



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Estimación y efecto sobre la vida útil de Fresa (*Fragaria x ananassa*) con el uso de biofilm producido por *Komagataeibacter xylinus*

Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Jorge Luis Acosta Telenchana

Tutor: Lcdo. David Andrés Terán Mera, PhD.

Ambato – Ecuador

Mayo - 2019

APROBACIÓN DE TUTOR

Lcdo. David Andrés Terán Mera, PhD.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha ido prolijamente revisado. Por lo tanto autorizo la presente de este Trabajo de Titulación modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 11 de Abril de 2019



Lcdo. David Andrés Terán Mera, PhD.

C.I: 171656972-6

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Acosta Telenchana Jorge Luis, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniero en Alimentos son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas.



Acosta Telenchana Jorge Luis


C.I. 180440750-8

AUTOR

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

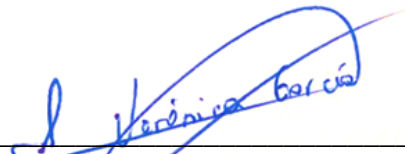


Presidente del tribunal



Ing. Liliana Alexandra Cerda Mejía Ph.D.

C.I. 180414808-6



Ing. Verónica Alejandra García Ibarra Ph.D.

C.I. 171472560-1

Ambato, 08 de Mayo de 2019

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo su reproducción parcial o total dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Acosta Telenchana Jorge Luis

C.I. 180440750-8

AUTOR

DEDICATORIA

El presente trabajo de titulación está dedicado a:

A Dios que con sus bendiciones no permitió desfallecer en este arduo camino permitiéndome día a día lograr mis metas propuestas.

A mis padres Gustavo y Blanca que han sido mi apoyo incondicional en toda mi carrera estudiantil, que con su inmenso amor, fortaleza, comprensión, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a culminar una meta de las muchas que tendré en la vida. Gracias por inculcar en mí el trabajo, esfuerzo y valentía. Son mi orgullo y tengo el privilegio de llamarlos padres.

A mis hermanos Adriana y Marlon por su amor, cariño y apoyo en todo momento. A toda mis familiares que con sus consejos, palabras y oraciones me hicieron una persona de bien y son acompañantes en mis metas y sueños.

A mis amigos, compañeros y personas que me supieron extender su mano en los momentos más difíciles y por su amistad incondicional brindados en este camino profesional.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica de Ambato por permitirme realizar mis estudios y llegar a ser un profesional.

A los docentes de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos, por haber impartidos sus conocimientos a lo largo de la preparación de mi vida profesional y de manera especial, al Lcdo. David Terán Ph.D. tutor de mi proyecto de investigación, a la Ing. Liliana Cerda Ph.D. e Ing. Verónica García Ph.D. en calidad de calificadoras de mi trabajo, quienes en conjunto me ha guiado con sus conocimientos, asesoramientos, pensamientos, paciencia, tiempo, y dedicación en el desarrollo de la investigación.

A el Dr. Alexis Debut, PhD. por las contribuciones realizadas a nuestro trabajo en el área de microscopía electrónica de barrido SEM, que fueron de gran importancia para el desarrollo de la investigación.

Al proyecto CANJE DE DEUDA de la Universidad Técnica de Ambato, por permitirme la utilización de sus amplia gama de equipos en el que se desarrolló la mayor parte de la investigación.

A mis padres por ser mi pilar fundamental en la carrera y haberme apoyado en todo momento, pese a los problemas, adversidades e inconvenientes que se presentaron en este arduo camino.

Gracias a todos

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DE TUTOR	i
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	ii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO	iii
DERECHOS DE AUTOR	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN EJECUTIVO	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPITULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes Investigativos.....	1
1.2. Objetivos	3
1.2.1. Objetivo General	3
1.2.2. Objetivos Específicos	3
1.3. Hipótesis.....	3
1.3.1. Hipótesis nula	3

1.3.2.	Hipótesis alternativa	3
1.4.	Señalamiento de variables de la hipótesis	4
1.4.1.	Variable independiente	4
1.4.2.	Variable dependiente	4
	METODOLOGÍA	5
2.1.	Materiales	5
2.1.1.	Fresa (<i>Fragaria x ananassa</i>)	5
2.1.2.	<i>Komagataeibacter xylinus</i>	5
2.2.	Métodos.....	5
2.2.1.	Producción de Celulosa Bacteriana y conservación de cepa bacteriana	5
2.2.1.1.	Medio caldo de cultivo H-S	6
2.2.1.2.	Medio de cultivo H-S Solido	6
2.2.1.3.	Lavado de biofilms de Celulosa Bacteriana	6
2.2.1.4.	Almacenamiento de Biofilms de CB	7
2.2.1.5.	Aplicación de CB a Fresas (<i>Fragaria x ananassa</i>).....	7
2.3.	Análisis Microbiológicos y Físico-Químicos.	7
2.3.1.	Vida Útil	7
2.3.2.	Perdida de peso, °Brix, pH y acidez titulable por Ultracongelación	8
2.3.3.	Impregnacion de nano particulas de Plata en biofilms de CB.....	9
2.3.4.	Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	9
2.4.	Cuantificación de azúcares reductores consumido por <i>K. Xylinus</i>	9

2.5.	Elaboración de un contenedor para mermelada usando como base de CB.....	10
2.6.	Diseño experimental.....	11
2.7.	Análisis Estadístico	11
CAPITULO III.....		12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		12
3.1.	Vida Útil de fresa	13
3.2.	Análisis fisicoquímicos de fresas en ultracongelación.....	17
3.2.1.	pH y Acidez.....	17
3.2.2.	Sólidos solubles (° Brix).....	19
3.2.3.	Pérdida de peso durante periodo de almacenamiento a ultracongelación ...	19
3.3.	Impregnación de nanopartículas de plata en biofilm de Celulosa Bacteriana	20
3.4.	Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).....	22
3.5.	Cuantificación de azúcares reductores consumido por <i>K. Xylinus</i>	24
3.6.	Utilización de CB como contenedor para mermelada de Frutilla.....	25
3.7.	Verificación de hipótesis.....	27
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		28
4.1.	Conclusiones	28
4.2.	Recomendaciones.....	29
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		30
ANEXOS.....		38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del medio de caldo de cultivo H-S propuesta por (Hestrin & Schramm, 1954)	6
Tabla 2. Tratamientos de la combinación de factores y niveles	11
Tabla 3. Determinación de tiempo de vida útil de fresa con y sin recubrimiento de Celulosa bacteriana	14
Tabla 4. Prueba no paramétrica de Friedman para Aerobio Mesófilos (ANOVA)...	16
Tabla 5. Prueba no paramétrica de Friedman para Mohos y levaduras (ANOVA) ..	16
Tabla 6. Análisis Fisicoquímico (pH, % de ácido cítrico y ° Brix) de fresas almacenadas en condiciones de ultracongelación (-80° C).....	18
Tabla 7. Pérdida de peso en fresa.....	20
Tabla 8. Porcentaje de pérdida de peso en mermelada de fresa.....	25
Anexo 2 . Parámetros de pH y ° Brix en muestras de fresa durante el proceso de ultracongelación	39
Anexo 3. Determinación de concentración de glucosa por método DNS.....	40
Anexo 4. Conteo de aerobios mesófilos, mohos y levaduras en muestras de fresa..	41
Anexo 5. Determinación de orden de reacción en fresa sin recubrimiento	43
Anexo 6. Determinación de orden de reacción en fresa con recubrimiento.	44
Anexo 7. Pérdida de peso en mermelada de fresa durante 18 días de estudio.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fresas usadas en el estudio con estado de Madurez tipo 4. A) Fresa sin recubrimiento de Celulosa Bacteriana. B) Fresa con recubrimiento de Celulosa Bacteriana.	12
Figura 2. Fresas usadas en el estudio de vida útil. A1) Fresa sin recubrimiento al quinto día (4°C). A2) Fresa con recubrimiento de CB al quinto día (4°C). B1) Fresa sin recubrimiento al cuarto día (25°C; presencia de moho y deshidratación). B2) Fresa con recubrimiento de CB al cuarto día (25°C). C1) Fresa sin recubrimiento al tercer día (37°C; presencia de mohos y daños en estructura). C2) Fresa con recubrimiento de CB al tercer día (37°C; presencia de mohos).	15
Figura 3: Análisis estadístico de presencia de microorganismos. P1) Prueba de Paramétrica de Friedman en R para Aerobio mesófilos. P2) Determinación de los mejores tratamientos (Eta cuadrado) para Aerobio mesófilos.	16
Figura 4: Determinación de los mejores tratamientos (Eta cuadrado) para mohos y levaduras.	17
Figura 5. Recubrimiento de fresa con CB impregnada con Plata	21
Figura 6. A) Morfología de la celulosa bacteriana (Toscano, 2019) . B) Microfotografía SEM de celulosa bacteria impregnada con Ag. C) BSE de celulosa bacteria impregnada con Ag, flecha amarilla: partículas con contraste diferente...	22
Figura 7. M) Identificación de Ag+ por Mapping de las partículas observadas	23
Figura 8. A) XRD en muestra de celulosa bacteriana. B) XRD en muestra de celulosa bacteriana impregnada con Ag	23
Figura 9. Consumo de glucosa por K. Xylinus durante la formación de CB	24
Figura 10. T1) Color inicial de mermelada de fresa día 0. T2) Color final de mermelada de fresa contenida en empaque impregnado de gelatina natural día 18. T3) Color final de mermelada de fresa contenida en empaque sellado en los extremos con gelatina natural día 18.	26

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 % Ácido cítrico en muestras de fresa durante el proceso de ultracongelación	38
Anexo 2 . Parámetros de pH y ° Brix en muestras de fresa durante el proceso de ultracongelación	39
Anexo 6 . Determinación de orden de reacción en fresa con recubrimiento.	44
Anexo 7 . Pérdida de peso en mermelada de fresa durante 18 días de estudio.....	45
Anexo 8 . Siembra de <i>K. Xylinus</i> en medio HS	46
Anexo 9 . Producción de celulosa bacteriana	46
Anexo 10 . Lavado de Celulosa bacteriana.....	46
Anexo 11 . Biofilm de CB óptima para recubrimiento.....	46
Anexo 12 . Fresa con recubrimiento (izquierda) y sin recubrimiento (derecha) antes de tratamientos.	46
Anexo 13 . Recuento de aerobios mesófilos dilución 10^{-5} de muestra almacenada a 25°C.....	47
Anexo 14 . Recuento de mohos y levaduras dilución 10^{-5} de muestra almacenada a 4°C	47

RESUMEN EJECUTIVO

La fresa es susceptible a cambios fisiológico, gran vulnerabilidad a ataque microbiano, los beneficios de recubrimientos comestibles son: tasa de respiración lenta, períodos prolongados de almacenamiento, retención de la firmeza y crecimiento microbiano reducido, Por ello el objetivo del presente trabajo de investigación es estimar la vida útil de Fresa (*Fragaria x ananassa*) con el uso de biofilm producido por *Komagataeibacter xylinus*. Se determinó que las muestras con recubrimiento de celulosa bacteriana presentan un promedio de tiempo de vida útil de 12, 6 y 3 días mientras que muestras sin recubrimiento el tiempo fue 8, 3 y 2 días a temperaturas de 4, 25 y 37 °C. El análisis de ultra congelación evidenció cambios del 1 %; 46.2 %; 12.6 % y 2.41 % en muestras sin recubrimiento, por otro lado las muestras con recubrimiento los cambios fueron del 0.3%; 15.9 %; 4 % y 1.49% en pH, Acidez, °Brix y pérdida de peso respectivamente. Las muestras que contenían recubrimiento de celulosa bacteriana impregnada con nanopartículas de plata no presentaron crecimiento de microorganismos durante el análisis. El contenedor de celulosa bacteriana con impregnación de gelatina natural presentó un 15,3% de pérdida de peso, 76,4 °Brix y coloración final rojo oscuro en la muestra, el contenedor de celulosa bacteriana con sellamiento de extremos presento mayor pérdida de peso del 19,8%; 83,6 °Brix y un color final rojo oscuro medio.

Palabras claves: Celulosa Bacteriana, Fresa, Vida Útil de Alimentos, Recubrimiento Comestible, Nanopartículas de Plata

ABSTRACT

The strawberry is susceptible to physiological changes, great vulnerability to microbial attack, the benefits of edible coatings are: slow breathing rate, prolonged periods of storage, retention of firmness and reduced microbial growth, so the objective of this research work is estimate the useful life of strawberry (*Fragaria x ananassa*) with the use of biofilm produced by *Komagataeibacter xylinus*. It was determined that the samples with bacterial cellulose coating have an average life time of 12, 6 and 3 days while samples without coating the time was 8, 3 and 2 days at temperatures of 4, 25 and 37 °C. The ultra-freeze analysis showed changes of 1%; 46.2%; 12.6% and 2.41% in samples without coating, on the other hand the samples with coating changes were 0.3%; 15.9%; 4% and 1.49% in pH, Acidity, °Brix and weight loss respectively. The samples containing bacterial cellulose coating impregnated with silver nanoparticles showed no growth of microorganisms during the analysis. The container of bacterial cellulose impregnated with natural gelatin presented a 15.3% weight loss, 76.4 ° Brix and a dark red final coloration in the sample, the bacterial cellulose container with end seals presented greater weight loss of 19%. , 8%; 83.6 ° Brix and a medium dark red final color.

Keywords: Bacterial Cellulose, Strawberry, Food Life, Edible Coating, Silver Nanoparticles

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

La fresa (*Fragaria spp.*) pertenece a la familia de las *Rosáceas* en el género *Fragaria*, originaria de las regiones templadas del mundo (Sagarpa, 2017), una de las frutas más populares en todo el planeta, sobresale por su sabor único y deseable, es rica en vitaminas, polifenoles, aminoácidos y antocianinas. Las principales características relacionadas a la calidad de la fruta son la textura, sabor y color (**Paliyath et al., 2008**), debido a su metabolismo muy activo, la fresa es altamente perecedera y tiene alta actividad fisiológica post cosecha lo cual conlleva una corta maduración y senescencia, produciéndose el envejecimiento de las células de los tejidos, dando como resultado su descomposición (**Campaniello et al., 2008**).

