

SEP
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCIÓN I.- TESIS

TRABAJO PROFESIONAL

"PRODUCCIÓN Y ESTUDIO DINÁMICO DE BIOPELÍCULAS
DE UN CONSORCIO DE TÍBICOS AISLADOS
A PARTIR DE CÁSCARA DE PIÑA"

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN INGENIERÍA QUÍMICA

PRESENTA:

Ing. Paul Linares Bravo

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Denis Cantú Lozano

CODIRECTOR DE TESIS:

M. C. Raúl Pérez Ávila



ORIZABA, VERACRUZ, MÉXICO.

MAYO 2018

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“Producción y estudio dinámico de biopelículas de un consorcio de
típicos aislados a partir de cáscara de piña”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA**

PRESENTA:

Ing. Paul Linares Bravo

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Denis Cantú Lozano

CO-DIRECTOR DE TESIS:

MC. Raúl Pérez Ávila



DEDICATORIAS

A Ian, por ser mi motivación, fuerza, valor y alegría.

A Rosy, por su inspiración, apoyo incondicional y amor.

A mis padres Paul y Angélica, por sus enseñanzas, amor y apoyo.

A la familia Bravo de la Luz, por sus consejos.

A mis amigos y compañeros, por su apoyo moral y laboral.

RECONOCIMIENTOS

Agradezco sinceramente al Dr. Denis Cantú Lozano, por brindar esta oportunidad, amistad, enseñanzas y por dirigir el presente proyecto siendo un verdadero ejemplo a seguir.

Agradezco sinceramente al MC. Raúl Pérez Ávila, por su apoyo incondicional, amistad, enseñanzas y por co-dirigir el presente proyecto.

A los miembros del jurado, Dra. Guadalupe Luna Solano, Dr. Galo Urrea García, por su guía, enseñanza y compromiso.

A CONACyT, por la beca otorgada, con número 738332, perteneciente a la Convocatoria de Becas Nacionales 2015.

RESUMEN

Producción y estudio dinámico de biopelículas a partir de un consorcio de tíficos aislados de cáscara de piña

Elaborada por: Ing. Paul Linares Bravo.

Dirigida por: Dr. Denis Cantú Lozano.

Co-Dirigida por: MC. Raúl Pérez Ávila

El envasado de alimentos presenta una serie de problemas medioambientales y grandes costes operativos debido a su derivación de los recursos fósiles. Además del problema con los plásticos, el procesamiento de la piña genera una gran cantidad de residuos agroindustriales. A pesar de esto, las características de estos residuos han demostrado ser extremadamente útiles dentro de la industria alimentaria, farmacéutica y petrolera.

El presente proyecto tiene como objetivo contribuir a mejorar la eficiencia del proceso en generación de biopolímeros y obtener un producto de valor agregado como biopelículas, a través de sus diferentes operaciones unitarias y materias primas (granos de Kefir y residuos de piña).

Esto se hizo mediante análisis cinéticos y reológicos, así como diferentes determinaciones fisicoquímicas, en el proceso de producción de biopelículas.

Fue posible concluir que los cultivos de Kefir de agua en medios de panela y azúcar adicionando cáscara de piña producen biopelículas, la cinética de crecimiento con PP25 a 35°C (panela -cáscara de piña a 25°Brix) es la que mayor concentración de biomasa mostró para el tercer día se asume que la cáscara de piña contribuye a incrementar la constante de velocidad de crecimiento específica y la concentración de biomasa máxima. El comportamiento reológico en estado estacionario mostró ser un fluido Herschel-Blukley ya que representa a un comportamiento no-Newtoniano con características dilatantes. Los caldos de fermentación se comportaron como una solución de partículas esféricas diluidas ajustándose al modelo de Einstein, μ_r tiene un valor promedio de 1.6 Pa s este comportamiento coincide con el reportado por Cantú-Lozano, 1987 con levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, la biopelícula obtenida tiene un alto valor de proteínas y humedad, un pH ácido y una acidez promedio de 3% además predominan las características elásticas de acuerdo al análisis reológico dinámico que se realizó lo que favorece su aplicación como material de embalaje.

ABSTRACT

Production and dynamic study of biofilms from a consortium of Kefir grains isolated from pineapple peel

By: Paul Linares Bravo.

Advisor: Dr. Denis Cantú Lozano.

Co-Advisor: MC. Raúl Pérez Ávila.

The packaging of food presents a series of environmental problems and large operating costs due to its derivation of fossil resources. In addition to the problem with plastics, pineapple processing generates a large amount of agroindustrial waste. Despite this, the characteristics of these residues have proven extremely useful in the food, pharmaceutical and oil industries.

The objective of this project is to contribute to improving the efficiency of the process in the generation of biopolymers and obtain a value-added product such as biofilms, through its different unit operations and raw materials (kefir grains and pineapple waste).

This was done by kinetic and rheological analysis, as well as different physicochemical determinations, in the process of bioplate production.

It was possible to conclude that kefir cultures of water in panela and sugar media adding pineapple peel produce biofilms, the kinetics of growth with PP25 at 35 ° C is the highest concentration of biomass showed for the third day it is assumed that the peel of pineapple contributes to increase the specific growth rate constant and the maximum biomass concentration. The rheological behavior at steady state showed to be a Herschel-Blukley fluid since it represents a non-Newtonian behavior with dilatant characteristics. The fermentation broths behaved as a solution of diluted spherical particles adjusting to the Einstein model, μ_r has an average value of 1.6 Pa s, this behavior coincides with the one reported by Cantú-Lozano, 1987 with yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, the biofilm obtained has a high protein and moisture value, an acid pH and an average acidity of 3%. Elastic characteristics predominate according to the dynamic rheological analysis that was carried out, which favors its application as a packaging mater.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABLAS	VII
NOMENCLATURA	IX
INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	
1.1. Problemática ambiental mundial debida a residuos plásticos no biodegradables	5
1.2. Residuos agroindustriales	6
1.2.1. Materia prima	7
1.2.1.1. Generalidades de la piña	7
1.2.1.2. Tibicos	9
1.3. Biopolímeros (polímeros biodegradables)	12
1.3.1. Biopolímeros para embalaje (Películas de empaque)	13
1.3.1.1. Biopelículas producidas por microorganismos	15
1.3.1.2. Biopelículas de proteínas	15
1.3.1.3. Biopelículas a base de gelatina	16
1.3.1.4. Plastificantes	16
1.3.2. Crecimiento microbiano	17
1.3.2.1. Modelo cinético de Monod	18
1.3.3. Parámetros fisicoquímicos	19
1.3.4. Propiedades mecánicas de las biopelículas	20
1.3.4.1. Texturometria	20
1.4. Reología	22
1.4.1. Clasificación de los materiales	22
1.4.1.1. Comportamiento fenomenológico en fluidos	22
1.4.1.2. Comportamiento fenomenológico en solidos	26
1.4.1.3. Materiales viscoelásticos	26
1.4.2. Modelos reológicos	28
1.4.3. Variación de la viscosidad con respecto a la temperatura	30
1.4.4. Reometría	30

CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Metodología general	35
2.2. Recolección de cáscara de piña y propagación de los tibicos	36
2.3. Proceso de fermentación para la obtención de la biopelícula	36
2.4. Determinación reológica a la sustancia formadora de biopelícula	37
2.4.1. Determinación del comportamiento de la viscosidad de la suspensión de kefir de agua	38
2.5. Caracterización de la biopelícula obtenida	39
2.5.1. Microscopia óptica	39
2.6. Caracterización fisicoquímica	39
2.6.1. Determinación de cenizas	39
2.6.2. Determinación de humedad	39
2.6.3. Determinación de pH	39
2.6.4. Determinación de acidez	39
2.6.5. Determinación de grasas	40
2.6.6. Determinación de proteínas	40
2.6.7. Determinación de fibra cruda	40
2.7. Pruebas mecánicas a la biopelícula de tibicos	40
2.7.1. Determinación de espesor	40
2.7.2. Determinación de reología elongacional y esfuerzo	40
2.8. Determinación reológica a la biopelícula obtenida	41
2.8.1. Estudio reológico dinámico	41
2.8.2. Viscoelasticidad lineal	41

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Proceso de fermentación para la obtención de la biopelícula	43
3.1.1. Proceso de fermentación para la obtención de la biopelícula en ausencia de Oxígeno	43
3.1.2. Proceso de fermentación para la obtención de la biopelícula en presencia de Oxígeno	46
3.1.3. Cinéticas y constantes de Monod	50
3.2. Reología de las sustancias formadoras de biopelícula	53

3.2.1. Comportamiento de la suspensión de kefir en base a la ecuación de Einstein	56
3.3. Biopelícula obtenida	54
3.3.1. Microscopia óptica	58
3.4. Caracterización fisicoquímica a la biopelícula obtenida	59
3.5. Caracterización mecánica de la biopelícula de tibicos y cáscara de piña	60
3.6. Caracterización reológica de la biopelícula de tibicos y cáscara de piña	61
3.7. Análisis estadístico	64
3.7.1. Análisis estadístico del proceso de fermentación en presencia de Oxígeno	64
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	66
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1.1 Producción mundial de plástico	5
1.2 Producción mundial de plástico por tipo de uso	5
1.3 Porcentajes de producción de piña en México	8
1.4 Clasificación y categoría de los polímeros	13
1.5 Cinética de crecimiento microbiano	18
1.6 Gráfico de método diferencial de Monod	19
1.7 Curva típica de resistencia a la tensión (σ) contra la distancia a la elongación (ϵ)	20
1.8 Curvas de deformación para materiales elásticos (Hookeanos), elastoplásticos y no elástico lineal o viscosos (viscoelásticos)	21
1.9 Comportamiento de fluidos independientes del tiempo, con respecto al esfuerzo de corte (a) y viscosidad aparente (b)	23
1.10 Comportamiento de fluidos dependientes del tiempo	25
1.11 Clasificación de acuerdo a comportamiento reológico	26
1.12 Variación del ángulo de fase con respecto a la frecuencia	28
1.13 Reograma del proceso de obtención de bioetanol en estado estacionario	31

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
2.1	Diagrama de metodología para “Producción y estudio dinámico de biopelículas de un consorcio de táticos aislados a partir de cáscara de piña”	35
3.1	Cinética de crecimiento de los granos de Kefir en base seca	44
3.2	Efecto del pH y ORP en ausencia de oxígeno	45
3.3	Cinética de crecimiento de los granos de Kefir en base seca en presencia de oxígeno	47
3.4	Efecto del pH y ORP en presencia de oxígeno	48
3.5	Gráficos del método diferencial de Monod a 25°C	51
3.6	Gráficos del método diferencial de Monod a 35°C	52
3.7	Reograma en función del esfuerzo de corte en estado estacionario	54
3.8	Reograma en función de la viscosidad en estado estacionario	55
3.9	Comportamiento de la viscosidad relativa de la suspensión de soluciones formadoras de biopelículas	57
3.10	Biopelículas obtenidas a 35 °C	57
3.11	Microscopía óptica	58
3.12	Gráfico de esfuerzo a la tensión a la biopelícula obtenida	61
3.13	Gráfico de barrido de amplitud de la biopelícula obtenida	63
3.14	Gráfico de barrido de frecuencia de la biopelícula obtenida	63

LISTA DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1.1	Producción de piña en México	7
1.2	Microrganismos presentes en los tibicos	11
1.3	Determinaciones necesarias para caracterizar fisicoquímicamente biopelículas	21
1.4	Modelos reológicos para describir el comportamiento de fluidos no Newtonianos	29
1.5	Esquemas de pruebas rotacionales	31
1.6	Esquemas de pruebas oscilatorias	32
2.1	Diseño de experimentos factorial	37
2.2	Sistemas de geometrías y Peltier empleados para caracterización reológica de cada muestra	38
3.1	Datos obtenidos de la regresión lineal en el proceso de fermentación con respecto al tiempo	46
3.2	Datos obtenidos de la regresión lineal en el proceso de fermentación con respecto al tiempo en presencia de oxígeno	50
3.3	Parámetros cinéticos de la ecuación de Monod	50
3.4	Parámetros reológicos de modelo Herschel Bulkley	53
3.5	Caracterización fisicoquímica de la biopelícula obtenida	56
3.6	Resultados de las pruebas mecánicas de la biopelícula obtenida	60
3.7	ANOVA del proceso fermentativo en presencia de oxígeno	64
3.8	Comparación múltiple de Tukey Kramer	65

NOMENCLATURA

VARIABLE	DESCRIPCIÓN	UNIDADES
G'	Módulo de almacenamiento	Pa
G''	Módulo de pérdida	Pa
G^*	Módulo complejo	Pa
K	Índice de consistencia	Pa s ⁿ
n	Índice reológico	-
T	Temperatura absoluta	K
ε	Elongación o Deformación	-
Y	Modulo de elasticidad	-
η_0	Viscosidad inicial dependiente del fluido	Pa s
η_{ap}	Viscosidad aparente	Pa s
η^*	Viscosidad compleja	Pa s
$\dot{\gamma}$	Velocidad de deformación	1/s
γ	Deformación	-
μ	Viscosidad dinámica	Pa s
τ	Tensión o esfuerzo de corte	Pa
τ_0	Tensión o esfuerzo de corte inicial	Pa
σ	Resistencia a la tensión	MPa

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el interés en los envases biodegradables como alternativa a los envases y empaques sintéticos a base de petróleo no biodegradables se ha incrementado para reducir el impacto sobre el medio ambiente y en la salud humana. Estos compuestos juegan un importante papel en la prevención de las enfermedades cardiovasculares, cáncer y diabetes (Moraes *et al.*, 2016). Una estadística mundial muestra que el 43% de las especies de mamíferos marinos, 86 % de las especies de tortugas marinas, y 44 % de las especies de aves marinas son susceptibles a la ingestión de desechos plásticos marinos (Malathy *et al.*, 2014).

Muchas materias primas han sido usadas para obtener biopelículas biodegradables, destacando entre ellas biopolímeros de fuentes renovables como los tiburinos, uno de los materiales orgánicos que cuenta con un bajo costo de producción, disponibilidad mundial y por su fácil manejo en la formación de biopelículas (Hernández-Espinosa y Linares-Bravo, 2015).

Las biopelículas son estructuras complejas de asociación de microorganismos similares y de diferentes especies de plantas, bacterias, levaduras, hongos y algas, con el fin de organizarse en forma de un biomaterial con características superiores a las que presentan individualmente estos microorganismos. Estos organismos son ampliamente explotados industrialmente, especialmente en las industrias de alimentos, productos químicos y farmacéuticos, debido a sus propiedades de catión emulsionante, estabilización, floculación, control de la cristalización, la inhibición de la sinéresis, la encapsulación, la formación de películas, y la eliminación de metales pesados.

En los campos industriales y biomédicos, los principales biopolímeros utilizados son producidos por las plantas (pectina, almidón) y algas (alginato, carragenina), hidrocoloides proteína animal (gelatina, caseína), y algunos polisacáridos microbianos (dextrana, xantana, gelano, curdlano) (Moura *et al.*, 2016).

INTRODUCCIÓN

A causa de la contaminación ambiental generada por residuos plásticos, es conveniente y necesario generar nuevos materiales que sean biodegradables, económicos, ligeros y resistentes, una alternativa a este problema es la producción de biopelículas a partir de táticos.

En esta investigación se propuso producir una biopelícula a partir de táticos con un nuevo sustrato a base de cáscara de piña, con las características necesarias que permitan sustituir a los polímeros sintéticos, por esto, se diseña una metodología más estricta que la reportada por Hernández-Espinosa y Linares-Bravo, 2015., con comportamientos de flujo desde su formación hasta su obtención, una metodología óptima para obtener biopelículas. Un análisis fisicoquímico, pruebas mecánicas y reológicas que permitan validar las propiedades de las biopelículas.

Esta metodología permite determinar las propiedades de la biopelícula obtenida para definir su aplicación como envase o empaque biodegradable.

Es por estas razones el interés de generar empaques a base de biopelículas biodegradables de uso en diversas operaciones. Este proyecto de investigación es en beneficio de las generaciones presentes y futuras, ya que aporta un nuevo conocimiento que permita limitar o eliminar el uso de plásticos derivados del petróleo.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1. Problemática ambiental mundial debida a residuos plásticos no biodegradables

Uno de los mayores problemas que enfrenta el mundo en materia ambiental es el uso de plástico. La producción mundial de plásticos ha ido creciendo llegando a producir hasta 280 millones de toneladas de plástico en el 2012 ocupando el 39 % de su producción en empaquetamiento y almacenamiento como se observa en la Figura 1.1 (UNEP, 2016; Plastics Europe, 2015; Van *et al.*, 2015) y en la Figura 1.1.2 correspondientemente (Góngora, 2014).

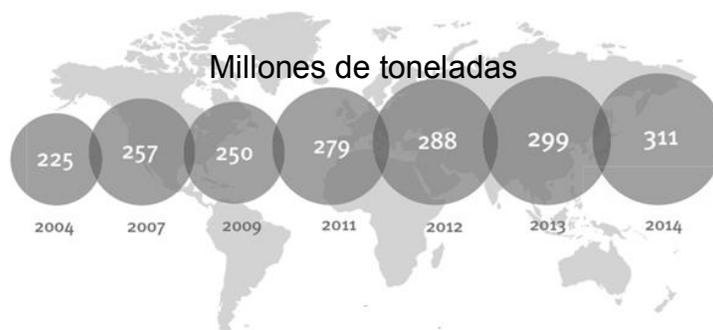


Figura 1.1 Producción mundial de plástico

Fuente: (UNEP, 2016; Plastics Europe, 2015; Van *et al.*, 2015)

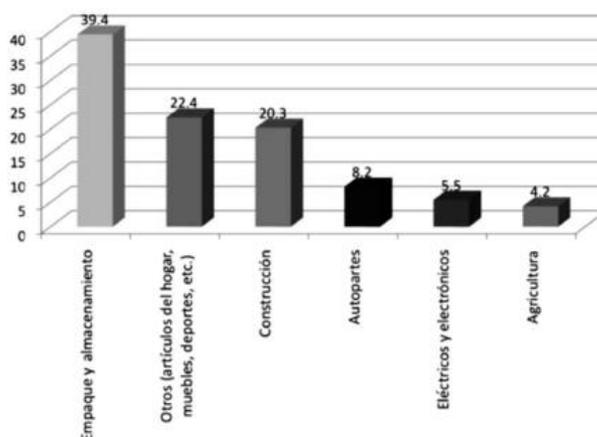


Figura 1.2 Producción mundial de plástico por tipo de uso, 2012 (porcentajes)

Fuente: (Góngora, 2014)

La mayoría de los compuestos denominados “plásticos” son productos sintéticos fabricados a partir de recursos naturales, como petróleo, gas natural, carbón y sal común. Son sustancias orgánicas de alto peso molecular sintetizadas a partir de compuestos de bajo peso molecular, que se caracterizan por tener una alta relación resistencia/densidad. Una de las principales aplicaciones del plástico es el empaquetado, los grandes volúmenes de residuos causados por esta actividad, han causado la contaminación del agua, aire y suelo, ya que no son degradados por el entorno y no sufren oxidación o descomposición con el tiempo (Frias *et al.*, 2003). Por ello, las envolturas biodegradables a base de materias primas renovables pueden ser de gran ayuda para reducir el problema, ya que, mediante la acción de enzimas y microorganismos, se degradan en compuestos de bajo peso molecular, sin ser nocivos para el ambiente, enriqueciendo los suelos (Tainara, 2016).

1.2. Residuos agroindustriales

La agroindustria es una actividad que integra la producción primaria agrícola, pecuaria o forestal, el proceso de beneficio o transformación, así como la comercialización del producto, sin dejar de lado los aspectos de administración, mercadotecnia y financiamiento (Saval, 2012). Los subproductos agroindustriales constituyen un problema serio de residuos en gran parte del mundo debido a dos factores principales: un aumento en la producción y al surgimiento de leyes ambientales más estrictas. Por ello, surge la necesidad de conversión de los mismos en un producto útil y de valor agregado (Jurado *et al.*, 2003). Un estudio realizado de productos agroindustriales fue enfocado a la utilización de cáscara de arroz, el objetivo de este trabajo ha sido darle una utilidad y un mayor valor agregado al subproducto principal de la industrialización del arroz, su cáscara, representando una posibilidad de expansión para la industria arroceras y aportando también a la solución de un problema medioambiental esta problemática fue investigada por Jurado *et al.*, (2003). Otro estudio que involucra los residuos agroindustriales y una transformación a productos de valor agregado es el estudiado por Vega *et al.*, (2005), con el tema obtención y caracterización de disoluciones en polietilenglicol (PEG) a partir de residuos de olote de la agroindustria del maíz. síntesis de

polímeros potencialmente biodegradables se abordó un tema que está tomando gran auge en los últimos años que es el estudio de los biopolímeros, se determinaron las condiciones adecuadas para la preparación de disoluciones lignocelulósicas de olote de maíz en polietilenglicol (PEG). La obtención de este tipo de materiales a partir de sustratos residuales pone de manifiesto el potencial aprovechamiento de los recursos generados por el país para la producción de materiales de alto valor agregado.

