas para las pruebas físicas	52
Tabla 12	Variables independientes y rendimiento de biomasa de los tratamientos	54
Tabla 13	Efectos estimados del modelo completo para rendimiento de biomasa	58
Tabla 14	Resultados del modelo completo	58
Tabla 15	Comparaciones de fuentes de celulosa con el tratamiento de estudio (T1)	62
Tabla 16	Variables independientes y respuesta	65
Tabla 17	Análisis de varianza para resistencia a la tracción (RT)	66
Tabla 18	Análisis de varianza para el porcentaje de elongación (PE)	66

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Formulaciones de las mezclas experimentales	80
Anexo 2	Panel fotográfico del procedimiento para la obtención de mucilago de cacao	81
Anexo 3	Panel fotográfico del procedimiento para la obtención de suero de leche en polvo	83
Anexo 4	Norma Técnica Peruana NTP 241.023	84
Anexo 5	Informe de ensayo N° 033-01/2022/LAB/CITEccal	85
Anexo 6	Informe de ensayo N° 033-02/2022/LAB/CITEccal	89
Anexo 7	Norma Técnica Peruana NTP-ISO 14931-2016	93

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de diversas proporciones de sacarosa (SA), mucílago de cacao (MC) y suero de leche (SL) en el rendimiento y la calidad de la celulosa bacteriana (CB) para la producción de cuero biológico. Se optimizaron los parámetros mediante el diseño simplex-centroide (DSC) y la función de deseabilidad (FD). El estudio comprendió 10 tratamientos, en los cuales la mezcla de diferentes proporciones de SA (10-15%), MC (5-10%) y SL (0-5%) constituyó el 20% de la formulación total. El rendimiento de biomasa (RB) se determinó como la relación entre el peso de la celulosa bacteriana (CB) producida a los 28 días y el sustrato consumido, con una pureza de biomasa en términos de celulosa del 96%. Se seleccionó el modelo cúbico debido a su efecto estadístico significativo más cercano al valor-p ($p=0,0377\approx0,05$) y su elevado coeficiente de determinación (R^2 = 93,11%), lo que permite predecir resultados futuros y evaluar diferentes parámetros del efecto de SA, MC y SL en el RB. El análisis de la superficie de respuesta reveló que las proporciones óptimas de cada componente, determinadas por la función de deseabilidad, fueron: 150g de SA, 50g de MC y 0g de SL, estos garantizan un RB superior a 30g de biomasa por gramo de sustrato. En la etapa subsiguiente, la celulosa bacteriana (CB) que exhibió la respuesta más favorable a los tratamientos aplicados se sometió a un proceso de estabilización. Para ello, se ensayaron tres técnicas de curtido: curtido mineral con sulfato de cromo (SC), curtido sintético con tensotan GL-50 (T-GL) y curtido vegetal con polvo de tara (PT). Se establecieron siete tratamientos siguiendo los lineamientos del diseño simplex-centroide (DSC). Los ensayos físico-mecánicos de tracción y porcentaje de alargamiento del cuero biológico obtenido, considerado como un compuesto de matriz polimérica, se llevaron a cabo conforme a lo establecido en la norma NTP-ISO 3376. Mediante la función de deseabilidad, se optimizaron la resistencia a la tracción (RT) en 20 N/mm2 y el porcentaje de elongación (PE) 15 % del cuero biológico. Bajo los siguientes parámetros: 4,64% (SC) 3,64% (T-GL) y 1,70% (PT), Estos resultados superan los valores objetivo de RT y PE establecidos en la norma NTP 241.023:2014, referente a las especificaciones del empeine para calzado casual.

Palabras claves: Kombucha, sustratos, cuero biológico, pruebas físicas y mecánicas

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the effect of various proportions of sucrose (SA), cocoa mucilage (MC) and whey (SL) on the yield and quality of bacterial cellulose (CB) for the production of bioleather. Parameters were optimized using simplex-centroid design (SCD) and desirability function (DF). The study comprised 10 treatments, in which the mixture of different proportions of SA (10-15%), MC (5-10%) and SL (0-5%) constituted 20% of the total formulation. Biomass yield (BY) was determined as the ratio between the weight of bacterial cellulose (CB) produced at 28 days and the substrate consumed, with a biomass purity in terms of cellulose of 96%. The cubic model was selected due to its statistically significant effect closest to the p-value ($p=0.0377\approx0.05$) and its high coefficient of determination ($R^2 = 93.11\%$), which allows predicting future results and evaluating different parameters of the effect of SA, MC and SL on the RB. The response surface analysis revealed that the optimal proportions of each component, determined by the desirability function, were: 150g of SA, 50g of MC and 0g of SL, these guarantee a RB higher than 30g of biomass per gram of substrate. In the subsequent stage, the bacterial cellulose (BC) that exhibited the most favorable response to the applied treatments was subjected to a stabilization process. For this purpose, three tanning techniques were tested: mineral tanning with chromium sulphate (SC), synthetic tanning with tensotan GL-50 (T-GL) and vegetable tanning with tara powder (TP). Seven treatments were established following the guidelines of the simplex-centroid design (DSC). The physical-mechanical tensile and elongation percentage tests of the obtained biological leather, considered as a polymeric matrix composite, were carried out in accordance with the provisions of the NTP-ISO 3376 standard. Through the desirability function, the tensile strength (RT) was optimized at 20 N/mm2 and the elongation percentage (PE) at 15 % of the biological leather. Under the following parameters: 4.64% (SC), 3.64% (T-GL) and 1.70% (PT), these results exceed the target RT and PE values established in the NTP 241.023:2014 standard, referring to the specifications of the upper for casual footwear.

Keywords: Kombucha, substrates, biological leather, physical and mechanical tests

INTRODUCCIÓN

El curtido de pieles involucra una serie de procesos de estabilización del colágeno por parte de los agentes curtientes, de modo que la piel ya no es susceptible de putrefacción o pudrición (Zhang, 2006). La industria del cuero suele emplear pieles de animales y subproductos de la industria cárnica como materia prima. En este contexto, podría considerarse que la industria del cuero tiene el potencial de ser respetuosa con el medio ambiente, ya que utiliza productos desechados de la producción de carne (Taylor et al., 1998). No obstante, esta industria a menudo se asocia con altos niveles de contaminación, debido a los olores desagradables, los residuos orgánicos y el elevado consumo de agua generados durante sus procesos de fabricación.

Diferentes formas de desechos biológicos surgen durante la transformación de pieles en cueros, según (Ozgunay *et al*., 2007) de una tonelada de pieles saladas en húmedo, solo unos 200 kg se convierten en cuero acabado y la diferencia se desecha.

La celulosa bacteriana de Kombucha es un biopolímero puro, ecológico con diversas aplicaciones comerciales. Su uso está limitado por la capacidad de producción de las cepas bacterianas y el costo del medio. La minería de nuevos organismos con condiciones de crecimiento bien optimizadas será importante para la masiva producción de celulosa bacteriana. (Saleh *et al*., 2022).

La estructura supramolecular de celulosa bacteriana tiene características micro morfológicas únicas con fibrillas separadas entrecruzadas formadas cuando diferentes capas están interconectadas, combinadas para formar una superficie resistente que es difícil de rasgar cuando se seca (Takai 2017).

El presente estudio se centra en el desarrollo de un cuero biológico a partir de celulosa bacteria de Kombucha, conscientes de la limitación por la capacidad de producción de las cepas bacterianas y el costo de los medios de cultivo se logró demostrar que el mucilago de cacao conjuntamente con sacarosa puede ser utilizado en la formulación de medios de cultivo para la producción de celulosa bacteriana, así mismo se logró interacciones importantes entre los curtientes mineral, sintético y vegetal.

CAPÍTULO I

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento de fundamentación del problema de investigación

Actualmente se sabe que no solamente se puede obtener celulosa de las paredes de células vegetales como el algodón y fibras de madera, sino que también es sintetizada por varios grupos de bacterias, principalmente las *Gluconacetobacter xylinum*; sin embargo, la "Celulosa Bacteriana aún se encuentra en un proceso de estudio para reducir costos de fabricación, dado que el alto valor económico de los medios de cultivos usados" para su síntesis aun provoca un impedimento en su producción (Jozala, *et al*., 2015).

Kombucha es un té azucarado parcialmente fermentado por diversos microorganismos como bacterias y levaduras que forman una biopelícula especial rica en celulosa, pero su aprovechamiento adaptado en nuestro medio local y posibles nuevas aplicaciones adatada al consorcio originario de Kombucha en incipiente.

(MINAGRI, 2018), El cacao ocupa los primeros lugares en importancia en varias regiones, Ayacucho posee la quinta posición nacional con 5056 toneladas métricas de cacao, además es un producto agrario priorizado desde el 2018. Otro aspecto social trascendente del cacao es que se ha utilizado como uno de los principales cultivos para la reconversión de la coca. La importancia económica del cacao no solo abarca la producción de derivados del cacao y productos industriales, sino también la utilización de los subproductos generados, por consideración con el medio ambiente.

De acuerdo al (MINAGRI, 2018), La superficie instalada de cacao ha pasado de 143 mil a 199 mil hectáreas. (Ortiz & Álvarez, 2015), indican que los subproductos del beneficio de cacao son aproximadamente tres toneladas de cáscara de cacao (peso fresco) y 60 litros de exudado por 5464 mazorcas recolectadas, estos desperdicios representan una amenaza a la salud pública. "Aproximadamente 90% del total de la leche utilizada en la industria quesera es eliminada como lactosuero, el cual retiene cerca de 55% del total de ingredientes de la leche como la lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales". (Adolfo & Huertas, 2019). Algunas posibilidades de la utilización de este residuo han sido propuestas, pero las

estadísticas indican que una importante porción de este residuo es descartada como efluente el cual crea un serio problema ambiental

Hoy en día, uno de los principales problemas tanto de la piel como del cuero artificial en el mercado es su origen plástico, plantea un serio problema a la hora de desecharse y la mayoría de las veces termina en un vertedero. Del mismo modo, no es creíble pensar que la piel natural de origen animal pueda seguir abasteciendo un mercado en continuo crecimiento. (Sandoval & Guadalupe, 2017) avizoran una nueva generación de biomateriales y dan respuesta a este problema con un nuevo enfoque: una serie de productos, como el cuero de hongos, de origen completamente natural y sostenible.

Según (Saleh, *et al* 2022), la falta de conocimiento y conciencia de los consumidores, sobre la procedencia de materiales usados para elaborar artículos de moda en base a piel animal, ha provocado que exista una creciente demanda de estos productos a nivel mundial, obligando a los fabricantes de cuero a reproducir y alterar el ciclo natural de vida de diferentes especies de mamíferos y aves.

1.2. Antecedentes de la investigación

(Ayyappan *et al*., 2022a) en su investigación “Incorporaciones de nanomateriales de oro, plata y carbono a la celulosa bacteriana derivada de la kombucha: desarrollo de materiales antibacterianos similares al cuero”, concluyeron en los siguiente:

Incorporaron varios nanomateriales a la celulosa bacteriana derivada de kombucha similar al cuero para estudiar diversas características fisicoquímicas y el potencial de aplicación.

Los datos de dispersión de rayos X de ángulo pequeño revelaron la reducción en el radio de giro y la reducción en la sección transversal homogénea de las fibras plausiblemente debido al llenado de huecos y la compresión por interacciones con nanomateriales de oro y plata.

El alargamiento a la rotura como las temperaturas de transición vítrea aumentaron debido a diversas interacciones no covalentes con diferentes nanomateriales. Incrementó significativamente la hidrofobicidad tras la incorporación de los nanomateriales mostrando su usabilidad en diferentes condiciones climáticas**.**

Además, los materiales mostraron actividad antibacteriana y alta resistencia a la flexión.

(Garcia & Prieto, 2018) en un artículo de revisión sobre “celulosa bacteriana como potencial sustituto del bio-cuero para la industria del calzado” concluyen lo siguiente:

Las principales marcas de ropa deportiva Puma, Adidas y Nike muestran interés en alternativas veganas a los materiales como consecuencia de la creciente conciencia ecológica de la necesidad de evitar materiales plásticos. Están desarrollando un cuero ecológico hecho de fibras naturales mezcladas con aceites vegetales.

La celulosa bacteriana es un material maleable, biocompatible, 10 veces más fuerte que la celulosa vegetal y es altamente hidrofílico (puede almacenar más del 90% de su propio peso en agua).

La producción industrial de fibras de celulosa por bacterias del género *Gluconobacter xylinum* como parte del té de Kombucha y otras fermentaciones, combinadas con otras bacterias y levaduras, producen aeróbicamente películas de celulosa que se acumulan en el medio extracelular de los espesores deseados y, cuando se secan, producen un material similar al cuero resistente con propiedades que se asemejan al tipo de cuero animal que se usa en la industria del calzado.

Las propiedades táctiles de la celulosa bacteriana son similares a las del fino cuero acabado; es decir, es muy suave y estirable. Estas propiedades son importantes para el bienestar y la comodidad del usuario, para las personas con diabetes son cruciales, por lo tanto, los pacientes con síndrome del pie diabético necesitan calzado que reduzca el riesgo de daños en la piel. Además, en 2025, más del 20% de los europeos tendrá 65 años o más, y se producirá un aumento particularmente importante en el número de personas mayores de 80 años. Estos grupos también necesitan evitar las infecciones de los pies.

La funcionalización y modificación de celulosa bacteriana se ha logrado mediante la alteración química o mecánica del polímero y mediante ajustes a las condiciones de cultivo, al controlar el crecimiento de las bacterias productoras, podría adaptarse las propiedades deseadas por la industria del calzado, se podrían producir láminas de celulosa bacteriana de 40 x 40 cm, un tamaño compatible con los requisitos de fabricación del calzado.

(Leal *et al*., 2018) presentan una revisión de la literatura titulad “Aspectos tecnológicos de la Kombucha, sus aplicaciones y el cultivo simbiótico (SCOBY), y extracción de compuestos de interés”, en la que concluyen de la siguiente manera:

La celulosa bacteriana son fibras nanométricas de bajo costo, altamente biodegradables y tienen un impacto ambiental reducido, han despertado un interés creciente como alternativa a los sintéticos, especialmente como relleno y refuerzo de compuestos, ya que tienen una estructura similar a la de la celulosa vegetal.

Debido a los daños tan preocupantes causados al medio ambiente por los procesos industriales y la generación de residuos, ha surgido interés por las fibras cristalinas y nanodimensionales de celulosa bacteriana como alternativa a los procesos tradicionales.

Entre los factores que afectan el rendimiento de celulosa bacteriana de la fermentación de kombucha, son: la concentración de sacarosa y nitrógeno, la temperatura, los períodos de incubación, la profundidad del área superficial en contacto con el té y una condición estática del caldo. Además, la cafeína y las xantinas de la kombucha estimulan la síntesis de celulosa bacteriana.

Las condiciones estáticas y una variedad de azúcares influyen en la producción de celulosa. De 5 a 14 días de fermentación, la concentración de celulosa bacteriana incremento de 4,77 ± 0,22 g. L−1 a 9,49 ± 0,47 g. L−1. Además, esta celulosa bacteriana en SCOBY alcanzó valores elevados de resistencia a la tracción (25,7 ± 1,2 MPa) y longitud de rotura (12,3 ± 0,6 km).

La celulosa bacteriana estuvo libre de contaminantes, como lignina y hemicelulosa. Las fibras cuyo diámetro estaba por debajo de los 100 nm formaban una red entrelazada tridimensional que mejora las propiedades mecánicas de la matriz.

(Ding *et al*., 2022) en su artículo “Un cambio radical hacia una producción de cuero sostenible y libre de cromo: uso de un agente curtiente aldehídico de biomasa combinado como un tratamiento pionero de curtido libre de cromo”, concluye con lo siguiente:

Los análisis de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X XPS y Calorimetría diferencial - de barrido TG-DSC mostraron que la introducción del agente curtiente aldehídico proporciona enlaces cruzados adicionales y constituyen una red entrelazada más robusta entre los grupos carboxilo de las fibras de colágeno.

Debido a esto, se mejoraron sustancialmente las propiedades físicas del cuero resultante, en términos de resistencia mecánica, propiedades organolépticas y rendimiento de coloración. Estas mejoras tuvieron lugar a un nivel tal que el cuero resultante mostró propiedades físicas comparables al cuero crust procesado utilizando metodologías convencionales de curtido al cromo, sin mencionar las ventajas adicionales, en términos de respeto al medio ambiente y economía.

(Hildebrandt *et al*., 2021) en su estudio titulado “La circularidad de las posibles rutas de producción de biotextiles: Comparación de los impactos del ciclo de vida de los materiales de base biológica utilizados en la fabricación de sustitutos del cuero” revelan las siguientes conclusiones:

Los sustitutos contribuyen a posibles estrategias a largo plazo para reducir y reemplazar el uso del cuero, pero solo en una combinación bien equilibrada cuando se predice una mejora, y solo con el potencial de apalancamiento para un desacoplamiento de impacto profundo.

También concluyen que confiar en la síntesis natural del cuero como un subproducto natural y gratuito de la producción de carne costosa y de alto impacto es una suposición cada vez más engañosa cuando se considera un mundo con tierras, recursos forrajeros cada vez más escasas y una población en crecimiento de demanda de consumo de carne en números absolutos. Por lo tanto, la asignación por precio es una regla de asignación cada vez más precisa para diferenciar los impactos entre la carne y el cuero, especialmente considerando los factores de costos futuros y las presiones del uso de la tierra.

(Provin *et al*., 2021) en su artículo de revisión titulado “Economía circular para la industria de la moda: Aprovechamiento de residuos de la industria alimentaria para la producción de biotextiles” consideran finalmente las siguientes tendencias en investigaciones futuras:

Mayores estudios sobre ahorro de energía y agua, rendimientos de producción, entre otros desafíos. En este sentido, el uso de celulosa bacteriana en la producción de ropa se puede destacar como un buen ejemplo, ofreciendo características eco-amigables. Así mismo en investigaciones futuras, las limitaciones asociadas con la producción comercial a gran escala también deben abordarse para su utilización en la industria de la moda.

(Vargas *et al*., 2021) una su revisión bibliométrica titulada “Efectos sobre la salud y potencial probiótico y prebiótico de la kombucha” presentan las siguientes consideraciones finales:

La kombucha es una importante fuente de compuestos bioactivos derivados de la materia prima y aumentada por el proceso de fermentación. Estos compuestos beneficiosos dependen de varias variables, como el tipo de materia prima, el tiempo de infusión, la comunidad microbiana del cultivo iniciador y los parámetros de fermentación. Por lo tanto, las propiedades que promueven la salud de la kombucha no deben generalizarse, ya que existen muchas variables que afectan la composición del producto final.

Hasta ahora, la Kombucha artesanal se produce a través de un proceso de fermentación no controlada y la comunidad microbiana es compleja, diversa y variable. Además, las interacciones entre levaduras, bacterias y su impacto en el microbiota humano no se han entendido ni investigado de manera adecuada y exhaustiva. Por esta razón, la Kombucha no puede considerarse una bebida probiótica o simbiótica, a menos que se hayan agregado cepas probióticas documentadas en el proceso.

Dado que la demanda de este producto va en aumento, se requieren estudios científicos para estandarizar el cultivo iniciador con microorganismos bien conocidos, con el fin de controlar los metabolitos producidos, estandarizar el producto final y desarrollar más estudios sobre las actividades biológicas de la kombucha, estableciendo como una bebida simbiótica funcional.

(Aguilar & Espin, 2019), investigaron la obtención de un biopolímero empleando residuos agroindustriales de la elaboración del cacao CCN-51 y un aislado nativo de *Gluconobacter xylinus*. “El biopolímero fue caracterizado mediante varios análisis como: microscopía electrónica de barrido (SEM), calorimetría diferencial de barrido (DSC), espectroscopia infrarroja” (FTIR), tracción, humedad, color y dimensionamiento de las membranas.

Los rendimientos de CB más relevantes alcanzados con residuos de las industrias del vino y la pulpa fueron 0,6 y 0,3 g/l, respectivamente, seguidas por el residuo crudo de biodiesel y el suero de queso con producciones de aproximadamente 0,1 g / L después de 96 h de incubación. La adición de otras fuentes de nutrientes (extracto de levadura, nitrógeno y fosfato) a los medios de cultivo basados en residuos

incrementan en un 200% y un 100% estas producciones de celulosa bacteriana (Carreño, *et al* 2019).

Ricaurte (2017) define al BioCuero como un tejido artesanal sostenible generado a base de Kombucha. El material es básicamente la consecuencia de una simbiosis de bacterias en un proceso de fermentación. Su creadora, Suzanne Lee (2020), diseñadora de moda y textil, comparte a través de una charla Ted, sus experimentos sobre el cultivo de este material que puede ser utilizado como una tela o biocuero para hacer ropa y accesorios de novedad.

Fruitleather es un novedoso material que reutiliza frutas y verduras en estado de descomposición. Fue desarrollado por un grupo de estudiantes de diseño de la ciudad de Rotterdam, Holanda. Este proyecto ha permitido darle uso a la gran cantidad de desechos orgánicos generados por las grandes cadenas de supermercados, logrando reducir la basura, crear conciencia y contribuir con el cuidado del planeta (Rosu, 2018).

Hijosa (2020). Es una empresa que desarrolla cuero vegetal a base de fibras de piña inicia su proceso con la recolección y clasificación de las hojas de piña, desfibrándolos para extraer celulosa, lavado y secado con la finalidad de eliminar la coloración verdosa de las fibras, posteriormente se peinan y secan al sol para una vez secas, se tiñen y las procesan de manera que forman una malla no tejida similar al fieltro. De esta forma crean la base para dar paso a realizar las terminaciones en la superficie del material. Se pueden lograr diferentes calibres y texturas, simulando el aspecto de cuero.

Según Cozzoni (2021), “Muskin es un nuevo material textil fabricado con setas (*Agaricus campester*), su apariencia es sumamente parecida a la gamuza y tiene propiedades similares al cuero de origen animal” resistente, flexible, aislante, suave, maleable, resistente al agua y permite la respiración. Adicional a esto, es antibacteriano y posee una gran capacidad de absorber la humedad.

Simone (2021), en su serie, FashionUnited explora las alternativas sostenibles y las innovaciones textiles que se están llevando a cabo actualmente en todo el mundo; desarrolla biomateriales a base de algas marinas, los que crecen hasta 10 veces más rápido que el bambú y se cultiva en granjas acuáticas. En otras palabras, un hilo biológico de algas marinas “alginato".

Un grupo multidisciplinario de científicos emprendedores mexicanos organizó la empresa de base tecnológica GECO. Su primer invento fue un bioplástico a base de cáscara de naranja, de fácil y ligera biodegradación, después de realizar diversas pruebas a nivel laboratorio, el equipo de científicos creó un polímero biodegradable con bacterias Gluconacetobacter xylinus, que se reproduce de manera natural ante la desintegración de la naranja (Rodríguez, 2020).

1.3 Formulación del problema de investigación

¿Qué medios y condiciones de cultivo son determinantes en el rendimiento y calidad de celulosa para la obtención de cuero biológico?

1.4 Delimitación del estudio

La presente investigación se desarrolló en la región Ayacucho, particularmente en las ciudades de Huamanga, Ayna y centro poblado de Allpachaka. En la ciudad de Ayna (Cooperativa Agraria Cafetalera Valle Río Apurímac CAC VRA) y centro poblado de Allpachaka (Fundo Allpachaka de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga) se recolectó mucilago de cacao y suero de leche respectivamente, para la formulación de los medios de cultivo; en Huamanga (Centro Experimental de Curtiembre de la Universidad Nacional del San Cristóbal de Huamanga) se desarrolló los experimentos en la producción de (celulosa bacteriana de Kombucha) para formular tratamientos de cuero biológico y los ensayos físicos y mecánicos se realizaron en los laboratorios del (Centro de Innovación Productiva y Transferencia Tecnológica del Cuero, Calzado e Industrias Conexas – CITEccal) del Ministerio de la Producción, adscrito al Instituto Tecnológico de la Producción- ITP Red CITE. El período en que se realizó esta investigación comprendió entre febrero de 2019 a marzo del 2022.

1.5 Justificación e importancia de la investigación

El presente estudio se justifica **porque** se descubrió una isla de plástico y materiales sintéticos, frente a las costas de Chile y Perú. que tiene una superficie aproximada de 2.6 millones de kilómetros cuadrados, casi dos veces la superficie de Perú (MINAM 2022), además estos materiales se degradan en un tiempo aproximado de 400 años. En el último Congreso de la Asociación Internacional de Residuos Sólidos, celebrado en la ciudad española de Bilbao en 2019, se advirtió que el plástico invadirá cada cm^2 de playa en el futuro y habrá más plástico que peces en el océano,

presencia de microplásticos en especies de peces, crustáceos y moluscos (UICN 2019). **Para que** un nuevo material no catalice la situación descrita anteriormente debe ser biodegradable, según Ellen (2019) estos materiales tienen la capacidad de degradarse hasta CO_2, CH_4, agua y biomasa por acción de microorganismos, contiene un mínimo del 50 % de sólidos volátiles, tiene concentraciones limitadas de sustancias químicas peligrosas y su degradación se realiza en un tiempo razonable: Degradación del 90 % en 6 meses en presencia de O_2 y 2 meses es ausencia de O_2.

