



EDUCACIÓN

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Orizaba

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCIÓN I.- TESIS

TRABAJO PROFESIONAL

**“USO DE ESPECIES PROBIÓTICAS PARA
LA BIOTRANSFORMACIÓN DE RESIDUOS DE
MAÍZ BLANCO (*Zea Mays L.*) EN PRODUCTOS
CON POTENCIAL ALIMENTICIO”.**

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

PRESENTA:

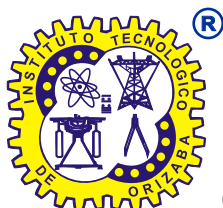
I.Q. Nohemí Sánchez Valeriano

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Juan Manuel Méndez Contreras

CODIRECTOR DE TESIS:

Dr. Eduardo Hernández Aguilar



ORIZABA, VERACRUZ, MÉXICO.

SEPTIEMBRE 2022



Orizaba, Veracruz, **14/septiembre/2022**

Dependencia: **División de Estudios de
Posgrado e Investigación**

Asunto: **Autorización de Impresión**
OPCION: I

C. NOHEMÍ SÁNCHEZ VALERIANO

Candidato(a) a Grado de Maestro en:

CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

P R E S E N T E.-

De acuerdo con el Reglamento de Titulación vigente de los Centros e Institutos Tecnológicos Federales del Tecnológico Nacional de México, de la Secretaría de Educación Pública, y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo respecto a su Trabajo Profesional titulado:

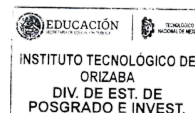
"Uso de especies probióticas para la biotransformación de residuos de Maíz Blanco (Zea Mays L.) en productos con potencial alimenticio".

Comunico a Usted que este Departamento concede su autorización para que proceda a la impresión del mismo.

A T E N T A M E N T E

Excelencia en Educación Tecnológica®
CIENCIA – TÉCNICA - CULTURA®

Dr. MARIO LEONCIO ARRIOLA RODRÍGUEZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



OG-13-F06





Orizaba, Veracruz, **19/agosto/2022**
Asunto: **Revisión de trabajo escrito**

C. MARIO LEONCIO ARRIJOJA RODRÍGUEZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
P R E S E N T E.-

Los que suscriben, miembros del jurado, han realizado la revisión de la Tesis del (Ia) C.

NOHEMÍ SÁNCHEZ VALERIANO

La cual lleva el título de:

**USO DE ESPECIES PROBIÓTICAS PARA LA BIOTRANSFORMACIÓN DE RESIDUOS DE
MAÍZ BLANCO (*Zea Mays L.*) EN PRODUCTOS CON POTENCIAL ALIMENTICIO.**

Y concluyen que se acepta.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
CIENCIA – TÉCNICA - CULTURA®

PRESIDENTE: DR. JUAN MANUEL MÉNDEZ CONTRERAS

FIRMA

SECRETARIO: DR. ALEJANDRO ALVARADO LASSMAN

FIRMA

VOCAL: MIQ. NORMA ALEJANDRA VALLEJO CANTÚ

FIRMA

VOCAL SUP.: DR. EDUARDO HERNÁNDEZ AGUILAR

FIRMA

TA-09-18



Declaración de originalidad y cesión de derechos

Orizaba, Veracruz, el día 20 del mes de septiembre del año 2022.

El(la) que suscribe

C. Nohemí Sánchez Valeriano

Declaro que esta tesis, que tiene una extensión de 103 cuartillas, ha sido escrita por mí y constituye el registro escrito del trabajo de la tesis titulada

“Uso de especies probióticas para la biotransformación de residuos de maíz blanco (*Zea Mays L.*) en productos con potencial alimenticio”

del programa: Maestría en Ciencias en Ingeniería Química bajo la asesoría y dirección del (la) Dr. Juan Manuel Méndez Contreras y Dr. Eduardo Hernández Aguilar no ha sido sometida en ninguna otra institución previamente.

Todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal y, en los casos que así lo requieran, cuento con las debidas autorizaciones de quienes poseen los derechos patrimoniales. Por lo tanto, me hago responsable de cualquier litigio o reclamación relacionada con derechos de propiedad intelectual, exonerando de toda responsabilidad al Tecnológico Nacional de México campus Orizaba.

También declaro que, al presentar esta tesis, cedo los derechos del trabajo al Tecnológico Nacional de México campus Orizaba para su difusión, con fines académicos y de investigación, bajo las regulaciones propias de la institución y que si existe algún acuerdo de confidencialidad de la información lo haré saber en forma escrita para que se omitan las secciones correspondientes.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y del director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: depi_orizaba@tecnm.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente de este.



Nohemí Sánchez Valeriano

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Jacinto y Rosalía, por todo el apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida, por motivarme siempre a continuar con mis estudios y a no rendirme en los momentos difíciles. Los quiero y los admiro mucho.

A mi hermana pequeña Rosalía, por ser siempre mi pilar, confidente y consejera. Gracias por tus palabras de aliento, por tu sincera compañía y por nunca dejarme sola.

A mis hermanos mayores Lupe, Fer, Beto y David, quienes me han acompañado y apoyado, en todos los aspectos, en cada una de mis decisiones y logros.

A mis amigos del posgrado Mariela, Ruby y Luis Pablo, por brindarme su sincera amistad y por todos los gratos momentos que pasamos en el laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio Roger, Mercedes, Mandi y José Manuel, por los ratos de sana convivencia.

Al M.C. Joaquín, por las asesorías y apreciable participación en la realización de esta tesis.

Al Dr. Juan Manuel Méndez Contreras por permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

RECONOCIMIENTOS

Al Dr. Juan Manuel Méndez Contreras, por la asesoría y seguimiento para la realización y término de este tema de tesis.

Al Dr. Eduardo Hernández Aguilar, por brindarme su apoyo y colaboración a lo largo de mi experimentación.

Al Dr. Alejandro Alvarado Lassman y a la M. I. Q. Norma Alejandra Vallejo Cantú, por sus aportaciones y sugerencias para el cumplimiento de mi tesis.

A la Dra. Ofelia Landeta Escamilla, por su apoyo en el proceso de titulación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con número 1078144.

RESUMEN

Uso de especies probióticas para la biotransformación de residuos de Maíz Blanco (*Zea Mays L.*) en productos con potencial alimenticio.

Elaborador por: I.Q. Nohemí Sanchez Valeriano

Dirigido por: Dr. Juan Manuel Méndez Contreras

Dr. Eduardo Hernández Aguilar

El olote es el residuo generado de la separación del grano de la mazorca y debido a sus componentes es considerado un material lignocelulósico por lo que su utilización es limitada, lo que propicia la quema de olote y el esparcimiento de los mismos generando así un problema de contaminación ambiental. Los probióticos son microorganismos vivos que cuando se suministran en cantidades adecuadas brindan un efecto beneficioso hacia el huésped, además de que tienen la capacidad de disminuir el contenido de carbohidratos en materiales lignocelulósicos a través del proceso de fermentación obteniendo un producto rico en nutrientes. Se realizaron cinéticas de fermentación utilizando tres bacterias probióticas (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus acidophilus*) en diferentes concentraciones (5, 10 y 15 % v/v) para la obtención de parámetros cinéticos de biotransformación de residuos de maíz blanco (*Zea Mays L.*). Se realizó una comparación del consumo de sustrato, la producción de ácido láctico (AL) y biomasa para cada experimento. La bacteria *Bacillus subtilis* con 5 % de inóculo y *Lactobacillus fermentum* y *acidophilus* con 10% de inóculo presentan velocidades de reacción más rápidas y por tanto un consumo acelerado del sustrato, en comparación con las demás dosis. La producción de biomasa es superior al emplear el inóculo de 15 %, siendo la concentración más alta 62.02 g/L generada por *Lactobacillus fermentum*, seguida de *Lactobacillus acidophilus* (30.81 g/L) y finalmente *Bacillus subtilis* (25.86 g/L). La biomasa generada tiene potencial para ser utilizada como alimento funcional para ganado debido al contenido proteico obtenido después de la fermentación probiótica, agregando así valor a los residuos de maíz.

ABSTRACT

Use of probiotic species for the biotransformation of residues of White Corn (*Zea Mays L.*) in products with food potential

By: I.Q. Nohemí Sánchez Valeriano

Advisor: Dr. Juan Manuel Méndez Contreras

Dr. Eduardo Hernández Aguilar

The cob is the residue generated from separating the grain from the cob. Due to its components, it is considered a lignocellulosic material, so its use is limited, favoring the burning of the cob and spreading, thus producing a problem of environmental pollution. Probiotics are live microorganisms that, when supplied in adequate amounts, provide an improvement effect on the host, in addition to reducing the carbohydrate content in lignocellulosic materials through the fermentation process, obtaining a product rich in nutrients. Fermentation kinetics were performed using three probiotic bacteria (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus fermentum*, and *Lactobacillus acidophilus*) at different concentrations (5, 10, and 15% v/v) to obtain kinetic parameters of biotransformation of white corn residues (*Zea Mays L.*). A comparison of substrate consumption, lactic acid production, and biomass was made for each experiment. *Bacillus subtilis* bacteria with 5% inoculum and *Lactobacillus fermentum* and *acidophilus* with 10% inoculum show faster reaction speeds and, therefore, an accelerated substrate consumption compared to the other doses. Biomass production is higher when using the 15% inoculum, with the highest concentration being 62.02 g/L produced by *Lactobacillus fermentum*, followed by *Lactobacillus acidophilus* (30.81 g/L) and finally *Bacillus subtilis* (25.86 g/L). The generated has the potential to be used as functional feed for cattle due to the protein content obtained after probiotic fermentation, thus adding value to corn residues.

ÍNDICE

RESUMEN	iii
ABSTRACT.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABLAS	xi
NOMENCLATURA.....	xiii
INTRODUCCIÓN	14
OBJETIVO GENERAL.....	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	18
1.1 Residuos agroindustriales	18
1.1.1 Residuos agroindustriales en México	19
1.1.2 Residuos de maíz blanco (<i>Zea Mays L.</i>)	21
1.1.3 Impacto ambiental de los residuos agroindustriales	22
1.1.4 Tratamiento de residuos agroindustriales.....	23
1.2 Proceso fermentativo	27
1.3 Bacterias probióticas.....	29
1.3.1 Condiciones de propagación de bacterias probióticas.....	30
1.3.2 Mecanismos de acción de los probióticos	31
1.3.3 Actividad probiótica en animales	32
1.3.4 Bacterias ácido-lácticas	35
1.3.5 <i>L. acidophilus</i>	37
1.3.6 <i>L. fermentum</i>	37
1.3.7 <i>Bacillus subtilis</i>	38

1.4	Crecimiento bacteriano	38
1.5	Modelo de Hom.....	40
1.6	Probióticos presentes en alimentos	41
1.6.1	Alimento funcional.....	45
1.7	Estudios previos	46
CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS		52
2.1	Metodología experimental.....	52
2.2	Obtención y acondicionamiento de los residuos de maíz blanco	52
2.3	Caracterización de los residuos de maíz	53
2.3.1	Determinación de pH	54
2.3.2	Determinación de ST	54
2.3.3	Determinación de STV	54
2.3.4	Determinación de nitrógeno total	55
2.3.5	Determinación de proteínas	56
2.3.6	Determinación de carbohidratos	56
2.3.7	Determinación de coliformes fecales	57
2.3.8	Determinación de <i>salmonella spp</i>	57
2.4	Tratamiento térmico de los residuos de maíz.....	58
2.5	Obtención y propagación de la bacteria probiótica <i>Lactobacillus acidophilus</i> 58	
2.6	Obtención y propagación de la bacteria probiótica <i>Lactobacillus fermentum</i> 59	
2.7	Obtención y propagación de la bacteria probiótica <i>Bacillus subtilis</i>	60
2.8	Determinación de los parámetros cinéticos de <i>L. acidophilus</i> , <i>L. fermentum</i> y <i>Bacillus subtilis</i> para la biotransformación de residuos de maíz blanco.	61
2.8.1	Proceso fermentativo	61

2.8.2 Determinación de biomasa	61
2.8.3 Determinación de ácido láctico (AL)	61
2.8.4 Conteo celular	62
2.8.5 Consumo de sustrato	62
2.9 Diseño experimental	63
2.10 Calidad de la biomasa obtenida	64
CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
3.1 Caracterización física, química y microbiológica de residuos de maíz.....	66
3.2 Obtención y propagación de bacterias probióticas <i>L. fermentum</i> , <i>L. acidophilus</i> y <i>Bacillus subtilis</i>	68
3.3 Producción y rendimiento de biomasa	69
3.3.1 <i>Bacillus subtilis</i>	69
3.3.2 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	69
3.3.4 <i>Lactobacillus fermentum</i>	70
3.4 Producción y rendimiento de ácido láctico	70
3.4.1 <i>Bacillus subtilis</i>	70
3.4.2 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	71
3.4.3 <i>Lactobacillus fermentum</i>	72
3.5 Cinética microbiana de bacterias probióticas en residuos de maíz.....	73
3.5.1 <i>Bacillus subtilis</i>	73
3.5.2 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	75
3.5.3 <i>Lactobacillus fermentum</i>	75
3.6 Consumo de carbohidratos a través del modelo de Hom	76
3.6.1 <i>Bacillus subtilis</i>	77
3.6.2 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	78

3.6.3 <i>Lactobacillus fermentum</i>	79
3.7 Calidad de la biomasa obtenida	80
3.7.1 <i>Bacillus subtilis</i>	80
3.7.2 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	81
3.7.3 <i>Lactobacillus fermentum</i>	82
3.8 Análisis de varianza	83
CONCLUSIONES	86
RECOMENDACIONES	88
ANEXO A	90
ANEXO B	92
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

LISTA DE FIGURAS

Figura	Nombre	Página
1.1	Rutas para la obtención de ácido láctico a partir de BAL.	28
1.2	Ruta de fermentación de glucosa por acción de bacterias homofermentadoras.	36
1.3	Ruta de fermentación de glucosa por acción de bacterias heterofermentadoras.	36
1.4	<i>Lactobacillus acidophilus</i> .	37
1.5	Curva del crecimiento bacteriano.	40
2.1	Diagrama general de la metodología a seguir.	52
2.2	Olote de maíz blanco.	53
2.3	Medicamento comercial con <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	59
2.4	Cepa pura de <i>Lactobacillus fermentum</i> .	60
2.5	Fungicida agrícola con <i>Bacillus subtilis</i> .	60
3.1	A) <i>Bacillus subtilis</i> , B) <i>L. acidophilus</i> , C) <i>L. fermentum</i> .	68
3.2	Producción de ácido láctico con <i>Bacillus subtilis</i> .	71
3.3	Producción de ácido láctico con <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	72
3.4	Producción de ácido láctico con <i>Lactobacillus fermentum</i> .	73
3.5	Cinética microbiana de la especie <i>Bacillus subtilis</i> .	74
3.6	Crecimiento microbiano de la especie <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	75
3.7	Cinética microbiana de la especie <i>Lactobacillus fermentum</i> .	76
3.8	Consumo de sustrato a través del modelo de Hom con <i>Bacillus subtilis</i> .	77
3.9	Consumo de sustrato a través del modelo de Hom con <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	78
3.10	Consumo de sustrato a través del modelo de Hom con <i>Lactobacillus fermentum</i> .	79

3.11	Análisis de varianza siendo la variable de respuesta la cantidad de carbohidratos consumidos. A) Diagrama de Pareto, B) Gráfica de efectos principales.	83
3.12	Análisis de varianza siendo la variable de respuesta la cantidad de carbohidratos consumidos. A) Diagrama de Pareto, B) Gráfica de efectos principales.	84

LISTA DE TABLAS

Tabla	Nombre	Página
1.1	Materias primas de biomasa lignocelulósica disponibles para fines energéticos.	20
1.2	Comparación de composición de olote de maíz reportado por otros autores.	22
1.3	Microorganismos aprobados para su uso en alimento para animales	33
1.4	Comparación de parámetros cinéticos obtenidos a través del modelo de Hom	41
1.5	Ejemplos de formulaciones probióticas para la nutrición de ganado	43
2.1	Parámetros para la caracterización de residuos de maíz blanco.	53
2.2	Diseño experimental.	63
2.3	Parámetros para la caracterización de biomasa	64
3.1	Caracterización física, química y microbiológica de residuos de maíz.	66
3.2	Producción y rendimiento de biomasa utilizando <i>Bacillus subtilis</i> .	69
3.3	Producción y rendimiento de biomasa utilizando <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	70
3.4	Producción y rendimiento de biomasa utilizando <i>Lactobacillus fermentum</i> .	70
3.5	Parámetros cinéticos del consumo de carbohidratos con <i>Bacillus subtilis</i> .	78
3.6	Parámetros cinéticos del consumo de carbohidratos con <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	79
3.7	Parámetros cinéticos del consumo de carbohidratos con <i>Lactobacillus fermentum</i> .	80

3.8	Caracterización de biomasa de <i>Bacillus subtilis</i> .	81
3.9	Caracterización de biomasa de <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	82
3.10	Caracterización de biomasa de <i>Lactobacillus fermentum</i> .	82

NOMENCLATURA

Símbolo	Significado	Unidades
pH	Potencial de hidrógeno	[-]
C/N	Relación carbono-nitrógeno	[-]
BAL	<i>Bacterias ácido-lácticas</i>	[-]
ST	Sólidos totales	% m/m
STV	Sólidos totales volátiles	% m/m
NMP	Número más probable	[-]
UFC	Unidades formadoras de colonia	[-]
AN	Agar nutritivo	[-]
AL	Ácido láctico	[-]
MRS	Mar, Rogosa y Sharp	[-]
PDA	Agar Papa Dextrosa	[-]
PCA	Agar Plate Count	[-]

INTRODUCCIÓN

La agroindustria es la actividad económica que combina los procesos, productivo agrícola e industrial para obtener alimentos o materias primas semielaboradas para posteriormente destinarlas al mercado. Uno de los resultados de las actividades agroindustriales es la generación de subproductos o residuos agroindustriales que son considerados un problema ambiental, ya que no son procesados o dispuestos de manera correcta. Existen tres grupos de tecnologías para el aprovechamiento de los residuos agroindustriales: 1) valorización biológica y química, 2) obtención de combustibles y 3) valorización térmica (Vargas-Corredor y Pérez-Pérez, 2018).