1.2.1. Materia prima

1.2.1.1. Generalidades de la piña

La piña (*Ananás comosus*) originaria de Sudamérica, específicamente de Brasil, con una larga tradición en nuestro país y considerado en muchos países como uno de los frutos más exquisitos y exóticos. La piña fue introducida a México por la Compañía Morrison en el año de 1903, en las regiones de Oaxaca, y Tezonapa, Veracruz, y cultivada para consumo doméstico. Sin embargo, debe considerarse el año de 1921 como el de inicio de la explotación de piña, en Loma Bonita, Oaxaca, con el propósito de exportarla a Estados Unidos (Jiménez-Bustamante, 2014). En la Tabla 1.1 se ilustra la producción de piña en México y en la Figura 1.3 se presentan los principales estados productores de piña. Su producción mundial en el año 2009 fue 16.9 millones de toneladas de fruta fresca llegando a 24.79 millones de toneladas en el año 2013 (Dai and Huang, 2016; Conesa *et al.*, 2016) siendo India, Hawái, Brasil, Malasia, Taiwán y México los mayores productores (Imandi *et al.*, 2008).

Tabla 1.1. Producción de piña en México

Producción promedio (Ton)	2010 (Ton)	2015 (Ton)	2016 (Ton)	Tasa media de crecimiento anual (%)
741,000	702,000	840,000	875,000	2.4

Fuente: (SAGARPA, 2017; SIAP, 2016)

PRODUCCION %

■ Veracruz ■ Oaxaca ■ Tabasco ■ Quintana Roo ■ Jalisco

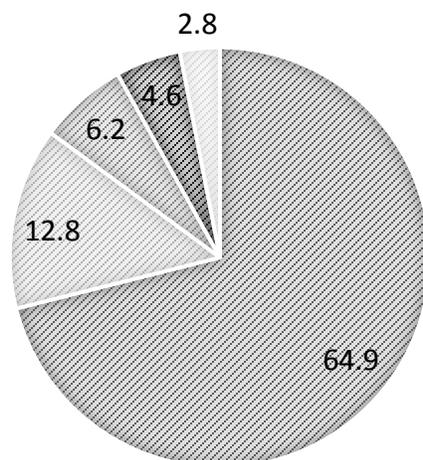


Figura 1.3. Porcentajes de la producción de piña en México

Fuente: (SAGARPA, 2017; SIAP, 2016)

La piña (*Ananás comosus*) pertenece a la familia *Bromeliaceae*, es una planta perenne de monocotiledóneas con inflorescencias terminales y una fruta múltiple terminal (Chan *et al.*, 2016). La piña es una de las frutas más comunes en muchos países tropicales y subtropicales y es consumida fresca, enlatada en almíbar, en forma de jugo (Bamidele and Fasogbon, 2017) o en rebanadas.

Actualmente se ha encontrado que los residuos de piña contienen muchas sustancias reutilizables de alto valor y alto potencial de explotación (Roda *et al.*, 2015), ya que es una materia prima altamente biodegradable y rica en carbohidratos y proteínas (Namsree *et al.*, 2012). Conforme avanzan los años va en aumento el estudio de este fruto y sus residuos sin embargo para los últimos años se ha visto limitado, algunas de las investigaciones son presentadas por Moya *et al.*, (1995), con el tema obtención potencial de polímeros biodegradables, estudio de la dilución de la cáscara de piña en polietilenglicol, Quesada *et al.*, (2005), estudio la utilización de las fibras de rastrojo de piña *ananás comosus* variedad champaka como materias de refuerzo para resinas de poliéster con los resultados obtenidos el material

obtenido puede ser aplicado en la elaboración de mesas o escritorios, Ramírez *et al.*, (2012) estudiaron la obtención de xilosa a partir de desechos lignocelulósicos de la producción y proceso industrial de la piña destacando que la cascara de piña en la obtención de xilosa presentando un alto potencial bajo condiciones sencillas de hidrolisis. Hasta la fecha, los residuos agroindustriales de piña solo se han estudiado en la producción de yogurt (Sah *et al.*, 2016), de vinagre (Roda *et al.*, 2015) de jarabe de glucosa (Zain y Seker, 2014), preparación de carbón activado de alta superficie (Hamedd y Foo, 2012), Hajar *et al.* (2012), determinaron las propiedades fisicoquímicas de la cáscara de piña, sin embargo, hay otra alternativa que aún no se ha explotado y es el uso de los residuos agroindustriales de la cascara de piña para la producción de biopolímeros. Con estos estudios se puede dar paso a el estudio de las biopelículas.

1.2.1.2. Tibicos

Los tibicos son un cultivo de bacterias y levaduras benignas que se encuentran en una matriz de polisacáridos creada por bacterias. Los microbios presentes en los tibicos actúan en simbiosis para mantener un cultivo estable. Los tibicos son llamados también kefir de agua en la creencia de que este cultivo es una adaptación del kefir de leche original, cosa muy discutible, ya que cualquier intento de adaptar al kefir de leche a un medio acuoso azucarado es infructuoso. Los tibicos son también llamados tibus, tibiches, kefir de agua, búlgaros de agua, granillos, granizo, hongos chinos, kephir, kewra, talai, mudu kekiya, matsoun, matsoni, waterkefir, y milkkefir. También conocidos como granos de agua de kefir, cristales japoneses de agua y abejas de lafornia. Los gránulos de los tibicos se reproducen por gemación al ser alimentados con azúcares en un medio acuoso. En su desarrollo descompone los azúcares complejos en simples, haciéndolos más asimilables y produciendo en el intercambio minúsculos granitos de polisacárido responsables de gran parte de las propiedades terapéuticas del fermento. El crecimiento de los gránulos es la señal de que las cosas van bien y estamos realizando el cultivo apropiadamente. Los tibicos están constituidos por una matriz de polisacáridos, generalmente dextranas no solubles en agua, dispuestos en dos capas. La externa es compacta y en ella se

encuentran bacterias y levaduras, mientras que la interna presenta una estructura esponjosa debido a la acumulación de CO₂ producido durante la fermentación (Hernández-Espinosa y Linares-Bravo, 2015). Muchos han estudiado los tibicos en funciones no convencionales dentro de los cuales se encuentran, la selección de bacterias de ácido láctico de granos brasileños para potencial uso como cultivos iniciadores o probióticos (Ferreira *et al.*, 2014), actividad metabólica e interacciones simbióticas de bacterias y levaduras de ácido láctico aislado del *Kefir* de agua (Stadie *et al.*, 2013), una cerveza novedosa fermentada por *kefir* aislados aumenta actividades antiinflamatorias y anti-ulcerogénicas encontrados en sus constituyentes (Rodríguez *et al.*, 2016), características microbiológicas y químicas de los *Kefir* durante los procesos de fermentación y almacenamiento (Leite *et al.*, 2012), obtención de bebidas fermentadas funcionales mediante el uso del *kefir* (Balabanova *et al.*, 2011, Monar *et al.*, 2014).

El origen de los tibicos, *kefir* de agua o *kefir* azucarado aún no es muy claro. Hay algunas descripciones de granos similares llamados "plantas de gengibre", que los soldados ingleses trajeron de la guerra Crimea en 1855 o "granos de Tibi", que se sabe que provienen de un cactus mexicano donde fueron sacados de las hojas (Gulitz *et al.*, 2011). Los tibicos, *kefir* de agua o *kefir* azucarados es un consorcio de diferentes microorganismos, dependiendo del origen y el medio ambiente en el que fue fermentado (Miao *et al.*, 2014) y se utilizan para preparar una bebida fermentada casera (Nikolaou *et al.*, 2016). El consorcio de microorganismo está embebido en unos gránulos transparentes en forma de coliflor. Estos gránulos son una matriz polisacárida compuesta por *kefiran* (Corona *et al.*, 2016). El polímero *kefiran* es producido principalmente por la bacteria *Lactobacillus kefiranofaciens*, mientras que el glucano es producido por las bacterias *Lactobacillus hilgardii* y *Lactobacillus satsumensis*, siendo el polímero primario en *kefir* de agua. La síntesis de este polímero (glucano) es llevado a cabo a partir de sacarosa a través de la actividad extracelular de glicosiltransferasa o glucanosacarasa (Paiva *et al.*, 2016). Dentro de la matriz polisacárida el consorcio de microorganismos actúa de forma simbiótica (Gulitz *et al.*, 2013) para mantener el cultivo estable, semejante a una masa

CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

gelatinosa compacta de color amarillento, translúcida de forma irregular y de tamaño variable. Sheng et al. (2012), investigaron los microorganismos presentes en la biosíntesis del grano de *Kefir*, el objetivo de este estudio fue comprender la importancia de cada microorganismo en la formación de granos mediante la evaluación de su agregación microbiana y propiedades de la superficie celular durante la co-agregación de bacterias ácido lácticas (LAB) y levaduras junto con una investigación de la formación de biopelículas.

Tabla 1.2 Microorganismos presentes en los tibicos

Bacterias	Levaduras
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>Casei</i>	<i>Saccharomyces florentinus</i>
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>Rhamnosus</i>	<i>Saccharomyces pretoriensis</i>
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>Pseudopantarum</i>	<i>Candida valida</i>
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>Tolerans</i>	<i>Candida lambica</i>
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>Torquens</i>	<i>Kloecker apiculata</i>
<i>Lactobacillus fructosus</i>	<i>Hansenula yalbensis</i>
<i>Lactobacillus alactosus</i>	
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	
<i>Lactobacillus homohiochi</i>	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	
<i>Lactobacillus pseudopantarum</i>	
<i>Lactobacillus yamanashiensis</i>	
<i>Streptococcus / lactococci</i>	
<i>Streptococcus cremoris</i>	
<i>Streptococcus lactis</i>	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	

Fuente: (Espinoza et al., 2012).

1.3. Biopolímeros (Polímeros biodegradables)

La biodegradación se puede definir como la degradación bioquímica de los materiales provocada por la acción de microorganismos como las bacterias, hongos y algas. La definición más común de un polímero biodegradable es: "un polímero degradable donde el mecanismo de degradación primaria es a través de la acción metabólica de los microorganismos convirtiéndose en biomasa, dióxido de carbono y/o metano" (Malathy et al., 2014). Los biopolímeros son polímeros obtenidos a partir de los orígenes biológicos y se utilizan para diversas aplicaciones industriales. Un biopolímero debe ser no tóxico, no antigénico, no irritante, no cancerígeno, esterilizable y adecuadamente disponible para sus aplicaciones generalizadas (Shakeel et al., 2016). Además, muchos bioplásticos son una mezcla de componentes sintéticos y se utilizan actualmente en algunas aplicaciones de envasado tales como bolsas de basura, espumas de embalaje, envoltorios y papeles laminados, sino que también puede colocar en pañales o sábanas, hisopos de algodón, juguetes y artículos de mesa de la comida rápida (Malathy et al., 2014).

Actualmente los polímeros sintéticos derivados del petróleo tienen una gran cantidad de aplicaciones especialmente en la industria del embalaje donde se consumen muchas toneladas al año.

Un porcentaje significativo de petróleo se utiliza para fabricar productos plásticos; por ejemplo, en el año 2005 se utilizaron 18 millones de barriles de petróleo crudo para fabricar 2 millones de botellas de polietileno tereftalato (Sukan et al., 2015) y según Siracusa et al. (2008), el incremento anual en el consumo de plásticos es de aproximadamente el 5%. Los biopolímeros han sido considerados como materiales alternativos al plástico fabricado de petróleo porque son biodegradables, renovables y abundantes (Hajar, 2014).

Dependiendo de su origen, los biopolímeros se clasifican en cuatro grupos: biopolímeros naturales extraídos de biomasa (por ejemplo, recursos agroindustriales), biopolímeros sintéticos de producción microbiana o fermentación (por ejemplo, Polihidroxicanoatos PHA), biopolímeros sintéticos

convencionalmente y químicamente sintetizado a partir de biomasa (por ejemplo, ácido poliláctico) y biopolímeros sintéticos convencional y químicamente sintetizados a partir de producto de petróleo (por ejemplo, policaprolactona (PCL), acetato de polivinilo (PVA)). Los tres primeros grupos se derivan de recursos renovables mientras que el último grupo se deriva del petróleo. La Figura 1.4 representa las categorías de los biopolímeros utilizados para las aplicaciones de envasado de alimentos.

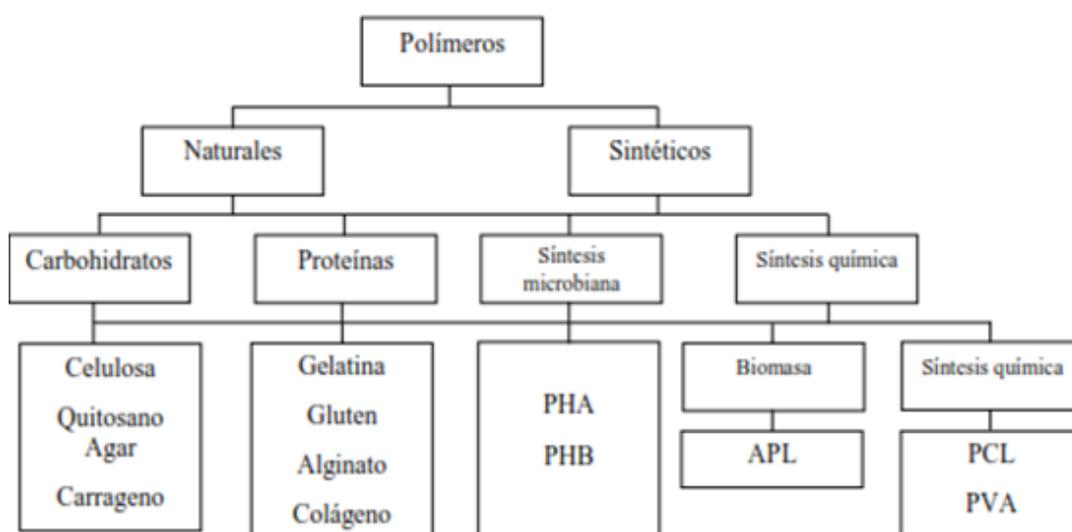


Figura 1.4 Clasificación y categoría de los polímeros

Fuente: (Hajar, 2014)

1.3.1. Biopolímeros para embalaje (Películas de empaque)

Un 45% de la producción total de plástico se destinan para la actividad de empaques y embalajes (Hajar, 2014). Las películas más comúnmente usadas para empaque se muestran en la Figura 1.4 anteriormente ilustrada. Reemplazar totalmente a los plásticos sintéticos por materiales biodegradables aun no es posible desde el punto de vista tecnológico; pero si hay la posibilidad de ser utilizados en aplicaciones

CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

específicas. Para ello, los requisitos esenciales para una buena película de empaque son (Frías *et al.*, 2003):

- Permitir una respiración lenta pero controlada del producto a empacar. (disminución de la absorción de O₂)
- Permitir una barrera selectiva a los gases (CO₂, etileno y vapor de agua).
- Creación de una atmósfera modificada con respecto a la composición del gas interno, regulando así el proceso de maduración, que conduce a la extensión de la vida útil.
- Disminuir la migración de los lípidos.
- Mantener la integridad estructural, evitar la pérdida de clorofila en productos hortofrutícolas frescos y mejorar la manipulación mecánica.
- Servir como un vehículo para la incorporación de los aditivos alimentarios (sabor, color, antioxidantes, agentes antimicrobianos).
- Evitar (o reducir) el deterioro microbiano en el almacenamiento prolongado.

Todos los requisitos esenciales para una buena película de empaque se pueden cumplir con la mezcla de varios polímeros, cuya composición y formulación puede variar entre los diversos productos a empacar. Los biopolímeros pueden mezclarse y/o transformarse para formar materiales de embalaje. Su funcionalidad puede ser mejorada combinándose con otros ingredientes tales como plastificantes y aditivos. Los posibles usos de estos materiales de embalaje biopoliméricos son los siguientes (Tharanathan, 2003):

- Materiales desechables de embalaje.
- Productos de consumo para uso de rutina diaria, tales como platos, vasos, contenedores, cajas de huevo, etc.
- Servilletas desechables para el cuidado personal o toallas sanitarias, pañales, etc.

La característica más importante e innovadora de los biopolímeros es su capacidad de servir de empaque para la conservación de alimentos, siendo al mismo tiempo amigables con el medio ambiente (Cruz-Morfin *et al.*, 2013).

1.3.1.1. Biopelículas producidas por microorganismos

Las biopelículas son organizaciones microbianas compuestas por microorganismos que se adhieren a las superficies gracias a la secreción de un exopolímero. Estas conformaciones microbianas presentan características como heterogeneidad, diversidad de microambientes. En el área industrial y del medio ambiente el papel de las biopelículas se centra en el biofouling y la bioremediación. El biofouling es la contaminación de un sistema producido por la actividad microbiana de la biopelícula, mientras que la bioremediación utiliza las biopelículas para mejorar las condiciones de un sistema contaminado. El estudio de las biopelículas es un área excitante en continua evolución; tienen repercusiones importantes para la humanidad las implicaciones que presentan estas asociaciones en los diversos ámbitos de la medicina y la industria (Aguilar-Méndez, 2005).

1.3.1.2. Biopelículas de proteínas

Los materiales a base de proteínas consisten de redes macromoleculares continuas, relativamente ordenadas y de baja humedad. Las interacciones entre proteínas necesitan ser numerosas y uniformes. La probabilidad de formación de enlaces intermoleculares depende de la forma de la proteína y de las condiciones de proceso. Las proteínas de alto peso molecular (glutenina) y proteínas fibrosas (colágeno), generalmente forman películas con buenas propiedades mecánicas. Mientras que las proteínas globulares y pseudoglobulares (gliadina, caseína y glicinina), usualmente necesitan desdoblarse antes de la formación de la red. Las películas de proteínas se adhieren fácilmente a superficies hidrofílicas y presentan la desventaja de alta permeabilidad al vapor de agua. Las proteínas más empleadas en la elaboración de películas son: caseína, zeína, soya, albúmina de huevo, lactoalbúmina, suero de leche, gluten de trigo, colágeno y gelatina. Una desventaja de las películas de proteína, es su sensibilidad a los cambios de pH, por lo que

deben delimitarse a las condiciones óptimas de su formación (Aguilar-Méndez, 2005).

1.3.1.3. Biopelículas a base de gelatina

El colágeno es una fibra biopolimérica que proviene del tejido conectivo de mamíferos y peces, cada fibra de colágeno está compuesta de tres cadenas a éstas se enrollan y se fijan mediante puentes de hidrógeno transversales para formar una triple hélice dextrógira. Estas a su vez forman una estructura cuaternaria cuando algunos residuos de aminoácidos como por ejemplo la 4-hidroxiprolina, forman entrecruzamientos entre las hélices. La secuencia predominante de aminoácidos en el colágeno es glicina-X-Y, donde X y Y pueden ser cualquier aminoácido, pero por lo regular son residuos de prolina e hidroxiprolina. hidrocoloides de proteína animal (gelatina, caseína) (Moura *et al.*, 2016).

La gelatina, se obtiene mediante la degradación térmica del colágeno. La gelatina representa un material óptimo para la formación de biopelícula debido a sus propiedades funcionales y biodegradables. Los Residuos produce de cápsulas de aceite de nutracéuticos (chía, linaza, coco, y girasol) se compone principalmente de gelatina, que se genera en grandes cantidades a un costo de tratamiento de residuos de alta a la industria. Este material puede ser 100% hecho uso para obtener un activo biodegradable, biopelícula, ya que contiene agua y glicerol que son los componentes importantes para la mejora de las propiedades de las películas (Tainara, 2016).

1.3.1.4. Plastificantes

La producción de películas comestibles y/o biodegradables requieren el uso de plastificantes con el fin de incrementar su maleabilidad, flexibilidad, dureza, resistencia al impacto y disminuir su fragilidad, evitando la aparición de grietas (Cao *et al.*, 2009). La función de los plastificantes es disminuir la intensidad de la fuerza de enlace entre moléculas del polímero; estos enlaces, así como las atracciones entre moléculas (fuerzas de van der Waals), confieren rigidez al polímero. En

términos estructurales, los plastificantes se insertan entre las cadenas que conforman la matriz polimérica, aumentando el espacio libre entre éstas, lo que provoca una disminución de las fuerzas intermoleculares a lo largo de la matriz. Entre los plastificantes más usados para las biopelículas se encuentran el glicerol, el sorbitol, propilenglicol y polietilenglicol (Rivero *et al.*, 2009). La composición, el tamaño, la estructura molecular y la compatibilidad del plastificante con el polímero podría afectar las interacciones entre ambos, incluyendo su capacidad para atraer agua a las películas de proteínas plastificadas (Lukasik *et al.*, 2006). Por lo tanto, algunas características idóneas en plastificantes son las siguientes: tamaño molecular pequeño, elevada polaridad dada por la presencia varios grupos polares por molécula y una mayor distancia entre los grupos polares dentro de la molécula, para dar mayores efectos de plastificación en un sistema polimérico (Cao *et al.*, 2009). Por su parte el glicerol actúa como plastificante introduciéndose entre las cadenas de proteínas formando puentes de hidrogeno y atrayendo agua entre las cadenas de gelatina, haciéndola cada vez más flexible (Andreuccetti *et al.*, 2009). Es una molécula pequeña con características altamente higroscópicas, su estructura tiene tres átomos de oxígeno que aportan sus átomos de hidrógeno para la formación de puentes de hidrógeno con las moléculas de los polímeros. Varias moléculas de glicerol pueden interactuar entre ellas por medio de puentes de hidrogeno, formando un compuesto líquido llamado glicerina. Aparte de su capacidad de fijar moléculas de agua, cada grupo hidroxilo del glicerol se puede combinar químicamente con el grupo carboxílico de las cadenas a de la gelatina (Atkins, 2007). Estas propiedades hacen que sea capaz de plastificar eficientemente las proteínas de las biopelículas.