La importancia que tiene la presente investigación es aprovechar las características de la celulosa bacteriana, según (Leal *et al*., 2018) son fibras nanométricas de bajo costo, altamente biodegradables y tienen un impacto ambiental reducido, han despertado un interés creciente como alternativa a los sintéticos, especialmente como relleno y refuerzo de compuestos, ya que tienen una estructura similar a la de la celulosa vegetal.

Debido a estas consideraciones, esta investigación se centra en el estudio de los factores que afectan el rendimiento en la producción de celulosa bacteriana de la fermentación de Kombucha, se evaluó residuos agroindustriales de la fabricación de chocolate y derivados lácteos como sustratos alternativos sustentables.

1.6 Objetivos de la investigación

1.6.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto del medio y condiciones de cultivo en el rendimiento y calidad de celulosa para la obtención de cuero biológico.

1.6.2 Objetivos específicos

- Optimizar el rendimiento en la producción de celulosa bacteriana de Kombucha utilizando como sustratos mucilago de cacao, suero de leche, sacarosa y combinaciones.
- Determinar la pureza de la celulosa bacteria resultante producto del mejor medio de cultivo.
- Evaluar diferentes curtientes en la celulosa bacteriana, que resalten las características físicas y mecánicas del cuero biológico.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Fundamentos teóricos de la investigación

2.1.1 Celulosa bacteriana (CB)

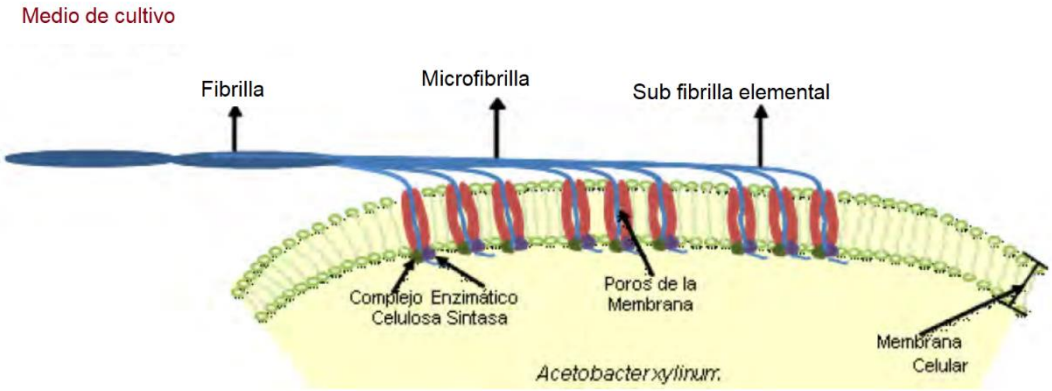
“La celulosa bacteriana es un biopolímero con una alta cristalinidad y pureza que es sintetizado principalmente por *Komagataeibacter xylinus*, anteriormente llamada *Gluconacetobacter xylinus* o *Acetobacter xylinum”* varios estudios revelan que este tipo de celulosa puede ser sintetizada por bacterias de los géneros *Agrobacterium, Achromobacter*, *Aerobacter, Azotobacter*, *Pseudomonas, Rhizobium* y *Sarcina* (Soriano & Barreto, 2018).

Las bacterias del género *Acetobacter* producen celulosa a partir de fuentes de carbono como glucosa, sacarosa, glicerol, manitol o arabitol. La síntesis de celulosa consta de dos etapas principales : “la primera es la conversión de la fuente de carbono en uridin difosfato glucosa (UDP-glucosa), que es el sustrato usado para producir la celulosa” la segunda etapa es la formación de la celulosa y su secreción al medio del cultivo (Saleh *et al*., 2022)

El proceso inicia con el ingreso del sustrato al microorganismo y su conversión a glucosa-6-fosfato por la enzima glucoquinasa; posteriormente, la glucosa-6-fosfato pasa a glucosa-1-fosfato por la acción de la enzima fosfoglucomutasa. En el siguiente paso, la glucosa-1-fosfato se convierte en UDP-glucosa en presencia de la enzima UDPG pirofosforilasa; finalmente, por la acción de la enzima celulosa-sintasa, que es la encargada de realizar la polimerización de la glucosa, se forma la celulosa (Carreño, *et al* 2019).

Figura 1

Formación de la celulosa y su excreción al medio de cultivo a través de la membrana celular del microorganismo Acetobacter xylinum.



Fuente: (Carreño *et al*., 2019)

2.1.2 Composición química

El conocimiento detallado de la composición y propiedades del té de Kombucha es crucial para comprender mejor su cinética; sin embargo, la composición y la concentración de metabolitos dependen de la fuente de inóculo, la concentración de azúcar y té, el tiempo de fermentación y la temperatura utilizada (Li *et al*., 2019a) Cualquier cambio en las condiciones de fermentación podría afectar el producto final, sin embargo, los componentes principales y algunos metabolitos clave producidos en el té fermentado se presentan a continuación en la tabla 1.

Tabla 1

Composición química general de Kombucha

	Compuesto	Composición media	sacarosa inicial	Tiempo de fermentación (días)	Referencias
Ácidos orgánicos	Ácido acético	5,6 g/l	70g/L	15 días	Blanco (1996)
	Ácido acético	8,36 g/l	100g/L	18 días	Jayabalan et al. (2007)
	Ácido acético	11g/L	100g/L	30 días	Chen y Liu (2000)
	Ácido glucónico	39g/L	100g/L	60 días	Chen y Liu (2000)
	Ácido glucurónico	0,0160 g/L	70g/L	21 días	Lončar et al. (2006)
	Ácido láctico	0,18g/L	100g/L	18 días	Jayabalan et al. (2007)
vitaminas	vitamina B1	0,74 mg/ml	70g/L	15 días	Bauer-Petrovska y Petrushevska-Tozi (2000)
	vitamina B2	8 mg/100 ml	70g/L	10 días	Malbaša et al. (2011)
	vitamina B6	0,52 mg/ml	70g/L	15 días	Bauer-Petrovska y Petrushevska-Tozi (2000)
	Vitamina B12	0,84 mg/ml	70g/L	15 días	Bauer-Petrovska y Petrushevska-Tozi (2000)
	Vitamina C	25 mg/litro	70g/L	10 días	Malbaša et al. (2011)
Compuestos generales	Etanol	5,5 g/l	100g/L	20 días	Chen y Liu (2000)
	Proteínas	3 mg/ml	100g/L	12 días	Jayabalan et al. (2007)
	Polifenoles del té	GAE de 7.8 mm	100g/L	15 días	Chu y Chen (2006)
Minerales	Cu, Fe, Mn, Ni, Zn	0,1 a 0,4 µg/mL	70g/L	15 días	Bauer-Petrovska y Petrushevska-Tozi (2000)
Aniones	F − , Cl − , Br − , yo − , NO 3 − , HPO 4 − SO 4 −	0,04 a 3,20 mg/g	100g/L	7 días	Kumar, Narayan y Hassarajani (2008)

Fuente: Villarreal *et al* 2018

2.1.3 Características de la celulosa bacteriana

En general, la “CB es estable en soluciones básicas, pero es susceptible a hidrólisis alcalina bajo condiciones drásticas (NaOH 1 M, 170° C). Diversos agentes oxidantes pueden afectar sus propiedades” al romper las cadenas y alterar la estructura (Martínez, 2019).

El mecanismo de síntesis de CB le confiere una pureza superior a cualquier fuente vegetal tabla 2, lo cual le otorga características singulares: alto grado de cristalización, alta resistencia a la presión, elasticidad y durabilidad. “La celulosa tiene alta capacidad para absorber agua y debido a un menor diámetro de las microfibrillas, la CB posee una mayor área superficial en comparación a la celulosa

de madera". (Klemm *et al*., 2018). Además de estas particularidades fisicoquímicas de importancia industrial, la CB es inerte metabólicamente, no tóxica, ni provoca reacción alérgica al contacto.

Tabla 2

Contenido de celulosa de fuentes vegetales en comparación con la celulosa bacteriana.

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

Fuente: Adaptado de Klemm *et al*., 2018.

2.1.4 Factores que influyen en la fermentación de Kombucha

La fermentación está influenciada por muchos factores como la temperatura, el pH, la cantidad de oxígeno, el CO_2 disuelto, el sistema operativo, el suministro de precursores, la velocidad de corte en el fermentador, así como la naturaleza y composición del medio. Cualquier variación en estos factores puede afectar la velocidad de fermentación, el espectro, el rendimiento, las propiedades organolépticas, la calidad nutricional y otras propiedades fisicoquímicas del producto. Las diferentes variedades de plantas, las concentraciones de azúcar, el tiempo de fermentación y la composición del hongo del té pueden explicar las diferencias en la composición y, por lo tanto, las actividades biológicas también se verían afectadas (Wolfe & Dutton, 2015).

- **Sustrato**

La bebida de Kombucha se obtiene a partir de la fermentación de tés verdes o negros endulzados, pero algunos autores (Battikh, Bakhrouf, & Ammar, 2015 citado en Watawana *et al*., 2016) han estudiado otros sustratos como alternativa para su elaboración obteniendo resultados interesantes. Battikh *et al*. (2015) probaron la actividad antimicrobiana de varios análogos del té de Kombucha. Watawana *et al*. (2016) fermentaron agua de coco (*Cocos nucifera var*. aurantiaca) con el consorcio

Kombucha, observaron una mejora de algunas actividades biológicas interesantes, nuevamente, Ayed *et al*. (2016) desarrollaron una bebida de Kombucha a partir de jugo de uva con propiedades sensoriales y funcionales mejoradas después de solo 6 días de fermentación. De acuerdo con estos estudios, se puede concluir que investigar el potencial terapéutico de las bebidas de Kombucha preparadas a partir de diferentes sustratos sería un enfoque interesante.

- **Efecto del tiempo**

La fermentación del té de Kombucha normalmente oscila entre 7 y 60 días y las actividades biológicas pueden aumentar durante este proceso; sin embargo, los mejores resultados se han obtenido en un promedio de 15 días (Li *et al*., 2019b). Aunque la mayoría de las actividades antioxidantes que se han obtenido han aumentado con el tiempo de incubación, no se recomienda una fermentación prolongada debido a la acumulación de ácidos orgánicos, que podrían alcanzar niveles perjudiciales para el consumo directo. Además, el CO_2 generado puede empezar a acumularse en la interfase entre la biopelícula y el caldo y puede bloquear la transferencia de nutrientes creando un ambiente debilitado.

- **pH**

El pH es uno de los parámetros ambientales más importantes que afectan la fermentación de Kombucha, ya que algunos de los ácidos formados, como el acético y el glucónico, podrían ser responsables de las actividades biológicas de las bebidas resultantes. También está estrechamente relacionado con el crecimiento microbiano y los cambios estructurales de los compuestos fitoquímicos que pueden influir en la actividad antioxidante (Du *et al*., 2018). Sin embargo, el valor de pH más bajo aceptable no debe descender por debajo de 3, que es el del tracto digestivo (Jayabalan *et al*., 2019). Sin embargo, el período de tiempo para obtener este valor puede diferir según el origen del medio de cultivo y las condiciones de fermentación.

- **Tasa de transferencia de oxígeno y proceso de ampliación**

La mayoría de los procesos de fermentación son aeróbicos y, por lo tanto, requieren la provisión de oxígeno. Si se considera la estequiometría de la respiración, entonces la oxidación de la glucosa se puede representar como:

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \text{ -------> } 6CO_2 + 6H_2O$$

donde se requieren 192 g de oxígeno para la oxidación completa de 180 g de glucosa. Sin embargo, ambos componentes deben estar en solución antes de que estén disponibles para un microorganismo y el oxígeno es aproximadamente 6000 veces menos soluble en agua que la glucosa, por lo que no es posible proporcionar a un cultivo microbiano la cantidad de oxígeno necesaria para completar la oxidación. de la glucosa o cualquier otra fuente de carbono, en una sola adición.

En la fermentación de Kombucha, según algunos autores, el proceso de agitación afecta la estructura de la biopelícula debido a la pérdida de resistencia mecánica reportada (Chawla *et al*., 2019) En cultivos estáticos, los sustratos tienen que ser transportados en su totalidad por difusión y la disponibilidad de oxígeno podría convertirse en el factor limitante para el metabolismo celular, lo que podría tener un efecto negativo en la producción y calidad de la celulosa. El factor cinético que expresa la relación entre el oxígeno disuelto y la superficie/volumen del medio es el área interfacial específica, que está directamente relacionada con otros factores, como la sección transversal del reactor y el coeficiente de transferencia de masa (Cvetković et al., 2018). Esto significa que la tasa de fermentación por lotes de Kombucha sin agitación y sin introducir gas depende del área interfacial específica. Cvetkovic et al. (2018) desarrolló un modelo matemático para escalar la fermentación del té de Kombucha basado en varias áreas de interfaz específicas. La verificación del modelo se realizó en reactores de gran volumen (90 L) y vasos muy pequeños de 0,33 L. El modelo estandariza las condiciones óptimas como: 70 g/L de sustrato inicial (sacarosa), área interfacial de 0,0231 a 0,0642 cm, y 14 días de fermentación. Llegaron a la conclusión de que, independientemente del tamaño o volumen del vaso, si el valor del área interfacial es constante, podrían asegurar la producción de té de Kombucha con propiedades similares. En el caso específico de la fermentación discontinua del té de Kombucha, se deben tener en cuenta varios factores biológicos. Especialmente en ausencia de agitación, donde puede ocurrir una desintegración microbiana entre las bacterias acéticas aerobias que tenderán a ocupar la capa superficial y la levadura que puede precipitarse en el fondo del recipiente (Lončar *et al*., 2006), y esto podría tienen efectos negativos en el proceso de fermentación. Para investigar la influencia del volumen en el procesamiento, Lončar *et al*., (2017) trabajaron con varias condiciones y encontraron que las mejores condiciones geométricas para escalar la fermentación se obtuvieron con un reactor de 4 L y un diámetro de 17 cm (Goh *et al.,* 2017) investigaron la relación entre el rendimiento, las propiedades de la biopelícula producida a partir de la fermentación de Kombucha y

el área superficial, y encontraron que la producción de la biopelícula aumentaba con la intensificación del área superficial y disminuía con una mayor profundidad. Esto se puede explicar porque el proceso metabólico es completamente aeróbico y constantemente genera dióxido de carbono, el cual puede quedar atrapado en la película y terminar acumulándose en mayor cantidad especialmente en los medios más profundos. Sin embargo, Caicedo *et al*., (2017) encontraron que, si bien el área superficial es determinante, la altura no deja de ser importante, ya que se observó que se necesita una altura mínima para el desarrollo de la película, esto teniendo en cuenta la producción de varias capas de celulosa a lo largo de la fermentación que ocupan parte del volumen inicial.

2.1.5 Influencia de la composición del medio de cultivo sobre la macro producción de celulosa bacteriana

A pesar de las cuantiosas propiedades que resaltan a la celulosa bacteriana, se deben tomar en cuenta varios puntos tanto para su producción a nivel de laboratorio como a nivel industrial, tales como la eficiencia de conversión de azúcares en celulosa por parte de la bacteria, la sencilla manipulación de la muestra de celulosa obtenida en dependencia del campo en donde será aplicado y la productividad o cantidad de biomasa sintetizada (Çakar, *et al*., 2018). “Para promover el buen desarrollo de las bacterias productoras de biocelulosa, el medio de cultivo requiere de la presencia de una fuente de carbono y nitrógeno” (Pachana, 2017).

Tabla 3

Producción de celulosa bacteriana de distintos desechos agroindustriales

Desecho	Producción	Bacteria empleada	Método de cultivo	Tiempo de fermentación	Referencia
Jugo de cascara de piña.	2,8 g/L	*Gluconacetobacter/ Komagataeibacter swingsii sp*	Estático	13 días	Castro *et al.,* 2011)
Cascara de la cereza del café (extracto)	5,6-8,2 g/L	*Gluconacetobacter/ Komagataeibacter hansenii UAC09*	Estático	7 días	(Rami & Appaiah 2013)
Residuos de olivo molido seco	0,81-0,85 g/L	Gluconacetobacter sacchari	Estático	4 días	(Gomes *et al*., 2013)
Jugo de naranja con fuente de nitrógeno de medio HS	6,90 g/L	Acetobacter xylinum NBRC 13693	Cultivo estático durante a 30°C	14 días	(Kurosumi*et al*. 2009)
Residuos de cultivo de cerveza	8,46 g/L	*Glucon acetobacter hansenii*	Cultivo estático	14 días	(Ha & Shehzad, 2008)

Fuente: Adaptado de (Soriano & Barreto, 2018).

2.2 Marco conceptual

Mucílago o pulpa de cacao.

Sustancia viscosa, generalmente hialina que contienen las plantas de cacao. La fruta del cacao contiene de 30 a 50 semillas o almendras la cantidad, tamaño y forma de la semilla es una peculiaridad varietal, rodeada por una envoltura clara y azucarada. La pulpa mucilaginosa está dispuesta por “células esponjosas parenquimatosas, que contienen células de savia ricas en azúcares (10-13%), pentosas (2-3%), ácido cítrico (1- 2%), y sales (8-10%). Aunque la pulpa es necesaria” para la fermentación, a menudo hay más pulpa de la necesaria. El exceso de pulpa, que tiene un delicioso sabor tropical, ha sido usado para hacer diferentes productos tales como jalea de cacao, alcohol y vinagre, nata y pulpa procesada. De 40 litros de pulpa se pueden

obtener de 800 kilos de semillas frescas (Arteaga, 2017). En la tabla 4 se aprecia la composición química del mucílago de cacao.

Tabla 4

Composición química del mucílago de cacao

Componente	% p/p (base húmeda)
Agua	79.2-84.2
Proteína	0.09-0.11
Azucares	12.50-15.9
Glucosa	11.6-15.32
pectina	0.9-1.19
Ácido cítrico	0.77-1.52
Ceniza	0.40-0.50

Fuente: (Aguilar & Espin, 2019)

El suero de leche

"Es un producto lácteo obtenido por la precipitación de la caseína en la producción de quesos, contiene más del 50% de los sólidos de la leche, incluyendo proteínas, lactosa, minerales" y vitaminas. Durante muchos años se consideró como un desperdicio y agente contaminante; sin embargo, este punto de vista ha cambiado radicalmente debido a que este subproducto es una fuente rica en materias primas y cada uno de sus componentes puede ser usados de alguna forma (Hernández & Velez, 2014)

El lactosuero es una sustancia líquida obtenida por separación del coágulo de leche en la fabricación de queso. "Es un líquido translúcido verde obtenido de la leche después de la precipitación de la caseína" (Adolfo & Huertas, 2009).

Hay varios tipos de lactosuero dependiendo principalmente de la eliminación de la caseína, el primero llamado dulce, está basado en la coagulación por la renina a pH 6,5. "El segundo denominado ácido resulta del proceso de fermentación o adición de ácidos orgánicos o ácidos minerales para coagular la caseína como en la elaboración de quesos frescos" (Panesar, *et al*., 2017). En la tabla 5, se puede detallar la composición nutricional del lactosuero dulce y acido, observándose que el dulce tiene mayor lactosa y mayor proteína respecto al ácido.

Tabla 5

Composición de lactosuero dulce y ácido

Componente	Lactosuero dulce (g/L)	Lactosuero acido (g/L)
Solidos solubles	63-70	63-70
Lactosa	46-52	44-46
Proteína	6-10	6-8
Calcio	0,4-0,6	1,2-1,6
Fosfato	1-3	2-4,5
Lactato	2	6,4
Cloruros	1,1	1,1

Fuente: Panesar, *et al*., 2017

Cuero ecológico

Suzanne Lee diseñadora textil, inventora del proyecto que denominado Bio-couture. “El futuro al parecer no era como ella lo pensaba, esto se debe a la crisis que sufre la industria petrolera a mediado de los años” 70 lo cual implico que se dejaran de vender las casas del futuro que eran a base de polímeros y plásticos, al igual que sufre una decepción por parte de la industria de la moda, porque para el mismo tiempo en que la industria petrolera se encontraba en dificultad, la ropa futurista también salieron de la industria debido a que los materiales que se utilizaban no eran aptos para ser parte del mismo. Es así como Suzanne comienza a compartir con científicos, biólogos para poder crear y generar su propio textil en el que se necesitan microorganismos y bacterias las cuales originan fibras que hilan y se convierten en un textil.

Aquí inicia a trabajar con microorganismos, cambia su taller de diseño por un laboratorio. Suzanne Lee crea un proyecto novedoso el cual busca cultivar la ropa mediante microorganismos productores de celulosa y té verde, son los principales compuestos que componen el cultivo del cuero ecológico, para lograr resultados óptimos los dejar fermentar aproximadamente durante dos semanas, tiempo en que obtiene un material polimérico para la fabricación del bio cuero. “Esta idea es conceptualizada gracias que la diseñadora Suzanne conoce una cerveza llamada kombucha la cual es a base de té verde, es así como por surge la idea” de crear un textil con algunas de las bases de esta cerveza (Simone, 2021).

Kombucha

Se exterioriza como una capa fina sobre la superficie del líquido, la misma que adquiere la forma del envase que lo contiene y a medida que la fermentación prospera se va engrosando, una vez alcanzado su dimensión este va creciendo en forma de capas hacia arriba acumulándose una sobre otra. La capa resultante es escurridiza, gelatinosa de color blanco, crema o pardo (puede adquirir tonos oscuros por efecto del té).

Komagataeibacter xylinus

"Bacteria Gram negativa destacada por su capacidad de producir celulosa en condiciones aerobias. Se encuentra entre el grupo de los mesófilos, su morfología es en forma de barras" y sin movilidad, con dimensiones aproximadas de 0.4-0.6 x 1.0-1.5µm. (Prudnikova & Shidlovsky, 2017). Según Cacicedo, *et al*., (2017) "Se encuentra de manera natural en frutas y vegetales en estado de descomposición. Es capaz de producir celulosa en condiciones de pH entre 3 y 7, a temperaturas entre 25 a 30ºC; usando" variadas fuentes de carbono.

Consorcio microbiano

De acuerdo a (Ochoa & Montoya, 2010) citado por (Gordillo, 2018) Un consorcio microbiano es una asociación natural, que puede estar formado por dos o más poblaciones microbianas, de distintas especies, que funcionan en conjunto como una unidad, donde todos obtienen beneficios de las actividades de los demás. La asociación manifiesta estilos de vida sintróficos, donde el crecimiento y el flujo cíclico de los nutrientes se transporta de una manera eficaz que en una población individual.

Un ejemplo de consorcios microbianos con importancia biotecnológica es el denominado Kombucha, una asociación simbiótica especialmente de varios tipos de bacterias y levaduras (Gordillo, 2018).

Medio de cultivo

Denominado también medio de fermentación o medio de crecimiento; será el que aporte los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos productores de celulosa. Este deberá contener principalmente fuentes de carbono y nitrógeno; además de otros componentes como fosforo, azufre, potasio y sales de magnesio (Chawla, *et al*., 2018).

Etapa de Fermentación

Periodo de crecimiento de Celulosa Bacteriana, se efectúa en presencia de oxígeno y en condiciones favorables según el método de cultivo empleado. (Shah, *et al*., 2018)

Fuente de carbono

La productividad de la CB puede maximizarse según el tipo de fuentes de nitrógeno y carbono utilizadas en el medio de cultivo, según (Santos *et al*., 2017). Como nutriente fuente esencial, el nitrógeno promueve el crecimiento de microorganismos y la construcción celular, extracto de levadura extracto, hidrolizado de caseína, sulfato de amonio, peptona, glutamato de sodio, glicina y el sustrato de té son las fuentes de nitrógeno utilizadas para la producción de CB.

La fuente de carbono también es otro ingrediente principal utilizado para mejorar el crecimiento y el metabolismo celular durante la síntesis CB. Azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) y derivados alimenticios que contienen azúcares, etanol y manitol se utilizan como fuentes de carbono para la producción de (Yim *et al*., 2017)

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1 Hipótesis central de la investigación

Utilizando la condición de cultivo agitado, con un medio compuesto por mucilago de cacao (0,33 g/kg), suero de leche (0,33 g/kg), sacarosa (0,33 g/kg), e Infusiones de té negro y verde (10 g/l) se obtiene rendimientos de celulosa bacteriana en 15,52 g. y con una calidad adecuada del biopolímero.

3.2 Variables e indicadores de la investigación

La tabla 6 presenta la operacionalización de variables, donde se describe el tipo de variable, la definición conceptual y operacional, y los indicadores.