México es considerado como uno de los principales países productores de maíz blanco, de acuerdo con el reporte del mercado de maíz de México, en 2019 la producción nacional de maíz blanco fue de 24.2 millones de toneladas (SADER, 2019). El residuo generado de la producción de maíz es el olote, que resulta de la separación del grano de la mazorca, se estima que por cada tonelada de maíz se obtienen 170 kg de olote (Rodríguez Martínez *et al.*, 2018).

Existen diversos estudios que han demostrado el uso de probióticos para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales (Valdovinos *et al.*, 2019). Los microorganismos utilizados con mayor frecuencia como probióticos son los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Enterococcus* y levaduras. Se ha demostrado que el uso de probióticos como aditivos para alimento de ganado genera diversos beneficios en la fisiología digestiva, la salud y el comportamiento productivo de los animales.

Los residuos agroindustriales funcionan como medio de cultivo para el crecimiento microbiano, de esta manera se abordan dos problemáticas fundamentales, el abastecimiento de fuentes de carbono y nitrógeno menos costosas para el desarrollo de probióticos y el aprovechamiento de residuos agroindustriales. De entre los residuos agroindustriales más utilizados como medio de cultivo son la miel,

melaza de caña de azúcar, almidón, salvado de trigo y arroz, bagazo de caña o azúcar y materiales vegetales lignocelulósicos (Sosa-Cossio *et al.*, 2018).

En el presente proyecto se propone determinar las condiciones de operación del proceso de biotransformación de olote de maíz blanco (*Zea Mays L.*) a través de una fermentación anaerobia con las bacterias probióticas *Bacillus subtilis*, *L. acidophilus* y *L. fermentum* para obtener biomasa con potencial alimenticio.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las condiciones de operación recomendables para la biotransformación de residuo de maíz blanco mediante las especies probióticas *Bacillus subtilis*, *L. acidophilus* y *L. fermentum*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar fisicoquímicamente los residuos de maíz blanco (*Zea Mays L.*).
- Propagar las especies *Bacillus subtilis*, *L. acidophilus* y *L. fermentum* a partir de productos comerciales para su utilización en la biotransformación de residuos de maíz blanco (*Zea Mays L.*).
- Determinar los parámetros cinéticos de biotransformación de residuos de maíz blanco (*Zea Mays L.*) utilizando los microorganismos probióticos *Bacillus subtilis*, *L. acidophilus* y *L. fermentum*.
- Determinar el rendimiento y la calidad de la biomasa obtenida en el proceso de biotransformación del residuo de maíz blanco (*Zea Mays L.*).

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 Residuos agroindustriales

La agroindustria es el conjunto de actividades económicas que benefician la transformación de los productos provenientes de la agricultura, la ganadería, la pesca y forestales (Mejías-Brizuela *et al.*, 2016). Uno de los resultados de las actividades agroindustriales, es la generación de subproductos o residuos agroindustriales que son considerados un problema ambiental (Vargas-Corredor y Pérez-Pérez, 2018). Estos residuos generados son el resultado de procesos físicos, químicos y biológicos en la industrialización de productos vegetales que posterior al desarrollo del proceso no tienen calidad como materia prima para la cadena de producción (Godoy-Padilla *et al.*, 2020).

A nivel mundial, la biomasa lignocelulósica representa 60 mil millones de toneladas por año, la cual se clasifica en cuatro grupos diferentes: residuos agrícolas, residuos forestales, cultivos energéticos y residuos celulósicos. La biomasa generada a partir de la agroindustria incluye porciones de cultivos alimentarios y no alimentarios. Los principales cultivos en el mundo que producen gran parte de la biomasa lignocelulósica son el trigo, el maíz, el arroz y la caña de azúcar, llegando a generar hasta 5 300 millones de toneladas de biomasa seca por año (Carrillo-Nieves *et al.*, 2018).

De acuerdo con el proceso de transformación y de la materia prima utilizada, es la composición química y biológica que presentan los residuos agroindustriales, sin embargo, estos son considerados materiales lignocelulósicos (Vargas-Corredor y Pérez-Pérez, 2018).

Cai *et al.*, (2017) se refieren a la biomasa lignocelulósica como la materia seca vegetal que está conformada en su mayoría por componentes estructurales (celulosa, hemicelulosa y lignina). Las materias primas de biomasa lignocelulósica

proviene principalmente de sectores como la agricultura, bosques e industria. En la Tabla 1.1 se muestran diferentes tipos de biomasa lignocelulósica y sus respectivos ejemplos. La celulosa es un homopolímero lineal de cadena larga de alto peso molecular, es el componente principal que conforma la pared celular de los vegetales al igual que la hemicelulosa con la diferencia de que ésta contiene cadenas ramificadas de menor grado de polimerización. La lignina es un polímero aromático con estructura tridimensional compleja, es amorfo y altamente ramificado (Flórez-Montes y Rojas-González, 2018).

1.1.1 Residuos agroindustriales en México

México es catalogado como uno de los principales países productores de residuos agroindustriales ya que está posicionado en el décimo tercer lugar a nivel mundial en producción de alimentos con 818 productos agroalimentarios, de entre los cuales 71 ocupan el primer lugar por volumen de producción. En México se generan aproximadamente 76 millones de toneladas de residuos orgánicos al año, de los cuales el 79 % son desechos primarios, es decir, que se producen durante la cosecha como hojas y tallos de maíz, tallos y vainas de sorgo, puntas y hojas de caña de azúcar, paja de trigo, paja de cebada, frijol y cascarilla de algodón. El porcentaje restante corresponde a residuos secundarios generados del procesamiento poscosecha como el bagazo de caña de azúcar, mazorcas, bagazo de maguey o agave y pulpa de café (Carrillo-Nieves *et al.*, 2018).

La agroindustria mexicana enfrenta una problemática con referencia a que no cuenta con una legislación específica que promueva la gestión y el manejo integral de los residuos desde que son generados hasta su disposición final, además de la falta de recursos económicos y capacidad tecnológica (Mejías-Brizuela *et al.*, 2016). En el estado de Veracruz se producen 65 150 toneladas al año de residuos agroindustriales, que en conjunto con los estados de Chiapas, Oaxaca y Puebla aportan 25 % de los residuos en el país (Olivera-de la Cruz *et al.*, 2019).

Tabla 1.1 Materias primas de biomasa lignocelulósica disponibles para fines energéticos
(Cai *et al.*, 2017).

Sector	Tipo	Ejemplos
Agricultura	Cultivos energéticos lignocelulósicos.	Cultivos herbáceos (pasto varilla, miscanthus, junco).
	Residuos de cultivos.	Residuos de cultivos, paja de cultivo (paja de arroz, paja de trigo, tallo de maíz, tallo de algodón).
	Cultivos energéticos de aceite, azúcar y almidón.	Semilla de colza, caña de azúcar, maíz.
Forestal	Silvicultura dedicada	Plantaciones de rotación corta (sauce, álamo, eucalipto).
	Subproductos forestales	Bloques de madera, astillas de madera de copas y ramas, astillas de madera por aclareo, troncos de raleo.
Industrial	Residuos agroindustriales lignocelulósicos	Cáscara de arroz, bagazo de caña de azúcar, maíz.
	Residuos de la industria de la madera	Madera de desecho industrial, aserrín de aserraderos
Otros	Residuos lignocelulósicos	Residuos lignocelulósicos de parques y jardines (podas, césped).

1.1.2 Residuos de maíz blanco (*Zea Mays L.*)

A diferencia de otros países en el mundo, en México la gran parte de producción de maíz corresponde a la variedad blanco ya que es utilizado principalmente para consumo humano. De manera que del total de la producción en los años 2019/2020, el 93 % corresponde a esta variedad. De acuerdo con el Reporte del Mercado de Maíz en México, la producción anual de maíz blanco en el 2019 fue de 26, 771 toneladas, siendo los principales estados productores Jalisco, Michoacán, México, Guanajuato y Chihuahua con un porcentaje de producción de 20.7 %, 10.4 %, 10.1 %, 9.3 %, 7.7 % respectivamente (SADER 2020).

El olote de maíz es considerado como un recurso no maderable que contiene grandes cantidades de xilanas, por tal motivo ha sido fuente de interés para ser utilizado como alternativa de compuestos químicos o como fuente de biomasa. El olote es el residuo generado de la separación del grano de la mazorca. Por cada tonelada de maíz se genera aproximadamente 170 kg de olote. Debido a los componentes presentes en el olote de maíz, no es considerado un material biodegradable por lo que su utilización es muy limitada. Esto propicia a la quema de olote o al esparcimiento de los residuos al ambiente provocando un problema de contaminación ambiental (Rodríguez- Martínez *et al.*, 2018).

Diversos autores han reportado que el olote de maíz es rico en compuestos como lignina y celulosa. En la Tabla 1.2 se muestran las referencias con los resultados reportados por otros autores.

Toribio *et al.*, (2019) utilizaron el método termogravimetría para la caracterización de residuos agroindustriales, entre ellos el olote de maíz. De acuerdo a su análisis, el olote contiene hemicelulosa (28.95 %), celulosa (32.02%), lignina (26.21 %), cenizas (3.46 %) y solidos volátiles (7.37%). De acuerdo con otros datos en la literatura, la hemicelulosa y la celulosa son de 30.44 % y 34.14 % respectivamente.

Tabla 1.2 Comparación de composición de olote de maíz reportado por otros autores.

Referencias	Componentes (% base seca)			
	Celulosa	Xilana	Lignina	Cenizas
Garrote <i>et al.</i> , 2007	34.3	31.1	18.8	1.30
Córdoba <i>et al.</i> , 2013	33.6	No reporta	15.8	2
Toribio <i>et al.</i> , 2019	32.02	No reporta	26.21	3.46

1.1.3 Impacto ambiental de los residuos agroindustriales

La conciencia ecológica por el manejo de residuos agroindustriales es muy precaria, la consecuencia es un efecto negativo hacia el medio ambiente provocado por el daño al suelo, agua y aire lo que conlleva a lo que se conoce como impacto ambiental (Mejías-Brizuela *et al.*, 2016).

Los residuos agroindustriales que no son dispuestos o procesados de manera adecuada, representan una fuente potencial de contaminación y riesgo para salud humana. En su mayoría, estos residuos son vertidos en rellenos sanitarios o incinerados provocando una gran cantidad de dióxido de carbono, contaminando cursos de aguas, molestias por olores desagradables, proliferación de vectores, entre otros. Debido a su composición rica en biomasa lignocelulósica, la velocidad de degradación es muy lenta, por lo que propicia a una disposición final deficiente. Si el residuo contiene carbohidratos, los microorganismos del suelo comenzarán la degradación y se producirán lixiviados que pueden infiltrarse al suelo provocando la contaminación de mantos acuíferos. Por otro lado, si la degradación es realizada por acción de bacterias anaerobias, se pueden producir olores a causa de gases como el ácido sulfhídrico y metano (Vargas-Corredor y Pérez-Pérez, 2018).

De acuerdo con Mejías Brizuela *et al.*, (2016) los efectos ambientales con mayor impacto causado por la generación de residuos son:

- Crecimiento acelerado de la polución y contaminación que generan problemas de salud, degradación del patrimonio natural, deterioro de ecosistemas y déficit de las funciones elementales de la biosfera.
- Debido a la proliferación de vectores epidémicos, se favorece el desarrollo de enfermedades infecto-contagiosas.
- Emisión de gases de efecto invernadero (dióxido de carbono, metano y dióxido de nitrógeno).
- Erosión y desertificación de suelos causado por la quema de restos de cultivos

1.1.4 Tratamiento de residuos agroindustriales

A causa del acelerado incremento de la agroindustria y a la gran extensión de suelos destinados al cultivo de productos agrícolas, la cantidad de residuos generados representa una fuente de contaminación ambiental debido a que el volumen producido rebasa la capacidad de biodegradación natural de los mismos, de manera que al acumularse generan un riesgo para el equilibrio del ecosistema, ya sea porque son colocados a cielo abierto o incinerados en terrenos sin control alguno. Por este motivo, existe el interés en el uso de estos residuos para emplearlos en procesos productivos que permitan obtener un beneficio económico y ambiental (Piña-Guzmán *et al.*, 2017).

Los residuos agroindustriales y forestales son las materias primas de biomasa más prometedoras para el desarrollo de nuevas tecnologías de aprovechamiento, por su costo relativamente bajo y por su exuberancia (Cai *et al.*, 2017)

Recientemente, el interés por el aprovechamiento de los residuos agroindustriales ha incrementado en diferentes ámbitos debido al bajo costo, a la alta disponibilidad

y a la necesidad de reducir el impacto ambiental causado; por ello se han estudiado nuevas tecnologías que usen los residuos, generados a partir de la agroindustria dependiendo de la composición, la tecnología y el método de aprovechamiento que se pueda emplear (Peñaranda-González *et al.*, 2017).

Una estrategia sustentable para muchas industrias es la conversión de biomasa lignocelulósica, proveniente de los residuos agrícolas, en compuestos de valor agregado. La degradación de estos materiales por acción de microorganismos permite la producción de diversos compuestos como proteínas, enzimas, ácidos orgánicos, metabolitos secundarios y oligosacáridos (Matos-Trujillo *et al.*, 2020).

La biorrefinería utiliza como materia prima la biomasa para obtener múltiples productos con un enfoque principal para la producción de biocombustibles (bioetanol, biodiesel y biogás), bioquímicos de valor agregado derivados de carbohidratos estructurales (celulosa y hemicelulosa) y bioenergía (calor y energía) (Carrillo-Nieves *et al.*, 2018).

- **Bioetanol**

De acuerdo con Sigüencia Avila *et al.*, (2020), el bioetanol es el principal vector sobre la línea de los biocombustibles líquidos. Se destina principalmente al sector transporte para su empleo puro o mezclado con gasolina. El bioetanol producido a partir de residuos agrícolas es una alternativa prometedora para la movilidad sostenible y reemplazar el combustible convencional. Algunas ventajas del uso del bioetanol respecto a la gasolina son:

- Disminución de emisiones de monóxido de carbono y compuestos aromáticos debido al contenido de oxígeno, que no se encuentra en la gasolina y por tanto permite el incremento en la eficiencia de la combustión.
- Optimiza en el octanaje de la mezcla y su relación de compresión.
- Incremento en la potencia de salida del motor de combustión interna.

Existe la controversia de utilizar granos alimenticios para la producción de bioetanol, pues puede incitar a una competencia directa entre la producción del biocombustible y la limitada tierra agrícola necesaria para la generación de alimentos y piensos. Para resolver dicha controversia, un enfoque más prometedor sería usar los residuos agrícolas, derivados de las partes no comestibles de los cultivos alimentarios, para su bioconversión en combustibles renovables. Así, desde el punto de vista energético y medioambiental, se obtiene un beneficio al desarrollar bioetanol de segunda generación a partir de estos residuos (Elahi y Rehman, 2018).

El bioetanol producido a partir de material celulósico de desechos agroindustriales implica varias etapas: molienda, pretratamiento, hidrólisis enzimática, fermentación, destilación y rectificación del producto. Las etapas mencionadas anteriormente hacen de esta una tecnología de alto costo de operación, sin embargo, se han estudiado varios procesos que favorezcan la conversión de materia lignocelulósica en etanol como la hidrólisis enzimática y la fermentación de la biomasa. El bioprocesamiento consolidado, para la producción de bioetanol de segunda generación, es el método de fermentación más prometedor para la producción de bioetanol (Carrillo-Nieves *et al.*, 2018).

- **Biodiesel**

Es el producto generado de la transesterificación que surge de la reacción química entre los ácidos grasos provenientes de cultivos oleaginosos, así también como de grasas animales, aceites y grasas recicladas. No obstante, se obtiene principalmente de alcoholes, tales como el metanol o el etanol. Existen residuos agroindustriales de los que es posible adquirir grasas y aceites vegetales, por ejemplo, las semillas de zapote mamey, subproducto de plantas procesadoras de frutas (Vargas Corredor *et al.*, 2018).

El biodiesel se ha convertido en uno de los biocombustibles más prometedores, a pesar de eso, el uso de aceites vegetales como materia prima para obtener biodiesel genera problemáticas como la inanición de alimentos, además de problemas

ambientales relacionados con el uso de tierras arables para la producción de cultivos oleaginosos. Como alternativa se ha estudiado el uso de lípidos microbianos para generar biodiesel. Para ello se han utilizado residuos agroindustriales como sustrato por su bajo costo (Louhasakul *et al.*, 2020).