1.3.2. Crecimiento microbiano

Cuando se siembran microorganismos en un medio de cultivo apropiado, los mismos comienzan a dividirse activamente empleando los nutrientes que le aporta el medio de cultivo para fabricar nuevos microorganismos. Este proceso continúa hasta que algún nutriente del medio de cultivo se agota (sustrato limitante) y el

crecimiento se detiene; También puede detenerse por acumulación de algunas sustancias inhibidora formada por los mismos microorganismos.

Debido a la naturaleza autocatalítica del crecimiento microbiano, es lógico suponer que la concentración de microorganismo influye en la velocidad con que aumenta la población así:

$$r_x = kX \quad (1)$$

Donde r_x , es la velocidad específica de crecimiento (kg de células/m³ s), k es la constante cinética de crecimiento (s⁻¹), y X es la concentración de células (kg de células /m³), la cual para un tipo de microorganismo dado depende principalmente de la composición y concentración del medio de cultivo, presenta inhibidores, temperatura y pH. Graficando datos experimentales de crecimiento en términos de logaritmo de la concentración de células con respecto al tiempo ofrece una curva como se muestra en la Figura 1.5 (McNeil and Harvey, 2008).

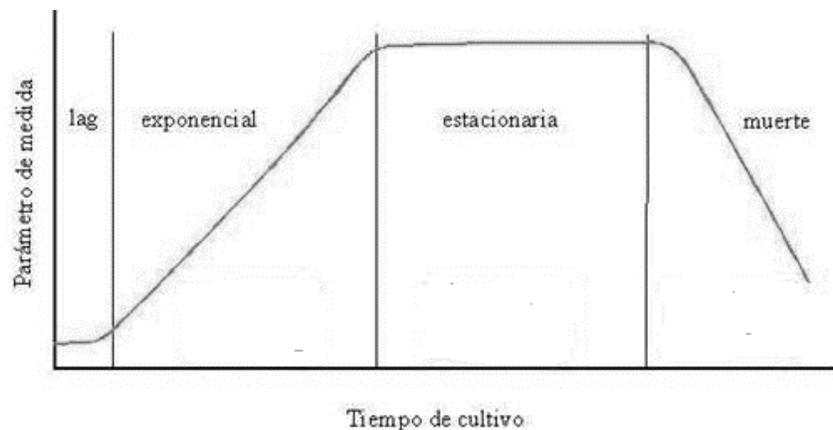


Figura 1.5 Cinética de crecimiento microbiano

Fuente: (McNeil and Harvey, 2008; Monod, 1949)

1.3.2.1. Modelo cinético de Monod

Existen varios modelos que describen cada una de las fases del crecimiento microbiano, en términos de maximizar la biomasa, la ecuación que describe la fase

CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

exponencial de la cinética de crecimiento celular es la ecuación de Monod (Monod,1949), (Ec. 2).

$$\mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x}S}{K_s+S} \quad (2)$$

La ecuación de Monod como la de Michaelis-Menten es una ecuación de dos parámetros que involucre dos constantes, la velocidad máxima de crecimiento específico ($\mu_{m\acute{a}x}$) y la constante de saturación (K_s) (Monod,1949; McNeil and Harvey, 2008).

Estas constantes pueden ser obtenidas con un método de regresión, en la Figura 1.6, se muestra el gráfico del método diferencial (Ec. 3) para la determinación de constantes de Monod.

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}} + \frac{K_s}{\mu_{m\acute{a}x}} \cdot \frac{1}{S} \quad (3)$$

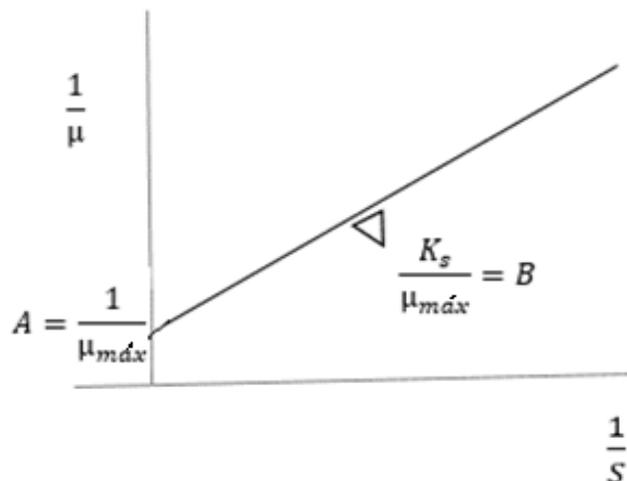


Figura 1.6 Grafico de método diferencial de Monod
Fuente: (Lehninger, 2009; Mathews *et al.*, 2012)

1.3.3. Parámetros fisicoquímicos

De acuerdo a estudios realizados en diferentes investigaciones es necesario caracterizar fisicoquímicamente todo producto de valor agregado para conocer su

composición y así mismo determinar una posible aplicación, en la Tabla 1.3. se muestran las determinaciones necesarias para cumplir la validación de esta caracterización.

1.3.4. Propiedades mecánicas de las biopelículas

Las pruebas mecánicas sirven para caracterizar materiales sólidos, elásticos y plásticos como son los polímeros sintéticos y biopolímeros (Gere *et al.*, 2009):

1.3.4.1. Texturometría

Las pruebas de resistencia a la tensión y distancia de elongación, son utilizadas para determinar las propiedades mecánicas de los materiales y en particular de las biopelículas. En la Figura 1.7 se muestran los parámetros comunes que se caracterizan en una curva típica de resistencia a la tensión contra la deformación son (Gere *et al.*, 2009):

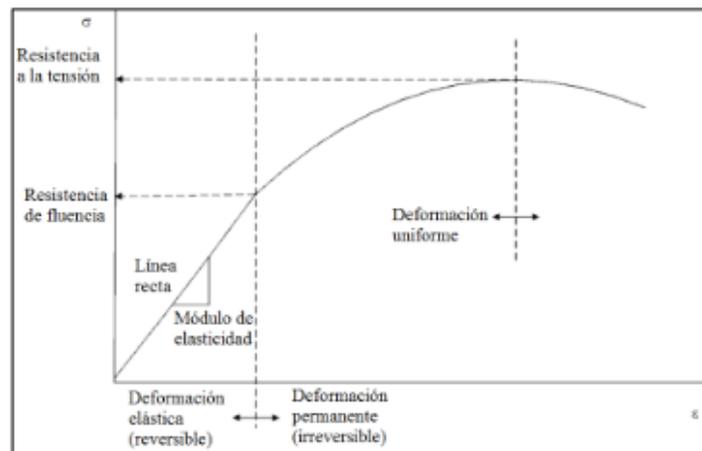


Figura 1.7 Curva típica de resistencia a la tensión (σ) contra la distancia a la elongación (ϵ). Fuente; (Gere *et al.*, 2009)

- La resistencia a la tensión (σ): Se define como la fuerza aplicada dividida entre el área transversal inicial del material (el área que tiene el material antes de aplicar la fuerza). El área transversal es el área perpendicular a la línea de acción de la fuerza.
- La distancia de elongación o deformación (ϵ): Se define como el cambio en la longitud a lo largo de la línea de aplicación de la fuerza.

CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

- c) El módulo de elasticidad (E o módulo de Young): Es la pendiente de la línea recta que se forma en la zona elástica. Es una medida de la rigidez del material, entre mayor sea el valor del módulo más rígido es el material.

Otra definición es descrita por Steffe, (1996) y se presenta en la Figura 1.8

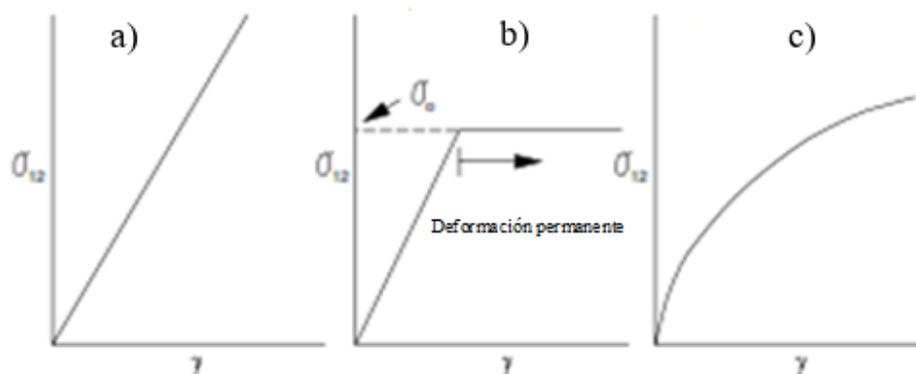


Figura 1.8. Curvas de deformación para materiales a) Elásticos (Hookeanos), b) elastoplásticos y c) no elástico lineal o viscosos (viscoelásticos)
Fuente Steffe, (1996)

Tabla 1.3 Determinaciones necesarias para caracterizar fisicoquímicamente biopelículas

Determinación	Método	Referencia
Cenizas	Cenizas totales	NMX-F-066-S-19978
Humedad	Secado de estufa	NMX-F-083-1986
pH	Potenciómetro	NMX-F-317-S-1978
Acidez	Estándar de titulación	NMX-102-F-1978
Grasas	Extracción directa	NMX-F-089-S-1978
Proteínas	Nitrógeno total Kjeldahl	NMX-F-068-S-1980
Fibra cruda	Estándar	NMX-F-090-S-1978

1.4. Reología

La reología es la ciencia que estudia y analiza los fenómenos de flujo, deformación y las propiedades mecánicas de los gases, líquidos, plásticos y comprende el estudio de las sustancias que fluyen pero que su comportamiento no está regido por la ley de Newton. Su campo de estudio se extiende desde la mecánica de los fluidos newtonianos hasta la elasticidad de Hooke. La región comprendida entre ellas corresponde a todos los materiales pastosos y suspensiones (Bird *et al.*, 2006).

Otra definición de reología es la ciencia que estudia la deformación de un cuerpo sometido a esfuerzos externos. Las propiedades reológicas definen la relación entre el esfuerzo y la tasa de deformación en diferentes tipos de fluidos. El esfuerzo se define como la fuerza que actúa sobre una unidad de área, mientras que la deformación se define como la medida de desplazamiento relativo, siendo ambos parámetros tensores de segundo orden.

Las mediciones reológicas son conducidas imponiendo un esfuerzo definido y midiendo la tasa de deformación resultante, o viceversa. La relación entre ambos eventos físicos, define diferentes tipos de propiedades reológicas (Heldman *et al.*, 2007). Existe una serie de ecuaciones, con las cuales es posible modelar el comportamiento de los materiales, las cuales se denominan modelos reológicos.

1.4.1. Clasificación de materiales

Los materiales se clasifican de acuerdo a su comportamiento y propiedades reológicas. El sólido ideal (de comportamiento elástico) y el fluido ideal (de comportamiento viscoso), representan dos respuestas extremas de un material.

1.4.1.1. Comportamiento fenomenológico en fluidos

Un fluido ideal se deforma a una tasa constante bajo un esfuerzo aplicado y el material no regresa a su configuración original cuando éste es removido. El flujo de un material viscoso simple es descrito por la ley de Newton, donde el esfuerzo de corte (τ) es directamente proporcional a la velocidad de corte ($\dot{\gamma}$). Dicha

CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

proporcionalidad se indica por medio de una constante, llamada viscosidad Newtoniana (η), como se indica en la (Ec.4).

$$\tau = \eta \dot{\gamma} \quad (4)$$

Los fluidos se clasifican en Newtonianos y no Newtonianos. Los fluidos Newtonianos son aquellos que obedecen a la ley de Newton, mientras que los fluidos no Newtonianos se caracterizan por tener una relación no lineal entre el esfuerzo de corte y la velocidad de corte. Este tipo de fluidos pueden ser independientes o dependientes del tiempo. En la Figura 1.9, se muestran los principales fluidos independientes del tiempo.

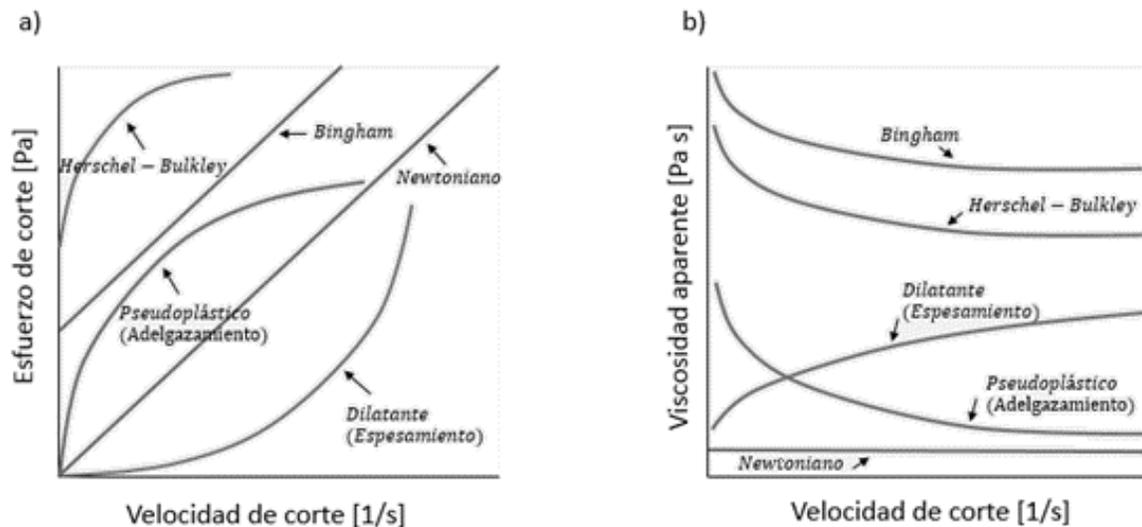


Figura 1.9 Comportamiento de fluidos independientes del tiempo, con respecto al esfuerzo de corte (a) y viscosidad aparente (b)

Fuente: (Steffe, 1996)

En la Figura 1.9, se indica el comportamiento de los fluidos de Bingham y Herschel-Bulkley. Los cuales se caracterizan por tener un esfuerzo inicial (τ_0), el cual representa un esfuerzo finito requerido para comenzar a fluir. Dicho parámetro juega

un papel muy importante en el diseño de procesos y aseguramiento de la calidad de materiales. La diferencia entre ellos recae en que la relación entre la velocidad de corte y el esfuerzo de corte es lineal para el fluido de Bingham (Bird *et al.*, 2006).

Los materiales que no requieren de tal esfuerzo inicial, se denominan como pseudoplástico y dilatante, con la diferencia de que el pseudoplástico tiene un decremento en su viscosidad conforme aumenta la velocidad de corte, y viceversa en el dilatante.

- Fluido pseudoplástico: Se define como la disminución de la viscosidad con el aumento de la velocidad de corte y el índice de comportamiento reológico (n), es menor que la unidad. Este comportamiento se encuentra con suspensiones concentradas en fluidos newtonianos cuando los sólidos tienen interacciones partícula-partícula. A medida que el caudal aumenta, los enlaces entre partículas se rompen, la movilidad de las partículas se incrementa, y la viscosidad de la suspensión disminuye (Carreau *et al.*, 2002).
- Fluido dilatante: Este tipo de fluido se caracteriza por un aumento de la viscosidad al aumentar el gradiente velocidad, es decir, la viscosidad aparente del fluido aumenta a medida que aumenta la velocidad de corte. El índice de comportamiento reológico (n) es mayor que la unidad. Las suspensiones concentradas exhiben este comportamiento de engrosamiento o espesamiento a altas velocidades de corte, pero la aparición y la importancia de los efectos de dilatación dependen en gran manera de la fracción de volumétrica, distribución de tamaño de partícula, y la viscosidad del fluido de suspensión. La forma de las partículas también es muy importante, y la anisotropía (variación de las propiedades generales de la materia según la dirección en que son examinadas) de las partículas tiende a producir efectos de espesamiento a una velocidad de corte baja y por una fracción de sólidos más pequeña. El aumento de la viscosidad se ha atribuido a una transición de un estratificado de dos dimensiones, arreglo de partículas a una forma tridimensional (al azar). La disposición en capas de las partículas permite que

la suspensión fluya fácilmente, ya que cada capa se mueve sin obstrucción por otras partículas (Carreau *et al.*, 2002).

Por otro lado, dentro de los fluidos dependientes del tiempo se encuentran los reopécticos y tixotrópicos, cuyo comportamiento se ilustra en la Figura 1.10.

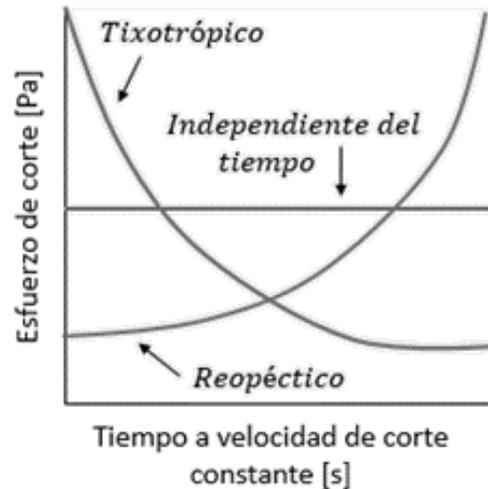


Figura 1.10. Comportamiento de fluidos dependientes del tiempo
Fuente: (Steffe, 1996)

En la Figura 1.10, se observa el comportamiento de los fluidos tixotrópicos y reopécticos; los tixotrópicos muestran un decremento en el esfuerzo de corte y en la viscosidad aparente a través del tiempo, mientras que los reopécticos muestran incremento. Se puede decir que, la tixotropía se refiere al adelgazamiento y la reopexia al espesamiento, ambas dependientes del tiempo (Steffe, 1996).

De manera independiente, se encuentran los fluidos viscoelásticos, los cuales tienen características tanto de fluido como de sólido (Steffe, 1996; Bird *et al.*, 2006).

En la Figura 1.11 se indica de manera esquematizada la clasificación de los materiales anteriormente mencionados, en donde D.T. significa dependientes del tiempo e I.T. independientes del tiempo, así mismo, se indica la clasificación de los materiales denominados como sólidos.

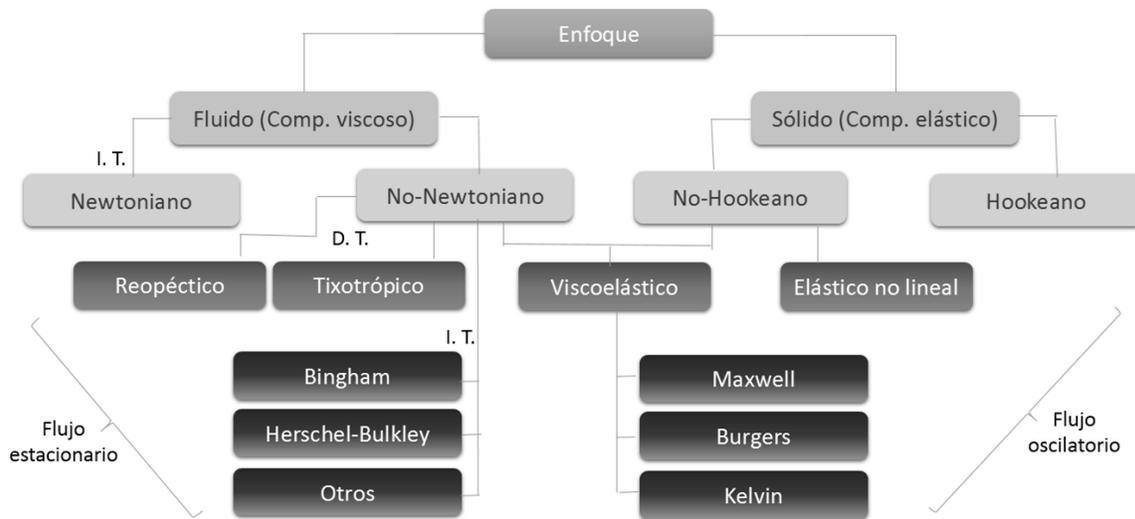


Figura 1.11 Clasificación de acuerdo a comportamiento reológico

Fuente: (Steffe, 1996; López-Ávila, 2014)

1.4.1.2. Comportamiento fenomenológico en sólidos

Un sólido ideal se deforma de manera instantánea cuando una fuerza es aplicada y regresa a su configuración original de la misma forma cuando ésta es removida. Los materiales elásticos ideales (Hookeanos) obedecen la ley de Hooke, donde el esfuerzo (τ) es directamente proporcional a la deformación (γ). Dicha proporcionalidad se indica por medio de una constante, llamada módulo (G), como se indica en la (Ec.5).

$$\tau = G \gamma \quad (5)$$

Los sólidos en los cuales no se mantiene dicha proporcionalidad, son denominados no Hookeanos.