En Ecuador la fresa se cultiva en zonas entre 1.300 y 2.600 metros sobre el nivel del mar y con temperaturas que bordean los 15° C, con una humedad relativa que se encuentra entre 60 y 75% (**Fajardo et al., 2014**). Tungurahua es la segunda provincia en Ecuador en la producción de esta fruta (**Riofrío, 2013**). En la parroquia Huachi de la ciudad de Ambato, la mayoría de la población se dedica al cultivo de la fresa, alternativa que tomaron desde que sus huertos de manzana y Claudia, dejaron de producir por daños climáticos y la actividad de volcánica (**ElHeraldo, 2012**).

En Ecuador no existe una norma que rijan a esta fruta por lo tanto no hay requisitos ni parámetros que ayuden como referencia para el manejo del control de calidad. La pérdida de calidad en esta fruta está relacionada con su sensibilidad a la infección por hongos y la susceptibilidad a la pérdida de agua, hematomas, lesiones mecánicas y suavizadas de la textura debido a la falta de cáscara protectora (**Atress et al., 2010**).

La industria alimentaria al tratar de satisfacer las exigencias de los consumidores ha impulsado el desarrollo y diseño de nuevas tecnologías, equipos, procesos y metodologías que permitan obtener productos con características semejantes a los alimentos frescos y con una vida útil equiparable a productos procesados. Por lo que las tecnologías alternas ofrecen productos en su estado más natural, aumentan la vida de anaquel y ofrecen sobre todo productos inocuos al reducir significativamente la

carga microbiana, sobre todo los considerados patógenos y de putrefacción de los alimentos (**Beltrán & Ramos, 2010**).

Se han estudiado varias técnicas de conservación, como la refrigeración, los fungicidas químicos sintéticos, el envasado en atmósfera modificada, los tratamientos osmóticos, los tratamientos hiperbáricos y los tratamientos térmicos con el fin de ampliar la vida útil de las fresas frescas o mínimamente procesadas (**DuckSoon et al., 2009**). La irradiación ultravioleta (UV-C) es una tecnología alternativa a la esterilización química, utilizada para reducir el crecimiento de microorganismos en alimentos, tiene su máximo pico de emisión a 254 nm y se ha comprobado que en esta longitud de onda presenta su mayor acción germicida, por lo que ha sido ampliamente estudiada en varios tejidos vegetales (**Beltrán et al., 2010**).

Por otra parte, desde hace mucho tiempo se han estudiado las bacterias del ácido acético, debido a su amplia aplicación en las industrias de alimentos y médicas. Generalmente este tipo de bacterias se producen de forma tradicional e industrial, los vinagres tradicionales presentan diferentes tipos de microorganismos con respecto a los que se producen de forma industrial (**Raspor & Goranovič, 2008**). Las cepas que se han aislado de vinagres tradicionales son de interés por su resistencia al estrés (acidez y temperatura durante la fermentación), entre estas bacterias se encuentra *K. xylinus* (**Valera et al., 2015**).

Komagataeibacter xylinus denominado anteriormente *Gluconacetobacter xylinus*, es un microorganismo aeróbico en forma de bastón, Gram negativo (**Yamada & Yukphan, 2008**). La bacteria se encuentra normalmente en los vinagres, frutas y verduras. Es capaz de secretar una capa gruesa de celulosa en la superficie del medio líquido (**Perumpuli et al., 2014**).

La celulosa es el principal homo-biopolímero en el Planeta Tierra compuesto por una unidad repetitiva de gluco-piranosas (**Rehm, 2010**). Se presenta en una amplia gama de organismos vivos desde plantas hasta bacterias (**Picheth et al., 2017**). La estructura única de celulosa la hace adecuada como un material de usos múltiples tales como aplicación potencial en ciencias relacionadas a la producción de alimentos, aplicaciones médicas y/o las industrias del papel (**Reiniati et al., 2017**).

En los últimos años, los recubrimientos comestibles han sido ampliamente estudiados para la conservación de frutas y verduras. Sus efectos beneficiosos y su fácil manejo los hicieron aplicables a frutas suaves. Las principales ventajas funcionales atribuidas al uso de recubrimientos comestibles son una tasa de respiración más lenta, períodos de almacenamiento prolongados, retención de la firmeza y crecimiento microbiano reducido (Fan et al., 2009) & (Garcia et al., 2010).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Estimar la vida útil de Fresa (*Fragaria x ananassa*) con el uso de biofilm producido por *Komagataeibacter xylinus*.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Determinar los cambios físicos en la vida útil de Fresa en ultra congelación con y sin recubrimiento de biofilm de celulosa
- Determinar la vida útil de Fresa con recubrimiento de biofilm de celulosa con nanopartículas de plata
- Determinar el posible uso de biofilm de celulosa como contenedor para mermelada de fresa.

1.3. Hipótesis

1.3.1. Hipótesis nula

El recubrimiento con biofilm de celulosa bacteriana producida por *Komagataeibacter xylinus* no tiene efecto significativo en la estimación de vida útil de Fresa (*Fragaria x ananassa*).

1.3.2. Hipótesis alternativa

El recubrimiento con biofilm de celulosa bacteriana producida por *Komagataeibacter xylinus* si tiene efecto significativo en la estimación de vida útil de Fresa (*Fragaria x ananassa*).

1.4. Señalamiento de variables de la hipótesis

1.4.1. Variable independiente

Recubrimiento con un biofilm de celulosa bacteriana producida por
Komagataeibacter xylinus

1.4.2. Variable dependiente

Características microbiológicas y físicas de Fresa (*Fragaria x ananassa*)

CAPITULO II

METODOLOGÍA

2.1. Materiales

2.1.1. Fresa (*Fragaria x ananassa*)

La Fresa (*Fragaria x ananassa*) se cosechó en el sector de Huachi Grande, Cantón Ambato de la Provincia de Tungurahua, la recolección de este fruto fue por la mañana. Las fresas se transportaron en envases de vidrio directamente al Laboratorio de Biotecnología y Microbiología de la Universidad Técnica de Ambato. Se realizó un lavado y clasificación para obtener una materia prima homogénea en tamaño y madurez, las mismas que se usaron para los posteriores experimentos a las que fueron sometidas.

2.1.2. *Komagataeibacter xylinus*

En la investigación se produjo biofilms de celulosa bacteriana (CB) mediante *Komagataeibacter xylinus* K2G30=UMCC2756, la cual pertenece al grupo de bacterias ácido acéticas (BAA). Esta cepa comercial fue adquirida a la colección alemana DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania) y fue empleando en el recubrimiento de Fresa (*Fragaria x ananassa*).

2.2. Métodos

2.2.1. Producción de Celulosa Bacteriana y conservación de cepa bacteriana

Para la producción de Celulosa Bacteriana (CB) por parte de la se cepa de colección *Komagataeibacter xylinus* K2G30=UMCC2756, se realizó en un medio caldo de cultivo H-S, mientras que para la conservación de la cepa bacteriana se utilizó medio de cultivo H-S sólido, metodologías descrita por **Hestrin & Schramm (1954)**. La formulación del medio H-S se describe a continuación.

Tabla 1. Composición del medio de caldo de cultivo H-S propuesta por (Hestrin & Schramm, 1954)

Medio de cultivo	Componentes	g/L	pH
H-S	Glucosa	20	6
	Peptona	5	
	Extracto de levadura	5	
	Fosfato di sódico	2,7	
	Ácido cítrico	1,15	

2.2.1.1. Medio caldo de cultivo H-S

Se aplicó la metodología descrita por **Gullo et al. (2018)**, para la producción de Biofilms de CB, el que se fundamenta en utilizar medio de caldo de cultivo H-S, con cepa de colección, *Komagataeibacter xylinus* K2G30=UMCC2756. Se inoculó las bacterias descritas en 40 ml de H-S y se incubó a 30° C durante 15 días sin agitación para la formación de la Biofilms de CB (**Vegas et al., 2010**).

2.2.1.2. Medio de cultivo H-S Solido

Para la conservación de la cepa *Komagataeibacter xylinus* se utilizó medio H-S sólido, la diferencia con el medio H-S líquido es la adición de bacto agar. La temperatura de crecimiento fue de 30° C durante 48 horas de incubación, en dicho tiempo se obtuvo colonias sobre el medio H-S sólido. Después de este tiempo se almacenó a -4 °C, cada caja Petri se recubrió con film plástico.

2.2.1.3. Lavado de biofilms de Celulosa Bacteriana

La celulosa microbiana obtenida después de la fermentación no se encontraba 100% pura por contener algunas impurezas como células y componentes del medio. Por esta razón se lavó con abundante agua destilada de 30 a 40 minutos y un blanqueamiento con NaOH 0.01 % durante 20 minutos (**Ashjarian, 2013**). Se eliminó NaOH presente en CB para evitar cambios en el Biofilm con agua destilada, añadiendo fenolftaleína para verificar su eliminación total.

2.2.1.4. Almacenamiento de Biofilms de CB

Al obtener Biofilms de CB pura se almacenó en una solución de ácido acético 0,01 % a una temperatura de refrigeración de -4 °C para mantenerlas estables y no presenten modificaciones

2.2.1.5. Aplicación de CB a Fresas (*Fragaria x ananassa*).

Para el recubrimiento de CB a fresas, se aplicó un secado a los biofilms de CB en estufa para eliminar la mayor cantidad de humedad posible presente en el film y así se evitó que la humedad afecte a los resultados de las muestras a analizar. El recubrimiento de la muestra con CB fue en todo el alimento.

2.3. Análisis Microbiológicos y Físico-Químicos.

2.3.1. Vida Útil

Para la determinación de tiempo de vida útil de Fresa, se realizó conteos de crecimiento de microorganismos Aerobios Mesófilos (NTE INEN-ISO 4833, 2014), a través de agar nutritivo y conteo de crecimiento de hongos y levaduras (NTE INEN 1529-10, 2013) a través de agar Potato Dextrose Agar (PDA). Estos medios fueron adquiridos a casa comercial ACUMEDIA. Para el análisis se utilizó fresas con y sin recubrimiento a diferentes temperaturas: 4°C ± 2; 25°C ± 2 y 37°C ± 2 a través del tiempo. Las muestras fueron procesadas según lo establecido en la Norma NTE INEN 1529-2, (2013) para muestras sólidas. Al obtener una solución homogénea se procedió a preparar diluciones serias hasta 10⁻⁵ en una cámara de flujo laminar (Optimar, Singapur), se utilizó como diluyente agua de peptona previamente esterilizada.

En la siembras se utilizó diluciones 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵ en cada agar mencionado con anterioridad. La temperatura de incubación para bacterias psicrótrofas y aerobios mesófilos presentes en alimentos fue de 37° C (Covenin 902-87, 1987), mientras que la temperatura de incubación para mohos y levaduras fue de 30° C, en un tiempo de incubación de 24 horas.

2.3.2. Pérdida de peso, °Brix, pH y acidez titulable por Ultracongelación

Se trabajó con 19 muestras de fresa con y sin recubrimiento colocadas en un recipiente abierto, el cual se almacenó en un ultracongelador (Binder, Germany) a una temperatura de -80 °C por 18 días.

Para pérdida de peso se seleccionó una fresa con y sin recubrimiento, de las que se registró la variación de peso en una balanza analítica (Ohaus, EEUU) cada día durante el periodo de experimentación.

Para la medición de °Brix, pH y acidez titulable se descongeló una muestra diaria tanto con y sin recubrimiento hasta temperatura ambiente, posteriormente se trituró para los análisis correspondientes. Para la determinación de °Brix se utilizó un refractómetro (Atago, Japón), el cual se calibró con agua destilada antes de realizar cada medición.

La medición de pH se efectuó a través de un potenciómetro (Mettler Toledo, USA), de forma directa. Para la determinación de acidez titulable se utilizó un titulador automático (Mettler Toledo, USA) para ello se pesó 5 gramos de muestra previamente triturada en un vaso propio del equipo y se aforó con agua destilada hasta un volumen de 50 ml, la muestra se homogeniza y se titula automáticamente hasta llegar a un valor de pH: 8. El ácido cítrico es el tipo de ácido predominante en todo tipo de fresas (Arreaga & Vinuesa, 2010), y su determinación se la realizó con la siguiente ecuación:

$$\%Acidez = \frac{V * N * Meq * 100}{M}$$

Donde:

V = Volumen de NaOH consumido

N = Normalidad de NaOH (0,01 N)

Meq = Peso equivalente al ácido predominante (ácido cítrico = 0.064)

M = Gramos de muestra pesada

2.3.3. Impregnación de nano partículas de Plata en biofilms de CB

Para la impregnación de nanopartículas de Ag en Biofilms de celulosa bacteriana se aplicó el método descrito por **Ali et al, (2017)**. Este procedimiento consta en sumergir la CB en AgNO₃ en una concentración de 0,001 M durante 1 hora a 200 rpm, posteriormente se sonicó la mezcla en un periodo de 20 minutos a 30 °C. Seguido de un tratamiento con NaOH 0.01M para reducir el tamaño de partícula de la plata. Finalmente se lavó la mezcla con etanol absoluto y agua desionizada.

2.3.4. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Para el análisis de la morfología de la Celulosa Bacteriana, se envió muestras de CB y CB impregnada con plata a la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE desde la Universidad Técnica de Ambato, dicha Institución Educativa cuenta con el equipo indicado para dicho análisis. Esto gracias a la colaboración académica entre Dr. Alex Debut y Dr. David Terán.