- **Biogás**

Una de las estrategias más comunes y utilizadas para la producción de biogás es la digestión anaerobia, que convierte la materia orgánica en biogás (metano, 60-70 %; dióxido de carbono, 30-40 %) a través de la acción de microorganismos que llevan a cabo un metabolismo coordinado en cuatro etapas: hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. A lo largo de estas etapas, existen factores ambientales que interfieren en la eficiencia de producción de metano. Las condiciones deben ajustarse a un régimen mesofílico (25-40 °C) o termofílico (45-60 °C), potencial redox (-220 mV) y pH (6-7). Otro factor importante a considerar es la composición bromatológica de la materia prima, ya que el contenido de carbohidratos y proteínas está en función del tipo y origen del residuo a tratar (González-Sánchez *et al.*, 2015).

Ricardo Dalpaz y *et al.*, (2020) determinaron que al utilizar residuos agroindustriales como materia prima para la obtención de biogás, la concentración de metano y la energía generada resultante aumentan, lo que conlleva a un mejor aprovechamiento del combustible. Obtuvieron concentraciones de 68.54 %, 83.45 % y 92.33 % de metano que generaron 2.04 kWh/m³, 3.21 kWh/m³ y 3.57 kWh/m³ de energía eléctrica respectivamente. La gestión eficiente de residuos agroindustriales promueve el uso de biogás y reduce los problemas ambientales vinculados a la generación de estos residuos.

- **Compostaje**

El compostaje es una técnica que transforma la materia orgánica en un producto con precursores de sustancias húmicas mediante la descomposición aeróbica, del cual se obtiene un producto final estable. Los residuos deben mezclarse de manera

que la relación carbono: nitrógeno, humedad (40-60 %) y aireación favorezcan la actividad microbiana y permita la modificación de la estructura de los materiales para que los nutrientes estén disponibles (Delgado-Arroyo *et al.*, 2019).

A lo largo del proceso de degradación de residuos lignocelulósicos, la relación C/N es un punto clave ya que de esta depende la disponibilidad de nutrientes para los hongos. Una relación C/N superior a 30 representa un proceso lento y con baja disponibilidad de nitrógeno, el cual es fundamental para el desarrollo de los hongos. Los residuos agroindustriales tienen valores altos en la relación C/N por lo que su degradación natural es lenta. Si se pretende acelerar el proceso de mineralización, se recomienda adicionar mariales con alto contenido de nitrógeno (Méndez-Matías *et al.*, 2018)

1.2 Proceso fermentativo

Se denomina fermentación al proceso por el cual un sustrato, ya sea sólido o líquido, es convertido por la acción de microorganismos procariontes (bacterias) y eucariontes (microalgas, levaduras, hongos) en un producto con valor y útil para el hombre. La fermentación es utilizada para la producción a nivel industrial de compuestos bioactivos. Existe la fermentación sólida, la cual es aplicada para materiales insolubles en agua, ya que la cantidad de agua no debe ser mayor a la capacidad de saturación del sustrato sólido. Los sustratos ocupados para la fermentación en seco son bagazo de caña, salvado de trigo y pulpa de papel. Por el contrario, la fermentación líquida, o también llamada fermentación sumergida, se aplica en sustrato solubles en agua para el crecimiento de microorganismos y biomasa. El sustrato debe ser barato, fácil de adquirir y con balance nutricional adecuado (Hernández-Melchor *et al.*, 2019).

La fermentación, a través de bacterias ácido lácticas (BAL), se ha utilizado como una estrategia para el aprovechamiento de residuos agroindustriales, de manera que se obtienen metabolitos o compuestos con valor económico, tales como el ácido

láctico, ácido acético y etanol, entre otros. La Figura 1.1 muestra las diferentes rutas de formación de metabolitos a partir de residuos agroindustriales, de entre las cuales se encuentra la fermentación con BAL.

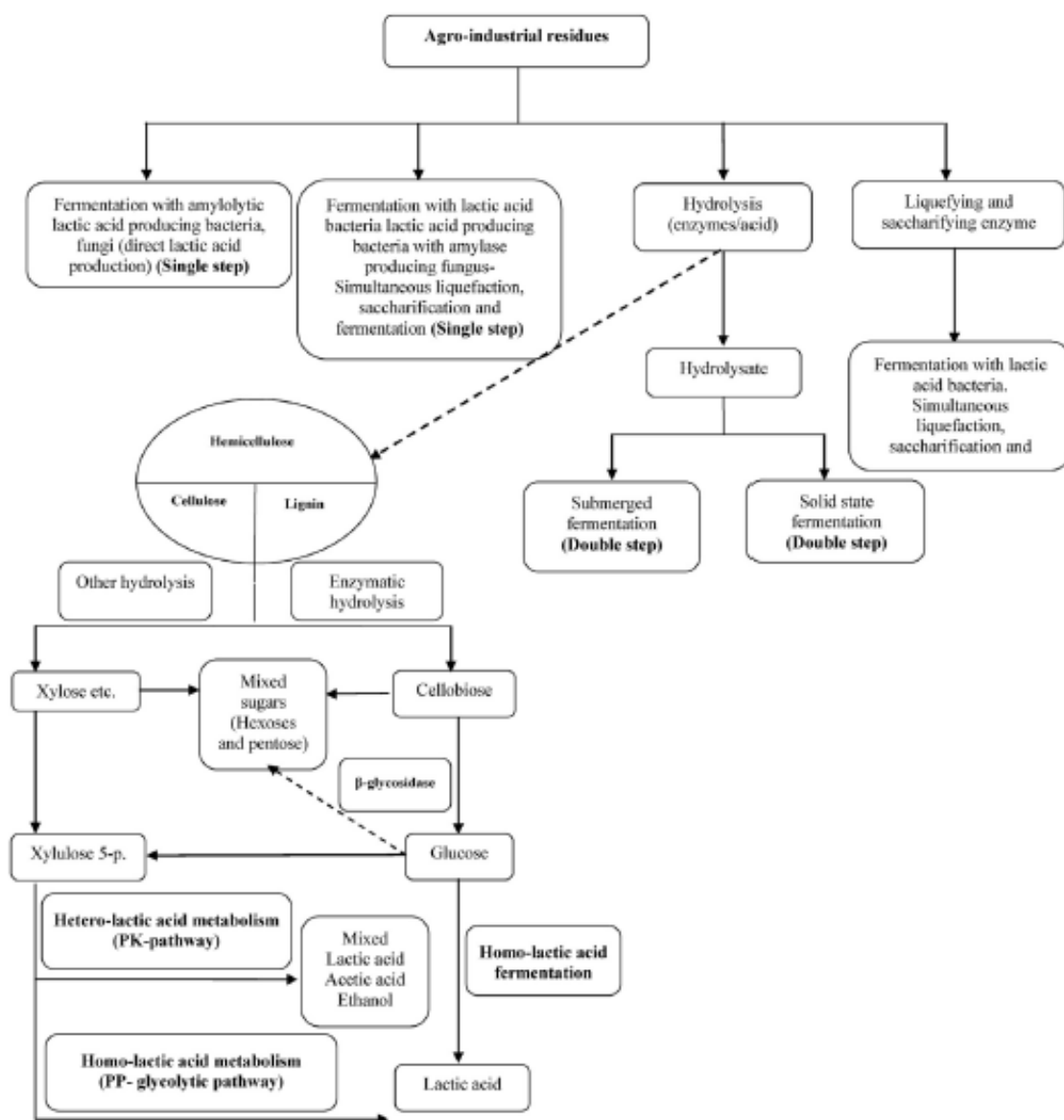


Figura 1.1 Rutas para la obtención de ácido láctico a partir de BAL (Abedi y Hashemi, 2020).

1.3 Bacterias probióticas

Los probióticos son microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas brindan un efecto beneficioso hacia el huésped. Se considera que los probióticos son beneficiosos pues proporcionan efectos positivos hacia la salud del huésped, como el mantenimiento del equilibrio microbiano intestinal, inhibición del crecimiento de bacterias patógenas, sintetización y mejoramiento de la biodisponibilidad de nutrientes, reducción del efecto de alérgenos, estimulación del sistema inmune y aumento a la resistencia de infecciones. (Corrales- Benedetti y Arias-Palacios, 2020).

Para que un microorganismo sea considerado como probiótico, debe cumplir ciertas especificaciones (Gutiérrez y Salas, 2018) como:

- No ser patógeno o toxigénico.
- Tener la capacidad de adaptarse al microbiota intestinal sin desplazar a la microbiota ya existente.
- Sobrevivir al tránsito gastrointestinal para después implantarse
- Mantenerse viable durante cierto tiempo en el intestino.
- Deber ser capaz de adherirse a las células epiteliales.
- Generar sustancias antimicrobianas.
- Mejorar las funciones inmunes y las actividades metabólicas.

Las especies *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son utilizadas con mucha frecuencia como probióticos, al igual que la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, además de otras bacterias como *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Oenococcus*, *Bacillus*, *Faecalibacterium* y *Enterococcus*. Algunas de estas son consideradas bacterias ácido lácticas que presentan funciones como agentes fermentadores de alimentos, lo que propicia que sean usadas como herramienta tecnológica en la conservación de productos y produzcan efectos fisiológicos que benefician al huésped a través de la capacidad probiótica (Bernal-Castro *et al.*, 2017).

1.3.1 Condiciones de propagación de bacterias probióticas.

El género *Bacillus* tiene una amplia distribución en varios tipos de ambientes como el suelo, los ecosistemas de agua dulce y marinos, así como también en ecosistemas extremos. Este género se ha aislado a partir de cultivos de importancia económica como el arroz, demostrando que las cepas de *Bacillus* son capaces de solubilizar fósforo, fijar nitrógeno, producir auxinas y sustancias antagonicas contra diferentes hongos fitopatógenos (Badía *et al.*, 2011). Algunos autores, como Ruiz *et al.*, (2021) aislaron la bacteria *Bacillus subtilis* a partir de cutículas de hormigas utilizando como medio de cultivo Agar Nutritivo (AN), al igual que Matos *et al.*, (2018) cuando realizaron fermentación sumergida para la producción de xilanasas a partir de la bacteria *Bacillus subtilis* E44, Mendez-Ubeda *et al.*, (2017) realizaron el aislamiento de bacterias del genero *Bacillus* a partir de bioinsumos artesanales utilizando como medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Plate Count (PCA) y AN a 35°C durante 24 horas.

A pesar de que las BAL tienen en común muchas características fundamentales, cada grupo o genero individual requieren de condiciones de crecimiento únicas que incluyen un rango de pH óptimo. Estas condiciones específicas de crecimiento hacen casi imposible identificar y utilizar un solo medio de uso múltiple para el cultivo de las BAL. Por ejemplo, el género *Lactobacillus* prefiere un pH inferior a 4.5, mientras que *Leuconostoc* se desarrolla mejor en un pH de 5.5 o superior. Esta variedad de requisitos de crecimiento ha dado lugar a la gran variedad de medios utilizados para el cultivo de cada especie específica de BAL, sin embargo el medio más utilizado para el cultivo rutinario de estas BAL es el medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS) que puede modificarse con sorbitol, galactosa o maltosa. Otros medios utilizados para el aislamiento de BAL específicas incluyen Elliker, medio de Lee para *Streptococcus*, agar selectivo de *Lactobacillus*, agar LM17, agar SM17 y agar de Edward (Renschler *et al.*, 2020).

Para la propagación y cultivo de las BAL, los requerimientos nutricionales son muy exigentes, ya que necesitan carbohidratos, aminoácidos, vitaminas y minerales para

su crecimiento, debido a esto se cultivan en medios enriquecidos. El medio de cultivo más usado para el crecimiento de estas bacterias es el medio MRS por su capacidad de aportar los nutrientes necesarios para el crecimiento de las bacterias. Sin embargo, es considerado como un medio costoso debido a las fuentes de nitrógeno que lo componen, tales como extracto de carne y proteosa de peptona. Para reducir los costos de dicho medio, es posible reemplazar las fuentes de nitrógeno por fuentes provenientes de residuos agroindustriales (Domínguez-Gutiérrez *et al.*, 2019).

1.3.2 Mecanismos de acción de los probióticos

El mecanismo general de los probióticos en el huésped consiste en incrementar la producción de enzimas que conducen a la digestión y absorción de nutrientes, mejorar la morfología de células epiteliales intestinales y potenciar la respuesta inmune aumentando la concentración de microorganismos favorables en el intestino que promuevan la función de barrera de células epiteliales intestinales e inhiban la adhesión de patógenos y toxinas (Ding *et al.*, 2020).

Existen diversos beneficios que aportan los probióticos y de acuerdo con la investigación realizada por Molina (2019) algunos de los mecanismos de acción que se destacan son los siguientes:

- Los probióticos tienen la capacidad de reducir agentes patógenos debido a la producción de bacteriocinas, a la exclusión por competencia al adherirse a los probióticos del epitelio intestinal, cambios en el pH.
- Bacterias ácido lácticas como *Bifidobacterium*, *Bacillus* y *Lactobacillus* generan bacteriocinas que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos como *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Listeria* y *Salmonella* ya que no permiten la síntesis de la pared celular bacteriana.

- Los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* sintetizan ácidos orgánicos que reducen el pH intracelular a niveles letales para las bacterias patógenas, por lo que disminuye el riesgo de colonización por microorganismos patógenos.
- Algunas bacterias poseen la capacidad de disminuir la permeabilidad del epitelio intestinal provocando una reducción en la translocación de patógenos intestinales del tubo digestivo hacia otros órganos.
- Se han utilizado probióticos como promotores de crecimiento debido mejoran la digestibilidad de nutrientes causada por el incremento de la actividad enzimática en el intestino.
- Tienen el poder de modular la respuesta inmune del huésped, tan la respuesta innata como la respuesta adaptativa.

1.3.3 Actividad probiótica en animales

El beneficio principal del empleo de los probióticos en la salud de los animales es el balance microbiano en el tubo digestivo. La exclusión competitiva, el antagonismo bacteriano e inmuno-modulación son los mecanismos por lo que los probióticas logran hacer este balance (Molina, 2019).

La Tabla 1.3 enlista las bacterias probióticas aprobadas para ser utilizadas en alimentos para animales, de acuerdo con la Asociación Americana de Oficiales de Control de Alimentos para Animales.

El empleo de probióticos en rumiantes es asociado a la modulación y estimulación del desarrollo de la microbiota ruminal. Algunos de los probióticos utilizados como aditivos son *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* y hongos. Se ha reportado que, al utilizar probióticos, como *Bacillus licheniformis*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Lactobacillus spp*, incrementa la producción de leche y porcentaje de grasa en los animales (Corredor-Camargo y Otálora-Porras, 2020).

Tabla 1.3 Microorganismos aprobados para su uso en alimento para animales (Molina, 2019).

Microorganismos	
Bacterias Gram positivas, formadoras de esporas	<i>Bacillus coagulans</i> <i>Bacillus lentus</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus subtilis</i>
Bacterias Gram negativas, no formadoras de esporas	<i>Bacteroides amylophilus</i> <i>Bacteroides capillosus</i> <i>Bacteroides ruminicola</i> <i>Bacteroides suis</i> <i>Megasphaera elsdenii</i>
Bacterias Gram positivas, no formadoras de esporas	<i>Bifidobacterium adolescentes</i> <i>Bifidobacterium animalis</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Bifidobacterium longum</i> <i>Bifidobacterium thermophilum</i> <i>Enterococcus cremoris</i> <i>Enterococcus diacetylactis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus intermedius</i> <i>Enterococcus lactis</i> <i>Enterococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus buchneri</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus cellobiosus</i> <i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Lactobacillus delbruekii</i> <i>Lactobacillus farciminis</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus lactis</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Pediococcus acidilacticii</i> <i>Pediococcus cerevisiae</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Propionibacterium acidipropionici</i> <i>Propionibacterium freudenreichi</i>

Khattab *et al.*, (2020) evaluaron los efectos de la adición de probióticos en la dieta basada en atriplex en ovejas. Utilizaron diferentes tratamientos con levadura y dos bacterias probióticas. Los tratamientos fueron: (1) dieta de control, (2) dieta de control adicionado con *Saccharomyces cerevisiae* por día y (3) dieta de control adicionado con *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus casei* por día. Para la experimentación utilizaron treinta ovejas que recién habían dado a luz. Tanto las ovejas como los corderos recién nacidos fueron alimentados con las dietas mencionadas anteriormente. Observaron que, al incluir probióticos en la dieta de las ovejas, aumentó significativamente la ingesta de materia seca, materia orgánica, proteína cruda y fibra de detergente neutro, pero no detectaron algún cambio en el peso corporal, la producción de leche, la composición de la leche o la eficiencia (ingesta de leche / materia seca). En cuanto a los corderos, la dieta de bacterias incremento la ganancia de peso diaria promedio en comparación con la dieta adicionada con levadura y dieta del grupo de control. El nitrógeno ureico en sangre aumentó y los lípidos y triglicéridos totales disminuyeron con la suplementación con probióticos. Todos los demás parámetros sanguíneos no se vieron afectados. Por tanto, concluyeron que al suplementar las dietas a base de heno atriplex con bacterias probióticas resultaron benéficas al demostrar un mayor peso al destete, un aumento de peso diario promedio y un mejor estado de salud en los corderos ya que disminuyeron las incidencias por diarrea.

