



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Análisis cinético de la producción de ácido glucónico empleando residuos de cáscara de piña.

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Krystel Patricia Solís Castro

Tutor: Mg. María Eugenia García Pazmiño

Ambato – Ecuador

Julio – 2026

APROBACIÓN DEL TUTOR

Mg. María Eugenia García Pazmiño

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 5 de Junio de 2026

Mg. María Eugenia García Pazmiño

21XXXXXX05

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Krystel Patricia Solís Castro, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Krystel Patricia Solís Castro

08XXXXXX61

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga uso de este Informe Final del 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 Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, 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.



Krystel Patricia Solís Castro

08XXXXXX61

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción 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

Mg. Danae Fernandez Rivero

17XXXXXXX09

Mg. Gabriela Elena Vizuite Fiallos

17XXXXXXX13

Ambato, 19 de Junio de 2026

DEDICATORIA

*Dedico este trabajo, en primer lugar, a mis padres, **Patricio Solis** y **Fany Castro**, por ser la base más importante de mi vida y el motor que me ha impulsado a alcanzar cada una de mis metas. Gracias por su amor incondicional, por cada sacrificio silencioso, por cada consejo, por cada palabra de aliento y por estar presentes en cada etapa de mi crecimiento personal y académico.*

Durante todos estos años han sido mi mayor apoyo, acompañándome en los momentos de alegría, pero también en aquellos días difíciles en los que el cansancio, la incertidumbre o el miedo parecían más fuertes que mis ganas de continuar. Gracias por creer en mí incluso cuando yo misma dudaba de mis capacidades, por enseñarme el valor de la perseverancia, la responsabilidad y el esfuerzo, y por recordarme siempre que los sueños se alcanzan con trabajo y determinación.

Nada de esto habría sido posible sin ustedes. Detrás de cada logro, cada examen aprobado, cada obstáculo superado y cada página escrita de esta tesis, se encuentran su dedicación, sus sacrificios y el inmenso amor con el que han guiado mi camino. Gracias por darme las herramientas para convertirme en la persona que soy hoy y por motivarme a seguir adelante aun cuando el camino parecía difícil.

Este logro no me pertenece únicamente a mí; también es suyo. Es el reflejo de años de esfuerzo compartido, de apoyo incondicional y de una confianza que nunca me faltó. Con todo mi amor, admiración y gratitud, les dedico este trabajo, porque ustedes han sido y siempre serán mi mayor inspiración.

*A mi querida **Nena**, mi fiel compañera durante esta etapa tan importante de mi vida. quien ya no se encuentra físicamente conmigo, pero cuyo recuerdo permanece siempre en mi corazón. Gracias por la compañía, el cariño y los momentos de alegría que me brindaste durante tantos años. Fuiste parte importante de mi vida y también de esta etapa de*

formación, acompañándome en momentos de estudio, descanso y dificultad. Aunque partiste antes de ver culminado este logro, tu recuerdo sigue presente y ocupa un lugar especial en esta dedicatoria, porque siempre formarás parte de mi historia.

*A mis amigos y colegas **Jennifer Pinto** y **Sebastián Pérez**, quienes formaron parte de esta importante etapa de mi vida universitaria. Gracias por su amistad, apoyo, compañía y por todos los momentos compartidos dentro y fuera de las aulas. Los aprendizajes, experiencias y recuerdos contruidos durante estos años hicieron que este camino fuera más especial y llevadero. Me alegra haber compartido con ustedes esta etapa que hoy culmina con la consecución de una meta tan importante para nuestras vidas profesionales.*

*A **Jonathan Robayo**, por acompañarme durante los últimos años de mi vida universitaria, brindándome apoyo, comprensión y fortaleza cuando más lo necesité. Gracias por impulsarme a seguir adelante, por creer en mis capacidades incluso en los momentos en que yo misma dudaba y por ser parte de los esfuerzos, sacrificios y aprendizajes que hicieron posible alcanzar esta meta. Este logro representa también una etapa compartida, llena de experiencias y recuerdos que atesoraré con cariño.*

Finalmente, a mí misma, por la fortaleza y perseverancia demostradas a lo largo de este camino. Detrás de esta investigación existen horas de trabajo, esfuerzo, incertidumbre, aprendizaje, errores y desafíos que pusieron a prueba mi paciencia y determinación. Hubo momentos en los que el camino parecía difícil, pero cada obstáculo se convirtió en una oportunidad para crecer y aprender. Hoy comprendo que esta tesis representa mucho más que un requisito académico; representa el resultado de años de dedicación, disciplina y sueños que poco a poco fueron tomando forma.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, doy gracias a Dios por el regalo de la vida, por cuidar de mí, guiar mis pasos y darme la fortaleza necesaria para seguir adelante incluso en los momentos más difíciles.

A la Mg. María Eugenia García Pazmiño, tutora de esta investigación, por su guía, paciencia, dedicación y valiosos conocimientos. Su acompañamiento fue fundamental para el desarrollo y culminación de este trabajo.

A la Ing. Isabel Guerrero, por su constante disposición para ayudarme, por compartir sus conocimientos y por brindarme su apoyo durante las actividades de laboratorio. Su colaboración fue de gran importancia durante el desarrollo de esta investigación.

A la Ing. Valeria Flores y a la Ing. Patricia Dávalos, por su apoyo, orientación y contribución durante la fase experimental de este trabajo. Sus recomendaciones y enseñanzas enriquecieron significativamente este proceso.

A mi compañero de carrera, José Pinto, por la amistad y las experiencias compartidas durante estos años de formación. Gracias por hacer más llevadero este camino y por formar parte de tantos momentos importantes.

A la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, por brindarme los conocimientos, espacios y oportunidades que contribuyeron a mi crecimiento académico y profesional.

Finalmente, a la Universidad Técnica de Ambato, institución que me abrió sus puertas y me permitió construir las bases de mi futuro profesional.

A todos ustedes, gracias por creer en mí, por acompañarme en este recorrido y por aportar, de una u otra manera, a la realización de este sueño. Este logro también lleva una parte de cada una de las personas que estuvieron presentes durante este camino.

Krystel Patricia Solís Castro

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	iii
DERECHOS DE AUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO	viii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
RESUMEN EJECUTIVO	xv
ABSTRACT.....	xvi
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO	1
1.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	1
1.1.1. Justificación del problema	1
1.1.2. Aprovechamiento de residuos agroindustriales	2
1.1.3. Ácido glucónico.....	4
1.1.3.1. Características y aplicaciones.....	4
1.1.3.2. Producción biotecnológica	5
1.1.4. Bacterias ácido acéticas	8
1.1.4.1. <i>Gluconobacter oxydans</i> y metabolismo oxidativo	9
1.1.5. Kombucha como fuente microbiana	10
1.1.5.1. Microbiota y potencial biotecnológico.....	10
1.1.6. Medios de cultivo microbiológicos.....	12
1.1.6.1. Medio GYC y composición.....	13
□ Glucosa.....	13
□ Extracto de levadura.....	13
□ Carbonato de calcio (CaCO ₃)	14
□ Agar bacteriológico	14
1.1.6.2. Uso del medio para bacterias acéticas.....	14
1.1.7. Fermentación y factores que afectan el proceso fermentativo.....	15
1.1.7.1. Fermentación aerobia	15

1.1.7.2.	Factores fisicoquímicos.....	15
1.1.8.	Técnicas analíticas y cinética microbiana.....	18
1.1.8.1.	Espectrofotometría UV-Vis aplicada al estudio de <i>Gluconobacter oxydans</i> .	18
1.1.8.2.	Determinación del crecimiento microbiano mediante DO600 en <i>Gluconobacter oxydans</i>	19
1.1.8.3.	Cuantificación espectrofotométrica del ácido glucónico a 540 nm	20
1.1.8.4.	Relación entre crecimiento microbiano (DO600) y producción de ácido glucónico en <i>Gluconobacter oxydans</i>	21
1.1.8.5.	Cinética fermentativa de <i>Gluconobacter oxydans</i> y producción de ácido glucónico	22
1.2.	OBJETIVOS.....	23
1.2.1.	Objetivo general.....	23
1.2.2.	Objetivos Específicos.....	23
CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA		24
2.1.	Materiales	24
2.2.	Métodología	26
2.2.1.	Aislar y selección de cepas de <i>gluconobacter oxydans</i>	26
2.2.2.	Evaluación de la producción de ácido glucónico mediante espectrofotometría utilizando extracto de cáscara de piña como sustrato	28
2.2.2.2.	Fermentación con <i>Gluconobacter oxydans</i>	29
2.2.2.3.	Cuantificación espectrofotométrica del ácido glucónico	30
2.2.3.	Determinación de la cinética de crecimiento de <i>Gluconobacter oxydans</i> y producción de ácido glucónico durante el proceso fermentativo	31
2.2.3.1.	Variables experimentales para el estudio cinético	31
2.2.3.2.	Construcción de curvas cinéticas de crecimiento y producción.....	32
2.2.3.3.	Determinación de la velocidad específica de crecimiento (μ)	33
2.2.3.4.	Determinación de parámetros cinéticos de producción de ácido glucónico.....	34
CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN		36
3.1.	Análisis y discusión de los resultados	36
3.1.1.	Obtención y selección de cepas de <i>Gluconobacter oxydans</i>	36
3.1.1.1.	Selección y confirmación preliminar de cepas.....	37
3.1.2.	Evaluación de la producción de ácido glucónico mediante espectrofotometría utilizando extracto de cáscara de piña como sustrato.....	41
3.1.2.1.	Preparación del extracto de cáscara de piña	41
3.1.2.2.	Seguimiento del proceso Fermentativo con <i>Gluconobacter oxydans</i>	43
3.1.2.3.	Construcción de la curva de calibración del ácido glucónico	44

3.1.2.4. Cuantificación espectrofotométrica del ácido glucónico.....	46
3.1.3. Determinación de la cinética de crecimiento de <i>Gluconobacter oxydans</i> y producción de ácido glucónico	52
3.1.3.1. Velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (td).....	52
3.1.3.2. Velocidad volumétrica de producción (rp).....	53
3.1.3.3. Relación producto/biomasa (Y_p/x).....	53
3.1.3.4. Ajuste de los datos experimentales al Modelo matemático de Luedeking– Piret Integral	55
CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	57
4.1. Conclusiones	57
4.2. Recomendaciones.....	59
BIBLIOGRAFÍA	60
ANEXOS	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición y generación de residuos de piña	2
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>Gluconobacter oxydans</i>	9
Tabla 3. Composición microbiana reportada en el consorcio fermentativo de kombucha y su relación con la producción de ácido glucónico.....	11
Tabla 4. Recursos y Materiales necesarios para la investigación.....	24
Tabla 5. Cuantificación espectrofotométrica de ácido glucónico durante el proceso fermentativo.	46
Tabla 6. Análisis cinético de la producción de ácido glucónico durante la fermentación.	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Componentes y compuestos valorizables de los residuos de piña.	3
Figura 2. Estructura química del ácido glucónico	5
Figura 3. Oxidación parcial de glucosa y formación de ácido glucónico y derivados en <i>Gluconobacter oxydans</i>	6
Figura 4. Principales rutas oxidativas involucradas en la producción de ácido glucónico y derivados catalizadas por enzimas deshidrogenasas dependientes de PQQ en <i>Gluconobacter oxydans</i>	7
Figura 5. Morfología microscópica de bacterias ácido-acéticas del género <i>Gluconobacter</i>	8
Figura 6. Actividad metabólica principal del té Kombucha	12
Figura 7. Crecimiento microbiano inicial posterior a la siembra de kombucha en medio GYC.	36
Figura 8. Observación microscópica de cepas bacterianas seleccionadas mediante tinción de Gram.	38
Figura 9. Evaluación preliminar de actividad catalasa en cepas bacterianas seleccionadas...	39
Figura 10. Crecimiento posterior y purificación preliminar de colonias bacterianas seleccionadas en medio GYC-CaCO ₃	40
Figura 11. Preparación del extracto de cáscara de piña utilizado como sustrato fermentativo.	42
Figura 12. Fermentación de <i>Gluconobacter oxydans</i> utilizando extracto de cáscara de piña.	43
Figura 13. Curva estándar de ácido glucónico obtenida mediante espectrofotometría UV-Vis.	45
Figura 14. Curva de crecimiento de <i>Gluconobacter oxydans</i> durante la fermentación.	49
Figura 15. Producción de ácido glucónico durante la fermentación.....	50
Figura 16. Variación del pH durante la fermentación.	51

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 . Crecimiento inicial de colonias de <i>Gluconobacter oxydans</i> en medio sólido.....	65
Anexo 2. Desarrollo y aumento poblacional de colonias de <i>Gluconobacter oxydans</i>	65
Anexo 3. Crecimiento avanzado de <i>Gluconobacter oxydans</i> en placa de cultivo.	66
Anexo 4. Variación morfológica y crecimiento heterogéneo de colonias bacterianas.	66
Anexo 5. Preparación y siembra de <i>Gluconobacter oxydans</i> en medio sólido.....	67
Anexo 6. Determinación del pH del medio fermentativo.....	67
Anexo 7. Extracto de cáscara de piña utilizado como sustrato fermentativo.	68
Anexo 8. Observación de precipitación de carbonato de calcio en medio inoculado con.....	68
Anexo 9. Manejo microbiológico durante el cultivo bacteriano.	69
Anexo 10. Observación microscópica de <i>Gluconobacter oxydans</i> mediante tinción bacteriana.	69

RESUMEN EJECUTIVO

La generación de residuos agroindustriales derivados del procesamiento de piña constituye una problemática ambiental debido al volumen de biomasa descartada. Sin embargo, estos residuos contienen azúcares fermentables que pueden aprovecharse en procesos biotecnológicos. El objetivo de esta investigación fue analizar el comportamiento cinético de la producción de ácido glucónico empleando cáscara de piña como sustrato. Para ello, se aislaron bacterias compatibles con *Gluconobacter oxydans* a partir de kombucha mediante cultivo en medio GYC suplementado con carbonato de calcio, seleccionando aquellas con capacidad acidificante. La identificación preliminar incluyó tinción de Gram y pruebas bioquímicas. Posteriormente, se realizaron fermentaciones utilizando extracto de cáscara de piña como fuente de carbono. El crecimiento microbiano fue evaluado mediante densidad óptica y la producción de ácido glucónico se determinó por espectrofotometría a quinientos cuarenta nm mediante el método colorimétrico basado en hidroxilamina y cloruro férrico. Los resultados evidenciaron la capacidad de las cepas aisladas para desarrollarse en el sustrato y producir ácido glucónico durante la fermentación. Se concluye que la cáscara de piña constituye una materia prima viable para la producción biotecnológica de ácido glucónico y una alternativa sostenible para el aprovechamiento de residuos agroindustriales.

Palabras clave: *Gluconobacter oxydans*, ácido glucónico, cáscara de piña, fermentación aerobia, análisis cinético.

ABSTRACT

The generation of agro-industrial residues derived from pineapple processing represents an environmental concern due to the large amount of discarded biomass. However, these residues contain fermentable sugars that can be utilized in biotechnological processes. The aim of this research was to analyze the kinetic behavior of gluconic acid production using pineapple peel as substrate. For this purpose, bacteria compatible with *Gluconobacter oxydans* were isolated from kombucha through cultivation on GYC medium supplemented with calcium carbonate, selecting those with acidifying capacity. Preliminary identification included Gram staining and biochemical tests. Subsequently, fermentations were carried out using pineapple peel extract as a carbon source. Microbial growth was evaluated by optical density, while gluconic acid production was determined by spectrophotometry at Five hundred forty nm using a colorimetric method based on hydroxylamine and ferric chloride. The results demonstrated the ability of the isolated strains to grow on the substrate and produce gluconic acid during fermentation. It was concluded that pineapple peel constitutes a viable raw material for the biotechnological production of gluconic acid and a sustainable alternative for the valorization of agro-industrial residues.

Keywords: *Gluconobacter oxydans*, *gluconic acid*, *pineapple peel*, *aerobic fermentation*, *kinetic analysis*.

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

1.1.1. Justificación del problema

La generación de residuos agroindustriales representa una problemática ambiental asociada al incremento de las actividades de producción y procesamiento de alimentos. Cuando estos residuos no son gestionados adecuadamente, pueden ocasionar contaminación del suelo y acumulación de materia orgánica en descomposición, generando impactos ambientales negativos (**Shcherbakova-Sandu et al., 2025**). Frente a esta situación, el aprovechamiento biotecnológico de biomasa residual ha adquirido relevancia como una alternativa sostenible orientada a la valorización de subproductos agrícolas y a la obtención de compuestos de interés industrial (**Ma et al., 2022**).

Entre los residuos derivados del procesamiento de frutas, la cáscara de piña (*Ananas comosus*) presenta potencial para aplicaciones biotecnológicas debido a su contenido de azúcares fermentables y otros compuestos orgánicos aprovechables en procesos microbianos. Según **Celis Cabeza et al. (2024)**, este subproducto representa una proporción considerable del peso total del fruto, generando grandes volúmenes de desechos durante las actividades de comercialización y procesamiento. A pesar de ello, existe limitada información sobre el comportamiento cinético de *Gluconobacter oxydans*, utilizando extracto de cáscara de piña para producción de ácido glucónico (**Dai et al., 2023**).

El ácido glucónico es un compuesto ampliamente utilizado en industrias alimentarias, farmacéuticas y químicas debido a sus propiedades como agente quelante y regulador de acidez (**Ma et al., 2022**). Su producción mediante bacterias ácido-acéticas como *G. oxydans* ha despertado interés debido a la capacidad de este microorganismo para oxidar glucosa de manera eficiente utilizando diferentes fuentes de carbono provenientes de biomasa residual (**Dai, Lian, et al., 2022**).

En este contexto, evaluar la producción de ácido glucónico por *G. oxydans* empleando extracto de cáscara de piña como sustrato fermentativo, no solo representa una alternativa de valorización de residuos agroindustriales, sino también una oportunidad para generar información experimental sobre el comportamiento cinético del proceso fermentativo, contribuyendo al desarrollo de estrategias biotecnológicas sostenibles y ampliando el

conocimiento sobre el aprovechamiento fermentativo de residuos agroindustriales para la producción de metabolitos de interés industrial. (**Hidayatullah et al., 2025**).

1.1.2. Aprovechamiento de residuos agroindustriales

En la actualidad, el aprovechamiento de residuos agroindustriales ha adquirido relevancia dentro de estrategias de economía circular y producción sostenible. **Banerjee et al., (2021)** indican que la valorización de residuos de piña permite generar productos de valor agregado a partir de biomasa residual. En concordancia con ello, **Paz-Arteaga et al. (2023)**, mencionan que el bioprocesamiento de residuos de piña mediante fermentación y bioconversión microbiana constituye una alternativa sostenible para la obtención de metabolitos de interés industrial. Asimismo, **Sarangi et al. (2022)** y **Meena et al. (2021)** coinciden en que la reutilización de estos residuos como fuente de carbono representa una estrategia prometedora para el desarrollo de procesos fermentativos con aplicación biotecnológica.

1.1.2.1. Producción y residuos de piña

La piña (*Ananas comosus*) de acuerdo a **Rivera et al. (2022)**, constituye una de las frutas tropicales de mayor importancia en la industria alimentaria debido a su elevada producción y amplia comercialización a nivel mundial, como consecuencia de estas actividades, se generan grandes cantidades de residuos agroindustriales, principalmente la cáscara, corona, núcleo y bagazo de la piña. Según **Meena et al. (2021)**, estos subproductos representan una proporción considerable del peso total del fruto y generalmente son descartados tras el procesamiento. De acuerdo con **Banerjee et al., (2021)**, entre el 45 % y 60 % de la biomasa de la piña termina convertida en residuo.

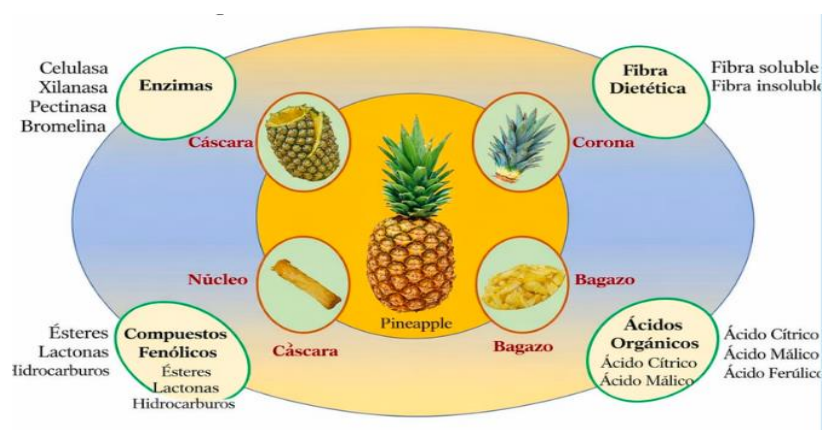
Tabla 1. Composición y generación de residuos de piña

Componente	Porcentaje (%)
Pulpa (parte comestible)	40 – 55%
Cáscara	30 – 40%
Núcleo (corazón)	7 – 15%
Corona	10 – 15%
Residuo total	45 – 60% del fruto

Nota. Fuente de **Banerjee et al., 2021**.

La acumulación inadecuada de residuos de piña favorece procesos de descomposición microbiológica (Saini et al., 2022). De acuerdo con Sarangi et al. (2022), estos residuos presentan una elevada carga orgánica, humedad y azúcares fermentables, características que aceleran el deterioro y la formación de lixiviados. Asimismo, Meena et al. (2021), reportan que la cáscara de piña contiene carbohidratos fermentables como glucosa, fructosa y sacarosa, además de fibra dietética y compuestos fenólicos con potencial funcional que pueden ser provecho como fuente de carbono.

Figura 1. Componentes y compuestos valorizables de los residuos de piña.