Se evaluó pequeños trozos de CB con y sin impregnación de plata en un microscopio electrónico de barrido (TESCAN, 2014), este equipo permite producir imágenes de alta resolución de la superficie (**Renau & Faura, 1994**). Cada muestra fue fijada en un Stub para microscopía electrónica utilizando dos capas de cinta de carbono doble faz conductora, posteriormente se recubrió por 30 segundos con una capa de aproximadamente 20nm de oro conductor (pureza de 99.99%) utilizando un evaporador (sputtering evaporator) Quorum Q150R ES previo al análisis. El Mapping de la muestra de CB impregnada con plata se realizó usando un detector Bruker XFlash 6|30 con una resolución de 123 eV a MnK α durante 600 segundos tomando en cuenta solo los elementos de Ag, mientras que las observaciones se realizaron con el detector de Electrones Secundarios (SE) en la muestra de CB y el de Electrones Retrodispersados (BSE) solo en la muestra de CB con impregnación usando un voltaje entre 5 a 10 kV.

2.4. Cuantificación de azúcares reductores consumido por *K. xylinus*

Para la cuantificación de azúcares reductores consumido por *Komagataeibacter xylinus* se aplicó el método de **Miller (1959)**, la concentración de azúcares reductores se determinó utilizando una curva de calibración absorbancia en función de concentración, se obtuvo dicha curva al preparar soluciones de 1-10 mg/ml, utilizando

glucosa como estándar, a estas soluciones se aplicó el método DNS y se leyó absorbancia de cada una de ellas en un espectrofotómetro (ThermoFisher, USA) a una longitud de onda 540 nm. Una vez construida la curva patrón se aplicó el método DNS a cada una de las muestras, para lo cual se mezcló 0,5 mL de cada una con 0,5 mL del reactivo DNS. Se llevó las muestras a ebullición por 5 min en una plancha de calentamiento e inmediatamente se detuvo la reacción con un shock térmico en baño de agua y hielo. Se reconstruyó las muestras con 5 mL de agua destilada, se agitó, se dejó en reposo por 15 min, y se determinó su absorbancia a 540 nm en un en un espectrofotómetro para microplacas (ThermoFisher, USA). El mismo tratamiento se realizó para el blanco con agua destilada (Ávila et al., 2012).

2.5. Elaboración de un contenedor para mermelada usando como base de CB

Se realizó un tratamiento previo de sellado sin ningún aditivo a la CB. Este experimento reflejó que no es posible el sellado de la CB sin un aditivo. Por lo tanto se inició el sellado de la CB con diferentes gomas.

Se elaboró un contenedor de biofilm para mermelada utilizando las siguientes gomas de grado alimentario: Xanthan, Guar, Dextrina, Alginato y Gelatina natural, para el sellado de los extremos del biofilm de CB y asemejar a una funda biodegradable. Se aplicaron dos tratamientos, el primero constó en impregnar cada goma en el biofilms por medio de agitación (2500 RPM; 50 min). El segundo tratamiento se realizó colocando goma en los extremos del Biofilm previamente secado. La concentración de cada goma fue al 50%. Se determinó propiedades de color, pérdida de peso y °Brix en muestras de mermelada de fresa que se colocó en el interior de los empaques durante 18 días.

Para la pérdida de peso se utilizó una balanza analítica (Ohaus, EEUU), mientras que para la determinación de sólidos solubles (°Brix) se utilizó un refractómetro (Atago, Japón), el cual se calibro con agua destilada antes de realizar cada medición.

El cambio de color se midió por triplicado con un colorímetro Lovibond modelo RM-200 con iluminante D65 y observador 10°. Mediante las coordenadas CIE L*a*b* se obtuvo valores que determinaron color inicial y final de cada tratamiento.

2.6. Diseño experimental

En el trabajo investigativo se aplicó un diseño experimental a*b, donde el factor A consta del recubrimiento y no recubrimiento de biofilm de CB en fresa, mientras que el factor B, viene dado por las temperaturas a las cuales se va a realizar los análisis que son 4°C, 25°C Y 37°C. Relacionando las variables dependientes e independientes, por medio de técnicas e instrumentos estadísticos se obtuvo los resultados que se analiza en el siguiente capítulo.

Tabla 2. Tratamientos de la combinación de factores y niveles

Nº Tratamiento	Combinaciones	Descripción
1	a0b0	Con recubrimiento, 4°C
2	aob1	Con recubrimiento, 25°C
3	aob2	Con recubrimiento, 37°C
4	a1b0	Sin recubrimiento, 4°C
5	b2b1	Sin recubrimiento, 25°C
6	b3b2	Sin recubrimiento, 37°C

2.7. Análisis Estadístico

Se aplicó un análisis estadístico en el programa R Project for Statistical Computing con un nivel de confianza del 95% para los resultados de crecimiento microbiológico en medio de cultivos PDA y Nutriente durante los 5 días de análisis destinados a la determinación de vida útil de fresa. Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existen diferencias significativas en los tratamientos utilizados.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La madures de la fresa se la puede determinar visualmente por medio del color externo de la fruta, metodología que ha sido descrita por el Ministerio de Agricultura del Ecuador (**Ministerio de Agricultura y Ganaderia, 2007**). Por ello los resultados mostrados a continuación se realizaron en fresas con un estado de madures tipo 4, la misma que presenta una coloración rojiza en las 3/4 partes de la fresa hacia el cáliz.

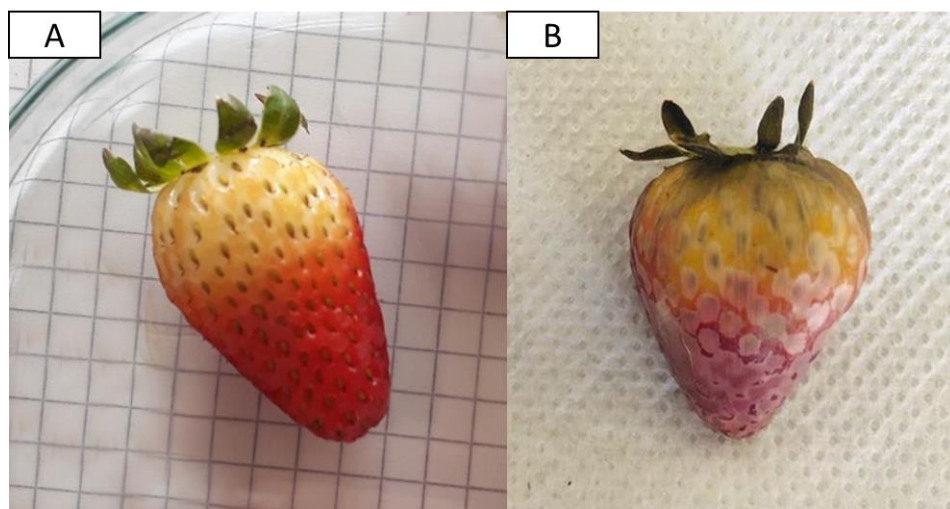


Figura 1. Fresas usadas en el estudio con estado de Madurez tipo 4. A) Fresa sin recubrimiento de Celulosa Bacteriana. B) Fresa con recubrimiento de Celulosa Bacteriana.

Los recuentos microbiológicos se encuentran expresados en UFC/g de mohos, levaduras y aerobios mesófilos. Estos UFC/g fueron utilizados para determinar vida útil y calidad microbiana de las fresas con y sin CB, a diferentes temperaturas de almacenamiento ($4^{\circ}\text{C} \pm 2$; $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ y $37^{\circ}\text{C} \pm 2$). Los resultados de *E.coli* no son reportados debido a que no existió crecimiento en Placas Petrifilm EC.

Los parámetros fisicoquímicos que incluyen sólidos solubles ($^{\circ}\text{Brix}$), pH, acidez titulable y pérdida de peso se evaluaron durante 18 días en ultracongelación (-80°C) en fresas con recubrimiento de biofilm de celulosa bacteriana y sin recubrimiento. Experimento que ayudó en la determinación de cambios producidos por el recubrimiento de CB. Previo al análisis las muestras fueron sometidas a un proceso de

descongelación progresiva desde -80°C (Ultracongelación) pasando a -24°C (congelación), -4°C (Refrigeración) y llegando a temperatura ambiente de 24 °C.

3.1. Vida Útil de fresa

La fresa es una fruta de corta vida útil con mayor afectación a su estructura por falta de control continuo de temperatura. Otras causas para estas afectaciones están atribuidas en el transporte y almacenamiento de este fruto que pueden ser desfavorable; tales como golpes o magulladuras, ambientes inadecuados, exceso de humedad que pueden inducir el crecimiento de microorganismos y la generación de enfermedades que afecten consumidor (**Fennema, 2000**). Existen también alteraciones de tipo microbiano que incluyen bacterias, mohos y levaduras por una mala práctica de inocuidad del producto (**Medina, 2016**).

La vida útil de un fruto se define como el tiempo que transcurre entre la producción o expendio del fruto y el punto en el cual se vuelve inaceptable bajo determinadas condiciones ambientales, microbiológicas, sensoriales que pueden ser un riesgo para la salud del consumidor (**Quispe, 2010**).

La determinación del tiempo de vida útil se estableció a partir de cifras obtenidas de recuento total de microorganismos como aerobios mesófilos, mohos y levaduras durante cinco días. Ecuador no tiene una normativa vigente que regule la calidad microbiológica que debe contener la fresa; por cual se optó por la recopilación de otras investigaciones como referencia para el cálculo de vida útil en esta fruta. **Jay & Ramis (2002)**, señala que el recuento de mohos y levaduras en placa es de 10^6 a 10^7 UFC/g son comunes en frutas y hortalizas. Por otro lado el **Ministerio de Salud de Peru MINSA/DIGESA-V.01, (2008)**, establece las normas de higiene donde señala que el número de Aerobios Mesófilos en frutas y hortalizas considerada como riesgo alimentario es de 10^6 UFC/g. Considerando lo mencionado en el párrafo anterior la **NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-093-SSA1-1994 (1994)**, reporta que los límites microbianos máximo permisible en fruta fresca para aerobio mesófilos es 150.000 UFC/g.

El método propuesto por **Alvarado (1996)**, se utilizó para la determinación del tiempo de vida útil, esta metodología describe que en frutas se debe usar la ecuación de

cinética de primer orden, se realizó el análisis de cinética de reacción con respecto al Tiempo vs. UFC/g. Dentro de este análisis los coeficientes de correlación determinan que el orden de reacción es similar al sugerido por el autor mencionado.

Tabla 3. Determinación de tiempo de vida útil de fresa con y sin recubrimiento de Celulosa bacteriana

Temperatura de almacenamiento	Tiempo (Días)			
	Sin recubrimiento		Con recubrimiento	
	Aerobios mesófilos	Mohos y levaduras	Aerobios mesófilos	Mohos y levaduras
4° C ± 2	8	8	12	11
25° C ± 2	4	3	6	6
37° C ± 2	2	2	3	3

El tiempo de vida útil en función de aerobios mesófilos UFC/g y mohos & levaduras UFC/g para cada temperatura se puede observar en la **tabla 3**, donde se determinó que las fresas que contenían el recubrimiento de CB presentan mayor tiempo de vida útil con respecto a las fresas sin recubrimiento de celulosa bacteriana.

Las fresas sin recubrimiento de CB presentan un incremento en la contaminación microbiana durante los días de análisis. Por otro lado el recubrimiento de CB impidió que existiera mayor proliferación de microorganismos en las fresas, conservando la fruta y aumentando el tiempo de vida de anaquel, ya que según **Beltrán et al. (2010)**, en su trabajo señalan que el tiempo de vida útil de fresa a 5 °C es de 8 días y por medio de tratamiento con radiación ultravioleta de onda corta (UV-C) lograron extender el tiempo a 10 días, en la investigación de **Restrepo et al. (2009)**, el tiempo de vida útil de este fruto es de 9 días a una temperatura de 4 °C.

Para las muestras con recubrimiento se pudo determinar que el mejor tratamiento fue a temperatura 4 °C donde se observa mayor conservación de la muestra en la que no se encontró cambios fisiológicos durante el quinto día de estudio, por otra parte la muestra que se encontraba 25 °C al cuarto día de análisis presenta deshidratación, mientras que a 37°C la muestra presenta deshidratación y presencia de mohos en la superficie del fruto (**Figura 2**, A2; B2; C2).