Sosa Cossio *et al.*, (2020) determinaron la respuesta biológica de pollos de ceba al añadir el probiótico *Lactobacillus pentosus* LB-3 en el alimento. Utilizaron ocho animales para el tratamiento, los cuales fueron separados en dos grupos, siendo el primero el grupo de control. El segundo grupo fue alimentado con la dieta común adicionada con *Lactobacillus pentosus* LB-31 en concentración de 1×10^7 UFC/ g de alimento (de acuerdo a la concentración mínima que se requiere de la bacteria para ser efectiva descrito por la FAO). Los animales fueron monitoreando con parámetro hematológicos, de bioquímica sanguínea, morfométricos e inmunológicos. En el caso de los indicadores morfométricos fueron expresados como peso relativo al peso vivo (g/kg de peso vivo) y para el grupo que fue alimentado con la dieta

adicionada con probióticos se pesaron los órganos relacionados con el sistema inmune (timo y bolsa de Fabricio). A los 42 días de edad de las aves no determinaron diferencia alguna en los tratamientos para la hemoglobina y hematocrito. Los niveles de albumina, colinesterasa y glutatión aumentaron, mientras que hubo una disminución en los niveles de globulinas, ácido úrico, amilasa pancreática, fosfatasa alcalina, colesterol y triglicéridos. En cuanto a parámetros morfométricos hubo un incremento en el peso de los órganos timo y bolsa de Fabricio, lo que indica que al adicionar el probiótico se estimuló el desarrollo de los órganos provocando una mejor respuesta inmune ante al ataque de agentes patógenos. Concluyeron que *Lactobacillus pentosus* LB-31 conserva su actividad probiótica en indicadores morfo- fisiológicos y hematológicos de pollos en ceba, por lo que posteriormente podría aplicarse para la elaboración en masa destinados a sistemas ganaderos.

1.3.4 Bacterias ácido-lácticas

Se refiere a las bacterias ácido-lácticas (BAL) como un grupo de bacterias Gram positivas, que presentan forma de cocos o bacilos, son no formadoras de esporas, no presentan motilidad y su característica principal es la sintetización de AL en el proceso de fermentación. Son ampliamente ocupadas en la industria alimentaria pues poseen la capacidad de conservar naturalmente productos lácteos (Heredia-Castro *et al.*, 2017).

La mayoría de las BAL obtienen energía solo del metabolismo de azúcares, por lo que su distribución y desarrollo se encuentra limitada a ambientes en los que haya azúcares. Suelen clasificarse en homofermentativas, que producen solamente ácido láctico, y heterofermentativas, que producen más de un compuesto (etanol y CO₂). Existen diferencias entre ambas rutas para la fermentación de glucosa las cuales pueden observarse en las Figuras 1.2 y 1.3. Las bacterias homofermentadoras producen dos ATP/glucosa, mientras que las bacterias heterofermentadoras producen solamente una ATP/glucosa, además de descarboxilar el 6-

fosfogluconato y producir CO₂, por lo que una manera fácil de identificar las rutas es si existe la producción de gas en los cultivos (Madigan *et al.*, 2015).

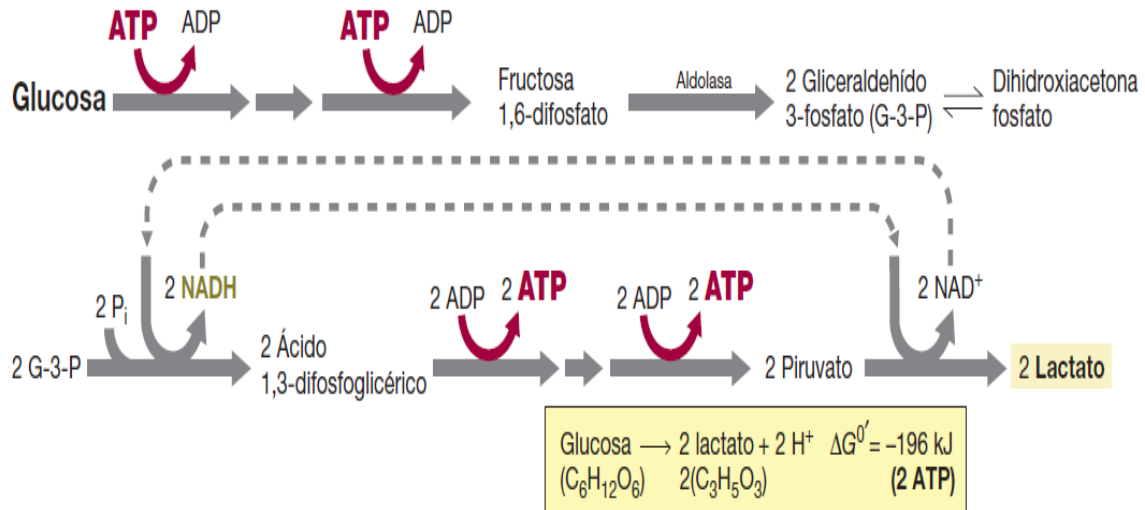


Figura 1.2 Ruta de fermentación de glucosa por acción de bacterias homofermentadoras (Madigan *et al.*, 2015).

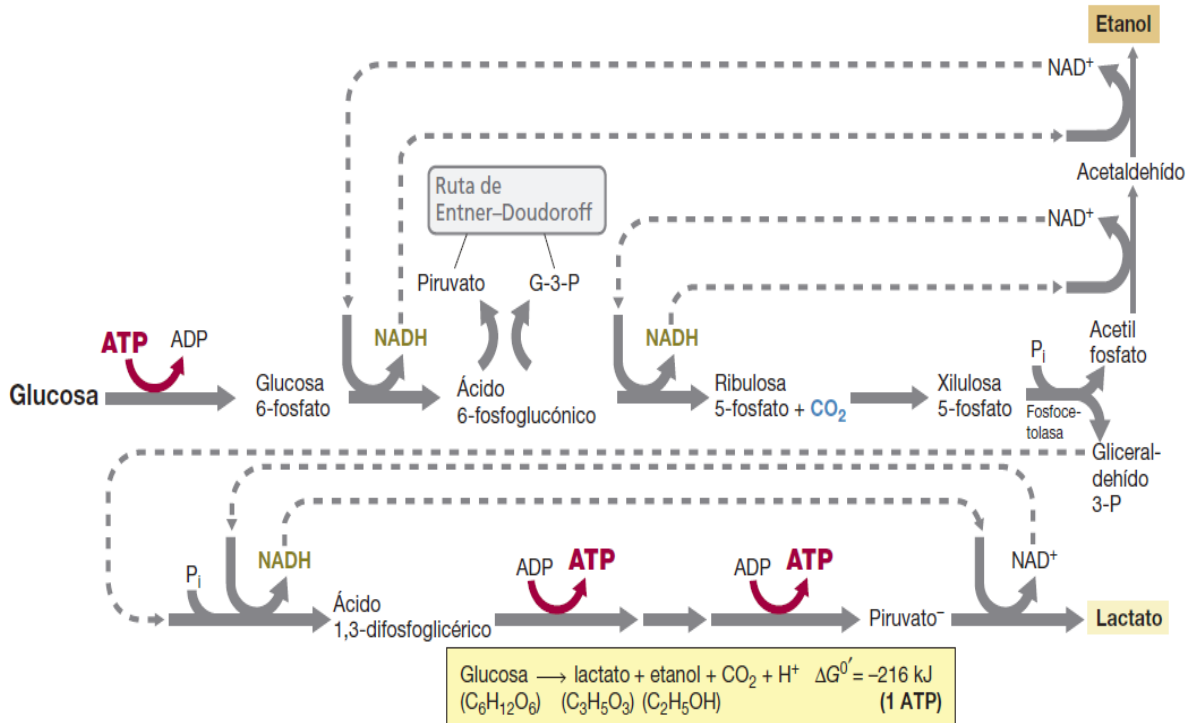


Figura 1.3 Ruta de fermentación de glucosa por acción de bacterias heterofermentadoras (Madigan *et al.*, 2015).

Producen sustancias antimicrobianas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), diacetilo, reuterina, ácidos orgánicos y sustancias de naturaleza protéica o también llamadas bacteriocinas (Borrás-Sandoval *et al.*, 2017).

1.3.5 *L. acidophilus*

Se encuentra de manera natural en una extensa variedad de alimentos. La mayoría de las cepas de *L. acidophilus* (Figura 1.4) son bacterias anaerobias y su crecimiento óptimo se logra a una temperatura de 30- 45 °C con pH de 4-5. Es ocupada en la industria alimenticia y asiste en la producción de niacina y ácido fólico en la digestión. Actualmente existen 3 secuencias de genomas de *L. acidophilus*, cada una de ellas han sido ocupadas para diferentes usos (Fina-Martín, 2019).



Figura 1.4 *Lactobacillus acidophilus* (Madigan *et al.*, 2015)

1.3.6 *L. fermentum*

Es una bacteria que se encuentra comúnmente en el tracto gastrointestinal de humanos, donde ejercen efectos beneficiosos para el huésped. También se encuentra en la leche cruda, productos lácteos y en bebidas y productos fermentados. Algunos probióticos aislados como *L. fermentum* 90 TC-4 y RC-14 son ampliamente utilizados en la industria (Anisimova y Yarullina, 2018).

1.3.7 *Bacillus subtilis*

Se definen como bacterias productoras de endosporas que resisten al calor. De entre sus características principales destacan, su crecimiento aerobio o en ocasiones anaerobio facultativo, son Gram positivas, presentan morfología bacilar, movilidad flagelar, su rango de tamaño es de 0.5 a 10 μm y requieren de pH neutro para su crecimiento óptimo. La mayoría de las especies *Bacillus* son mesófilas, sin embargo, algunas resisten un amplio intervalo de temperatura para su crecimiento. También tienen la capacidad de producir endosporas como un mecanismo de resistencia (Villareal-Delgado *et al.*, 2018).

Muchos bacilos generan enzimas hidrolíticas extracelulares que realizan la hidrólisis de polímeros complejos, como polisacáridos, ácido nucleicos o lípidos, lo que facilita que utilicen estos productos como fuente de carbono y donadores de electrones (Madigan *et al.*, 2015). En adición, muchos de los miembros que conforman este género presentan características como las endosporas, que le confieren a la bacteria resistencia a la desecación y al calor, por lo que se le considera como un candidato ideal para la formulación de productos estables y su empleo en la biotecnología agrícola (Badía *et al.*, 2011) además de que han demostrado capacidad para la sacarificación simultánea y co-fermentación de azúcares hidrolizados para la producción de lactato (Santiago *et al.*, 2019).

1.4 Crecimiento bacteriano

De acuerdo con Madigan *et al.*, (2015), el ciclo de crecimiento bacteriano completo incluye las siguientes fases:

- Fase de latencia. Cuando un cultivo microbiano es inoculado en un medio fresco, se inicia la fase de latencia. Esta fase puede ocurrir en un breve o extenso intervalo de tiempo, dependiendo de los antecedentes del inóculo, la naturaleza del medio y las condiciones de crecimiento. Si se transfieren

células de un cultivo que se encontraba en fase exponencial al mismo y en las mismas condiciones no se producirá una fase de latencia y el crecimiento exponencial comenzará de manera inmediata. Caso contrario a que si el inoculo se obtiene de un cultivo viejo, habrá fase de latencia ya que las células carecen de constituyentes esencial y necesitan tiempo para su biosíntesis. También existe la fase de latencia cuando el inoculo es de baja viabilidad (pocas células vivas) o contiene células dañadas por algún agente como altas o bajas temperaturas, radiación o sustancias toxicas. La fase de latencia puede presentarse cuando se transfiere un cultivo microbiano de un medio de cultivo rico a uno más pobre.

- Fase exponencial. A lo largo del crecimiento exponencial la población de células se duplica en intervalos regulares de tiempo, dependiendo de los recursos disponibles y otros factores. Las células que están en fase exponencial se encuentran en su mejor estado de salud. La velocidad de crecimiento exponencial varía mucho y depende de las condiciones ambientales, como la temperatura y composición del medio de cultivo. Generalmente las células procariotas crecen con mayor velocidad que los eucariotas y las eucariotas más pequeñas suelen crecer más rápido que las grandes. Por lo tanto, las células pequeñas tienen mayor capacidad para el intercambio de nutrientes, esto influye en gran medida en el crecimiento y otras propiedades.
- Fase estacionaria. Cuando el crecimiento exponencial termina, porque los nutrientes del medio se agotan o porque se acumulan los desechos del organismo, da inicio la fase estacionaria. En esta fase no se produce un aumento o disminución de células de manera que la velocidad de crecimiento de la población es igual a cero. Esto no significa que el crecimiento, metabolismo energético y los procesos biosintéticos se detengan, solo ocurre a una velocidad muy baja.

- Fase de muerte. Esta, al igual que la fase exponencial, produce una función exponencial. La fase de muerte es mucho más lenta que la fase de crecimiento, incluso pueden quedar células viables durante meses o años.

En la Figura 1.5 se puede observar la gráfica del crecimiento típico bacteriano, en la cual la densidad óptica (turbidez) aumenta conforme al crecimiento de células.

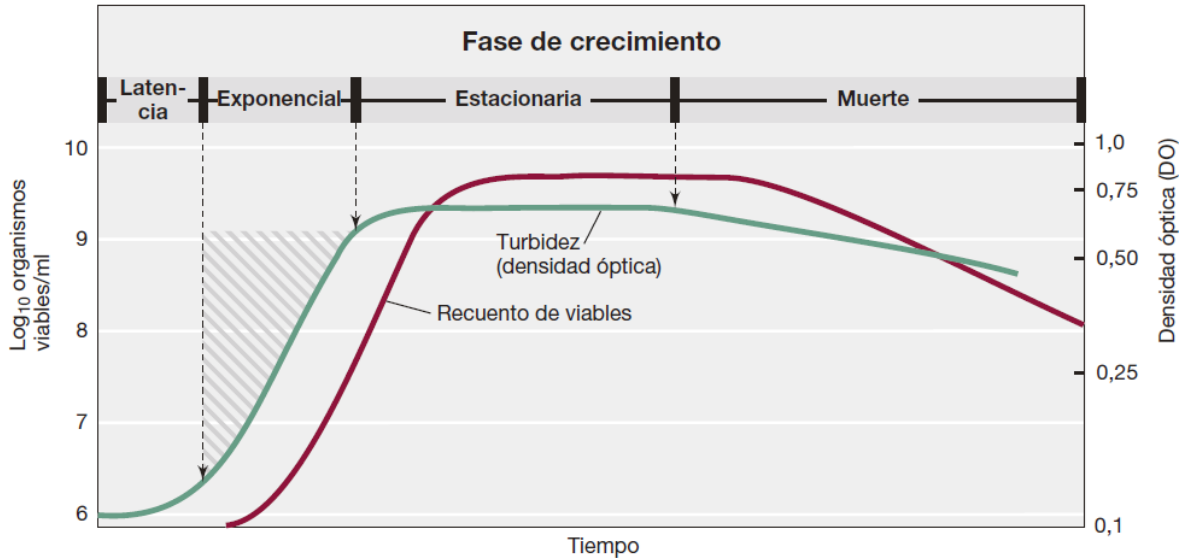


Figura 1.5 Curva del crecimiento bacteriano (Madigan *et al.*, 2015).

1.5 Modelo de Hom

En 1972 Hom propuso un modelo que proporciona una expresión generalizada para el producto de concentración de tiempo, su modelo es muy parecido al modelo de Chick-Watson. En él se observa una adición de un factor de potencia m por tiempo. Posteriormente se introduce una modificación que permite el rezago inicial, la fase logarítmica lineal y la disminución de la curva. El modelo de Hom modificado se observa en la Ecuación 1.1, donde el valor de K_1 , K_2 , K_3 son las constantes empíricas (Ganguly *et al.*, 2018).

$$\ln \frac{N}{N_0} = -K_1 [1 - \exp(-K_2 T)]^{K_3} \quad (1.1)$$

Se han realizado trabajos de investigación en los cuales se han obtenido parámetros cinéticos a través del modelo de Hom, tal es el caso de Estrada- García (2021), quien monitoreó la biotransformación de residuos de porcínaza, a través del consumo de carbohidratos. Él determinó que al utilizar una velocidad de agitación de 100 rpm, el valor de k es mayor (3.2090×10^{-2}) por lo que la velocidad de consumo de sustrato es más rápida. Mientras que Romero-Mota *et al.*, (2021), al realizar fermentación anaerobia de residuos agrocañeros, concluyeron que al emplear una velocidad de agitación de 150 rpm el consumo de carbohidratos es acelerado ya que la velocidad de consumo es de 2.211×10^{-3} . Por otra parte Rocafuerte- Peña (2022), determinó que a las 48 horas de fermentación anaerobia de residuos de café se obtiene mayor velocidad de consumo de sustrato, con un valor de k de 0.4188. En la Tabla 1.4 se observan a detalle los parámetros cinéticos obtenidos, a través del modelo de Hom, por estos autores.

Tabla 1.4. Comparación de parámetros cinéticos obtenidos a través del modelo de Hom.

Referencia	Sustrato	k*	m	R ²
Rocafuerte- Peña, (2022)	Residuos de café	0.4188	0.03216	0.9998
Estrada- García, (2021)	Porcínaza	3.2090×10^{-4}	0.9599	0.8682
Romero-Mota <i>et al.</i> , (2021)	Residuos agrocañeros	2.211×10^{-3}	1.363	0.9420

1.6 Probióticos presentes en alimentos

En el mercado es posible encontrar una variedad de productos que contienen probióticos en su composición, principalmente medicamentos, complementos

alimenticios, soluciones de rehidratación oral, fórmulas de continuación y alimentos. Estos pueden o no presentar una única cepa, algunos están compuestos por combinaciones de varias especies de microorganismos, en ocasiones asociadas también con vitaminas, sustancias prebióticas, etc. Las principales especies de probióticos que se adicionan en alimentos son bacterias que tienen la capacidad de producir AL y que pertenecen a dos géneros principalmente: *Lactobacillus*, utilizados en la fermentación de alimentos y *Bifidobacterium*, gérmenes anaerobios estrictos. De igual forma se utilizan microorganismos no bacterianos, como *Saccharomyces boulardii* (levadura no patógena), y bacterias no patógenas como *Streptococcus thermophilus* y *Escherichia coli* nissle 1917 (Añez- Zavala et al., 2015).