1.4.1.3. Materiales viscoelásticos

Como se mencionó anteriormente, un material viscoelástico, es aquel que tiene comportamiento tanto elástico, como viscoso. A continuación, se nombran algunos parámetros que son de gran aplicabilidad para la interpretación del comportamiento de este tipo de materiales.

CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

El módulo de pérdida (G'') representa la energía disipada durante la deformación, es decir, representa el carácter viscoso del material (Ec. 6).

$$G''(\omega) = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \sin \delta \quad (6)$$

El módulo de almacenamiento (G'), representa la energía almacenada durante la deformación, es decir, representa el carácter elástico del material (Ec.7).

$$G'(\omega) = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cos \delta \quad (7)$$

Aplicando la notación compleja, el módulo complejo (G^*) se define como se muestra en la ecuación (8).

$$G^* = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \quad (8)$$

Al cociente de ambos módulos, se le conoce como tangente de pérdida, propiedad viscoelástica comúnmente empleada (Ec.9).

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} = \frac{1}{\omega \lambda_{rel}} \quad (9)$$

La tendencia en que un material exhiba un comportamiento más fluido o más elástico con respecto al incremento de la frecuencia, puede ser examinada considerando la dependencia de la frecuencia con respecto al ángulo de fase (δ). El máximo ángulo de fase que se puede presentar ($\pi/2$) es para los fluidos Newtonianos, mientras que el mínimo (0) es para sólidos Hookeanos, como se indica en la Figura 1.12.

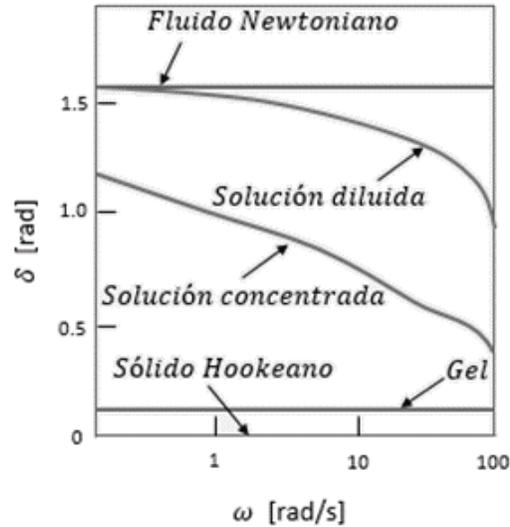


Figura 1.12 Variación del ángulo de fase con respecto a la frecuencia
Fuente: (Steffe, 1996)

Las funciones de viscosidad más apropiadas para materiales de este tipo, son las mostradas en las ecuaciones (10) y (11).

$$\eta' = \frac{G''}{\omega} \quad (10)$$

$$\eta'' = \frac{G'}{\omega} \quad (11)$$

Aplicando la notación compleja, la viscosidad compleja (η^*) se define como se muestra a continuación:

$$\eta^* = \sqrt{(\eta')^2 + (\eta'')^2} \quad (12)$$

1.4.2. Modelos reológicos

Existe una serie de ecuaciones, con las cuales es posible modelar el comportamiento de los materiales sometidos a pruebas reológicas, las cuales se

CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

denominan modelos reológicos. En la Tabla 1.4 se muestran únicamente los modelos reológicos para fluidos no Newtonianos, empleados en el presente trabajo de investigación (Steffe, 1996; Bird *et al.*, 2002).

Tabla 1.4. Modelos reológicos para describir el comportamiento de fluidos no Newtonianos

Modelo	Ecuación	Descripción
Modelo Ostwald-de Waele	$\tau = K \dot{\gamma}^n$	También conocida como ley de potencia. Para $n=1$ se transforma en la ley de viscosidad de Newton. Cuando $n < 1$ el comportamiento es pseudoplástico, mientras que $n > 1$ el comportamiento es dilatante.
Modelo de Herschel-Bulkley	$\tau \text{ (Pa)} = \tau_0 + K \dot{\gamma}^n$	Este modelo es una relación general para describir el comportamiento de fluidos no-Newtonianos. Este modelo incluye el término esfuerzo de cedencia, para describir el comportamiento tipo plástico, pseudoplástico o dilatante
Modelo de Bingham	$\tau \text{ (Pa)} = \tau_0 + K \dot{\gamma}$	Conocidos también como cuerpo de Bingham. Estos cuerpos no se derraman bajo el efecto de su peso; necesitan que la presión sobrepase un umbral para que comiencen el flujo. Una vez que se ha sobrepasado este valor crítico, el fluido se comportara como newtoniano.

Fuente: Steffe, (1996)

Donde τ se refiere al esfuerzo de corte (Pa), τ_0 al esfuerzo de corte inicial, K al índice de consistencia (Pa sⁿ), $\dot{\gamma}$ a la velocidad de corte (s⁻¹) y n al índice de comportamiento reológico (adimensional).

La interpretación del valor de este último parámetro es de suma importancia para la determinación del comportamiento, donde $n = 1$ indica un comportamiento Newtoniano, donde $n < 1$ indica un comportamiento pseudoplástico y $n > 1$ un

comportamiento dilatante. De igual manera, cabe recalcar la presencia del parámetro τ_0 en el modelo de Herschel-Bulkley, marcando la diferencia con respecto al modelo de Ostwald-de Waele, indicando un valor de esfuerzo necesario para que dicho fluido comience a fluir (Steffe, 1996).

1.4.3. Variación de la viscosidad con respecto a la temperatura

Normalmente, en los líquidos, la viscosidad disminuye conforme la temperatura aumenta. La ecuación de Arrhenius (13), permite evaluar la relación entre ambos parámetros, e indica que la viscosidad disminuye con el aumento de temperatura.

Esto es, puesto que las fuerzas viscosas son superadas por la energía cinética conforme aumenta la temperatura (Steffe, 1996).

$$\eta_{ap} = \eta_0 e^{\frac{Ea}{RT}} \quad (13)$$

La energía de activación, Ea , es una medida del umbral de energía que se debe vencer para que el ordenamiento de moléculas en el fluido se modifique para fluir.

Este parámetro se refiere a la cantidad de energía que debe absorber el fluido para que los empaquetamientos de moléculas muestren alineación.

1.4.4. Reometría

Un reómetro es un instrumento que mide las propiedades reológicas de un material. Las mediciones en el reómetro se pueden realizar tanto en estado estacionario como en dinámico; donde el estacionario se emplea para fluidos y el dinámico se emplea principalmente para sólidos y materiales viscoelásticos.

La gráfica que muestra la relación de propiedades reológicas, se llama reograma (Steffe, 1996) como se muestra en la Figura 1.13.

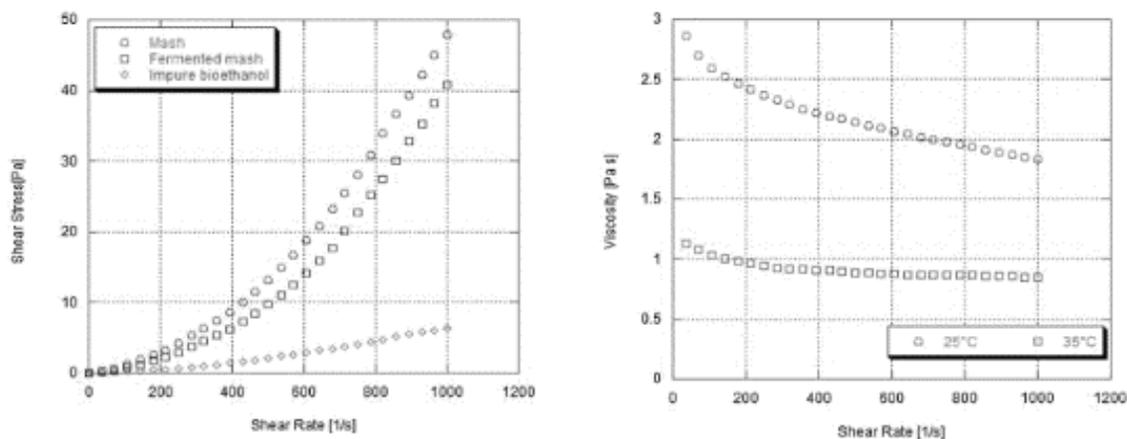


Figura 1.13. Reograma del proceso de obtención de bioetanol en estado estacionario
Fuente: (Oropeza *et al.*, 2016)

Las configuraciones de geometrías más empleadas son plato-plato, cono-plato, cilindros concéntricos y agitadores, dependiendo de las características de la muestra a analizar.

Asimismo, las mediciones se llevan a cabo de acuerdo a los parámetros constantes y variables a considerar, que pueden ser de las cuatro maneras que se indican en la Tabla 1.5 (Steffe, 1996).

Tabla 1.5 Esquemas de pruebas rotacionales

Parámetro	Barrido de velocidad	Rampa de temperatura	Rampa de tiempo
Velocidad de corte ($\dot{\gamma}$)	Variable	Constante	Constante
Temperatura (T)	Constante	Variable	Constante
Tiempo (t)	Constante	Constante	Variable

Fuente: Steffe, (1996)

Por otro lado, el estado dinámico se evalúa por medio de pruebas oscilatorias, en donde las muestras están sujetas a esfuerzos armónicos.

Es el método más común en el estudio del comportamiento de los materiales viscoelásticos. Los resultados obtenidos en este tipo de pruebas, son muy sensibles

CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

a la composición química y estructura física de las muestras. Asimismo, las mediciones se llevan a cabo de acuerdo a los parámetros constantes y variables a considerar, que pueden ser de las cuatro maneras que se indican en la Tabla 1.6 (Steffe, 1996).

Es importante recalcar que, al trabajar con pequeñas amplitudes (SAOS, por sus siglas en inglés) en el barrido de amplitud, se evalúa el comportamiento en el rango viscoelástico lineal, en donde no existe una deformación a la estructura interna del material (Heldman *et al.*, 2007).

Tabla 1.6 Esquemas de pruebas oscilatorias

Parámetro	Barrido de amplitud	Barrido de frecuencia	Rampa de temperatura	Rampa de tiempo
Deformación o amplitud (γ)	Variable	Constante	Constante	Constante
Frecuencia (ω)	Constante	Variable	Constante	Constante
Temperatura (T)	Constante	Constante	Variable	Constante
Tiempo (t)	Constante	Constante	Constante	Variable

Fuente: Steffe, (1996)

En un estudio previo (Cantú-Lozano, D. 2015) se estudio el efecto de la temperatura y la concentración en el comportamiento reológico de disoluciones de quitosano, el cual es un bio-fluido que se utiliza principalmente como plastificante, el análisis reológico mostró que el efecto de la temperatura es mayor en la concentración de las soluciones de quitosano con valores de viscosidad observado.

Es evidente que un comportamiento antagonista entre la concentración del quitosano y la tensión de corte inicial, ya que una concentración menor habrá más espacio entre las partículas dentro de la solución y para aumentar la turbulencia

CAPÍTULO 1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

dentro del bio-líquido, lo que dificulta el movimiento de los sólidos en la solución, lo que resulta en una tensión de corte inicial mayor.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Metodología general

En la Figura 2.1 se presenta la metodología general para el cumplimiento de los objetivos planteados.

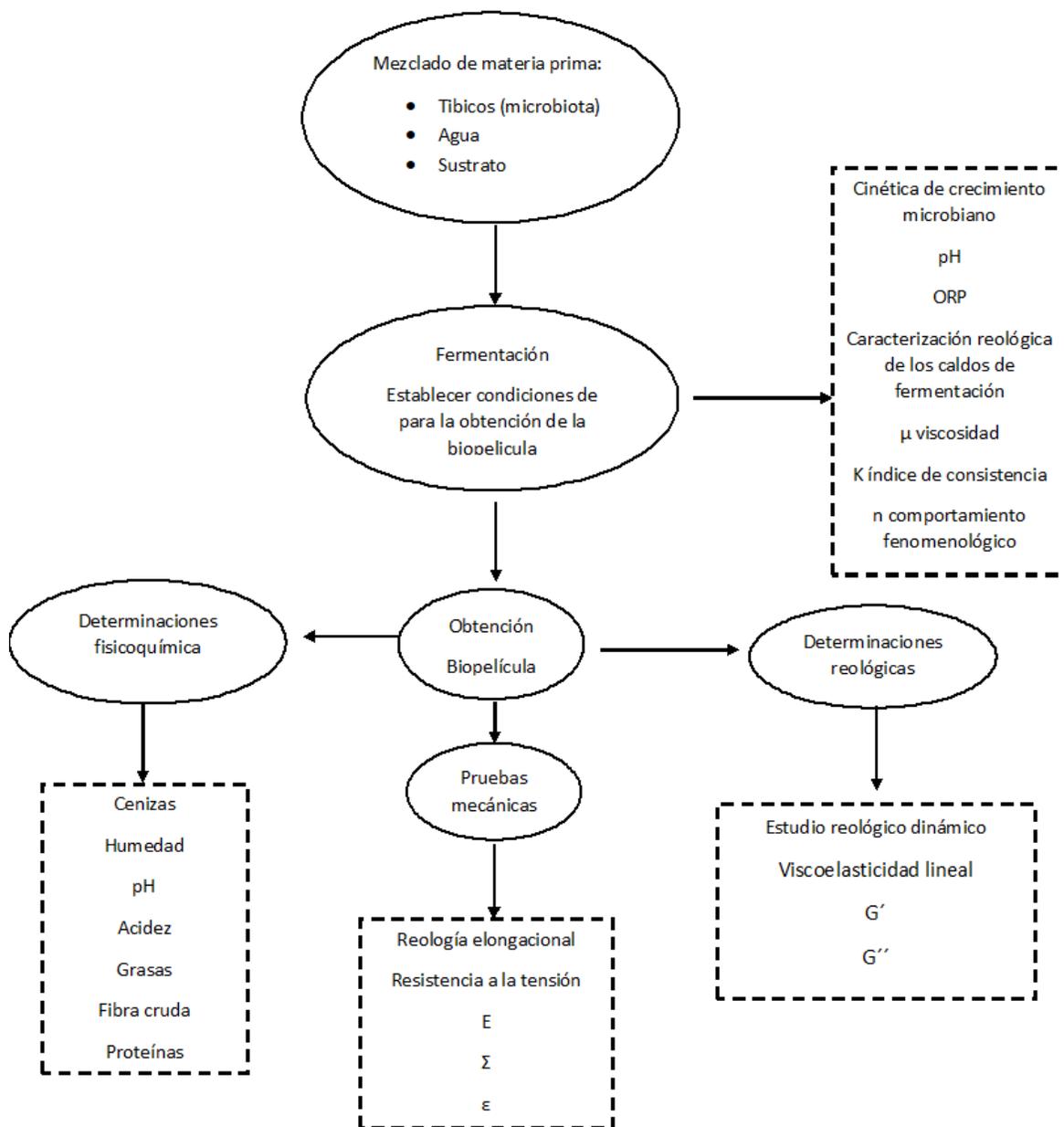


Figura 2.1 Diagrama de metodología para “Producción y estudio dinámico de biopelículas de un consorcio de tibicos aislados a partir de cáscara de piña”

El primer paso del proyecto consistió en llevar a cabo una revisión bibliográfica relacionada con la temática planteada. Principalmente, la información se obtuvo de libros, así como de investigaciones dadas a conocer a través de trabajos de tesis y artículos publicados en revistas indizadas (JCR). Resultó imprescindible que la revisión bibliográfica se hiciera de manera constante, y cada vez más específica, a lo largo del proyecto.

2.2. Recolección de cáscara de piña y propagación de los tibicos

Se emplearon muestras de residuos de cáscara de piña donadas por el mercado Emiliano Zapata de Orizaba, Veracruz, fue necesario lavar con agua destilada para eliminar otros contaminantes, además se obtuvo una cepa de tibicos a aproximadamente 10 g donadas por el laboratorio de Ingeniería ambiental de licenciatura del Instituto Tecnológico de Orizaba, posteriormente se prosiguió a propagar el consorcio de microorganismos.

Se cultivaron en un medio acuoso con sustrato de sacarosa comercial, a 25°Brix y temperatura ambiente cambiando el medio, cada 48 h.

2.3. Proceso de fermentación para la obtención de la biopelícula

El primer paso fue evaluar las condiciones para la fermentación tipo batch de 1L, se tomaron en consideración los siguientes factores:

- Concentración de sustrato (25°Brix, 17°Brix)
- Temperatura (25°C, 35°C)
- La variación de origen de sustrato empleando panela, azúcar refinada, panela con cáscara de piña y azúcar con cáscara de piña (P, A, PP, AP) correspondientemente, la concentración de biomasa se mantuvo constante en 10g.

Análisis estadístico. Los experimentos se realizaron en un diseño experimental (Tabla 2.1). Se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) al nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0.05$), utilizando el programa estadístico NCSS, se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey los

factores son el tipo de muestra, la temperatura y la concentración, la variable de respuesta (R) fue el rendimiento de biomasa.

Tabla 2.1 Diseño de experimentos factorial

Temperatura, °C	25		35	
Concentración °Brix	25	17	25	17
Muestra				
P25	R	R	R	R
A25	R	R	R	R
P17	R	R	R	R
A17	R	R	R	R
PP25	R	R	R	R
AP25	R	R	R	R
PP17	R	R	R	R
AP17	R	R	R	R

2.4. Determinación reológica a la sustancia formadora de biopelícula

La caracterización de propiedades reológicas, fue llevada a cabo con la finalidad de obtener información fundamental sobre su comportamiento en los distintos puntos del proceso de producción de biopelículas. El análisis reológico de las Sustancias Formadoras de Películas (SFP) se llevó a cabo de la siguiente forma las SFP, se dejaron enfriar a una temperatura ambiente ($25 \pm 3^\circ\text{C}$) para evaluar su comportamiento reológico mediante pruebas de corte en estado estable, utilizando un Reómetro Anton Paar modelo MCR301. Las pruebas reológicas en estado estable se realizaron a velocidades de corte desde 0.1 a 1,000 s^{-1} . Los comportamientos de flujo se analizaron mediante el empleo del modelo que mejor se ajustó a su comportamiento fenomenológico Tabla 1.4, se realizaron experimentos de corte a diferentes temperaturas (25 y 35°C). Primeramente, fue

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

necesario definir la geometría más apta para cada muestra, tal como se indica en la Tabla 2.2. Con dichos análisis, fue posible describir el comportamiento observado a través de los diferentes modelos reológicos.

Tabla 2.2 Sistemas de geometrías y Peltier empleados para caracterización reológica de cada muestra

Muestra	Geometría	Peltier	Temperatura
	Agitador	Cuba	
P25	(ST22-4V-40-SN10120)	(C-PTD200-SN80123149)	25 y 35 °C
	Agitador	Cuba	
A25	(ST22-4V-40-SN10120)	(C-PTD200-SN80123149)	25 y 35 °C
	Agitador	Cuba	
P17	(ST22-4V-40-SN10120)	(C-PTD200-SN80123149)	25 y 35 °C
	Agitador	Cuba	
A17	(ST22-4V-40-SN10120)	(C-PTD200-SN80123149)	25 y 35 °C
	Agitador	Cuba	
PP25	(ST22-4V-40-SN10120)	(C-PTD200-SN80123149)	25 y 35 °C
	Agitador	Cuba	
AP25	(ST22-4V-40-SN10120)	(C-PTD200-SN80123149)	25 y 35 °C
	Agitador	Cuba	
PP17	(ST22-4V-40-SN10120)	(C-PTD200-SN80123149)	25 y 35 °C
	Agitador	Cuba	
AP17	(ST22-4V-40-SN10120)	(C-PTD200-SN80123149)	25 y 35 °C

2.4.1. Determinación del comportamiento de la viscosidad de la suspensión del kefir de agua

Se estudió la relación existente entre la viscosidad de suspensiones polimerales de la solución formadora de biopelícula, a partir de la ecuación de Einstein, ecuación

14, que describe la viscosidad relativa, $\mu_r[-]$ en suspensiones con partículas esféricas diluidas, en función de la fracción volumétrica, $\phi[-]$ (Bird, 2006).

$$\mu_r = \frac{\mu_s}{\mu_l} = 1 + 2.5\phi \quad (14)$$

2.5. Caracterización de la biopelícula obtenida

Considerando los resultados de la cinética que incrementó la biomasa se fermentó en lotes de 1L a 25 ° Brix y 35 ° C con panela y cáscara de piña (PP25 a 35 ° C) y a 25 ° Brix y 35 ° C con azúcar y cáscara de piña (AP25 a 35 ° C) durante 8 días en estado estacionario para obtener la biopelícula.

2.5.1 Microscopia óptica

Se realizó una prueba para verificar la estructura de granos de kéfir en agua y biopelícula mediante microscopía óptica con objetivos 10x y 4x utilizando un microscopio óptico y digital (pantalla LCD IOPTRON ST-640).

2.6. Caracterización fisicoquímica

2.6.1 Determinación de cenizas

Se utilizó la determinación en seco es el método más común de acuerdo a la norma NMX-F-066-S-1978

2.6.2 Determinación de humedad

La determinación de secado en estufa se basó en la pérdida de peso de la muestra por evaporación del agua (NMX-F-083-1986).

2.6.3 Determinación de pH

El valor del pH se determinó de forma precisa mediante un Potenciómetro Hanna Instruments pH/ORP Meter modelo HI 2211(NMX-F-317-S-1978)

2.6.4 Determinación de acidez

El procedimiento se realizó por el método estándar de titulación (NMX-102-F-1978).