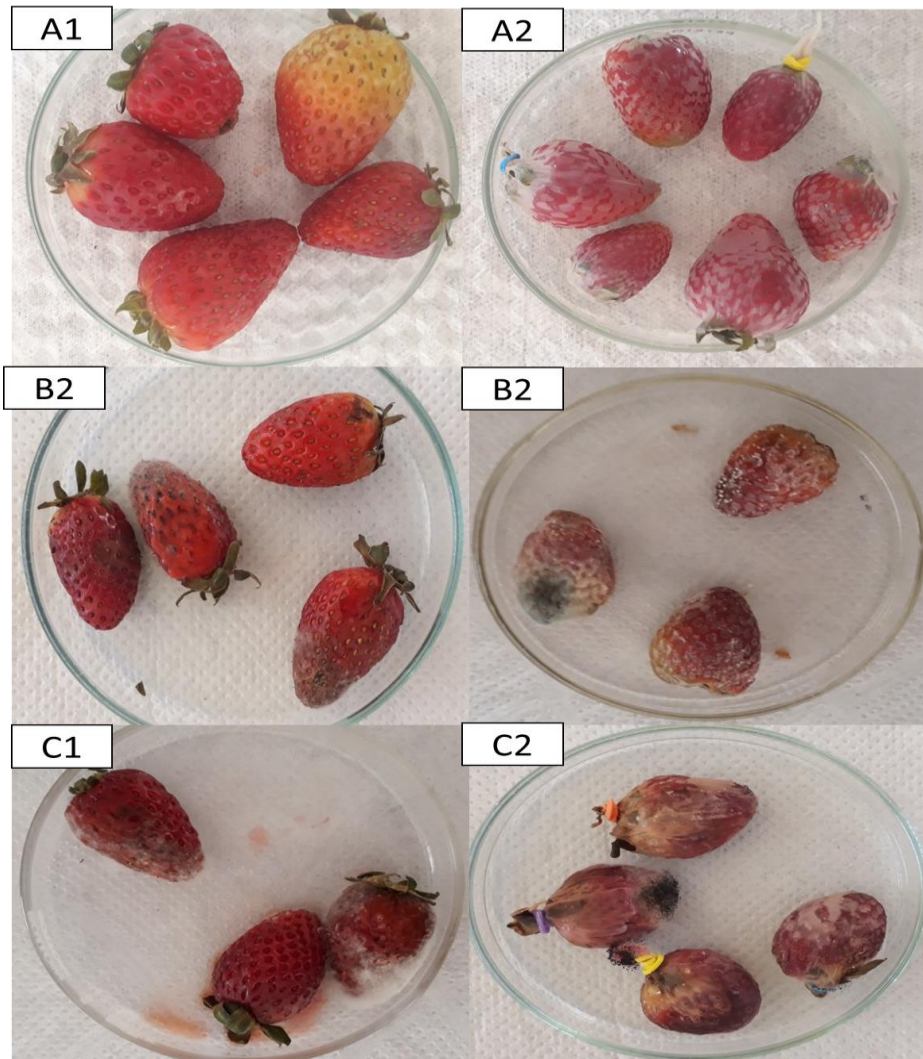


Figura 2. Fresas usadas en el estudio de vida útil. *A1) Fresa sin recubrimiento al quinto día (4°C). A2) Fresa con recubrimiento de CB al quinto día (4°C). B1) Fresa sin recubrimiento al cuarto día (25°C; presencia de moho y deshidratación). B2) Fresa con recubrimiento de CB al cuarto día (25°C). C1) Fresa sin recubrimiento al tercer día (37°C; presencia de mohos y daños en estructura). C2) Fresa con recubrimiento de CB al tercer día (37°C; presencia de mohos).*

El deterioro fue más evidente en las muestras sin recubrimiento a excepción de la muestra que se almaceno a 4°C, en la que no se evidencia cambios fisiológicos al quinto día de estudio, para las muestras almacenadas a 25°C y 37°C se determinó que existe perdida de color, textura, deshidratación y presencia de microorganismos como mohos. No se realizó análisis sensorial ya que las muestras no estaban aptas para el consumo humano. (**Figura 2**, A1; B1; C1).

Tabla 4. Prueba no paramétrica de Friedman para Aerobio Mesófilos (ANOVA)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
tm	1	58.27	58.27	1667.31	0.000599	***
rc	1	8.17	8.17	233.69	0.004252	**
tm:rc	1	2.33	2.33	66.69	0.014665	*
Residuals	2	0.07	0.03			

Signif.codes:0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 tm: tipo de recubrimiento; rc: tiempo de vida util

Mediante el análisis estadístico por el programa R PROJECT FOR STATISTICAL COMPUTING, se determinó que existe diferencia significativa en los tratamientos analizados tanto para mohos y levaduras como para aerobios mesófilos (**Tabla 4 & 5**), por medio de un análisis de varianza (ANOVA).

Tabla 5. Prueba no paramétrica de Friedman para Mohos y levaduras (ANOVA)

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
tm	1	51.61	51.61	112.941	0.00874	**
rc	1	8.17	8.17	17.871	0.04166	.
tm:rc	1	0.81	0.81	1.765	0.01535	
Residuals	2	0.91	0.46			

Signif.codes:0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 tm: tipo de recubrimiento; rc: tiempo de vida util

Se aplicó una prueba paramétrica de Friedman, la que se basa en la comparación entre medias de varios grupos (**Amat, 2016**), con ello se determinó que el mejor tratamiento es el que contenía recubrimiento de celulosa bacteriana a la temperaturas de 4 °C (**Figura 3**) correspondientes al recuento de aerobio mesófilos, esto se debe a que el biofilm actúa como barrera protectora e impide el contacto directo entre la superficie del fruto con el oxígeno, el cual es de primordial importancia para que estas bacterias se reproduzcan (**RENALOA, 2014**).

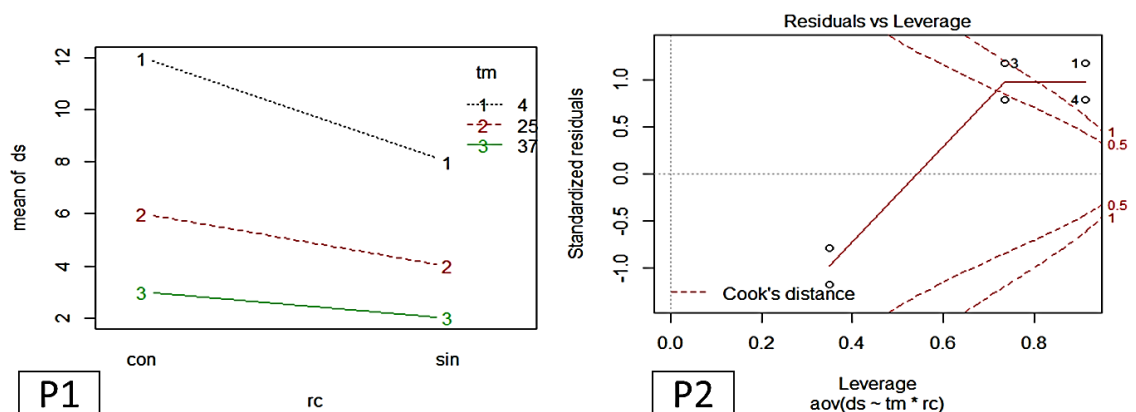


Figura 3: Análisis estadista de presencia de microorganismos. P1) Prueba de Paramétrica de Friedman en R para Aerobio mesófilos. P2) Determinación de los mejores tratamientos (Eta cuadrado) para Aerobio mesófilos.

Mediante el análisis estadístico se determinó que el mejor tratamiento para mohos y levaduras es el tratamiento 4 (**Figura 4**), no presenta recubrimiento y se almacena a una temperatura de 4 °C, se describe como el mejor tratamiento ya que mohos y levaduras son organismos aerobios y aunque muchas especies son fermentadoras, otras no lo son, por ello el biofilm no actúa como barrera ante este tipo de microorganismos.

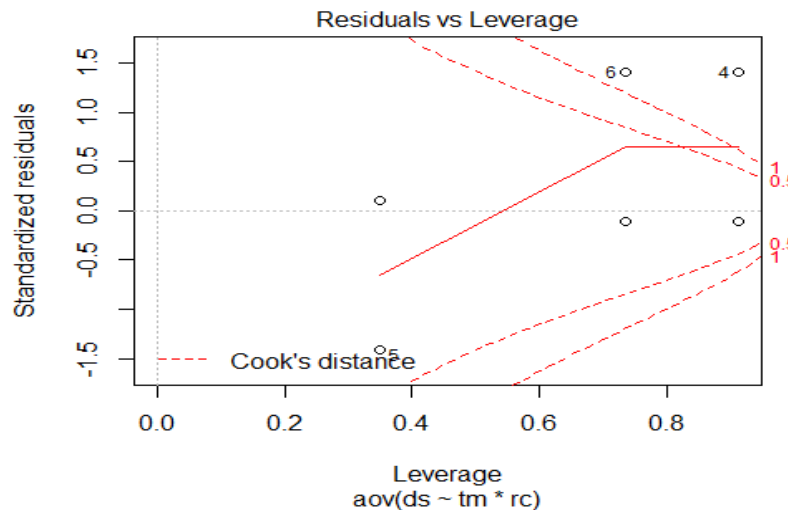


Figura 4: Determinación de los mejores tratamientos (Eta cuadrado) para mohos y levaduras.

3.2. Análisis fisicoquímicos de fresas en ultracongelación.

3.2.1. pH y Acidez

La acidez titulable no define el total de acidez de una muestra ni la cantidad de ácidos involucrados en ella, sino al contrario mide el cambio de concentración de ácidos orgánicos en un alimento. El parámetro de acidez titulable se determinó con Na(OH) 0,1 N. Los resultados presentados en la **tabla 6** se encuentran expresados en función a la cantidad de ácido cítrico, por ser el más abundante en fresas como señala **Ulrich (1970)**, seguido de ácido málico, succínico y ascórbico.

La variación de pH y acidez en las fresas sin recubrimiento de CB, es notable debido a procesos fisiológicos propio de la fruta, el pH aumenta en función del tiempo, mientras que la acidez va descendiendo, lo cual es explicado por **Fennema (2000)**. Quien indica que las fresas por su proceso normal de maduración y procesos fisiológicos cambian sus características fisicoquímicas, tales como la disminución del

porcentaje de acidez y el aumento de pH durante el tiempo de almacenamiento sin dejar de lado la respiración de la fruta para dichos procesos. Es de suma importancia tener en cuenta la temperatura de almacenamiento (-80 °C) donde las variables de pH y acidez titulable no varían significativamente (**Tabla 6**). Esto indica que los procesos de maduración se ven retardados y de esta forma se alarga el tiempo de vida útil de la fresa. Además que la fresa es un fruto climatérico (siguen madurando después de ser recolectados) que al aumentar el índice de madurez posiblemente alcanzan una tasa de respiración máxima y desdobra rápidamente sus reservas (ácidos orgánicos) como respuesta al incremento de su metabolismo y, en consecuencia, el pH se incrementa (**Kays & Paull, 2004**).

Tabla 6. Análisis Físicoquímico (pH, % de ácido cítrico y °Brix) de fresas almacenadas en condiciones de ultracongelación (-80 °C).

Día	Sin recubrimiento			Con recubrimiento		
	pH	% Ac. Cítrico	°Brix	pH	% Ac. Cítrico	°Brix
0	3,77	1,3395	8,60	3,78	1,0851	8,80
1	3,75	1,3231	8,50	3,77	1,0796	8,80
5	3,81	1,2672	8,61	3,85	1,0399	8,71
9	3,82	1,0714	8,65	3,89	0,9833	8,90
12	3,90	1,0295	8,95	3,96	0,8865	8,65
15	4,10	0,8813	9,05	3,90	0,8063	8,75
18	4,49	0,7339	9,35	4,10	0,8169	8,95

En la muestra con recubrimiento de CB, la variación de los parámetros analizados en la tabla 6 es mínima en comparación con la muestra sin recubrimiento. Al no variar en gran escala los resultados se puede determinar que el recubrimiento con CB retarda los procesos biológicos del alimento como respiración, deshidratación, cambio de color y sabor, lo que es bueno para aumentar el tiempo de vida útil de la fresa. El film actúa como capa protectora, evita la respiración de la fruta permitiendo el retardo en los procesos de maduración, pues en el estudio realizado por **Carreño (2011)**, se determina que las membranas de celulosa bacteriana presentan un alto grado de cristalinidad, la fase amorfa es muy reducida y por lo que un intercambio gaseoso exhibe dificultad al atravesar la membrana, dificultando la tasa de respiración del alimento y al no existir paso de oxígeno hacia el alimento las funciones de maduración no se realizan con normalidad.

3.2.2. Sólidos solubles (° Brix)

Uno de los aspectos que refleja la madurez de la fresa es el comportamiento de los sólidos totales (°Brix), los azúcares representan del 80 a 95 % del contenido de sólido total por lo tanto al aumentar los °Brix se determina que la fruta sigue su proceso de maduración debido a la hidrólisis de los almidones que se transforman en azúcares (Osterloh et al., 1997).

La variación de la cantidad de sólidos solubles se presenta en la **tabla 6**. Se aprecia un aumento de la cantidad de azúcares en la muestra que no tiene recubrimiento, al pasar de 8,60 a 9,35 ° Brix, esta variación es normal si comparamos los cambios de pH como de acidez de la muestra lo que conlleva a un cambio total en la fresa por la maduración de la misma pese a estar a una temperatura de -80 °C. En el caso de la muestra con recubrimiento a lo largo del estudio no presentaron mayores variaciones y permaneció el valor de sólido soluble estable durante el almacenamiento (8,80 - 8,95 °Brix). Esta estabilidad de los °Brix se puede explicar por la baja tasa de respiración que existe por el alimento debido al recubrimiento de CB, la misma que afecta al pH y Acidez como se discute en la sección anterior.

3.2.3. Pérdida de peso durante periodo de almacenamiento a ultracongelación

La pérdida de peso en fresa fue diferente en cada muestra cómo se presenta en la **tabla 7**. La muestra sin recubrimiento sufre una pérdida de peso en primera instancia, seguida de una ganancia de peso con el pasar de los días. La pérdida de peso en el congelamiento puede tener como causa la sublimación del hielo en la superficie de la muestra formando una capa porosa deshidratada, la misma que en el periodo analizado aumenta el espesor (Campañone et al., 2005). Mientras que el aumento de peso se ve influenciado por el fenómeno de adsorción de la humedad ambiental y las fuerzas impulsoras (diferencia entre la presión de vapor de agua sobre la superficie del alimento y la presión de vapor del aire de los alrededores) de la humedad en la superficie del alimento que se encuentra deshidratado parcialmente por el efecto de la sublimación y la humedad del aire (Campañone et al., 2002), adquiriendo una ganancia del 2,35 % durante el almacenamiento a ultracongelación.

La muestra con recubrimiento de CB, presenta pérdida de peso con respecto al inicial, en el primer día existe mayor pérdida de peso con respecto a los días restantes debido

a lo explicado anteriormente. En los días siguientes el recubrimiento de CB comienza a ganar peso con respecto al día 1, dicha ganancia no supera el peso inicial de la fresa por lo cual existe una pérdida de peso global en esta muestra. Este fenómeno fue postulado durante el proceso de secado expuesto por (Jie et al., 2005). De acuerdo con estos autores las uniones de los puentes de hidrógeno entre agua-agua y agua-celulosa son extremadamente fuertes para constituir macro cavidades que se van haciendo más pequeñas a medida que se evapora el agua libre, dando lugar a uniones de puente de hidrógeno entre las fibras de celulosa; dichas uniones permiten mantener la humedad del alimento y de la parte interna de la CB que se encuentra en contacto con la muestra, existiendo sublimación solo en la parte exterior del biofilm

Tabla 7. Pérdida de peso en fresa

Día	Sin recubrimiento		Con recubrimiento	
	Peso (g)	%	Peso (g)	%
0	10,285	0,00	8,970	0,00
1	10,278	-0,07	8,718	-2,81
5	10,344	0,57	8,759	-2,36
9	10,369	0,82	8,800	-1,90
12	10,481	1,91	8,830	-1,56
15	10,479	1,89	8,830	-1,56
18	10,527	2,35	8,835	-1,51

La parte exterior del biofilm presenta un menor fenómeno de adsorción ya que no se ve influenciado la presión de vapor de la superficie del alimento, actuando como una barra protectora que disminuye la presión de vapor del aire en la muestra por encontrarse hidratado el biofilm. Por lo que la pérdida de peso fue del 1,51 % durante el almacenamiento.