Tabla 6

Operacionalización de variables

Variables	Niveles de variable	Tipo	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores
Medios de Cultivo	Mucilago de cacao	Independiente	Fuente de carbono provenientes del mucilago de cacao contiene (carbohidrato, aminoácido, ácido cítrico) que es utilizada por un organismo para la síntesis de sus moléculas orgánicas	Para encontrar cuál es el nutriente ideal para el consorcio microbiano presente en la Kombucha se utilizaron tres fuentes de carbono: mucilago de cacao, Suero de leche y sacarosa.	g/L
	Suero de leche	Independiente	Fuente de carbono presente obtenido por la precipitación de la caseína en la fabricación de quesos, contiene más del 50% de los sólidos de la leche, incluyendo proteínas, lactosa, minerales y vitaminas	Para encontrar cuál es el nutriente ideal para el consorcio microbiano presente en la Kombucha se utilizaron tres fuentes de carbono: mucilago de cacao, Suero de leche y sacarosa.	g/L

	Sacarosa	Independiente	Es el combustible que necesita la Kombucha para fermentar	Para encontrar cuál es el nutriente ideal para el consorcio microbiano presente en la Kombucha se utilizaron tres fuentes de carbono: mucilago de cacao, Suero de leche y sacarosa.	g/L
Técnicas para la obtención de cuero biológico	Curtido mineral	Independiente	Se define como la celulosa bacteriana estabilizada gracias a la unión química de la molécula de cromo	Permite estabilizar la celulosa bacteriana mediante agentes curtientes minerales transformándola en cuero.	%
	Curtido sintético	Independiente	Se define como la celulosa bacteriana estabilizada gracias a la unión química del aldehído modificado.	Permite estabilizar la celulosa bacteriana mediante agentes curtientes sintéticos transformándola en cuero.	%
	Curtido vegetal	Independiente	Se define como la celulosa bacteriana estabilizada gracias a la unión química de taninos de tara *Caesalpinia spinosa*	Permite estabilizar la celulosa bacteriana mediante agentes curtientes vegetales transformándola en cuero.	%
Rendimiento de biomasa	Rendimiento de biomasa	Dependiente	El rendimiento porcentual obtenido de celulosa bacteriana es una razón peso de la celulosa bacteriana obtenida entre la cantidad de fuente de carbono agregada al medio de cultivo.	La celulosa bacteriana obtenida de cada tratamiento fue purificada, luego se secado a 110°C. hasta peso constante para encontrar el mejor rendimiento según la mejor fuente de carbono.	(g de biomasa /g sustrato)
Ensayos físicos y mecánicos	Resistencia a la tracción	Dependiente	Las propiedades mecánicas de los materiales indican el comportamiento de un material cuando se encuentra sometido a fuerzas exteriores. NTP-ISO 3376 para composites	Una probeta es estirada a una velocidad especificada hasta que la fuerza alcanza un valor predeterminado o hasta que la probeta se rompe.	N/mm2

3.3 Métodos de la investigación

3.3.1 Según el método científico

- **Investigación correlacional**

La presente investigación es correlacional, porque “mide el grado de relación que existe entre dos o más variables, se pretende saber cómo se comporta las variables dependientes (Porcentaje de rendimiento obtenido de producción de celulosa bacteriana y ensayos físicos y mecánicos) conociendo el comportamiento de las variables independientes (medios de cultivo y técnicas para la obtención de cuero biológico) en la solución al problema planteado.

3.3.2 Según el método frente al objeto de estudio

- **Experimental**

Las variables independientes se manipulan simultáneamente, lo que nos permite probar múltiples hipótesis en un solo experimento, así como evaluar los efectos principales y las interacciones entre las variables manipuladas. Los datos obtenidos durante la experimentación nos permitieron calcular las proporciones óptimas de los componentes (fuentes de carbono como mucílago de cacao, suero de leche y sacarosa) para maximizar la variable de respuesta y, de este modo, lograr los mejores resultados.

3.4 Diseño o esquema de la investigación

En este estudio se efectuaron dos experimentos interdependientes uno del otro:

Experimento 1. Se prepararon los medios de cultivo, en el que se manipuló los niveles de fuentes de carbono provenientes de mucilago de cacao, suero de leche y sacarosa para proporcionar nutrientes al consorcio microbiano presente en la Kombucha y así mejorar el porcentaje de rendimiento de producción de celulosa bacteriana, claramente se evidencia que los niveles de dichos componentes o ingredientes no son independientes, este hecho hace que en la presente investigación apliquemos experimentos con mezclas.

Experimento 2. Se ensayaron tres técnicas para estabilizar la celulosa bacteriana seleccionada del experimento 1, mediante agentes curtientes mineral, sintético y vegetal transformándola en cuero biológico. Estos niveles de los factores en estudio

son interdependientes, este hecho hace que apliquemos experimentos con mezclas ya que sus diferentes componentes dependen de las proporciones con las que participan y no de la cantidad absoluta de ellos.

3.4.1 Diseño óptimo de experimentos (DOE) en la evaluación de datos

La presente investigación diseña un producto sustituto al cuero integrando principios de circularidad en la recuperación de subproductos de las cadenas de chocolate y productos lácteos; por tal razón, el Diseño Óptimo de Experimentos (DOE) resulta especialmente interesante, ya que su finalidad es conseguir la máxima información posible para cubrir expectativas futuras a mínimo costo.

Las variables controladas en la experimentación son proporciones, para este propósito se siguió los lineamientos de DOE en problemas de experimentos con mezclas, para encontrar los mejores resultados de porcentaje de rendimiento de producción de celulosa bacteriana en función a las proporciones de los componentes en su formulación (mucilago de cacao, suero de leche y sacarosa).

3.4.2 Modelización del experimento

Los resultados experimentales se ajustaron a un modelo estadístico cuadrático para analizar el efecto de los componentes sobre la respuesta. Como primer paso, se consideró la posibilidad de ajustar un modelo de primer orden.

$$(y) = \beta_0 + \sum_{i=1}^{q} \beta_i x_i$$

Donde (Y) es el valor esperado de la variable de respuesta y, sin embargo, debido a la restricción $X_1 + X_2 + X_3 = 1$ es posible demostrar que los parámetros $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3$ no son únicos (Montgomery, 2017)

Cuando se ajusta un modelo cuadrático también es necesario incorporar las restricciones $X_1 + X_2 + X_3 = 1$, ya que esto le dará una característica especial al modelo cuadrático para los tres componentes *X_1, X_2, X_3, por lo que el polinomio de segundo grado esta dado por:*

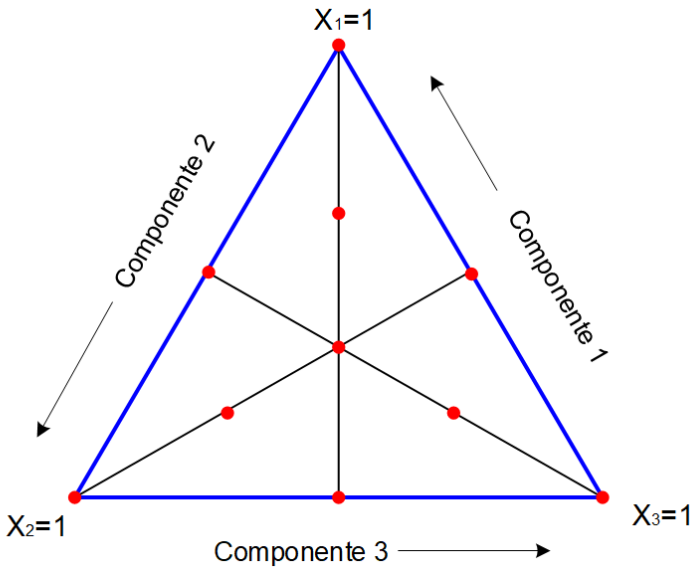
$$(y) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2$$

Debido a la restricción de que la suma de las proporciones siempre es igual a la unidad, el efecto de un ingrediente en un diseño de mezclas es diferente al efecto de un factor en un experimento factorial, donde se puede mover el factor manteniendo fijos a los demás (Gutierrez *et al*., 2018)

Interesa realizar predicciones acerca de mezclas completas, por eso preferimos realizar corridas dentro del interior del "simplex centroide" con corridas axiales según (García & Gutiérrez, 2017) los simplex centroide se encuentran en los límites de la región experimental con la excepción del centroide figura 2, la distribución de la información se denomina como 3: 3: 4. los (3) puntos proveen la información de las mezclas puras, los (3) brindan información de las mezclas binarias y (4) son mezclas permutadas, dándonos 10 puntos experimentales tabla 7.

Figura 2

Diseño Simplex centroide con puntos axiales



(X_1, X_2, X_3) = (1, 0, 0), (0, 1, 0), (0, 0, 1) mezcla pura

(X_1, X_2, X_3) = (1/2, 1/2, 0), (1/2, 0, 1/2), (0, 1/2, 1/2) mezclas binarias

(X_1, X_2, X_3) = (2/3, 1/6, 1/6), (1/6, 2/3, 1/6), (1/6, 1/6, 2/3), (1/3, 1/3, 1/3) mezclas ternarias

Fuente: (Cintas, Almagro, & Llabrés, 2012)

Tabla 7

Matriz experimental para la evaluación del porcentaje de rendimiento de producción de celulosa bacteriana

N° Trat.	Variables independientes			Variable dependiente
	Proporciones de componentes codificado			% rendimiento de celulosa bacteriana
	SA	MC	SL	RCB
T1	1	0	0	
T2	0	1	0	
T3	0	0	1	
T4	1/2	1/2	0	
T5	1/2	0	½	
T6	0	1/2	½	
T7	1/3	1/3	1/3	
T8	2/3	1/6	1/6	
T9	1/6	2/3	1/6	
T10	1/6	1/6	2/3	

SA sacarosa, MC mucilago de cacao, SL suero de leche polvo, % rendimiento de celulosa bacteriana (RCB)

El estudio concretizó en el contraste de 7 tratamientos basados en tres técnicas de curtido mineral con sulfato de cromo (SC), curtido sintético tensotan GL-50 (T-GL) y curtido vegetal polvo de tara *Caesalpinia spinosa* como componentes puros. El Diseño Simplex-Centroide (DSC) constituye un triángulo que representa todo el universo de posibilidades de mezcla de los tres curtientes evaluados (SC, T-GL y PT) tabla 8. El análisis estadístico de regresión múltiple para evaluar el efecto de los curtientes en la resistencia a la tracción (RT) como variable de respuesta fue realizado usando el software libre Minitab versión 18 y requirió de un análisis de varianza ($\alpha = 0,05$) de modelos de regresión lineal, cuadrático y cúbico, para escoger el modelo más significativo ($p < 0,05$) y de mejor ajuste ($R^2 > 0,85$) con el cual se construyó la superficie de respuesta para determinar los rangos de los tres curtientes que optimizan la (RT).

Tabla 8

Matriz experimental para la evaluación de la resistencia a la tracción

N° Trat.	Variables independientes			Variable dependiente
	Proporciones de componentes codificado			Resistencia a la tracción
	SC	T-GL	PT	RT
T1	1	0	0	
T2	0	1	0	
T3	0	0	1	
T4	0,5	0,5	0	
T5	0,5	0	0,5	
T6	0	0,5	0,5	
T7	1/3	1/3	1/3	

SC=Sulfato de cromo; Tensotan GL-50 (T-GL); PT=Polvo de tara; RT=Resistencia a la tracción.

3.5 Población y muestra

3.5.1 Población

La Kombucha es considerada una bebida probiótica. En Perú, su popularidad ha crecido significativamente en los últimos tres años, y la pandemia impulsó a más marcas a invertir en esta bebida, destacando sus múltiples beneficios para la salud. La empresa Kombucha del Perú S.A.C. comercializa a nivel nacional Cultivo de Kombucha (SCOBY) junto con líquido activador.

3.5.2 Muestra

La empresa Kombucha del Perú S.A.C procesa bebidas no alcohólicas por lo que genera cultivo (SCOBY) + Líquido activador el cual realiza sus ventas online en el siguiente link https://www.kombuchaperu.com/product-page/kit-scoby

3.6 Actividades del proceso investigativo

A continuación, se detallan las actividades en la investigación a través de diagramas de flujo de procesamiento y se describen cada una de las operaciones que involucra el proceso.

3.6.1 Obtención de las fuentes de carbono

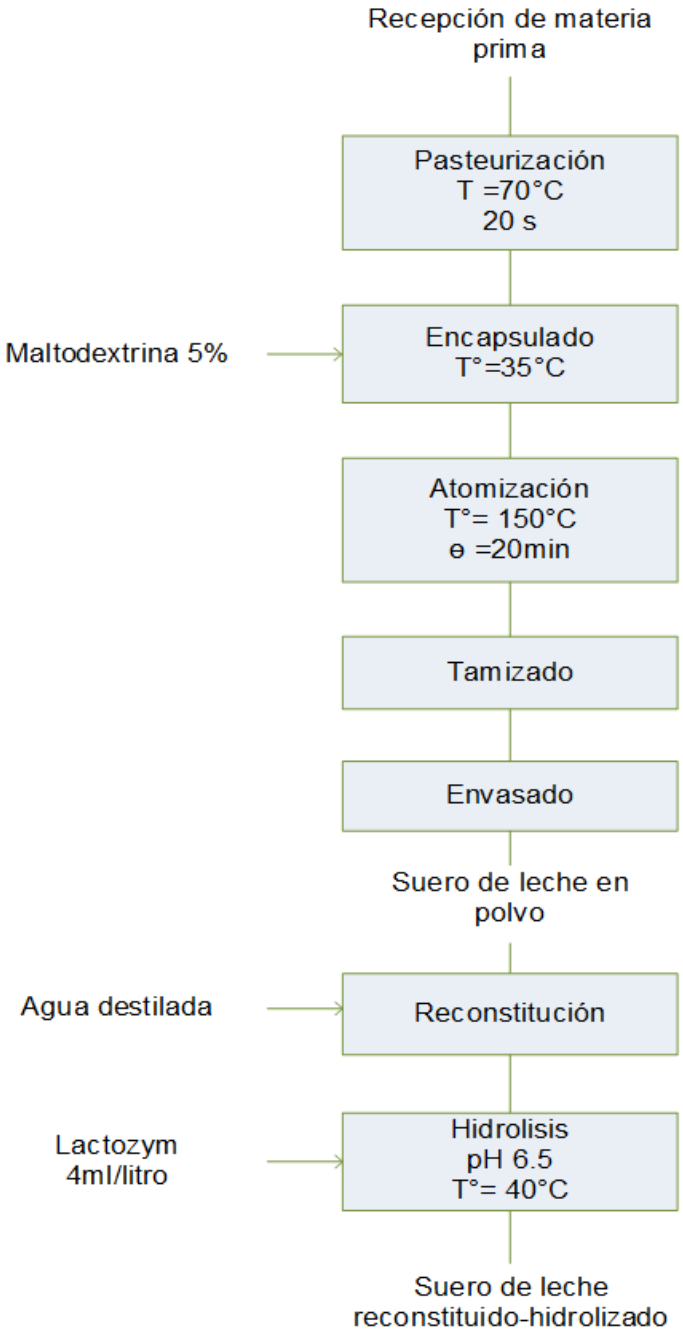
3.6.1.1 Obtención del suero de leche en polvo

A 45 minutos al sur-oeste de la ciudad de Huamanga, en el distrito de Chiara centro poblado de Allpachaka, está ubicado el fundo Allpachaka de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, lugar donde produce leche en promedio 1200 litros de leche fresca al día y derivados lácteos como el queso (fresco, terrandino y mozzarella) yogurt y mantequilla.

En promedio se procesan 100 kilos de queso, los que producen 900 litros de lactosuero, situación que provoca impactos ambientales, en la figura 3 demostramos que la economía circular es perfectamente aplicable a uso del lactosuero porque permanece casi el 50 % de las proteínas, aminoácidos, vitaminas y minerales de la leche (Quille & Aruhuanca, 2021).

Figura 3

Diagrama de flujo de operaciones para la obtención del suero de leche en polvo modificado



Fuente: Laboratorio de “transferencia de masa” UNSCH

3.6.1.2 Descripción de las operaciones para la obtención de suero de leche en polvo

Recepción de materia prima

La recepción de la materia prima es uno de los pasos fundamentales en el proceso. Durante esta etapa, se registró un pH que osciló entre 4,8 y 6,8, y un nivel de azúcar en °Brix de 6 a 8%. Estos parámetros son esenciales para determinar la estabilidad del suero (Loachamin & Narváez, 2021).

Pasteurización

La pasteurización se realizó con la finalidad de eliminar las bacterias ácido-lácticas que pertenecen, principalmente, a los géneros *Lactobacillus spp., Leuconostoc spp. y Lactococcus spp. Lactobacillus spp* responsables del proceso productivo del queso y así mantener las propiedades y la calidad del suero sean seguros para el consumo del consorcio microbiano (Kombucha). La temperatura de pasteurización fue de 70ºC por un tiempo de 20 segundos.

Encapsulado

Es necesario maltodextrina, el cual se adiciona 5% p/p en relación al suero de leche, permitiendo alcanzar una viscosidad de 2,2 centipoise recomendada por (Habtegebriel *et al*., 2021) dicho insumo cumple con la función de encapsular los componentes del suero, facilitando de esta manera el proceso de atomización.

Atomización

Las muestras fueron atomizados bajo los resultados de (Salimi, Maghsoudlou, & Jafari, 2018)(Salimi *et al*., 2018) presión de 2 bar en la boquilla y temperatura del aire de entrada de 150ºC para evitar mayores tiempo de rehidratación del polvo resultante.

Tamizado

El proceso de tamizado consistió en hacer pasar el polvo de leche atomizada por una columna de tamices de diferentes mallas, donde se tuvo mayor retención fue en la malla 100 calificándose como polvo fino.

Envasado

El envasado del polvo de suero de leche se realizó en frascos de vidrio con tapa de 3 kg de capacidad, con la finalidad de proteger y preservar de la contaminación exterior, esto incluye de la humedad y vida del producto.

Reconstitución

Se agregó 11,5 g de suero de leche en polvo en 100 ml de agua, este parámetro se tomó de acuerdo a Saiz *et al*., 2015), bajo el criterio de proporcionar la calidad y cantidad de nutrientes a los medios de cultivo.

Hidrolisis

Se diseñó un proceso de hidrólisis enzimática con el objetivo de mejorar la limitada capacidad de asimilación de la lactosa por diversos microorganismos. Para llevar a cabo la hidrólisis de este disacárido, se incubó a 40ºC con 4 ml/l de Lactozyn en suero de leche, tal como lo recomienda Juárez (2018). Este enfoque amplía significativamente las posibilidades de aprovechamiento del suero en la producción de celulosa bacteriana.

Figura 4

Hidrolisis de la lactosa con lactasa



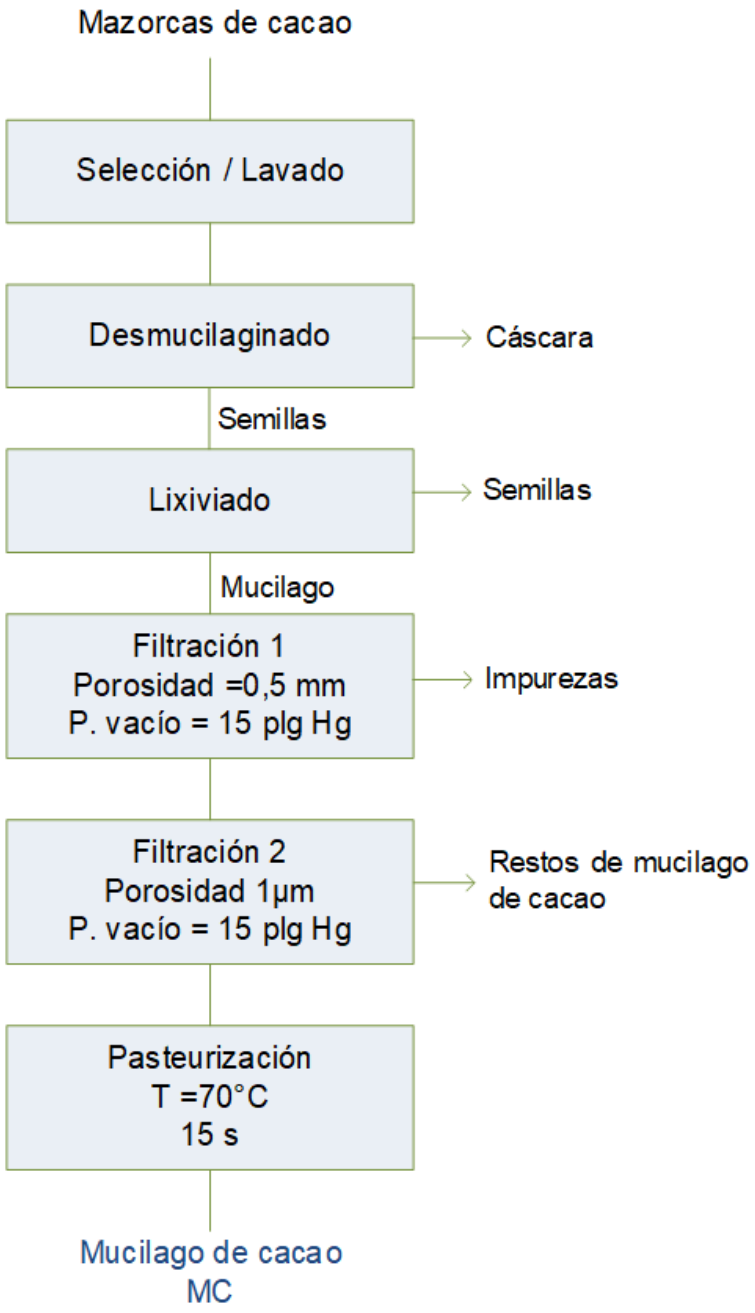
(Dantas *et al*., 2022)

3.6.1.3 Obtención del mucilago de cacao

También se utiliza el mucílago de cacao, que está compuesto por células esponjosas y parénquima que contiene células de savia ricas en azúcares, las cuales son fuentes de carbono necesarias para la acción de las bacterias del género Acetobacter, responsables de la producción de celulosa (Aguilar & Espin, 2019). A continuación, se presentan las operaciones para obtener el mucílago de cacao, como se muestra en la figura 5.

Figura 5

Diagrama de flujo de operaciones para la obtención del mucilago de cacao



3.6.1.4 Descripción de las operaciones para la obtención del mucilago de cacao

- **Mazorcas de cacao.** Variedad VRAE 99 procedente de la Cooperativa Agraria Cafetalera Valle Río Apurímac CAC VRA) de Ayna La Mar (Ayacucho / Perú) fueron recolectadas al azar, las muestras no tenían presencia aparente de patógenos como monilla, o Phytophthora. La cosecha se almacenó en sacos de polipropileno a una temperatura promedio de 25ºC.
- **Selección / lavado.** Las mazorcas de cacao fueron seleccionadas para eliminar materiales extraños, lavadas con agua potable, desinfectadas con una solución de 5 ml de cloro en 10 litros de agua durante 5 minutos, enjuagadas con agua potable, dejadas reposar para escurrir del exceso de humedad.
- **Desmucilaginado.** En esta operación las mazorcas se desprende la mucosidad que se encuentra entre el grano y vaina de cacao, lográndose eliminar la cáscara y parte de la pulpa que contiene el fruto, para su posterior fermentación.
- **Lixiviado**. La operación se realizó al ambiente y los lixiviados fueron recolectados en un envase de plástico. El lixiviado generalmente arrastra gran cantidad de los compuestos presentes en las semillas sólidas (glucosa, fructosa y sacarosa).

- **Filtración 1.** El lixiviado que se obtuvo cuando se extrae el mucilago del fruto, es filtrado con la finalidad de retener la placenta, mucilago y partículas sólidas de 0,5 mm de espesor a una velocidad de flujo media.

- **Filtración 2.** Este grado de filtración nos permite clarificar el líquido para formular los medios de cultivo y experimentar en la producción de celulosa bacteriana, la no presencia de partículas finas en los medios de cultivo nos garantiza que no haya formación de precipitados que influyan en la colmatación durante la producción de celulosa bacteriana.

- **Pasteurización**. La actividad enzimática es detenida con la pasteurización a 70°C por 16 s. Además, se reduce la presencia de agentes patógenos (como por ejemplo ciertas bacterias, protozoos, mohos, levaduras, etc.) que puedan contener y causar antagonismo en el consorcio microbiano (Kombucha).

3.6.2 Formulación de los medios de cultivo

Teniendo disponible el suero de leche en polvo, mucilago de cacao tratado y azúcar rubia se formula 10 medios de cultivo en condiciones estáticas (tratamientos) siguiendo los lineamientos del diseño simplex centroide con puntos axiales aumentado, los tratamientos con valores reales y codificados se muestran en la tabla 9, los tres principales componentes de la mezcla (medio de cultivo) formaron el 20% del total de la fórmula y variaron entre las siguientes proporciones: sacarosa (SA) (10% - 15%), mucilago de cacao (MC) (5% - 10%) y suero de leche (SL) (0% - 5%); mientras que los demás ingredientes permanecieron constantes en los siguientes porcentajes : agua destilada (75%) y (5%) té negro *Camellia sinensis* (L.) rico en fuentes de nitrógeno asimilables por el complejo microbiano, también es muy utilizado el té verde quien además de proveer nitrógeno le adhiere una superficie más lisa y mayor cristalinidad de los tejidos de celulosa bacteriana.