2.6.5 Determinación de grasas

También llamado determinación de lípidos crudos, se realizó según la norma NMX-F-089-S-1978

2.6.6 Determinación de proteínas

El método Kjeldahl se utiliza en química analítica para la determinación del contenido de nitrógeno según la norma El método consta de tres etapas (NMX-F-068-S-1980):

Digestión – Destilación – Titulación

2.6.7 Determinación de fibra cruda

Desde un punto de vista práctico se considera apropiado clasificar las fibras según su grado de fermentación, lo que da lugar a dos grupos claramente diferenciados, el de las fibras totalmente fermentables y el de las parcialmente fermentables. De ahí se derivan los dos conceptos más aceptados en tomo a la fibra: fibra fermentable, soluble y viscosa; y la fibra escasamente fermentable, insoluble y no viscosa (NMX-F-090-S-1978).

2.7. Pruebas mecánicas a la biopelícula de tibicos

2.7.1 Determinación de espesor

Antes de proceder con la determinación a todas las biopelículas se determinó el espesor utilizando un micrómetro marca Mitutoyo modelo IP65 Coolant Proof, con intervalo de 0-1 pulgadas; se realizó la medición en los extremos y en el centro de la misma, obteniendo un valor promedio del espesor final.

Se realizaron al menos tres réplicas de este tratamiento en la obtención de la biopelícula.

2.7.2 Determinación de reología elongacional y esfuerzo

El porcentaje de elongación y el esfuerzo se monitorearán de acuerdo a la Norma ASTM-D882-91 “Propiedades de Tensión en Laminas Plásticas Delgadas”. O bien

acuerdo a la norma ASTM D 882-95, al igual que el método propuesto por Tainara et al., (2016), validado por la norma ASTM D882-09 siendo ésta el más actual.

2.8. Determinación reológica a la biopelícula obtenida

2.8.1. Estudio reológico dinámico

Las determinaciones se llevaron a cabo en un reómetro de bajo esfuerzo Anton Paar modelo MCR301. Las temperaturas de las muestras fueron controladas con plato Peltier. En un intervalo de tasa de corte comprendidas entre 0 y 1000 s⁻¹ utilizando una geometría PP25.

2.8.2. Viscoelasticidad lineal

Se realizó un barrido de amplitud de 0 a 1000% a una frecuencia angular constante de 10 rad para determinar la zona viscoelástica lineal, posteriormente se llevó a cabo un barrido de frecuencia entre 0.010 y 100 rad, para determinar el comportamiento de los módulos de almacenamiento G' (Pa) y de pérdida G'' (Pa) en función de la frecuencia angular. (Gonzales et al., 2015).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Proceso de fermentación para la obtención de la biopelícula

Una vez que se obtuvieron las muestras de tibicos y cáscara de piña provista por el mercado Emiliano Zapata correspondientemente, se evaluaron las condiciones durante la fermentación (Cinética de crecimiento, pH, ORP).

3.1.1. Proceso de fermentación para la obtención de la biopelícula en ausencia de Oxígeno

En la Figura 3.1 se ilustra la cinética de crecimiento de tibicos a diferentes temperaturas donde se observó que el mayor crecimiento se dio teniendo como sustrato panela-piña a 35°C y 25°Brix (PP25).

Se notó que la cáscara de piña acelera y maximiza el crecimiento microbiano como se observó en la curva AP25 a 25 °C que corresponde a el sustrato azúcar-piña a 25°Brix y en las curvas PP25, AP25 y AP17 a 35°C (panela-piña a 25°Brix, azúcar-piña a 25°Brix y azúcar-piña a 17°Brix), en la Figura 3.2 se observaron los mejores resultados para 25°C y 35°C comparando las muestras con piña y las muestras sin piña, siendo PP25 Y AP25 con un mayor crecimiento.

En cuanto al pH y el ORP se observó en la Figura 3.2, que durante la fermentación ocurrió una oxidación la ganancia de iones H⁺ indico que se acidifico la muestra llegando a un valor regularmente estable al día 4 con un pH promedio de 3 y un ORP de 200 mV, debido a esto es que el crecimiento microbiano se vio afectado ya que empezó a haber inhibición de tibicos, se formó el comercialmente llamado vinagre de tibicos (Ferreira *et al.*, 2014).

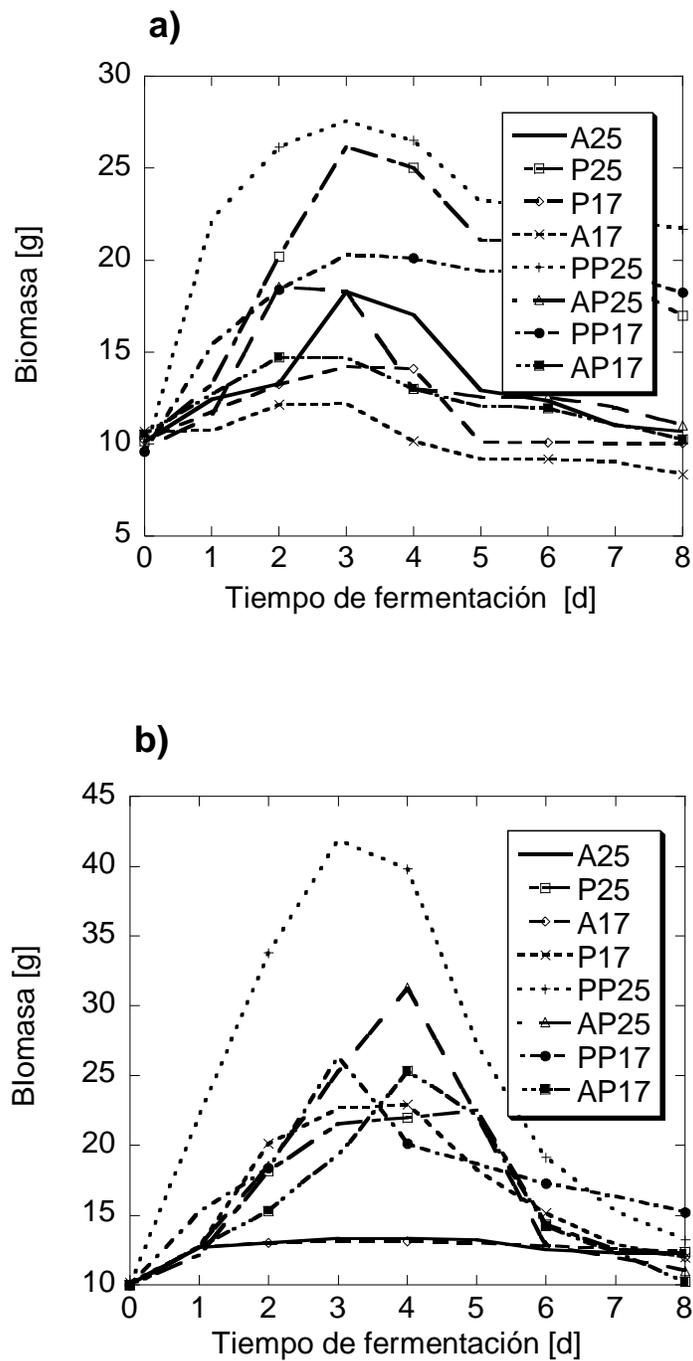


Figura 3.1. Cinética de crecimiento de los granos de Kefir en base seca, a) Cinética de crecimiento a 25°C y b) Cinética de crecimiento a 35°C

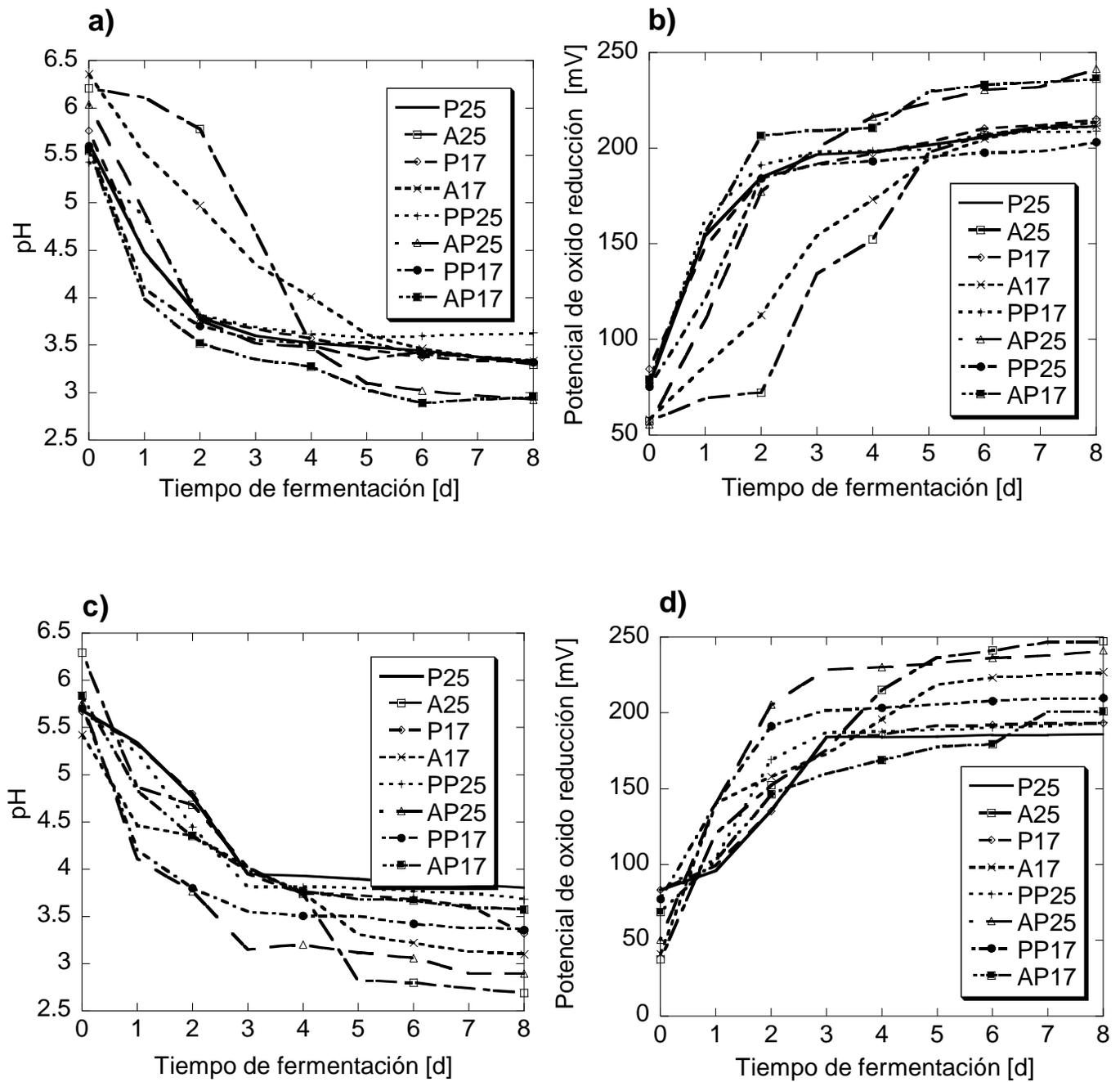


Figura 3.2. Efecto del pH y ORP en ausencia de oxígeno. a) Efecto del pH a 25°C, b) Efecto del ORP a 25°C, c) Efecto del pH a 35°C y d) Efecto del ORP a 35°C

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para representar el crecimiento que ocurrió en la etapa exponencial de la cinética microbiana se obtuvo mediante regresión lineal la constante de crecimiento específico con respecto al tiempo que se observa en la Tabla 3.1, que la temperatura influye sobre la constante de crecimiento con respecto al tiempo, la cosecha máxima se ve influenciada por la temperatura.

Tabla 3.1. Datos obtenidos de la regresión lineal en el proceso de fermentación con respecto al tiempo

Temperatura, °C	25		35	
Muestra	Velocidad específica [μ] (d^{-1})	Concentración de biomasa máxima (gcél/L)	Velocidad específica [μ] (d^{-1})	Concentración de biomasa máxima (gcél/L)
P25	0.3401	16.024	0.3401	11.994
A25	0.1935	8.1807	0.1935	3.3165
P17	0.0955	4.0494	0.2893	12.7118
A17	0.0638	1.4918	0.0638	3.073
PP25	0.1083	18.0058	0.1083	31.8631
AP25	0.2311	8.8027	0.2311	21.238
PP17	0.1382	10.6896	0.1382	16.3488
AP17	0.0727	4.1891	0.0727	15.306

3.1.2. Proceso de fermentación para la obtención de la biopelícula en presencia de O₂

Debido a que los táticos son un consorcio de bacterias y levaduras facultativas, se hicieron las cinéticas de crecimiento microbiano, para comparar su crecimiento en presencia de oxígeno, en la Figura 3.3 se observan las cinéticas de crecimiento donde se notó que nuevamente los mejores resultados fueron las curvas donde se adiciono cáscara de piña y la curva PP25 a 35°C en efecto el pH y ORP es similar al comportamiento en ausencia de oxígeno. Como se muestra en la Figura 3.4.

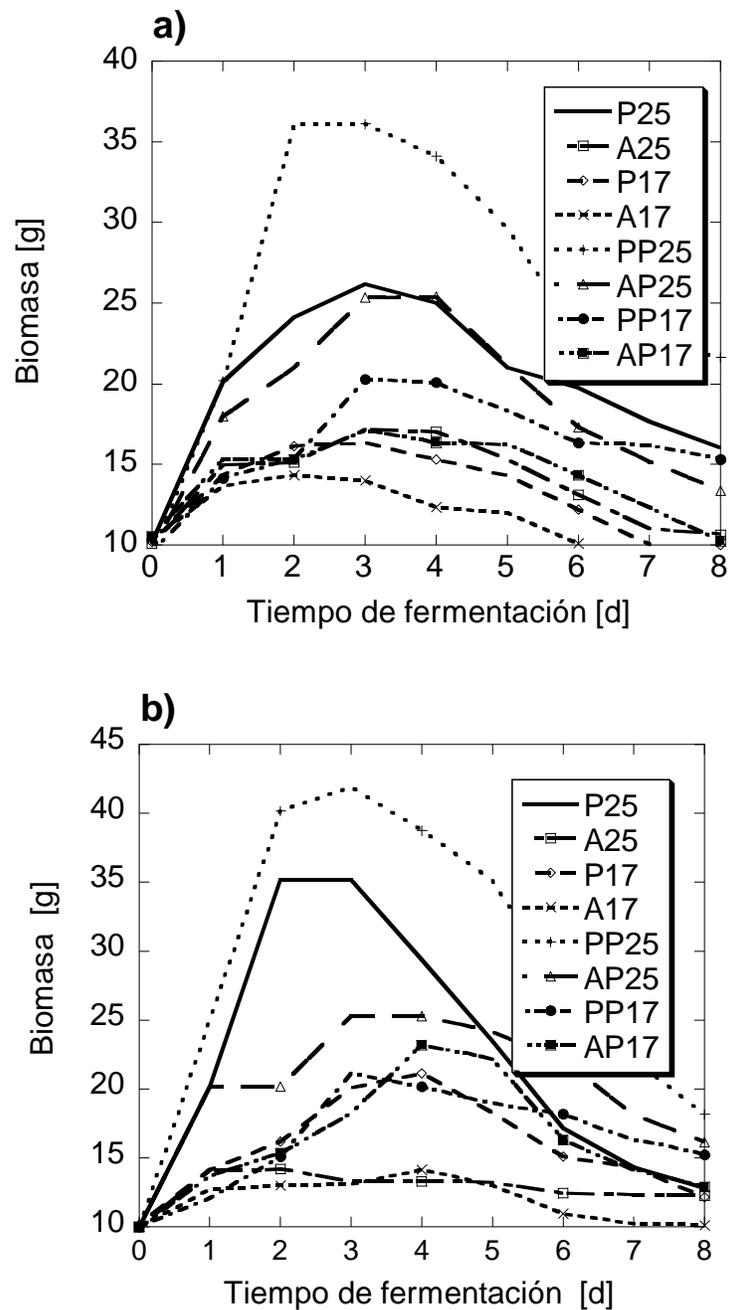


Figura 3.3. Cinética de crecimiento de los granos de Kefir en base seca, en presencia de oxígeno. a) Cinética de crecimiento a 25 °C y b) Cinética de crecimiento a 35 °C

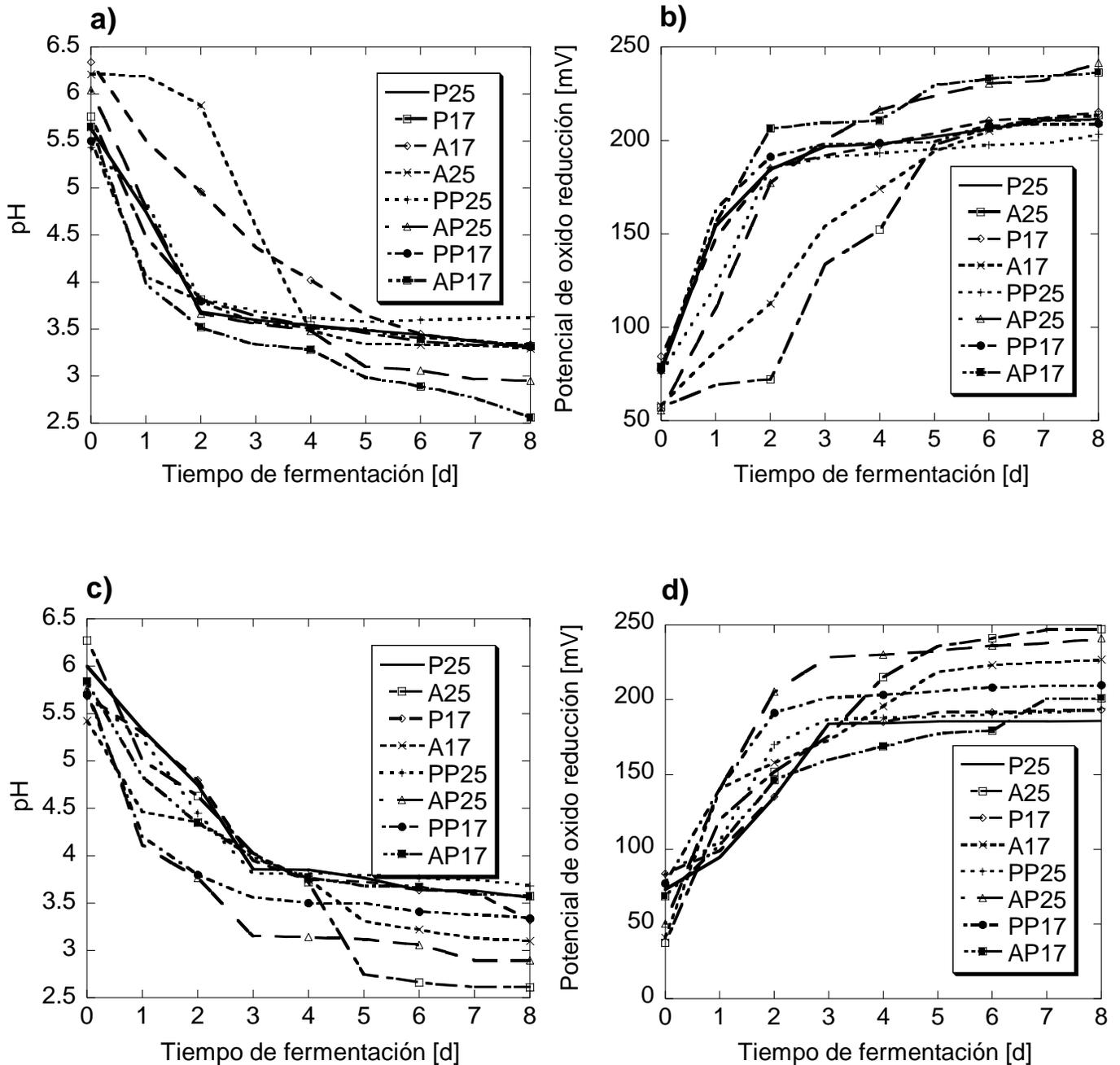


Figura 3.4 Efecto del pH y ORP en presencia de oxígeno. Fig. 3.4a. Efecto del pH a 25°C y Fig.3.4b. Efecto del ORP a 25°C y Fig. 3.4c. Efecto del pH a 35°C y Fig.3.4d. Efecto del ORP a 35°C

En la Tabla 3.2 se ilustró nuevamente la etapa exponencial de la cinética microbiana se obtuvo mediante regresión lineal la constante de crecimiento específico con respecto al tiempo donde se observó que la velocidad de crecimiento aumenta al igual que la concentración de biomasa máxima y esta se ve influenciada por el oxígeno además que la cascara de piña y la temperatura representan significancia en la obtención de biomasa.

La ganancia de iones H^+ ocurrió durante la fermentación, lo que indica que la muestra se acidificó, alcanzando un valor regularmente estable el día 4 con un pH promedio de 3, debido a que el crecimiento de la biomasa se vio afectado. La actividad metabólica de los microorganismos y la producción de ácidos podría ser inhibitoria en el desarrollo de algunos microorganismos (Caro Vélez & León Peláez, 2015).