3.3. Impregnación de nanopartículas de plata en biofilm de Celulosa Bacteriana

Una vez realizada la impregnación de nano partículas de plata en los biofilms de celulosa bacteriana, se procedió al recubrimiento en fresas siguiendo el mismo procedimiento descrito para CB sin impregnación. Se realizaron dos tratamientos: fresas con recubrimiento a temperatura ambiente (25 °C) y acelerada (37 °C). El análisis de las muestras tuvo un periodo de 7 días en los cuales se realizó recuento de microorganismos como: mohos, levaduras y aerobios mesófilos a las 24 horas de incubación. Los resultados obtenidos para cada temperatura fueron similares ya que

no se evidencio crecimiento de microorganismos en medios de cultivo PDA y Nutritivo.



Figura 5. Recubrimiento de fresa con CB impregnada con Plata

Este fenómeno de inhibición de crecimiento de microorganismos esta explicado por las nanopartículas de plata que se encuentran impregnadas en el biofilm de CB, las cuales tienen capacidad antimicrobiana y antimicótica. Además se corroboran los resultados obtenidos con el estudio presentado por **Dan et al. (2005)**, quienes señalan que las nanopartículas de plata actúan contra bacterias gram negativos, gram positivos y hongos. Aunque el mecanismo asociado a la inhibición del crecimiento microbiano por nanopartículas de plata no está claro, se postula que los iones de plata interactúan con tiol (-SH) que contienen proteínas dentro del límite celular o por moléculas de superficie; inactivando las proteínas o disminuyendo la permeabilidad de la membrana. Según los resultados de **(Barua et al., 2013)** establece que los iones de plata reaccionan con grupos de proteínas -SH e inhibe el metabolismo bacteriano. En la membrana celular, los protones y fosfato son inhibidos por fosforilación oxidativa debido a la exposición a nanopartículas de plata.

3.4. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

En la morfología de celulosa bacteriana Figura 6A, se observa microfibrillas entrelazadas unas con otras formando una red tridimensional, no se observó presencia de elementos extraños dentro de la estructura, con lo que se puede determinar que la CB presenta una característica pura y cristalina, lo cual concuerda con **Chávez et al, (2004)**, quienes manifiestan que el contenido de celulosa en los biofilms es del 98%, además durante el blanqueamiento del biofilm con NaOH se eliminaron restos del microorganismo y del medio donde se obtuvo la CB.

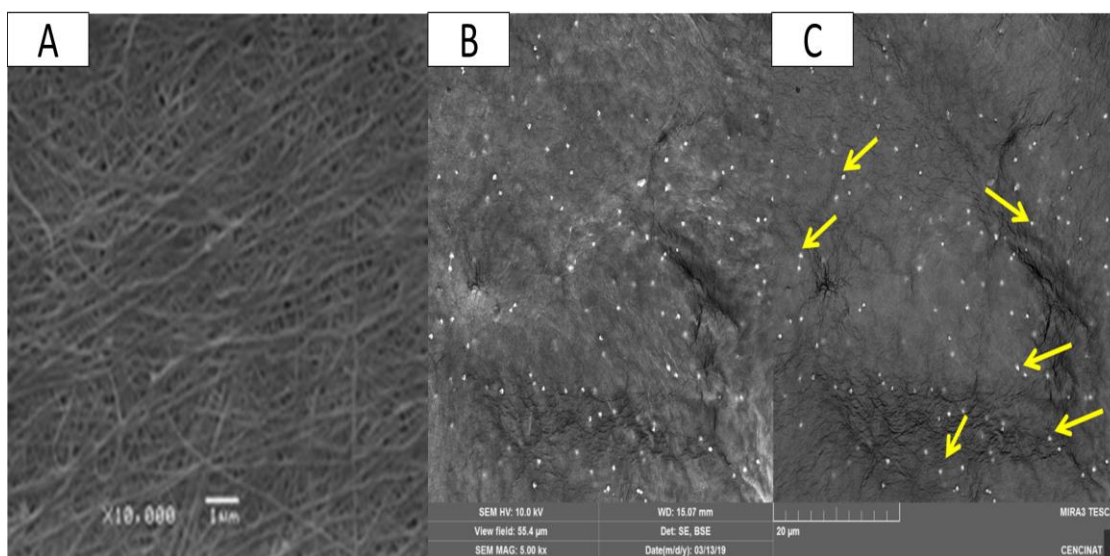


Figura 6. *A) Morfología de la celulosa bacteriana (Toscano, 2019) . B) Microfotografía SEM de celulosa bacteria impregnada con Ag. C) BSE de celulosa bacteria impregnada con Ag, flecha amarilla: partículas con contraste diferente.*

La impregnación de Ag al ser tratada con NaOH 0.01N, los iones se redujeron para formar nanopartículas de plata, la celulosa bacteriana incolora original se tornó amarillenta lo que comprueba la impregnación de iones Ag⁺ en biofilms de CB.

En la figura 6B, se confirma la presencia de nanopartículas de Ag en la estructura de CB, estas nanopartículas se sitúan en los espacios existentes en la red tridimensional formada por las microfibrillas, además se observa que no existe una reacción por parte de la plata hacia la celulosa y lo cual es comprobado por **Ali et al. (2017)**, en su trabajo de investigación.

Según **He et al. (2003)**, señalan que las partículas de Ag⁺ absorbidas se unen a las microfibrillas de celulosa bacteriana a través de interacciones electrostáticas, el

oxígeno rico en electrones esperan que los átomos de los grupos hidroxilo polar y éter de la celulosa bacteriana interactúen con los cationes del metal. Mediante la identificación de Ag por Mapping se confirma que en la estructura de celulosa existe nanopartículas de plata (**Figura 7**).

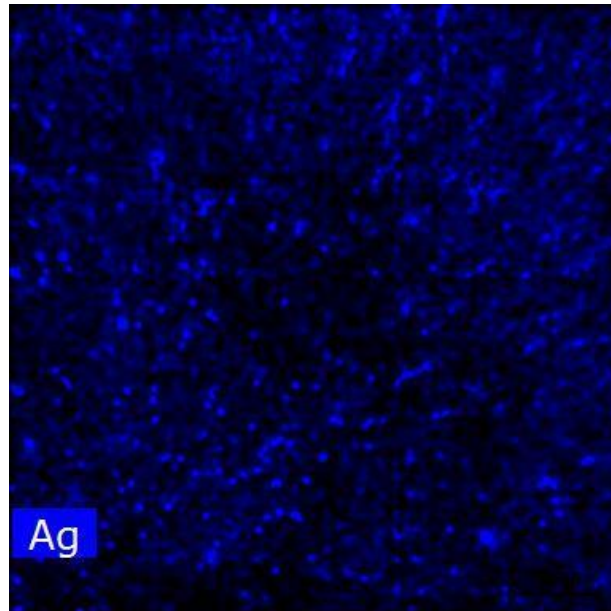


Figura 7. M) Identificación de Ag⁺ por Mapping de las partículas observadas en el detector de electrones retrodispersados (BSE)

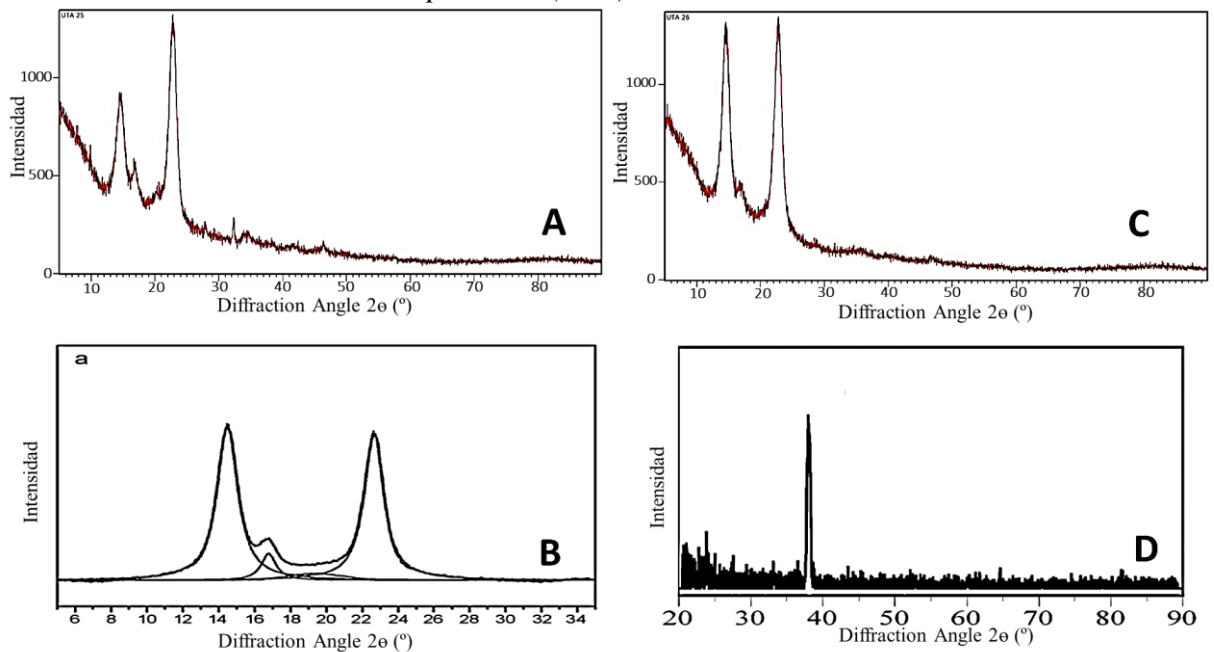


Figura 8. A) XRD en muestra de celulosa bacteriana. B) XRD de películas de microfibrillas de celulosa bacteriana (Castro et al., 2011). C) XRD en muestra de celulosa bacteriana impregnada con Ag. D) XRD patrones de las partículas de plata (Chen, Fan, & Carroll, 2002).

La difracción de rayos X (DRX) se utilizó para examinar la estructura cristalina de celulosa bacteriana (8A) identificando pico al valor 2θ de $14,5^\circ$, 17° y $22,9^\circ$. Dichos valores se asemejan a los reportados por **Cacicedo (2017)**. Las nanopartículas metálicas presentes en CB (8B). El patrón DXR confirman nanopartículas de Ag impregnada en celulosa bacteriana en un pico (8B) al valor de 2θ de $32,3^\circ$ concordando con en el estudio presentado por **Chen et al. (2002)**, quienes presentan un valor de identificación de nanopartículas de plata de $38,1^\circ$ en 2θ .

3.5. Cuantificación de azúcares reductores consumido por *K. Xylinus*

La glucosa es utilizada por *Komagataeibacter xylinus* como fuente de carbono, energía y síntesis de celulosa bacteriana. La celulosa de cualquier fuente es un polímero de residuo de glucosa (**Chávez et al., 2004**). El consumo de glucosa aumenta en función del tiempo existiendo un mayor consumo en los primeros 7 días en el que consume 12.61 mg/ml, siendo el 58,73% del total de la glucosa, después de este tiempo el consumo es menor. En el día 11 el microorganismo ha consumido el total de glucosa presente en el medio H-S estándar que fue de 21,46 mg/ml (99,91% de glucosa), lo interesante de la CB formada es que no se desintegra con el pasar del tiempo, esta observación lo hizo **Hestrin & Schramm (1954)**, cuando determino que la celulosa formada no disminuye cuando la incubación continua a pesar de que no queda glucosa, el proceso global de la síntesis puede ser considerado como irreversible, además añade que el tiempo óptimo para el desarrollo de celulosa bacteriana es de 15 días, con lo que se infiere debido a que en el día 11, ya no existe glucosa para la síntesis de CB.

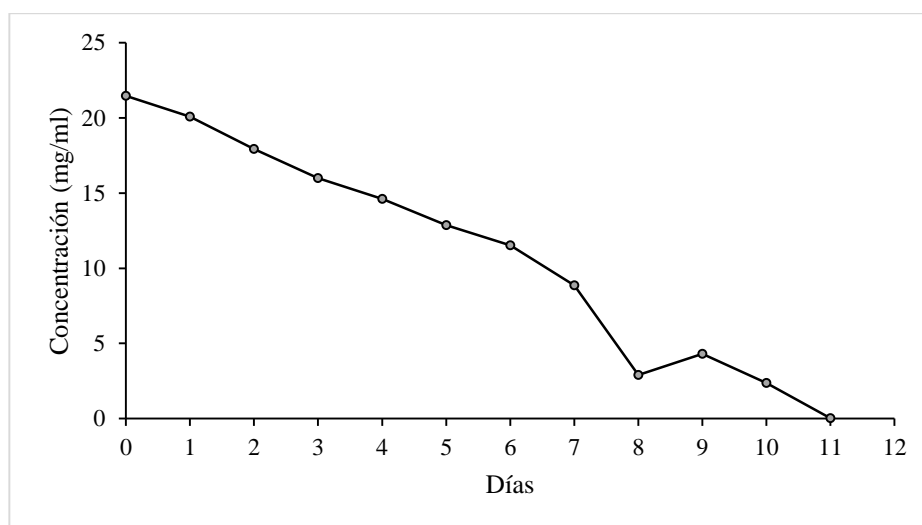


Figura 9. Consumo de glucosa por *K. Xylinus* durante la formación de CB

La experimentación se realizó por duplicado y concuerda con el trabajo presentado por **Toscano (2019)**, motivo por el cual se determinó que la formación de celulosa bacteriana finaliza en el día 11 por no existir glucosa para el consumo del microorganismo.