Lactobacillus y *Bifidobacterium* (pertenecientes al género de las BAL) son los probióticos más utilizados en alimentos y piensos. Otros microorganismos como la levadura; *Saccharomyces cerevisiae* y algunas especies de *Escherichia coli* y *Bacillus* también han sido empleados como probióticos. Los probióticos se han utilizado durante siglos en productos lácteos fermentados. Sin embargo, las aplicaciones potenciales de los probióticos en productos alimenticios no lácteos y en la agricultura no han recibido un reconocimiento formal (Kidist et al., 2019). En la Tabla 1.5 se encuentra un listado de fórmulas probióticas utilizadas para la nutrición de los animales con el respectivo tipo de ganado. En él se observa que muchas de las formulaciones contienen el género *Lactobacillus* y *Bacillus*, ya sea como especie única de la formula o en combinación con otras especies.

Tabla 1.5 Ejemplos de formulaciones probióticas para la nutrición de ganado (Markowiak y Śliżewska, 2018).

Nombre comercial del preparado	Microorganismo	Animal destino
Acid-Pak-4-Way (Alltech)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	Aves de corral, cerdos
Anta Pro EF (Dr. Eckel)	<i>Enterococcus faecium</i>	Cerdos
Avian PAC (Soluble Loveland Industries)	<i>Streptococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> ,	Aves de corral
Biogen D (Bio-Gen)	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Pediococcus faecium</i>	Aves de corral
Biogen N (Bio-Gen)	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Pediococcus faecium</i>	Cerdos
Biogen T (Bio-Gen)	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	Cerdos
Bio Plus2B® (Chr. Hansen)	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>	Cerdos, terneros, aves de corral
BioPlus®YC (Evonik Industries)	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Cerdos
B.I.O.Sol (Biochem)	<i>Enterococcus faecium</i>	Aves de corral
Bro-biofair (Vitality Co.)	<i>Saccharomyces servisia</i>	Cerdos
Calsporin (ORFFA)	<i>Bacillus subtilis</i>	Aves de corral, cerdos
Cerbiopor	<i>Lactobacillus: acidophilus, brevis, casei, fermentum, lactis, plantarum</i> ; <i>Bacillus: subtilis, megaterium, pumilus</i> ; <i>Enterococcus faecium, Cellulomonas sp., Saccharomyces cerevisiae</i>	Cerdos
Cernivet LBC (Cerbios)	<i>Enterococcus faecium</i>	Terneros, cerdos
Cerbiogalli	<i>Lactobacillus: acidophilus, casei, plantarum</i>	Aves de corral
Cylactin (DSM)	<i>Enterococcus faecium</i>	Aves de corral, cerdos, terneros
Doctor Em® (Biotron)	<i>Lactobacillus: paracasei, plantarum</i> ; <i>Lactococcus lactis, Saccharomyces cerevisiae</i>	Aves de corral, cerdos, terneros
Ecobiol (Norel Animal Nutrition)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Aves de corral

Tabla 1.5 Continuación

Nombre comercial del preparado	Microorganismo	Animal destino
Enviva™ Pro (DANISCO Animal Nutrition)	<i>Bacillus subtilis</i>	Aves de corral
Enviva®MPI (DANISCO Animal Nutrition)	<i>Lactobacillus: farciminis, rhamnosus</i>	Cerdos
Farmafore soluble (Farm'apro)	<i>Lactobacillus: rhamnosus, farciminis</i>	Aves de corral
FloraMax-B11 (Pacific Vet Group)	<i>Lactobacillus salivarius, Pediococcus parvulus</i>	Aves de corral
GalliPro® (Evonik Industries)	<i>Bacillus subtilis</i>	Aves de corral
Galvit Probiotyk (Galvit)	<i>Enterococcus faecium</i>	Aves de corral
Lactiferm	<i>Enterococcus faecium</i>	Aves de corral, cerdos, terneros
Lavipan® (JHJ)	<i>Lactobacillus: plantarum, casei; Lactococcus lactis, Carnobacterium divergens, Saccharomyces cerevisiae</i>	Aves de corral, cerdos
LSP 122 (Alpharma)	<i>Bacillus licheniformis</i>	Cerdos
Microguard (PeterLab Holdings)	<i>Bacillus: licheniformis, megaterium, mesentericus, polymyxa, subtilis; Saccharomyces boulardii; Bifidobacterium bifidum; Lactobacillus: acidophilus, bulgaricus, plantarum; Streptococcus faecium</i>	Aves de corral, cerdos
MicroSource S (Agtech Products Inc.)	<i>Bacillus: subtilis, licheniformis</i>	Cerdos
Oralin® (Chevita GmbH)	<i>Enterococcus faecium</i>	Cerdos, terneros, aves de corral
PrimaLac (Star Labs, Inc.)	<i>Bifidobacterium: bifidum, thermophilus; Enterococcus faecium; Lactobacillus: acidophilus, casei,</i>	Cerdos, caballos, aves de corral, ciervos
Probiomix	<i>Bifidobacterium bifidum Lactobacillus amylovorus Enterococcus faecium</i>	Terneros, aves de corral

Tabla 1.5 Continuación

Nombre comercial del preparado	Microorganismo	Animal destino
Procion (Woogene B&G Co. Ltd.)	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Clostridium butyricum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Cerdos, aves de corral
Probios (Chr Hansen)	<i>Lactobacillus: acidophilus, casei, plantarum, lactis; Enterococcus faecium; Bacillus subtilis</i>	Aves de corral, cerdos
Probiosacc C-I	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Terneros
Pro-Biotyk em15® (ProBiotics)	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bifidobacterium: animalis, bifidum, longum</i> , <i>Lactobacillus: acidophilus, casei, delbrueckii subsp. bulgaricus, fermentum, plantarum; Lactococcus lactis subsp. lactis; Saccharomyces cerevisiae; Streptococcus thermophilus</i>	Aves de corral, cerdos, terneros, caballos
Propoul (International Company s.r.o.)	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Aves de corral
Protexin (Protexin Probiotics International Ltd.)	<i>Lactobacillus: plantarum, delbrueckii subsp. bulgaricus, acidophilus, rhamnosus; Bifidobacterium bifidum; Streptococcus salivarius subsp. thermophilus; Enterococcus faecium; Aspergillus oryzae; Candida pintolepesii</i>	Aves de corral, cerdos, ovejas, ganado
Provita LE (Schaumann)	<i>Lactobacillus rhamnosus, Enterococcus faecium</i>	Cerdos, terneros
Super-CyC (Choong Ang Biotech Co. Ltd.)	<i>Bacillus subtilis, Saccharomyces cerevisiae</i>	Aves de corral, ganado, caballos, cerdos
Toyocerin® (Rubinum S.A.)	<i>Bacillus toyonensis</i>	Cerdos
UltraCruz (Santa Cruz Animal Health)	<i>Enterococcus faecium, Lactobacillus: acidophilus, casei, plantarum</i>	Ganado, terneros, aves de corral
Yea Sacc (Alltech)	<i>Lactobacillus rhamnosus, Enterococcus faecium</i>	Ganado, terneros

1.6.1 Alimento funcional

Citando a Castillo (2016), un alimento funcional es aquel alimento o ingrediente alimentario potencialmente saludable que contiene nutrientes no tradicionales que

benefician en una o más funciones al organismo. Este puede contener un macronutriente con efecto fisiológico específico, un micronutriente esencial o un componente alimenticio que a pesar de no ser considerado como esencial, su ingesta permite la modulación de alguna función específica en el organismo que reduzca el riesgo de enfermedad. Por tanto, un alimento funcional probiótico contendrá, en número suficiente, microorganismos viables que brinden un efecto beneficioso hacia el huésped, ya sea adicional, terapéutico o preventivo.

1.7 Estudios previos

Matos Trujillo *et al.*, (2020) evaluaron residuos agrícolas como el afrecho de trigo, el bagazo de caña de azúcar, la cáscara de arroz y el rastrojo de maíz como sustrato para la producción de enzimas utilizando la bacteria *Bacillus subtilis* a través de la fermentación en estado seco, con la finalidad de evaluar la producción de enzimas endocelulósas, endoxilanasas y mananasas. Estas enzimas complementan a las enzimas endógenas, que ya se encuentran en los animales, para la reducción de infecciones provocadas por patógenos como *Salmonella spp* y *Clostridium spp*. Concluyeron que la mayor producción de enzimas endoxilanasas en los residuos agrícolas fue el afrecho de trigo (25.08 UI mL⁻¹), seguido por el bagazo de caña de azúcar (9.32 UI mL⁻¹), la cáscara de arroz (6.92 UI mL⁻¹) y el rastrojo de maíz (6.95 UI mL⁻¹). Por tanto, se consideró que la bacteria *Bacillus subtilis* tiene un gran potencial para la producción de enzimas endoxilanasas, por lo que puede ser utilizada como un aditivo para aumentar la calidad del alimento para ganado.

Almanaa *et al.*, (2020) evaluaron la producción de amilasa en el proceso de fermentación en estado sólido de residuos agroindustriales como salvado de trigo, cáscara de plátano, cáscara de naranja, salvado de arroz y cáscara de piña, utilizando la cepa *Bacillus subtilis* D19. De acuerdo con su investigación, los medios sintéticos son demasiado caros por lo que no es factible utilizarlos para grandes producciones de enzimas industriales, para ellos utilizaron residuos agroindustriales como un medio más económico para la producción de amilasa que puede ser

utilizada para diversos procesos industriales. Analizaron parámetros como el pH, humedad y fuente de carbono para determinar las condiciones óptimas para una mejor producción de amilasa. Utilizaron como fuente de carbono levadura y almidón. Observaron que al inocular la cepa bacteriana *Bacillus subtilis* D19 en salvado de trigo, con pH de 9, humedad del 70 %, 1 % de almidón, 1 % extractos de levadura y 5 % de inóculos se obtenía una mejor producción de amilasa (1239 U/g). Por lo tanto, concluyeron que, la producción de amilasa a pH y contenido de humedad óptimos mejora el rendimiento de la enzima, además de que los factores físicos y las fuentes de carbono influyen en la producción de amilasa.

Caicedo *et al.*, (2019) determinaron la composición química y digestibilidad de nutrientes de la fermentación, con inóculos de yogur natural, de residuos de tubérculos de taro (*Colocasia esculenta* (L), Schott) en cerdos de crecimiento. Determinaron parámetros como materia seca (MS), materia orgánica (MO), proteína bruta (PB), fibra bruta (FB), cenizas, extracto étereo (EE), extractos libres de nitrógeno (ELN) y energía bruta (EB). Para el análisis de digestibilidad ocuparon 12 cerdos castrados y los alimentaron con tres dietas con diferentes porcentajes de inclusión de fermentación en seco (0, 10 y 20 %). El fermentado de taro presento alto contenido de MS (83.33 %), MO (93.77 %), PB (13.95 %) y ELN (72.78 %). Mientras que los coeficientes de digestibilidad más altos se alcanzaron con la dieta que contenía 20 % de inclusión de fermentación, ya que obtuvo valores de MS (91.37 %), MO (96.36 %), PB (87.81 %) y FB (54.75 %). Además, encontraron que el contenido de proteínas aumento después de la fermentación, esto es debido a la producción de proteína microbiana de las bacterias ácido lácticas. Concluyeron que la suplementación con *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, *Bacillus* y *Pediococcus* en dietas de cerdas brindan un efecto positivo en el aprovechamiento de materia orgánica y nitrógeno y por tanto que la utilización de tubérculos de taro fermentados garantiza un alimento apropiado para cerdos en etapa de crecimiento.

Fonseca López *et al.*, (2018) utilizaron zanahorias de la especie *Daucus carota* L. en conjunto con otros residuos agrícolas lignocelulósicos como la caña de azúcar,

cascarilla de café, repila de trigo y tusa de maíz para la elaboración de un alimento para ganado bovino. Utilizaron como estrategia la fermentación en estado sólido y elaboraron tres tratamientos con diferente composición cada uno. Monitorearon parámetros como el pH, humedad, proteína bruta, materia seca, cenizas, fibra en detergente acida, extracto etéreo (lípidos) y análisis microbiológicos. Lograron obtener una masa rica en proteína bruta, sin embargo, encontraron que la humedad y pH es un parámetro que influye mucho sobre el proceso de fermentación en seco, pues se observó que una humedad de 41.1 % y pH superior a 6, reduce la disolución de nutrientes y por tanto limita el crecimiento de bacterias ácido lácticas.

Vera Mejía *et al.*, (2018) evaluaron el efecto de *L. plantarum* con una concentración de 1×10^9 , en indicadores de salud, bioproductivos y morfométricos en cerdos destetados. Utilizaron 24 lechones, los cuales fueron distribuidos en tres grupos, uno de control (T1) y dos grupos tratados (T2 y T3). El grupo T1 fue alimentado con la dieta que normalmente consumen, mientras que al alimento de los grupos T2 y T3 se les adicionó 10 y 20 mL de solución con probióticos (por animal) respectivamente. El alimento adicionado con probióticos era suministrado por las mañanas durante 70 días. Durante el tiempo que duro el experimento, analizaron indicadores productivos como la ganancia de peso semanal, peso final, conversión alimenticia y ganancia de peso de los cerdos, además se realizaron análisis hematológicos como proteína total albumina, urea, glucosa, colesterol total colesterol HDL y LDL, AST y ALT, glóbulos rojos, leucocitos y linfocitos. Observaron que en el grupo T3 hubo un mejor comportamiento en cuanto a la conversión alimenticia con un valor de 1.58 kg lo que nos indica que la presencia de *L. plantarum* en el intestino asegura una mejor absorción de las proteínas haciendo más eficiente la capacidad digestiva lo que provoca un incremento en la disponibilidad proteica. También observaron que la incidencia de diarreas se redujo para los grupos T2 y T3 en un 14.29 % y 28.57 % respectivamente por lo que al disminuir los trastornos gastrointestinales, disminuyen los gastos en medicamentos. En cuanto a los análisis hematológicos, no se presentaron cambios por lo que determinaron que el probiótico no afecta las características de la sangre de los

cerdos. Finalmente concluyeron que la adición de probióticos en cantidades adecuadas mejora la composición del microbiota intestinal de los cerdos.

Romero Mota (2017), determinó a través de una caracterización fisicoquímica y microbiológica que el residuo porcícola es un sustrato susceptible para el crecimiento de las bacterias *L. acidophilus*, *fermentum* y *reuteri* debido a su rico contenido de nutrientes que permiten el óptimo crecimiento de las bacterias mencionadas anteriormente. Realizó una cinética con duración de 72 horas, con variaciones en la concentración de carbohidratos y pH, manteniendo la temperatura y agitación constante. Concluyó que las condiciones óptimas para la producción de AL y para la supervivencia estable de los lactobacilos es utilizando una concentración de carbohidratos de 8.2 g/L y un rango de pH de 5.5 a 6.7, además de que el tiempo de residencia en el cual se produjo mayor cantidad de AL se obtuvo entre las 48 y 72 horas. Observó que las concentraciones de coliformes fecales y *salmonella spp* disminuyeron en una y dos unidades logarítmicas respectivamente. El AL es una sustancia antimicrobiana, por lo que el uso de bacterias probióticas en el proceso fermentativo tiene un doble beneficio, la degradación y desinfección de residuos porcícolas y la obtención de un producto con potencial alimenticio.

Rodríguez de Olmos *et al.*, (2017) analizaron el proceso fermentativo en estado sólido de residuos de semillas de soja utilizando las bacterias *L. paracasei subsp. paracasei* CRL 207, *L. rhamnosus* CRL 981, *L. fermentum* CRL 251 y *Bifidobacterium (B.) longum* CRL para crear un alimento vegetariano funcional portador de microorganismos que aporten propiedades nutricionales. Para seleccionar las bacterias tomaron como criterios de aceptación, la cantidad de carbohidratos disponibles, tales como la sacarosa, rafinosa y/o estaquiosa, la producción de enzimas y la capacidad de hidrolizar proteínas. Realizaron pastas de sojas con diferentes porcentajes de humedad, a las cuales posteriormente se les agregaron diferentes concentraciones de inóculo de bacterias con 1 % (v/p) equivalente a 1.50×10^7 UFC/g, 4 % (v/p) equivalente a 7.9×10^7 UFC/ g y 8 % (v/p) lo que equivale a 1.84×10^7 UFC/ g. Los parámetros monitoreados a lo largo de la

fermentación, que tuvo un lapso de 24 horas, fueron el pH, el crecimiento microbiológico y la temperatura. Al analizar los resultados obtenidos concluyeron que al utilizar la cepa *L. rhamnosus* CRL 981 con la pasta que contenía 80 % de humedad y 4 % de inóculo a 37 °C se obtenía mayor producción de bacterias y por tanto un alimento rico en probióticos.