Nota. Fuente de Banerjee et al., 2021.

1.1.2.2.Potencial Biotecnológico

Los residuos derivados del procesamiento de piña poseen un importante potencial biotecnológico debido a su contenido de carbohidratos, fibra y compuestos orgánicos aprovechables en procesos fermentativos. Según Khan. (2026), estos subproductos presentan aplicaciones funcionales y biotecnológicas que favorecen su utilización para la obtención de productos de valor agregado. De manera similar, Banerjee et al. (2021) y Dhar et al., (2024), señalan que la valorización de residuos de piña mediante estrategias de biorrefinería constituye una alternativa sostenible para reducir desechos agroindustriales y generar compuestos de interés industrial.

De acuerdo a Saini et al., (2022), el aprovechamiento de residuos de piña representa una estrategia sostenible orientada a la economía circular y obtener metabolitos y bioproductos de valor agregado. Según Paz-Arteaga et al. (2023), el bioprocesamiento de estos residuos

mediante fermentación permite obtener metabolitos de interés industrial, contribuyendo a la reducción del impacto ambiental asociado a los desechos agroindustriales.

Entre los metabolitos de mayor interés industrial obtenidos a partir de residuos de piña destacan diversos ácidos orgánicos, como ácido cítrico, ácido láctico y ácido glucónico (**Saini et al., 2022**). Este último ha despertado especial interés debido a sus aplicaciones como agente quelante, acidulante y precursor en diferentes procesos industriales, razón por la cual constituye uno de los principales productos biotecnológicos derivados de la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos (**Ma et al., 2022**).

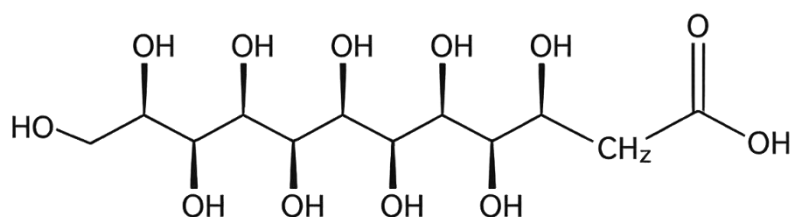
1.1.3. Ácido glucónico

El ácido glucónico es un ácido orgánico obtenido a partir de la oxidación parcial de la glucosa, ampliamente empleado en las industrias alimentaria, farmacéutica, química y de tratamiento de aguas debido a su alta solubilidad en agua, capacidad quelante de minerales y metales, baja toxicidad y biodegradabilidad. Según **Ma et al. (2022)**, este compuesto puede obtenerse mediante procesos químicos y biotecnológicos, destacándose la fermentación aerobia con microorganismos oxidativos como *Gluconobacter oxydans*, capaces de transformar la glucosa en ácido glucónico mediante enzimas asociadas a la membrana celular. Asimismo **Setiawan & Chiang (2021)**, señalan que este ácido posee capacidad para interactuar con minerales y compuestos metálicos, lo que incrementa su interés en aplicaciones industriales y ambientales.

1.1.3.1. Características y aplicaciones

Las aplicaciones del ácido glucónico abarcan industrias alimentarias, farmacéuticas, químicas y de tratamiento de materiales. Según **Ma et al. (2022)**, este compuesto es utilizado como regulador de acidez, aditivo alimentario y agente quelante en formulaciones industriales. De igual manera, **Gomes et al. (2018)** reportan que los derivados del ácido glucónico tienen importancia en la industria alimentaria debido a su estabilidad y compatibilidad con diferentes procesos de producción. Además, **da Silva et al. (2022)**, señalan que la producción de ácido glucónico mediante bacterias ácido-acéticas, especialmente *Gluconobacter oxydans*, ha adquirido relevancia biotecnológica por la capacidad de este microorganismo para oxidar glucosa de manera eficiente y selectiva.

Figura 2. Estructura química del ácido glucónico



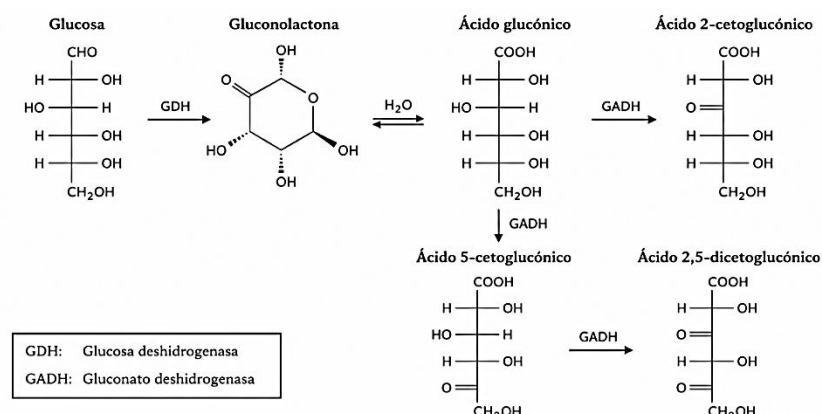
Nota. Estructura molecular del ácido glucónico ($C_6H_{12}O_7$), compuesta por una cadena carbonada con un grupo carboxilo terminal y múltiples grupos hidroxilo. Elaborado con base en la información estructural reportada por (Ma et al., 2022).

1.1.3.2. Producción biotecnológica

La producción biotecnológica de ácido glucónico se basa principalmente en la oxidación incompleta de la glucosa mediante microorganismos capaces de transformar este sustrato en condiciones aerobias. Según Hermann et al. (2004), este proceso consiste en la conversión del grupo aldehído de la glucosa en un grupo carboxilo, sin que ocurra la degradación completa de la molécula, permitiendo la acumulación de ácido glucónico como producto principal. Asimismo, Sheng et al. (2024), reportan que *Gluconobacter oxydans* posee una eficiente actividad catalítica para la oxidación de glucosa, favoreciendo la producción de ácido glucónico incluso en sustratos provenientes de biomasa lignocelulósica.

La actividad catalítica de *G. oxydans* se basa en la acción de enzimas deshidrogenasas localizadas en la membrana celular, las cuales participan en la oxidación incompleta de la glucosa. Como se observa en la Figura 3, la glucosa es transformada inicialmente en gluconolactona mediante la acción de la glucosa deshidrogenasa (GDH), para posteriormente convertirse en ácido glucónico. Además, el ácido glucónico puede continuar oxidándose y dar lugar a derivados como el ácido 2-cetoglucónico, ácido 5-cetoglucónico y ácido 2,5-diketoglucónico, dependiendo de la actividad de otras enzimas oxidativas presentes en la bacteria (Hermann et al., 2004).

Figura 3. Oxidación parcial de glucosa y formación de ácido glucónico y derivados en *Gluconobacter oxydans*

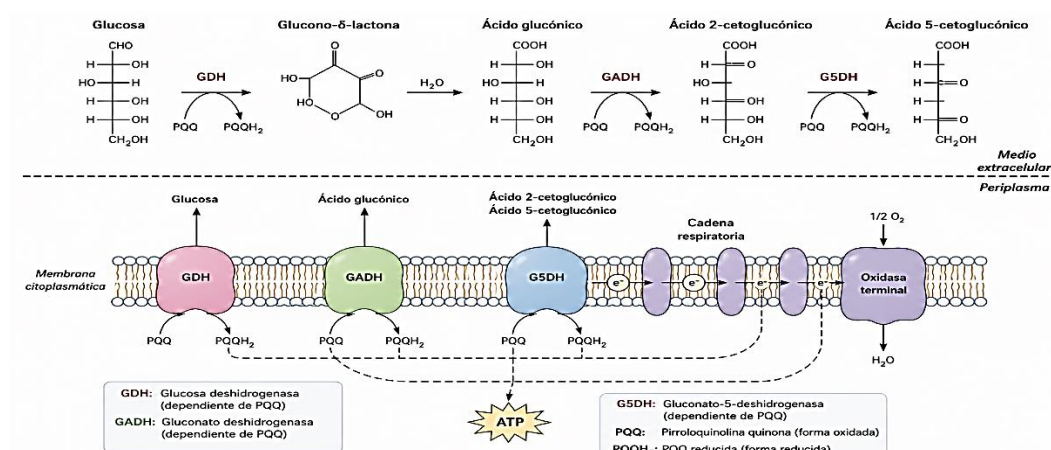


Nota. La oxidación de glucosa a ácido glucónico ocurre mediante la acción de la enzima glucosa deshidrogenasa (GDH) dependiente de pirroloquinolina quinona (PQQ), localizada en la membrana celular de *Gluconobacter oxydans*. Adaptado de **Hermann et al. (2004)**.

La conversión de glucosa a ácido glucónico ocurre mediante enzimas deshidrogenasas dependientes de pirroloquinolina quinona (PQQ), localizadas en la membrana celular de *Gluconobacter oxydans*. Según **da Silva et al. (2022)**, este microorganismo destaca por su versatilidad metabólica y su capacidad de oxidar diferentes compuestos sin requerir la incorporación completa del sustrato al metabolismo celular.

En concordancia con ello, **Hermann et al. (2004)**, describen la transformación de glucosa hacia ácido glucónico mediante rutas oxidativas catalizadas por enzimas específicas. La principal ruta oxidativa inicia con la conversión de glucosa en glucono- δ -lactona mediante la acción de la enzima glucosa deshidrogenasa dependiente de pirroloquinolina quinona (PQQ-GDH), localizada en la membrana citoplasmática externa de *G. oxydans* (**Hermann et al., 2004**). Posteriormente, la glucono- δ -lactona se hidroliza espontáneamente o mediante lactonasas hasta formar ácido glucónico, el cual se acumula extracelularmente debido a la limitada capacidad del microorganismo para metabolizar completamente este compuesto (**da Silva et al., 2022**).

Figura 4. Principales rutas oxidativas involucradas en la producción de ácido glucónico y derivados catalizadas por enzimas deshidrogenasas dependientes de PQQ en *Gluconobacter oxydans*.



Nota. La oxidación incompleta de glucosa en *G. oxydans* Adaptado (Ripoll et al., 2023).

Además de la PQQ-glucosa deshidrogenasa, *Gluconobacter oxydans* presenta otras enzimas oxidativas de membrana involucradas en la transformación sucesiva del ácido glucónico. Entre ellas destaca la gluconato-2-deshidrogenasa (GADH), responsable de oxidar ácido glucónico hacia ácido 2-cetoglucónico, y la gluconato-5-deshidrogenasa, implicada en la formación de ácido 5-cetoglucónico (Li et al., 2016). Estas rutas oxidativas secundarias forman parte del metabolismo oxidativo periplásmico característico del microorganismo y dependen directamente de la disponibilidad de oxígeno y de la actividad de la cadena transportadora de electrones (Sheng et al., 2024). Las condiciones hidrodinámicas y de aireación influyen significativamente en la expresión de estas enzimas y, por tanto, en la velocidad de producción de ácido glucónico (Liu et al., 2023).

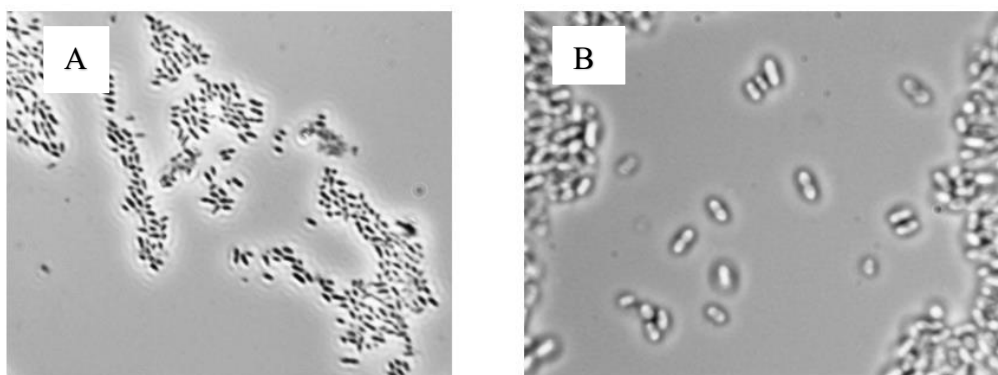
Durante la fermentación, la glucosa disponible es oxidada progresivamente por las deshidrogenasas de membrana, favoreciendo la acumulación extracelular de ácido glucónico y la disminución gradual del pH del medio Dai, Jiang, et al. (2022), reportan que la eficiencia de conversión depende directamente de la transferencia de oxígeno y de la actividad de las enzimas oxidativas asociadas a membrana. Asimismo, Lian et al. (2022), señalan que una adecuada aireación incrementa significativamente la actividad oxidativa de *G. oxydans*, promoviendo mayores rendimientos de ácido glucónico durante fermentaciones aerobias prolongadas.

1.1.4. Bacterias ácido acéticas

Las bacterias ácido-acéticas, según **Gomes et al. (2018)**, constituyen un grupo de microorganismos Gram negativos caracterizados por su capacidad de oxidar parcialmente carbohidratos y alcoholes mediante enzimas asociadas a membrana, generando productos como ácido acético y ácido glucónico sin completar la oxidación hasta dióxido de carbono y agua **Deppenmeier & Ehrenreich, (2009)**, describen que estas bacterias pertenecen principalmente a la familia *Acetobacteraceae* y presentan un metabolismo oxidativo asociado a procesos fermentativos utilizados en la industria alimentaria.

En la actualidad, el estudio de bacterias ácido-acéticas ha adquirido interés debido a su potencial en procesos sostenibles de bioconversión y aprovechamiento de biomasa residual. **Wang et al. (2022)**, señalan que estos microorganismos poseen capacidad de adaptarse a diferentes sustratos ricos en azúcares fermentables, mientras que **Mandlaa et al. (2025)**, destacan su importancia en fermentaciones complejas asociadas a la producción de ácidos orgánicos, principalmente ácido acético y ácido glucónico. Asimismo, **Noman et al. (2020)** mencionan que el potencial metabólico de *Gluconobacter oxydans* favorece el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas relacionadas con la producción de ácido glucónico, ácido 2-ceto-D-glucónico y ácido 5-ceto-D-glucónico, metabolitos de interés industrial utilizados en las industrias alimentaria, farmacéutica y química, algunas cepas de *G. oxydans* presentan capacidad para producir estos compuestos mediante procesos oxidativos específicos.

Figura 5. Morfología microscópica de bacterias ácido-acéticas del género *Gluconobacter*.



Nota. Las células de *Gluconobacter oxydans*. A) Agrupación celular observada microscópicamente. B) Morfología bacilar corta u ovoide característica del género. Adaptado de **Olijve & Kok, (1979)**.

1.1.4.1. *Gluconobacter oxydans* y metabolismo oxidativo

Gluconobacter oxydans pertenece al grupo de bacterias ácido-acéticas caracterizadas por presentar un metabolismo oxidativo altamente eficiente y una elevada capacidad para transformar diferentes compuestos carbonados (Mamlouk & Gullo, 2013). Este microorganismo se desarrolla principalmente en ambientes ricos en azúcares y sistemas fermentativos naturales, donde participa activamente en procesos de oxidación incompleta y producción de metabolitos orgánicos de interés industrial (Ripoll et al., 2023). Su presencia ha sido reportada en bebidas fermentadas como la kombucha, en la cual forma parte del consorcio simbiótico de bacterias y levaduras responsable de diversas transformaciones metabólicas (Wang et al., 2022a). Investigaciones recientes han reportado cepas del género *Gluconobacter* aisladas de kombucha con potencial biotecnológico y elevada actividad oxidativa, caracterizada por la oxidación parcial de glucosa a ácido glucónico mediante enzimas deshidrogenasas localizadas en la membrana celular (Neffe-Skocińska et al., 2024).

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Gluconobacter oxydans*

Clasificación Taxonómica	
Categoría:	Clasificación:
Dominio:	Bacteria
Phylum:	Proteobacteria
Clase:	<i>Alphaproteobacteria</i>
Orden:	<i>Rhodospirillales</i>
Familia:	<i>Acetobacteraceae</i>
Género:	<i>Gluconobacter</i>
Especie:	<i>Gluconobacter oxydans</i>

Nota. Adaptado de Deppenmeier & Ehrenreich 2009.

Desde el punto de vista fisiológico, este microorganismo se caracteriza por ser una bacteria Gram negativa y aerobia estricta con elevada actividad oxidativa asociada a enzimas localizadas en la membrana. Estas enzimas permiten oxidar rápidamente azúcares y alcoholes sin incorporar completamente el sustrato al metabolismo intracelular, favoreciendo la acumulación de metabolitos en el medio extracelular (Mamlouk & Gullo, 2013). Las deshidrogenasas dependientes de membrana participan directamente en la transferencia de

electrones durante la oxidación de glucosa y otros compuestos carbonados (**Kitova et al., 2021**).

1.1.5. Kombucha como fuente microbiana

La kombucha es una bebida fermentada elaborada a partir de té azucarado y un cultivo simbiótico de bacterias y levaduras conocido como SCOBY (*Symbiotic Culture of Bacteria and Yeast*) compuesto principalmente por bacterias ácido-acéticas de los géneros *Komagataeibacter*, *Gluconobacter* y *Acetobacter*, junto con levaduras como *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* y *Brettanomyces*. Durante el proceso de fermentación, los microorganismos presentes transforman los azúcares del medio en diversos metabolitos orgánicos, generando compuestos de interés funcional y biotecnológico (**Neffe-Skocińska et al., 2023**).

En los últimos años, la kombucha ha despertado interés científico debido a sus propiedades microbiológicas, actividad metabólica y potencial aplicación en diferentes áreas industriales y biotecnológicas (**Kapp & Sumner, 2019**). Además, su proceso fermentativo involucra una compleja interacción microbiana responsable de la formación de ácidos orgánicos y otros compuestos bioactivos (**Villarreal-Soto et al., 2018**).

1.1.5.1. Microbiota y potencial biotecnológico

En el sistema fermentativo las bacterias ácido-acéticas representan uno de los grupos microbianos predominantes debido a su capacidad de oxidar azúcares y alcoholes bajo condiciones aeróbicas (**Neffe-Skocińska et al., 2023**). Estos microorganismos participan activamente en la producción de ácidos orgánicos y compuestos derivados del metabolismo oxidativo, contribuyendo a las características fisicoquímicas y microbiológicas de la bebida fermentada. Diversos estudios han reportado la presencia de bacterias pertenecientes a la familia *Acetobacteraceae*, reconocidas por su relevancia biotecnológica reconocidas por su relevancia biotecnológica debido a sus aplicaciones en la producción de vinagre, ácido glucónico, ácidos cetoglucónicos y procesos de bioconversión de carbohidratos (**Villarreal-Soto et al., 2018**). De igual manera, la actividad metabólica de estas bacterias favorece la formación de metabolitos asociados a procesos de bioconversión y fermentación microbiana (**Wang et al., 2022**).

Tabla 3. Composición microbiana reportada en el consorcio fermentativo de kombucha y su relación con la producción de ácido glucónico.

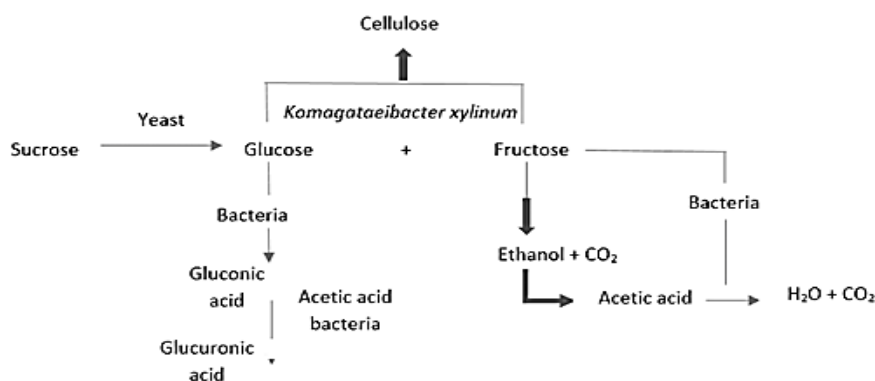
Grupo microbiano	Género / microorganismo	Función principal en la kombucha	Relación con la producción de ácido glucónico
Levaduras	<i>Saccharomyces</i>	Fermentación de azúcares y producción de etanol y CO ₂	Genera sustratos aprovechables por bacterias ácido-acéticas
Levaduras	<i>Zygosaccharomyces</i>	Tolerancia a medios ácidos y fermentación de sacarosa	Favorece la disponibilidad de glucosa y fructosa
Levaduras	<i>Brettanomyces</i>	Producción de metabolitos secundarios durante la fermentación	Contribuye al equilibrio microbiano del SCOBY
Levaduras	<i>Candida</i>	Participación en fermentación y metabolismo de carbohidratos	Interviene indirectamente en la formación de ácidos orgánicos
Levaduras	<i>Pichia</i>	Producción de compuestos fermentativos y etanol	Apoya el metabolismo bacteriano posterior
Bacterias ácido-acéticas	<i>Gluconobacter</i>	Oxidación incompleta de glucosa y alcoholes	Producción directa de ácido glucónico mediante PQQ-GDH
Bacterias ácido-acéticas	<i>Acetobacter</i>	Oxidación de etanol hacia ácido acético	Participa en la acidificación del medio
Bacterias ácido-acéticas	<i>Komagataeibacter</i>	Producción de biocelulosa y oxidación de compuestos orgánicos	Mantiene la estructura del SCOBY y estabilidad fermentativa

Nota. La kombucha corresponde a un cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY), compuesto principalmente por bacterias ácido-acéticas y levaduras fermentativas capaces de

transformar azúcares en diferentes metabolitos orgánicos. Dentro de este consorcio, *Gluconobacter sp.* desempeña un papel importante en la oxidación parcial de glucosa hacia ácido glucónico mediante deshidrogenasas dependientes de PQQ. Adaptado de **Chen & Liu (2000); Deppenmeier & Ehrenreich (2009); Gomes et al. (2018); Ripoll et al. (2023).**

El SCOBY de acuerdo a **Villarreal-Soto et al. (2018)** constituye una matriz biológica compuesta principalmente por bacterias ácido-acéticas y levaduras, las cuales mantienen una relación simbiótica durante la fermentación. Las levaduras hidrolizan la sacarosa presente en el medio para producir glucosa y fructosa, mientras que las bacterias utilizan estos compuestos para generar metabolitos como ácido glucónico, ácido glucurónico y ácido acético. Esta interacción metabólica favorece la estabilidad del sistema fermentativo y la acumulación de compuestos de interés industrial. Asimismo, la composición microbiana de la kombucha puede variar dependiendo de las condiciones de fermentación, tipo de sustrato y origen del SCOBY utilizado (**Wang et al., 2022**).