Algunos autores han informado sobre la disminución del pH en los sustratos azucarados que serán fermentados por el consorcio de microorganismos en los granos de kefir. (Silva, Rodríguez, Filho, y Lima, 2009) utilizaron 10 g/L de diferentes azúcares no refinados (demerara, moray y melaza) como sustrato de fermentación del kefir (0,6% de inóculo), en el que analizaron la disminución del pH durante un período de 7 días, ajustando el pH inicial a 5 con 0.1 M HCl. Estos autores determinaron el pH mínimo de 3.3 para azúcar demerara, 3.4 para azúcar moreno y 3.5 para melaza, después de 48 h de incubación a 25 ° C.

En esta investigación, se encontraron niveles mínimos de pH de 3 en períodos de tiempo más largos (4 días) a 25 y 35 ° C y en los que se utilizó panela como sustrato inoculado con 10 g de granos de kefir.

Lo que nos permite concluir que la adición de panela de piña es un medio adecuado para el cultivo de granos de kefir que prolonga su propia inhibición.

Tabla 3.2. Datos obtenidos de la regresión lineal en el proceso de fermentación con respecto al tiempo en presencia de oxígeno

Temperatura, °C		25		35	
Muestra	Velocidad específica [μ] (d^{-1})	Concentración de biomasa máxima (gcél/L)	Velocidad específica [μ] (d^{-1})	Concentración de biomasa máxima (gcél/L)	
P25	5.2071	16.0240	12.5800	25.1608	
A25	2.1388	7.0797	2.0895	4.17904	
P17	2.0218	6.1386	2.7948	10.9700	
A17	1.9987	3.9974	0.8541	4.0779	
PP25	13.2750	26.5499	15.0660	31.8631	
AP25	3.8582	15.6290	4.5895	15.2982	
PP17	3.3275	10.6896	3.6330	11.1132	
AP17	1.9776	6.5911	3.0868	13.1662	

3.1.3. Cinéticas y constantes de Monod

Se obtuvieron los gráficos de las cinéticas de Monod y la velocidad máxima de crecimiento específico (μ_{max}) y la constante de saturación (K_s), en la Tabla 3.3 se ilustraron las constantes del método diferencial de Monod y en la Figura 3.5 se graficaron las cinéticas a 25°C y en la Figura 3.6 se graficaron las cinéticas a 35°C.

Tabla 3.3. Parámetros cinéticos de la ecuación de Monod

Temperatura, °C		25		35	
Muestra	μ_{max}	K_s	μ_{max}	K_s	
P25	-2.1454	-53.1307	-4.661	-21.8066	
A25	-0.5566	-786.4538	-0.4473	-1188.0509	
P17	-1.5197	-60.3912	-1.5197	-60.3912	
A17	-0.1597	-6067.4680	-0.1597	-6061.5192	
PP25	-2.9785	-27.3581	-3.1396	78.074	
AP25	-1.6132	-92.3819	-1.6131	-92.3819	
PP17	-0.9151	-192.3546	-0.9151	-192.3546	
AP17	-0.3482	-1260.1468	-0.2392	-2609.5740	

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

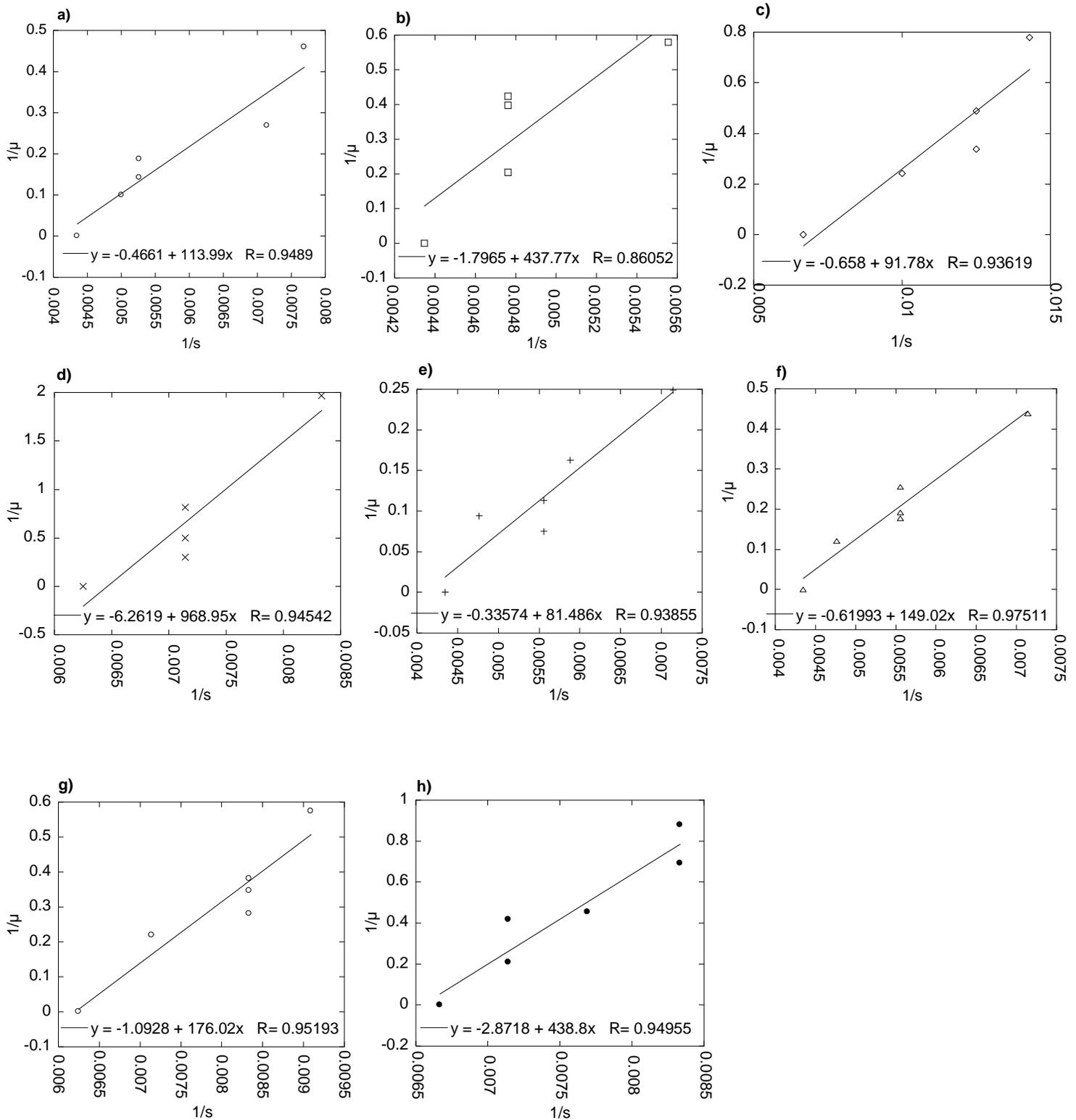


Figura 3.5. Gráficos del método diferencial de Monod a 25°C. a) Curva P25, b) curva A25, c) curva P17, d) curva A17, e) curva PP25. f) curva AP 25, g) curva PP17 y h) curva AP17

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

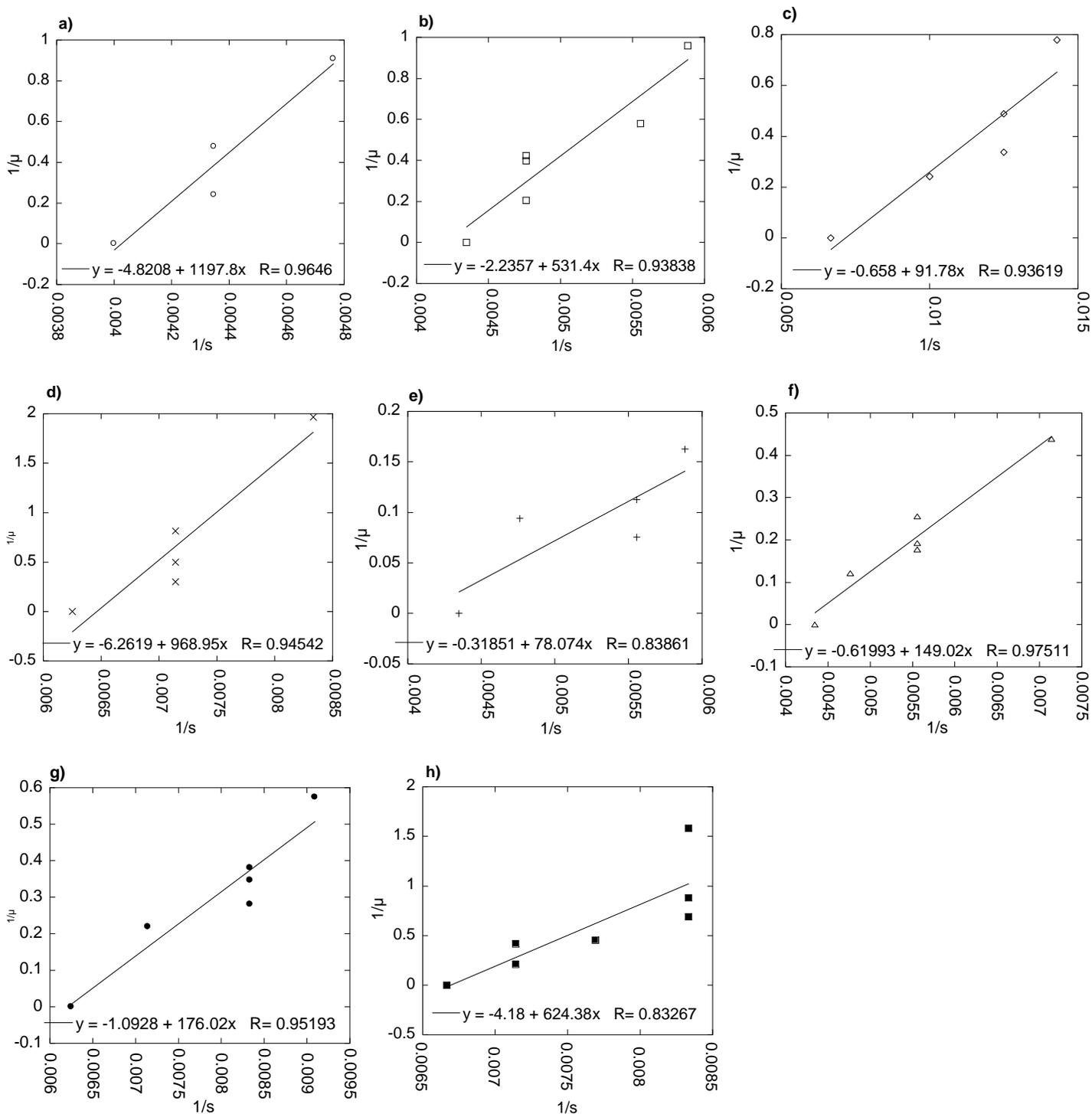


Figura 3.6. Gráficos del método diferencial de Monod a 35°C. a) Curva P25, b) curva A25, c) curva P17, d) curva A17, e) curva PP25. f) curva AP 25, g) curva PP17 y h) curva AP17

3.2. Reología de las sustancias formadoras de biopelícula

A cada caldo de fermentación se le realizaron pruebas reológicas rotacionales a 25°C y 35°C dando como resultado un comportamiento dilatante y ajustándose al modelo de Herschel-Blukley (HB), en la Figura 3.7 se muestra el comportamiento en función del esfuerzo de corte a las dos temperaturas, en la Figura 3.8 se muestra el comportamiento en función de la viscosidad y en la Tabla 3.4 se muestran los parámetros analizados así como su ajuste promedio de R² de 0.99 que se obtuvieron.

Tabla 3.4. Parámetros reológicos de modelo HB

Muestra	Temperatura [°C]	η [mPa·s]	τ_0 [mPa]	K [mPa s ⁿ]	n [-]	R ²	"t" prob	"t"
P25	25	24.1	77.248	0.104	1.865	0.991	0.9104	0.1160
	35	22.5	67.453	0.104	1.863	0.991		
A25	25	21.2	59.087	0.094	1.861	0.990	0.9898	0.0131
	35	22.2	59.155	0.094	1.850	0.990		
P17	25	21.3	56.512	0.097	1.856	0.991	0.9423	0.0746
	35	19.6	64.299	0.098	1.880	0.992		
A17	25	24.0	56.516	0.097	1.856	0.991	0.9396	1.4340
	35	18.7	68.445	0.098	1.879	0.992		
PP25	25	20.9	71.060	0.105	1.860	0.992	0.9806	0.0251
	35	21.9	67.690	0.106	1.870	0.992		
AP25	25	23.9	73.607	0.102	1.866	0.991	0.9157	0.1053
	35	21.7	65.838	0.102	1.874	0.991		
PP17	25	21.5	59.439	0.095	1.861	0.992	1.000	1.2422
	35	21.5	59.439	0.096	1.861	0.992		
AP17	25	21.4	63.558	0.098	1.855	0.989	0.9626	0.0483
	35	20.2	60.687	0.098	1.857	0.993		

"t" = student test. Se usó el software Kaleida Graph para el análisis de los datos, T temperatura, η viscosidad aparente, τ_0 esfuerzo inicial para fluir, K índice de consistencia, n índice de comportamiento de flujo, R² ajuste del modelo Herschel-Blukley.

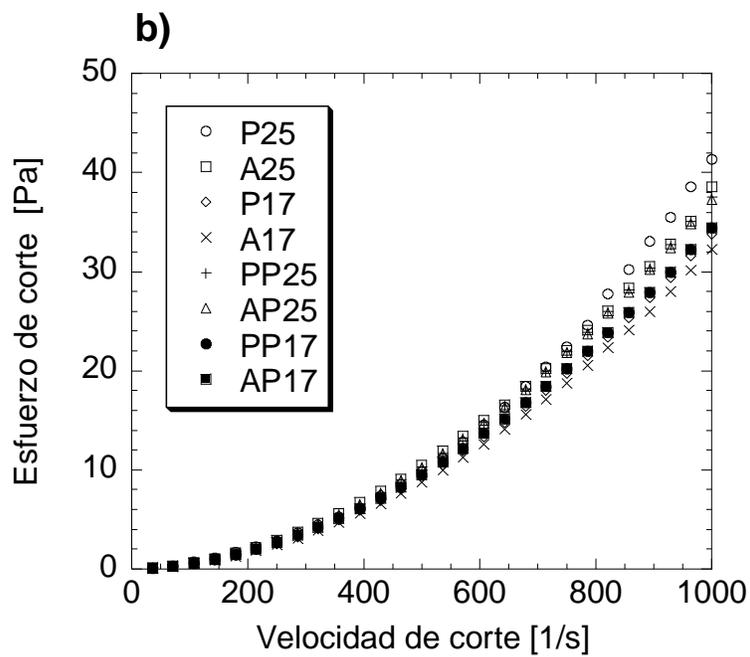
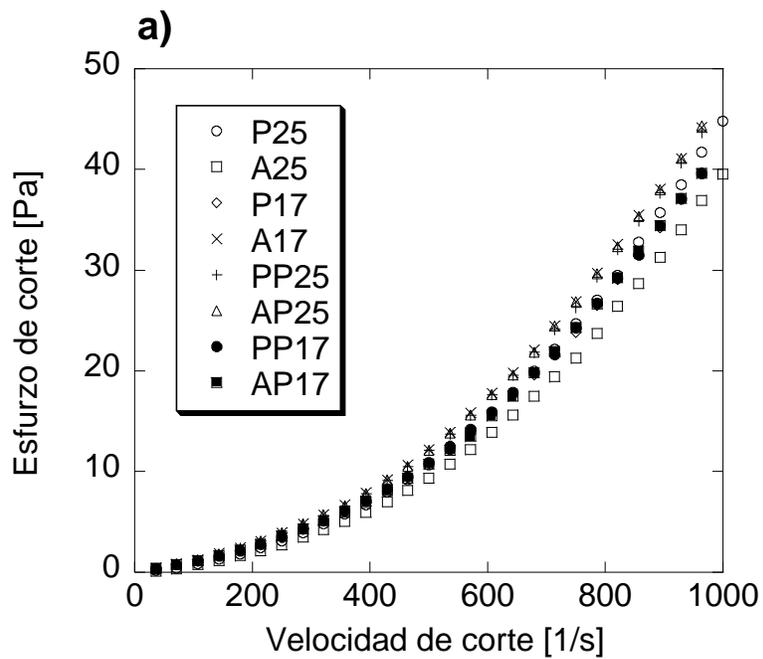


Figura 3.7 Reograma en función del esfuerzo de corte en estado estacionario, a). Reograma a 25°C y b) Reograma a 35°C

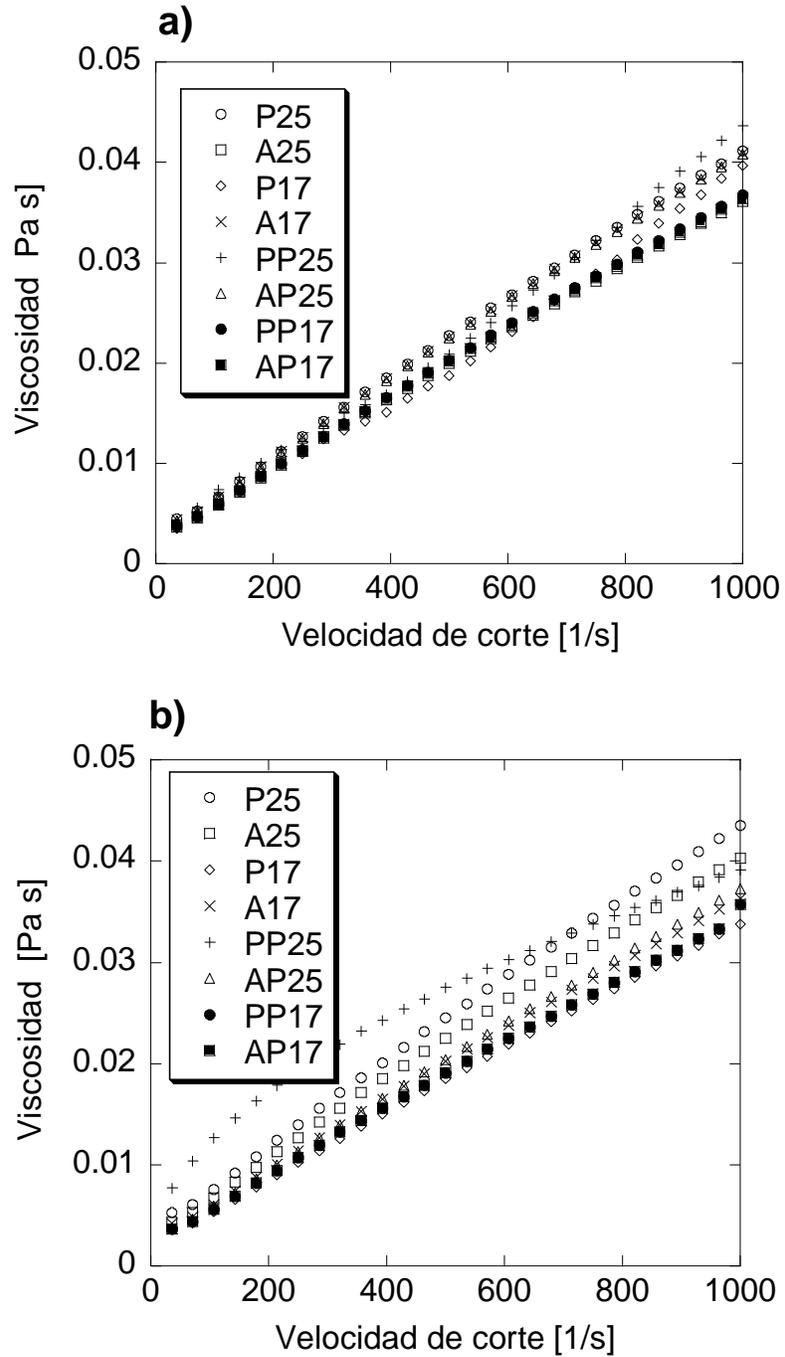


Figura 3.8 Reograma en función de la viscosidad en estado estacionario. a) Reograma a 25°C y b) Reograma a 35°C.

El reograma en función de la viscosidad en la Figura 3.8 nos muestra nuevamente el comportamiento dilatante comprobando que el modelo representa a una fermentación no-newtoniana.

SFP a 25 y 35 ° C, presentó un comportamiento no newtoniano. Su índice de comportamiento de flujo fue mayor de uno ($n > 1$) con lo que se confirmó dilatación (comportamiento de espesamiento de cizallamiento) (Steffe et al., 1996). Este comportamiento se asemeja al reportado en la producción de bioetanol para macerado, puré fermentado, bioetanol impuro (Oropeza et al., 2018). τ_0 es el límite elástico (Pa), que se considera una indicación del valor específico del estrés ejercido sobre el SFP cuando comienza a fluir (Liu et al., 2016). Se observó que para muestras de panela y muestras que contenían cáscara de piña τ_0 a 35 ° C, resultó ser menor en comparación con las de 25 ° C, lo que indica que se requiere menos esfuerzo para fluir. Todos los parámetros del modelo de Herschel-Blukley se muestran mostraron una confianza satisfactoria (95% < θ > 99%).