Tabla 9

Matriz experimental con valores reales para la evaluación del rendimiento de biomasa

N° Trat.	Variables independientes						Variable dependiente
	Proporciones de componentes codificado			Proporciones de componentes reales (%)			Rendimiento de biomasa (g biomasa/g sustrato)
	SA	MC	SL	SA	MC	SL	RB
T1	1	0	0	15	5	0	
T2	0	1	0	10	10	0	
T3	0	0	1	10	5	5	
T4	1/2	1/2	0	12.5	7.5	0	
T5	1/2	0	1/2	12.5	5	2.5	
T6	0	1/2	1/2	10	7.5	2.5	
T7	1/3	1/3	1/3	11.6	6.6	1.66	
T8	2/3	1/6	1/6	13.3	5.83	0.83	
T9	1/6	2/3	1/6	10.8	8.33	0.83	
T10	1/6	1/6	2/3	10.83	5.83	3.3	

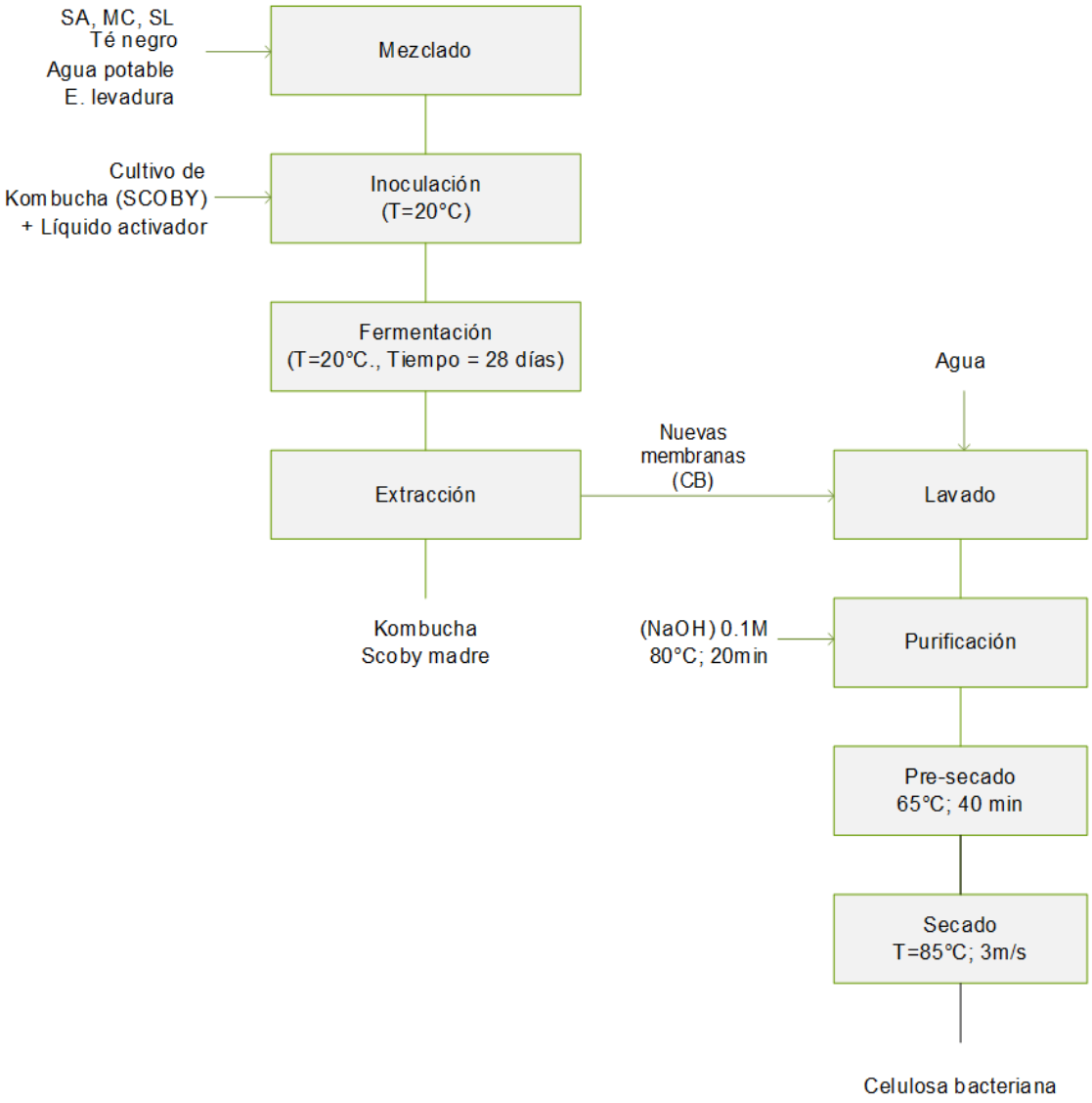
SA sacarosa, MC mucilago de cacao, SL suero de leche polvo, rendimiento de biomasa (RB)

3.6.2.1 Obtención de celulosa bacteriana

Las siguientes operaciones nos condujeron a obtener la celulosa bacteriana figura 6 en base a los tratamientos establecidos (anexo 1).

Figura 6

Diagrama de flujo del proceso de cultivo de celulosa bacteriana



3.6.2.2 Protocolo para la formulación de cultivos productores de celulosa bacteriana

Mezclado

Se preparó un medio de cultivo de 1 litro, pesando con precisión los componentes: sacarosa (SA), mucílago de cacao (MC) y suero de leche (SL). Se mezcló agua a 86°C (75% v/v) con té negro (3% p/v) y extracto de levadura (2% p/v), aprovechando la temperatura elevada para optimizar la disolución. Los cálculos detallados se presentan en el Anexo 1. Posteriormente, se incorporaron todos los componentes, homogeneizando la mezcla y ajustando la temperatura a 20°C para asegurar una distribución uniforme. Finalmente, se determinaron los grados Brix y el pH del medio formulado.

Inoculación

Se inoculó cada uno de los medios de cultivo previamente formulados con un cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY, por sus siglas en inglés) de Kombucha, junto con su líquido activador correspondiente. Estos inóculos fueron adquiridos de la empresa comercial Kombucha Perú. La inoculación se realizó bajo condiciones asépticas para mantener la integridad microbiológica de los cultivos.

Fermentación

La fermentación se llevó a cabo en condiciones estáticas utilizando depósitos rectangulares de acero inoxidable AISI 304 con un volumen de 10,8 litros (dimensiones: 30 x 20 x 9 cm). La fase inicial de fermentación se prolongó durante 7-8 días a temperatura ambiente (21 ± 2°C). Este proceso resultó en la formación de una nueva capa de biopelícula (SCOBY) en la superficie del cultivo. La biopelícula continuó su desarrollo mediante la acumulación de capas sucesivas, alcanzando un espesor de 15-20 mm tras 28 días de fermentación.

Extracción

Al término del período de fermentación, se extrajeron cuidadosamente las nuevas biopelículas formadas de los depósitos rectangulares de acero inoxidable. El SCOBY madre se conservó para su uso en fermentaciones

subsecuentes, asegurando la continuidad y consistencia del inóculo. Se registraron los grados Brix y el pH final del medio fermentado (los datos detallados se presentan en el Anexo 1). Este procedimiento permitió evaluar los cambios en la composición del medio durante el proceso fermentativo y establecer parámetros de control para futuras replicaciones.

Lavado

Las biopelículas de celulosa bacteriana (CB) extraídas se sometieron a un proceso de purificación mediante lavado con agua destilada a temperatura ambiente (21 ± 1°C). Este procedimiento tuvo como objetivo eliminar los residuos sólidos adheridos durante el proceso fermentativo, incluyendo células microbianas y componentes del medio de cultivo. El lavado se realizó de manera sistemática, asegurando la integridad estructural de las biopelículas mientras se maximizaba la eliminación de impurezas.

Purificación

Las membranas (CB) fueron purificadas utilizando una solución de NaOH 1N a 60ºC durante 10 minutos, con el objetivo de eliminar fenoles, ácidos grasos, taninos y carotenos presentes en la azúcar rubia, el suero de leche y el té negro, respectivamente.

Presecado.

Las membranas de (CB) presentan una alta capacidad de retención de agua. Esta operación tiene como objetivo eliminar el exceso de agua mediante el oreado de las fibrillas sintetizadas por bacterias, cuyo diámetro es inferior a 100 nm. Este proceso da lugar a la formación de una red tridimensional entrelazada que mejora las propiedades mecánicas de la matriz (Emiljanowicz & Malinowska, 2019).

Secado

La deshidratación se llevó a cabo en un secador de bandejas tipo túnel horizontal con circulación de aire forzado. El proceso se realizó a una temperatura de 85°C y una velocidad de aire de 3 m/s, manteniéndose hasta alcanzar un peso constante. Este método permitió separar eficazmente el agua de las membranas (CB).

3.6.3 Obtención de cuero biológico

Se evaluaron tres técnicas de estabilización para la celulosa bacteriana que exhibió la respuesta más favorable a los tratamientos previos. Los tratamientos se establecieron siguiendo los lineamientos del diseño simplex-centroide (DSC), basándose en técnicas de curtido mineral con sulfato de cromo (SC), curtido sintético con tensotan GL-50 (T-GL) y curtido vegetal con polvo de tara (PT). Los agentes curtientes constituyeron el 10% de la mezcla total, con las siguientes variaciones porcentuales: SC (0-10%), T-GL (0-10%) y PT (0-10%). Este diseño permitió examinar el efecto de mezclas puras, binarias y ternarias en siete tratamientos distintos. Las variables dependientes analizadas fueron la resistencia a la tracción (RT) en N/mm² y el porcentaje de elongación (%). Los baños de curtido se mantuvieron constantes en un 90% de agua potable. La Tabla 10 presenta la matriz experimental completa, mientras que la Figura 7 ilustra el diagrama de flujo del proceso de obtención del cuero biológico. Este enfoque metodológico facilitó una evaluación sistemática de las propiedades físico-mecánicas del material resultante bajo diversas condiciones de curtido, proporcionando una base sólida para la optimización del proceso.

Tabla 10

Matriz experimental para los ensayos físico y mecánicos del cuero biológico

N° Trat.	Variables independientes						Respuesta	
	Proporciones de componentes codificado			Proporciones de componentes reales (%)			Resistencia a la tracción N/mm2	Porcentaje de elongación (%)
	SC	T-GL	PT	SC	T-GL	PT	RT	PE
T1	1	0	0	10	0	0		
T2	0	1	0	0	10	0		
T3	0	0	1	0	0	10		
T4	0.5	0.5	0	5	5	0		
T5	0.5	0	0.5	5	0	5		
T6	0	0.5	0.5	0	5	5		
T7	1/3	1/3	1/3	3.33	3.33	3.33		

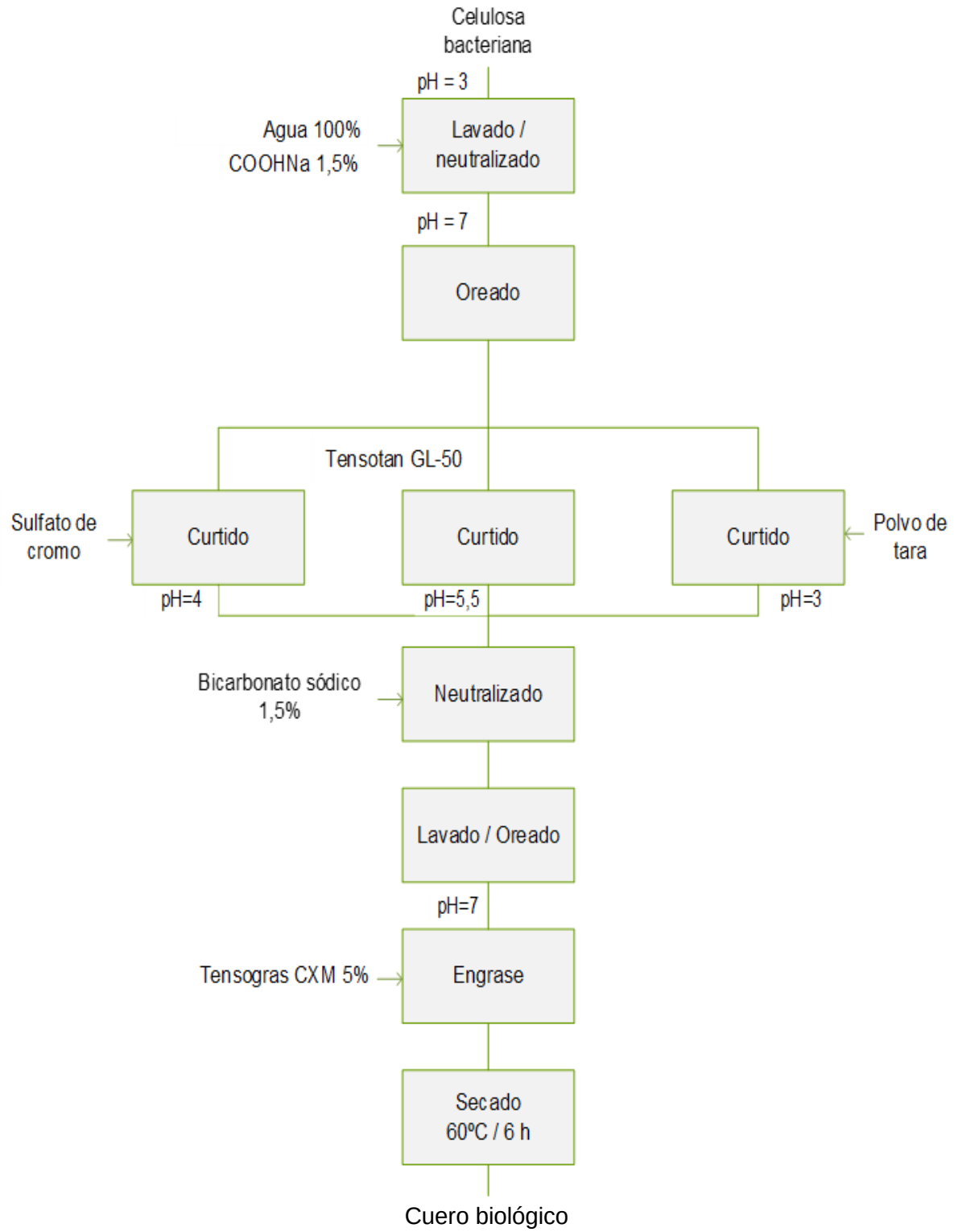
SC=Sulfato de cromo; T-GL=Tensotan GL-50; PT=Polvo de tara; RT=Resistencia a la tracción; PE=Porcentaje de elongación.

3.6.3.1 Operaciones para la obtención de cuero biológico

Con el objetivo de desarrollar un sustituto sostenible del cuero tradicional, se diseñó una matriz polimérica compuesta (cuero biológico) a partir de recursos renovables. Como se muestra en la Figura 7. Esta metodología, que combina principios de la biotecnología y la ingeniería de materiales, pretende obtener un material biocompatible con propiedades mecánicas superiores, prometedor para su aplicación en la industria del calzado, la automotriz y la confección, entre otras.

Figura 7

Diagrama de flujo para la obtención de cuero biológico.



3.6.3.2 Descripción de las operaciones para la obtención de cuero biológico

Lavado – neutralizado

La etapa inicial del proceso consiste en la remoción de azúcares residuales y la neutralización del pH ácido generado durante la fermentación de la Kombucha. El agua elimina los azúcares no consumidos, inhibiendo el crecimiento de microorganismos contaminantes (Ramírez & Coha, 2003). Posteriormente, se ajusta el pH a 7 mediante la adición de formiato de sodio, creando un ambiente óptimo para la posterior aplicación de curtientes (Ariram & Madhan, 2020). De esta manera, se prepara la celulosa bacteriana para las siguientes etapas del proceso, asegurando la calidad y uniformidad del producto final (Coelho *et al*., 2020).

Oreado

La celulosa bacteriana generada, comúnmente denominada SCOBY (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast), presenta una estructura gelatinosa y mecánicamente inestable, caracterizada por una red de fibras con malla ancha (Guinea, 2016). Estas fibras son aproximadamente 100 veces más delgadas que las fibras de celulosa de origen vegetal y exhiben una capacidad de retención de agua superior en más de 100 veces (Campano et al., 2016). Estas propiedades únicas, particularmente la elevada turgencia celular, representan un desafío para la absorción eficiente de los agentes curtientes evaluados en este estudio. En consecuencia, se implementó un proceso de oreado a temperatura ambiente (21 ± 2°C) hasta alcanzar la humedad de equilibrio, con el objetivo de optimizar la penetración y fijación de los curtientes en la matriz celulósica.

Curtido

El proceso de curtido desempeña un papel fundamental en la estabilización de la celulosa bacteriana y en la prevención de la adhesión interfibrilar durante el secado, evitando así la formación de una estructura rígida y quebradiza. Además, este tratamiento confiere al material una serie de propiedades físico-mecánicas esenciales, incluyendo plenitud, tacto, elasticidad y resistencia. La naturaleza y magnitud de estas propiedades están intrínsecamente ligadas al agente curtiente empleado (Rosu et al., 2018).

Se evaluaron tres técnicas de curtido distintas: curtido mineral con sulfato de cromo (SC), curtido sintético con tensotan GL-50 (T-GL) y curtido vegetal con polvo de tara

(PT). Las proporciones de los agentes curtientes se establecieron según la matriz experimental detallada en la Tabla 10. El proceso de curtido se llevó a cabo en un baño constituido por 100% de agua potable durante un período de 24 horas. Para asegurar una penetración uniforme de los agentes curtientes, se aplicó un efecto mecánico intermitente a una velocidad de 5 rpm, manteniendo una temperatura constante de 21 ± 1°C.

Neutralizado

La etapa de neutralización se llevó a cabo utilizando bicarbonato de sodio al 1,5% p/p. Este proceso tuvo como objetivo neutralizar el exceso de ácido acético residual en la celulosa bacteriana, así como los agentes curtientes no fijados (SC, T-GL y PT) en la matriz del cuero biológico. Esta neutralización es crucial para prevenir la precipitación indeseada de estos compuestos en las capas superficiales del material. La elevación controlada del pH durante esta operación reduce la carga positiva de la estructura, facilitando así la penetración subsecuente de productos aniónicos durante la fase de engrase. Este paso es fundamental para optimizar la distribución uniforme de los agentes de acabado y, por ende, las propiedades finales del cuero biológico.

Lavado / oreado

Tras la neutralización, se implementó un proceso de lavado adicional para eliminar las sales formadas durante esta etapa y cualquier residuo remanente en la matriz del cuero biológico. Este lavado final presentó menor complejidad en comparación con el inicial, dado que el material ya no contenía sales de cromo, aldehído o tanino sin fijar. El objetivo principal de esta etapa fue la eliminación de sales neutras, utilizando un sistema de fulón experimental.

La presencia de agua intersticial en las fibras podría interferir con el proceso de engrase subsecuente. Por lo tanto, se implementó una fase de oreado para reducir la turgencia celular de la red de fibras celulósicas. Este paso buscó equilibrar la concentración de solutos entre el medio interno y externo de las fibras, optimizando así las condiciones para la posterior penetración y fijación de los agentes de engrase.

Engrase

Se implementó un proceso de engrase utilizando un aceite sintético aniónico (Tensogras CXM) al 5% p/p. Este tratamiento tiene como objetivo prevenir el endurecimiento del cuero biológico durante el secado, fenómeno que podría ocurrir

debido a la deshidratación y la consecuente unión y compactación de las fibras celulósicas. La incorporación de este agente de engrase cumple una función crucial: mantener las fibras separadas y lubricadas, facilitando así su deslizamiento relativo. Este mecanismo es fundamental para preservar la flexibilidad y suavidad del material final. La selección de un aceite sintético aniónico se basó en su compatibilidad con la estructura molecular de la celulosa bacteriana y su capacidad para distribuirse uniformemente en la matriz fibrosa. Esta estrategia de engrase no solo mejora las propiedades mecánicas del cuero biológico, sino que también potencia su resistencia a la degradación y su durabilidad a largo plazo.

Secado

En esta etapa, se sometió el cuero biológico a un proceso de secado en un secador toggling a 60°C durante 6 horas, con el objetivo de eliminar tanto el agua superficial como la asociada a la hidratación de las fibras. Este tratamiento provocó una significativa reducción del contenido de humedad y una contracción superficial, tal como lo reportan Ariram y Madhan (2020). Además de estos cambios físicos, se observaron migraciones de sustancias solubles y la formación de nuevos enlaces interfibrilares, lo que contribuyó a modificar las propiedades mecánicas y químicas del material.

3.7 Técnicas e instrumentos de la investigación

3.7.1 Medición de la producción de la celulosa bacteriana

La cinética de formación de celulosa descrita en este proceso, se ajusta al modelo cinético propuesto por Marx-Figini y Pion (1974) para cultivos estáticos, citado por (Jaramillo *et al*., 2020). Se siguió el procedimiento que a continuación se describe:

Para determinar el peso de cada película de celulosa bacteriana (BC), se siguió un proceso meticuloso. Las muestras fueron extraídas del reactor en distintos intervalos del período de cultivo. Luego, se sometieron a un lavado con una solución de NaOH 0.1 N a 30°C durante 20 minutos, con el propósito de eliminar las células bacterianas adheridas. Para garantizar la pureza de la

muestra, se realizaron dos lavados adicionales con agua desionizada. Antes de medir el peso húmedo, se eliminó el exceso de agua utilizando papel absorbente. Finalmente, las muestras de celulosa se sometieron a un proceso de secado a 60°C hasta que su peso se estabilizó, alcanzando un valor constante.

- El rendimiento del producto fue determinado como la relación de peso entre la celulosa bacteriana producida a los 28 días y los sustratos consumidos por medio de la siguiente ecuación :

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta p}{-\Delta s}$$

Donde:

ΔP, la cantidad de celulosa formada

ΔS el sustrato utilizado para la síntesis

3.7.2 Determinación del consumo de sustrato por el método DNS

La metodología para determinar el consumo de sustrato de los medios de cultivo por el método DNS fue adaptado de (Burgos, 2020) y a continuación se describen su procedimiento:

- En el sobrenadante se determina azúcares reductores expresados como glucosa, densidad óptica a 550 nm. Puesto que, la fuente de carbono es sacarosa, es necesario hidrolizar previamente de la siguiente manera: tomar 500 µL de sobrenadante, adicionar 50 µL de ácido clorhídrico 0,5 N y colocar en un baño a ebullición durante 10 min.

- Proceder a determinar azúcares reductores por el método DNS.

- Reemplazar la absorbancia promedio en la curva estándar de fructosa:

$$Y = 0{,}0641\ X - 0{,}0311$$

Y : Absorbancia promedio
X : Concentración en mM

- Expresar los resultados en porcentaje de sacarosa (factor de corrección de glucosa a sacarosa 0,95; Análisis químico de los alimentos, Pearson).

- Determinación de azucares reductores
- Materiales
  - Muestra
  - Embudo Buchner
  - Erlenmeyer
  - Fiola
  - Kitasato
  - Tubos de prueba
  - Bomba de vació
  - Espectrofotómetro
  - Solución de DNS: Disolver 11 g de hidróxido de sodio, 10 g de DNS, 2 g de fenol y 0,5 g de bisulfito de sodio llevar a un litro y conservar en refrigeración en botella oscura.
  - Sal de Rochelle: Preparar una solución al 40 % de tartrato de sodio y potasio y refrigerar.
  - Solución estándar de glucosa: preparar 6 soluciones entre 1,5 a 7,5 x 10^{-4} g de glucosa anhidra/0,5 mL de solución.

- Procedimiento
- Preparación de la curva estándar

- Pesar exactamente 0,2 g de glucosa anhidra.
- Colocar en una fiola de 100 ml y enrasar con agua destilada previamente hervida y fría.
- Tomar alícuotas de 7, 9, 11, 14.5, 18 y 22 ml; y colocarlas en fiolas de 25 ml enrasar.
- Colocar en un tubo de prueba 0,5 ml de la solución de glucosa, adicionar 3 ml de la solución de DNS; calentar a ebullición durante 5 minutos.
- Adicionar 1 ml de Sal de Rochelle, seguido de 10 ml de agua destilada, mezclar.
- Leer la absorbancia a 550 nm.
- Para realizar la curva se toma por triplicado cada solución y se incluye un blanco; estos puntos se someten a un análisis de regresión lineal.
- Graficar la absorbancia en el eje de las ordenadas y la concentración en el eje de las abscisas.

- Análisis de la muestra

  La muestra a analizar deberá ser diluida usando agua destilada. La muestra es diluida para dar una concentración final de 2,5 a 9 x 10^{-4} g de glucosa anhidra/0,5 ml de solución y se procede al igual que para las soluciones de la curva estándar. Con la densidad óptica obtenida se va a la curva estándar y se determina la concentración de azúcares reductores expresados como glucosa.

3.7.3 Determinación del contenido de celulosa

Se implementó una variante del método de Kurschner y Hoffer (TAPPI, 1999) para determinar el contenido de celulosa. El procedimiento se inició con la preparación de una muestra de fibra molida, la cual fue tamizada utilizando un tamiz N° 45 y liberada de extraíbles. Se pesó con precisión 1 g de esta muestra (±0,1 mg), y paralelamente se determinó su contenido de humedad.

La muestra pesada se introdujo en un balón de 100 ml equipado con un refrigerante de reflujo. Se preparó una solución compuesta por 10 ml de ácido nítrico y 10 ml de etanol, la cual se agregó al balón con la muestra. Este conjunto se sometió a una ebullición suave en baño María durante una hora.

Transcurrido este tiempo, se decantó cuidadosamente el líquido sobre un crisol filtrante N° 2, evitando el paso de partículas sólidas. Se repitió el proceso añadiendo otros 50 ml de la mezcla nitro-alcohólica y calentando por otra hora. Este procedimiento se realizó una tercera vez.

Al finalizar la tercera ebullición, se filtró la mezcla al vacío utilizando el crisol filtrante. El residuo se lavó con agua desionizada caliente y se secó en una estufa a 103°C ± 2°C hasta alcanzar un peso constante.

El porcentaje de celulosa se calculó utilizando una fórmula específica, expresando el resultado como un promedio con dos decimales (Mendoza, Velásquez, & Gómez, 2020).

$$\%\, Celulosa = \frac{(Peso\ del\ residuo\ seco)}{(Peso\ seco\ de\ la\ muestra\ )}$$

3.7.4 Ensayos mecánicos, determinación de la resistencia a la tracción y del porcentaje de alargamiento

Para evaluar las propiedades mecánicas del cuero biológico, se realizaron ensayos de tracción siguiendo la norma internacional NTP-ISO 3376. Este método estándar

permitió determinar la resistencia a la tracción y el porcentaje de elongación del compuesto de matriz polimérica.