Figura 6. Actividad metabólica principal del té Kombucha



Nota. Representación esquemática del metabolismo microbiano presente en la fermentación de kombucha. Las levaduras hidrolizan la sacarosa en glucosa y fructosa, mientras que bacterias ácido-acéticas oxidan estos compuestos para producir ácido glucónico, ácido glucurónico y ácido acético. Adaptado de (**Villarreal-Soto et al., 2018**).

1.1.6. Medios de cultivo microbiológicos

Los medios de cultivo microbiológicos son preparaciones nutritivas empleadas para el crecimiento, aislamiento y mantenimiento de microorganismos en condiciones controladas. Su composición general incluye fuentes de carbono, nitrógeno, minerales, vitaminas y, en el caso de medios sólidos, agentes gelificantes que permiten cubrir los requerimientos nutricionales

necesarios para el desarrollo celular y la actividad metabólica microbiana (**Sharafi et al., 2010**).

1.1.6.1. Medio GYC y composición

El medio GYC (glucosa–extracto de levadura–carbonato de calcio–agar) es un medio de cultivo sólido utilizado para el crecimiento y evaluación de microorganismos con capacidad de producir ácidos orgánicos (**Sharafi et al., 2010**). Su formulación proporciona las condiciones nutricionales necesarias para el desarrollo microbiano y permite evidenciar cambios metabólicos asociados a la oxidación de carbohidratos y producción de metabolitos ácidos (**Mamlouk & Gullo, 2013**). Debido a estas características, el medio GYC ha sido ampliamente utilizado en estudios microbiológicos relacionados con fermentación, metabolismo oxidativo y producción de metabolitos de interés biotecnológico (**Ripoll et al., 2023**).

➤ Glucosa

La glucosa constituye la principal fuente de carbono y energía dentro del medio GYC, siendo el sustrato fundamental para la producción de ácido glucónico por *Gluconobacter oxydans*. Este microorganismo utiliza glucosa mediante sistemas oxidativos de membrana dependientes de pirroloquinolina quinona (PQQ), oxidándola inicialmente a glucono- δ -lactona y posteriormente a ácido glucónico (**Ma et al., 2022**). La presencia de glucosa favorece directamente la actividad metabólica oxidativa y la transferencia de electrones hacia la cadena respiratoria, permitiendo la acumulación extracelular de ácidos orgánicos durante el crecimiento bacteriano (**Mamlouk & Gullo, 2013**). Además, la disponibilidad adecuada de glucosa incrementa la actividad de enzimas deshidrogenasas asociadas a la membrana celular, condición esencial para procesos fermentativos relacionados con producción de ácido glucónico y bioconversión de azúcares fermentables (**Li et al., 2016**).

➤ Extracto de levadura

El extracto de levadura actúa como fuente de nitrógeno orgánico, vitaminas del complejo B, aminoácidos y factores de crecimiento indispensables para el desarrollo de *Gluconobacter oxydans* (**Sharafi et al., 2010**). Debido a que esta bacteria presenta elevada actividad respiratoria y rápida demanda metabólica durante la oxidación de glucosa, requiere compuestos nitrogenados que favorezcan la síntesis de proteínas, enzimas oxidativas y componentes celulares asociados al metabolismo aerobio (**Ripoll et al., 2023**). Asimismo, el extracto de levadura contribuye al mantenimiento de la viabilidad celular y estabilidad metabólica durante

el crecimiento bacteriano, favoreciendo condiciones adecuadas para la producción sostenida de ácido glucónico y otros metabolitos oxidativos (K. Li et al., 2016).

➤ **Carbonato de calcio (CaCO₃)**

El carbonato de calcio (CaCO₃) cumple una función importante dentro del medio GYC como agente indicador y regulador parcial de acidez durante el crecimiento de bacterias ácido-acéticas (Sharafi et al., 2010). Durante la oxidación de glucosa, *Gluconobacter oxydans* produce ácidos orgánicos que disminuyen progresivamente el pH del medio; en presencia de CaCO₃, estos ácidos generando halos de solubilización alrededor de las colonias bacterianas, indicador visual de actividad oxidativa y producción de ácidos orgánicos (Mamlouk & Gullo, 2013). Además, el carbonato de calcio ayuda a amortiguar parcialmente los cambios extremos de acidez, favoreciendo condiciones más estables para la actividad metabólica y respiratoria de *G. oxydans* durante procesos fermentativos asociados a oxidación de carbohidratos y producción de ácido glucónico (Ma et al., 2022).

➤ **Agar bacteriológico**

El agar funciona como agente solidificante del medio GYC, permitiendo el crecimiento superficial y la diferenciación de colonias de *Gluconobacter oxydans* durante el aislamiento microbiológico. Aunque el agar no aporta nutrientes directamente, proporciona estabilidad física al medio y facilita la observación de halos de solubilización generados por la producción de ácidos orgánicos alrededor de las colonias bacterianas (Sharafi et al., 2010). Esta característica facilita evaluar visualmente la actividad oxidativa de *Gluconobacter* y seleccionar microorganismos con capacidad de oxidar glucosa y producir ácido glucónico bajo condiciones aerobias (Ripoll et al., 2023).

1.1.6.2. Uso del medio para bacterias acéticas

El medio GYC ha sido ampliamente empleado en estudios microbiológicos relacionados con bacterias ácido-acéticas debido a su capacidad para favorecer el crecimiento y evaluación preliminar de microorganismos con metabolismo oxidativo (Sharafi et al., 2010). Su composición permite evidenciar la producción de ácidos orgánicos mediante la formación de halos de solubilización alrededor de las colonias bacterianas, constituyendo un indicador visual de actividad acidificante y oxidativa (Mamlouk & Gullo, 2013).

En bacterias ácido-acéticas como *Gluconobacter oxydans*, la oxidación incompleta de carbohidratos y la liberación extracelular de ácidos orgánicos generan modificaciones visibles en el medio, facilitando la diferenciación y selección preliminar de cepas con capacidad metabólica oxidativa **(Ripoll et al., 2023)**. Debido a estas características, el medio GYC ha sido utilizado en procesos de aislamiento y evaluación microbiológica orientados a identificar microorganismos con potencial biotecnológico asociados a fermentación y producción de metabolitos de interés **(Ma et al., 2022)**.

1.1.7. Fermentación y factores que afectan el proceso fermentativo

1.1.7.1. Fermentación aerobia

La fermentación aerobia corresponde a un proceso metabólico desarrollado en presencia de oxígeno, donde los microorganismos utilizan este elemento como aceptor final de electrones durante las reacciones de oxidación celular **(Mamlouk & Gullo, 2013)**. En este proceso, los compuestos orgánicos son transformados mediante rutas oxidativas que permiten la obtención de energía y la formación de metabolitos de interés biotecnológico **(Ripoll et al., 2023)**.

Las bacterias ácido-acéticas presentan estrecha relación con la fermentación aerobia debido a su metabolismo oxidativo asociado a enzimas localizadas en membrana, responsables de la oxidación incompleta de carbohidratos y alcoholes bajo condiciones aerobias **(Deppenmeier & Ehrenreich, 2009)**. Este comportamiento metabólico favorece la acumulación extracelular de compuestos orgánicos, entre ellos ácidos derivados del metabolismo oxidativo, utilizados en diferentes procesos fermentativos e industriales **(Ma et al., 2022)**.

En microorganismos como *Gluconobacter oxydans*, la fermentación aerobia constituye la base fisiológica para la oxidación parcial de glucosa y la producción de ácido glucónico, proceso mediado por sistemas deshidrogenasa asociados a membrana y dependiente de condiciones adecuadas de cultivo **(Liu et al., 2023)**. Debido a ello, el control de factores fisicoquímicos como pH, temperatura, disponibilidad de sustrato y oxigenación resulta determinante para mantener la actividad metabólica y eficiencia fermentativa del microorganismo **(Li et al., 2016)**.

1.1.7.2. Factores fisicoquímicos

Los factores fisicoquímicos influyen directamente sobre el crecimiento microbiano, la actividad metabólica y la eficiencia de los procesos fermentativos **(Li et al., 2016)**. Variables

como el pH, temperatura, disponibilidad de oxígeno, concentración de sustrato y tiempo de fermentación pueden modificar la velocidad de crecimiento celular y la producción de metabolitos durante la fermentación **(Ma et al., 2022)**. El control adecuado de estas condiciones permite optimizar los procesos microbiológicos y favorecer la estabilidad metabólica de los microorganismos empleados en fermentación **(Ripoll et al., 2023)**.

➤ pH

El pH representa un factor determinante para el crecimiento y actividad oxidativa de *Gluconobacter oxydans*, debido a su influencia directa sobre la estabilidad celular y el funcionamiento de enzimas de membrana involucradas en la oxidación de glucosa. Las bacterias ácido-acéticas suelen desarrollarse en medios moderadamente ácidos, condición que favorece su metabolismo respiratorio y la producción de ácidos orgánicos **(Mamlouk & Gullo, 2013)**. Los rangos de pH cercanos a 4,5–6,0 favorecen la actividad metabólica y el mantenimiento de la integridad fisiológica necesaria para la producción de ácido glucónico **(Ortiz-Cortés et al., 2021)**. Durante la fermentación, la acumulación progresiva de ácido glucónico ocasiona disminución del pH, fenómeno característico del metabolismo oxidativo del microorganismo; sin embargo, valores excesivamente ácidos pueden afectar la actividad enzimática y limitar la eficiencia productiva **(Ma et al., 2022)**.

➤ Temperatura

La temperatura influye directamente sobre la velocidad de crecimiento y la actividad catalítica de *Gluconobacter oxydans*, especialmente sobre las deshidrogenasas asociadas a membrana responsables de la oxidación incompleta de carbohidratos. Este microorganismo presenta comportamiento mesófilo, desarrollando crecimiento y metabolismo oxidativo más eficientes generalmente entre 28 y 30 °C **(Ortiz-Cortés et al., 2021)**. Temperaturas inferiores reducen la actividad metabólica y prolongan los tiempos fermentativos, mientras que temperaturas elevadas pueden provocar inestabilidad enzimática y estrés fisiológico celular **(Ma et al., 2022)**. Según **Ripoll et al. (2023)**, el control térmico adecuado resulta fundamental para mantener la actividad oxidativa de *Gluconobacter* y favorecer la síntesis sostenida de metabolitos derivados de la oxidación de glucosa, entre ellos el ácido glucónico.

➤ Oxígeno

El oxígeno constituye uno de los factores más críticos para *Gluconobacter oxydans*, debido a que esta bacteria desarrolla un metabolismo estrictamente aerobio basado en sistemas respiratorios localizados en la membrana celular (**Deppenmeier & Ehrenreich, 2009**). La producción de ácido glucónico ocurre mediante deshidrogenasas dependientes de PQQ acopladas a transferencia de electrones, por lo que la disponibilidad de oxígeno influye directamente sobre la velocidad de oxidación de glucosa y acumulación del metabolito. **Lian et al. (2022)**, demostraron que el incremento en transferencia de oxígeno favorece significativamente la fermentación aerobia y mejora los rendimientos de ácido glucónico en *G. oxydans*. De manera complementaria, **Ripoll et al. (2023)**, destacan que la eficiencia de biotransformación oxidativa del microorganismo depende estrechamente del mantenimiento de condiciones adecuadas de aireación y respiración celular.

➤ Concentración de sustrato

La concentración de sustrato constituye un factor esencial para la producción de ácido glucónico, debido a que la glucosa representa la principal fuente de carbono oxidada por *Gluconobacter oxydans*. La disponibilidad adecuada de azúcares fermentables favorece la actividad de glucosa deshidrogenasa y mantiene activa la oxidación incompleta característica del microorganismo (**Li et al., 2016**). Sin embargo, concentraciones insuficientes limitan la síntesis del metabolito, mientras que concentraciones excesivas pueden alterar el equilibrio osmótico y afectar la estabilidad fisiológica bacteriana (**Ma et al., 2022**). **Dai, Jiang, et al. (2022)** reportan que la eficiencia de conversión hacia ácidos orgánicos depende directamente de la disponibilidad del sustrato y de su aprovechamiento por las rutas oxidativas de membrana, aspecto particularmente importante cuando se emplean residuos agroindustriales ricos en azúcares como fuente de carbono.

➤ Tiempo de fermentación.

El tiempo de fermentación determina la dinámica de crecimiento y acumulación de ácido glucónico durante el metabolismo oxidativo de *Gluconobacter oxydans*. La producción del metabolito puede iniciar desde etapas tempranas del proceso debido a la rápida oxidación extracelular de glucosa mediada por PQQ-glucosa deshidrogenasa, aumentando progresivamente conforme se incrementa la actividad metabólica bacteriana (**Liu et al.,**

2023). Estudios sobre fermentaciones prolongadas muestran que la acumulación de metabolitos orgánicos responde al comportamiento cinético del microorganismo y a la disponibilidad continua de oxígeno y sustrato (**Chen & Liu, 2000**). **Sheng et al. (2024)**, señalan que la mayor producción suele observarse durante la fase exponencial tardía y transición hacia fase estacionaria, pudiendo mantenerse posteriormente una acumulación gradual bajo condiciones aerobias favorables, comportamiento compatible con producción parcialmente asociada al crecimiento.

1.1.8. Técnicas analíticas y cinética microbiana

Las técnicas analíticas representan herramientas fundamentales para evaluar el comportamiento microbiológico y metabólico durante los procesos fermentativos. Estas metodologías permiten cuantificar compuestos de interés, monitorear el crecimiento celular y analizar la producción de metabolitos generados durante la actividad microbiana (**Ma et al., 2022**). En estudios relacionados con fermentación y producción de ácidos orgánicos, las técnicas analíticas facilitan el seguimiento de cambios fisicoquímicos y metabólicos asociados al desarrollo microbiano (**Ripoll et al., 2023**). Asimismo, el análisis cinético permite interpretar el comportamiento del crecimiento celular y la evolución de metabolitos a lo largo del tiempo, contribuyendo a la evaluación de la eficiencia fermentativa y del metabolismo microbiano (**Kovárová-Kovar & Egli, 1998**).

1.1.8.1. Espectrofotometría UV-Vis aplicada al estudio de *Gluconobacter oxydans*

La espectrofotometría UV-Visible constituye una herramienta analítica ampliamente utilizada en estudios fermentativos con *G. oxydans*, debido a su capacidad para monitorear simultáneamente el crecimiento microbiano y la producción de metabolitos derivados de su metabolismo oxidativo. Su fundamento se basa en la Ley de Beer-Lambert, la cual establece que la absorbancia es proporcional a la concentración del compuesto analizado y al trayecto óptico recorrido por la radiación incidente (**Deppenmeier & Ehrenreich, 2009**)

$$A = \varepsilon \cdot L \cdot c$$

Ecuación 1. Ley de Beer-Lambert

Donde:

- **A** = absorbancia
- **ε** = coeficiente de absortividad molar
- **L** = longitud del trayecto óptico

- c = concentración del compuesto analizado

En estudios relacionados con *G. oxydans*, la espectrofotometría UV-Vis presenta dos aplicaciones principales que permiten describir el comportamiento fermentativo del microorganismo. La primera corresponde a la medición de densidad óptica a 600 nm (DO600), empleada para estimar el crecimiento celular y concentración relativa de biomasa bacteriana. La segunda se relaciona con la lectura de absorbancia a 540 nm, utilizada para cuantificar ácido glucónico mediante métodos colorimétricos específicos basados en la formación de complejos coloreados **(Mandlaa et al., 2025)**. La combinación de ambas determinaciones posibilita analizar simultáneamente la dinámica de crecimiento y la producción metabólica durante la fermentación de *G. oxydans* **(Ripoll et al., 2023)**.

1.1.8.2. Determinación del crecimiento microbiano mediante DO600 en *Gluconobacter oxydans*

El crecimiento de *G. oxydans* durante procesos fermentativos puede evaluarse mediante la medición de densidad óptica a 600 nm (DO600), técnica espectrofotométrica indirecta ampliamente utilizada para estimar la concentración relativa de biomasa bacteriana en cultivos líquidos **(Mamlouk & Gullo, 2013)**. Esta metodología resulta particularmente útil en bacterias ácido-acéticas debido a que el incremento celular produce aumento de turbidez en el medio, fenómeno que puede relacionarse con la dispersión de la luz y, por tanto, con el desarrollo microbiano **(Villarreal-Soto et al., 2018)**.

En *G. oxydans*, la medición de DO600 adquiere especial relevancia debido a su metabolismo oxidativo asociado a membrana y a la estrecha relación existente entre crecimiento celular y actividad de sus sistemas deshidrogenasa dependientes de PQQ **(Deppenmeier & Ehrenreich, 2009)**. A medida que la biomasa aumenta, también se incrementa el número de sitios enzimáticos capaces de oxidar glucosa y transformar el sustrato en ácido glucónico, permitiendo relacionar el crecimiento bacteriano con la eficiencia fermentativa del proceso **(Ripoll et al., 2023)**.

La lectura a 600 nm se selecciona porque esta longitud de onda minimiza interferencias asociadas a pigmentos y componentes solubles presentes en el medio de cultivo, permitiendo registrar principalmente la turbidez generada por la suspensión bacteriana **(Sheng et al., 2024)**. En consecuencia, la absorbancia obtenida no representa directamente metabolitos ni

concentración química específica, sino un indicador relativo del crecimiento celular de *G. oxydans* durante la fermentación (Mamlouk & Gullo, 2013).

1.1.8.3. Cuantificación espectrofotométrica del ácido glucónico a 540 nm

La cuantificación del ácido glucónico producido por *Gluconobacter oxydans* constituye una etapa fundamental para evaluar la eficiencia fermentativa y el comportamiento metabólico del microorganismo durante la oxidación de glucosa. Esta bacteria ácido-acética posee sistemas deshidrogenasa localizados en la membrana celular capaces de catalizar la oxidación incompleta de carbohidratos, permitiendo la acumulación extracelular de ácido glucónico como uno de sus principales metabolitos oxidativos (Deppenmeier & Ehrenreich, 2009). Debido a ello, la determinación cuantitativa del ácido glucónico permite monitorear directamente la actividad metabólica de *G. oxydans* y relacionarla con su crecimiento y rendimiento fermentativo (Ripoll et al., 2023)

El ácido glucónico producido por *G. oxydans* no presenta absorbancia significativa en la región visible que permita su determinación directa mediante espectrofotometría convencional (Albanese et al., 2014). Por esta razón, se emplean métodos colorimétricos indirectos basados en reacciones químicas que generan compuestos coloreados medibles espectrofotométricamente, procedimiento ampliamente utilizado para la cuantificación de metabolitos con grupos carboxílicos (Mandlaa et al., 2025)

El método colorimétrico utilizado para determinar ácido glucónico se basa en la reacción del metabolito con hidroxilamina, formando inicialmente un derivado hidroxamato. Posteriormente, este compuesto reacciona con iones férricos (Fe^{3+}) provenientes del cloruro férrico (FeCl_3), generando un complejo hidroxamato-férrico de color rojizo o púrpura cuya intensidad es proporcional a la concentración del ácido glucónico presente en la muestra (Li et al., 2016). Este complejo presenta máxima absorbancia cercana a 540 nm, longitud de onda empleada para la lectura espectrofotométrica y cuantificación del metabolito producido durante la fermentación (Zhu et al., 2013).

El procedimiento colorimétrico comprende dos etapas consecutivas:

➤ **Formación del derivado hidroxamato**

El ácido glucónico generado durante la fermentación por *G. oxydans* reacciona con la hidroxilamina formando un derivado hidroxamato.

➤ **Formación del complejo coloreado hidroxamato–férrico**

El hidroxamato formado reacciona posteriormente con Fe^{3+} procedente del cloruro férrico, originando un complejo coloreado con máxima absorbancia alrededor de 540 nm. La intensidad del color desarrollado mantiene una relación proporcional con la concentración de ácido glucónico presente en la muestra, permitiendo construir curvas de calibración y estimar cuantitativamente la producción del metabolito durante el proceso fermentativo (Shcherbakova-Sandu et al., 2025).

En fermentaciones con *G. oxydans*, esta metodología ha sido ampliamente empleada debido a su sensibilidad y reproducibilidad para monitorear cambios metabólicos asociados a la oxidación de glucosa y acumulación de ácido glucónico (Mandlaa et al., 2025). La combinación del seguimiento espectrofotométrico a 600 nm para biomasa y a 540 nm para ácido glucónico permite describir integralmente la cinética fermentativa de *G. oxydans*, relacionando el crecimiento bacteriano con la síntesis y acumulación del metabolito de interés (Ripoll et al., 2023).