3.2.1. Comportamiento de la suspensión del kefir de agua en base a la ecuación de Einstein

En la Figura 3.9 se observó el comportamiento de las suspensiones donde se ajustaron perfectamente a la ecuación de Einstein (Bird, 2006) teniendo una $R^2=0.99$ observando que las soluciones tienen un comportamiento de una suspensión de partículas esféricas diluidas donde μ_s es la viscosidad de la suspensión y μ_r es la viscosidad relativa y esta tiene un valor promedio de 1.6 Pa s, este comportamiento coincide con el reportado por Cantú-Lozano, 1987 con levaduras *Saccharomyces cerevisiae*.

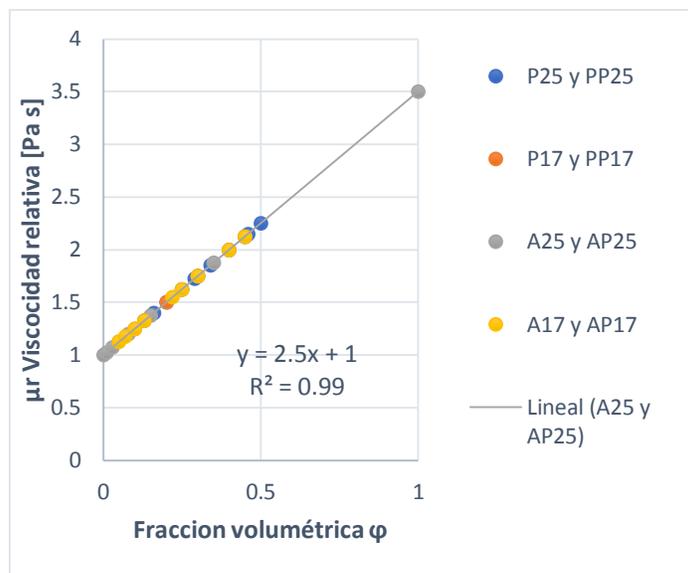


Figura 3.9. Comportamiento de la viscosidad relativa de la suspensión de soluciones formadoras de biopelículas

3.3. Biopelícula obtenida

Las biopelículas obtenidas se muestran en las Fig. 3.10. Se observó que las biopelículas toman el color de su medio, para la biopelícula de cáscara de panela-piña a 25 ° Brix y 35 ° C (PP25 a 35 ° C) se observó un color transparente de mostaza amarilla y para el azúcar biopelícula - cáscara de piña a 25 ° Brix y 35 ° C (AP25 a 35 ° C) se observó un color beige transparente.

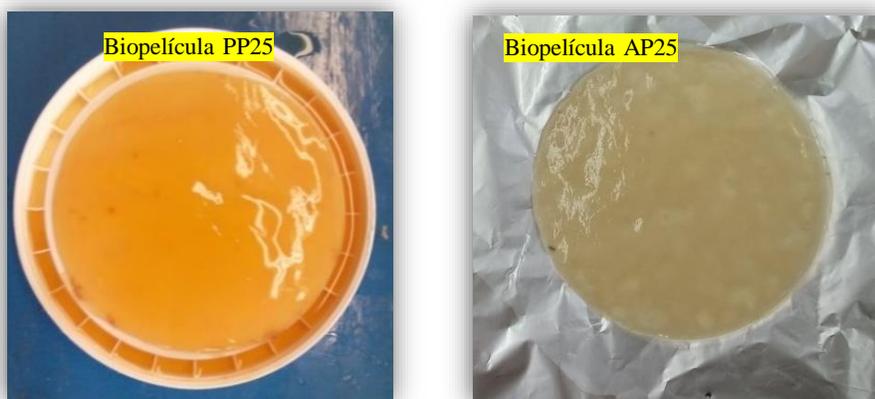


Figura 3.10. Biopelículas obtenidas a 35 °C

3.3.1. Microscopia óptica

Una sección de un grano entero fue examinada por microscopía y fotografiada (Fig. 3.11). (A) los granos son de forma irregular con un diámetro de 10 a 15 mm y estructuralmente podría abrirse y extenderse como una biopelícula gruesa, algunos autores han informado de la existencia de consorcios microbianos de bacterias y levaduras (Wang et al., 2012) toda la capa externa del grano estaba más densamente poblada por microorganismos que la parte interna. A mayor aumento, se encontró que la capa externa del grano contenía lactobacilos, lactococos y levaduras. La capa interna de grano fue similar, excepto que los lactobacilos fueron mucho más largos y se encontraron más células de levadura en la capa interna de grano. En los ensayos de biopelícula en todas las micrografías se observó una superficie más lisa, sin embargo, se observaron irregularidades debido a la materia orgánica, las micrografías de AP25 se muestran más claras y lisas que las micrografías de PP25, esto se debe al sustrato utilizado para las muestras de AP25 sacarosa comercial y para PP25 el uso de panela da forma a las irregularidades.

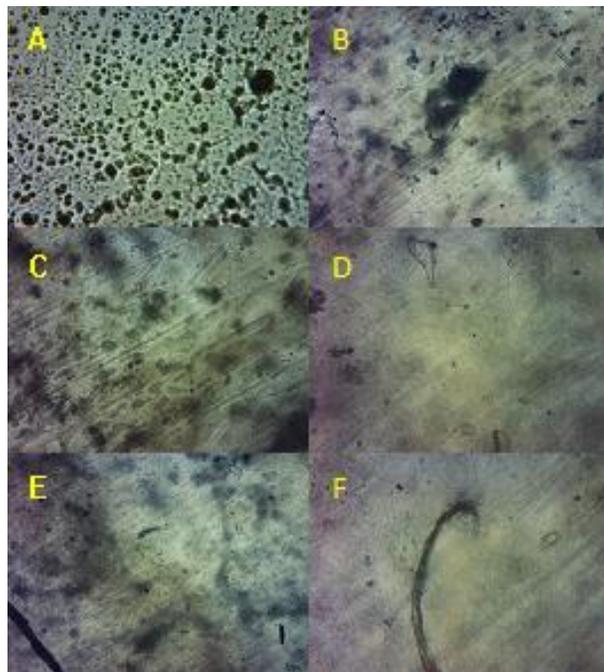


Fig. 3.11. Microscopia óptica. (A) Granos de kefir de agua, (B) Superficie de biopelícula AP25 a objetivo de 10x, (C) superficie de biopelícula PP25 a objetivo de 10x, (D) superficie de biopelícula AP25 a objetivo de 4x, (E) superficie de biopelícula PP25 a objetivo de 4x and (F) superficie de biopelícula AP25 a 4x

3.4 Caracterización fisicoquímica a la biopelícula obtenida

Después del proceso de fermentación, se obtuvo una biopelícula resultante a base de tibicos nutridos por soluciones con sacarosa y cáscara de piña los resultados se muestran en la Tabla 3.5, dando como resultado, un alto contenido de proteínas, alto contenido de humedad, se encontró que al ser proveniente de una fermentación acida la biopelícula tiene un pH ácido y su porcentaje de acidez este alrededor de 3.78 ± 0.03 .

En literatura, se ha reportado la caracterización físico-química de biopelículas comestibles (González-Linares, Medina-Vivanco, Garay-Montes, y Mendieta-Taboada, 2017). Se analizaron la torta de Sacha Inchi y el aislado proteico liofilizado para la determinación de humedad, proteína, ceniza, fibra y grasa de acuerdo con los métodos oficiales de AOAC 935.29, 991.20, 923.03, 962.09, 920.39, respectivamente (AOAC, 1998). La proteína se calculó multiplicando el contenido de nitrógeno por el factor de conversión 6.25, informó la composición química proximal del aislado de proteína Sacha Inchi sobre una base seca, proteína $89.1 \pm 0.88\%$, lípidos $6.54 \pm 0.08\%$, cenizas $3.29 \pm 0.07\%$, fibra bruta e hidratos de carbono disponibles $1.07 \pm 1.46\%$ y contenido de humedad (base húmeda) $3.69 \pm 0.31\%$, estos resultados dan la aplicación como biopelícula comestible a la biopelícula de tibicos.

Tabla 3.5. Caracterización fisicoquímica de la biopelícula obtenida

Parámetros	Valor
Cenizas (%)	0.68 ± 0.04
Humedad (%)	26.28 ± 0.02
pH [-]	3 ± 0.02
Acidez (%)	3.78 ± 0.03
Lípidos (%)	4.3 ± 0.05
Proteínas (%)	28 ± 0.01
Fibra cruda (%)	0.026 ± 0.001

\pm Desviación estándar. Se usó el software Kaleida Graph para el análisis de datos

3.5. Caracterización mecánica de la biopelícula de tibicos y cáscara de piña

Como primer paso se obtuvo el espesor de la biopelícula ya que es un parámetro necesario para poder calcular el esfuerzo y el módulo de Young o modulo elástico en la Tabla 3,6 se muestran los resultados que se obtuvieron de las pruebas mecánicas como lo indica la norma ASTM-D881 para laminas plásticas delgadas.

Se encontró un valor de espesor de 1.3 ± 0.03 mm en las biopelículas PP25 y AP25, que pueden aportar ventajas sobre la densidad y resistencia de la biopelícula (Peter et al., 2010), este espesor es mayor que el informado por autores que funcionalizaron quitosano con plastificantes en materiales de empaque que reportan valores de 0.15 mm (Ahmed & Ikram, 2016), 0.12 ± 0.002 mm (Martins, Cerqueira, y Vicente, 2012) y 0.13 ± 0.001 mm (González-Linares et al., 2017).

Se obtuvieron biopelículas homogéneas y flexibles de PP25 y AP25 y todas las biopelículas fueron transparentes, como se observó a simple vista en las Fig.3.10, lo que indica una buena compatibilidad entre los componentes de las películas. Si la compatibilidad entre los componentes de las películas no era buena, entonces debido a la reflexión o dispersión de la luz en la interfaz de fase, la transparencia sería baja (Martins et al., 2012). Dado el hecho de que no hubo diferencias significativas en el valor del espesor y la reducción en las biopelículas podría indicar una buena compatibilidad entre los diferentes componentes.

Tabla 3.6. Resultados de las pruebas mecánicas de la biopelícula obtenida

Determinaciones	Resultado
Espesor (mm)	1.3 ± 0.03
Esfuerzo (tensión) (Pa)	200
Módulo de elasticidad (-)	15.2

\pm Desviación estándar. Se usó el software Kaleida Graph para el análisis de datos

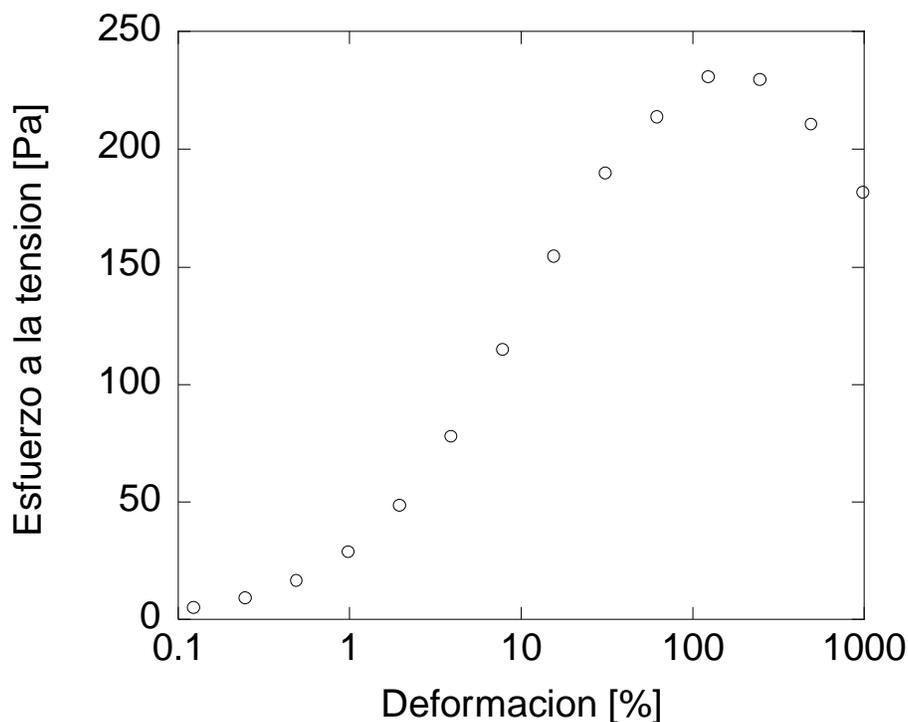


Figura 3.12. Gráfico de esfuerzo a la tensión de la biopelícula obtenida

3.6. Caracterización reológica de la biopelícula de tibicos y cáscara de piña

Los resultados del barrido de amplitud mostraron que tiende a dominar el módulo de almacenamiento G' antes del punto de cruce, lo que significa que tiende a la zona de elasticidad, después del punto de cruce tiende a la zona viscosa el módulo de pérdida G'' predominó.

Las propiedades viscoelásticas de las biopelículas obtenidas en la región viscoelástica lineal se analizaron de acuerdo con la prueba de barrido de frecuencia. Los barridos de frecuencia son muy útiles para comparar, a veces denominados "huellas dactilares", diferentes productos alimenticios o para comparar los efectos de diversos ingredientes y tratamientos de procesamiento sobre la viscoelasticidad.

Los materiales usualmente exhiben características de tipo más sólido a frecuencias más altas (Steffe et al., 1996). El módulo de almacenamiento (G') resultó mayor que

el módulo de pérdida (G''), lo que indica un comportamiento elástico (estructura de tipo sólido).

Algunos autores han informado que el predominio del módulo de almacenamiento en el módulo de pérdida asegura un comportamiento elástico en el comportamiento viscoso (Oropeza et al., 2018) mostró que las incrustaciones en las columnas en la producción de bioetanol tienen un comportamiento elástico (estructura sólida) que se debe principalmente a dextrana.

En las redes poliméricas de proteínas, el comportamiento es viscoelástico y predomina la zona elástica; sin embargo, en el caso de algunos autores, los módulos G' y G'' nunca se cruzan y disminuyen, haciendo hincapié en que casi nunca se observan (Rühs, Böcker, Inglis, & Fischer, 2014).

En algunos otros casos de estudio, los geles se comportan como fluido predominando el comportamiento viscoso del módulo G'' y al agregar un compuesto plastificante tiende a cubrirse con una biopelícula dando estabilidad al gel predominando el comportamiento elástico del módulo G' (Silva-Weiss et al., 2013).

Tal es el caso de las propiedades estructurales del estudio de películas y la reología de soluciones formadoras de película basadas en la mezcla de quitosano y quitosano-almidón enriquecido con extracto de hoja de murta ", extracto acuoso rico en polifenoles de murta (PEML) agregado a las películas de quitosano dando un estado sólido al gel cuanto mayor sea el contenido sólido, más fuertes serán las fuerzas coloidales y la fuerza de la red (Liu et al., 2016).

Los resultados del barrido de amplitud (Fig. 3.13) mostraron que tiende a predominar el módulo de almacenamiento G' antes del punto de cruce lo que significa que tiende a la zona elástica la biopelícula obtenida, después del punto de cruce tiende a la zona viscosa predomino el módulo de pérdida G'' .

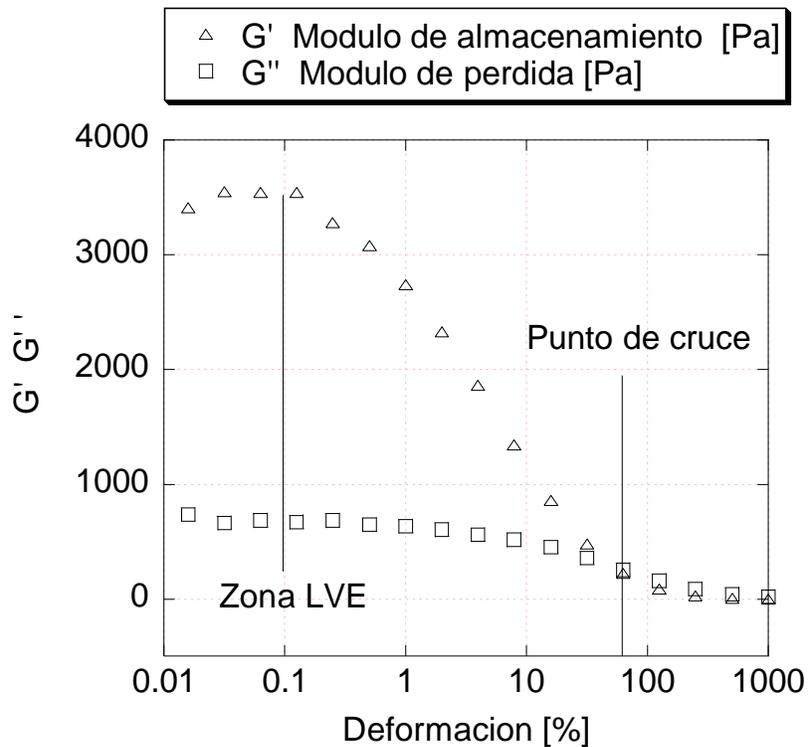


Figura 3.13. Gráfico de barrido de amplitud de la biopelícula obtenida

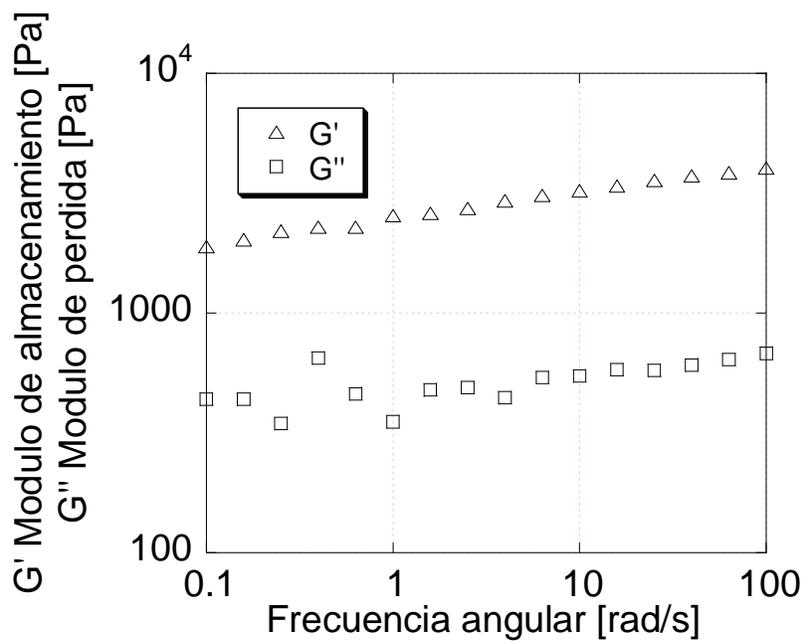


Figura 3.14. Gráfico de barrido de frecuencia de la biopelícula obtenida

En la Fig. 3.14 se observó el comportamiento en el barrido de frecuencia de los módulos G' y G'' dando como resultado el comportamiento predominante en la zona elástica además de que no existe un punto de cruce predominando la parte sólida lo que favorece la posibilidad de que la biopelícula pueda utilizarse como material de embalaje.

3.7 Análisis estadístico

3.7.1 Análisis estadístico del proceso de fermentación en presencia de O₂

En la Tabla 3.7 se muestran los resultados del análisis estadístico del proceso fermentativo en presencia de O₂ el cual mostró significancia para todos los factores a excepción de la temperatura, los análisis de comparación múltiple de Tukey Kramer indicaron los niveles de mayor rendimiento, en la Tabla 3.8 se mostró que el sustrato que maximiza la producción de biomasa es la combinación de panela-y cáscara de piña.

Tabla 3.7. ANOVA del proceso fermentativo en presencia de oxígeno

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F ₀	Nivel de Probabilidad	Poder (Alpha=0.05)
A: Sustrato	3	1409.869	469.9562	26342.04	0.000000*	1
B: Temperatura	1	4.36E-03	4.36E-03	0.24	0.627681	0.07517
AB	3	138.9486	46.31621	2596.12	0.000000*	1
C: Concentración	1	1153.21	1153.21	64639.83	0.000000*	1
AC	3	434.0826	144.6942	8110.42	0.000000*	1
BC	1	279.102	279.102	15644.26	0.000000*	1
ABC	3	255.5276	85.17585	4774.29	0.000000*	1
S	16	0.2854487	1.78E-02			
Total (Adjusted)	31	3671.029				
Total	32					

* Terminó de significancia $\alpha = 0.05$

R²=0.65

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 3.8. Comparación múltiple de Tukey Kramer

Sustrato			Temperatura			Concentración		
Grupo	Media	Grupos diferentes	Grupo	Media	Grupo diferentes	Grupo	Media	Grupo diferente
2	24.21	1, 4, 3	2	31.02	-	2	25.03	1
1	25.51	2, 4, 3	1	31.05	-	1	37.04	2
4	33.83	2, 1, 3						
3	40.59	2, 1, 4						

$\alpha = 0.050$ Grados de libertad= 16 Sumatoria de media de cuadrados 1.78×10^{-2}

Se notó que la temperatura no tiene significancia y que no importa en qué nivel se trabaje si en alto o bajo y se mostró que la concentración que da mejor rendimiento fue la de 25°Brix.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En el presente proyecto de investigación se confirmó la hipótesis inicial planteada, esto es, el aprovechamiento de residuos como son los tibicos y la cáscara de piña son una alternativa en la sustitución de procesos y de productos que derivan del uso de recursos derivados del petróleo. Los granos de kéfir y la cáscara de piña son una gran alternativa para generar biopelículas en la sustitución de materiales viscoelásticos derivados de recursos fósiles como el plástico.