3.6. Utilización de CB como contenedor para mermelada de Frutilla

Se debe explicar que se realizaron intentos de sellado de CB sin goma y no se obtuvo éxito, por esta razón se inició la combinación de CB con diferentes gomas.

Se aplicó dos tratamientos para el sellamiento del biofilm de CB, el primer sellamiento basado en la impregnación de las gomas (Xanthan, Guar, Dextrina, Alginato y Gelatina natural) en CB. Este tratamiento con impregnación presentó dificultad por la excesiva adhesividad de todo el biofilm lo que dificultó el trabajo de elaboración del contenedor para mermelada, todas las gomas presentaban adhesividad predominando la Gelatina natural. El segundo tratamiento, la elaboración de contenedor fue más práctico y simple a comparación del tratamiento anterior logrando un buen sellado del Biofilm con las gomas mencionadas, en este tratamiento la Gelatina natural predomina por presentar mayor fuerza de sellado.

Se empacó mermelada de fresa en contenedores de biofilm que presentaron mayor adherencia de cada tratamiento y se evaluó parámetros de color, °Brix, y pérdida de peso.

Tabla 8. Porcentaje de pérdida de peso en mermelada de fresa

Día	Impregnación de gelatina natural	Sellamiento de extremos con de gelatina natural
	% Perdida Peso	% Perdida Peso
3	3,2	5,4
6	8,2	14,0
9	13,0	15,8
12	14,3	17,6
15	14,5	18,0
18	15,3	19,8

La pérdida de peso en mermelada es evidente en los tratamientos utilizados. Para el primer tratamiento el que consta de impregnación de gelatina natural en CB tiene una pérdida de peso del 15,3%, mientras que en el tratamiento de sellamiento de celulosa

con gelatina natural en los extremos presento una pérdida de peso mayor siendo del 19,8 %. La pérdida de peso en el primer tratamiento es inferior a comparación del tratamiento de sellado de extremos, debido a que la gelatina natural se incrusta en los espacios que existe entre microfibrillas y la adherencia en las mismas microfibrillas de la CB, formando una capa protectora con más firmeza y rigidez. Mientras que en el otro tratamiento la pérdida de peso es mayor debido a que el biofilm de CB por presentar propiedades de absorción de agua y permeabilidad, absorbe el agua presente en la mermelada y es trasladada hacia el exterior provocando una deshidratación de la muestra.

Según estudios realizados por **Álvarez et al.(2013)**, en la elaboración de una funda para chorizo a partir de celulosa bacteriana, presentan el mismo problema de deshidratación señalando que en algunos casos el chorizo mostró una pérdida muy significativa de humedad. Una de las razones para este comportamiento puede deberse a la carencia de una capa de proteína coagulada que se forma entre ambas partes y que se encarga de reducir las mermas por evaporación. Adicionalmente, pruebas de permeabilidad en el trabajo mencionado mostraron que los film de celulosa tiene una tasa de permeabilidad mayor que la del colágeno.

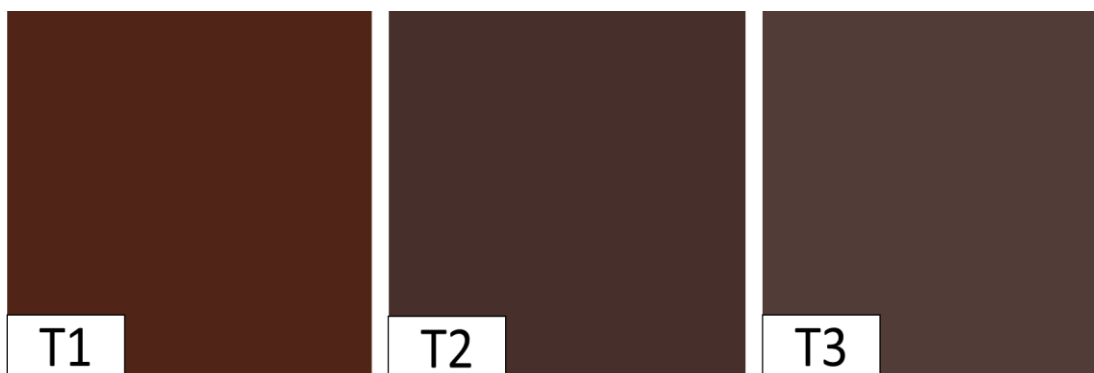


Figura 10. *T1) Color inicial de mermelada de fresa día 0. T2) Color final de mermelada de fresa contenida en empaque impregnado de gelatina natural día 18. T3) Color final de mermelada de fresa contenida en empaque sellado en los extremos con gelatina natural día 18.*

Por la permeabilidad del biofilm de CB y la deshidratación de la muestra, los °Brix se ven influenciados notoriamente en las muestras analizadas, pasando de un valor inicial de 66,2 °Brix a 76,4 °Brix en la muestra que se almaceno en el empaque de impregnación de CB, mientras que el valor final de la muestra que se almaceno en el

empaquete sellado en los extremos fue de 83,6 °Brix. Como se mencionó anteriormente los °Brix determinan la cantidad de sólidos solubles presente en una sustancia.

Al analizar las coordenadas obtenidas por el CIE L*a*b* se observó una variación de color. El color de la mermelada del día 0 (**T1**) presento las siguientes características color oscuro de rojo-naranja, dicho color se compone de 31.37% de rojo, 14.12% de verde y 8.63% de azul. El color final para el tratamiento con impregnación de gelatina (**T2**) presento un color rojo oscuro, se compone de 27.84% de rojo, 18.43% de verde y 16.86% de azul. En el tratamiento de sellado en los extremos del biofilm de CB, el color final de la muestra (**T3**) presento un color rojo oscuro medio se compone de 32.16% de rojo, 23.53% de verde y 21.96% de azul. El cambio de color de un matiz claro a un oscuro se explica por la deshidratación que sufre la mermelada donde el contenido de polifenoles, antocianinas, sólidos que se concentran y por reacciones enzimáticas que se pueden efectuar según los describe **García, Serrano, & Garrido (2016)**, quienes expresan que los alimentos en la deshidratación y almacenamiento prolongado presentan decoloración debido al pardeamiento. El pardeamiento enzimático es ocasionado por la enzima polifenol oxidasa (PPO) que cataliza la oxidación del mono- y orto- difenoles para formar quinonas que se ciclan, experimentando oxidaciones futuras, y se condensan para formar pigmentos pardeados (melaninas).

3.7. Verificación de hipótesis

Mediante los análisis realizados sobre determinación de vida útil en fresa (*Fragaria x ananassa*) y el respectivo análisis de datos ANOVA en cada tratamiento, con un nivel de confianza del 95% se rechaza la hipótesis nula debido a que si existen diferencias significativas en Fresa con recubrimiento de biofilm de celulosa bacteriana producida por *Komagataeibacter xylinus* lo que da como resultado un alargamiento de tiempo de vida útil de la fresa con respecto a la que no tiene recubrimiento, de esta forma se acepta la hipótesis alternativa

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- El recubrimiento con biofilm de celulosa bacteriana producida por *Komagataeibacter xylinus* aplicada a fresa (*Fragaria x ananassa*) aumenta el tiempo de vida útil de este fruto, alargando a 12, 6 y 3 días el tiempo de vida de anaquel por presentar mayor calidad microbiana, por otro lado fresa sin recubrimiento tuvo una vida de anaquel de 11, 4 y 2 días a las temperaturas de 4, 25 y 37°C respectivamente, el recubrimiento redujo la carga microbiana hasta niveles aceptables establecida por normativas .
- La variación de los parámetros fisicoquímicos de pH, acidez titulable, sólidos solubles y pérdida de peso son notables en fresas que no presentan recubrimiento de CB, a pesar de encontrarse a una temperatura extremadamente baja (-80°C) el proceso de maduración continuaba debido a los cambios que presentaron en los parámetros mencionados. Para muestras con recubrimiento de CB, el film actuó como barrera entre la superficie externa de la fruta y el ambiente dificultando que la fresa continúe su proceso de maduración por la reducción del intercambio gaseoso que es necesario para la respiración, provocando que el fruto no realice con normalidad sus procesos biológicos.
- Las nanopartículas de plata presentan un poder antimicrobiano eficaz por ello al impregnar las nanopartículas en biofilms de CB y realizar los respectivos análisis microbiológicos, se determinó que no existe presencia de aerobios mesófilos, mohos y levaduras en muestras tratadas con este recubrimiento, lo que aumenta el tiempo de vida útil en la fresa en función a parámetros microbianos. Con respecto a procesos de maduración las nanopartículas de plata no influyen. Mediante el análisis SEM y XRD se confirmó que existe presencia de Ag en la estructura de la celulosa bacteriana.
- El mejor tratamiento para el sellamiento del biofilm de celulosa fue con gelatina natural como aditivo. El tratamiento con impregnación de gelatina natural tiene una pérdida de peso del 15,3 %, mientras que en el tratamiento de sellamiento de extremos del biofilm de celulosa bacteriana se observó una

pérdida mayor de peso correspondiente al 19,8%. Esta pérdida de peso por deshidratación influyó de forma directa en la concentración de los °Brix, de 66,2 °Brix, a 76,4 °Brix en el tratamiento de impregnación y 83,6 °Brix en el tratamiento de sellado de externos. La variación de color fue evidente pasando de un color oscuro de rojo-naranja a un color final de rojo oscuro en el tratamiento de impregnación, mientras que en el tratamiento de sellado de extremos el color final fue rojo oscuro medio.

4.2. Recomendaciones

- Realizar recubrimiento de celulosa bacteriana en diferentes matrices para determinar si presentan resultados favorables igual al obtenido en fresa o difieren a los obtenidos en esta fruta, y analizar las posibles alteraciones en las nuevas matrices si presentan resultados adversos a este estudio.
- Las muestras que se analicen a temperaturas de ultracongelación deben contener recipientes herméticos y cerrados para no alterar los resultados ya sea por ganancia de humedad, descongelamiento progresivo y daños estructurales por manipulación.
- Se recomienda realizar impregnación en CB con diferentes nanopartículas que presenten actividad antimicrobiana para identificar el poder de inhibición de microorganismos en muestras alimentarias.
- Estudiar diferentes tipos de resinas y gomas para un mejor sellado de biofilms de celulosa bacteriana, con el objetivo de elaborar un empaque que se asemeje a los que se encuentran disponibles en el mercado, poder competir con ellos y así contribuir a contrarrestar la contaminación ambiental.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ali, A., Haq, I. U., Akhtar, J., Sher, M., Ahmed, N., & Zia, M. (2017). Synthesis of Ag-NPs impregnated cellulose composite material: its possible role in wound healing and photocatalysis. *IET Nanobiotechnology*, 11(4), 477–484. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2016.0086>
- Alvarado, J. de D. (1996). *Principios de Ingeniería Aplicados a los Alimentos*. (Radio Comunicaciones, Ed.). Quito-Ecuador: OEA-PRDC.
- Álvarez, C., Gallegos, D., Córdoba, C., & Castro, C. (2013). *Elaboración de una funda para chorizo a partir de celulosa bacterial*. Universidad Pontificia Bolivariana. Retrieved from <https://www.yumpu.com/es/document/read/14808401/elaboracion-de-una-funda-para-chorizo-a-partir-de-celulosa-bacterial>
- Amat, J. (2016). RPubS - Test de Friedman. Retrieved February 22, 2019, from https://rpubs.com/Joaquin_AR/219732
- Arreaga, A., & Vinueza, N. (2010). Determinación de la vida útil del mango fresco variedad edward a temperatura ambiente y de refrigeración (15°C). Retrieved from <https://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/10731>
- Ashjarian, A. (2013). Properties and Applications of Bacterial Cellulose as a Biological Non-woven Fabric. *Asian Journal of Chemistry*, 25(2), 783–788. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2013.12898>
- Atress, S., El-Mogy, M., Aboul-Anean, H., & Alsanis, B. (2010). Improving Strawberry Fruit Storability by Edible Coating as a Carrier of Thymol or Calcium Chloride. *Journal of Horticultural Science & Ornamental Plants*, 2(3), 88–97. Retrieved from [https://idosi.org/jhsop/2\(3\)10/2.pdf](https://idosi.org/jhsop/2(3)10/2.pdf)
- Ávila, R., Rivas, B., Motzezak, R., & Chirinos, M. (2012). Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en Agave cocui Trelease Content of total, Reducing and Non-Reducing Sugars in Agave cocui Trelease. *MULTICIENCIAS*, 12, 129–135. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/904/90424216002.pdf>

- Barua, S., Konwarh, R., Bhattacharya, S. S., Das, P., Devi, K. S. P., Maiti, T. K., ... Karak, N. (2013). Non-hazardous anticancerous and antibacterial colloidal 'green' silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *105*, 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.12.015>
- Beltrán, Á., & Ramos, M. (2010). *Estudio de la vida útil de fresas (Fragaria vesca) mediante tratamiento con luz ultravioleta de onda corta UV-C*. Ambato-Ecuador. Retrieved from [http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/858/1/AL434 Ref. 3280.pdf](http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/858/1/AL434_Ref_3280.pdf)
- Beltrán, A., Ramos, M., & Alvarez, M. (2010). Estudio de la Vida Útil de Fresas (Fragaria vesca) Mediante Tratamiento con Radiación Ultravioleta de Onda Corta (UV-C). *ESPOL – RTE*, *23*(N. 2, 17-24), 8. Retrieved from http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:_RZh-eB_tdIJ:www.rte.espol.edu.ec/index.php/tecnologica/article/download/51/22+&cd=4&hl=es&ct=clnk&gl=ec
- Cacicedo, L. (2017). *Desarrollo de sistemas de liberación controlada de agentes quimioterapéuticos en matrices de celulosa microbiana con aplicaciones biomédicas*. Universidad Nacional De La Plata. Retrieved from http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/64775/Documento_completo.pdf?sequence=1
- Campaniello, D., Bevilacqua, A., Sinigaglia, M., & Corbo, M. R. (2008). Chitosan: Antimicrobial activity and potential applications for preserving minimally processed strawberries. *Food Microbiology*, *25*(8), 992–1000. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2008.06.009>
- Campañone, L., Roche, L., Salvadori, V., & Mascheroni, R. (2002). Monitoring of Weight Losses in Meat Products during Freezing and Frozen Storage. *Food Science and Technology International*, *8*(4), 229–238. <https://doi.org/10.1106/108201302028555>
- Campañone, L., Salvadori, V., & Mascheroni, R. (2005). Food freezing with simultaneous surface dehydration: approximate prediction of weight loss during freezing and storage. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, *48*(6), 1195–1204. <https://doi.org/10.1016/j.ijheatmasstransfer.2004.09.031>