1.1.8.4. Relación entre crecimiento microbiano (DO600) y producción de ácido glucónico en *Gluconobacter oxydans*

La relación entre crecimiento microbiano y producción de ácido glucónico en *G. oxydans* se encuentra estrechamente asociada a su metabolismo oxidativo característico. Este microorganismo produce ácido glucónico mediante la oxidación incompleta de glucosa catalizada por sistemas deshidrogenasa localizados en la membrana celular, particularmente enzimas dependientes de pirroloquinolina quinona (PQQ), responsables de la transferencia de electrones durante la oxidación extracelular del sustrato (Deppenmeier & Ehrenreich, 2009). Debido a este mecanismo fisiológico, la acumulación del metabolito mantiene una relación funcional con la actividad metabólica y el estado fisiológico del microorganismo (Li et al., 2016).

El crecimiento bacteriano estimado mediante densidad óptica a 600 nm (DO600) constituye un indicador indirecto de biomasa y refleja el incremento celular durante la fermentación. En *G. oxydans*, el aumento de biomasa suele acompañarse de mayor actividad oxidativa asociada a las enzimas de membrana responsables de la oxidación de glucosa, favoreciendo el inicio temprano de la producción de ácido glucónico bajo condiciones adecuadas de oxígeno y disponibilidad de sustrato (Ripoll et al., 2023). Por esta razón, la síntesis del metabolito puede detectarse desde etapas iniciales del crecimiento y continuar durante fases posteriores del proceso fermentativo (Lian et al., 2022).

La evaluación simultánea del crecimiento microbiano mediante DO600, la cuantificación espectrofotométrica del ácido glucónico a 540 nm y el seguimiento de cambios de pH permite interpretar integralmente la dinámica fermentativa de *G. oxydans*. Mientras la DO600 refleja la evolución de la biomasa, la absorbancia a 540 nm evidencia la acumulación del metabolito y la disminución progresiva del pH constituye un indicador indirecto de la actividad oxidativa y formación de ácidos orgánicos (Ripoll et al., 2023). En conjunto, estas variables permiten establecer relaciones entre crecimiento celular y producción metabólica, facilitando el análisis cinético y la evaluación del rendimiento fermentativo del sistema.

1.1.8.5. Cinética fermentativa de *Gluconobacter oxydans* y producción de ácido glucónico

La cinética fermentativa describe la evolución temporal del crecimiento microbiano, consumo de sustrato y formación de productos durante un proceso biotecnológico. En fermentaciones desarrolladas con *G. oxydans*, el análisis cinético permite evaluar cuantitativamente la relación entre biomasa bacteriana, disponibilidad de azúcares fermentables y acumulación de ácido glucónico, proporcionando información relevante sobre la eficiencia metabólica y el desempeño fermentativo del microorganismo (Liu et al., 2017). Este enfoque constituye una herramienta fundamental para comprender el comportamiento dinámico del proceso y optimizar las condiciones de producción del metabolito de interés (Ripoll et al., 2023).

El crecimiento de *G. oxydans* en sistemas fermentativos líquidos generalmente presenta las fases clásicas de desarrollo microbiano: latencia, fase exponencial y transición hacia fase estacionaria (Hölscher et al., 2008). Durante la fase de adaptación o latencia ocurre el ajuste fisiológico del microorganismo al medio de cultivo y la activación de sistemas metabólicos asociados al metabolismo oxidativo (Liu et al., 2023). Posteriormente, en la fase exponencial se incrementan progresivamente la biomasa y la actividad respiratoria, favoreciendo la oxidación de glucosa y la acumulación de ácido glucónico. Finalmente, durante la transición

hacia fase estacionaria, la velocidad de crecimiento disminuye debido a cambios en la disponibilidad de nutrientes, oxígeno y acumulación de metabolitos ácidos en el medio (Li et al., 2016).

El estudio cinético de fermentaciones con *G. oxydans* incluye la evaluación simultánea del crecimiento microbiano, producción del metabolito y utilización de sustrato, permitiendo calcular parámetros que describen el desempeño del sistema fermentativo (Liu et al., 2023). Entre los indicadores más empleados se encuentran la velocidad específica de crecimiento (μ), asociada al incremento de biomasa durante la fase exponencial; la productividad fermentativa, relacionada con la velocidad de acumulación del ácido glucónico por unidad de tiempo; y los coeficientes de rendimiento, utilizados para establecer relaciones entre biomasa, sustrato consumido y producto formado (Mamlouk & Gullo, 2013). Estos parámetros permiten comparar procesos fermentativos y evaluar la eficiencia de conversión del sistema biológico.

En consecuencia, el análisis cinético de *G. oxydans* constituye una herramienta fundamental para interpretar la relación entre crecimiento celular y producción de ácido glucónico, permitiendo describir cuantitativamente el comportamiento fermentativo y evaluar la eficiencia metabólica del microorganismo bajo diferentes condiciones de cultivo (Ripoll et al., 2023). La determinación de estos parámetros resulta especialmente relevante cuando se emplean sustratos alternativos ricos en carbohidratos, como el extracto de cáscara de piña utilizado en la presente investigación, debido a que facilita valorar su potencial biotecnológico y rendimiento en la producción de ácido glucónico (Dai, Jiang, et al., 2022).

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo general

Analizar el comportamiento cinético de la producción de ácido glucónico empleando cáscara de piña

1.2.2. Objetivos Específicos

- Aislar y seleccionar cepas de *Gluconobacter oxydans* con capacidad de fermentar extracto de cáscara de piña.
- Evaluar la producción de ácido glucónico mediante espectrofotometría utilizando extracto de cáscara de piña como sustrato.

- Determinar la cinética de crecimiento de *Gluconobacter oxydans* y la cinética de producción del metabolito durante el proceso fermentativo.

CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

2.1. Materiales

El presente trabajo de titulación fue de tipo experimental y se desarrolló en los laboratorios académicos de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato. Para el desarrollo experimental se emplearon diversos reactivos, materiales fungibles y equipos de laboratorio necesarios para el procesamiento del sustrato, cultivo microbiológico y evaluación de la producción de ácido glucónico a partir de cáscara de piña (*Ananas comosus*). La Tabla 3 presenta los materiales, reactivos y equipos utilizados durante la investigación.

Tabla 4. Recursos y Materiales necesarios para la investigación

Material	Cantidad
Reactivos	
Agua destilada	3,5 L
Glucosa (para el medio GYC y curvas)	15 g
Extracto de levadura	3.06 g
CaCO ₃ (Carbonato de calcio)	9.1 g
Agar Bacteriológico	6.01 g
Reactivo de hidroxilamina	3,47 g
Reactivo férrico ácido (FeCl ₃)	2,70 g
Ácido glucónico en polvo (reactivo analítico o grado $\geq 99\%$)	1g
Etanol 96%	1 L
Solución estándar de ácido glucónico	1 g/L
HCl para ajuste de pH	25 ml
NaOH 1 N (solo para lavado o ajuste externo)	10ml
Solución salina estéril (0,85%)	1 L

Material Fungible	
Puntas de micropipetas (10 - 100 μ l y 100 - 1000 μ l)	1 caja de cada una
Tubos de ensayo	20 unidades
Frascos de vidrio con tapa rosca estériles	8 unidades
Probeta (100 ml)	2 uni
Espátula o cucharilla de laboratorio	4 uni
Asa bacteriológica	1 uni
Parafilm o cinta para sellar placas	1 uni
Microtubos de 1.5mL	300
Tubos Falcon de 15 mL	50 unidades
Placas Petri estériles	15 unidades
Filtros Whatman N°1	2 cajas
Guantes de Nitrilo	2 cajas
Mascarillas	1 caja
Equipos	
Incubadora	1
Agitador orbital	1
Autoclave	1
pH-metro	1
Balanza analítica	1
Microscopio óptico	1
Cámara de flujo laminar	1
Micropipeta (10–100 μ L, 100–1000 μ L)	2 unidades
Mechero Bunsen o mechero de alcohol	1
Refrigerador / Congelador	1
Espectrofotómetro UV-Vis (lectura 540 nm)	1
Laptop para análisis de datos	1
<i>Nota.</i> Elaboración propia.	

2.2. Metodología

2.2.1. Aislar y selección de cepas de *gluconobacter oxydans*

2.2.1.1. Aislamiento y siembra de las muestras

El aislamiento selectivo de bacterias ácido-acéticas oxidativas se realizó utilizando medio GYC (glucosa–extracto de levadura–carbonato de calcio–agar), empleado comúnmente para el crecimiento y diferenciación preliminar de microorganismos pertenecientes a la familia *Acetobacteraceae* debido a su capacidad para favorecer el desarrollo de bacterias con metabolismo oxidativo y actividad acidificante (**Tong et al., 2026**). Como fuente microbiana se empleó kombucha artesanal no pasteurizada con SCOBY activo, obtenida de un sistema fermentativo doméstico y utilizada como inóculo por su riqueza en bacterias ácido-acéticas asociadas a fermentaciones aerobias (**Wang et al., 2022**).

Para la preparación del medio GYC se utilizaron 300 mL de agua destilada estéril, en los cuales se disolvieron 15 g de glucosa como fuente principal de carbono, 3,06 g de extracto de levadura como fuente de nitrógeno y factores de crecimiento, 9,1 g de carbonato de calcio (CaCO_3) como agente indicador de producción de ácidos orgánicos y 6,01 g de agar bacteriológico como agente solidificante (**Sharafi et al., 2010**). La presencia de glucosa favoreció el metabolismo oxidativo característico de bacterias ácido-acéticas, mientras que el extracto de levadura aportó nutrientes esenciales requeridos para el crecimiento celular (**Mamlouk & Gullo, 2013**).

Por su parte, el CaCO_3 permitió evidenciar actividad acidificante mediante la formación de halos de solubilización asociados a la producción de compuestos ácidos durante el crecimiento microbiano (**Ma et al., 2022**). Posteriormente, el medio preparado fue esterilizado en autoclave a 121 °C durante 15 minutos bajo condiciones controladas de esterilidad microbiológica (**Gomes et al., 2018**). Una vez esterilizado, el medio fue utilizado para el aislamiento bacteriano empleando manipulación aséptica y trabajo en cámara de flujo laminar con el fin de reducir riesgos de contaminación experimental.

Las muestras fueron inoculadas mediante técnica de extensión superficial, depositando 100 µL de kombucha sobre el medio sólido y distribuyéndolos homogéneamente utilizando un asa bacteriológica estéril. Para el aislamiento inicial se emplearon cuatro placas Petri, las cuales fueron incubadas a 28 °C durante un periodo comprendido entre 24 y 72 horas bajo condiciones aerobias favorables para el crecimiento de bacterias ácido-acéticas con metabolismo oxidativo

(Tong et al., 2026). Todas las etapas de preparación, inoculación e incubación se realizaron bajo condiciones asépticas y manipulación microbiológica controlada, con el propósito de garantizar la esterilidad y reproducibilidad experimental (Wang et al., 2022).

2.2.1.2. Selección y confirmación preliminar de cepas

Finalizado el periodo de incubación, se realizó la evaluación macroscópica de las colonias desarrolladas en medio GYC con el propósito de seleccionar microorganismos con características compatibles con bacterias ácido-acéticas oxidativas. El medio GYC permite la diferenciación preliminar de estos microorganismos debido a la presencia de carbonato de calcio, compuesto que actúa como indicador indirecto de actividad acidificante (Sharafi et al., 2010). En consecuencia, la selección preliminar se basó en la observación de halos de solubilización alrededor de las colonias, fenómeno asociado a la disolución del CaCO_3 ocasionada por la producción de compuestos ácidos derivados del metabolismo oxidativo bacteriano, característica frecuentemente reportada en bacterias ácido-acéticas aerobias (Mamlouk & Gullo, 2013).

Las colonias que presentaron halos visibles, morfología diferenciada y crecimiento definido fueron consideradas candidatas para aislamiento preliminar, debido a que estos rasgos se asocian con microorganismos capaces de oxidar carbohidratos y generar ácidos orgánicos en medio sólido (Ma et al., 2022). A partir de las placas incubadas se seleccionaron 19 colonias con características compatibles con bacterias ácido-acéticas, las cuales fueron codificadas individualmente para su posterior seguimiento microbiológico y caracterización preliminar (ver Anexo 1). La codificación y trazabilidad de colonias constituyen procedimientos recomendados en procesos de aislamiento microbiológico debido a que permiten mantener control experimental y reducir errores asociados al seguimiento de cepas durante etapas posteriores de caracterización (Gomes et al., 2018).

Posteriormente, las colonias seleccionadas fueron sometidas a procesos de resiembra mediante técnica de agotamiento en medio sólido con el objetivo de obtener cultivos aislados y morfológicamente homogéneos. La resiembra representa una etapa fundamental para disminuir mezclas microbianas y favorecer la obtención de cepas individuales compatibles con bacterias ácido-acéticas (Gomes et al., 2018). Asimismo, el mantenimiento de manipulación aséptica y trabajo en cámara de flujo laminar permitió reducir riesgos de contaminación cruzada y preservar la pureza microbiológica de los cultivos obtenidos (Tong et al., 2026).

La confirmación preliminar de las cepas aisladas se realizó mediante evaluación microscópica y pruebas bioquímicas básicas, incluyendo tinción de Gram, prueba de catalasa y prueba de oxidasa, metodologías empleadas frecuentemente en la caracterización inicial de bacterias ácido-acéticas y microorganismos con metabolismo respiratorio oxidativo (**Mamlouk & Gullo, 2013**). La tinción de Gram permitió diferenciar bacterias según la estructura de su pared celular, considerando que especies del género *Gluconobacter* se describen como bacilos Gram negativos pertenecientes a la familia *Acetobacteraceae* (**Gomes et al., 2018**). Complementariamente, las pruebas de catalasa y oxidasa permitieron evaluar actividad enzimática asociada al metabolismo aerobio, debido a que bacterias ácido-acéticas presentan mecanismos oxidativos dependientes de enzimas respiratorias y sistemas de detoxificación de especies reactivas de oxígeno (**Gomes et al., 2018; Ripoll et al., 2023**). En consecuencia, las colonias seleccionadas fueron consideradas compatibles con el género *Gluconobacter* cuando presentaron morfología Gram negativa, actividad catalasa positiva y respuesta oxidasa positiva, características fenotípicas asociadas a bacterias aerobias con elevada actividad oxidativa (**Tong et al., 2026**).

2.2.2. Evaluación de la producción de ácido glucónico mediante espectrofotometría utilizando extracto de cáscara de piña como sustrato

2.2.2.1. Preparación del sustrato: extracto de cáscara de piña

Las cáscaras de piña empleadas como sustrato fermentativo fueron obtenidas en el mercado 1 de Mayo de la ciudad de Ambato, Ecuador, a partir de frutos previamente destinados al consumo de pulpa, destinando las cáscaras como residuo agroindustrial para su posterior aprovechamiento biotecnológico. La utilización de residuos derivados de *Ananas comosus* permite disponer de una fuente rica en carbohidratos fermentables y compuestos solubles adecuados para procesos oxidativos y fermentativos (**Banerjee et al., 2021**). Asimismo, **Ma et al. (2022)**, señalan que el uso de biomasa residual favorece estrategias de economía circular y reduce el impacto ambiental asociado a la acumulación de desechos orgánicos.

Posteriormente, las cáscaras fueron lavadas con abundante agua destilada para eliminar impurezas superficiales y materia particulada adherida. Luego se fragmentaron en porciones pequeñas con el propósito de incrementar el área de contacto y facilitar la extracción de azúcares y compuestos solubles presentes en el tejido vegetal (**Ma et al., 2022**). Las muestras fueron licuadas hasta obtener un extracto crudo homogéneo, el cual posteriormente fue filtrado

para remover residuos sólidos y obtener un medio líquido apropiado para el proceso fermentativo.

La disponibilidad de azúcares fermentables constituye un factor esencial para el metabolismo oxidativo de bacterias ácido-acéticas. Según **Mamlouk & Gullo (2013)**, la presencia de glucosa y otros carbohidratos solubles favorece la actividad de sistemas deshidrogenasa involucrados en la producción de ácidos orgánicos. Por esta razón, el extracto obtenido fue ajustado a un pH entre 5,0 rango compatible con el crecimiento y actividad oxidativa de microorganismos ácido-acéticos durante fermentaciones aerobias (**Li et al., 2016**). Estas condiciones permitieron mantener estabilidad fisicoquímica del sustrato y favorecer el aprovechamiento metabólico de los azúcares presentes en el extracto (**Mamlouk & Gullo, 2013**).

Con el fin de disminuir riesgos de contaminación microbiológica y garantizar condiciones controladas durante el ensayo fermentativo, el extracto preparado fue esterilizado en autoclave. La esterilización permitió eliminar microorganismos competidores y asegurar que el proceso experimental estuviera asociado principalmente al crecimiento de las cepas seleccionadas compatibles con *Gluconobacter* (**Gomes et al., 2018**).

Posteriormente, la concentración inicial de azúcares solubles del extracto fue determinada mediante refractometría expresada en °Brix, debido a que este parámetro permite estimar la disponibilidad inicial de sustrato y evaluar variaciones durante la fermentación (**Dai, Jiang, et al., 2022**). La medición inicial de °Brix permitió establecer un control previo del sistema fermentativo y facilitar el análisis posterior del consumo de azúcares durante el proceso experimental (**Ma et al., 2022**).

2.2.2.2. Fermentación con *Gluconobacter oxydans*

Las cepas seleccionadas fueron inoculadas en matraces Erlenmeyer que contenían extracto de cáscara de piña previamente acondicionado y esterilizado, todos los ensayos fermentativos y determinaciones analíticas se realizaron por triplicado. El proceso fermentativo se realizó bajo condiciones aerobias, con agitación constante a 200 rpm y temperatura controlada a 28 °C, siguiendo condiciones empleadas para el cultivo de bacterias ácido-acéticas con metabolismo oxidativo (**da Silva et al., 2022**). El seguimiento fermentativo se realizó mediante muestreos periódicos desde 0 hasta 408 h, considerando intervalos experimentales establecidos según la

dinámica del cultivo. En cada tiempo de fermentación se registró el pH del medio, la densidad óptica a 600 nm y los sólidos solubles expresados en °Brix. Estos parámetros permitieron evaluar el comportamiento del cultivo durante la fermentación y generar los datos necesarios para el análisis cinético posterior **(Ortiz-Cortés et al., 2021)**.

El crecimiento microbiano se estimó indirectamente mediante densidad óptica a 600 nm, utilizando el blanco correspondiente para corregir la lectura del medio. La DO₆₀₀ se calculó mediante la diferencia entre la lectura de la muestra y la lectura del blanco, de acuerdo con el procedimiento empleado para el seguimiento de biomasa en cultivos líquidos **(Mytilinaios et al., 2012)**.

$$DO_{600} = \text{Lectura de muestra} - \text{Lectura blanco} \quad \text{Ecuación 2.}$$

El pH se midió directamente con potenciómetro previamente calibrado, mientras que los sólidos solubles fueron determinados con refractómetro y expresados como °Brix. Las muestras obtenidas en cada intervalo fueron reservadas para la cuantificación posterior de ácido glucónico mediante el método espectrofotométrico descrito en el apartado siguiente **(Mandlaa et al., 2025)**.

2.2.2.3. Cuantificación espectrofotométrica del ácido glucónico

La concentración de ácido glucónico producida durante la fermentación se determinó mediante un método colorimétrico–espectrofotométrico basado en la reacción del ácido glucónico con hidroxilamina y posterior formación de un complejo coloreado en presencia de iones férricos (Fe³⁺), siguiendo adaptaciones metodológicas descritas por **(Mandlaa et al., 2025)**. La lectura del complejo formado se realizó mediante espectrofotometría UV–Visible a 540 nm, longitud de onda correspondiente al máximo de absorbancia del complejo hidroxamato–férrico **(Liu et al., 2017)**.

Para la preparación de la solución estándar se utilizó ácido glucónico en polvo grado analítico (>99 %), elaborando una solución madre de 1 g/L. A partir de esta solución se prepararon concentraciones estándar de 20, 40, 60, 100, 120 y 160 mg/L, empleando masas equivalentes de 0,505 mg; 1,010 mg; 1,515 mg; 2,525 mg; 3,030 mg y 4,040 mg, respectivamente. Estas soluciones fueron utilizadas para la construcción de la curva de calibración y obtención de la ecuación de regresión lineal empleada en la determinación de las muestras fermentativas **(Harris & Berenguer Navarro, 2007)**.

El reactivo de hidroxilamina se preparó disolviendo 3,47 g en 100 mL de solución, mientras que el reactivo férrico ácido fue preparado utilizando 2,70 g de FeCl_3 en 100 mL, de acuerdo con adaptaciones del método colorimétrico empleado para cuantificación de ácidos orgánicos (Mandlaa et al., 2025).

Las lecturas obtenidas a partir de las soluciones estándar permitieron construir la curva de calibración y calcular la pendiente y ecuación de la recta. Posteriormente, las muestras recolectadas en cada intervalo del proceso fermentativo (0–408 h) fueron procesadas bajo el mismo procedimiento analítico y analizadas espectrofotométricamente a 540 nm, con el propósito de determinar la presencia y concentración de ácido glucónico producido durante la fermentación (Mandlaa et al., 2025). La concentración del metabolito en cada muestra se obtuvo mediante interpolación utilizando la ecuación generada a partir de la curva patrón (Liu et al., 2017).

2.2.3. Determinación de la cinética de crecimiento de *Gluconobacter oxydans* y producción de ácido glucónico durante el proceso fermentativo

2.2.3.1. Variables experimentales para el estudio cinético

Para el análisis cinético del proceso fermentativo se evaluaron variables relacionadas con el crecimiento microbiano, consumo de sustrato y producción de ácido glucónico, tomando como referencia parámetros ampliamente utilizados en estudios de fermentación oxidativa y modelamiento cinético microbiano (da Silva et al., 2022). Estas variables permitieron describir el comportamiento metabólico de *G. oxydans* durante la bioconversión del extracto de cáscara de piña y establecer relaciones entre biomasa, sustrato y formación del metabolito de interés (Ripoll et al., 2023).