- **Determinación de la resistencia a la tracción**

Previo al ensayo, se ajustó la separación entre las mordazas del dinamómetro a 50 ± 1 mm. La probeta se colocó en el equipo de ensayo, asegurando que los bordes de las mordazas coincidieran con las líneas AB y CD de la probeta (Figura 8). Se verificó visualmente que el lado flor de la probeta estuviera en un plano paralelo a las mordazas. Una vez asegurada la correcta posición de la probeta, se inició el ensayo de tracción a una velocidad constante hasta la ruptura de la misma. La fuerza máxima registrada durante el ensayo se consideró como la fuerza de rotura (F).

Expresión de resultados

La resistencia a la tracción (T_n), newtons por milímetro cuadrado, utilizando la siguiente ecuación.

$$T_n = \frac{F}{w.t}$$

Donde:

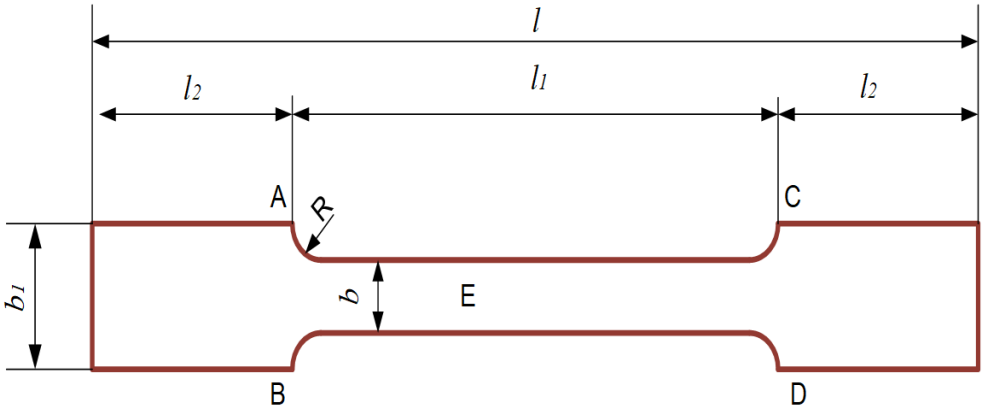
F es la fuerza máxima registrada, en newtons;

w es la anchura media de la probeta, en milímetros;

t es el espesor medio de la probeta, en milímetros.

Figura 8

Forma de la probeta



Fuente: NTP-ISO 3376 (2017)

Tabla 11

Medidas de las probetas para las pruebas físicas

Denominación	l	l_1	l_2	b	b_1	R
Normal	110	50	30	10	20	5
Grande	190	100	45	20	40	10

Fuente NTP-ISO 3376 (2017)

- **Preparación y ejecución del porcentaje de alargamiento a la rotura**

1. Configuración inicial: Se ajustaron las mordazas del dinamómetro a una separación de 50 mm ± 1 mm. La probeta se posicionó cuidadosamente entre las mordazas, alineando los bordes de éstas con las líneas AB y CD de la muestra. Se verificó que la superficie flor de la probeta quedara en un plano uniforme.
2. Medición de longitud inicial: Se registró la distancia entre las mordazas con una precisión de 0.5 mm. Este valor, denominado *L*0, se estableció como la longitud inicial de la probeta.

3. Realización del ensayo: Se activó el dinamómetro, iniciando así el proceso de tracción hasta que se produjo la ruptura de la probeta.
4. Registro de datos: En el momento exacto de la ruptura, se documentó la distancia entre las mordazas (o los sensores, según el caso). Esta medida se registró como *L2*, representando la longitud de la probeta en el punto de rotura.

Expresión de resultados

El porcentaje de alargamiento a la rotura, (E_b), debe calcularse utilizando la ecuación:

$$E_b = \frac{L_2 - L_0}{L_0} X100$$

Donde

L_2 es la separación entre las mordazas o los sensores en la rotura;

L_0 es la separación inicial entre las mordazas o los sensores.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Rendimiento de biomasa

La tabla 12 presenta el rendimiento de biomasa (RB), expresado en gramos de biomasa por gramo de sustrato, para los 10 tratamientos que emplearon distintas proporciones de (SA), (MC) y (SL). Los resultados oscilaron entre 13,37 y 30,08 g de biomasa/g sustrato, lo que indica que las diversas combinaciones porcentuales de SA, MC y SL permitieron una exploración exhaustiva del RB en los medios de cultivo evaluados. Entre los tratamientos, el T1 mostró el mayor RB (30,08), con una composición de 150 g de SA, 50 g de MC y 0 g de SL. Le siguieron el T8 y T7, con RB de 24,09 y 21,19, respectivamente. El análisis de estos resultados sugiere que, en general, niveles intermedios de SA y MC, combinados con niveles bajos de SL, favorecen un mayor RB. Esto implica que la interacción entre SA y MC tiene un efecto positivo en el RB, mientras que el SL, de manera individual, tiende a producir un RB más bajo. Es importante señalar que estos componentes y sus interacciones se analizarán con mayor detalle en la interpretación de la superficie de respuesta, lo que proporcionará una comprensión más profunda de su influencia en el rendimiento de biomasa.

Tabla 12

Variables independientes y rendimiento de biomasa de los tratamientos

Nº Trat.	Variables independientes									Respuesta
	Proporciones codificadas			Proporciones reales (%)			Proporciones manipuladas (g)			Rendimiento de biomasa (g de biomasa/g sustrato)
	SA	MC	SL	SA	MC	SL	SA	MC	SL	RB*
T1	1	0	0	15	5	0	150	50	0	30,08 ±0,15
T2	0	1	0	10	10	0	100	100	0	18,09 ±0,19
T3	0	0	1	10	5	5	100	50	50	16,05 ±0,10
T4	1/2	1/2	0	12,5	7,5	0	125	75	0	17,07 ±0,15
T5	1/2	0	1/2	12,5	5	2.5	125	50	25	14,46 ±0,92
T6	0	1/2	1/2	10	7,5	2.5	100	75	25	13,37 ±0,74
T7	1/3	1/3	1/3	11,6	6,6	1,66	116	66	16,6	21,19 ±0,38
T8	2/3	1/6	1/6	13,3	5,83	0,83	133	58,3	8,3	24,09 ±0,18
T9	1/6	2/3	1/6	10,8	8,33	0,83	108	83,3	8,3	18,33 ±0,66
T10	1/6	1/6	2/3	10,83	5,83	3,3	108,3	58,3	33	21,25 ±0,51

SA sacarosa, MC mucilago de cacao, SL suero de leche, RB rendimiento de biomasa (g de biomasa/g sustrato)

* RB expresa en valor promedio ± desviación estándar=4,98

La fermentación de la celulosa bacteriana es un proceso secuencial, ilustrado en la figura 9, donde cada nueva capa de celulosa (biomasa) se forma sobre la anterior. Este proceso comienza con la acción de las levaduras, que fermentan la sacarosa convirtiéndola en fructosa, glucosa y etanol (Carreño et al., 2012). Posteriormente, las bacterias del ácido acético transforman la glucosa en ácido glucónico y la fructosa en ácido acético. La etapa final involucra la polimerización de la glucosa por la enzima celulosa-sintasa, resultando en la formación de celulosa. Investigaciones recientes sugieren que la incorporación de nuevos componentes en los medios de cultivo puede mejorar significativamente el rendimiento de biomasa (RB) (Aguilar & Espin, 2019). Estudios comparativos realizados por Guinea (2016) y Brown et al. (2018) han explorado el uso de residuos agroindustriales como plátano, piña, mucílago de cacao y lactosa. Estos trabajos han demostrado que la utilización de diversos monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos puede incrementar notablemente la producción de celulosa bacteriana.

Figura 9

Celulosa bacteriana obtenida en forma de gel en cultivo estático



Nota. La figura ilustra el proceso secuencial de producción de celulosa bacteriana, que se desarrolla en cuatro fases distintivas: A) Fase de inoculación: Se inicia el proceso con la introducción del cultivo iniciador Scoby (Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast), en el medio de cultivo. B) Fase de formación inicial: En esta etapa, se observa la aparición de celulosa bacteriana en forma de un prepolímero. Esta estructura inicial se caracteriza por su inestabilidad mecánica. C) Fase de crecimiento y desarrollo: Se evidencia la formación de una capa de celulosa plana con una superficie uniforme. Durante esta fase, se registra un incremento en el grosor de la película, que oscila entre 0,5 y 1,5 mm por día. D) Fase de maduración: Al final del período de cultivo establecido para cada tratamiento (detallado en el anexo 1), se obtiene una lámina de celulosa mecánicamente estable. En esta etapa, la

superficie del prepolímero se ha cerrado completamente, confiriendo al material sus propiedades finales.

4.1.1 Optimización por diseño simplex centroide (DSC)

Las tablas 13 y 14 muestran los resultados de ajustar diferentes modelos a los datos en Rendimiento de biomasa. El modelo lineal consiste en términos de primer orden para cada uno de los componentes. El modelo cuadrático agrega productos cruzados entre pares de componentes. El modelo cúbico especial agrega términos que involucran productos de tres componentes. Cada modelo se muestra con un valor-p de 0,0667, 0,7796 y 0,0377, y coeficientes de determinación R^2 (%) de 53,87, 63,90 y 93,11, respectivamente. El modelo cúbico fue elegido por tener el efecto estadístico significativo más próximo al valor-p menor que ($p=0,0377\approx0,05$), y por poseer un elevado coeficiente de determinación R^2 (93,11%). El modelo fue representado de la siguiente manera:

Rendimiento de biomasa = 30,111*Sacarosa + 17,7392*Mucilago de cacao + 16,9183*Suero de leche – 28,6995*Sacarosa*Mucilago de cacao – 32,6216*Sacarosa*Suero de leche – 13,7649*Mucilago de cacao*Suero de leche + 258,889*Sacarosa*Mucilago de cacao*Suero de leche

Los signos positivos en los coeficientes del modelo sugieren sinergia, indicando que los efectos combinados o de interacción entre los componentes generan respuestas mayores cuando se mezclan. Asimismo, el signo negativo implica antagonismo entre los componentes, es decir que se producen respuestas menores (Montgomery 2017). De acuerdo con Claringbold, (2017) en un Diseño Simplex-Centroide las sinergias o antagonismos son notorios cuando para explicar la respuesta se eligen modelos cuadráticos o cúbicos (cuyas ecuaciones cuentan con elementos de interacción entre las variables), de esta misma forma en esta investigación al evaluar los coeficientes del modelo cúbico se observó que los tres componentes individualmente influyen positivamente del mismo modo que su interacción total en el (RB), mientras que las interacciones binarias no lo hacen.

Tabla 13

Efectos estimados del modelo completo para rendimiento de biomasa

Fuente	Gl	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Valor F	Valor-P
Media	1	3762,82	3762,82		
Lineal	2	120,104	60,0518	4,09	0,0667
Cuadrático	3	22,3631	7,45435	0,37	0,7796
Cúbico Especial	1	65,1245	65,1245	12,71	0,0377
Error	3	15,3709	5,12363		
Total	10	3985,79			

Tabla 14

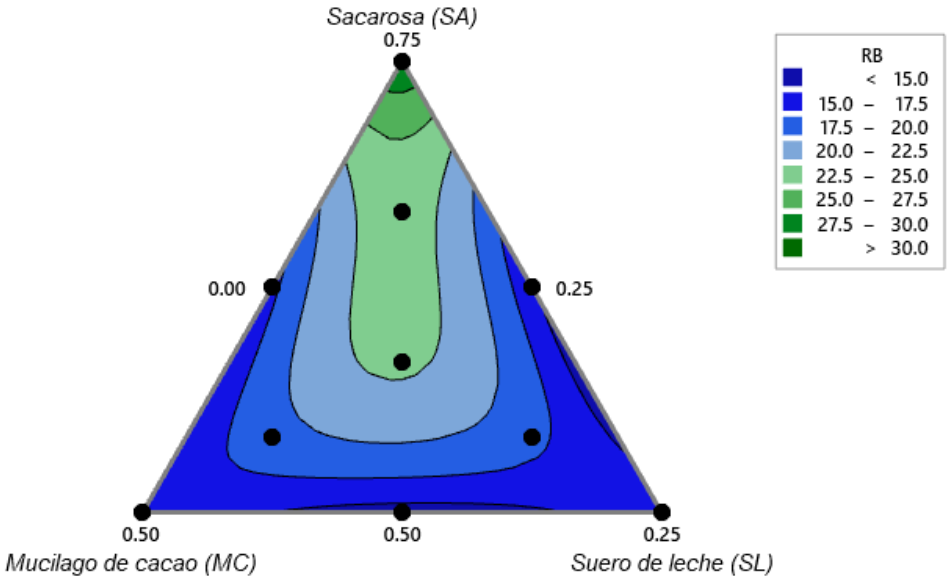
Resultados del modelo completo

Modelo	ES	R-Cuadrada	R-Cuadrada Ajd.
Lineal	3,83328	53,87	40,69
Cuadrático	4,48596	63,9	18,77
Cúbico Especial	2,26354	93,11	79,32

Una vez establecido el modelo óptimo, se procedió a su interpretación visual mediante gráficos de contorno de la superficie de respuesta. Este enfoque permite identificar los rangos porcentuales de (SA), (MC) y (SL) que maximizan el rendimiento de biomasa (RB) en los medios de cultivo. Las figuras 10 y 11 se verifica el comportamiento individual, cuando se consideran de forma aislada, generalmente no producen un RB elevado. a excepción notable de la sacarosa (SA), que muestra un mejor desempeño individual. Sin embargo se observan efectos sinérgicos significativos en las combinaciones binarias y ternarias de los componentes, lo que subraya la importancia de considerar estas interacciones en la optimización del medio de cultivo, la región que indica el máximo RB está representada en el gráfico por un área de color verde oscuro. Esta zona visual proporciona una guía clara para la formulación óptima del medio de cultivo.

Figura 10

Gráfico de contorno de mezcla del rendimiento de biomasa (proporciones de los componentes)



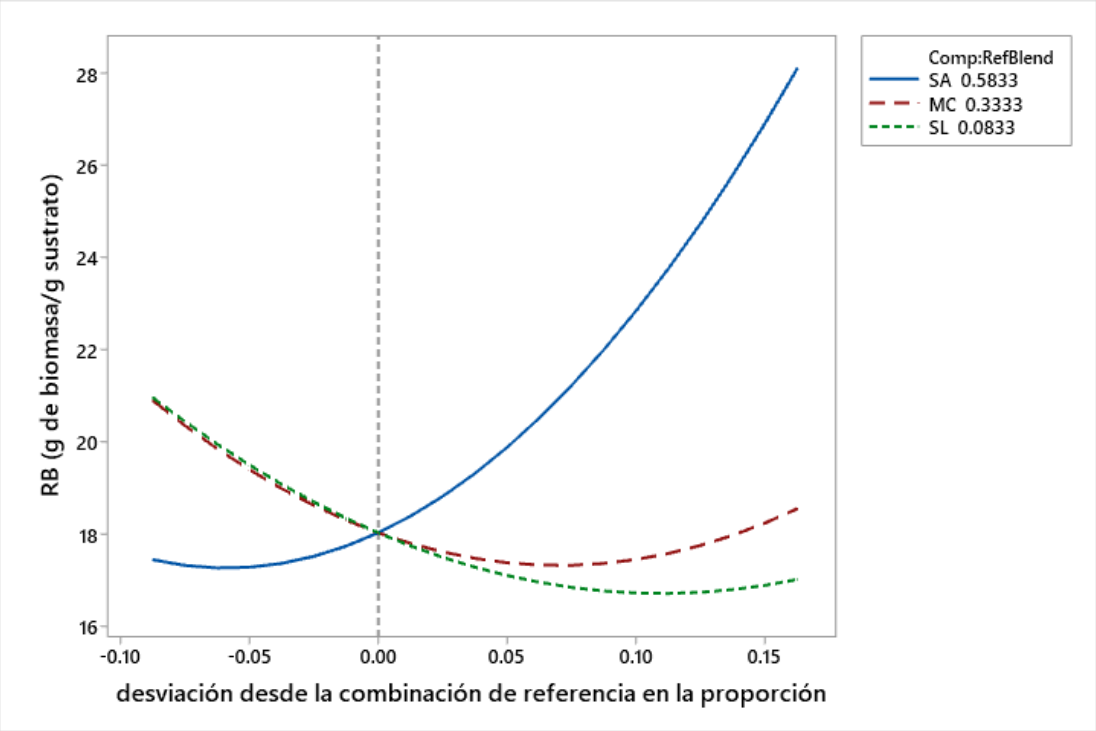
La figura 11 presenta un diseño centroide del espacio de mezcla, ilustrando cómo el rendimiento de biomasa (RB) fluctúa en función de cada componente. Este análisis confirma el papel predominante de la sacarosa (SA) en el proceso de fermentación, ejerciendo una influencia positiva significativa en el RB. Reiss (2014) y Kondagula & Molt (2019) explican el proceso bioquímico subyacente: durante la fermentación de la Kombucha, las levaduras del consorcio microbiano transforman la sacarosa en fructosa, glucosa y etanol. Subsecuentemente, las bacterias del ácido acético convierten la glucosa en ácido glucónico y la fructosa en ácido acético. Chen & Liu (2000) reportaron que el etanol y el ácido acético resultantes poseen propiedades antimicrobianas contra bacterias patógenas, lo cual protege el cultivo de Kombucha contra contaminaciones, favoreciendo así el RB. En contraste, el (MC) no muestra un impacto significativo en el RB, mientras que el (SL) parece comportarse de manera inerte respecto a esta variable de respuesta. Hong y Qiu (2008) señalan que las fuentes de carbono complejas requieren hidrólisis previa. El aumento en la producción se atribuye al uso de glucosa como fuente única de carbono, lo cual promueve la síntesis de ácido (ceto) glucónico por parte del microorganismo. Un

estudio de optimización realizado por Bae et al. (2017) con Acetobacter xylinum en un medio de licor de maíz suplementado con fructosa reveló que el incremento en la viscosidad del medio de cultivo estático resulta en una disminución de la producción de celulosa.

Se puedes verificar el comportamiento de los componentes dentro de los niveles mínimos y máximos en la optimización simultánea en el caso un incremento de SA a medida que se incrementa este.

Figura 11

Grafica de rastreo de respuesta de Cox



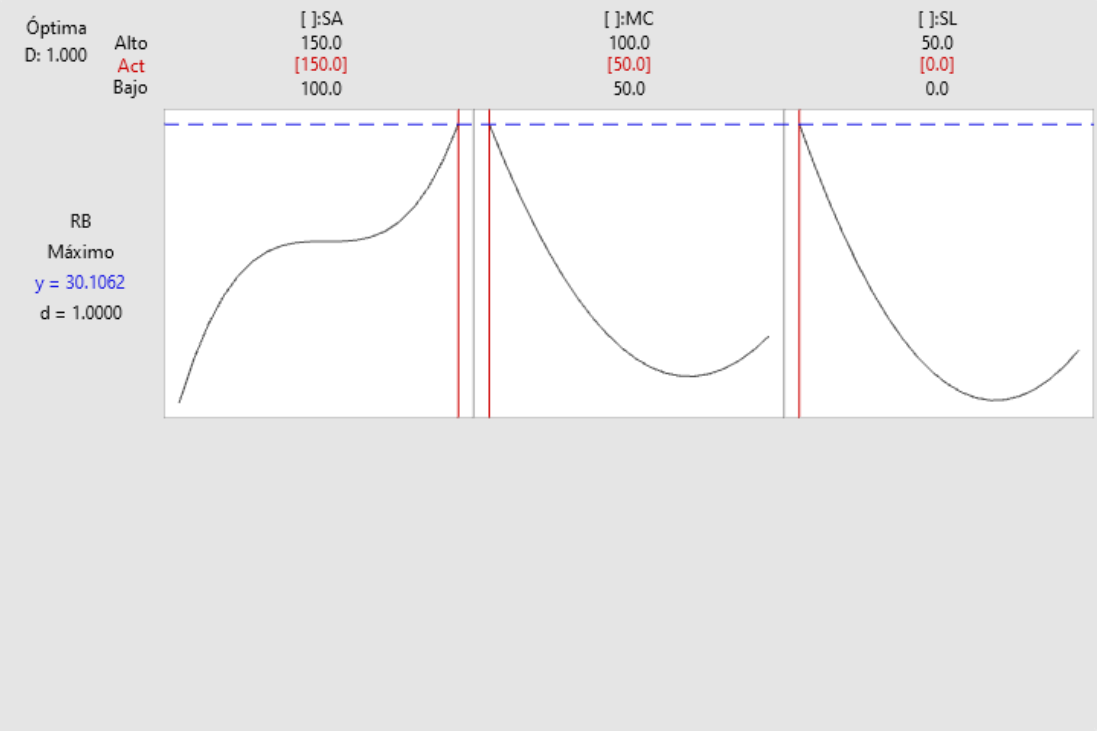
4.1.2 Optimización por función de deseabilidad para el rendimiento de biomasa

La figura 12 muestra el optimizador dinámico de “las proporciones de cada componente que maximizan el RB determinados por la función de deseabilidad son los siguientes: 150g de SA, 50g de MC y 0g de SL.” Estos valores corresponden a los rangos determinados por modelo del diseño simplex centroide y garantizan que el medio de cultivo formulado con esos valores en gramos de SA, MC y SL tendrá un alto rendimiento de biomasa (RB>30 g de biomasa/g sustrato).

La deseabilidad compuesta de 1, nos indica que la configuración ha logrado resultados favorables para todas las respuestas simultáneamente. Sin embargo, la deseabilidad individual indica que la configuración más efectiva para maximizar el RB, es el incremento del nivel de SA, este presenta una fase estacionaria, y posterior aceleración en favor del RB, el cual coincide con (Gama, Gatenholm & Klemm 2014) donde identificaron tres etapas en el proceso de generación de celulosa bacteriana: la primera etapa, posterior a la inoculación, se genera la celulosa bacteriana y se hace visible en forma de un prepolímero. En la etapa dos, la superficie del pre polímero se cierra completamente, finalmente la etapa 3 se obtiene un material de celulósico plano con superficie uniforme y con un crecimiento de espesor de 0,5-1,5 mm por día.

Figura 12

Optimización de rendimiento de biomasa mediante función de deseabilidad



4.2 Calidad de celulosa

En la tabla 15 se muestra la comparación de diferentes fuentes de celulosa con el T1, se puede apreciar que tiene una pureza expectante con respecto a las demás fuentes de celulosa. Al respecto (Martínez *et al*., 2019) explica que el mecanismo de síntesis de celulosa bacteriana le confiere una pureza superior a diferencia de cualquier fuente vegetal, otorgándole características de cristalización, alta resistencia a la presión, elasticidad y durabilidad. (Krystynowicz *et al*., 2012) refieren que "la celulosa tiene alta capacidad para absorber agua y debido a un menor diámetro de las microfibrillas, posee una mayor área superficial que la presente en la celulosa de madera", por ello el interés industrial, además "es inerte metabólicamente, no tóxica, ni provoca reacción alérgica al contacto, igualmente" (Guinea, 2016) señala que una características de la celulosa bacteriana es su estabilidad "en soluciones básicas pero es susceptible a hidrólisis alcalina bajo condiciones drásticas (NaOH 1 M, 170° C").

Tabla 15

Comparación de fuentes de celulosa con el tratamiento de estudio (T1)

Fuente	Composición (%)		Método de ensayo	Referencia
	Celulosa	Lignina		
T1	96	0	Kurschner y Hoffer	Trabajo de investigación
Bacteriana	98	0	Kurschner y Hoffer	Martínez Yee, Contreras Zentella, 2019
Algodón	95	1	TAPPI T 222 os-74	Klemm *et al*., 2002b
Madera	43-47	16-24	ASTM D- 104	Klemm *et al*., 2002b
Bagazo	40	20	ASTM D- 104	Klemm *et al*., 2002b
Residuos foliares de Piña	44	12	Kurschner y Hoffer	Mendoza 2020

4.3 Ensayos físicos y mecánicos del cuero biológico

Una vez ejecutado las operaciones para la obtención de cuero biológico figura 13 se realizó las pruebas físicas y mecánicas para poder proyectar el emplearse en la fabricación de otros productos, como la tapicería para muebles, y una amplia gama de artículos de cuero, como correas de reloj, bolsos, artículos de viaje, etc.

Figura 13

Obtención del cuero biológico y pruebas físicas mecánicas



. En la figura se aprecia la secuencia de operaciones desarrolladas para obtener y validar el cuero biológico. En primer lugar, (A) el efecto mecánico requerido para que los diferentes curtientes ingresen al material polimérico (celulosa bacteriana) se usó un botal de laboratorio en el Centro Experimental de Curtiembre de la UNSCH. (B) La velocidad del equipo es de 6 rpm y se aprecia que no hay daños físicos en el material celulósico. (C) el material celulósico estabilizado se acondiciona para las pruebas de resistencia a la tracción y porcentaje de elongación. (D) Calibración de los equipos en el laboratorio físico del Citeccal Lima.