Con respecto al proceso fermentativo realizado, se hizo un estudio comparativo de los cultivos de Kefir de agua en medios de panela y azúcar adicionando cáscara de piña, la cinética de crecimiento con PP25 a 35°C es la que mayor concentración de biomasa mostró para el tercer día se asume que la cáscara de piña contribuye a incrementar la constante de velocidad de crecimiento específica y la concentración de biomasa máxima. El comportamiento reológico en estado estacionario mostró ser un fluido Herschel-Blukley ya que representa a un comportamiento no-Newtoniano con características dilatantes. Los caldos de fermentación se comportaron como una solución de partículas esféricas diluidas ajustándose al modelo de Einstein, μ_r tiene un valor promedio de 1.6 Pa s

Mientras que la caracterización fisicoquímica mostró un alto contenido de proteínas, humedad y un pH ácido con un porcentaje de acidez del 3%. La caracterización mecánica mostró un espesor promedio de la biopelícula obtenida de 1mm. Y los análisis reológicos en estado dinámico demostraron que la biopelícula de tibicos predominó la zona elástica lo que favorece su aplicación como material de embalaje.

Es necesario realizar investigaciones sobre este tipo de material de biopelículas a partir de tibicos para mejorar las propiedades de barrera, asegurar la integridad de las propiedades de los alimentos, incorporar un etiquetado inteligente, para brindar al consumidor la posibilidad de tener información más detallada sobre el producto que el sistema actual. El uso de tales biopelículas abrirá beneficios económicos potenciales para los agricultores y los procesadores agrícolas deberían adoptar técnicas innovadoras para preservar la inocuidad de los alimentos y la integridad

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

estructural-nutricional, así como una biodegradabilidad completa. Finalmente, el bio-envasado es un nicho de mercado y ese será nuestro futuro.

Para el seguimiento del proyecto, se recomienda explorar alternativas para seguir generando conocimiento nuevo que permita contribuir a la mitigación del uso de los recursos fósiles, algunas de las alternativas que se recomiendan son la polimerización para mejorar las propiedades mecánicas, el estudio de micrografías para ver si la biopelícula es porosa y observar su aplicación en la microfiltración, así como optimizar y validar en equipo escala piloto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguilar-Méndez, M. A. 2005. Propiedades físicas y mecánicas de películas biodegradables y su empleo en el recubrimiento de frutos de aguacate. Tesis de grado. Maestría en Tecnología Avanzada. I.P.N, Ciudad de México D.F, México.
2. Ahmed, S., & Ikram, S. (2016). Chitosan and gelatin based biodegradable packaging films with UV-light protection. *JPB*. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.08.023>
3. Andreuccetti, C., Carvalho, R. A., Grosso, C. R. F. 2009. Effect of hydrophobic plasticizers on functional properties of gelatin-based films. *Food Research International*, 42:1113-1121. doi: 10.1016/j.foodres.2009.05.010
4. Atkinson, B. 1986. Reactores bioquímicos. Editorial Reverte, España
5. Atkins, P. 2007. Las moléculas de Atkins, Editions Akal. ISBN 9788446022541
6. ASTM D882-09 (2009) Standards. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. In Annual book of ASTM standards. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
7. ASTM D882-91 Propiedades de Tensión en Laminas Plásticas Delgadas.
8. ASTM D 882-95 (1995b). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
9. Balabanova, T., Panayotov, P. 2011. Obtaining functional fermented beverages by using the *Kefir* grains. *Procedia Food Science*, 1: 1653-1659. doi: 10.1016/j.profoo.2011.09.244
10. Bamidele, O. P. and Fasogbon, M.B. 2017. Chemical and antioxidant properties of snake tomato (*Trichosanthes cucumerina*) juice and pineapple (*Ananas comosus*) juice blends and their changes during storage. *Food Chemistry*. 220, 184-189. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.013>
11. Bird, R.B., Stewart, E. W., Lightfoot, N. E. 2006. Fenómenos de transporte. Editorial LIMUSA, México. pp. 11, 16, 286-287
12. Cantú-Lozano, D., Gutiérrez-Basilio, C., Gaziola-De la Torre, L. 2015. Temperature and concentration effect on rheological behavior of Chitosan dissolutions. VII, Brazilian, Conference on Rheology, BCR, Brazil.
13. Cao, N., Yang, X., Fu, Y. 2009. Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films. *Food Hydrocolloids*, 23: 729-735. doi: 10.1016/j.foodhyd.2008.07.0

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

14. Caro Velez, C. A., & León Peláez, Á. M. (2015). Capacidad antifúngica de sobrenadantes libres de células obtenidos de la fermentación de un sustrato de “panela” con gránulos de kefir de agua. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2), 22–32. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n2.42758>.
15. Carreau, P. J., Cotton, F., Citerne, G.P., Moan, M. 2002. Rheological Properties of Concentrated Suspensions: Applications to Foodstuffs. En: *Engineering and Food for the 21st Century*. Pp. 327-345. CRC Press, Nueva York. ISBN: 978-1-56676-963-1 ISBN: 978-1-4200-1016-9 DOI: 10.1201/9781420010169.ch20
16. Chan, S. L., Tan, P. Y., Halim, A. A., Ong, S.-T. 2016. Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies of a new potential biosorbent for the removal of basic blue 3 congo red dyes: Pineapple (*Ananas comosus*) plant stem. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 1-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtice.2016.01.010>
17. Conesa, C., Seguí, L., Laguarda-Miró, N., Fito, P. 2016. Microwaves as a pretreatment for enhancing enzymatic hydrolysis of pineapple industrial waste for bioethanol production. *Food and Bioproducts Processing*. 100, 203-213. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.fbp.2016.07.001>
18. Corona, O., Randazzo, W., Alessandro, M., Guarcello, R., Nicola, F., Erten, H., Moschetti, G., Settanni, L. 2016. Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. *LWT- Food Science and Technology*. doi10.1016/j.lwt.2015.11.014
19. Cruz-Morfin, R., Martínez-Tenorio, Y., y López-Malo Vigil, A. 2013. Biopolímeros y su integración como polímeros convencionales como alternativa de empaque de alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 2, 42-45.
20. Dai, H. and Huang, H. 2016. Modified pineapple peel cellulose hydrogels embedded whit sepia ink for effective removal of methylene blue. *Carbohydrate Polymers*. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.carbpol.2016.04.040>
21. Espinoza, C, P., Pincay, P, S. 2012. Elaboración de una bebida probiótica con cultivos de tíficos. Tesis de licenciatura. Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería Química. Universidad de Guayaquil. Colombia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

22. Ferreira, Z, D., Abatemaco, J, M., de Cicco, S, S., Nicoli, J, R., Cantini, N, A., Neumann, E. 2014. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian *Kefir* grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe*, 1:1-7 <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.12.007>
23. Frias, C., Ize, I, A., Gavilan, A. 2003. La situación de los envases de plástico en México. *Gaceta Ecológica* 69: 67-82.
24. Garcia C, R., Mendoza, M, A. M.. 2010. Estudio de las propiedades morfológicas y reológicas de una red híbrida de polímeros sintetizada a partir de tres biopolímeros: gelatina/quitosan/dextran . *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 11(2): 88-109.
25. Gere, J., Barry Goodno, P. D. Cardenas, J. 2009. Mecánica de Materiales. Cengage Learning Latin American **ISBN-10:** 9708300403 **ISBN-13:** 978-9708300407
26. Góngora, P, J. P. 2014. La industria del plástico en México y el mundo. *Comercio Exterior*, 64(5): 6-9.
27. Gonzáles, C, R. E., Urbina, N. A., Moron A, L. 2015. Caracterización Viscoelástica de Biopelículas Obtenidas a Base de Mezclas Binarias . *Información Tecnológica*, 26(3): 71-76.
28. González-Linares, J. I., Medina-Vivanco, M. L., Garay-Montes, R., & Mendieta-Taboada, O. W. (2017). Desarrollo de películas comestibles a partir de proteínas extraídas de la torta de sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.). *Informacion Tecnologica*, 28(5), 115–130. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000500013>
29. Gulitz, A., Stadie, J., Ehrmann, A.M., Ludwig, W., Vogel, F.R. 2013. Comparative phylobiomic analysis of the bacterial community of water kefir by 16S rRNA gene amplicon sequencing and ARDRa analysys. *Journal of Applied Microbiology*. 114, 1082-1091. doi:10.1111/jam.12124
30. Gulitz, A., Stadie, J., Wenning, M., Ehrmann, A. M., Vogel, F. R. 2011. The microbial diversity of water kefir. *International Journal of Food Microbiology*. 151,284-288. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.016
31. Hajar, O. S. 2014. Bio-nanocomposite materials for food packagin applications: Types of biopolymer and nano-sized filler. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 2, 296-303. doi: 10.1016/j.aaspro.2014.11.042

32. Hameed, B., Foo, K. 2012. Porous structure and adsorptive properties of pineapple peel based activated carbons prepared via microwave assisted KOH and K₂CO₃ activation. *Microporous and Mesoporous Materials*. 148, 191-195. doi: 10.1016/j.micromeso.2011.08.005
33. Heldman, D. and Lund, D. 2007. Handbook of Food Engineering. Segunda edición. Editorial CRC Press. E.U.A. ISBN-13:978-0-8247-5331-3, ISBN-10: 0-8247-5331-3
34. Hernandez-Espinosa, J., Linares-Bravo, P. 2015. Obtencion y caracterizacion de una biopelícula a partir de tibicos. Tesis de licenciatura. Ingeniería Química. Instituto Tecnológico de Orizaba. Orizaba, Veracruz, Mexico.
35. Imandi, B. S., Ratnam, B. V. V., Rao, S. S., Ramalakshmi, B. S., Rao, G. H. 2008. Application of statistical experimental designs for the optimization of médium constituents for the production of citric acid pineapple waste. *Bioresource Technology*.99, 4445-4450. doi: 10.1016/j.biortech.2007.08.071
36. Jimenez-Bustamante, J. M. 2014. Aprovechamiento de residuos celulósicos de piña para la producción de carbón activado. Tesis de Experiencia Recepcional. Ingeniería Ambiental. Xalapa, Veracruz, Mexico.
37. Jurado, P, L., Mutuberria, J, F., Oliver, N., Charandia, R., Brühl, S, P., Garcia, M, C.2003. Diseño de un proceso de aprovechamiento integral de residuos agroindustriales. *Jornadas sam/ Conamet/ Simposio Materia*, 17(2): 1118-1121
38. Lehninger, A, D, M. Cox, M. 2009. Lehninger Principios de Bioquímica. Omega. Quinta edición, Spain. ISBN 978-84-282-1486-5
39. Leite, A.M.O., Leite, D.C.A. Del Aguila, E.E., Alvares, T.S., Peixoto, R.S., Miguel, M.A.L., Silva, J.T., Paschoalin, V.M.F. 2012 Microbiological and chemical characteristics of Brazilian *Kefir* during fermentation and storage processes.
40. López-Ávila L.G., 2016. Impacto y reología de hidrocoloides en el proceso de producción de bioetanol a partir de melaza. Tesis de Maestría, Instituto Tecnológico de Orizaba, Orizaba, Veracruz, México.
41. Lukasik, K. V., Ludchester, R. D. 2006. Molecular mobility in water and glycerol plasticized cold- and hot-cast gelatin films. *Food Hydrocolloids* 20: 96-105 American Dairy Science Association, 96: 4149-4159 doi:10.1016/j.foodhyd.2005.03.007

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

42. Malathy, A. N., Santhosh, K. S., Udaykumar, N. 2014. Recent trends of Biodegradable polymer: Biodegradable films for Food Packaging and application of Nanotechnology in Biodegradable Food Packaging. *Current Trends in Technology and Science*, 3 (2):73-79.
43. Martins, J. T., Cerqueira, M. A., & Vicente, A. A. (2012). Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.06.011>
44. Mathews, C., van Holde, K., Appling, D. y Cahill, A. 2012. Biochemistry. Cuarta edición. Prentice Hall. E.U.A.
45. McNeil and Harvey, M. L. (2008). Practical fermentation Technology. John Wiley & Sons, Ltd. England.
46. Miao, J., Gua, H., Ou, Y., Liu, G., Fang, X., Liao, Z., Ke, C., Chen, Y., Zhao, L., Cao, Y. 2014. Purification and characterization of bacteriocin F1, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* sub sp. *Tolerans* FX-6 from Tibetan kefir, a traditional fermented milk from Tibet, China. *Food Control*. 42; 48-53 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.041>
47. Monar, M., Dávalos, I., Zapata, S., Caviedes, M., Ramírez, C, L. 2014. Chemical and microbiological characterization of ecuadorian homemade whater Kefir. *Avances en ciencias e Ingenierías*, 6(1): 860-866.
48. Moraes-Crizel, T., Hass-Costa, T. M., de Oliveira-Rios, A., Hickmann-Flóres, S. 2016. Valorization of food-grade industrial waste in the obtaining active biodegradable films for packaging. *Industrial Crops and Products*, 87: 218-228. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.039>
49. Moura, de P, I., da Silva, S, R., Silva, L, I., de Sousa, F, E. M., Oliveira, M, T., Valenzuela, B, M. J., Robert, N, J., Cantini, N, Á., Neumann, E. 2016. *Lactobacillus kefiranoferiens* and *Lactobacillus satsumensis* isolated from Brazilian kefir grains produce alpha-glucans that are potentially suitable for food applications. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 390-398. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.010>

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

50. Moya, P, M., Sibaja, B, M., Durán, C, M., Vega, B, J. 1995. Obtencion potencial de polimeros biodegradables estudio de la disolucion de la cáscara de piña en PEG. *Uniciencia*, 12: 39-43
51. Namsree, P., Suvajittanont, W., Puttanlek, Ch., Uttapap, D., Rungsardthong, V. 2012. Anaerobic digestion of pineapple pulp and peel in a plug-flow reactor. *Journal of enviromental Management*. 110, 40-47. doi:10.1016/j.jenvman.2012.05.017
52. Nikolaou, A., Galanis, A., Kanellaki, M., Tassou, C., Akrida-Demertzi, K., Kourkoutas, Y. 2016. Assessment of free and ammobilized kefir culture in simultaneous alcoholic and malolactic cider fermentations. *LWT- Food Science and Technology*. 76, 67-78 <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.034>
53. NMX-F-066-S-1978. Determinación de cenizas en alimentos. foodstuff determination of ashes. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
54. NMX-F-068-S-1980. Alimentos. Determinación de proteínas. foods. determination of proteins. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
55. NMX-F-083-1986. Alimentos. Determinación de humedad en productos alimenticios. foods. moisture in food products determination. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
56. NMX-F-089-S-1978. Determinación de extracto etéreo (método soxhlet) en alimentos. foodstuff-determination of ether extract (soxhlet). Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
57. NMX-F-090-S-1978. Determinación de fibra cruda en alimentos. Foodstuff determination of crude fiber. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas
58. NMX-F-102-1978. Determinación de la acidez titulable en productos elaborados a partir de frutas y hortalizas. Norma Mexicana. Dirección General de Normas.
59. NMX-F-217-1975. Determinación de dextrosa equivalente en glucosa de maíz. Determination of equivalent dextrose on corn glucose. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
60. NMX-F-317-S-1978. Determinación de pH en alimentos. Determination of pH in foods. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

61. Oropeza-De la Rosa, E., López-Ávila, L. G., Luna-Solano, G., Cantú-Lozano, D. 2017. Bioethanol production process rheology. *Industrial Crops and Products*. **106**: 59-64, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.051>
62. Peter, M., Ganesh, N., Selvamurugan, N., Nair, S. V., Furuike, T., Tamura, H., & Jayakumar, R. 2010. Preparation and characterization of chitosan-gelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, **80**(3), 687–694. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.11.050>
63. Plastics Europe. 2015. Plastics – the Facts. An analysis of European plastics production, demand and waste data. Available online (21st June 2016) at: http://www.plasticseurope.org/documents/document/20151216062602plastics_the_facts_20*15_final_30pages_14122015.pdf
64. Quesada, S. K., Alvarado, A. P., Sibaja, B. R., Vega, B. J., 2005. Utilización de las fibras del rastrojo de piña (*ananas comosus*, variedad *champaka*) como materias de refuerzo en resinas de poliéster. *Revista Iberoamericana de Polimeros*, **6** (2): 157-179
65. Ramírez, A. K., Rojas, C. Ó., Alvarado, A. P., Vega, B. J. 2012. Xylose from lignocellulosic waste in the production and industrial processing of pineapple (*ananas comosus*). *Uniciencia*, **26**: 75-89
66. Rao, G. D. 2016. Biorreactors and fermentation. En: Introduction to biochemical engineering. Editorial Mc Graw hill. United States.
67. Rivero, S., Garcia, M. A., Pinotti, A. 2009. Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **11**: 369-375. doi: 10.1016/j.ifset.2009.07.005
68. Roda, A., De Faveri, D. M., Giacosa, S., Dordoni, R., Lambri, M. 2015. Effect of pre-treatments on the saccharification of pineapple waste as a potential source for vinegar production. *Journal of Cleaner Production*. **xxx**, 1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.07.019>
69. Rodríguez, K. L., Araújo, T. H., Schneedorf, J. M., Ferreira, C. de S., Moraes, G. de O., Coimbra, R. S., Rodrigues, M. R. 2016. A novel beer fermented by kefir

- enchances anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities found isolated in its constituents. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.035>
70. Rühls, P. A., Böcker, L., Inglis, R. F., & Fischer, P. (2014). Studying bacterial hydrophobicity and biofilm formation at liquid-liquid interfaces through interfacial rheology and pendant drop tensiometry. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 117, 174–184. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.02.023>
71. Sheng, Y, W., Kun, N, C., Yung, M, L., Ming, L, C., Hsi, Chia, c., Je, R, L., M, J, C. 2012. Investigation of microorganisms involved in byosynthesis of the Kefir grain. *Food Microbiology*, 32: 274-285 <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2012.07.001>
72. Shakeel, A., Saika, I. 2016. Chitosan and gelatin based biodegradable packaging films with UV-light. *Photochemistry and Photobiology*. IN PRESS
73. SIAP, 2012. Servicio de información agroalimentaria y pesquera SAGARPA. Consultado en línea. <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
74. Silva-Weiss, A., Bifani, V., Ihl, M., Sobral, P. J. A., & Gómez-Guillén, M. C. (2013). Structural properties of films and rheology of film-forming solutions based on chitosan and chitosan-starch blend enriched with murta leaf extract. *Food Hydrocolloids*, 31(2), 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.028>
75. Silva, K. R., Rodrigues, S. A., Filho, L. X., & Lima, Á. S. (2009). Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 152(2), 316–325. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8303-3>
76. Siracusa, V., Rocculi, P., Romani, S., Rosa, M.D. 2008. Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 19, 634-643. doi:10.1016/j.tifs.2008.07.003
77. Stadie, J., Gulitz, A., Ehrmann, M, A., Vogel, R, F. 2013. Metabolic activity and symbiotic interaction of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water *Kefir*. *Food Microbiology*, 35: 92-98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.03.009>
78. Sukan, A., Roy, I., and Keshavarz, T. 2015. Dual production of biopolymers from bacteria. *Carbohydrate Polymers*. 03, 001. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.carbpol.2015.03.001>

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

79. Tharanathan, R. N. 2003. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future Trends in Food Science & Technology, 14: 71–78. doi:10.1016/S0924-2244(02)00280-7
80. UNEP. 2016. “At UN Environment Assembly Convening in Nairobi: Governments Agree to 25 Landmark Resolutions to Drive Sustainability Agenda and Paris Climate Agreement”, 28th May. Available at: <http://www.unep.org/newscentre/Default.aspx?DocumentID=27074&ArticleID=36197&l=en>
81. Van Cauwenberghe, L. and Janssen, C.R. 2014. Microplastics in bivalves cultured for human consumption, Environmental Pollution, 193, pp. 65-70.
82. Vega, B, J., Alvarado, A, P., Sibaja, B, R., Moya, P, M., NikilaeV, N, S. 2005. Obtención y caracterización de disoluciones en polietilenglicol (PEG) a partir de residuos de olote de la agroindustria del maíz síntesis de polímeros potencialmente biodegradables. Revista Iberoamericana de Polímeros, 6 (3): 199-212
83. Wang, S., Chen, K., Lo, Y., Chiang, M., Chen, H., Liu, J., & Chen, M. (2012). Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the ke fi r grain. *Food Microbiology*, 32(2), 274–285. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.07.001>
84. Zain, N., Seker, D. 2014. Response surface optimization of glucose production from liquid pineapple waste using immobilized invertase in PVA-alginate-sulfate beads. *Separation and Purification Technology*. 133,48-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2014.06.018>
85. Zamudio, F, P. B., García, A, L. E., Ramos, M, A., Tirado, G, J. M., Bello, P, L. A., Salgado D, R. 2013. Soluciones formadoras de película a base de almidón oxidado de avena mezcladas con quitosano: Caracterización reológica y propiedades mecánicas de sus películas . Revista Iberoamericana de Polímeros , 14(6): 293-304.