La biomasa microbiana (X) fue estimada mediante medición de densidad óptica a 600 nm (DO600), parámetro utilizado como indicador indirecto del crecimiento celular y turbidez bacteriana durante procesos fermentativos y estudios microbiológicos (Mytilinaios et al., 2012). La determinación espectrofotométrica permitió realizar el seguimiento temporal del crecimiento de *G. oxydans* bajo condiciones controladas de cultivo (Kovárová-Kovar & Egli, 1998).

La producción de ácido glucónico (P) fue cuantificada mediante el método colorimétrico–espectrofotométrico previamente descrito, basado en la reacción del ácido glucónico con

hidroxilamina y posterior formación del complejo férrico medido a 540 nm (**Mandlaa et al., 2025**). Este procedimiento permitió estimar la concentración del metabolito producido durante el proceso fermentativo y analizar su acumulación temporal en el medio de cultivo (**Tong et al., 2026**).

El consumo de sustrato (S) fue estimado mediante mediciones refractométricas expresadas en °Brix, utilizadas como indicador indirecto de variaciones en la concentración de azúcares fermentables presentes en el extracto de cáscara de piña (**Dai Jiang et al., 2022**). La utilización de °Brix ha sido reportada como una herramienta útil para el monitoreo del aprovechamiento de carbohidratos durante fermentaciones asociadas a bacterias oxidativas y sistemas ricos en azúcares fermentables (**Li et al., 2016**).

El tiempo de fermentación (t) fue considerado como variable independiente para el seguimiento cinético del proceso experimental, debido a su influencia directa sobre la dinámica metabólica, crecimiento microbiano y formación de productos derivados de la oxidación de glucosa (**Kovárová-Kovar & Egli, 1998**). La evaluación temporal permitió establecer relaciones entre actividad oxidativa y acumulación progresiva de ácido glucónico durante el desarrollo fermentativo (**Ripoll et al., 2023**).

Adicionalmente, se consideraron parámetros derivados relacionados con productividad y rendimiento fermentativo, incluyendo velocidad específica de crecimiento (μ), velocidad volumétrica de producción (r_p), rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$), producto/sustrato ($Y_{p/s}$) y producto/biomasa ($Y_{p/x}$), utilizados para describir cuantitativamente el comportamiento del sistema fermentativo (**Sheng et al., 2024**). Estos parámetros permiten interpretar la eficiencia de conversión del sustrato y la relación existente entre crecimiento celular y formación del metabolito de interés (**Li et al., 2022**).

2.2.3.2. Construcción de curvas cinéticas de crecimiento y producción

Durante el proceso fermentativo se realizó el seguimiento temporal del crecimiento microbiano y de la producción de ácido glucónico mediante muestreos periódicos efectuados desde el inicio hasta 408 horas de fermentación, considerando los tiempos experimentales establecidos en el diseño del estudio (**Li et al., 2016**). El monitoreo secuencial permitió registrar la evolución metabólica del sistema fermentativo bajo condiciones controladas de cultivo (**Ripoll et al., 2023**).

En cada intervalo experimental se determinaron pH, densidad óptica a 600 nm (DO600), concentración de ácido glucónico mediante espectrofotometría a 540 nm y azúcares residuales expresados en °Brix, con el propósito de caracterizar integralmente el comportamiento cinético del sistema fermentativo **(Mytilinaios et al., 2012)**. La evaluación simultánea de estas variables permitió relacionar crecimiento celular, acidificación del medio y utilización del sustrato durante la fermentación oxidativa **(da Silva et al., 2022)**.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado con el fin de garantizar reproducibilidad experimental y confiabilidad analítica de los resultados obtenidos **(Harris & Berenguer Navarro, 2007)**. La repetición experimental constituye un criterio fundamental en estudios fermentativos y microbiológicos orientados al análisis cinético y validación de datos **(Ripoll et al., 2023)**.

Con los datos obtenidos se construyeron curvas cinéticas correspondientes a biomasa versus tiempo (X vs t), producción de ácido glucónico versus tiempo (P vs t), consumo de sustrato versus tiempo (S vs t) y variación del pH versus tiempo (pH vs t), representaciones comúnmente utilizadas para describir la evolución temporal de procesos fermentativos aerobios **(Li et al., 2022)**. Estas curvas permitieron identificar las diferentes fases del crecimiento microbiano y relacionarlas con la dinámica de producción del metabolito durante el proceso fermentativo de acuerdo al estudio de **(Lian et al., 2022)**.

2.2.3.3. Determinación de la velocidad específica de crecimiento (μ)

La velocidad específica de crecimiento (μ) de *Gluconobacter oxydans* fue determinada utilizando los valores de biomasa estimados mediante DO600 correspondientes a la fase exponencial del crecimiento microbiano **(Mytilinaios et al., 2012)**. Este parámetro permitió describir la rapidez del incremento celular y evaluar el comportamiento fisiológico del microorganismo durante la fermentación **(Kovárová-Kovar & Egli, 1998)**.

El cálculo de μ se realizó mediante la expresión matemática derivada de la cinética clásica de crecimiento microbiano:

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \quad \text{Ecuación 3.}$$

Donde:

- μ = velocidad específica de crecimiento (h^{-1})
- X_1 y X_2 = concentración de biomasa o valores de DO_{600} en los tiempos evaluados
- t_1 y t_2 = intervalo de tiempo considerado dentro de la fase exponencial del crecimiento

Para la determinación de este parámetro se seleccionaron los intervalos de tiempo correspondientes a la fase exponencial del crecimiento microbiano, considerando el tramo de mayor incremento lineal en la representación de $\ln(X)$ versus tiempo (Liu et al., 2023). El ajuste de la pendiente y el análisis de comportamiento cinético fueron realizados mediante procesamiento estadístico de los datos experimentales obtenidos durante la fermentación (Zhu et al., 2013). La determinación de μ permitió comparar el comportamiento de crecimiento celular y relacionarlo con la producción de ácido glucónico durante el proceso fermentativo (Ripoll et al., 2023).

2.2.3.4. Determinación de parámetros cinéticos de producción de ácido glucónico

A partir de las curvas cinéticas de biomasa, producción de ácido glucónico y consumo de sustrato, se determinaron parámetros relacionados con productividad y rendimiento fermentativo del proceso desarrollado con *Gluconobacter oxydans*. Estos parámetros permitieron evaluar la eficiencia de conversión del extracto de cáscara de piña y relacionar el metabolismo oxidativo bacteriano con la formación del metabolito de interés (Zhu et al., 2013). Asimismo, el análisis cinético permitió interpretar la relación existente entre crecimiento celular y producción de ácido glucónico durante el proceso fermentativo (Ripoll et al., 2023).

La velocidad volumétrica de producción de ácido glucónico (r_p) fue determinada mediante la siguiente ecuación:

$$r_p = \frac{\Delta P}{\Delta t} \quad \text{Ecuación 4.}$$

Donde:

- r_p = velocidad volumétrica de producción
- ΔP = incremento de ácido glucónico producido
- Δt = intervalo de tiempo evaluado

Este parámetro permitió identificar el periodo de máxima productividad fermentativa y evaluar la velocidad de formación del metabolito durante la fermentación (**Liu et al., 2023**).

Posteriormente, se determinaron los coeficientes de rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$), producto/sustrato ($Y_{p/s}$) y producto/biomasa ($Y_{p/x}$), empleados para relacionar el consumo de azúcares con la formación de biomasa y producción de ácido glucónico durante el proceso fermentativo (**Li et al., 2016**).

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad \text{Ecuación 5.}$$

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad \text{Ecuación 6.}$$

$$Y_{P/X} = \frac{\Delta P}{\Delta X} \quad \text{Ecuación 7.}$$

Donde:

- ΔX = incremento de biomasa
- ΔP = incremento de ácido glucónico
- ΔS = consumo de azúcares fermentables

Estos parámetros permitieron comparar la eficiencia de bioconversión del extracto de cáscara de piña y establecer la relación entre crecimiento microbiano y producción del metabolito durante la fermentación (**Celis Cabeza et al., 2024**). Asimismo, el análisis de rendimiento permitió interpretar la eficiencia metabólica de *G. oxydans* bajo las condiciones experimentales utilizadas en el presente estudio (**Zhu et al., 2013**).

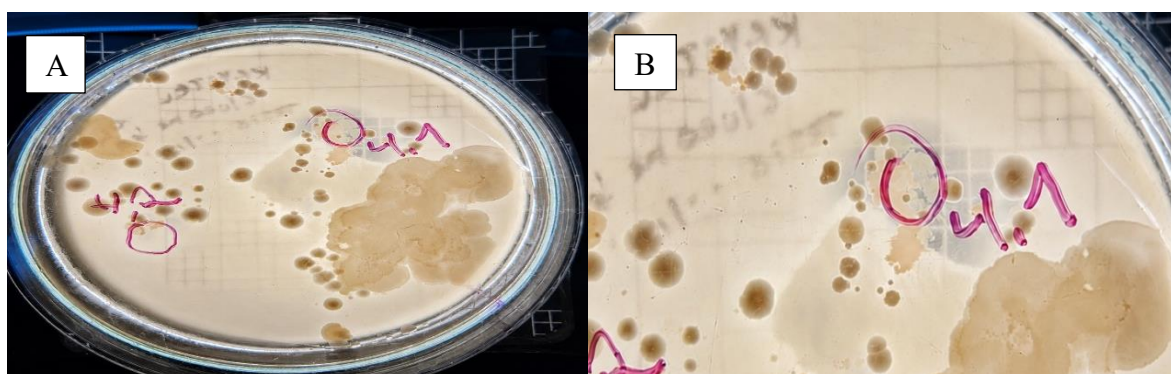
CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de los resultados

3.1.1. Obtención y selección de cepas de *Gluconobacter oxydans*

En las placas de medio GYC inoculadas con kombucha casera no pasteurizada se observó crecimiento microbiano heterogéneo, caracterizado por colonias de diferente tamaño, forma y tonalidad, como se evidencia en la **Figura 7**. Este comportamiento refleja la naturaleza mixta de la kombucha como sistema fermentativo integrado por levaduras y bacterias ácido-acéticas, cuya interacción favorece diversidad morfológica y metabólica durante las etapas iniciales del crecimiento microbiano (Villarreal-Soto et al., 2018).

Figura 7. Crecimiento microbiano inicial posterior a la siembra de kombucha en medio GYC.



Nota. (A) Desarrollo inicial de colonias microbianas provenientes de kombucha en medio GYC suplementado con CaCO_3 , mostrando variabilidad en tamaño, morfología y patrón de crecimiento. (B) Halo de aclaramiento asociado a la solubilización del carbonato de calcio alrededor de colonias con potencial de actividad oxidativa y acidificante.

La heterogeneidad observada refleja la naturaleza mixta de la kombucha como sistema fermentativo compuesto por levaduras y bacterias ácido-acéticas, cuya interacción favorece diversidad morfológica y metabólica durante las etapas iniciales del crecimiento microbiano (Villarreal-Soto et al., 2018). Los halos de aclaramiento observados alrededor de ciertas colonias se asociaron a la solubilización del carbonato de calcio (CaCO_3) debido a la liberación de compuestos ácidos derivados del metabolismo oxidativo bacteriano. Este fenómeno constituye un indicador preliminar de actividad acidificante característica de bacterias ácido-acéticas aerobias (Mamlouk & Gullo, 2013).

Resultados similares fueron reportados por **Neffe-Skocińska et al. (2023)**, quienes describen formación de halos en aislamientos bacterianos provenientes de kombucha con capacidad de oxidación incompleta de carbohidratos. En consecuencia, las colonias que presentaron crecimiento definido y halos visibles fueron consideradas candidatas para procesos posteriores de purificación y confirmación preliminar mediante tinción de Gram y pruebas bioquímicas.

3.1.1.1. Selección y confirmación preliminar de cepas

A partir de las placas obtenidas se seleccionaron colonias que presentaron crecimiento definido y formación visible de halos de aclaramiento alrededor del desarrollo bacteriano. Las diferencias observadas en tamaño, morfología y extensión de los halos sugieren variabilidad metabólica entre los microorganismos aislados, posiblemente asociada con diferencias en la capacidad oxidativa y producción de metabolitos ácidos (**Ripoll et al., 2023**). Según **Mamlouk & Gullo (2013)**, las bacterias ácido-acéticas poseen sistemas enzimáticos de membrana responsables de la oxidación incompleta de carbohidratos y la liberación de compuestos ácidos al medio extracelular. De forma similar, **Gomes et al. (2018)**, indican que la formación de halos en medios suplementados con carbonato de calcio constituye un criterio preliminar útil para diferenciar microorganismos con actividad acidificante y metabolismo oxidativo activo.

Las colonias seleccionadas fueron sometidas posteriormente a evaluación microscópica y pruebas bioquímicas preliminares con el propósito de confirmar características compatibles con bacterias ácido-acéticas. Entre estas evaluaciones se incluyeron tinción de Gram y pruebas de catalasa y oxidasa, herramientas ampliamente empleadas en procesos iniciales de caracterización microbiológica (**Ripoll et al., 2023**).

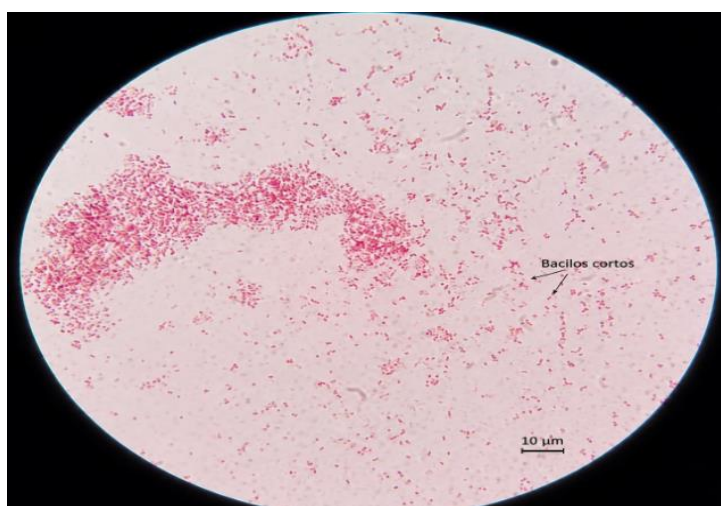
Como se observa en la **Figura 8**, la tinción de Gram permitió evidenciar células con morfología bacilar corta y coloración rosada, compatibles con bacterias Gram negativas asociadas preliminarmente al género *Gluconobacter*. Bajo observación microscópica se evidenció distribución celular irregular y agrupaciones bacterianas dispersas en el campo visual, características reportadas para bacterias ácido-acéticas aerobias (**Mamlouk & Gullo, 2013**).

Los hallazgos observados en el presente estudio coinciden con lo descrito por **Neffe-Skocińska et al. (2024)**, quienes reportaron aislamientos bacterianos provenientes de kombucha con morfología bacilar pequeña y comportamiento oxidativo asociado a la producción de metabolitos ácidos. De manera similar, **Wang et al. (2022)**, señalan que los microorganismos

ácido-acéticos aislados de kombucha presentan características microscópicas compatibles con bacterias Gram negativas adaptadas a ambientes ricos en azúcares fermentables.

Asimismo, **Ripoll et al. (2023)**, destacan que la tinción de Gram constituye una herramienta útil para la confirmación preliminar de cepas con potencial biotecnológico, debido a que permite diferenciar grupos bacterianos antes de realizar análisis metabólicos o fermentativos más específicos. En consecuencia, las colonias seleccionadas y positivas a las pruebas preliminares fueron consideradas candidatas para su posterior evaluación fermentativa y análisis de producción de ácido glucónico.

Figura 8. Observación microscópica de cepas bacterianas seleccionadas mediante tinción de Gram.



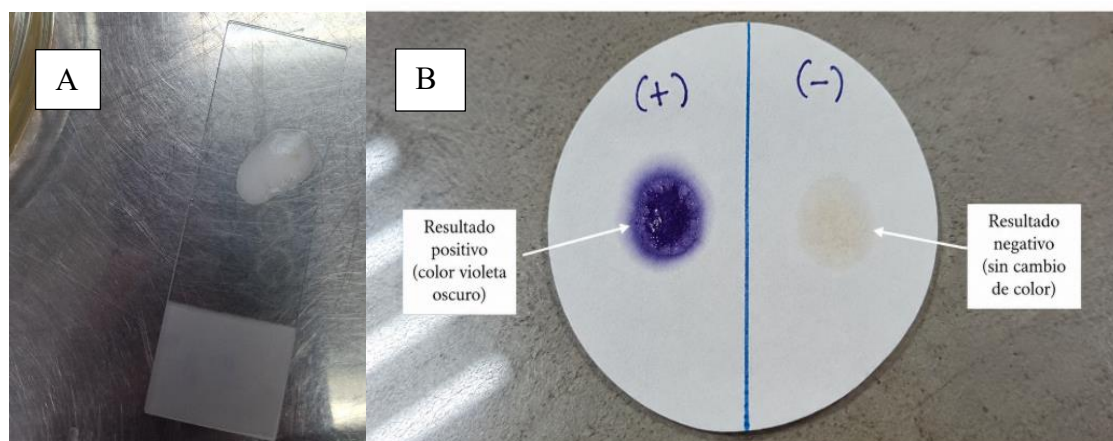
Nota. Se observan bacilos cortos con coloración rosada distribuidos de manera dispersa e irregular dentro del campo microscópico, compatibles con bacterias Gram negativas obtenidas a partir de los aislamientos seleccionados.

Las colonias seleccionadas fueron sometidas a tinción de Gram como parte del proceso de confirmación preliminar. Como se observa en las **Figuras 8 y 9**, donde se evidenciaron células con morfología bacilar corta y coloración rosada, compatibles con bacterias Gram negativas asociadas preliminarmente al género *Gluconobacter*. La observación microscópica mostró distribución celular dispersa e irregular, características reportadas para bacterias ácido-acéticas aerobias con metabolismo oxidativo (**Mamlouk & Gullo, 2013**).

Estos hallazgos coinciden con lo descrito por **Neffe-Skocińska et al. (2023)** y **Wang et al. (2022)** quienes reportaron aislamientos bacterianos provenientes de kombucha con morfología

bacilar pequeña y tinción Gram negativa asociada a microorganismos adaptados a medios ricos en azúcares fermentables. En consecuencia, la tinción de Gram constituyó una herramienta de apoyo para la selección preliminar de cepas compatibles con bacterias ácido-acéticas antes de su evaluación bioquímica y fermentativa posterior.

Figura 9. Evaluación preliminar de actividad catalasa en cepas bacterianas seleccionadas.



Nota. (A) Formación de burbujas durante la prueba de catalasa tras la adición de peróxido de hidrógeno sobre el aislamiento seleccionado, indicando actividad catalasa positiva. (B) Resultado de prueba de oxidasa sobre disco reactivo; la aparición de coloración violeta intensa indicó actividad oxidasa positiva.

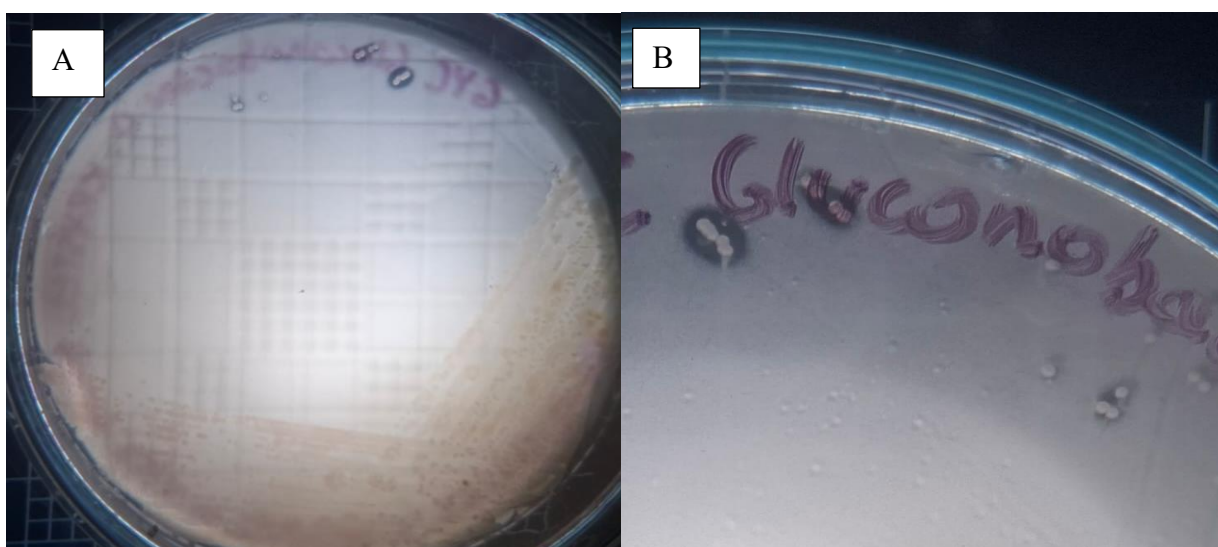
Las cepas seleccionadas fueron sometidas a pruebas bioquímicas preliminares de catalasa y oxidasa con el propósito de evaluar actividad respiratoria asociada a bacterias ácido-acéticas. Como se observa en la **Figura 10A**, la adición de peróxido de hidrógeno produjo formación inmediata de burbujas, indicando actividad catalasa positiva. Por otra parte, la **Figura 10B** evidenció reacción oxidasa positiva mediante el desarrollo de coloración violeta intensa sobre el reactivo oxidasa.

Estos resultados sugieren presencia de sistemas enzimáticos asociados al metabolismo respiratorio aeróbico, compatibles con bacterias ácido-acéticas oxidativas (Mamlouk & Gullo, 2013). Resultados similares fueron reportados por Gomes et al. (2018) y Ripoll et al. (2023), quienes describen actividad catalasa y oxidasa positiva en especies del género *Gluconobacter*.