4.3.1 Resistencia a la tracción y porcentaje de alargamiento

La resistencia a la tracción (RT) y el porcentaje de elongación (PE) de los 7 tratamientos del cuero biológico con porcentajes diferentes de SC, T-GL y PT se muestran en la tabla 16, este varió en el rango de 13,20 a 23,12 N/mm^2 y 5.34 a 17,22 % para RT y PE respectivamente, lo cual hace entender que los niveles porcentuales de SC, T-GL y PT, permitieron una exploración general de la RT y PE del cuero biológico, al respecto la NTP 241.023:2014 establece los requisitos de RT ≥10 N/mm^2 y PE ≥15% para empeine de calzado casual (anexo 4). Entre los tratamientos, el T6 presento mayor RT (23,12 N/mm^2) al estar compuesta por mezclas 5% de T-GL y 5% de PT, seguido del T4 y T7 con un RT de 20,46 y 13,32 N/mm^2 respectivamente. La composición de estos tratamientos evidencio que en general los niveles intermedios de T-GL y PT generan mayor RT, es decir, que la interacción de los componentes es positiva para la RT, mientras que individualmente los componentes SC, T-GL y PT generan un RT baja, por ejemplo, los tratamientos T1, T2, T3 tuvieron una RT baja posiblemente causada por la no interacción de los otros componentes. (Tamilselvi et al., 2019) refieren que al determinar las propiedades del cuero, no es suficiente conocer solo los valores de resistencia, la deformación de la piel siempre es importante cuando se aplica fuerza durante las pruebas. El T4 presento mayor PE (1,22%) al estar compuesto por una mezcla 5% de SC, 5% de T-GL, seguido del T2 y T7 con un 15,32 y14,26, respectivamente. La composición de estos tratamientos evidenció que en general los niveles intermedios de SC y T-GL de mezclas binarias genera mayor PE. Al respecto (Wang *et al*., 2019) señalan que la elasticidad tiene interés industrial en los materiales al cambiar fácilmente de la forma plana a la tridimensional, además (Ariram & Madhan, 2020) refieren que el estiramiento uniforme del cuero sin el peligro de rotura del tejido interfibrilar, refleja confort en la producción de varios accesorios como bolsos prendas de vestir, tapicería y varios otros productos.

Los resultados mostraron que las mezclas binarias con niveles 'intermedios' de SC y T-GL alcanzaron la mayor performance elástica. Esta propiedad resulta de gran interés industrial, ya que permite a los materiales cambiar fácilmente de una forma plana a tridimensional. Además, la capacidad de estirar el cuero de manera uniforme sin dañarlo es fundamental para la producción de diversos artículos como bolsos, ropa y tapicería, ya que garantiza mayor comodidad y durabilidad. Como señalan Wang et al (2019), esta propiedad es crucial para la adaptación de los materiales a

diferentes formas y aplicaciones. Según Ariram y Madhan, (2020) la capacidad de estirar el cuero de manera uniforme es fundamental para garantizar la calidad y el confort de los productos finales."

Tabla 16

Variables independientes y respuesta

N° Trat.	Variables independientes						Respuesta	
	Proporciones de componentes codificado			Proporciones de componentes reales (%)			Resistencia a la tracción[1] N/mm^2	Porcentaje de elongación[2] (%)
	SC	T-GL	PT	SC	T-GL	PT	RT	PE
T1	1	0	0	10	0	0	18,23 ± 1,0	7,25 ± 0,64
T2	0	1	0	0	10	0	16,75 ± 1,74	15,32 ± 0,34
T3	0	0	1	0	0	10	13,20 ± 0.96	5,34 ± 0,78
T4	0.5	0.5	0	5	5	0	20,46 ± 0,98	17,22 ± 0,8
T5	0.5	0	0.5	5	0	5	16,23 ± 0,81	8,12 ± 0,12
T6	0	0.5	0.5	0	5	5	23,12 ± 0,74	9,45 ± 0,34
T7	1/3	1/3	1/3	3,33	3,33	3,33	18,32 ± 0,45	14,26 ± 0,67

SC=Sulfato de cromo; T-GL=Tensotan GL-50; PT=Polvo de tara; RT=Resistencia a la tracción; PE=Porcentaje de elongación, valores promedio ± [1]desviación estándar =3,17 [2]desviación estándar =4,56

Según (Fernandes *et al*., 2019) el cuero es un material proteico fibroso (colágeno) que se trata químicamente con material curtiente, generalmente cromo, para obtener las propiedades físicas deseadas. La morfología de la celulosa bacteriana obtenida en esta investigación nos presenta “fibrillas separadas y entrecruzadas formando diferentes capas interconectadas con una superficie resistente difícil de rasgar” lo que nos persuade en investigar la adición de agentes curtientes para mejorar su resistencia mecánica y flexibilidad. Al respecto *(*Ayyappan *et al*., 2022b) reportaron una resistencia a la tracción de 63,03 MPa y 18,39% el alargamiento a la rotura en un estudio donde incorporaron “nanomateriales de oro, plata y carbono a la celulosa bacteriana de kombucha” similares al cuero. Dado que la industria de curtiembre genera una gran cantidad de residuos que se transforman en significativos problemas ambientales y han sido explicados en otras investigaciones. Este trabajo se enfocó en optimizar las propiedades físicas (RT y PE) como indicador general para el desarrollo de materiales similares al cuero.

4.3.2 Optimización por Diseño Simplex Centroide (DSC)

El análisis de varianza de los modelos de regresión que explican la RT y PE en base a los porcentajes de SC, T-GL y PT, se verifican en las tablas 17 y 18. El modelo cuadrático fue elegido por tener el efecto estadístico más próximo al valor del nivel de confianza (p= 0,05) y por poseer un elevado coeficiente de determinación R^2. El modelo fue expresado de la siguiente manera:

Tabla 17

Análisis de varianza para resistencia a la tracción (RT)

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Valor F	Valor p
Regresión	5	54,9506	10,9901	2,12	0,478
Lineal	2	13,2383	6,6823	1,29	0,529
Cuadrático	3	41,7124	13,9041	2,68	0,416
SC*T-GL	1	2,1707	2,9863	0,58	0,587
SC*PT	1	0,4985	0,1734	0,03	0,885
T-GL*PT	1	39,0431	39,0431	7,52	0,223
Error residual	1	5,1924	5,1924		
Total	6	60,143			

Modelo lineal R^2 = 22,01%

Modelo cuadrático R^2= 91,37%

Tabla 18

Análisis de varianza para el porcentaje de elongación (PE)

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Valor F	Valor p
Regresión	5	122,561	24,5121	11,08	0,224
Lineal	2	85,601	28,0622	12,68	0,195
Cuadrático	3	36,96	12,3199	5,57	0,3
SC*T-GL	1	32,204	33,059	14,94	0,161
SC*PT	1	4,715	4,6639	2,11	0,384
T-GL*PT	1	0,041	0,0413	0,02	0,914
Error residual	1	2,213	2,2126		
Total	6	124,773			

Modelo lineal R^2 = 68,61%
Modelo cuadrático R^2= 98,23%

PE = 7,12053*SC + 15,1905*T-GL + 5,21053*PT + 26,3294*SC*T-GL + 9,88941*SC*PT – 0,930587*T-GL*PT

RT = 18,4283*SC + 16,9483*T-GL + 13,3983*PT + 7,91337*SC*T-GL – 1,90663*SC*PT + 28,6134*T-GL*PT

Los signos positivos en los coeficientes de los modelos sugieren sinergia, indicando que los efectos combinados o de interacción entre los ingredientes generan respuestas mayores cuando se mezclan. Asimismo, el signo negativo implica antagonismo entre los componentes, es decir, que se producen respuestas memores, (Montgomery, 2017) en un Diseño Simplex-Centroide las sinergias o antagonismos son notorios cuando para explicar la respuesta se eligen modelos cuadráticos o cúbicos (cuyas ecuaciones cuentan con elementos de interacción entre los componentes). En esta investigación los coeficientes del modelo cuadrático individuales influyen positivamente a las respuestas mientras que las interacción duales (T-GL*PT) y (SC*PT) para RT y PE respectivamente no lo hacen.

Definido el modelo, se realizó la interpretación gráfica de la superficie de respuesta en el formato de gráfico de contornos para conocer los rangos de los porcentajes de SC, T-GL y PT que optimizan la RT y PE en el cuero biológico. En la figura 14 y 15, se puede comprobar que los componentes individualmente no generan una RT y PE tan alta como cuando existe interacción entre componentes. La región de interés que indica la máxima RT y PE está representada por la zona de color verde oscuro.

Figura 14

Gráfico de contorno de mezcla de la resistencia a la tracción del cuero biológico (proporciones de los componentes)

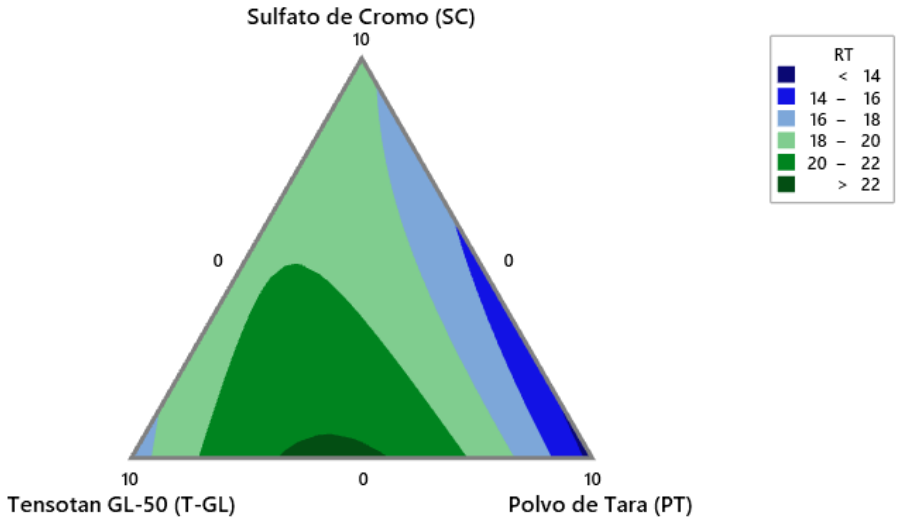
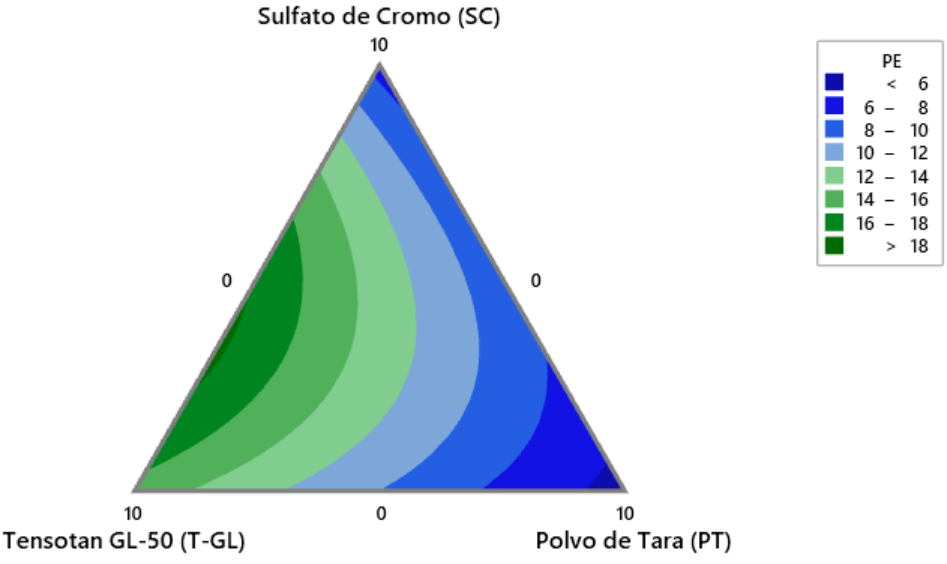


Figura 15

Gráfico de contorno de mezcla del porcentaje de elongación del cuero biológico (proporciones de los componentes)

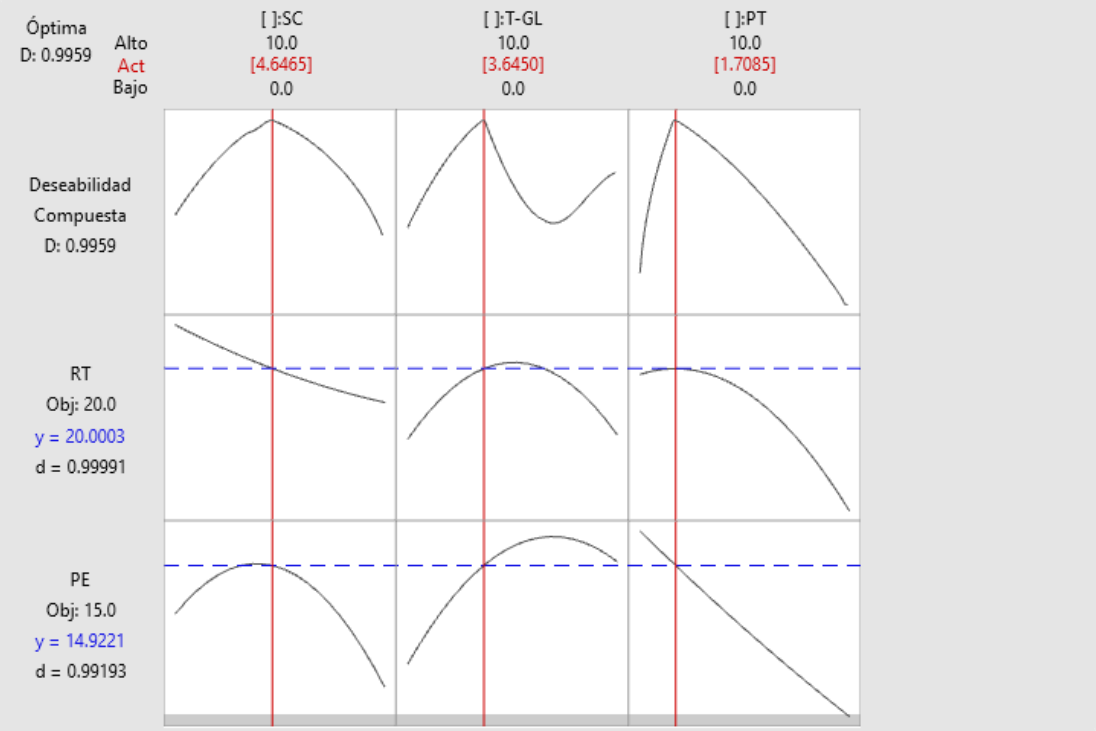


4.3.3 Optimización de las propiedades físicas y mecánicas del cuero biológico mediante funciones de deseabilidad

A través de la Figura 16, se visualizan los valores ajustados de los componentes que maximizan tanto la resistencia a la tracción como la elongación a la ruptura del cuero biológico. Estos valores, junto con sus respectivos intervalos de predicción, permiten evaluar la precisión de los modelos utilizados y determinar si los resultados obtenidos se encuentran dentro de los límites establecidos por la normativa técnica peruana NTP 241.023:2014, garantizando así la calidad del producto final

Figura 16

Optimización de las pruebas física y mecánicas del cuero biológico



Los resultados de las pruebas físicas y mecánicas indican una deseabilidad compuesta de 0.9959, lo cual sugiere una excelente optimización de las propiedades del cuero. El análisis de la gráfica muestra los valores óptimos de cada componente de la mezcla: 4.64% de sulfato de cromo, 3.64% de Tensotan GL-50 y 1.70% de polvo de tara. Esta composición maximiza la resistencia a la tracción (RT) y la elongación (PE), cumpliendo con los requisitos establecidos en la norma NTP 241.023:2014 para empeines de calzado casual. Los valores pronosticados de RT es

20,00 N/mm2 y su deseabilidad individual es 0,99991 en tanto que para PE es 14,92 % y su deseabilidad individual es 0,99193. Otras observaciones son las siguientes:

- Sulfato de cromo (SC): se observa que al aumentar el % de SC también aumenta el PE hasta cierto punto; sin embargo, el efecto sobre la RT es mínimo en comparación con el valor de PE; por lo tanto, el valor de configuración óptimo se encuentra en la mitad del rango (4,64%), lo que representa un compromiso entre metas. Al respecto (Lucumí, Mora, Lizcano, & Benítez, 2020) realizaron bioensayos de reducción de cromo, con cepa CrLIM26 donde las variables de respuesta fueron la concentración de Cr(VI) y el crecimiento bacteriano; lo cual evidencia el efecto del Cr(VI) sobre la morfología bacteriana; además (Ayyappan *et al*., 2022b) trataron celulosa bacteriana (BC) derivada de kombucha con varios nanomateriales como óxidos de grafeno, nanopartículas de oro y nanopartículas de plata que conducen a diversas interacciones sinérgicas no covalentes, logrando interacciones sinérgicas para mejorar diversas propiedades mecánicas y físicas.

- El Tensotan GL-50 (T-GL) mostró un efecto no lineal en las propiedades del cuero. Al aumentar su concentración, se observó una mejora en las respuestas hasta alcanzar un máximo en el experimento a los 3.64%. Sin embargo, concentraciones mayores resultaron en una disminución del rendimiento. Echeverry (2016) también reportó el uso de aldehídos, como el glutaraldehído, en procesos de curtido, aunque con diferentes objetivos.

- El polvo de tara, un curtiente vegetal tradicional, influye de manera compleja en las propiedades mecánicas del cuero. Los resultados indican que, si bien el aumento de su porcentaje mejora la resistencia a la tracción (RT), también provoca una disminución en la elongación (PE). Este comportamiento opuesto sugiere la existencia de un punto óptimo de adición de polvo de tara, el cual se estableció en 1.70%. Estos hallazgos son consistentes con la literatura especializada, que destaca el papel del curtido vegetal en la mejora de la suavidad y elasticidad del cuero, como lo demuestran los estudios de Teklay et al. (2017)

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

El medio de cultivo determina directamente el rendimiento y la calidad de celulosa bacteriana según lo que se pudo comprobar en los tratamientos conducidos bajo la metodología del diseño simplex centroide, las condiciones de cultivo fueron estáticas y a temperatura ambiente (± 21ºC) permitió obtener láminas de celulosa mecánicamente estable con la superficie plana y uniforme.

- El modelo cúbico del diseño simplex centroide fue elegido por tener el efecto estadístico significativo más próximo al valor-p ($p=0.0377\approx0.05$) y R^2 (93.11%); permite optimizar el rendimiento de biomasa >30 g de biomasa/g sustrato) por la función de deseabilidad con 150g de SA, 50g de MC y 0g de SL. Según las gráficas de contorno de mezclas la región donde predominan mezclas binarias entre SA y MC son las que optimizan el rendimiento en la producción de celulosa bacteriana.

- Se determinó el contenido de celulosa en 96%, bajo los lineamientos de TAPPI (Technical Association of the Pulp and Paper Industry), quienes rigen aspectos de calidad en la fabricación de papel y sus productos. La pureza de la celulosa bacteriana de Kombucha es superior a cualquier fuente vegetal, tal valor está en función directa a los mecanismos de síntesis donde participan diversos microorganismos en forma de consorcio microbiano.

- Los resultados de los ensayos físicos y mecánicos realizados al cuero biológico determinaron que el tratamiento ternario de los siguientes niveles de componentes: 4,64% sulfato de cromo (SC), 3,64% Tensotan GL-50 (T-GL) y 1,70% polvo de tara (PT) maximizan la resistencia a la tracción y porcentaje de elongación en: 20.00 N/mm2 y 14,92 % respectivamente, dichos valores están cercanos a los valores establecidos por la NTP 241.023 referente a requisitos y métodos de ensayo de calzado casual.

5.2 Recomendaciones

- Repetir el experimento ampliando los rangos de los niveles de estudio, para explorar regiones de soluciones más óptimas en cuanto a sus características físicas y mecánicas, para escalar a una investigación de nivel aplicada que respondan a las necesidades de la sociedad y los sectores productivos del país.

- La industria del cuero tiene un avance tecnológico enorme en cuanto a productos auxiliares de acabado, interesaría estudiar el efecto, interacciones con la celulosa bacteriana de Kombucha en un marco de procesos ecoeficientes

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Adolfo, R., & Huertas, P. (2019). Lactosuero: importancia en la industria de alimentos, *62*(1), 4967–4982.

Aguilar, S., & Espin, D. (2019). PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN BIOPOLÍMERO OBTENIDO A PARTIR DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES DEL CACAO (CCN-51), *8*(5), 55.

Ariram, N., & Madhan, B. (2020). Development of bio-acceptable leather using bagasse. *Journal of Cleaner Production*, *250*. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119441

Ayyappan, V. G., Vhatkar, S. S., Bose, S., Sampath, S., Das, S. K., Samanta, D., & Mandal, A. B. (2022a). Incorporations of gold, silver and carbon nanomaterials to kombucha-derived bacterial cellulose: Development of antibacterial leather-like materials. *Journal of the Indian Chemical Society*, *99*(1), 100278. https://doi.org/10.1016/j.jics.2021.100278

Ayyappan, V. G., Vhatkar, S. S., Bose, S., Sampath, S., Das, S. K., Samanta, D., & Mandal, A. B. (2022b). Incorporations of gold, silver and carbon nanomaterials to kombucha-derived bacterial cellulose: Development of antibacterial leather-like materials. *Journal of the Indian Chemical Society*, *99*(1). https://doi.org/10.1016/j.jics.2021.100278

Ayed, L., Ben Abid, S., Hamdi, M., 2016. Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium. Ann. Microbiol. 67 (1), 111–121. https://doi.org/10.1007/s13213-016-1242-2.

Arteaga, Yadira E. (2017). Estudio del desperdicio del mucilago de cacao en el cantón naranjal (provincia del guayas) Ecuador. 49-59pp

Battikh, H., Chaieb, K., Bakhrouf, A., & Ammar, E. (2015). Antibacterial and antifungal activities of black and green kombucha teas. Journal of Food Biochemistry, 37, 231–236

Bae, sangok; shoda, makoto. (2017). Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium. Biotechnology progress, vol. 20, no 5, p. 1366-1371

Burgos, M. L. J. (2020). Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de piña con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico. *Questionar: Investigación Específica*, *7*(1), 57–66. https://doi.org/10.29097/23461098.308

Brown, R. M., Willison, J. H., & Richardson, C. L. (2018). Cellulose biosynthesis in Acetobacter xylinum: visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process. Proc. Natl. Acad. Sci, 73, 4565-4569.

Cakar F, Ozer I, Aytekin AÖ, Sahin F. (2018) Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium. Carbohydr Polym ; 106:7–13.

Carreño, P. L. D., Caicedo, M. L. A. C., & Martínez, R. C. A. (2019). Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. *Ingeniería y Ciencia*, *8*(16), 307–335. https://doi.org/10.17230/ingciencia.8.16.12

Cacicedo, M. L., Castro, M. C., Servetas, I., Bosnea, L., Boura, K., Tsafrakidou, P., & Castro, G. R. (2017). Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. Bioresource Technology, https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.071

Campano, C., Balea, A., Blanco, A., & Negro, C. (2016). Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: A review. Cellulose, 23(1), 57–91. https://doi.org/10.1007/s10570-015-0802-0

Cintas, P., Almagro, M., & Llabrés, X. T. (2012). *Industrial Statistics with Minitab Industrial Statistics with Minitab*. (U. K. John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, PO19 8SQ, Ed.) (Wiley). Barcelona, Spain.

Coelho, R. M. D., Almeida, A. L. de, Amaral, R. Q. G. do, Mota, R. N. da, & Sousa, P. H. M. d. (2020). Kombucha: Review. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, *22*. https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2020.100272

Cozzoni, Enrico. (enero 2021). Grado zero innovation. Tuscany - Firenze - Italy Sustainable materials & product innovation. https://fashiontechalliance.eu/images/portfolio/GZI_PRESENTATION_ok.pdf

Cvetkovi´c, D., Markov, S., Djuri´c, M., Savi´c, D., & Veli´canski, A. (2018). Specific interfacial area as a key variable in scaling-up Kombucha fermentation. Journal ofFood Engineering, 85(3), 387–392. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.07.021

Claringbold, P. J. (2017). Use of the simplex design in the study of the joint action of related hormones. Biometrics, 11, 174–185.

Chawla, P., Bajaj, I., Survase, S., & Singhal, R. (2019). Microbial Cellulose: Fermentative production and applications. Food Technology and Biotechnology, 47(2), 107-124.

Chen, C., & Liu, B. Y. (2000). Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. Journal of Applied Microbiology, 89(5), 834–839. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01188.x

Dantas, D. S., da Silva Gomes, L., Costa Gonçalves, L. S., Correia, J. O., Silva, G. M. da, Rocha de Queiroga, A. P., Alonso Buriti, F. C. (2022). Lactose hydrolysis implications on dairy beverages with autochthonous Limosilactobacillus mucosae and Syzygium cumini pulp. *Lwt*, *155*. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112963

Ding, W., Liu, H., Remón, J., Jiang, Z., Chen, G., Pang, X., & Ding, Z. (2022). A step-change toward a sustainable and chrome-free leather production: Using a biomass-based, aldehyde tanning agent combined with a pioneering terminal aluminum tanning treatment (BAT-TAT). *Journal of Cleaner Production*, *333*(December 2021), 130201. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.130201

Du, R., Zhao, F., Peng, Q., Zhou, Z. & Han, Y. Production and characterization of bacterial cellulose produced by Gluconacetobacter xylinus isolated from Chinese persimmon vinegar. Carbohydr. Polym. 194, 200–207 (2018).