Asgher *et al.*, (2016) evaluaron la degradación de lignocelulosa de residuos agroindustriales a través del proceso fermentativo en estado sólido utilizando el hongo *Schizophyllum commune* IBL-06. Inocularon el hongo en paja de arroz para posteriormente inocular en otros residuos agroindustriales y lograr una remoción de lignina. Monitorearon parámetros como el tiempo de incubación, pH, temperatura, fuente de carbono y nitrógeno, relación carbono/nitrógeno y efecto de los mediadores. Determinaron que las condiciones óptimas para alcanzar una mayor recuperación de enzima fueron pH de 5, temperatura 35 °C, relación C: N, 20:1, mediador MnSO₄, tamaño de inóculo de 4 mL, tiempo de 144 h. Utilizaron el extracto ligninolítico para la deslignificación de tallo de plátano, mazorcas de maíz, bagazo de caña de azúcar y paja de trigo, logrando remover el 61.7 %, 47.5 %, 72.3 %, y 67.2 % respectivamente. Concluyeron que los residuos lignocelulósicos podrían ser utilizados como un sustrato de bajo costo para la producción de enzimas que juegan un papel importante para sectores industriales y biotecnológicos.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Metodología experimental

La metodología para realizar esta investigación se describe a continuación, en la Figura 2.1 se puede observar el diagrama de bloques que describe por etapas los procedimientos realizados a lo largo de la experimentación.

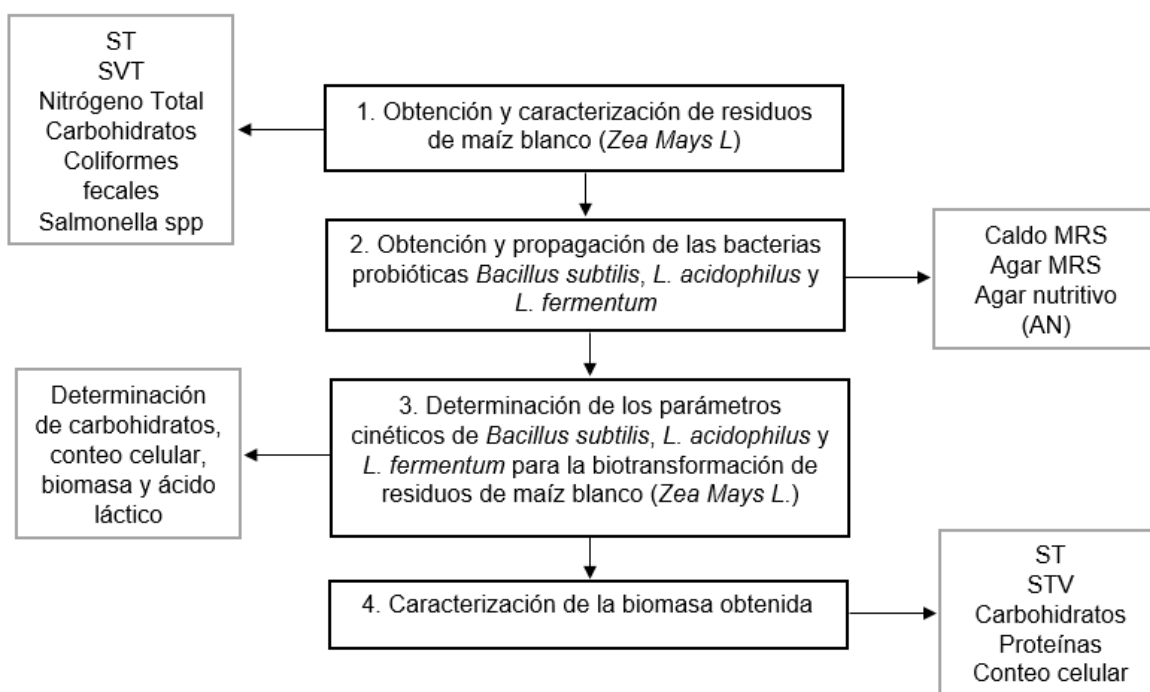


Figura 2.1 Diagrama general de la metodología.

2.2 Obtención y acondicionamiento de los residuos de maíz blanco

La recolección de los residuos de maíz se llevó a cabo en el mercado Emiliano Zapata ubicado en el municipio de Orizaba, Veracruz, México (Figura 2.2).

Las muestras obtenidas fueron sometidas a un proceso de secado durante 48 horas en una estufa a 115 °C. Posterior al secado se realizó una reducción de tamaño de partícula hasta obtener un polvo. Una vez obtenido el polvo se procedió a hacer una

dilución 1:15 con agua purificada para obtener un valor de ST de 4-5 %. La dilución de residuos de maíz se mantuvo en refrigeración a 4 °C hasta el momento de su uso.



Figura 2.2 Olote de maíz blanco.

2.3 Caracterización de los residuos de maíz

Se realizó la caracterización física, química y microbiológica del residuo, con el propósito de conocer las propiedades, composición y los niveles de contaminantes que pudiera presentar. En la Tabla 2.1 se muestran los parámetros evaluados, así como el método bajo el cual se realizó cada análisis.

Tabla 2.1 Parámetros para la caracterización de residuos de maíz blanco.

Parámetros	Unidad	Método
Físicos		
pH	--	Potenciómetro
ST	%m/m	2540 B Standard Methods
STV	%m/m	2540 E Standard Methods
Químicos		
Nitrógeno Total	mg/kg ST	4500-NTK C SM
Carbohidratos	g/L	Antrona-Sulfúrico
Proteínas	%	Micro Kjeldahl
Microbiológicos		
Coliformes fecales	NMP/ g ST	NOM-004-SEMARNAT-2002
Salmonella spp.	NMP/ g ST	NOM-004-SEMARNAT-2002

2.3.1 Determinación de pH

El pH es el parámetro que indica la concentración de iones hidrógeno en una disolución, este parámetro se mide de forma directa en la muestra con ayuda de un potenciómetro. La determinación de pH se realizó a través de un potenciómetro marca Orion modelo 250a.

2.3.2 Determinación de ST

Se define como ST al material residual obtenido después de la evaporación y el secado de la muestra a determinada temperatura. La determinación de ST se realizó mediante la técnica gravimétrica descrita en el método estándar 2540 G de la APHA-AWWA-WPFC (1999) que consistió en evaporar la muestra en un crisol, previamente puesto a peso constante, a 103-105 °C durante 24 horas en una estufa marca Felisa. El incremento de peso sobre el peso del crisol vacío representa la cantidad de ST presentes en la muestra. Para calcular el porcentaje se utilizó la Ecuación 2.1.

$$\%ST = \frac{P_3 - P_1}{P_2 - P_1} * 100 \quad (2.1)$$

Donde:

P₁= Peso del crisol a peso constante

P₂= Peso del crisol a peso constante + peso de la muestra antes de la evaporación

P₃= Peso del crisol a peso constante + peso de la muestra seca

2.3.3 Determinación de STV

De igual manera que los ST, el porcentaje de sólidos totales volátiles (STV) se determinó con el método estándar 2540 G de la APHA-AWWA-WPFC (1999), el cual consiste en calcinar el residuo, producido en la determinación de sólidos totales, a 550 °C en una mufla marca Termolyne durante un lapso de dos horas. El

peso perdido en el crisol tras la incineración del residuo seco representa el contenido en STV. El porcentaje se calculó usando la Ecuación 2.2.

$$\%STV = \frac{P_3 - P_4}{P_3 - P_1} * 100 \quad (2.2)$$

Donde:

P₁= Peso del crisol a peso constante

P₃= Peso del crisol a peso constante + peso del residuo seco

P₄= Peso del crisol a peso constante + peso de la muestra calcinada

2.3.4 Determinación de nitrógeno total

El contenido de nitrógeno total en la muestra se midió mediante el método 4500-NTK C de APHA-AWWA-WPFC (1999), el cual está basado en la digestión de la muestra con ácido sulfúrico concentrado en presencia de selenio (utilizado como catalizador), para llevar a cabo la reducción de nitrógeno orgánico en iones de amonio. Una vez concluida la digestión, se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente para posteriormente pasarla al destilador Micro Kjeldahl en el cual se añadió hidróxido de sodio (40 %) para alcalinizar la muestra y desplazar el equilibrio hacia la formación de amoniaco libre. El amoniaco es arrastrado al vaso receptor en solución de ácido bórico 4 % e indicador rojo-azul de metileno.

Finalmente se realiza la valoración del borato que reacciona con el amoniaco mediante la titulación con ácido sulfúrico de normalidad conocida. El nitrógeno total se calculó usando la Ecuación 2.3.

$$\%N = \frac{G \cdot N \cdot 0.014^*}{M} \cdot 100 \quad (2.3)$$

Donde:

G= mL de solución gastados en la titulación

N= normalidad de la solución en la titulación

M= peso de la muestra

*el valor de 0.014 corresponde a los miliequivalentes de nitrógeno

2.3.5 Determinación de proteínas

Las proteínas son macromoléculas orgánicas de alto peso molecular constituidas básicamente por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Son importantes para el desarrollo de los múltiples procesos vitales. La cuantificación de proteína presente en la muestra se realizó mediante el método Kjeldahl, en el cual, una vez obtenido el valor de nitrógeno se pudo obtener el porcentaje de proteína aplicando la Ecuación 2.4:

$$\%P = \%N * F \quad (2.4)$$

Donde:

%N= porcentaje de nitrógeno

F= factor de conversión (6.25)

2.3.6 Determinación de carbohidratos

La concentración de carbohidratos se determinó a través del método de Antrona-Sulfúrico. Este método permite la cuantificación de una amplia gama de carbohidratos. En presencia de ácido sulfúrico concentrado, los carbohidratos son deshidratados a furfurales los cuales se condensan con antrona dando un complejo azul verdoso.

Se preparó una curva de calibración con solución dextrosa para hacer una correlación matemática y obtener los valores de concentración de acuerdo con la absorbancia.

La muestra se diluyó previamente 1:50, de la cual se tomó 2 mL y se adicionó en un tubo de ensayo al cual se agregaron 8 mL de la solución de antrona-sulfúrico para posteriormente colocar a baño caliente durante 12 minutos a 94 °C. Finalmente se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente para dar paso a la lectura en un espectrofotómetro Thermo Scientific modelo Genesys 20 el cual estaba ajustado a longitud de onda de 620 nm.

2.3.7 Determinación de coliformes fecales

Se utilizó el método para la cuantificación de coliformes fecales en lodos y biosólidos descrito en la NOM-004-SEMARNAT 2003. El método está basado en que las bacterias presentes en la muestra pueden ser separadas dando como resultado una suspensión de células bacteriana. Mediante diluciones sucesivas de la muestra se adquieren inóculos de al menos una célula para obtener crecimiento en el medio de cultivo (tubos positivos). La combinación de resultados positivos y negativos en los tubos permite realizar una estimación de la densidad bacteriana utilizando cálculos de probabilidad.

El número más probable (NMP) de coliformes fecales se genera a partir del código producido por tubos con resultado positivo en medio EC. Si se inoculan tres series de tres tubos, se obtiene el código por el número de tubos positivos en las tres series consecutivas, verificando el valor del NMP correspondiente a través de la Ecuación 2.5.

$$\text{NMP} = \text{NMP (de tablas)} * \left(\frac{10}{\text{mayor volumen inoculado}} \right) \quad (2.5)$$

2.3.8 Determinación de *salmonella spp*

El método utilizado para la determinación de *Salmonella spp* fue el descrito en la NOM-004-SEMARNAT-2003 para llevar a cabo la cuantificación de *Salmonella spp* a través de la técnica de tubos múltiples o NMP en lodos y biosólidos. El método se basa en el enriquecimiento con medios selectivos, que contienen sustancias inhibitoras, favoreciendo la multiplicación de *Salmonella spp* reconstituyendo a su vez la vitalidad de células dañadas e impidiendo el crecimiento de bacterias coliformes asociadas.

El NMP de *Salmonella spp* se obtiene a partir del código compuesto por los tubos positivos en caldo de selenito cistina. Si son inoculados tres series de tubos, el

código se forma por el número de tubos positivos en las tres series consecutivas, verificando el valor del NMP correspondiente a través de la Ecuación 2.5.

2.4 Tratamiento térmico de los residuos de maíz

Se realizó un tratamiento térmico a la muestra con la finalidad de reducir la concentración de agentes patógenos, ya que se pretende que la biomasa obtenida a partir de la biotransformación de residuos sea utilizada como producto alimenticio para ganado. Otro propósito del tratamiento térmico es hacer una hidrólisis que promueva el desdoblamiento y desnaturalización de compuestos orgánicos presentes en el olote, para facilitar a las bacterias probióticas la biotransformación de los residuos de maíz.

El tratamiento consistió en calentar la muestra a 90 °C durante un periodo de tiempo de 30 minutos. Posterior al tratamiento térmico, se realizó una segunda caracterización con los parámetros físicos, químicos y microbiológicos señalados en la Tabla 2.1.

2.5 Obtención y propagación de la bacteria probiótica *Lactobacillus acidophilus*

La bacteria *L. acidophilus* se obtuvo a partir de un medicamento comercial (Figura 2.3) fabricado por la empresa Gelpharma S.A. de C.V. Es un medicamento con presentación de cápsulas que contiene *L. acidophilus*, aceite de soya, aceite vegetal hidrogenado, lecitina de soya y vitamina E.



Figura 2.3 Medicamento comercial con *Lactobacillus acidophilus*.

Se usó como medio de cultivo caldo MRS, el cual es apropiado para el enriquecimiento de *Lactobacillus spp* y otras BAL (Vera Mejía et al., 2021). Se preparó 1 L de caldo MRS, posteriormente fue sometido a un proceso de esterilización en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Las condiciones de incubación fueron de temperatura de 35-37 °C por 24 horas.

2.6 Obtención y propagación de la bacteria probiótica *Lactobacillus fermentum*

La cepa CDBB-B-1893 de *L. fermentum* (Figura 2.4) se obtuvo como cepa pura de la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, el cual se encuentra ubicado en la Colonia San Pedro Zacatenco en la Ciudad de México.

Se usó agar MRS que es un medio de cultivo apropiado para el aislamiento y recuento de lactobacilos y otras BAL. Se preparó 1 L de agar MRS, el cual fue esterilizado en autoclave a 121° C durante 15 minutos. Las condiciones de incubación fueron temperatura de 35-37° C durante 24-72 horas.



Figura 2.4 Cepa pura de *Lactobacillus fermentum*.

2.7 Obtención y propagación de la bacteria probiótica *Bacillus subtilis*

La bacteria *Bacillus subtilis* se obtuvo del fungicida agrícola “SERENADE ASO” (Figura 2.5) fabricado por Bayer CropScience. El contenido neto de este producto es de 1 L. Contiene un solo ingrediente activo, la cepa de *Bacillus subtilis* QST 713 (equivalente a 13.68 g/L, 1×10^3 UFC por 1 mL de producto). Para la propagación de esta bacteria se utilizaron como medio de cultivo AN.



Figura 2.5 Fungicida agrícola con *Bacillus subtilis*.

2.8 Determinación de los parámetros cinéticos de *L. acidophilus*, *L. fermentum* y *Bacillus subtilis* para la biotransformación de residuos de maíz blanco.

En el siguiente apartado se presentan los parámetros monitoreados a lo largo de las cinéticas de fermentación para la obtención de los parámetros cinéticos de bioconversión de los residuos de maíz.

2.8.1 Proceso fermentativo

Posterior a la propagación de las bacterias se llevó a cabo el proceso cinético de fermentación anaerobia. En matraces Erlenmeyer de 250 mL, se ocupó un volumen útil de 150 mL, a los cuales se adicionó el sustrato y el inóculo de bacterias probióticas a diferentes concentraciones (5, 10 y 15 % v/v). Los matraces fueron colocados en una incubadora modelo ZHWY-100B a temperatura constante de 36 °C y en agitación a 110 rpm. Este proceso fue monitoreado durante 3 días y se tomaron muestras cada 8 horas.

2.8.2 Determinación de biomasa

La producción de biomasa se determinó a través del método de pesos seco el cual consistió en centrifugar 10 mL de muestra durante 10 minutos a 10,000 rpm. La centrifuga que se utilizó para la determinación es marca HERMLE-Lubnet Z323. Posteriormente se suspendieron los sólidos dos veces con agua destilada, y repitiendo la centrifugación, para remover la mayor cantidad de compuestos indeseables. Previamente se colocaron crisoles a peso constante y se dejó secar la muestra a 95 °C durante 4 horas.

2.8.3 Determinación de ácido láctico (AL)

La determinación de AL se llevó a cabo mediante la técnica descrita en NMX-F-716-COFOCALEC-2014, que consiste en titular la muestra con solución de NaOH 0.1 N. El cálculo se realizó a partir de la Ecuación 2.6.

$$\text{Ácido láctico } \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right) = \frac{V * N * 90}{M} \quad (2.6)$$

Donde:

V= Volumen gastado de NaOH (mL)

N= Normalidad del NaOH

M= Volumen de la muestra (mL)

2.8.4 Conteo celular

El conteo celular se llevó a cabo mediante la técnica de placa vertida (Peng *et al.*, 2021), con la finalidad de contabilizar el crecimiento bacteriano en unidades formadoras de colonias (UFC). Se realizaron diluciones seriadas para mayor facilidad al momento del conteo y se utilizaron como medios de cultivo, agar MRS y AN. Se utilizó la Ecuación 2.9 para calcular la concentración de bacterias.

$$\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = \text{colonias contadas} \cdot \text{factor de dilucion} \cdot \text{volumen de inóculo} \quad (2.9)$$

2.8.5 Consumo de sustrato

El modelo de Hom fue utilizado para la obtención de los parámetros cinéticos k^* y m . A lo largo de las cinéticas, el consumo de carbohidratos se utilizó como variable de respuesta ya que es un indicativo del comportamiento de las bacterias, para ello se usó la Ecuación 2.8. Cabe mencionar que para la obtención de los parámetros cinéticos se utilizó como herramienta el software GraphPad.

$$\text{Log } \frac{C}{C_0} = -k^* \cdot t^m \quad (2.8)$$

Donde:

C = concentración de carbohidratos en el tiempo n (g/L)

C_0 = concentración inicial de carbohidratos (g/L)

k^* = velocidad de consumo de sustrato

m = constante de Hom

2.9 Diseño experimental

Se utilizó un diseño factorial 3^2 con 3 réplicas sin aleatoriedad, donde las variables independientes fueron la especie de bacteria probiótica (*L. acidophilus*, *L. fermentum* y *Bacillus subtilis*) y el porcentaje de inóculo v/v (5 %, 10 % y 15 %). Se consideraron como variable de respuesta a la producción de AL y consumo de sustrato. A través de este diseño experimental se pudo realizar el análisis de cómo es que interfiere la especie probiótica y la concentración de esta durante el proceso fermentativo. La Tabla 2.2 muestra el diseño experimental utilizado a través del software Minitab 18.