En conjunto, las evidencias microscópicas y bioquímicas fortalecieron la confirmación preliminar de cepas compatibles con bacterias ácido-acéticas, justificando su selección para etapas posteriores de purificación y evaluación fermentativa.

Finalmente, las cepas seleccionadas fueron purificadas mediante resiembras sucesivas en medio GYC, obteniéndose colonias con crecimiento más uniforme y morfología colonial homogénea. Las colonias purificadas presentaron apariencia circular, borde definido y tonalidad blanquecina, compatibles con características descritas para bacterias ácido-acéticas cultivadas en medios ricos en glucosa y carbonato de calcio (**Gomes et al., 2018**).

Figura 10. Crecimiento posterior y purificación preliminar de colonias bacterianas seleccionadas en medio GYC- CaCO_3 .



Nota. (A) Crecimiento bacteriano posterior al proceso de re-siembra y purificación en medio GYC suplementado con carbonato de calcio (CaCO_3). (B) Observación ampliada de colonia purificada con crecimiento definido y halo de aclaramiento asociado a solubilización de CaCO_3 alrededor del desarrollo bacteriano.

Como se observa en la **Figura 10A**, las colonias seleccionadas fueron sometidas a re-siembras sucesivas en medio GYC suplementado con CaCO_3 con el propósito de obtener cultivos más homogéneos y reducir la presencia de microorganismos acompañantes (**Sharafi et al., 2010**). Posterior al proceso de purificación se observaron colonias con crecimiento más uniforme, borde definido y morfología colonial estable (**Tong et al., 2026**). La **Figura 10B** evidenció la persistencia del halo de aclaramiento alrededor del crecimiento bacteriano, fenómeno asociado

a la solubilización del carbonato de calcio por la producción de compuestos ácidos durante el metabolismo oxidativo de la glucosa (**Gomes et al., 2018**). Este comportamiento es característico de bacterias ácido-acéticas del género *Gluconobacter*, las cuales oxidan azúcares y liberan ácido glucónico al medio extracelular, generando una disminución local del pH y la consecuente disolución del CaCO_3 presente en el medio de cultivo (**Deppenmeier & Ehrenreich, 2009**).

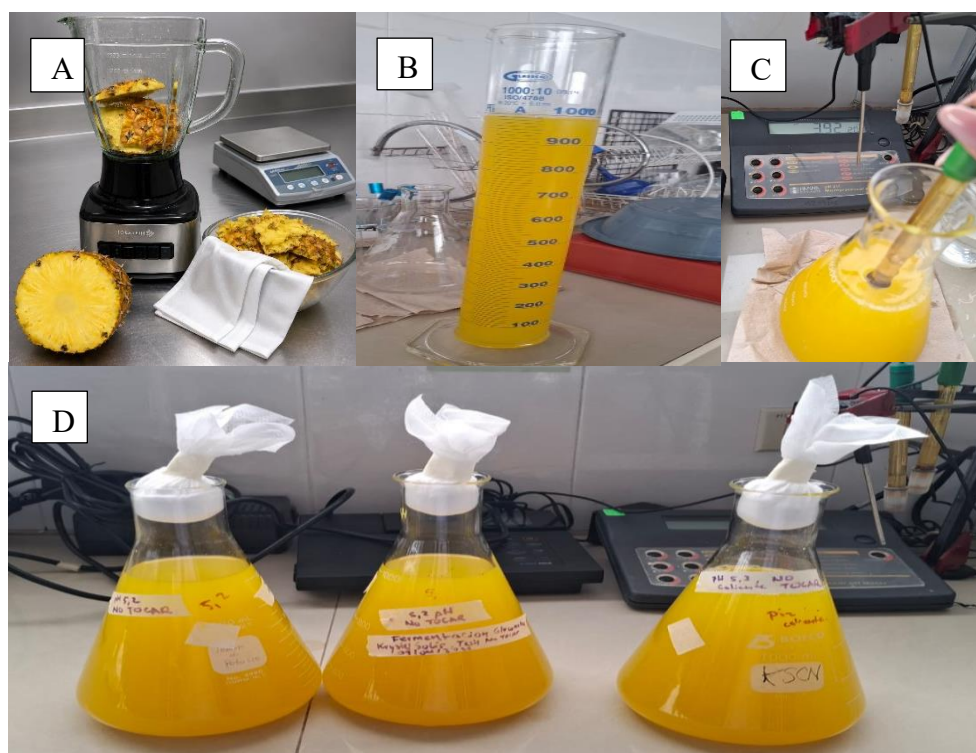
Los resultados obtenidos presentan concordancia con lo reportado por **Neffe-Skocińska et al. (2023)**, quienes observaron que aislamientos bacterianos procedentes de kombucha mantuvieron actividad acidificante y crecimiento estable después de sucesivos procesos de purificación. De manera similar, **Tong et al. (2026)**, indican que las re-siembras constituyen una estrategia fundamental para estabilizar las características fenotípicas y garantizar una mayor pureza microbiológica antes de los ensayos fermentativos. En consecuencia, la persistencia del halo de aclaramiento observada en este estudio constituyó un criterio preliminar de selección de cepas compatibles con *Gluconobacter oxydans*, justificando su evaluación posterior mediante pruebas bioquímicas y fermentativas orientadas a la producción de ácido glucónico. En consecuencia, la persistencia del halo de aclaramiento y la estabilidad morfológica observadas después del proceso de purificación fortalecieron la selección preliminar de cepas compatibles con bacterias ácido-acéticas y justificaron su utilización en posteriores evaluaciones fermentativas orientadas a la producción de ácido glucónico (**Sharafi et al., 2010**).

3.1.2. Evaluación de la producción de ácido glucónico mediante espectrofotometría utilizando extracto de cáscara de piña como sustrato

3.1.2.1. Preparación del extracto de cáscara de piña

El extracto obtenido a partir de cáscara de piña presentó apariencia líquida homogénea y coloración amarilla intensa, características asociadas a la presencia de compuestos solubles y azúcares fermentables presentes en residuos de *Ananas comosus* (**Banerjee et al., 2021**). Como se observa en la Figura 12A–D, el acondicionamiento del sustrato permitió obtener una fase líquida adecuada para su empleo en el proceso fermentativo.

Figura 11. Preparación del extracto de cáscara de piña utilizado como sustrato fermentativo.



Nota. (A) Trituración y licuado de cáscaras de piña para obtención del extracto crudo. (B) Extracto filtrado con coloración amarilla posterior al proceso de separación de sólidos. (C) Ajuste de pH del extracto fermentativo previo a la inoculación bacteriana. (D) Matraces Erlenmeyer acondicionados con extracto de cáscara de piña para el proceso fermentativo con *Gluconobacter oxydans*.

La apariencia homogénea y el acondicionamiento del extracto coinciden con lo reportado para residuos de piña utilizados como sustratos fermentativos, los cuales presentan disponibilidad de glucosa, fructosa y sacarosa aprovechables por microorganismos oxidativos **Wang et al. (2022)** y **Ripoll et al. (2023)** señalan que los residuos derivados de piña constituyen matrices adecuadas para fermentaciones aerobias debido a su contenido de carbohidratos fácilmente metabolizables.

Asimismo, la remoción de partículas gruesas y el ajuste de pH previo a la inoculación favorecen la estabilidad del sistema fermentativo y mejoran la disponibilidad del sustrato para bacterias ácido-acéticas (**Mamlouk & Gullo, 2013**). A su vez **Gomes et al. (2018)**, indican que el acondicionamiento inicial del medio representa un factor importante para mantener actividad metabólica oxidativa y reducir interferencias microbiológicas durante procesos fermentativos.

En consecuencia, las características fisicoquímicas y el acondicionamiento previo del extracto permitieron disponer de un sustrato compatible con el desarrollo fermentativo de *G. oxydans* y adecuado para la posterior evaluación de producción de ácido glucónico (Tong et al., 2026).

3.1.2.2. Seguimiento del proceso Fermentativo con *Gluconobacter oxydans*

El sistema fermentativo establecido con *G. oxydans* utilizando extracto de cáscara de piña presentó condiciones visualmente estables durante el periodo experimental, observándose mantenimiento de la coloración amarilla característica del sustrato y ausencia de contaminación evidente en los frascos fermentativos. Como se observa en la **Figura 12A**, los cultivos permanecieron bajo condiciones aerobias controladas durante el seguimiento del proceso fermentativo.

Figura 12. Fermentación de *Gluconobacter oxydans* utilizando extracto de cáscara de piña.



Nota. (A) Frascos fermentativos inoculados con *Gluconobacter oxydans* mantenidos bajo condiciones aerobias controladas durante el proceso fermentativo. (B) Recolección periódica de muestras durante el seguimiento cinético para evaluación de biomasa, consumo de sustrato y producción de ácido glucónico.

La estabilidad observada en los frascos fermentativos coincide con lo reportado para bacterias ácido-acéticas del género *Gluconobacter*, las cuales requieren condiciones aerobias para

mantener su metabolismo oxidativo activo (**Mamlouk & Gullo, 2013**). Esta característica se relaciona con la presencia de enzimas de membrana capaces de oxidar parcialmente azúcares solubles y favorecer la acumulación extracelular de metabolitos orgánicos como el ácido glucónico (**Deppenmeier & Ehrenreich, 2009**).

Durante el seguimiento fermentativo se realizó recolección periódica de muestras en los diferentes intervalos experimentales, como se observa en la **Figura 12B**, con el propósito de evaluar pH, biomasa microbiana, consumo de azúcares fermentables y producción de ácido glucónico (**Li et al., 2016**). El monitoreo temporal permitió registrar la evolución metabólica del sistema y generar información necesaria para el posterior análisis cinético del proceso fermentativo (**Ripoll et al., 2023**).

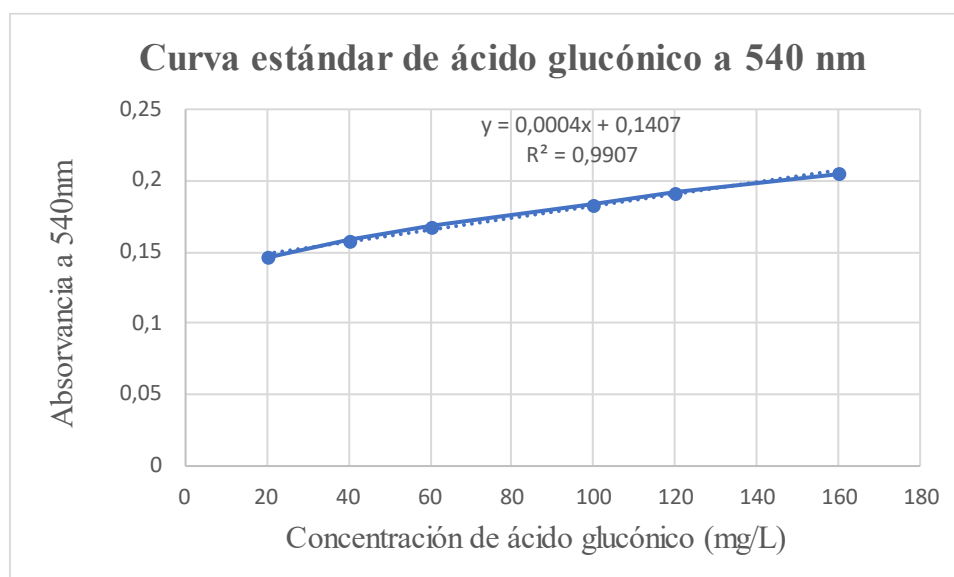
Este enfoque coincide con lo descrito por **Wang et al. (2022)**, indica que el seguimiento mediante muestreos periódicos constituye una herramienta fundamental para evaluar eficiencia fermentativa y relacionar crecimiento microbiano, utilización de sustrato y acumulación de metabolitos de interés. En consecuencia, el seguimiento fermentativo desarrollado permitió establecer la base experimental para el análisis cinético y la posterior cuantificación de ácido glucónico producido durante el proceso.

3.1.2.3. Construcción de la curva de calibración del ácido glucónico

Para la cuantificación espectrofotométrica del ácido glucónico se construyó una curva estándar utilizando soluciones patrón con concentraciones de 20, 40, 60, 100, 120 y 160 mg/L (**Mandlaa et al., 2025**). Las lecturas de absorbancia fueron realizadas a 540 nm, longitud de onda empleada para la detección del complejo hidroxamato-férrico formado durante la reacción colorimétrica (**Tong et al., 2026**). Se observó un incremento progresivo de la absorbancia conforme aumentó la concentración del estándar de ácido glucónico (**Ortiz-Cortés et al., 2021**).

La ecuación lineal obtenida corresponde a la absorbancia medida a 540 nm y x a la concentración de ácido glucónico expresada en mg/L (Harris & Berenguer Navarro, 2007). El coeficiente de determinación $R^2 = 0,9907$ indicó adecuada linealidad dentro del rango de concentraciones evaluado. Esta linealidad permitió emplear la ecuación de la recta para estimar la concentración de ácido glucónico en las muestras fermentativas mediante interpolación matemática (**Zhu et al., 2013**).

Figura 13. Curva estándar de ácido glucónico obtenida mediante espectrofotometría UV-Vis.



Nota. Curva estándar construida mediante soluciones patrón de ácido glucónico entre 20 y 160 mg/L evaluadas por espectrofotometría UV-Vis a 540 nm. La ecuación lineal obtenida presentó elevado coeficiente de determinación, indicando adecuada linealidad del método analítico empleado.

Como se observa en la **Figura 13**, la absorbancia registrada presentó incremento progresivo conforme aumentó la concentración del estándar de ácido glucónico, evidenciando relación lineal entre ambas variables. La ecuación obtenida correspondió a $y = 0,0004x + 0,1407$, con coeficiente de determinación $R^2 = 0,9907$, indicando adecuada linealidad dentro del intervalo evaluado.

El elevado coeficiente de determinación según **(Zhu et al., 2013)**, permitió estimar con confiabilidad las concentraciones de ácido glucónico presentes en las muestras fermentativas; reduciendo errores asociados a la cuantificación analítica y fortaleciendo la precisión del procedimiento experimental **(Albanese et al., 2014)**. Resultados similares han sido reportados por **Mandlaa et al. (2025)**, describe relaciones lineales elevadas en métodos colorimétricos basados en formación de complejos hidroxamato-férricos detectados por espectrofotometría visible. En consecuencia, la linealidad observada confirmó la validez del método empleado para cuantificar ácido glucónico producido durante la fermentación con *G. oxydans*.

3.1.2.4. Cuantificación espectrofotométrica del ácido glucónico

Las concentraciones de ácido glucónico obtenidas durante el proceso fermentativo evidenciaron incremento progresivo conforme avanzó el tiempo de incubación, como se presenta en la **Tabla 5**. Este comportamiento sugiere actividad oxidativa sostenida de las bacterias ácido-acéticas sobre los azúcares fermentables presentes en el extracto de cáscara de piña.

Tabla 5. Cuantificación espectrofotométrica de ácido glucónico durante el proceso fermentativo.

Tiempo (h)	Abs 540nm R1	Abs 540nm R2	Abs 540nm R3	Abs 540nm Prom	ÁG R1 (mg/L)	ÁG R2 (mg/L)	ÁG R3 (mg/L)	Promedio ÁG (mg/L)
0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0,294	0,284	0,255	0,278	383,25	358,25	285,75	342,42
48	0,365	0,345	0,335	0,348	560,75	510,75	485,75	519,08
72	0,393	0,396	0,384	0,391	630,75	638,25	608,25	625,75
168	0,586	0,484	0,494	0,521	1113,25	858,25	883,25	951,58
192	0,543	0,574	0,569	0,562	1005,75	1083,25	1070,75	1053,25
216	0,584	0,596	0,583	0,588	1108,25	1138,25	1105,75	1117,42
240	0,603	0,592	0,586	0,594	1155,75	1128,25	1113,25	1132,42
264	0,612	0,618	0,625	0,618	1178,25	1193,25	1210,75	1194,08
336	0,684	0,639	0,639	0,654	1358,25	1245,75	1245,75	1283,25
360	0,633	0,679	0,685	0,666	1230,75	1345,75	1360,75	1312,42
384	0,705	0,655	0,658	0,673	1410,25	1285,75	1293,25	1329,75
408	0,675	0,687	0,658	0,673	1335,25	1365,75	1293,25	1331,42

Nota. La tabla presenta los valores de absorbancia a 540 nm y las concentraciones de ácido glucónico calculadas durante la fermentación de *Gluconobacter oxydans* utilizando extracto de cáscara de piña. Las mediciones se realizaron por triplicado experimental durante 408 h.

Durante las primeras etapas del cultivo, la producción del metabolito fue moderada, registrándose valores promedio de 342,42 mg/L a las 24 h y 625,75 mg/L a las 72 h de fermentación, lo que indica establecimiento progresivo de la actividad metabólica bacteriana (Li et al., 2016).

Posteriormente, la concentración de ácido glucónico presentó incremento sostenido durante la fase intermedia del proceso fermentativo, registrándose valores superiores a 950 mg/L entre 168 y 192 h, comportamiento compatible con elevada actividad oxidativa y disponibilidad de sustrato fermentable (Sheng et al., 2024).

El máximo promedio de producción se registró a las 408 h de fermentación con 1331,42 mg/L, precedido por valores cercanos a 1329,75 mg/L en etapas previas del cultivo, sugiriendo estabilización gradual del sistema fermentativo y acumulación extracelular del metabolito.

Este comportamiento cinético coincide con lo descrito para especies del género *Gluconobacter*, cuya producción de ácido glucónico se encuentra asociada a procesos de oxidación incompleta de carbohidratos mediados por deshidrogenasas localizadas en membrana, favoreciendo acumulación progresiva del ácido bajo condiciones aerobias. (Deppenmeier & Ehrenreich, 2009).

Tabla 6. Análisis cinético de la producción de ácido glucónico durante la fermentación.

Tiempo (h)	DO600 promedio	pH promedio	Ácido glucónico promedio (mg/L)
0	0	5,2	0
24	0,175	5,19	342,42
48	0,262	5,15	519,08
72	0,292	5,12	625,75
168	0,568	5	951,58
192	0,603	4,98	1053,25
216	0,624	4,93	1117,42
240	0,629	4,89	1132,42
264	0,637	4,83	1194,08
336	0,642	4,73	1283,25
360	0,656	4,71	1312,42
384	0,665	4,62	1329,75
408	0,67	4,61	1331,42

Nota. La tabla presenta los valores promedio de densidad óptica (DO600), pH y concentración de ácido glucónico obtenidos durante la fermentación de *Gluconobacter oxydans* utilizando extracto de cáscara de piña como sustrato.

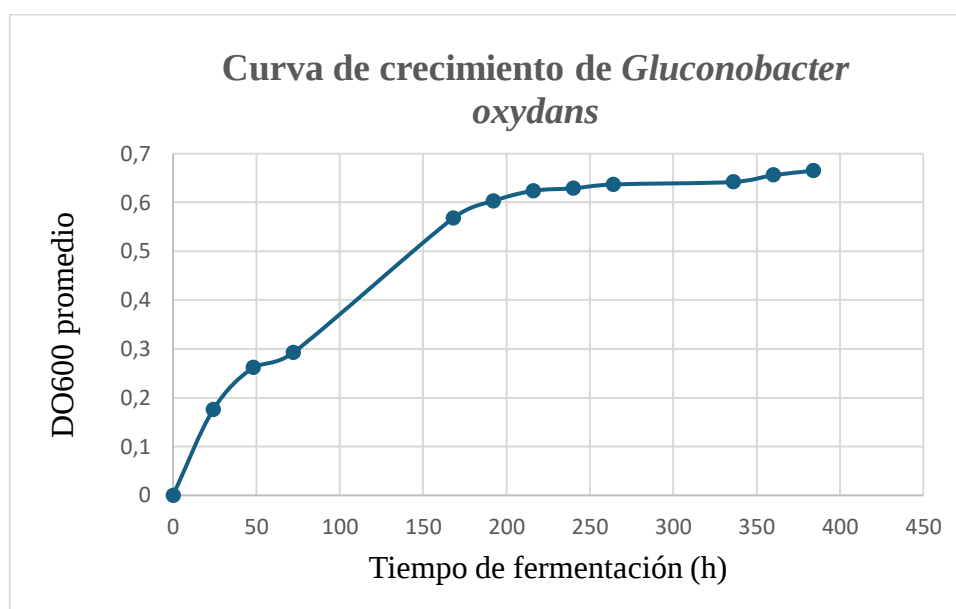
La **Tabla 6** evidencia incremento progresivo de la densidad óptica (DO600) acompañado de disminución gradual del pH y aumento sostenido de la concentración de ácido glucónico durante el periodo fermentativo.

La disminución del pH observada durante la fermentación sugiere actividad metabólica sostenida y liberación gradual de compuestos ácidos al medio extracelular, condición frecuentemente relacionada con la oxidación parcial de carbohidratos desarrollada por bacterias del género *Gluconobacter*. **(Ripoll et al., 2023)**. Paralelamente, la producción de ácido glucónico mostró incremento sostenido conforme avanzó la fermentación, evidenciando actividad oxidativa activa y aprovechamiento eficiente de los azúcares fermentables presentes en el extracto de cáscara de piña. **(Li et al., 2016)**.

La relación observada entre incremento del crecimiento bacteriano, disminución gradual del pH y acumulación progresiva de ácido glucónico coincide con el metabolismo oxidativo descrito para especies del género *Gluconobacter*, cuya producción de metabolitos orgánicos depende de sistemas enzimáticos asociados a deshidrogenasas localizadas en membrana celular. **(Deppenmeier & Ehrenreich, 2009)**. Diversos estudios describen que, durante fermentaciones aerobias desarrolladas por bacterias ácido-acéticas, el crecimiento celular puede mantenerse simultáneamente a la acidificación del medio y a la producción sostenida de ácidos orgánicos derivados de la oxidación incompleta de carbohidratos fermentables **(Tong et al., 2026)**.