- Carreño, L. (2011). *Efecto de las condiciones de cultivo y purificación sobre las propiedades fisicoquímicas y de transporte en membranas de celulosa bacteriana*. Colombia. Retrieved from <http://bdigital.unal.edu.co/4303/>
- Castro, C., Zuluaga, R., Putaux, J.-L., Caro, G., Mondragon, I., & Gañán, P. (2011). Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.072>
- Chávez, J., Martínez, S., Contreras, M., & Escamilla, E. (2004). *Celulosa Bacteriana en Gluconacetobacter Xylinum: Biosíntesis y Aplicaciones. Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* (Vol. 7). México: División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Retrieved from <https://www.redalyc.org/html/432/43270103/>
- Chen, S., Fan, Z., & Carroll, D. L. (2002). Silver Nanodisks: Synthesis, Characterization, and Self-Assembly. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(42), 10777–10781. <https://doi.org/10.1021/jp026376b>
- Covenin 902-87. (1987). *Comisión Venezolana de Normas Industriales. Método para recuento de colonias de bacterias aerobias en placas de petri* (Segunda). Venezuela. Retrieved from <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/902-87.pdf>
- Dan, Z. G., Ni, H. W., Xu, B. F., Xiong, J., & Xiong, P. Y. (2005). Microstructure and antibacterial properties of AISI 420 stainless steel implanted by copper ions. *Thin Solid Films*, 492(1–2), 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2005.06.100>
- DuckSoon, A., EunYoung, P., & DongSun, L. (2009). *Postharvest biology and technology. Postharvest Biology and Technology* (Vol. 52). Elsevier. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20093075074>
- ElHeraldo. (2012). Ecuador: La fresa es un cultivo rentable en Tungurahua. Retrieved December 28, 2018, from <https://www.freshplaza.es/article/61868/Ecuador-La-fresa-es-un-cultivo-rentable-en-Tungurahua/>
- Fajardo, S., Patiño, J., Álvarez, A., Velásquez, S., Patiño, D., García, E., ... Rodríguez, H. (2014). *Manual Técnico del Cultivo de Fresa Bajo Buenas Prácticas*

- Agrícolas*. (ISBN: 978-958-8711-51-5, Ed.) (SENA). Medellín-Colombia. Retrieved from https://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/fresa_BPA_1.pdf
- Fan, Y., Xu, Y., Wang, D., Zhang, L., Sun, J., Sun, L., & Zhang, B. (2009). Effect of alginate coating combined with yeast antagonist on strawberry (*Fragaria×ananassa*) preservation quality. *Postharvest Biology and Technology*, 53(1–2), 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.03.002>
- Fennema, O. R. (2000). *Química de los alimentos*. Editorial Acribia. Retrieved from <https://sceqa.files.wordpress.com/2014/05/quc3admica-de-los-alimentos-fennema.pdf>
- García, L., Rodrigues, L., Sarantópoulos, C., & Hubinger, M. (2010). Selection of an Edible Starch Coating for Minimally Processed Strawberry. *Food and Bioprocess Technology*, 3(6), 834–842. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0313-9>
- García, M., Serrano, M., & Garrido, D. (2016). *Contenido En Antocianos Y Compuestos Fenólicos En Diferentes Frutos Frescos Y Deshidratados*. España. Retrieved from http://dspace.umh.es/bitstream/11000/2914/1/TFM_García_Pastor%2C_María_Emma.pdf
- Gullo, M., China, S., Giudici, P., & Massimiliano, P. (2018). Biotechnological production of cellulose by acetic acid bacteria: current state and perspectives. *Article in Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9164-5>
- He, J., Kunitake, T., & Nakao, A. (2003). Facile In Situ Synthesis of Noble Metal Nanoparticles in Porous Cellulose Fibers. *Chemistry of Materials*, 15(23), 4401–4406. <https://doi.org/10.1021/cm034720r>
- Hestrin, S., & Schramm, M. (1954). Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *The Biochemical Journal*, 58(2), 345–352. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13208601>
- Jay, J., & Ramis, M. (2002). *Microbiología moderna de los alimentos*. Editorial Acribia.

- Jie, X., Cao, Y., Qin, J.-J., Liu, J., & Yuan, Q. (2005). Influence of drying method on morphology and properties of asymmetric cellulose hollow fiber membrane. *Journal of Membrane Science*, 246(2), 157–165. <https://doi.org/10.1016/J.MEMSCI.2004.08.007>
- Kays, S., & Paull, R. (2004). *Postharvest biology*. Athens Ga.: Exon Press. Retrieved from <https://www.worldcat.org/title/postharvest-biology/oclc/253451927>
- Medina, A. (2016). *Influencia Del Mantenimiento De La Cadena De Frío Controlada En La Vida Útil, Calidad Microbiológica, Físico Química Y Organoléptica En Fresas Tipo Exportación*. Pontificia Universidad Javeriana Facultad De Ciencias Carrera De Microbiología Industrial, Bogotá. Retrieved from <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8286/tesis266.pdf?sequence=1>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2007). *Agrocadena de Fresa*. Costa Rica. Retrieved from <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/E70-9555.pdf>
- Ministerio de Salud de Peru MINSA/DIGESA-V.01. (2008). *Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano*. Lima-Peru. Retrieved from http://www.sanipes.gob.pe/archivos/biblioteca/N_14_RM_591_2008_MINSA.pdf
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-093-SSA1-1994. (1994). *Bienes Y Servicios. Prácticas De Higiene Y Sanidad En La Preparación De Alimentos*. México. Retrieved from <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/093ssa14.html>
- NTE INEN-ISO 4833. (2014). *Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Técnica de recuento de colonias a 30 °C. Norma Técnica Ecuatoriana (Primera)*. Quito-Ecuador. Retrieved from <https://drive.google.com/file/d/1N8EEqnnKIq5cvt2QSXauezynPIDxrP8p/view>

- NTE INEN 1529-10. (2013). *Control microbiológico de los alimentos. Mohos y levaduras viables. Recuentos en placa por siembra en profundidad. Norma Técnica Ecuatoriana Voluntaria (Primera)*. Quito-Ecuador. Retrieved from <http://181.112.149.204/buzon/normas/1529-10-1R.pdf>
- NTE INEN 1529-2. (2013). *Control microbiológico de los alimentos. Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico (Primera)*. Quito-Ecuador. Retrieved from <http://181.112.149.204/buzon/normas/1529-2-1R.pdf>
- Osterloh, A., Ebert, G., Held, H., Schulz, H., & Urban, E. (1997). Lagerung von Obst und Südfrüchten. *Food / Nahrung*, 41(3), 181–181. <https://doi.org/10.1002/food.19970410315>
- Paliyath, G., Murr, D., Handa, A., & Lurie, S. (2008). *Postharvest Biology and Technology of Fruits, Vegetables, and Flowers (First)*. USA: Wiley-Blackwell.
- Perumpuli, P. A. B. N., Watanabe, T., & Toyama, H. (2014). Identification and characterization of thermotolerant acetic acid bacteria strains isolated from coconut water vinegar in Sri Lanka. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78(3), 533–541. <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.882758>
- Picheth, G. F., Pirich, C. L., Sierakowski, M. R., Woehl, M. A., Sakakibara, C. N., de Souza, C. F., ... de Freitas, R. A. (2017). Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 97–106. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2017.05.171>
- Quispe, S. (2010). *Efecto De La Aplicación De Tratamientos De Desinfección Utilizando Tsunami 100 Y Vitalin, En La Calidad Microbiológica De Fresa (Fragaria ananassa) Variedades Albión Y Diamante Producidas En El Cantón Cevallos*. Universidad Técnica De Ambato Facultad De Ciencia E Ingeniería En Alimentos. Retrieved from <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3299/3/PAL232.pdf>
- Raspor, P., & Goranovič, D. (2008). Biotechnological Applications of Acetic Acid Bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28(2), 101–124. <https://doi.org/10.1080/07388550802046749>
- Rehm, B. H. A. (2010). Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and

- applications. *Nature Reviews Microbiology*, 8(8), 578–592.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2354>
- Reiniati, I., Hrymak, A. N., & Margaritis, A. (2017). Recent developments in the production and applications of bacterial cellulose fibers and nanocrystals. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(4), 510–524.
<https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1189871>
- RENALOA. (2014). *Análisis Microbiológico De Los Alimentos Microorganismos Indicadores*. Argentina. Retrieved from http://www.anmat.gov.ar/renaloa/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_III.pdf
- Renau, J., & Faura, M. (1994). *Principios básicos del Microscopio Electrónico de Barrido 1.-Introducción*. Valencia. Retrieved from https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/9313/CC-011_art_5.pdf;sequence=1
- Restrepo, A. M., Cortés, M., & Rojano, B. (2009). Determinación de la vida útil de la fresa (fragaria ananassa duch.) Fortificada con vitamina e vida útil de la fresa (fragaria ananassa duch.) Fortificada con vitamina e misael cortés. *Año*, 76, 163–175. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/496/49611945018.pdf>
- Riofrío, P. (2013). *Evaluación de tres fungicidas químicos para el control de Botrytis cinerea en el cultivo de frutilla (Fragaria chiloensis), en el cantón Otavalo, provincia de Imbabura*. Babahoyo: UTB, 2013. Retrieved from <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/49000/284/10/T-UTB-FACIAG-AGR-000069.03.pdf>
- Sagarpa. (2017). *FRESA Mexicana planeación agrícola nacional*. México. Retrieved from <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257075/Potencial-Fresa.pdf>
- Toscano, J. (2019). Estimación de vida útil de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) a partir del recubrimiento de celulosa bacteriana producida por *Komagataeibacter xylinus*. Retrieved from <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/29409>

- Ulrich, R. (1970). Organic acids. p. 452-453. *The Biochemistry of Fruits and Their Products*, , 1, 620. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19710305450>
- Valera, M. J., Torija, M. J., Mas, A., & Mateo, E. (2015). Cellulose production and cellulose synthase gene detection in acetic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(3), 1349–1361. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6198-1>
- Vegas, C., Mateo, E., González, Á., Jara, C., Guillamón, J. M., Poblet, M., ... Mas, A. (2010). Population dynamics of acetic acid bacteria during traditional wine vinegar production. *International Journal of Food Microbiology*, 138(1–2), 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.006>
- Yamada, Y., & Yukphan, P. (2008). Genera and species in acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1), 15–24. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2007.11.077>

ANEXOS

Anexo I. % Ácido cítrico en muestras de fresa durante el proceso de ultracongelación

Día	Acidez final (Ac. Cítrico)			
	Sin Recubrimiento		Con Recubrimiento	
	Vol. de NaOH 0,1N utilizado (ml)	% Ácido cítrico	volumen de NaOH 0,1N utilizado (ml)	% Ácido cítrico
1	10,465	1,33952	8,477	1,085056
2	10,337	1,323136	8,434	1,079552
3	10,22	1,30816	8,2745	1,059136
4	10,179	1,302912	8,276	1,059328
5	9,9	1,2672	8,124	1,039872
6	9,119	1,167232	8,094	1,036032
7	9,119	1,167232	8,015	1,02592
8	8,42	1,07776	8,015	1,02592
9	8,37	1,07136	7,682	0,983296
10	8,1	1,0368	7,0445	0,901696
11	8,043	1,029504	6,9825	0,89376
12	8,043	1,029504	6,9255	0,886464
13	7,934	1,015552	6,6405	0,849984
14	7,904	1,011712	6,608	0,845824
15	6,885	0,88128	6,2995	0,806336
16	6,9095	0,884416	6,421	0,821888
17	6,6555	0,851904	6,401	0,819328
18	5,7335	0,733888	6,382	0,816896

Anexo 2 . Parámetros de pH y ° Brix en muestras de fresa durante el proceso de ultracongelación

Día	Parámetros de pH y ° Brix en muestras			
	Sin Recubrimiento		Con Recubrimiento	
	pH	Solidos Solubles (° Brix)	pH	Solidos Solubles (° Brix)
1	3,77	8,60	3,78	8,80
2	3,75	8,50	3,77	8,80
3	3,76	8,45	3,81	8,70
4	3,75	8,45	3,80	8,80
5	3,81	8,61	3,85	8,71
6	3,78	8,55	3,82	8,70
7	3,78	8,55	3,84	8,85
8	3,81	8,30	3,97	8,15
9	3,82	8,65	3,89	8,90
10	3,82	8,80	3,87	8,60
11	3,80	8,55	3,87	8,50
12	3,90	8,95	3,96	8,65
13	3,89	9,00	3,87	8,50
14	3,82	9,15	3,93	8,00
15	4,10	9,05	3,90	8,75
16	4,17	9,05	4,01	8,50
17	4,24	9,25	4,03	8,85
18	4,49	9,35	4,10	8,95