Emiljanowicz, K. E., & Malinowska-Pa´nczyk, E. (2019). Kombucha from alternative raw materials – the review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1–10. https:// doi.org/10.1080/10408398.2019.1679714

Ellen Macarthur Foundation (03 de abril de 2019) ¿Qué es una economía circular? https://ellenmacarthurfoundation.org/es/temas/presentacion-economia-circular/vision-general

Fernandes M, Gama M, Dourado F, Souto AP. 2019. Desarrollo de nuevas bacterias compuestos de celulosa para la industria textil y del calzado. Microbio. Biotecnología.12: 650–61.

García, C., & Gutiérrez, I. (2017). Diseño óptimo de experimentos para modelos de mezclas aplicados en la ingeniería y las ciencias experimentales, 258.

Garcia, C., & Prieto, M. A. (2018). Bacterial cellulose as a potential bioleather substitute for the footwear industry. *Microbial Biotechnology*, *12*(4), 1–4. https://doi.org/10.1111/1751-7915.13306

Gordillo, H. M. (2018). *Aislamiento y caracterización de bacterias y levaduras a partir del consorcio de microorganismos denominado KOMBUCHA*. UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA La Universidad Católica de Loja ÁREA.

Goh WN, Rosma A, Kaur B, Eazilah A, Karim AA, Bhat R. 2017. Fermentation ofblack tea broth (kombucha): I. Effects of sucrose concentration and fermentation time on the yield ofmicrobial cellulose. Int Food Res J 19:109–7.

Guinea, M. (2016). Diseño de planta piloto para producción de Celulosa Bacteriana. *Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona*, *1*, 92.

Gutiérrez, H., Salazar, R., Johnson, Kuby, P., Sáenz López, K., & Tamez González, G. (2018). *Estadística elemental: Lo esencial*. *Métodos Y Técnicas Cualitativas Y Cuantitativas Aplicables a La Investigación En Ciencias Sociales*. Retrieved from http://eprints.uanl.mx/8625/1/7. Metodología cap 19 solo capítulo.pdf%0Ahttps://www.academia.edu/40887991/Estadística_Elemental_10ma_Edición_Robert_Johnson%0Ahttps://www.researchgate.net/publication/44401609_Analisis_y_Diseno_de_Experimentos

Habtegebriel, H., Edward, D., Wawire, M., & Seifu, E. (2021). Insolubility and denaturation of whey proteins of skimmed camel milk as affected by spray drying operating parameters. *International Journal of Food Properties*, *24*(1), 517–532. https://doi.org/10.1080/10942912.2021.1883057

Hildebrandt, J., Thrän, D., & Alberto, B. (2021). The circularity of potential bio-textile production routes: Comparing life cycle impacts of bio-based materials used within the manufacturing of selected leather substitutes. *Journal of Cleaner Production*, *287*. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.125470

Hijosa, C. (Febrero 2020). Londres. Piñatex ananas aman. https://www.ananas-anam.com/

Hong, F., & Qiu, K. (2008). An alternative carbon source from konjac powder for enhancing production of bacterial cellulose in static cultures by a model strain Acetobacter aceti ssp. xylinus ATCC 23770. Carbohydrate Polymers, 72(3), 545-549.

Hernández, R. M., & Velez, R. J. (2014). Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales, 13–22.

Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), 20 de diciembre de 2019. Recuperado del 15 enero 2023 de: https://www.iberdrola.com/medio-

ambiente/microplasticos-amenaza-para-la-salud

Jaramillo, R. L., Tobio, W. J., & Escamilla, J. M. (2020). Efecto de la sacarosa en la producción de celulosa por Gluconacetobacter xylinus en cultivo estático. *Revista MVZ Cordoba*, *17*(2), 3004–3013. https://doi.org/10.21897/rmvz.235

Jayabalan, R., Radomir, V., Malbasa, Eva. S., Loncar, Jasmina. S., & Vitas, Muthuswamy. S. (2019). A review on kombucha tea – microbiol- ogy, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity and tea fungus. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 13, 538–550.

Juárez, R. (2018). *"Hidrólisis Enzimática De La Lactosa Del Suero En Polvo."* UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS. Retrieved from http://repositorio.umm sa.bo/bitstream/handle/123456789/10606/PG-675-Juarez Mamani%2C Raul.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P. & Bohn, A. (2018). Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. Angew. Chem. Int. Ed. 44, 3358–3393.

Klemm D, Schumann D, Udhardt U, Marsch S (2002) Bacterial synthesized cellulose-artificial blood vessels for microsurgery. Prog Polym Sci 26:1561–1603

Kondagula, F., & Molt, K. (2019). Infrared Spectrometric Purity Control of Chemical Substances using R. Universität Duisburg-Essen, Department of Chemistry, Duisburg, Germany. Obtenido de https://www.r-project.org/conferences/useR-2010/abstracts/Kondagula+Molt.pdf

Krystynowicz, A., Czaja, W., & Wiktorowska-Jezierska, A. (2012). Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. J Ind Microbiol Biotechnol, 29, 189- 195.

Leal, J. M., Suárez, L. V., Jayabalan, Rasu, J. H., & Escalante Aburto, A. (2018). A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. *CYTA - Journal of Food*, *16*(1), 390–399. https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1410499

Li, J., Chen, G., Zhang, R., Wu, H., Zeng, W., & Liang, Z. (2019a). Production of high crystallinity type-I cellulose from Komagataeibacter hansenii JR-02 isolated from Kombucha tea. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *66*(1), 108–118. https://doi.org/10.1002/bab.1703

Loachamin, B., & Narváez, F. (2021). *OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SUERO DE LECHE EN POLVO A PARTIR DE LACTOSUERO DE LA EMPRESA (PROLAD´S) MEDIANTE EL MÉTODO DE SECADO POR ASPERSIÓN (Spray Dryer)*. *Universidad Técnica De Cotopaxi Facultad*. Retrieved from http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/4501/1/PI-000727.pdf

Lonˇcar ES, Petrovi´c SE, Malbaˇsa RV, Verac RM. 2017. Biosynthesis of glucuronic acid by means of tea fungus. Nahrung 44:138–9.

Lucumí, R. S., Mora, C. A., Lizcano, V. W. H., & Benítez, C. N. (2020). ACTIVIDAD ELECTROQUÍMICA DE LA CEPA BACTERIANA CrLIM26 ACOPLADA A LA REDUCCIÓN DE Cr(VI). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, *36*(3), 555–565. https://doi.org/10.20937/rica.53405

Martínez Yee, Contreras Zentella, E. E. (2019). Celulosa Bacteriana en Gluconacetobacter xylinum. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, *7*(1), 19–25. https://doi.org/10.1111/epi.12525

Mendoza, C. J. W., Velásquez, C. P. F., & Gómez, G. Y. (2020). Caracterización estructural, física y química de la fibra de rastrojo de la cosecha de piña (ananas comosus) golden como alternativa para elaborar papel. *Ingeniería Investiga*, *2*(2), 314–323. https://doi.org/10.47796/ing.v2i2.408

MINAGRI, D. D. (2018). *Análisis de la Cadena Productiva del Cacao* (Ministerio).

Montgomery D. C. (2017). *Design and analysis of experiments*. (I. John Wiley & Sons, Ed.) (Ninth Edit, Vol. 9). Arizona State University.

Ortiz, K., & Álvarez, R. (2015). EFECTO DEL VERTIMIENTO DE SUBPRODUCTOS DEL BENEFICIO DE CACAO (Theobroma cacao L.) SOBRE ALGUNAS PROPIEDADES QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS EN LOS SUELOS DE UNA FINCA ACAOTERA, MUNICIPIO DE YAGUARÁ (HUILA, COLOMBIA). *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, *19*(1), 65–84. https://doi.org/10.17151/bccm.2015.19.1.5

Pachana Arina, S. G., & Th, M. (2017). *DISEÑO DE MEZCLA SIMPLEX-CENTROIDE PARA LA OPTIMIZACIÓN DE UN CULTIVO PRODUCTOR DE CELULOSA BACTERIANA*.

Panesar, P., J. Kennedy, D. Gandhi and K. Bunko. 2017. Bioutilisation of whey for lactic acid production. Food Chemistry 105: 1-14.

Provin, A. P., Dutra, A. R. de A., De Sousa, e Silva Gouveia, Aguiar, I. C., & Cubas, A. L. V. (2021). Circular economy for fashion industry: Use of waste from the food industry for the production of biotextiles. *Technological Forecasting and Social Change*, *169*(October 2020), 120858. https://doi.org/10.1016/j.techfore.2021.120858

Prudnikova, S. V., & Shidlovsky, I. P. (2017). The New Strain of Acetic Acid Bacteria Komagataeibacter xylinus B-12068 Producer of Bacterial Cellulose for Biomedical Applications. Journal of Siberian Federal University, 10(2), 246-254.

Quille, L., Luque, O., & Aruhuanca, F. (2021). Revista Científica I + D Aswan Science. *Potencialidades Del Lactosuero Generado Por La Industria Quesera y Su Valorización Potentialities*, *1*(1), 1–9. https://doi.org/https://doi.org/10.51892/rcidas.v1i2.10 Potencialidades

Ramírez, P., & Coha, J. M. (2003). Enzymatic degradation of cellulose for thermophilic actinomycete: Isolation, characterization and cellulolytic activity determination. *Revista Peruana de Biologia*, *10*(1), 67–77.

Ricaurte, A. (2017). Diseño y comunicación Neofolk Bags : Bolsos con valor agregado, 1–139. https://fdocuments.ec/document/neofolk-bags-bolsos-con-valor-una-tcnica-textil-novedosa-adaptada-al-diseo.html?page=1

Reiss, J. (2014). Influence of different sugars on the metabolism of the tea fungus. Zeitschrift Fuer Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung, 198(3), 258–261. https://doi.org/10. 1007/BF01192606

Rosu, L., Varganici, C., Crudu, A., Rosu, D., & Bele, A. (2018). Ecofriendly wet–white leather vs. conventional tanned wet–blue leather. A photochemical approach. *Journal of Cleaner Production*, *177*, 708–720. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.12.237

Rodrigez. E, (Marzo 2020). Modadal. noticias de America Latina y el Caribe. https://www.nodal.am/2017/09/cientificos-mexicanos-fabrican-plastico-cascaras-

naranja/

Saleh, A. K., El-Gendi, H., Soliman, N. A., El-Zawawy, W. K., & Abdel-Fattah, Y. R. (2022). Bioprocess development for bacterial cellulose biosynthesis by novel Lactiplantibacillus plantarum isolate along with characterization and antimicrobial assessment of fabricated membrane. *Scientific Reports*, *12*(1), 1–17. https://doi.org/10.1038/s41598-022-06117-7

Salimi, A., Maghsoudlou, Y., & Jafari, S. M. (2018). Effect of emulsion stability and spray drying conditions on physicochemical characteristics of encapsulated powders. *Latin American Applied Research*, *48*(2), 95–100. https://doi.org/10.52292/j.laar.2018.265

Sandoval, R., & Guadalupe, A. S. De. (2017). Diseños y aplicaciones de cuero vegano.

Santos, S. M., Carbajo, J. M., & Villar, J. C. (2017). The effect of carbon and nitrogen sources on bacterial cellulose production and properties from gluconacetobacter sucrofermentans CECT 7291 focused on its use in degraded paper restoration. *BioResources*, *8*(3), 3630–3645. https://doi.org/10.15376/biores.8.3.3630-3645

Saiz Jiménez, J. Á., & Cornejo Royo, L. (2015). Secado De Alimentos Mediante Energía Solar. *3C Tecnología_Glosas de Innovación Aplicadas a La Pyme*, *3*(4), 234–244. https://doi.org/10.17993/3ctecno.2014.030411.234-244

Soriano, J., & Barreto, M. (2018). *Síntesis y estudio de propiedades de celulosa bacteriana obtenida en piña y banano, inoculados con Kombucha*. Retrieved from http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/27913/1/Tesis-Celulosa-Bacteriana-Piña-Banano.pdf

Simone, Preuss (Febrero 2021). fashionunited. Estado de california USA. https://fashionunited.com.pe/authors/simone

Shah, N., Ul-Islam, Mazhar, Khattak, Walled, & Park, J. K. (2018). Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material. Carbohydrate Polymers, 98, 1585-1598.

Tamilselvi, A., Jayakumar, G. C., Sri Charan, K., Sahu, B., Deepa, P. R., Kanth, S. V., & Kanagaraj, J. (2019). Extraction of cellulose from renewable resources and its application in leather finishing. *Journal of Cleaner Production*, *230*, 694–699. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.401

Technical Association for the Pulp and PaperIndustries, (1999). Acid insoluble in wood and pulp. TAPPI Test Method T 222 om-98. TAPPI PRESS, Atlanta, USA.

Teklay, A., Gebeyehu, G., Getachew, T., Yaynshet, T., & Sastry, T. P. (2017). Conversion of finished leather waste incorporated with plant fibers into value added consumer products – An effort to minimize solid waste in Ethiopia. *Waste Management*, *68*, 45–55. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.024

Vargas, B. K., Fabricio, M. F., & Záchia Ayub, M. A. (2021). Health effects and probiotic and prebiotic potential of Kombucha: A bibliometric and systematic review. *Food Bioscience*, *44*(August). https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101332

Villarreal-Soto, S. A., Beaufort, S., Bouajila, J., Souchard, J. P., & Taillandier, P. (2018). Understanding Kombucha Tea Fermentation: A Review. *Journal of Food Science*, *83*(3), 580–588. https://doi.org/10.1111/1750-3841.14068

Wang, X., Chen, K., Li, W., Hao, D., & Guo, P. (2019). A paper sizing agent based on

leather collagen hydrolysates modified by glycol diglycidyl ether and its compound performance. *International Journal of Biological Macromolecules*, *124*, 1205–1212. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.047

Wolfe, B. E., & Dutton, R. J. (2015). Fermented foods as experimentally tractable microbial ecosystems. Cell, 161(1), 49–55. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.034

Watawana, MI, Jayawardena, N., Gunawardhana, CB y Waisundara, VY (2015). Aspectos de salud, bienestar y seguridad del consumo de Kombucha. Diario de Química. 2015, 1 – 11.https://doi.org/10.1155/2015/591869

Yim, S. M., Song, J. E., & Kim, H. R. (2017). Production and characterization of bacterial cellulose fabrics by nitrogen sources of tea and carbon sources of sugar. *Process Biochemistry*, *59*, 26–36. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.07.001

Zhang, Z., Li, G., Shi, B., 2006. Propiedades fisicoquímicas del colágeno, la gelatina y el hidrolizado de colágeno derivado de desechos bovinos partidos encalados. J. Soc. Tecnología de cuero, Química, 9023

ANEXO 1

Formulaciones de las mezclas experimentales

Nº Trat.	Proporciones de componentes codificado			Proporciones de componentes valores reales (%)			Componentes manipulados (g) (20%)			Componentes constantes (g) (70%)			(100%) Mezcla total	Parámetros iniciales de fermentación		Parámetros finales (28 días de fermentación)		Cultivo de Kombucha inoculado (g)	Kombucha producido (g)	Sustrato inicial (g)	Sustrato final (g)	Rendimiento de biomasa (g de biomasa/g sustrato
	SA	MC	SL	SA	MC	SL	SA	MC	SL	(75%) Agua	(2%) Lev.	(3%) Té		ºBrix	pH	ºBrix	pH	Biomasa 1	Biomasa 2	Fuente de carbono 1	Fuente de carbono 2	
T1	1	0	0	15	5	0	150	50	0	750	20	30	1000	18	5	15	1.5	127	1132	200	166.7	30.08
T2	0	1	0	10	10	0	100	100	0	750	20	30	1000	16.5	5	12	2.5	129	1121	200	145.5	18.09
T3	0	0	1	10	5	5	100	50	50	750	20	30	1000	16	5	12	2	120	925	200	150.0	16.05
T4	1/2	1/2	0	12.5	7.5	0	125	75	0	750	20	30	1000	17	5	13	2	125	932	200	152.9	17.07
T5	1/2	0	1/2	12.5	5	2.5	125	50	25	750	20	30	1000	17	5	13	2	124	826	200	152.9	14.46
T6	0	1/2	1/2	10	7.5	2.5	100	75	25	750	20	30	1000	16	5	12	3	127	814	200	150.0	13.37
T7	1/3	1/3	1/3	11.6	6.6	1.66	116	66	16.6	750	20	30	998.6	16	5	13	2.5	125	921	198.6	161.4	21.19
T8	2/3	1/6	1/6	13.3	5.83	0.83	133	58.3	8.3	750	20	30	999.6	16	5	13	2	124	1029	199.6	162.2	24.09
T9	1/6	2/3	1/6	10.8	8.33	0.83	108	83.3	8.3	750	20	30	999.6	17	5	12.5	2	123	1109	199.6	146.8	18.33
T10	1/6	1/6	2/3	10.83	5.83	3.3	108.3	58.3	33	750	20	30	999.6	16	5	13	2.5	125	930	199.6	162.2	21.25

ANEXO 2

PANEL FOTOGRÁFICO DEL PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE MUCILAGO DE CACAO



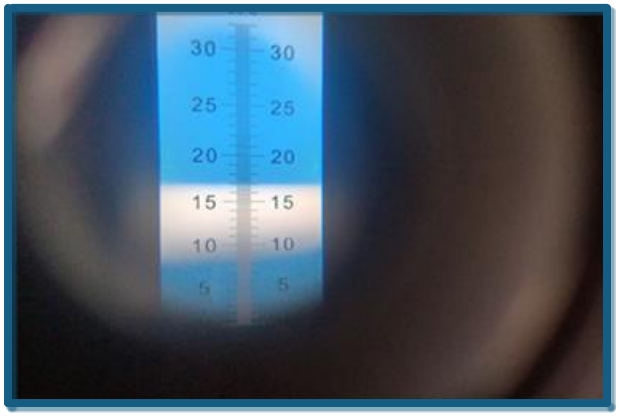
Fotografía 2.1: Recepción de mucilago de cacao en el laboratorio de procesos agroindustriales UNSCH



Fotografía 2.2: Extracción del mucilago de cacao



Fotografía 2.3: Mucilago de cacao filtrado y pasteurizado para formular los tratamientos



Fotografía 2.4: Grados Brix del mucilago de cacao

ANEXO 3

PANEL FOTOGRÁFICO DEL PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE SUERO DE LECHE EN POLVO



Fotografía 3.1 Recepción del suero de leche en la fabricación de queso andino con renina (Quinosina)



Fotografía 3.2: Atomización del suero de la leche dulce, laboratorio de transferencia de masa UNSCH

ANEXO 4

NORMA TÉCNICA PERUANA NTP 241.023

TABLA 3 - Requisitos y métodos de ensayo para el forro

Características	Requisito	Método de ensayo
Resistencia al desgarro	Mínimo 30 N[1)]	NTP ISO 3377-2
Permeabilidad al vapor de agua (WVP) y Absorción al vapor de agua (WVA)	WVP mayor o igual a 2,0 mg/cm^2.h Si WVP del empeine es menor a 0,8 mg/cm^2.h , entonces el WVA del forro debe ser mínimo 8,0 mg/cm^2 .	ISO 17699
Resistencia a la abrasión	sin formación de orificios en la superficie de uso a los siguientes números de ciclos: - Seco: Mayor o igual a 25 600 ciclos - Húmedo: Mayor o igual a 12 800 ciclos	NTP ISO 20344. Apartado 6.12
Solidez del color al frote	Método A: Descarga Mínimo 3 (escala de grises) después de 50 ciclos con solución de sudor artificial. Mínimo 3 (escala de grises) después de 150 ciclos en seco y 50 ciclos en húmedo.	NTP ISO 17700
Solidez del color al sudor	Mínimo 3	NTP ISO 11641
Resistencia a la flexión	En seco 15 000 ciclos sin daño visible	NTP ISO 17694
pH (Acidez)	pH mínimo 3,5 en cuero [2)]	NTP ISO 4045
Contenido en sustancias solubles en agua	Materiales solubles en agua máximo 16% Cenizas sulfatadas solubles en agua máximo 1,5% (en el ensayo no es necesario para algunos materiales de forro)[3)]	NTP SO 20869

1) En el caso de tejidos, se puede aumentar el tamaño de la probeta para facilitar el desgarro.
2) Si pH < 4,0, índice de diferencia ≤ 0,7.
3) Este requisito se considera esencial para el cuero

NOTAS:
a) Se consideran ensayos imprescindibles los resaltados en negritas
b) Los otros ensayos que se listan pueden ser requeridos cuando apliquen dependiendo del modelo y materiales empleados.

© INDECOPI 2014 – Todos los derechos son reservados

ANEXO 5

INFORME DE ENSAYO Nº 033-01/2022/LAB/CITEccal

Rímac, 22 de febrero de 2022

1. DATOS DEL SOLICITANTE:

Nombre:	VELASQUEZ CCOSI PERCY FERMIN
Domicilio Legal:	Asociación Los Olivos Mz A Lote 18. San Juan Bautista. Huamanga.
Teléfono:	966189951
Correo electrónico:	percy.velasquez@unsch.edu.pe
Objetivo del ensayo:	Investigación "Efecto del medio y condiciones de cultivo en el rendimiento y calidad de celulosa para la obtención de cuero biológico"

2. DATOS DE LA MUESTRA

Nombre del Producto: Material polimérico

Identificación y descripción de la muestra:

Una pieza, color marrón. De 39 cm x 28 cm aproximadamente. **La muestra es identificada por el cliente como "PT (T6)"**.



3.LUGAR Y FECHA DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA: Laboratorio de CITEccal - Av. Caquetá N° 1300. Rimac, 18 de febrero de 2022

4. FECHA DE LOS ENSAYOS: 22 de febrero de 2022

5.LOCALIZACION DE LA ZONA DE TOMA DE MUESTRA: No aplica

6.ENSAYOS

6.1 Determinación de la resistencia a la tracción:

Condiciones ambientales del acondicionamiento de la muestra:

Humedad relativa: 50 ± 5%
Temperatura: 23 ± 2°C
Tiempo de acondicionamiento: 48 horas (se reportan 48 horas de acondicionamiento antes del ensayo)

Condiciones ambientales del ensayo:

Temperatura ambiental: 23 ± 2°C
Humedad relativa ambiental: 50 ± 5%

Resultados

Materia polimérico

Número de probetas ensayadas	Sentido	Espesor (mm)	Fuerza de tracción (N/mm^2)	Fuerza de tracción promedio (N/mm^2)
3	A	0,58	22,61	23,12
3	B	0,41	23,64	

Observaciones:
La muestra es una pieza procedente de un material polimérico, se desconoce el sentido; por lo cual se designa A y B (B es perpendicular al A)

6.2 Determinación del porcentaje de elongación:

Condiciones ambientales del acondicionamiento de la muestra:

Humedad relativa: 50 ± 5%
Temperatura: 23 ± 2°C
Tiempo de acondicionamiento: 48 horas (se reportan 48 horas de acondicionamiento antes del ensayo)

Condiciones ambientales del ensayo:

Temperatura ambiental: 23 ± 2°C
Humedad relativa ambiental: 50 ± 5%

Resultados

Materia polimérico

Número de probetas ensayadas	Sentido	Porcentaje de elongación (%)	Porcentaje de elongación promedio (%)
3	A	11,41	9,45
3	B	7,50	

Observaciones:

La muestra es una pieza procedente de un material polimérico, se desconoce el sentido; por lo cual se designa A y B (B es perpendicular al A)

Nota:

Se le indica al cliente que la norma NTP ISO 3376:2012. Cuero. Ensayos físicos y mecánicos. Determinación de la resistencia a la tracción y del porcentaje de alargamiento, no aplica para este tipo de material; pero aún así solicita que se realice con dicho método de ensayo.

Métodos de ensayo:

1. NTP ISO 3376:2012. CUERO. Ensayos físicos y mecánicos. Detemrinación de la resistencia a la tracción y del porcentaje de alargamiento.

2. NTP ISO 2419 2016. CUERO. Ensayos físicos y mecánicos. Preparación y acondicionamiento de muestras.

Lic. Maria Luz Meneses Begazo
CQP 991
Unidad de Laboratorio de
CITEccal

PRESCRIPCIONES

1. CITEccal responde únicamente por los resultados consignados en este informe, los cuales se refieren exclusivamente a los materiales o muestras que se indican en el mismo y que quedan en su poder.

2. Salvo mención expresa las muestras para ensayos, han sido elegidas y enviadas al laboratorio por el solicitante.

3.Ninguna de las indicaciones formuladas en este informe pueden tener el carácter de garantía para las marcas comerciales que en su caso se citen.

4.Generalmente cuando el cliente proporcione la cantidad adecuada de muestra, y salvo indicación expresa, los materiales de ensayo se conservarán tres meses después de su utilización y tras este plazo, no se podrán realizar comprobaciones.

5.Los resultados se consideran como propiedad del solicitante y sin autorización previa, CITEccal se abstendrá de comunicarlo a un tercero. Sin embargo, pasado un mes de la entrega del informe, CITEccal podrá publicar los resultados con fines estadísticos o científicos, manteniendo siempre la confidencialidad del solicitante.

6. CITEccal no se hace responsable en ningún caso, de la interpretación o uso indebido que pueda hacerse de este documento.

7. La reproducción total o parcial de este documento sin la autorización escrita de CITEccal está totalmente prohibida.

8. Ante posibles discrepancias en los resultados, se procederá a una comprobación, siempre y cuando el cliente proporcione la cantidad adecuada de muestra.