En el presente estudio, la estabilización observada hacia las etapas finales de fermentación podría asociarse con una aproximación a la fase estacionaria del metabolismo bacteriano, condición relacionada con reducción progresiva del sustrato disponible y acumulación de productos ácidos en el medio fermentativo **(Ripoll et al., 2023)**.

Figura 14. Curva de crecimiento de *Gluconobacter oxydans* durante la fermentación.

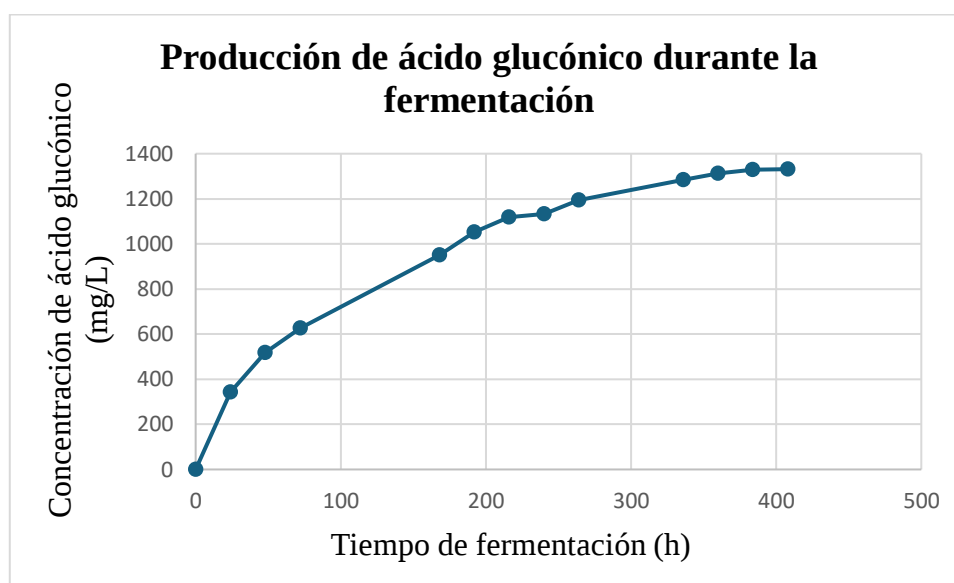


Nota. La figura presenta la variación de la densidad óptica promedio a 600 nm (DO600) durante la fermentación de *G. oxydans* utilizando extracto de cáscara de piña como sustrato fermentativo. Se observó incremento progresivo de biomasa bacteriana durante el periodo experimental.

Como se observa en la **Figura 14**, el crecimiento de *G. oxydans* presentó incremento progresivo durante el proceso fermentativo, evidenciado por el aumento gradual de la densidad óptica hacia las etapas finales de incubación, lo que indica adecuada adaptación bacteriana al extracto de cáscara de piña como sustrato fermentativo (**Deppenmeier & Ehrenreich, 2009**). Este comportamiento coincide con el crecimiento característico de bacterias ácido-acéticas aerobias, cuya actividad metabólica depende de disponibilidad de oxígeno y sustratos carbonados fermentables (**Mamlouk & Gullo, 2013**).

Diversos estudios describen que el crecimiento sostenido de *Gluconobacter* en medios ricos en azúcares fermentables favorece la actividad de sistemas enzimáticos asociados a oxidación incompleta de carbohidratos y producción de metabolitos extracelulares (**Li et al., 2016**). En el presente estudio, la tendencia ascendente de DO600 evidenció que la cepa purificada mantuvo actividad metabólica activa durante gran parte del proceso experimental, condición compatible con fermentaciones aerobias desarrolladas por bacterias ácido-acéticas oxidativas (**Tong et al., 2026**).

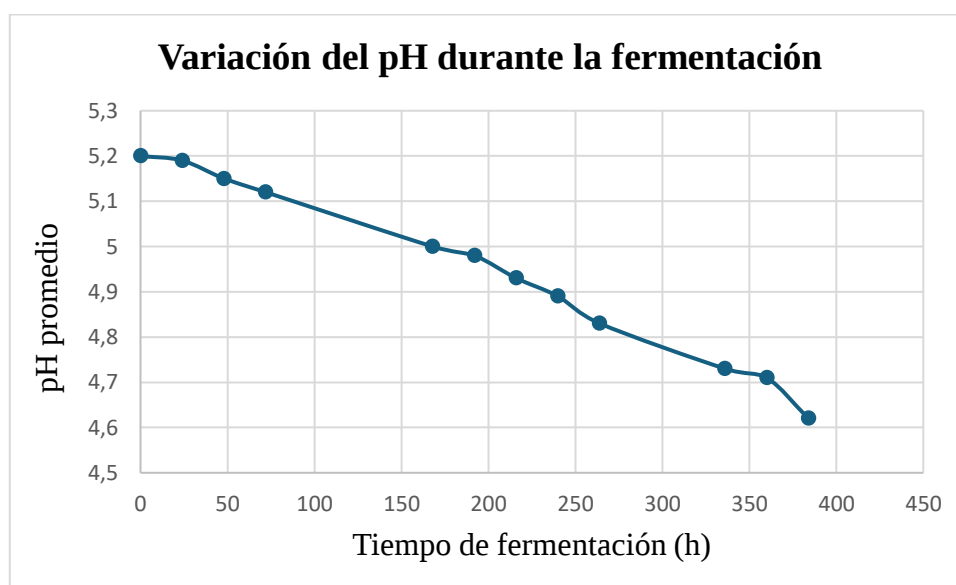
Figura 15. Producción de ácido glucónico durante la fermentación.



Nota. La figura presenta la variación de la concentración promedio de ácido glucónico durante la fermentación de *Gluconobacter oxydans* utilizando extracto de cáscara de piña como sustrato fermentativo.

La **Figura 15** evidencia incremento sostenido de la concentración de ácido glucónico durante el proceso fermentativo, observándose acumulación progresiva del metabolito hasta las etapas finales de incubación. La tendencia observada es compatible con el metabolismo oxidativo de *G. oxydans*, capaz de oxidar parcialmente glucosa mediante deshidrogenasas localizadas en membrana y liberar ácido glucónico al medio extracelular (**Deppenmeier & Ehrenreich, 2009**). Resultados similares han sido descritos en fermentaciones aerobias desarrolladas con bacterias ácido-acéticas sobre sustratos ricos en carbohidratos, donde la producción del metabolito aumenta mientras se mantiene actividad celular y disponibilidad de sustrato (**Li et al., 2016; Tong et al., 2026**).

Figura 16. Variación del pH durante la fermentación.



Nota. La figura presenta la variación del pH promedio durante la fermentación de *Gluconobacter oxydans* utilizando extracto de cáscara de piña como sustrato fermentativo, evidenciando acidificación progresiva del medio.

Paralelamente al incremento de biomasa y producción de ácido glucónico, la **Figura 16** evidenció disminución progresiva del pH durante el proceso fermentativo, pasando de valores cercanos a 5,2 al inicio hasta aproximadamente 4,6 en la etapa final, comportamiento compatible con la acumulación de compuestos ácidos derivados del metabolismo oxidativo bacteriano (**Mamlouk & Gullo, 2013**). Las bacterias ácido-acéticas generan acidificación gradual del medio debido a la oxidación incompleta de carbohidratos y liberación extracelular de ácidos orgánicos,

La acidificación gradual del medio coincide con la acumulación de ácido glucónico y otros metabolitos derivados del metabolismo oxidativo bacteriano, comportamiento característico de bacterias ácido-acéticas aerobias (**Mamlouk & Gullo, 2013**). En conjunto, el incremento de biomasa, la acumulación sostenida de ácido glucónico y la disminución progresiva del pH evidencian comportamiento fermentativo compatible con el metabolismo aeróbico de *G. oxydans* utilizando extracto de cáscara de piña como sustrato fermentable.

3.1.3. Determinación de la cinética de crecimiento de *Gluconobacter oxydans* y producción de ácido glucónico

El análisis cinético realizado a partir de los valores promedio de DO600, pH y concentración de ácido glucónico permitió identificar variaciones en la actividad fisiológica de *G. oxydans* durante la fermentación del extracto de cáscara de piña. Como se observa en la **Tabla 6**, el crecimiento bacteriano y la producción del metabolito no ocurrieron de manera uniforme, sino que presentaron cambios dependientes del tiempo de fermentación y del estado metabólico de la cepa purificada. Entre las primeras 72 h se evidenció incremento sostenido de biomasa y acumulación progresiva de ácido glucónico, lo que sugirió predominio de actividad oxidativa activa y adecuado aprovechamiento del sustrato fermentable (Li et al., 2016).

Posteriormente, aunque el crecimiento celular mostró tendencia gradual hacia estabilización, la producción del metabolito continuó aumentando, indicando persistencia de actividad enzimática asociada a la oxidación parcial de carbohidratos característica del género *Gluconobacter* (Deppenmeier & Ehrenreich, 2009). La disminución progresiva del pH observada durante el proceso acompañó la acumulación del ácido producido y evidenció modificación del medio fermentativo debido a la liberación extracelular de compuestos orgánicos (Mamlouk & Gullo, 2013).

3.1.3.1. Velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (td)

El análisis cinético permitió identificar que el intervalo comprendido entre 24 y 72 horas presentó el mayor incremento sostenido de biomasa relativa, correspondiente a la etapa de crecimiento exponencial del cultivo. Durante este periodo, la densidad óptica aumentó desde 0,175 hasta 0,292, obteniéndose una velocidad específica máxima de crecimiento ($\mu_{\max}$) de 0,022 h⁻¹. Este comportamiento evidenció elevada actividad fisiológica y adecuada adaptación de *G. oxydans* al medio elaborado con extracto de cáscara de piña, sugiriendo condiciones favorables para el establecimiento del metabolismo oxidativo bacteriano (Li et al., 2022).

La velocidad específica de crecimiento se determinó mediante la **Ecuación 3** presentada en Metodología. Se usa tramo 24–72 h de la **Tabla 6**, correspondiente a la fase exponencial.

$$\mu = \frac{\ln(0.292) - \ln(0.175)}{72 - 24}$$

$$\mu = 0.0218 \text{ h}^{-1}$$

Valores similares han sido descritos para bacterias ácido-acéticas aerobias desarrolladas en medios ricos en carbohidratos fermentables, donde la velocidad de crecimiento depende del aprovechamiento eficiente del sustrato y disponibilidad de oxígeno (Wang et al., 2022).

3.1.3.2. Velocidad volumétrica de producción (rp)

El comportamiento productivo de *Gluconobacter oxydans* evidenció que la formación de ácido glucónico no ocurrió de manera uniforme durante todo el proceso fermentativo, sino que presentó variaciones asociadas al estado fisiológico del cultivo y a la disponibilidad progresiva del sustrato. El mayor valor de velocidad volumétrica de producción ($r_{pmax} = 8,41 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) se registró entre 168 y 192 horas de fermentación, intervalo en el cual la producción del metabolito se mantuvo activa aun cuando el crecimiento bacteriano comenzaba a mostrar tendencia hacia estabilización. Este comportamiento indicó que la actividad oxidativa responsable de la síntesis de ácido glucónico permaneció fisiológicamente activa durante etapas posteriores al crecimiento exponencial máximo (Li et al., 2022).

La velocidad volumétrica de producción se calculó mediante la **Ecuación 4.** presentada en Metodología. Se usa Máximo intervalo 168–192 h de la **Tabla 6.**

$$r_p = \frac{1053.25 - 951.58}{24}$$

$$r_p = 8.41 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

3.1.3.3. Relación producto/biomasa (Yp/x)

La relación producto/biomasa permitió evaluar la eficiencia con la que *G. oxydans* transformó el crecimiento celular en producción de ácido glucónico durante el proceso fermentativo. El rendimiento obtenido ($Y_{p/x} = 1583 \text{ mg/L por DO}$) evidenció que el incremento de biomasa estuvo acompañado por acumulación progresiva del metabolito, sugiriendo estrecha relación fisiológica entre actividad celular y capacidad oxidativa de la cepa purificada. Este comportamiento indicó que el crecimiento bacteriano contribuyó de manera importante al sostenimiento de la producción observada durante la fermentación (Wang et al., 2022).

En bacterias ácido-acéticas, la producción de ácido glucónico depende de enzimas oxidativas asociadas a membrana, cuyo funcionamiento se encuentra vinculado al metabolismo respiratorio y al aprovechamiento continuo del sustrato disponible (Deppenmeier & Ehrenreich, 2009). Debido a ello, la síntesis del metabolito puede mantenerse aun cuando el

incremento de biomasa comienza a disminuir, siempre que persistan condiciones favorables de oxigenación y disponibilidad de carbohidratos fermentables (**Mamlouk & Gullo, 2013**). Esta característica fisiológica explica por qué el máximo productivo observado en el presente estudio ocurrió posteriormente al intervalo de mayor velocidad específica de crecimiento (**Li et al., 2022**).

El desplazamiento temporal entre μ_{max} y r_{pmax} sugiere que la producción de ácido glucónico no dependió exclusivamente del crecimiento exponencial, sino que permaneció activa durante etapas posteriores del cultivo. Este comportamiento ha sido descrito en bacterias oxidativas donde la actividad de deshidrogenasas continúa favoreciendo acumulación extracelular de metabolitos aun cuando la biomasa se aproxima gradualmente a estabilización (**Ortiz-Cortés et al., 2021**). La persistencia de actividad oxidativa registrada en el presente estudio coincide con la fisiología metabólica descrita para *Gluconobacter oxydans* cultivado bajo condiciones aerobias y medios ricos en azúcares fermentables (**Sheng et al., 2024**).

El rendimiento producto/biomasa fue calculado mediante la **Ecuación 7**.

$$\Delta P = 1053.25 - 342.42 = 710.83$$

$$\Delta X = 0.603 - 0.175 = 0.428$$

$$Y_{P/X} = 1661 \text{ mg } L^{-1} \text{ DO6000}^{-1}$$

Los resultados cinéticos obtenidos evidenciaron que la producción de ácido glucónico se mantuvo activa incluso después del intervalo de mayor velocidad específica de crecimiento, sugiriendo comportamiento parcialmente asociado al crecimiento celular. La separación temporal observada entre μ_{max} y r_{pmax} indicó que la síntesis del metabolito dependió tanto del desarrollo fisiológico bacteriano como de la persistencia de actividad oxidativa en etapas posteriores del cultivo (**Li et al., 2022**).

El rendimiento biomasa/sustrato se estimó utilizando la **Ecuación 5** descrita previamente en Metodología.

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S}$$

$$\Delta X = 0.603 - 0.175 = 0.428$$

$$\Delta S = 5.0 - 4.8 = 0.2$$

$$Y_{x/s} = \frac{0.428}{0.2}$$

$$Y_{x/s} = 2,14 \text{ DO600}/^\circ \text{Brix}$$

El rendimiento producto/sustrato calculado evidenció que pequeñas variaciones en °Brix estuvieron asociadas con incrementos importantes en la concentración de ácido glucónico producida durante el proceso fermentativo (**Ripoll et al., 2023**). La actividad oxidativa de *Gluconobacter oxydans* permaneció fisiológicamente activa durante la fermentación, favoreciendo la conversión progresiva de carbohidratos presentes en el extracto hacia metabolitos ácidos extracelulares (**Li et al., 2022**).

El rendimiento producto/sustrato se determinó mediante la **Ecuación 6**.

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S}$$

$$\Delta P = 1053.25 - 342.42 = 710.83$$

$$\Delta S = 5.0 - 4.8 = 0.2$$

$$Y_{P/S} = \frac{710.83}{0.2} = 3554.15 \text{ mgL. } L^{-1}/^\circ \text{Brix}$$

En conjunto, el rendimiento producto/sustrato obtenido indicó aprovechamiento eficiente del extracto de cáscara de piña durante la fermentación, evidenciando que la disponibilidad de carbohidratos presentes en el sustrato favoreció la producción sostenida de ácido glucónico bajo las condiciones experimentales evaluadas.

3.1.3.4. Ajuste de los datos experimentales al Modelo matemático de Luedeking–Piret Integral

$$P(t) = P_0 + \alpha(X - X_0) + \beta \int_0^t X(\tau) d\tau$$

Donde:

$P(t)$: concentración acumulada de ácido glucónico en el tiempo t .

P_0 : concentración inicial del producto.

$X - X_0$: biomasa formada

α : cuánto producto se genera por unidad de biomasa formada

$\int X dt$: biomasa acumulada en el tiempo

β : tasa de producción independiente del crecimiento

Parámetros:

- $\alpha = 1666.24$
- $\beta = 1.063$
- $R^2 = 0.988$

El ajuste de los datos experimentales de producción de ácido glucónico al modelo matemático de Luedeking–Piret en su forma integral demostró una alta capacidad descriptiva del sistema fermentativo, evidenciada por un coeficiente de determinación elevado ($R^2 \approx 0.99$). Este resultado confirma que la dinámica de formación del metabolito puede explicarse adecuadamente mediante la combinación de un término asociado al crecimiento celular y un término proporcional a la biomasa acumulada en el tiempo. La significancia simultánea de los parámetros α y β indica que la producción de ácido glucónico por *Gluconobacter oxydans* presenta un comportamiento cinético mixto, es decir, parcialmente dependiente de la fase exponencial de crecimiento y parcialmente independiente de ésta, manteniéndose activa durante la fase estacionaria.

Desde el punto de vista biológico, este comportamiento es coherente con el metabolismo oxidativo característico del género *Gluconobacter*, en el cual la conversión de glucosa a ácido glucónico ocurre mediante sistemas enzimáticos periplásmicos que pueden mantenerse activos aun cuando la tasa de crecimiento disminuye. La superioridad del modelo integral frente a la formulación diferencial radica en su estabilidad numérica y en la reducción del ruido asociado al cálculo de derivadas experimentales, lo que permite una estimación más robusta de los parámetros cinéticos. En conjunto, el ajuste obtenido valida el uso del modelo de Luedeking–Piret integral como herramienta matemática apropiada para describir y analizar la cinética de producción de ácido glucónico en sistemas batch utilizando extractos de residuos agroindustriales.

CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

El proceso de aislamiento y selección bacteriana realizado a partir de kombucha permitió obtener cepas con características preliminares compatibles con *Gluconobacter oxydans*, evidenciadas por la formación de halos de aclaramiento en medio GYC suplementado con carbonato de calcio y corroboradas mediante tinción de Gram y pruebas bioquímicas de catalasa y oxidasa. La presencia de bacilos Gram negativos y respuestas bioquímicas positivas confirmó el potencial oxidativo de las cepas seleccionadas, permitiendo reducir progresivamente la heterogeneidad microbiana inicial y disponer de un aislamiento adecuado para posteriores ensayos fermentativos.

El extracto de cáscara de piña demostró constituir un sustrato fermentativo funcional para el desarrollo de bacterias ácido-acéticas, debido a que el acondicionamiento aplicado permitió obtener un medio estable y compatible con la actividad metabólica bacteriana. La estabilidad observada durante el seguimiento experimental y la permanencia del crecimiento microbiano evidenciaron que los compuestos fermentables presentes en este residuo agroindustrial fueron aprovechados fisiológicamente por la cepa seleccionada, confirmando el potencial biotecnológico de la cáscara de piña como materia prima de bajo costo y valor agregado.

El seguimiento simultáneo de biomasa, producción de ácido glucónico y variación del pH permitió evidenciar un comportamiento fermentativo coherente con el metabolismo oxidativo característico de *G. oxydans*. El incremento progresivo del crecimiento bacteriano, reflejado por el aumento del DO600 desde 0,175 hasta aproximadamente 0,67, acompañado por la disminución gradual del pH desde 5,2 hasta valores cercanos a 4,6, indicó acumulación sostenida de metabolitos ácidos y permanencia de actividad fisiológica durante gran parte del proceso fermentativo.

La cuantificación espectrofotométrica del ácido glucónico mediante el método colorimétrico evaluado a 540 nm permitió determinar un incremento progresivo de la producción del metabolito a lo largo de la fermentación. La concentración promedio aumentó desde 342,42 mg/L durante las primeras 24 h hasta alcanzar un valor máximo de 1331,42 mg/L a las 408 h, comportamiento que evidenció mantenimiento sostenido de actividad oxidativa sobre los carbohidratos presentes en el extracto fermentativo. La adecuada linealidad de la curva estándar ($R^2 = 0,9907$) permitió estimar con confiabilidad las concentraciones obtenidas y respaldó la aplicabilidad analítica del método empleado.

El análisis cinético desarrollado permitió identificar parámetros fisiológicos relevantes asociados al comportamiento fermentativo de la cepa evaluada. La velocidad específica máxima de crecimiento alcanzó aproximadamente $0,022\text{ h}^{-1}$ y el tiempo de duplicación celular fue cercano a 31,8 h, indicando adecuada adaptación microbiana al medio elaborado con extracto de cáscara de piña. De manera complementaria, la velocidad volumétrica máxima de producción registrada ($8,41\text{ mg L}^{-1}\text{ h}^{-1}$) y los rendimientos cinéticos obtenidos evidenciaron que la síntesis de ácido glucónico se mantuvo activa aun después de la etapa de crecimiento exponencial, sugiriendo una relación parcialmente asociada al crecimiento y compatible con procesos oxidativos desarrollados por bacterias ácido-acéticas aerobias.

En conjunto, los resultados obtenidos permitieron demostrar que el empleo de extracto de cáscara de piña como sustrato fermentativo y el uso de cepas compatibles con *G. oxydans* constituyen una alternativa biotecnológica viable para la producción de ácido glucónico, integrando simultáneamente aprovechamiento de residuos agroindustriales y obtención de metabolitos de interés industrial mediante procesos fermentativos controlados.