Tabla 2.2 Diseño experimental

Corrida	Bacteria	%Inóculo	Corrida	Bacteria	%Inóculo
1	1	5	15	2	15
2	1	10	16	3	5
3	1	15	17	3	10
4	2	5	18	3	15
5	2	10	19	1	5
6	2	15	20	1	10
7	3	5	21	1	15
8	3	10	22	2	5
9	3	15	23	2	10
10	1	5	24	2	15
11	1	10	25	3	5
12	1	15	26	3	10
13	2	5	27	3	15
14	2	10			

2.10 Calidad de la biomasa obtenida

Al término de las cinéticas se procedió a caracterizar la biomasa obtenida con el propósito de conocer la calidad de esta. En la Tabla 2.3 se muestran los parámetros que se realizaron y el respectivo método que se utilizó.

Tabla 2.3 Parámetros para la caracterización de biomasa.

Parámetros	Unidad	Método
ST	%m/m	2540 B Standard Methods
STV	%m/m	2540 E Standard Methods
Carbohidratos	g/L	Antrona-Sulfúrico
Proteínas	%	Micro Kjeldahl
Conteo celular	UFC	Placa vertida

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente capítulo se presentan los resultados obtenidos de las etapas que constituyen la metodología experimental de este trabajo de investigación. Los resultados son mostrados con la misma secuencia con la que se describieron en el Capítulo 2.

3.1 Caracterización física, química y microbiológica de residuos de maíz.

En la Tabla 3.1 se muestran los resultados obtenidos de la caracterización antes y después de aplicar el tratamiento térmico al sustrato elaborado a partir de residuos de maíz. Cada parámetro se llevó a cabo a partir de la muestra y dos réplicas.

Tabla 3.1 Caracterización física, química y microbiológica de residuos de maíz.

Parámetros	Unidad	Muestra cruda	Muestra con tratamiento térmico
Físicos			
pH	--	6	6.27
ST	%m/m	5.95	6.13
STV	%m/m	96.29	92.90
Químicos			
Nitrógeno Total	%	0.17	0.15
Proteínas	%	1.08	0.94
Carbohidratos	g/L	10.19	20.01
Microbiológicos			
Coliformes fecales	NMP/ g ST	<2000	<2000
Salmonella spp.	NMP/ g ST	<1000	<1000

Se observó que el valor de pH fue de 6 y 6.27 después de ser tratada térmicamente. Este valor se encuentra dentro del rango de pH óptimo utilizado por Zhang *et al.*, (2021), para el crecimiento de la bacteria *Lactobacillus fermentum*, el cual es de 4.5 - 6. En cambio, para el género *Bacillus* se requiere de un pH neutro para un mejor desarrollo de la bacteria.

El valor obtenido de ST fue de 5.95 %, cuyo valor aumentó ligeramente a 6.13 % posterior al tratamiento térmico, mientras que el porcentaje de STV presentó un comportamiento contrario, pues disminuyó de 96.29 % a 92.90 %.

En cuanto a la caracterización química, se analizaron los tres principales componentes que actúan como nutrientes para el desarrollo de bacterias probióticas. Se obtuvo un valor de 1.08 % de proteínas y 0.17 % de nitrógeno, éste último, es similar al valor obtenido por Romero *et al.*, (2020), quienes reportaron un valor de 0.15 % de nitrógeno en residuos agrocañeros, los cuales son considerados como un material lignocelulósico al igual que los residuos de maíz, por esta razón se hace esta comparativa entre ambos materiales lignocelulósicos.

Posterior al tratamiento térmico, se observó que el porcentaje de nitrógeno y proteínas disminuyó a 0.15 % y 0.94 % respectivamente. Limongi *et al.*, (2019) reportaron un valor de proteínas de 9.79 %, el cual corresponde al maíz en su totalidad y no solo al olote. Chan *et al.*, (2021) obtuvieron un valor de 9.77 % de proteína, mencionando que los granos de maíz contienen la mayor cantidad de lípidos y proteínas. La concentración inicial de carbohidratos fue de 10.19 g/L, mientras que en la muestra tratada el valor se duplicó a 20.01 g/L, la cual se encuentra dentro del rango de 4.2 a 67.6 g/L utilizada por Espinel-Ríos *et al.*, (2018), quienes realizaron hidrólisis de residuos de semilla de aguacate.

Se encontró que los residuos de maíz, tanto antes como después del tratamiento térmico, presentan una concentración de coliformes fecales y *Salmonella spp* de <2000 y <1000 NMP/g ST respectivamente. La concentración baja de agentes patógenos pudo deberse al secado que inicialmente se realizó al residuo de maíz y al tratamiento térmico al cual fue sometido, por lo que los coliformes fecales y *Salmonella spp* no resisten temperaturas superiores a 60 °C durante más de 20 minutos (Cota- Espericueta y Ponce-Corral, 2008). Estos valores se encuentran por debajo de los límites máximos permisibles que debe cumplir un lodo de clase C, de acuerdo con lo descrito en la NOM-004-SEMARNAT-2002.

3.2 Obtención y propagación de bacterias probióticas *L. fermentum*, *L. acidophilus* y *Bacillus subtilis*.

Las bacterias se obtuvieron a partir de productos comerciales, por lo que la propagación se realizó primero en cajas Petri con agar MRS (*L. acidophilus* y *L. fermentum*) y AN (*Bacillus subtilis*), ya que son los medios que brindan los nutrientes necesarios para el crecimiento de las bacterias probióticas que se utilizaron.

Posterior a la propagación en medio sólido, se procedió a hacer la propagación en medio líquido, para la cual se utilizó caldo MRS. En la Figura 3.1 se puede observar la propagación de las bacterias *Bacillus subtilis*, *L. acidophilus* y *L. fermentum* en medio sólido.

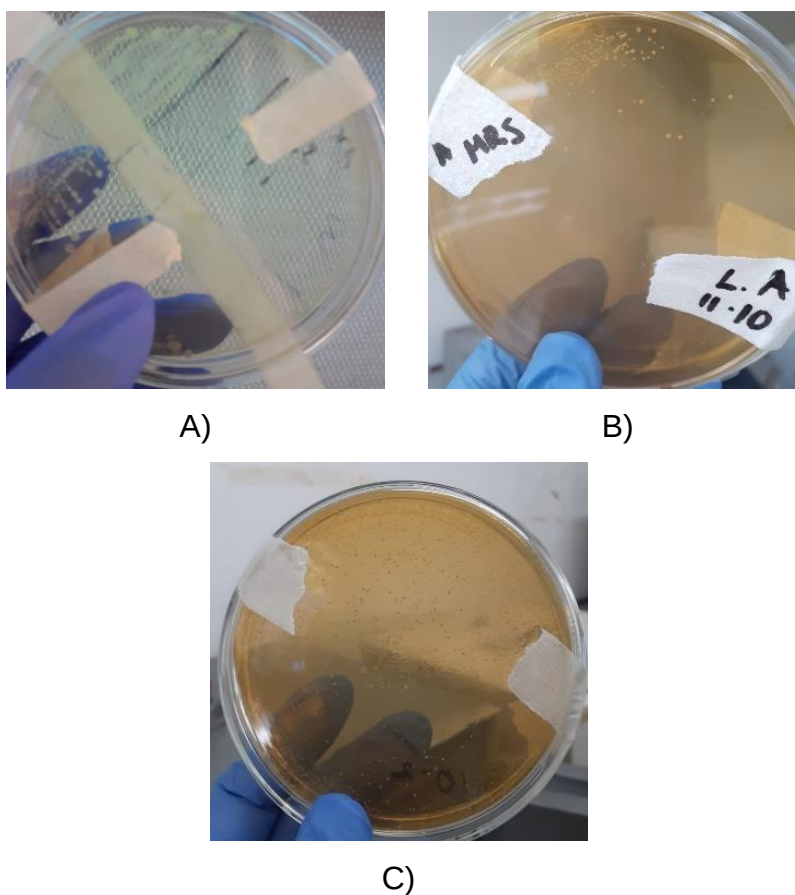


Figura 3.1 A) *Bacillus subtilis*, B) *L. acidophilus*, C) *L. fermentum*

3.3 Producción y rendimiento de biomasa

Se entiende por biomasa a la cantidad de células que existen en un cultivo, en un organismo, en una colonia o creciendo en una superficie. Dicho esto, se evaluó la concentración inicial y final de la producción de biomasa, así como los rendimientos de producción.

3.3.1 *Bacillus subtilis*

En la Tabla 3.2 se muestran las concentraciones iniciales y finales de biomasa en g/L correspondiente a cada de las concentraciones de inóculo utilizadas a lo largo de las cinéticas. Se puede observar que el experimento en el que se utilizó 5 % de inóculo obtuvo mayor producción de biomasa y por tanto mayor rendimiento, siendo este de 1.48 g biomasa/ g sustrato.

Tabla 3.2 Producción y rendimiento de biomasa utilizando *Bacillus subtilis*.

Inóculo	Concentración (g/L)		$Y_{p/s}$ (g biomasa/g sustrato)
	Inicial	Final	
5%	16.47	22.56	1.48
10%	12.69	18.31	0.46
15%	20.60	25.86	1.01

3.3.2 *Lactobacillus acidophilus*

Esta especie fue la bacteria que mayor rendimiento de producción de biomasa obtuvo en comparación con las demás bacterias, pues al utilizar inóculo de 5, 10 y 15 %, por cada gramo de sustrato se produjeron 0.84, 1.71 y 2.26 g de biomasa respectivamente. Cabe mencionar que al utilizar una concentración de 15% de inóculo hubo mayor producción de biomasa (30.81 g/L). Esto se comprueba con el rendimiento de producción que fue de 2.26 g biomasa /g sustrato. La Tabla 3.3 muestra los valores de concentración de biomasa al inicio y al término del proceso fermentativo.

Tabla 3.3 Producción y rendimiento de biomasa utilizando *Lactobacillus acidophilus*.

Inóculo	Concentración (g/L)		$Y_{p/s}$ (g biomasa /g sustrato)
	Inicial	Final	
5%	18.59	24.29	0.84
10%	17.88	26.24	1.71
15%	16.24	30.81	2.26

3.3.4 *Lactobacillus fermentum*

Al utilizar la bacteria *Lactobacillus fermentum* se obtuvieron menores rendimientos de biomasa debido a la pequeña cantidad de sustrato consumido por el microorganismo. Sin embargo, hubo mayor producción de biomasa en el experimento en el cual se utilizó 15% de inóculo, pues la concentración final de biomasa fue de 62.02 g/L. La Tabla 3.4 comprende los valores iniciales y finales de concentración de biomasa al igual que los rendimientos obtenidos por cada una de las dosis empleadas.

Tabla 3.4 Producción y rendimiento de biomasa utilizando *Lactobacillus fermentum*.

Inóculo	Concentración (g/L)		$Y_{p/s}$ (g biomasa /g sustrato)
	Inicial	Final	
5%	34.51	42.05	0.30
10%	35.48	47.01	0.17
15%	42.91	62.02	0.12

3.4 Producción y rendimiento de ácido láctico

El AL es un componente producido por BAL que son capaces de utilizar diferentes fuentes de carbono, en este caso residuos de maíz, para sintetizarlo. La concentración y el rendimiento de producción de AL fueron analizados para cada una de las bacterias utilizando diferentes concentraciones de inóculo.

3.4.1 *Bacillus subtilis*

Considerando las tres concentraciones de inóculo, en promedio se produjeron 9.75 g/L de AL a partir de *Bacillus subtilis*. El rendimiento de producción fue de 1.09, 2.57 y 0.84 g AL/g sustrato para 5, 10 y 15 % de inóculo respectivamente. Los

rendimientos obtenidos son similares al reportado por Jiang *et al.* (2019) quienes al realizar fermentación anaerobia de mazorcas de maíz a través de la bacteria *Bacillus coagulans* obtuvieron un rendimiento de 0.85 g AL/g sustrato con una concentración final de AL de 68 g/L. A pesar de que esta especie no está considerada como una bacteria homofermentativa, autores como Gao *et al.* (2012) reportaron una concentración de 113.9 g/L en la fermentación anaerobia de glucosa con extracto de levadura y licor de maíz, demostrando que la bacteria tiene un gran potencial como sintetizador de AL, además de que sus requerimientos nutricionales no son tan demandantes para la producción de AL (Abedi y Hashemi, 2020).

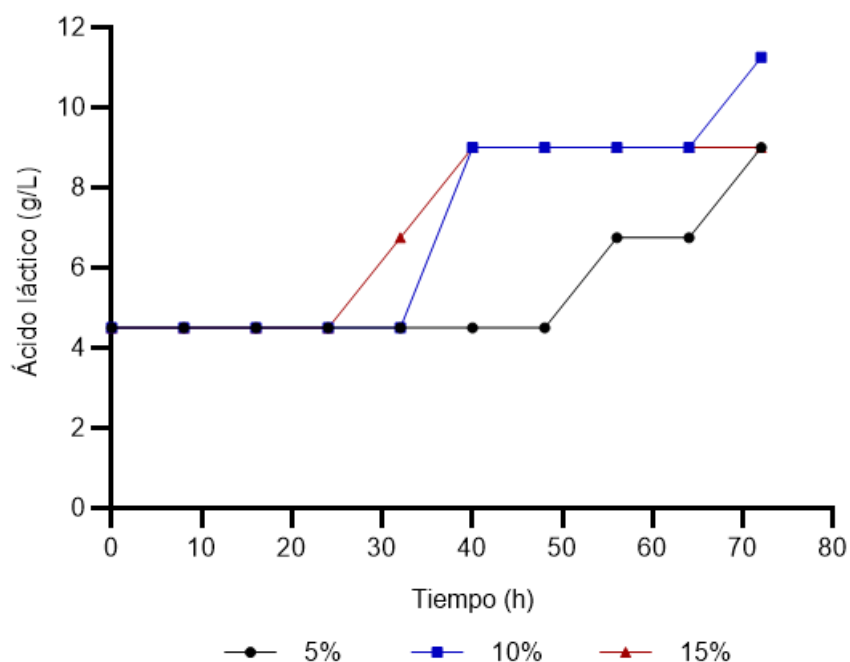


Figura 3.2 Producción de AL con *Bacillus subtilis*.

3.4.2 *Lactobacillus acidophilus*

La producción de AL utilizando la bacteria *Lactobacillus acidophilus* fue menor en comparación con *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus fermentum*. En la Figura 3.3 se puede observar que la concentración máxima alcanzada fue de 6.5 g/L con el experimento en el que se utilizó 15 % de inóculo, el cual obtuvo un rendimiento de producción de 0.34 g AL/ g sustrato, mientras que con 5 % de inóculo el rendimiento

fue de 0.49 g AL/ g sustrato y concentración máxima de 6.75 g/L de AL. Estas concentraciones son semejantes a las reportadas por Vera Mejía *et al.*, (2021) quienes obtuvieron una concentración de 3.28 g/L de AL tras utilizar la bacteria *Lactobacillus plantarum* en un medio conformado por melaza de caña, suero de leche y levadura. En cuanto al inóculo del 10 % la concentración de AL se mantuvo constante a lo largo de la cinética por lo que no hubo rendimiento de producción.

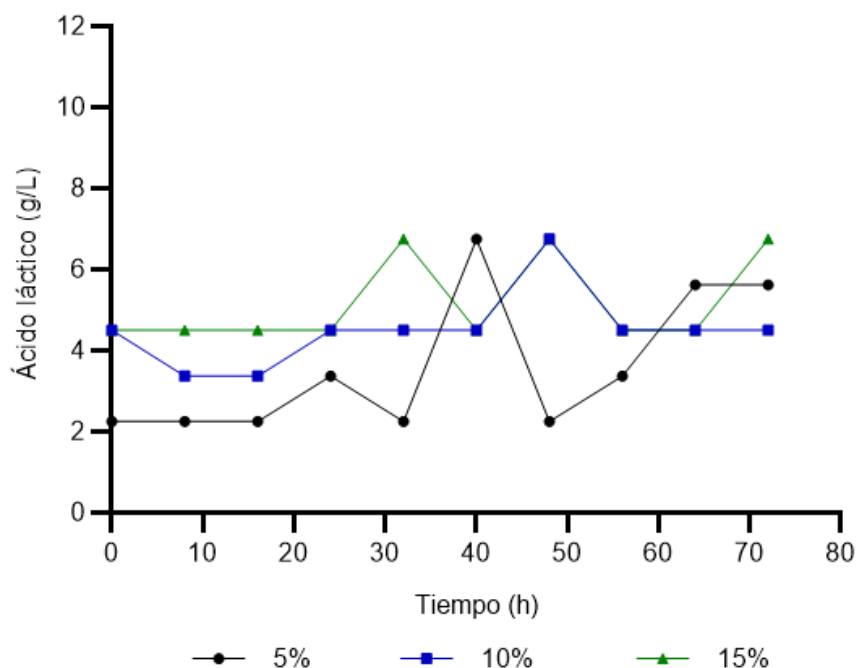


Figura 3.3 Producción de AL con *Lactobacillus acidophilus*.