Anexo 3. Determinación de concentración de glucosa por método DNS

Días	Absorbancia	Concentración de glucosa (mg/ml)
0	0,8966	21,4613
1	0,8486	20,0863
2	0,7733	17,9293
3	0,7054	15,9843
4	0,6576	14,6151
5	0,5966	12,8677
6	0,5496	11,5214
7	0,4566	8,8574
8	0,2486	2,8992
9	0,298	4,3142
10	0,2301	2,3692
11	0,1056	-1,1971
12	0,0676	-2,2856
13	0,0496	-2,8012
14	0,0246	-3,5174

Anexo 4. *Conteo de aerobios mesófilos, mohos y levaduras en muestras de fresa*

Medios	Temperatura	Días	Tiempo (h)	Sin recubrimiento UFC/g		Con recubrimiento UFC/g	
PDA	4°C	Lunes	0	1,00E+05	1,00E+05	6,00E+05	8,00E+05
		Miércoles	48	1,00E+05	1,00E+05	1,10E+06	1,30E+06
		Jueves	72	2,00E+05	2,00E+05	9,00E+05	1,50E+06
		Viernes	96	6,00E+05	5,00E+05	2,10E+06	1,90E+06
		Lunes	168	8,00E+06	6,00E+06	4,00E+06	3,50E+06
	25°C	Lunes	0	2,00E+05	4,00E+05	1,00E+05	3,00E+05
		Miércoles	48	3,50E+06	4,10E+06	1,20E+06	9,00E+05
		Jueves	72	8,70E+06	9,10E+06	2,00E+06	2,20E+06
		Viernes	96	1,24E+07	1,31E+07	4,90E+06	5,20E+06
		Lunes	168	2,61E+07	2,54E+07	8,70E+06	9,30E+06
	37°C	Lunes	0	3,00E+05	9,00E+05	4,00E+05	6,00E+05
		Miércoles	48	6,50E+06	7,90E+06	4,50E+06	3,60E+06
		Jueves	72	1,24E+07	1,45E+07	8,90E+06	9,10E+06
		Viernes	96	3,10E+07	3,00E+07	1,45E+07	1,39E+07
		Lunes	168	3,00E+07	3,00E+07	1,32E+07	1,20E+07

Nutriente	4°C	Lunes	0	2,00E+04	2,60E+04	3,00E+03	3,00E+03
		Miércoles	48	3,50E+04	4,10E+04	6,00E+03	5,00E+03
		Jueves	72	8,10E+04	9,20E+04	1,00E+04	8,00E+03
		Viernes	96	6,10E+04	8,70E+04	1,10E+04	1,30E+04
		Lunes	168	1,02E+05	1,15E+05	3,00E+04	3,20E+04
	25°C	Lunes	0	1,00E+03	1,00E+03	3,00E+03	2,00E+03
		Miércoles	48	8,90E+04	9,60E+04	1,00E+04	1,00E+04
		Jueves	72	1,34E+05	1,47E+05	4,90E+04	5,30E+04
		Viernes	96	3,00E+05	3,00E+05	7,10E+04	7,30E+04
		Lunes	168	3,00E+05	3,00E+05	1,62E+05	1,49E+05
	37°C	Lunes	0	1,00E+03	1,00E+03	6,00E+03	9,00E+03
		Miércoles	48	1,23E+05	1,25E+05	9,80E+04	9,20E+04
		Jueves	72	3,00E+05	3,00E+05	1,54E+05	1,52E+05
		Viernes	96	3,00E+05	3,00E+05	3,00E+05	3,00E+05
		Lunes	168	3,00E+05	3,00E+05	4,51E+05	4,54E+05

Anexo 5. Determinación de orden de reacción en fresa sin recubrimiento

PDA	Orden de reacción (4°C)						
	(A) 1	LN (A) 1	1/(A) 1		(A) 1	LN (A) 1	1/(A) 1
	1,00E+05	1,15E+01	1,00E-05	a	-1,58E+06	1,08E+01	1,05E-05
	2,00E+05	1,22E+01	5,00E-06	bx	4,13E+04	2,70E-02	-6,70E-08
	5,50E+05	1,32E+01	1,82E-06	R^2	7,17E-01	8,93E-01	8,32E-01
	7,00E+06	1,58E+01	1,40E-07				
	7,00E+06	1,58E+01	3,33E-06				
	Orden de reacción (25°C)						
	(A) 1	LN (A) 1	1/(A) 1		(A) 1	LN (A) 1	1/(A) 1
	3,00E+05	1,26E+01	3,33E-06	a	-1,73E+06	1,29E+01	2,05E-06
	3,80E+06	1,52E+01	2,63E-07	bx	1,57E+05	4,00E-02	-1,70E-08
	8,90E+06	1,60E+01	1,12E-07	R^2	9,74E-01	9,56E-01	5,26E-01
	1,28E+07	1,64E+01	7,80E-08				
	2,58E+07	1,71E+01	3,90E-08				
	Orden de reacción (37°C)						
	(A) 1	LN (A) 1	1/(A) 1		(A) 1	LN (A) 1	1/(A) 1
	6,00E+05	1,33E+01	1,67E-06	a	-2,57E+06	1,35E+01	1,03E-06
	7,20E+06	1,58E+01	1,39E-07	bx	2,87E+05	4,10E-02	-8,00E-09
	1,35E+07	1,64E+01	7,43E-08	R^2	8,04E-01	7,39E-01	5,24E-01
	3,05E+07	1,72E+01	3,28E-08				
	3,00E+07	1,72E+01	3,33E-08				
NUTRITIVO	Orden de reacción (4°C)						
	(A) 1	LN (A) 1	1/(A) 1		(A) 1	LN (A) 1	1/(A) 1
	2,30E+04	1,00E+01	4,35E-05	a	2,60E+04	1,02E+01	3,60E-05
	3,80E+04	1,05E+01	2,63E-05	bx	5,21E+02	9,30E-03	-1,98E-07
	8,65E+04	1,14E+01	1,16E-05	R^2	8,51E-01	8,59E-01	7,38E-01
	7,40E+04	1,12E+01	1,35E-05				
	1,09E+05	1,16E+01	9,22E-06				
	Orden de reacción (25°C)						
	(A) 1	LN (A) 1	1/(A) 1		(A) 1	LN (A) 1	1/(A) 1
	1,00E+03	6,91E+00	1,00E-03	a	1,90E+04	8,72E+00	5,90E-04
	9,25E+04	1,14E+01	1,08E-05	bx	1,92E+03	3,08E-02	-4,97E-06
	1,41E+05	1,19E+01	7,12E-06	R^2	8,26E-01	6,42E-01	4,83E-01
	3,00E+05	1,26E+01	3,33E-06				
	3,00E+05	1,26E+01	3,33E-06				

Orden de reacción (37°C)						
(A) 1	LN (A) 1	1/(A) 1		(A) 1	LN (A) 1	1/(A) 1
1,00E+03	6,91E+00	1,00E-03	a	6,55E+04	7,61E+00	5,85E-04
1,24E+05	1,17E+01	8,06E-06	bx	1,82E+03	6,22E-02	-4,97E-06
3,00E+05	1,26E+01	3,33E-06	R^2	6,76E-01	8,67E-01	4,80E-01
3,00E+05	1,26E+01	3,33E-06				
3,00E+05	1,26E+01	3,33E-06				

Anexo 6. Determinación de orden de reacción en fresa con recubrimiento.

PDA	Orden de reacción (4°C)						
	(A) 1	LN (A) 1	1/(A) 1		(A) 1	LN (A) 1	1/(A) 1
	7,00E+05	1,35E+01	1,43E-06	a	3,46E+05	1,34E+01	1,29E-06
	1,20E+06	1,40E+01	8,33E-07	bx	1,85E+04	1,00E-02	-6,72E-09
	1,20E+06	1,40E+01	8,33E-07	R^2	9,21E-01	9,73E-01	9,09E-01
	2,00E+06	1,45E+01	5,00E-07				
	3,75E+06	1,51E+01	2,67E-07				
	Orden de reacción (25°C)						
	(A) 1	LN (A) 1	1/(A) 1		(A) 1	LN (A) 1	1/(A) 1
	2,00E+05	1,22E+01	5,00E-06	a	-8,09E+05	1,27E+01	3,34E-06
	1,05E+06	1,39E+01	9,52E-07	bx	5,58E+04	2,27E-02	-2,59E-08
	2,10E+06	1,46E+01	4,76E-07	R^2	9,35E-01	9,99E-01	6,05E-01
	5,05E+06	1,54E+01	1,98E-07				
	9,00E+06	1,60E+01	1,11E-07				
	Orden de reacción (37°C)						
	(A) 1	LN (A) 1	1/(A) 1		(A) 1	LN (A) 1	1/(A) 1
	5,00E+05	1,31E+01	2,00E-06	a	1,98E+06	1,33E+01	1,26E-06
	4,05E+06	1,52E+01	2,47E-07	bx	7,93E+04	3,57E-02	-9,89E-09
	9,00E+06	1,60E+01	1,11E-07	R^2	7,32E-01	9,76E-01	5,34E-01
	1,42E+07	1,65E+01	7,04E-08				
	1,26E+07	1,63E+01	7,94E-08				
Orden de reacción (4°C)							
(A) 1	LN (A) 1	1/(A) 1		(A) 1	LN (A) 1	1/(A) 1	
3,00E+03	8,01E+00	3,33E-04	a	-9,63E+02	8,01E+00	2,82E-04	
5,50E+03	8,61E+00	1,82E-04	bx	1,70E+02	1,40E-02	-1,74E-06	
9,00E+03	9,11E+00	1,11E-04	R^2	9,43E-01	9,95E-01	8,57E-01	
1,20E+04	9,39E+00	8,33E-05					
3,10E+04	1,03E+01	3,23E-05					

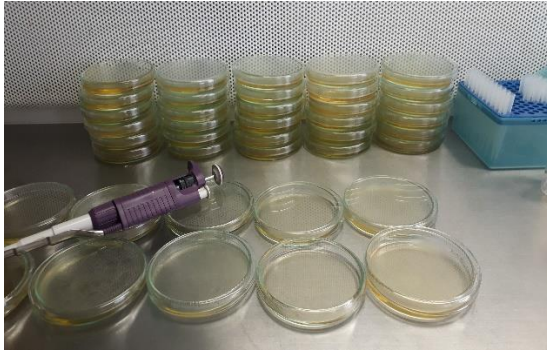
Orden de reacción (25°C)						
(A) 1	LN (A) 1	1/(A) 1		(A) 1	LN (A) 1	1/(A) 1
2,50E+03	7,82E+00	4,00E-04	a	-6,27E+03	8,28E+00	2,71E-04
1,00E+04	9,21E+00	1,00E-04	bx	7,43E+02	2,51E-02	-2,13E-06
5,10E+04	1,08E+01	1,96E-05	R^2	9,43E-01	9,59E-01	6,22E-01
7,20E+04	1,12E+01	1,39E-05				
1,56E+05	1,20E+01	6,43E-06				
Orden de reacción (37°C)						
(A) 1	LN (A) 1	1/(A) 1		(A) 1	LN (A) 1	1/(A) 1
7,50E+03	8,92E+00	1,33E-04	a	5,46E+03	9,04E+00	8,25E-05
9,50E+04	1,15E+01	1,05E-05	bx	1,99E+03	4,35E-02	-6,68E-07
1,53E+05	1,19E+01	6,54E-06	R^2	9,65E-01	9,66E-01	5,26E-01
3,00E+05	1,26E+01	3,33E-06				
4,53E+05	1,30E+01	2,21E-06				

NUTRITIVO

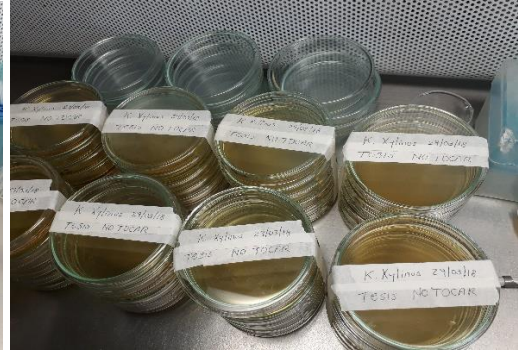
Anexo 7. Pérdida de peso en mermelada de fresa durante 18 días de estudio

Días	Pérdida de Peso			
	Impregnación de gelatina natural		Sellamiento de extremos con de gelatina natural	
	Peso	% Perdida	Peso	% Perdida
0	37,46	0,00	82,66	0,00
3	36,25	3,23	78,23	5,36
6	34,37	8,25	71,06	14,03
9	32,59	13,00	69,64	15,75
12	32,11	14,28	68,12	17,59
15	32,02	14,52	67,80	17,98
18	31,72	15,32	66,30	19,79

Anexo 8. Siembra de *K. Xylinus* en medio HS



Anexo 9. Producción de celulosa bacteriana



Anexo 10. Lavado de Celulosa bacteriana



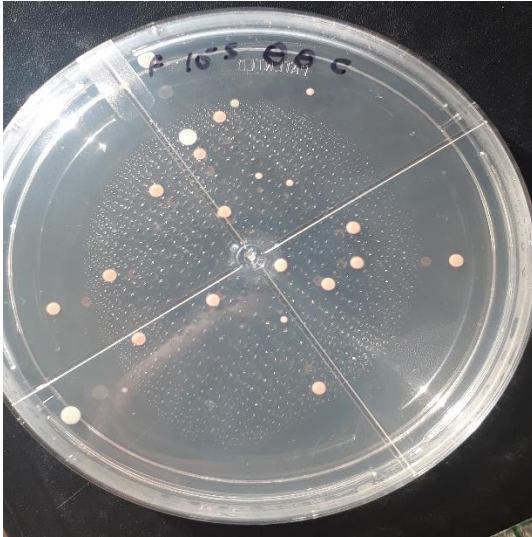
Anexo 11. Biofilm de CB óptima para recubrimiento



Anexo 12. Fresa con recubrimiento (izquierda) y sin recubrimiento (derecha) antes de tratamientos.



Anexo 13. Recuento de aerobios mesófilos dilución 10^{-5} de muestra almacenada a 25°C



Anexo 14. Recuento de mohos y levaduras dilución 10^{-5} de muestra almacenada a 4°C