4.2. Recomendaciones

- Resulta pertinente complementar la identificación preliminar obtenida mediante tinción de Gram y pruebas bioquímicas con técnicas de caracterización molecular, particularmente secuenciación del gen 16S rRNA u otros análisis genéticos equivalentes, con el propósito de confirmar taxonómicamente la cepa seleccionada y fortalecer la precisión microbiológica del estudio.
- Se recomienda desarrollar estudios de optimización fermentativa evaluando de manera controlada variables como aireación, disponibilidad de oxígeno, agitación, concentración inicial de sustrato y regulación de pH, debido a que el metabolismo oxidativo de *Gluconobacter oxydans* depende significativamente de estas condiciones y puede influir directamente sobre la productividad final de ácido glucónico.
- Se considera conveniente incrementar la frecuencia de muestreo durante las etapas tempranas e intermedias del proceso fermentativo, especialmente alrededor del intervalo donde se registró mayor velocidad de producción, con el objetivo de describir con mayor precisión la transición entre fases fisiológicas y fortalecer la interpretación cinética del cultivo.
- Se sugiere complementar el método espectrofotométrico empleado con técnicas analíticas instrumentales de mayor especificidad, como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para validar las concentraciones de ácido glucónico determinadas experimentalmente y comparar sensibilidad, exactitud y reproducibilidad entre metodologías de cuantificación.
- Se recomienda continuar investigando el uso de cáscara de piña y otros residuos agroindustriales ricos en carbohidratos fermentables como sustratos alternativos, incorporando estudios de escalamiento y evaluación económica del proceso, con la finalidad de determinar su factibilidad como estrategia sostenible para producción biotecnológica de ácido glucónico y valorización de subproductos agroindustriales.

BIBLIOGRAFÍA

- Albanese, D., Malvano, F., Sannini, A., Pilloton, R., & Di Matteo, M. (2014). A doped polyaniline modified electrode amperometric biosensor for gluconic acid determination in grapes. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 14(6), 11097–11109. <https://doi.org/10.3390/S140611097>
- Banerjee, S., Vijayaraghavan, R., Patti, A. F., & Arora, A. (2021). Integrated Biorefinery Strategy for Valorization of Pineapple Processing Waste into High-Value Products. *Waste and Biomass Valorization* 2021 13:1, 13(1), 631–643. <https://doi.org/10.1007/S12649-021-01542-7>
- Celis Cabeza, M. V., Toro Ruedas, C. D., Rodríguez Ordoñez, D. C., Parra Llanos, J. W., Celis Cabeza, M. V., Toro Ruedas, C. D., Rodríguez Ordoñez, D. C., & Parra Llanos, J. W. (2024). Characterization of pineapple peel (*Ananas comosus*) Perolera variety as a potential resource for bioethanol production. *Revista ION*, 37(3), 73–83. <https://doi.org/10.18273/revion.v37n3-2024006>
- 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>
- da Silva, G. A. R., Oliveira, S. S. de S., Lima, S. F., do Nascimento, R. P., Baptista, A. R. de S., & Fiaux, S. B. (2022). The industrial versatility of *Gluconobacter oxydans*: current applications and future perspectives. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 38(8). <https://doi.org/10.1007/S11274-022-03310-8>
- Dai, L., Jiang, W., Jia, R., Zhou, X., & Xu, Y. (2022). Directional enhancement of 2-keto-gluconic acid production from enzymatic hydrolysate by acetic acid-mediated bio-oxidation with *Gluconobacter oxydans*. *Bioresource Technology*, 348. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126811>
- Dai, L., Lian, Z., Fu, Y., Zhou, X., Xu, Y., Zhou, X., Kuznetsov, B. N., & Jiang, K. K. (2023). Low pH Stress Enhances Gluconic Acid Accumulation with Enzymatic Hydrolysate as Feedstock Using *Gluconobacter oxydans*. *Fermentation* 2023, Vol. 9, 9(3). <https://doi.org/10.3390/fermentation9030278>
- Dai, L., Lian, Z., Zhang, R., Nawaz, A., ul Haq, I., Zhou, X., & Xu, Y. (2022). Multi-strategy in production of high titer gluconic acid by the fermentation of concentrated cellulosic hydrolysate with *Gluconobacter oxydans*. *Industrial Crops and Products*, 189, 115748. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115748>
- Deppenmeier, U., & Ehrenreich, A. (2009). Physiology of Acetic Acid Bacteria in Light of the Genome Sequence of *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 16(1–2), 69–80. <https://doi.org/10.1159/000142895>
- Dhar, P., Nickhil, C., Pandiselvam, R., & Deka, S. C. (2024). Pineapple waste-based-biorefinery for sustainable generation of value-added products. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(20), 24927–24948. <https://doi.org/10.1007/S13399-023-04801-W/METRICS>

- Gomes, R. J., Borges, M. de F., Rosa, M. de F., Castro-Gómez, R. J. H., & Spinosa, W. A. (2018). Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications. *Food Technology and Biotechnology*, 56(2), 139–151. <https://doi.org/10.17113/FTB.56.02.18.5593>
- Harris, D. C., & Berenguer Navarro, V. (2007). *Análisis químico cuantitativo*. <http://opac.univalle.edu.co/cgi-olimp/?infile=details.glu&luid=703165&rs=4249379&hitno=1>
- Hermann, U., Merfort, M., Jeude, M., Bringer-Meyer, S., & Sahm, H. (2004). Biotransformation of glucose to 5-keto-D-gluconic acid by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(1), 86–90. <https://doi.org/10.1007/S00253-003-1455-8>
- Hidayatullah, I. M., Maritza, D. A., Yohda, M., Sahlan, M., Kusmayadi, A., Leong, Y. K., & Hermansyah, H. (2025). Fermentative Synthesis of Gluconic and Xylonic Acids from Hydrolyzed Palm Fronds Using *Gluconobacter oxydans*. *Bioengineering* 2025, Vol. 12, 12(8). <https://doi.org/10.3390/bioengineering12080801>
- Hölscher, T., Schleyer, U., Merfort, M., Bringer-Meyer, S., Görisch, H., & Sahm, H. (2008). Glucose oxidation and PQQ-dependent dehydrogenases in *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 16(1–2), 6–13. <https://doi.org/10.1159/000142890>
- Kapp, J. M., & Sumner, W. (2019). Kombucha: a systematic review of the empirical evidence of human health benefit. *Annals of Epidemiology*, 30, 66–70. <https://doi.org/10.1016/J.ANNEPIDEM.2018.11.001>
- Khan, R. (2026). Valorization of Pineapple Waste: Functional and Biotechnological Applications-A Comprehensive Review. *Current Food Science and Technology Reports* 2026 4:1, 4(1), 2-. <https://doi.org/10.1007/S43555-026-00077-Z>
- Kitova, A., Tarasov, S., Plekhanova, Y., Bykov, A., & Reshetilov, A. (2021). Direct Bioelectrocatalytic Oxidation of Glucose by *Gluconobacter oxydans* Membrane Fractions in PEDOT:PSS/TEG-Modified Biosensors. *Biosensors*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/BIOS11050144>
- Kovárová-Kovar, K., & Egli, T. (1998). Growth Kinetics of Suspended Microbial Cells: From Single-Substrate-Controlled Growth to Mixed-Substrate Kinetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 646–666. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.646-666.1998>
- Li, G., Shan, X., Zeng, W., Yu, S., Zhang, G., Chen, J., & Zhou, J. (2022). Efficient Production of 2,5-Diketo-D-gluconic Acid by Reducing Browning Levels During *Gluconobacter oxydans* ATCC 9937 Fermentation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 918277. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2022.918277/TEXT>
- Li, K., Mao, X., Liu, L., Lin, J., Sun, M., Wei, D., & Yang, S. (2016). Overexpression of membrane-bound gluconate-2-dehydrogenase to enhance the production of 2-keto-D-gluconic acid by *Gluconobacter oxydans*. *Microbial Cell Factories*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/S12934-016-0521-8>

- Lian, Z., Dai, L., Zhang, R., Liu, Y., Zhou, X., & Xu, Y. (2022). Efficient aerobic fermentation of gluconic acid by high tension oxygen supply strategy with reusable *Gluconobacter oxydans* HG19 cells. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2022 45:11, 45(11), 1849–1855. <https://doi.org/10.1007/S00449-022-02791-Z>
- Liu, C., Zhang, J., Huang, J., Zhang, C., Hong, F., Zhou, Y., Li, G., & Haruta, M. (2017). Efficient Aerobic Oxidation of Glucose to Gluconic Acid over Activated Carbon-Supported Gold Clusters. *ChemSusChem*, 10(9), 1976–1980. <https://doi.org/10.1002/CSSC.201700407>
- Liu, X., Ding, C., He, T., Zhu, Y., Sun, L., Xu, C., & Gu, X. (2023). Kinetic modeling of xylonic acid production by *Gluconobacter oxydans*: effects of hydrodynamic conditions. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2023 46:6, 46(6), 829–837. <https://doi.org/10.1007/S00449-023-02865-6>
- Ma, Y., Li, B., Zhang, X., Wang, C., & Chen, W. (2022). Production of Gluconic Acid and Its Derivatives by Microbial Fermentation: Process Improvement Based on Integrated Routes. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 864787. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.864787>
- Mamlouk, D., & Gullo, M. (2013). Acetic Acid bacteria: physiology and carbon sources oxidation. *Indian Journal of Microbiology*, 53(4), 377–384. <https://doi.org/10.1007/S12088-013-0414-Z>
- Mandlaa, M., Liu, M., Ren, G., Qu, H., Wang, H., Ma, F., Zhang, M., Guo, J., Chen, Z., & Sun, Z. (2025). Composition and distribution characteristics of acetic acid-related bacteria during the fermentation process of strong-flavor baijiu. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1603412. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2025.1603412/TEXT>
- Meena, L., Sengar, A. S., Neog, R., & Sunil, C. K. (2021). Pineapple processing waste (PPW): bioactive compounds, their extraction, and utilisation: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 59(11), 4152. <https://doi.org/10.1007/S13197-021-05271-6>
- Mytilinaios, I., Salih, M., Schofield, H. K., & Lambert, R. J. W. (2012). Growth curve prediction from optical density data. *International Journal of Food Microbiology*, 154(3), 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.035>
- Neffe-Skocińska, K., Długosz, E., Szulc-Dąbrowska, L., & Zielińska, D. (2023). Novel *Gluconobacter oxydans* strains selected from Kombucha with potential postbiotic activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 27. <https://doi.org/10.1007/S00253-023-12915-4>
- Neffe-Skocińska, K., Długosz, E., Szulc-Dąbrowska, L., & Zielińska, D. (2024). Novel *Gluconobacter oxydans* strains selected from Kombucha with potential postbiotic activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/S00253-023-12915-4>
- Noman, A. E., Al-Barha, N. S., Sharaf, A. A. M., Al-Maqtari, Q. A., Mohedein, A., Mohammed, H. H. H., & Chen, F. (2020). A novel strain of acetic acid bacteria *Gluconobacter oxydans* FBFS97 involved in riboflavin production. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 13527-. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70404-4>

- Olijve, W., & Kok, J. J. (1979). Analysis of growth of *Gluconobacter oxydans* in glucose containing media. *Archives of Microbiology*, 121(3), 283–290. <https://doi.org/10.1007/BF00425069>/METRICS
- Ortiz-Cortés, L. Y., Ventura-Canseco, L. M. C., Abud-Archila, M., Ruíz-Valdiviezo, V. M., Velázquez-Ríos, I. O., & Alvarez-Gutiérrez, P. E. (2021). Evaluation of temperature, pH and nutrient conditions in bacterial growth and extracellular hydrolytic activities of two *Alicyclobacillus* spp. strains. *Archives of Microbiology*, 203(7), 4557–4570. <https://doi.org/10.1007/S00203-021-02332-4>
- Paz-Arteaga, S. L., Ascacio-Valdés, J. A., Aguilar, C. N., Cadena-Chamorro, E., Serna-Cock, L., Aguilar-González, M. A., Ramírez-Guzmán, N., & Torres-León, C. (2023). Bioprocessing of pineapple waste for sustainable production of bioactive compounds using solid-state fermentation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 85, 103313. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2023.103313>
- Ripoll, M., Lerma-Escalera, J. A., Morones-Ramírez, J. R., Rios-Solis, L., & Betancor, L. (2023). New perspectives into *Gluconobacter*-catalysed biotransformations. *Biotechnology Advances*, 65. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108127>
- Rivera, A. M. P., Toro, C. R., Londoño, L., Bolivar, G., Ascacio, J. A., & Aguilar, C. N. (2022). Bioprocessing of pineapple waste biomass for sustainable production of bioactive compounds with high antioxidant activity. *Journal of Food Measurement and Characterization* 2022 17:1, 17(1), 586–606. <https://doi.org/10.1007/S11694-022-01627-4>
- Saini, R., Chen, C. W., Patel, A. K., Saini, J. K., Dong, C. Di, & Singhania, R. R. (2022). Valorization of Pineapple Leaves Waste for the Production of Bioethanol. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING9100557>
- Sarangi, P. K., Anand Singh, T., Joykumar Singh, N., Prasad Shadangi, K., Srivastava, R. K., Singh, A. K., Chandel, A. K., Pareek, N., & Vivekanand, V. (2022). Sustainable utilization of pineapple wastes for production of bioenergy, biochemicals and value-added products: A review. *Bioresource Technology*, 351. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2022.127085>
- Setiawan, W. K., & Chiang, K. Y. (2021). Eco-friendly rice husk pre-treatment for preparing biogenic silica: Gluconic acid and citric acid comparative study. *Chemosphere*, 279, 130541. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.130541>
- Sharafi, S. M., Rasooli, I., & Beheshti-Maal, K. (2010). Isolation, characterization and optimization of indigenous acetic acid bacteria and evaluation of their preservation methods. *Iranian Journal of Microbiology*, 2(1), 38. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3279764/>
- Shcherbakova-Sandu, M. P., Meshcheryakov, E. P., Gulevich, S. A., Kushwaha, A. K., Kumar, R., Sonwane, A. K., Samal, S., & Kurzina, I. A. (2025). Use of Glucose Obtained from Biomass Waste for the Synthesis of Gluconic and Glucaric Acids: Their Production, Application, and Future Prospects. *Molecules* 2025, Vol. 30, 30(14). <https://doi.org/10.3390/molecules30143012>

- Sheng, Z., Li, Y., & Wang, J. (2024). High-yield production of 5-keto-D-gluconic acid via regulated fermentation strategy of *Gluconobacter oxydans* and its conversion to L-(+)-tartaric acid. *Heliyon*, 10(17). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e36527>
- Tong, K., Liao, Y., Tang, Y., Luo, Y., Liu, X., Yu, D., Zhou, J., Hou, C., & Li, Z. (2026). Red Yeast Rice-Driven Kombucha Fermentation: A Novel Strategy for Developing Functional Beverages with Enhanced Hypoglycemic and Hypolipidemic Properties. *Foods*, 15(4), 747. <https://doi.org/10.3390/FOODS15040747/S1>
- 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, B., Rutherford-Markwick, K., Zhang, X. X., & Mutukumira, A. N. (2022a). Isolation and characterisation of dominant acetic acid bacteria and yeast isolated from Kombucha samples at point of sale in New Zealand. *Current Research in Food Science*, 5, 835. <https://doi.org/10.1016/J.CRFS.2022.04.013>
- Wang, B., Rutherford-Markwick, K., Zhang, X. X., & Mutukumira, A. N. (2022b). Kombucha: Production and Microbiological Research †. *Foods*, 11(21), 3456. <https://doi.org/10.3390/FOODS11213456/S1>
- Zhu, Z., Xi, L., Subhani, Q., Huang, Z., & Zhu, Y. (2013). Simultaneous determination of glucose, D-gluconic, 2-keto-D-gluconic and 5-keto-D-gluconic acids by ion chromatography-pulsed amperometric detection with column-switching technique. *Talanta*, 113, 113–117. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.03.019>

ANEXOS

Anexo 1 . Crecimiento inicial de colonias de *Gluconobacter oxydans* en medio sólido.



Nota. Se observa el crecimiento inicial de colonias aisladas de *G. oxydans* cultivadas en medio sólido, evidenciando desarrollo microbiano y distribución dispersa de colonias.

Anexo 2. Desarrollo y aumento poblacional de colonias de *Gluconobacter oxydans*.



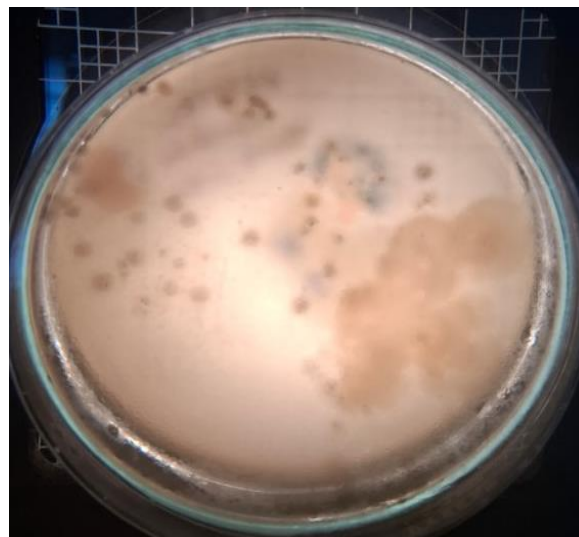
Nota. La imagen muestra incremento en el número y tamaño de colonias bacterianas, indicando adaptación y proliferación del microorganismo en el medio de cultivo.

Anexo 3. Crecimiento avanzado de *Gluconobacter oxydans* en placa de cultivo.



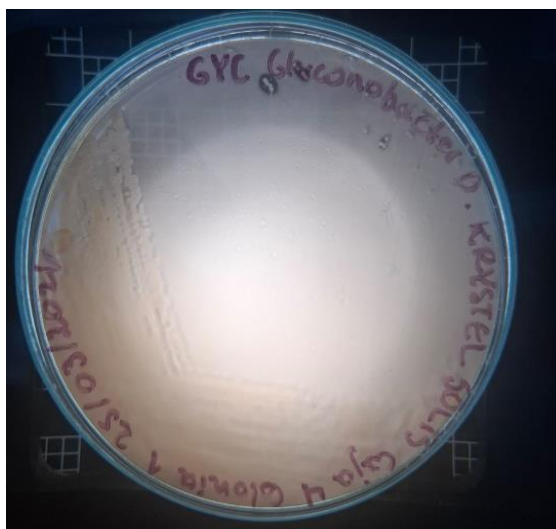
Nota. Se evidencia mayor densidad de colonias y crecimiento más extendido sobre el medio sólido, compatible con desarrollo bacteriano sostenido.

Anexo 4. Variación morfológica y crecimiento heterogéneo de colonias bacterianas.



Nota. La imagen evidencia colonias con diferente tamaño y distribución sobre el medio de cultivo, sugiriendo crecimiento diferencial y actividad metabólica bacteriana.

Anexo 5. Preparación y siembra de *Gluconobacter oxydans* en medio sólido.



Nota. Se presenta la placa preparada para el cultivo bacteriano, utilizada durante el proceso de aislamiento y evaluación microbiológica.

Anexo 6. Determinación del pH del medio fermentativo.



Nota. Medición del pH del extracto de cáscara de piña inoculado con *Gluconobacter oxydans* utilizando un potenciómetro digital para el seguimiento de la acidificación del medio durante la fermentación.

Anexo 7. Extracto de cáscara de piña utilizado como sustrato fermentativo.



Nota. Se observa el extracto de cáscara de piña empleado como medio fermentativo. En la parte inferior del recipiente se aprecia una ligera acumulación de material sedimentado, atribuible a partículas suspendidas del extracto y posiblemente a biomasa microbiana generada durante el proceso fermentativo. La presencia de este sedimento es compatible con el desarrollo del cultivo y la transformación biológica del sustrato.

Anexo 8. Observación de precipitación de carbonato de calcio en medio inoculado con



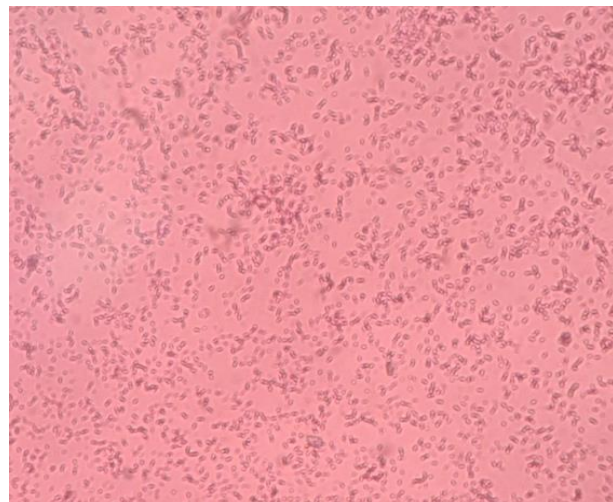
Nota. La imagen muestra la placa inoculada con *Gluconobacter oxydans*, donde se observa en la parte inferior del medio la presencia de carbonato de calcio (CaCO_3) condensado o precipitado. Este componente fue incorporado al medio como indicador asociado a la actividad oxidativa y producción de compuestos ácidos durante el crecimiento bacteriano.

Anexo 9. Manejo microbiológico durante el cultivo bacteriano.



Nota. Se observa el empleo de material de laboratorio y fuente de esterilización utilizados durante la manipulación y aislamiento de *G. oxydans*.

Anexo 10. Observación microscópica de *Gluconobacter oxydans* mediante tinción bacteriana.



Nota. La microfotografía evidencia células bacterianas observadas al microscopio óptico, utilizadas para la caracterización morfológica del microorganismo.