9. Los resultados de los informes de ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce.

ANEXO 6

INFORME DE ENSAYO Nº 033-02/2022/LAB/CITEccal

Rímac, 22 de febrero de 2022

1. DATOS DEL SOLICITANTE:

Nombre:	VELASQUEZ CCOSI PERCY FERMIN
Domicilio Legal:	Asociación Los Olivos Mz A Lote 18. San Juan Bautista. Huamanga.
Teléfono:	966189951
Correo electrónico:	percy.velasquez@unsch.edu.pe
Objetivo del ensayo:	Investigación "Efecto del medio y condiciones de cultivo en el rendimiento y calidad de celulosa para la obtención de cuero biológico"

2. DATOS DE LA MUESTRA

Nombre del Producto: Material polimérico

Identificación y descripción de la muestra:

Una pieza, color marrón. De 37,5 cm x 28,5 cm aproximadamente. **La muestra es identificada por el cliente como "T-GL (T4)"**.



3.LUGAR Y FECHA DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA: Laboratorio de CITEccal - Av. Caquetá N° 1300. Rimac, 18 de febrero de 2022

4. FECHA DE LOS ENSAYOS: 22 de febrero de 2022

5.LOCALIZACION DE LA ZONA DE TOMA DE MUESTRA: No aplica

6.ENSAYOS

6.1 Determinación de la resistencia a la tracción:

Condiciones ambientales del acondicionamiento de la muestra:

Humedad relativa: 50 ± 5%
Temperatura: 23 ± 2°C
Tiempo de acondicionamiento: 48 horas (se reportan 48 horas de acondicionamiento antes del ensayo)

Condiciones ambientales del ensayo:

Temperatura ambiental: 23 ± 2°C
Humedad relativa ambiental: 50 ± 5%

Resultados

Materia polimérico

Número de probetas ensayadas	Sentido	Espesor (mm)	Fuerza de tracción (N/mm^2)	Fuerza de tracción promedio (N/mm^2)
3	A	0,32	21,28	20,46
3	B	0,32	19,63	

Observaciones:
La muestra es una pieza procedente de un material polimérico, se desconoce el sentido; por lo cual se designa A y B (B es perpendicular al A)

6.2 Determinación del porcentaje de elongación:

Condiciones ambientales del acondicionamiento de la muestra:

Humedad relativa: 50 ± 5%
Temperatura: 23 ± 2°C
Tiempo de acondicionamiento: 48 horas (se reportan 48 horas de acondicionamiento antes del ensayo)

Condiciones ambientales del ensayo:

Temperatura ambiental: 23 ± 2°C
Humedad relativa ambiental: 50 ± 5%

Resultados

Materia polimérico

Número de probetas ensayadas	Sentido	Porcentaje de elongación (%)	Porcentaje de elongación promedio (%)
3	A	16,27	17,22
3	B	18,17	

Observaciones:

La muestra es una pieza procedente de un material polimérico, se desconoce el sentido; por lo cual se designa A y B (B es perpendicular al A)

Nota:

Se le indica al cliente que la norma NTP ISO 3376:2012. Cuero. Ensayos físicos y mecánicos. Determinación de la resistencia a la tracción y del porcentaje de alargamiento, no aplica para este tipo de material; pero aún así solicita que se realice con dicho método de ensayo.

Métodos de ensayo:

1. NTP ISO 3376:2012. CUERO. Ensayos físicos y mecánicos. Detemrinación de la resistencia a la tracción y del porcentaje de alargamiento.

2. NTP ISO 2419 2016. CUERO. Ensayos físicos y mecánicos. Preparación y acondicionamiento de muestras.

Lic. Maria Luz Meneses Begazo
CQP 991
Unidad de Laboratorio de
CITEccal

PRESCRIPCIONES

1. CITEccal responde únicamente por los resultados consignados en este informe, los cuales se refieren exclusivamente a los materiales o muestras que se indican en el mismo y que quedan en su poder.

2. Salvo mención expresa las muestras para ensayos, han sido elegidas y enviadas al laboratorio por el solicitante.

3.Ninguna de las indicaciones formuladas en este informe pueden tener el carácter de garantía para las marcas comerciales que en su caso se citen.

4.Generalmente cuando el cliente proporcione la cantidad adecuada de muestra, y salvo indicación expresa, los materiales de ensayo se conservarán tres meses después de su utilización y tras este plazo, no se podrán realizar comprobaciones.

5.Los resultados se consideran como propiedad del solicitante y sin autorización previa, CITEccal se abstendrá de comunicarlo a un tercero. Sin embargo, pasado un mes de la entrega del informe, CITEccal podrá publicar los resultados con fines estadísticos o científicos, manteniendo siempre la confidencialidad del solicitante.

6. CITEccal no se hace responsable en ningún caso, de la interpretación o uso indebido que pueda hacerse de este documento.

7. La reproducción total o parcial de este documento sin la autorización escrita de CITEccal está totalmente prohibida.

8. Ante posibles discrepancias en los resultados, se procederá a una comprobación, siempre y cuando el cliente proporcione la cantidad adecuada de muestra.

9. Los resultados de los informes de ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce.

ANEXO 7

NORMA TÉCNICA PERUANA

NTP-ISO 3376 2012 (revisada el 2017)

Dirección de Normalización - INACAL
Calle Las Camelias 817, San Isidro (Lima 27) Lima, Perú

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Cuero. Ensayos físicos y mecánicos. Determinación de la resistencia a la tracción y del porcentaje de alargamiento

Leather. Physical and mechanical tests. Determination of tensile strength and percentage extension.

(EQV. ISO 3376:2011 Leather – Physical and mechanical tests – Determination of tensile strength and percentage extension)

2017-04-12
3ª Edición

R.D. N° 013-2017-INACAL/DN. Publicada el 2017-04-25 Precio basado en 09 páginas
I.C.S.: 59.140.30 ESTA NORMA ES RECOMENDABLE
Descriptores: Cuero, ensayo físico, ensayo mecánico, resistencia a la tracción, alargamiento.

© ISO 2011 - © INACAL 2017

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

© ISO 2011

Todos los derechos son reservados. A menos que se especifique lo contrario, ninguna parte de esta publicación podrá ser reproducida o utilizada por cualquier medio, electrónico o mecánico, incluyendo fotocopia o publicándolo en el Internet o intranet, sin permiso por escrito del INACAL, único representante de la ISO en territorio peruano.

© INACAL 2017

Todos los derechos son reservados. A menos que se especifique lo contrario, ninguna parte de esta publicación podrá ser reproducida o utilizada por cualquier medio, electrónico o mecánico, incluyendo fotocopia o publicándolo en el internet o intranet, sin permiso por escrito del INACAL.

INACAL

Calle Las Camelias 817, San Isidro
Lima - Perú
Tel.: +51 1 640-8820
administracion@inacal.gob.pe
www.inacal.gob.pe

ÍNDICE

		página
	ÍNDICE	ii
	PRÓLOGO (de revisión 2017)	iii
	PREFACIO	v
1	OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN	1
2	REFERENCIAS NORMATIVAS	1
3	PRINCIPIO DEL MÉTODO	2
4	APARATOS	2
5	TOMA Y PREPARACIÓN DE MUESTRA	4
6	PROCEDIMIENTO OPERATORIO	4
7	EXPRESIÓN DE RESULTADOS	6
8	INFORME DEL ENSAYO	8

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

© ISO 2011 - © INACAL 2017 - Todos los derechos son reservados

PRÓLOGO
(de revisión 2017)

A.1 La Norma Técnica Peruana (NTP) **NTP-ISO 3376:2012 CUERO. Ensayos físicos y mecánicos. Determinación de la resistencia a la tracción y del porcentaje de alargamiento,** 3ª Edición, se encuentra incluida en el programa de actualización de Normas Técnicas Peruanas que cumplieron 05 años de vigencia.

A.2 La NTP referida, aprobada mediante resolución N° 0092-2012/CNB-INDECOPI, fue revisada por el Comité Técnico de Normalización (CTN) de Cuero, calzado y derivados, y puesta a consulta pública por un periodo de 30 días calendario. No recibió observaciones por parte de los representantes de los sectores involucrados: producción, consumo y técnico.

A.3 El CTN de Cuero, calzado y derivados, recomendó mantener la vigencia de la NTP y la Dirección de Normalización (DN), procedió a mantener su vigencia, previa revisión final, aprobando la versión revisada el 12 de abril de 2017.

NOTA: Cabe resaltar que la revisión de la presente NTP se ha realizado con el objetivo de determinar su vigencia, más no su actualización.

A.4 Los métodos de ensayo y de muestreo cambian periódicamente con el avance de la técnica. Por lo cual, recomendamos consultar en el Centro de Información y Documentación del INACAL, la vigencia de los métodos de ensayo y de muestreo citados en esta NTP.

A.5 La presente Norma Técnica Peruana reemplaza a la NTP-ISO 3376:2012 CUERO. Ensayos físicos y mecánicos. Determinación de la resistencia a la tracción y del porcentaje de alargamiento, 3ª Edición.

B. INSTITUCIONES MIEMBROS DEL CTN DE CUERO, CALZADO Y DERIVADOS

Secretaría	CITEccal
Presidente	Oscar Genaro Chunga Pingo

© ISO 2011 - © INACAL 2017 - Todos los derechos son reservados

Secretario	Maria Luz Meneses Begazo

ENTIDAD	**REPRESENTANTE**
CITEccal	Adriana Ríos Vasquez Abdón Segundo Espada
PRODUCE	Luis Guerrero Aquije
COLEGIO DE INGENIEROS DEL PERU	Gladys Conza Blanco
HULES PERUANOS S. A. C.	Celia Arias Portal
JUAN LENG DELGADO S. A. C.	Jaime Legua Yactayo
POLI SHOES S. A. C.	Luis Felipe Velásquez Coya
SGS DEL PERÚ S.A.C.	Norma Roldán Tello
NSF INASSA S.A.C.	Hugo Zarate Pamo Ana Chamorro Bohorquez
CONSULTOR	Carlos Chávez Mendoza
CONSULTOR	Dante Chumpitaz Prado
CONSULTOR	Liliana Maylle Astocondor

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

© ISO 2011 - © INACAL 2017 - Todos los derechos son reservados

PREFACIO

A. RESEÑA HISTÓRICA

A.1 La presente Norma Técnica Peruana ha sido elaborada por el Comité Técnico de Normalización de Cuero, Calzado y Derivados, mediante el Sistema 1 o de Adopción, durante el mes de junio de 2012, utilizando como antecedente a la norma ISO 3376:2011: Leather – Physical and mechanical tests – Determination of tensile strength and percentage extension .

A.2 El Comité Técnico de Normalización de Cuero, Calzado y Derivados, presentó a la Comisión de Normalización y de Fiscalización de Barreras Comerciales no Arancelarias –CNB-, con fecha 2012-07-02, el PNTP ISO 3376:2012, para su revisión y aprobación, siendo sometido a la etapa de discusión pública el 2012-08-25. No habiéndose presentado observaciones fue oficializada como Norma Técnica Peruana **NTP-ISO 3376:2012 CUERO. Ensayos físicos y mecánicos. Determinación de la resistencia a la tracción y del porcentaje de alargamiento,** 3ª Edición, el 31 de octubre de 2012.

A.3 Esta Norma Técnica Peruana reemplaza a la norma NTP-ISO 3376:2007. La presente Norma Técnica Peruana presenta cambios editoriales referidos principalmente a terminología empleada propia del idioma español y ha sido estructurado de acuerdo a las Guías Peruanas GP 001:1995 y GP 002:1995

B. INSTITUCIONES QUE PARTICIPARON EN LA ELABORACIÓN DE LA NORMA TÉCNICA PERUANA

Secretaría	CITEccal
Presidente	Oscar Genaro Chunga Pingo
Secretario	Maria Luz Meneses Begazo

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

© ISO 2011 - © INACAL 2017 - Todos los derechos son reservados

ENTIDAD	REPRESENTANTE
CITEccal	Adriana Ríos de Horna
CITEccal	Abdón Segundo Espada
PRODUCE	Luis Guerrero Aquije
PROMPERÚ	Carmen Huapaya Huapaya
APEQTIC	Freddy Juro Helvert Vera
ASPEC	Teofilo Armando Blas Neyra
HULES PERUANOS S.A.C.	Celia Aurora Arias Portal
INDUSTRIAL ZAYMA S.A.C.	Luis Meza Martínez
CONSULTOR	Carlos Chávez Mendoza
CONSULTOR	Dante Chumpitaz Prado

---oooOooo---

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

© ISO 2011 - © INACAL 2017 - Todos los derechos son reservados

Cuero. Ensayos físicos y mecánicos. Determinación de la resistencia a la tracción y del porcentaje de alargamiento

1 OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta Norma Técnica Peruana especifica un método de ensayo para determinar la resistencia a la tracción, el alargamiento bajo una carga especificada y el alargamiento a la rotura del cuero. Este método es aplicable a todos los tipos de cuero.

2 REFERENCIAS NORMATIVAS

Las siguientes normas contienen disposiciones que al ser citadas en este texto, constituyen requisitos de esta Norma Técnica Peruana. Las ediciones indicadas estaban en vigencia en el momento de esta publicación. Estas referencias normativas se citan en los lugares apropiados del texto de la norma y se relacionan a continuación. Para las referencias con fecha, no son aplicables las revisiones o modificaciones posteriores de ninguna de las publicaciones. Para las referencias sin fecha, se aplica la edición en vigor del documento normativo al que se haga referencia (incluyendo sus modificaciones). El Organismo Peruano de Normalización posee la información de las Normas Técnicas Peruanas en vigencia en todo momento.

2.1 Normas Técnicas Internacionales

2.1.1	ISO 2418*	Cuero. Ensayos químicos, físicos, mecánicos y de solidez. Localización de la zona de toma de muestras
2.1.2	ISO 2419**	Cuero. Ensayos físicos y mecánicos. Preparación y acondicionamiento de muestras

* La NTP-ISO 2418 es equivalente a la ISO 2418
** La NTP-ISO 2419 es equivalente a la ISO 2419
*** La NTP-ISO 2589 es equivalente a la ISO 2589

© ISO 2011 - © INACAL 2017 - Todos los derechos son reservados

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

2.1.3	ISO 2589***	Cuero. Ensayos físicos y mecánicos. Determinación del espesor
2.1.4	ISO 7500-1	Materiales metálicos. Verificación de máquinas de ensayos uniaxiales estáticos. Parte 1: Máquinas de ensayo de tracción/compresión. Verificación y calibración del sistema de medida de fuerza

3 PRINCIPIO DEL MÉTODO

Una probeta es estirada a una velocidad especificada hasta que la fuerza alcanza un valor predeterminado o hasta que la probeta se rompe.

4 APARATOS

4.1 **Dinamómetro**, con:

- un intervalo de fuerza adecuado a la muestra que se va a ensayar;
- un dispositivo para registrar la fuerza con una precisión de al menos 2 % , tal y como se especifica en la clase 2 de la Norma ISO 7500-1;
- una velocidad de separación entre las mordazas uniforme de 100 mm/min ± 20 mm/min;
- un medio para registrar la fuerza, por ejemplo, una curva de alargamiento;
- mordazas, con una longitud mínima de 45 mm en la dirección en la que se aplica la carga, diseñadas para mantener un sujeción constante por medios mecánicos o neumáticos. La textura y el diseño de las caras internas de las mordazas deben ser tales, que con la carga máxima aplicada en el ensayo, la muestra no deslice de ninguna de las mordazas en una cantidad que exceda el 1 % de la separación original entre las mordazas.

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

© ISO 2011 - © INACAL 2017 - Todos los derechos son reservados

4.2 **Dispositivo para determinar el alargamiento de la probeta**, controlando la separación de las mordazas o por sensores que controlen la separación de dos puntos fijos en la pieza de ensayo.

4.3 **Micrómetro**, como se especifica en la Norma ISO 2589.

4.4 **Troqueles**, como se especifican en la Norma ISO 2419, capaces de cortar una probeta como la que se muestra en la figura 1, con las dimensiones que se dan en la tabla 1.

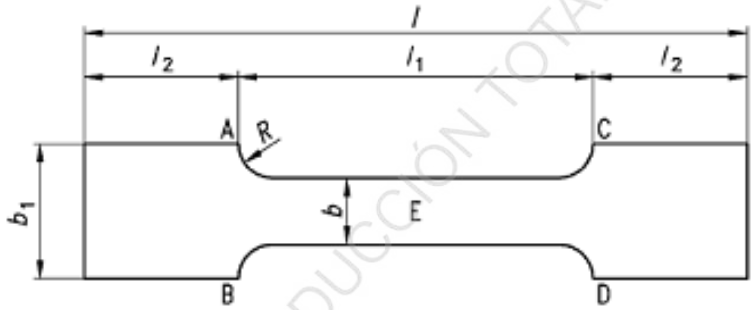


FIGURA 1 - Forma de la probeta

TABLA 1 − Medidas de las probetas

Medidas en milimetros

Denominación	l	l_1	l_2	b	b_1	R
Normal	110	50	30	10	20	5
Grande	190	100	45	20	40	10

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

© ISO 2011 - © INACAL 2017 - Todos los derechos son reservados

4.5 **Pie de rey**, con una precisión de lectura de 0,1 mm.

5 TOMA Y PREPARACIÓN DE MUESTRA

5.1 Se realiza la toma de muestra de acuerdo con la Norma ISO 2418.

5.2 Se cortan seis probetas de la muestra de acuerdo con la Norma ISO 2419 aplicando un troquel (véase 4.4) por el lado flor, tres probetas con los lados más largos paralelos al espinazo y tres probetas con los lados más largos perpendiculares al espinazo. Si en ensayos anteriores se ha producido un deslizamiento de la probeta en las mordazas, se utiliza el troquel grande (véase 4.4).

Si es necesario ensayar más de dos pieles en un lote, sólo se necesita tomar una probeta en cada dirección de cada una de las pieles, siempre que el total no sea inferior a tres probetas en cada dirección.

5.3 Se acondicionan las probetas de acuerdo con la Norma ISO 2419.

6 PROCEDIMIENTO OPERATORIO

6.1 Determinación de dimensiones

6.1.1 Mediante el pie de rey (véase 4.5) se mide la anchura de cada probeta con una aproximación de 0,1 mm en tres posiciones sobre el lado flor, y en tres sobre el lado carne. En cada grupo de tres mediciones, se toma una en el punto medio E (como se muestra en la figura 1) y las otras dos en puntos situados aproximadamente entre el punto medio E y las líneas AB y CD. Se toma la media aritmética de las seis mediciones como la anchura de la probeta, *w*. Para cueros blandos ("flexibles"), la anchura se puede tomar como la anchura del troquel.

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

© ISO 2011 - © INACAL 2017 - Todos los derechos son reservados

6.1.2 Se mide el espesor de cada probeta de acuerdo con la Norma ISO 2589. Se realizan las mediciones en tres puntos, en el punto medio E, y en dos puntos situados aproximadamente entre el punto medio E y las líneas AB y CD. Se toma la media aritmética de las tres mediciones como el espesor de la probeta, *t*.

6.2 Determinación de la resistencia a la tracción

6.2.1 Se sitúan las mordazas del dinamómetro (véase el apartado 4.1) separadas entre sí unos 50 mm ± 1 mm en el caso de utilizar la probeta normal o a 100 mm si se utiliza la probeta grande. Se coloca la probeta en las mordazas de forma que los bordes de las mordazas se sitúen a lo largo de las líneas AB y CD. Una vez que se ha situado la probeta, hay que asegurarse de que el lado flor está situado en un plano.

6.2.2 Se pone en marcha el dinamómetro hasta que se rompe la probeta y se registra la fuerza máxima ejercida como la fuerza de rotura, *F*.

6.3 Determinación del porcentaje de alargamiento producido por una carga determinada

6.3.1 Se coloca la probeta entre las mordazas del dinamómetro como se describe en el apartado 6.2.1. Se mide la distancia entre las mordazas con una aproximación de 0,5 mm y se anota esta distancia, L_0, como la longitud inicial de la probeta.

6.3.2 Se pone en marcha el dinamómetro. A menos que el aparato registre automáticamente una curva de fuerza/alargamiento con la exactitud necesaria (4.2), se mide la distancia entre las mordazas o los sensores, a medida que aumenta la fuerza.

6.3.3 Se anota la distancia entre las mordazas o los sensores en el momento en el que la fuerza alcanza por primera vez el valor especificado. Se anota esta distancia como la longitud de la probeta a esta fuerza, L_1. Si es necesario obtener los resultados de los procedimientos descritos en los apartados 6.2 o 6.4 no se debe parar el dinamómetro.

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

© ISO 2011 - © INACAL 2017 - Todos los derechos son reservados

6.4 Determinación del porcentaje de alargamiento a la rotura

6.4.1 Se realizan los pasos descritos en el apartado 6.3.1.

6.4.2 Se pone en marcha el dinamómetro hasta que se rompa la probeta.

6.4.3 Se anota la distancia entre las mordazas o los sensores en el instante en que se produce la rotura de la probeta.

Se anota la distancia como la longitud de la probeta en la rotura, L_2.

6.5 Deslizamiento

Si se produce un deslizamiento de la probeta en cualquiera de las mordazas al realizar el ensayo según los apartados 6.2, 6.3 o 6.4, y el deslizamiento es superior al 1 % de la separación inicial entre las mordazas, se rechaza el resultado y se repite la determinación con una probeta nueva, cortada utilizando el troquel grande (véase 4.4).

7 EXPRESIÓN DE RESULTADOS

7.1 Resistencia a la tracción

La resistencia a la tracción, Tn, en MPa (o newtons por milímetro cuadrado, si se requiere), se calcula utilizando la ecuación:

$$T_n = \frac{F}{\bar{w} \cdot \bar{t}}$$

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

© ISO 2011 - © INACAL 2017 - Todos los derechos son reservados

donde

F es la fuerza máxima registrada, en newtons;

w es la anchura media de la probeta, en milímetros;

t es el espesor medio de la probeta, en milímetros.

NOTA: La relación entre MPa y N/mm^2 es la siguiente: 1 N/mm^2 = 1 MPa

7.2 Alargamiento producido por una carga determinada

El porcentaje de alargamiento producido por una carga determinada, *E*l, debe calcularse mediante la ecuación:

$$E_1 = \frac{L - L_0}{L_0} \times 100$$

donde

L_1 es la separación entre las mordazas o los sensores bajo una carga determinada;

L_0 es la separación inicial de las mordazas o los sensores.

7.3 Alargamiento a la rotura

El porcentaje de alargamiento a la rotura, E_b, debe calcularse utilizando la ecuación:

$$E_b = \frac{L_2 - L_0}{L_0} \times 100$$

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

© ISO 2011 - © INACAL 2017 - Todos los derechos son reservados

donde

L_2 es la separación entre las mordazas o los sensores en la rotura;

L_0 es la separación inicial entre las mordazas o los sensores.

8 INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir los siguientes datos:

a) referencia a esta norma, es decir, la Norma ISO 3376:2011[a)];

b) la resistencia a la tracción media, en MPa (o en newtons por milímetro cuadrado, si se requiere), con una precisión de 0,1 MPa, para las probetas con el borde mayor cortado en paralelo al espinazo;

c) la resistencia a la tracción media, en MPa (o en newtons por milímetro cuadrado, si se requiere), con una precisión de 0,1 MPa, para las probetas con el borde mayor cortado en perpendicular al espinazo;

d) el porcentaje de alargamiento medio a la rotura, con una precisión de 1 % , para las probetas con el borde mayor cortado en paralelo al espinazo;

e) el porcentaje de alargamiento medio a la rotura, con una precisión de 1 % , para las probetas con el borde mayor cortado en perpendicular al espinazo;

f) el porcentaje de alargamiento medio para una carga determinada, con una precisión de 1 % , para las probetas con el borde mayor cortado en paralelo al espinazo, si se requiere;

g) el porcentaje de alargamiento medio para una carga determinada, con una precisión de 1 % , para las probetas con el borde mayor cortado en perpendicular al espinazo, si se requiere;

h) el espesor de la muestra, en milímetros, conforme a la Norma ISO 2589;

i) cualquier desviación del método especificado en esta norma;

[a)] La NTP-ISO 3376:2012 es equivalente a la ISO 3376:2011

© ISO 2011 - © INACAL 2017 - Todos los derechos son reservados

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

j) todos los detalles de identificación de la muestra y cualquier desviación de la Norma ISO 2418 con respecto a la toma de muestra.

k) si se requiere, por el cliente o por las especificaciones, se permite indicar en el informe de ensayo los resultados descritos en los puntos l), m) y n) del capítulo 8 en lugar de los puntos desde el b) al g) del capítulo 8;

l) la resistencia a la tracción promedio, en MPa (o en newtons por milímetro cuadrado), con una precisión de 0,1 MPa [es decir, la media aritmética de los puntos b) y c)];

m) el porcentaje promedio de alargamiento a la rotura con una precisión del 1 % es decir, la media aritmética de los puntos d) y e)];

n) el porcentaje promedio de alargamiento para una carga determinada con una precisión del 1% es decir, la media aritmética de los puntos f) y g)], si se requiere;

o) la atmósfera normalizada utilizada para el acondicionamiento y el ensayo, tal y como se establece en la Norma ISO 2419.

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

© ISO 2011 - © INACAL 2017 - Todos los derechos son reservados