3.4.3 *Lactobacillus fermentum*

El promedio de concentración final de AL fue de 11 g/L, que es aún inferior al citado por Abedi y Hashemi (2020), quienes reportan una concentración de 18 g/L al utilizar la bacteria *L. Delbrueckii sp. Bulgaricus* CICC21101 y 20.95 g/L usando la mezcla de *Lb. Rhamnosus* y *Lb. brevis*, ambos en la fermentación de rastrojo de maíz. En cuanto a la producción de AL, el rendimiento para el inóculo 5, 10 y 15 % fue de 3.55, 3.26 y 4.05 g AL/g sustrato respectivamente.

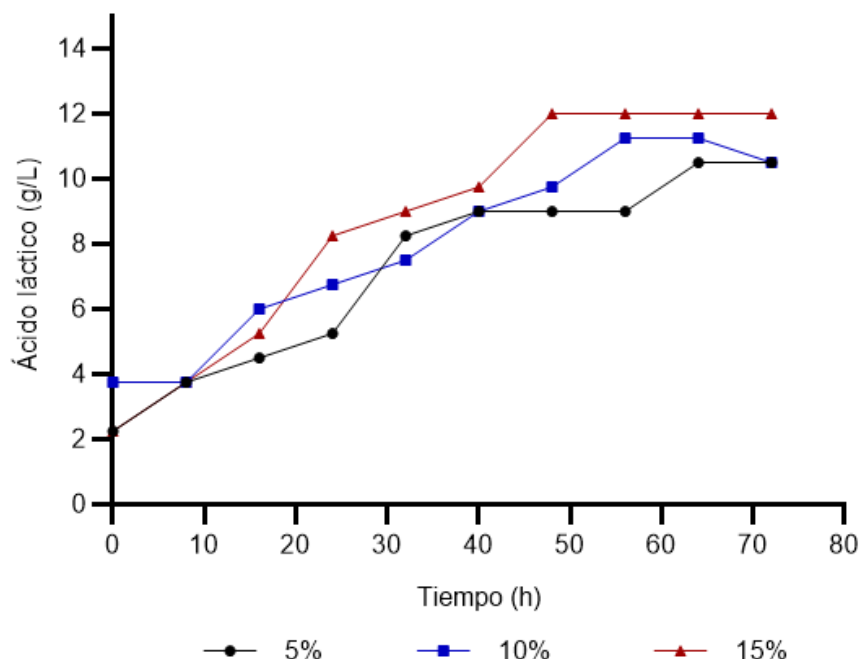


Figura 3.4 Producción de AL con *Lactobacillus fermentum*.

3.5 Cinética microbiana de bacterias probióticas en residuos de maíz

La tasa de crecimiento microbiana es importante para estudios en los que están implicados los microorganismos, ya que estas extraen nutrientes del medio en el que se encuentran para aprovecharlos como fuente de energía, biosíntesis o formación de nuevos productos (Shuler *et al.*, 2017).

3.5.1 *Bacillus subtilis*

A continuación, se muestra la Figura 3.5 donde se puede observar el desarrollo de la bacteria a lo largo de la cinética de 72 horas. A partir de las 8 horas, la concentración de microorganismos disminuye considerablemente. La concentración inicial de microorganismos fue de 1×10^5 UFC/mL para el inóculo de 5 y 10 %, mientras que para el experimento en el que se utilizó el 15 % de inóculo la concentración fue de 2×10^5 UFC/mL. Al finalizar el proceso fermentativo, las concentraciones fueron de 1.6×10^3 , 6×10^2 , 8×10^3 UFC/mL para las

concentraciones de inóculo de 5, 10 y 15 % respectivamente. La disminución en la concentración microbiana pudo deberse a la falta de sustrato disponible para el consumo de las bacterias y al valor de pH (5.1) presente en la fermentación, que de acuerdo a lo mencionado por Abedi y Hashemi (2020) un pH bajo tiene un impacto inhibitorio sobre el metabolismo celular ya que gran cantidad de BAL no puede crecer por debajo de un pH de 4, por ello se utiliza la cal como neutralizador de pH, sin embargo no es recomendable ya que se corre el riesgo de producción de lactato de calcio en la fermentación, esto conduciría a la utilización de ácido sulfúrico para la obtención de AL a partir del lactato de calcio provocando problemas de eliminación de desechos, problemas de corrosión y un costo significativo en el paso de metabolitos, como lo es el AL. A pesar de esto, la bacteria *Bacillus subtilis* demostró tener un gran potencial, sin concentraciones elevadas, para lograr la biotransformación de los residuos de maíz. La producción de ácidos orgánicos puede provocar la inhibición de crecimiento bacteriano de acuerdo con Herrera *et al.*, (2008), quienes reportaron un decrecimiento a las 16 horas de fermentación anaerobia con excretas de pollo

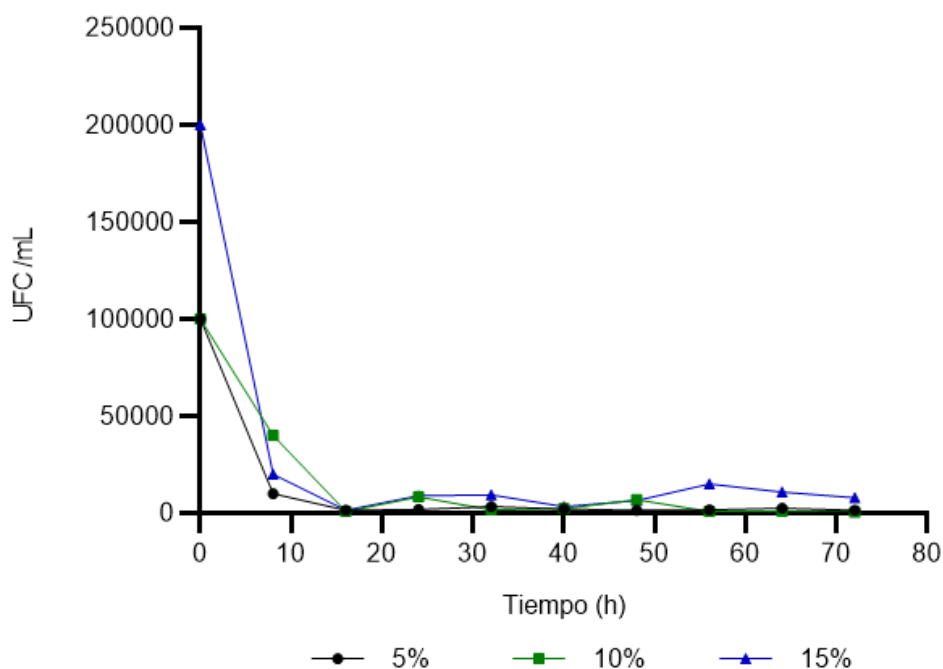


Figura 3.5 Cinética microbiana de la especie *Bacillus subtilis*.

3.5.2 *Lactobacillus acidophilus*

La Figura 3.6 muestra la cinética microbiana en la que se utilizó la bacteria *Lactobacillus acidophilus*. En comparación con las cinéticas llevadas a cabo con *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus fermentum*, esta cinética presentó concentraciones más altas de microorganismos, pues la concentración final fue de 7.62×10^{10} , 7.56×10^{10} y 7.57×10^{10} UFC/ mL para el inóculo de 5, 10 y 15 % respectivamente, esto debido a que la producción de AL fue muy baja, favoreciendo así el desarrollo y crecimiento de los microorganismo, ya que de acuerdo con Herrera *et al.*, (2008) las concentraciones altas de ácidos orgánicos pueden provocar la lisis celular.

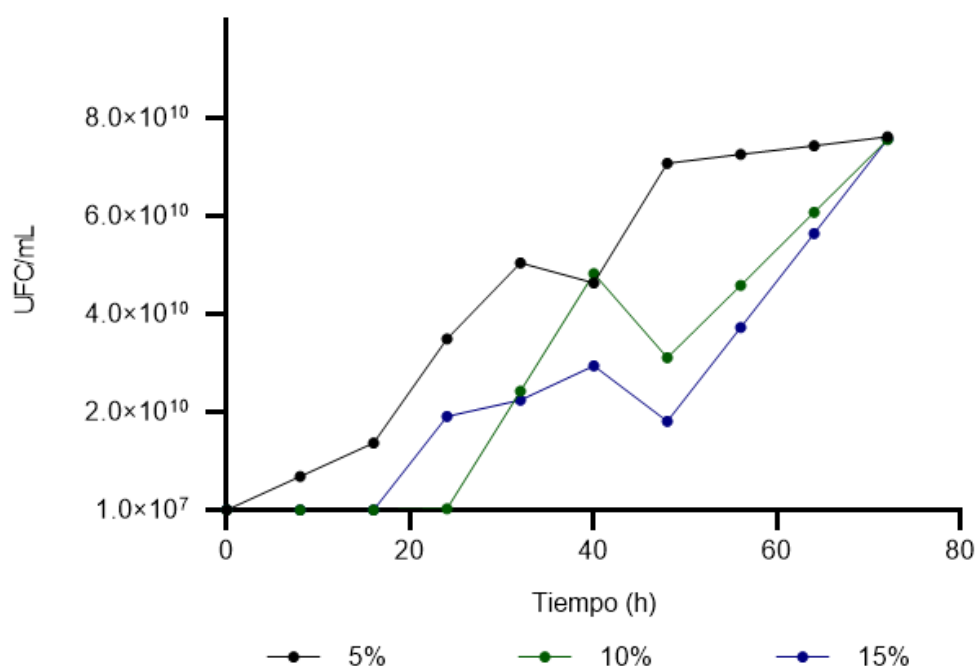


Figura 3.6 Crecimiento microbiano de la especie *Lactobacillus acidophilus*.

3.5.3 *Lactobacillus fermentum*

En la Figura 3.7 se muestra el comportamiento del crecimiento de la bacteria *Lactobacillus fermentum* en las tres concentraciones de inóculo utilizadas para la realización de las cinéticas. Se aprecia como a partir de las 15 horas de experimentación decrece la concentración microbiana. La cinética con 5 % de

inóculo comenzó con una concentración de 9.8×10^6 UFC/mL y finalizó con 6.9×10^6 UFC/mL. En cuanto al experimento con el cual se utilizó 10 % de inóculo, la concentración inicial y final fue de 1.2×10^7 UFC/mL y 1.6×10^6 UFC/mL respectivamente disminuyendo tan solo una orden de magnitud. Esto pudo ocasionarse al pH presente en la fermentación, el cual fue de 5.4, pues las BAL tienen una baja sensibilidad al pH, lo que conduce al uso de grandes cantidades de agentes neutralizantes, incluyendo CaCO_3 que da como resultado la producción de yeso en el medio de fermentación Abedi y Hashemi (2020). Finalmente, al utilizar el inóculo de 15 %, la cinética dio inicio con una concentración 2×10^7 UFC/mL y finalizó con 1.4×10^6 UFC/mL.

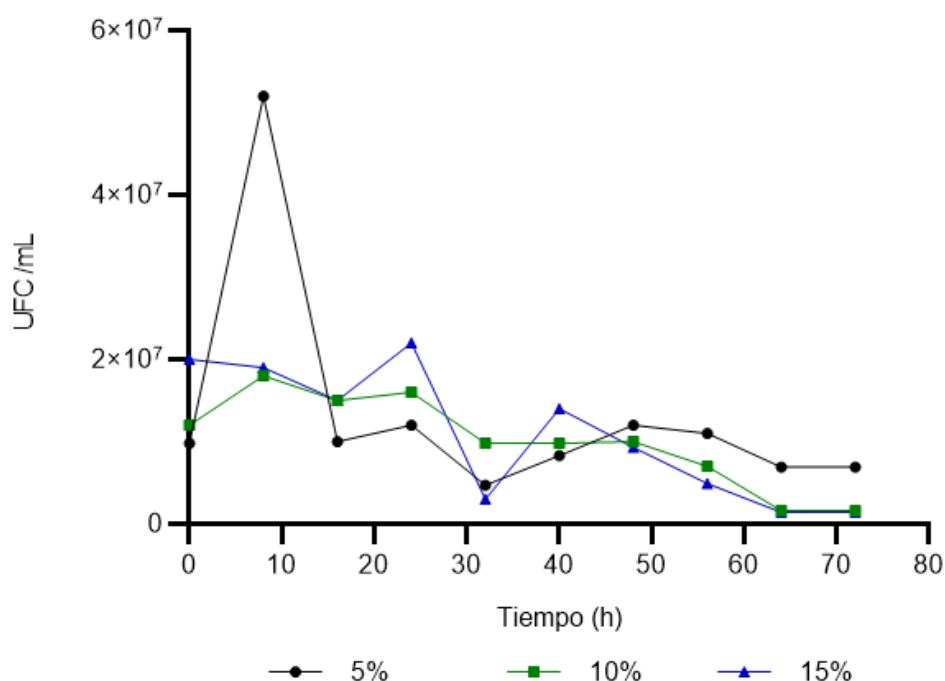


Figura 3.7 Cinética microbiana de la especie *Lactobacillus fermentum*.

3.6 Consumo de carbohidratos a través del modelo de Hom

Una manera de determinar que las bacterias están realizando la biotransformación del sustrato es a través de la concentración de carbohidratos consumidos durante la fermentación anaerobia. Para ello se analizaron los datos obtenidos a través del modelo de Hom.

3.6.1 *Bacillus subtilis*

En la Figura 3.8 se puede observar el comportamiento del consumo de sustrato, que está representado por la remoción de carbohidratos y ajustado al modelo de Hom, utilizando la bacteria *Bacillus subtilis* con tres concentraciones diferentes de inóculo (5, 10 y 15% v/v).

La Tabla 3.5 comprende los valores de k y m obtenidos para cada una de las concentraciones de inóculo. En las tres diferentes concentraciones el modelo se ajusta de manera adecuada. De acuerdo con los resultados, el valor mas pequeño de m (0.5330) corresponde al experimento en el que se utilizó el inóculo de 5 %, la misma concentracion que utilizaron Pleissner *et al.*, (2016) al realizar fermentacion de pulpa de café con *Bacillus coagulans*. Esto indica que hubo un mejor acondicionamiento de la bacteria durante esta cinética, lo cual se corrobora con el valor de la velocidad de consumo de sustrato, k , (0.0592) siendo mayor a lo obtenido en las cinéticas con concentraciones de inóculo de 10 % y 15 %.

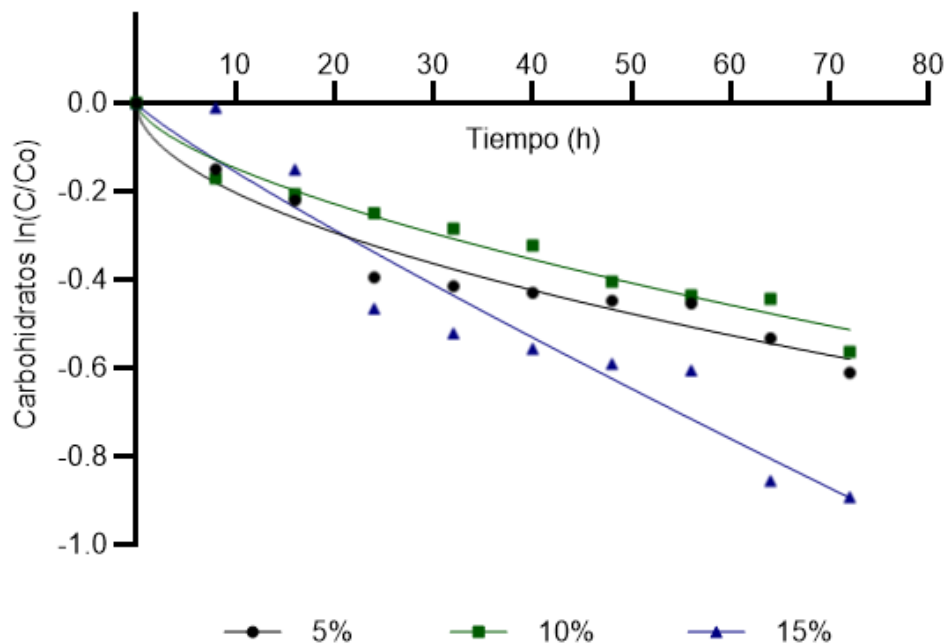


Figura 3.8. Consumo de sustrato a través del modelo de Hom con *Bacillus subtilis*.

Tabla 3.5 Parámetros cinéticos del consumo de carbohidratos con *Bacillus subtilis*.

Concentración de inóculo	k^*	m	R^2
5 %	0.05928	0.5330	0.9568
10 %	0.03420	0.6333	0.9701
15 %	0.02012	0.8870	0.9325

3.6.2 *Lactobacillus acidophilus*

En cuanto a la bacteria *Lactobacillus acidophilus* se puede observar que las tres dosis se ajustan al modelo de manera adecuada, siendo estos de 0.9574, 0.9648 y 0.9492 para 5, 10 y 15 % de inóculo respectivamente. En la Figura 3.9 se muestra como al utilizar el inóculo del 10 % la curva se encuentra más cercano a la pendiente por lo que hay un mejor ajuste al modelo, lo que se comprueba con el valor de R^2 mostrado en la Tabla 3.2. Con respecto a los parámetros cinéticos obtenidos, al utilizar el 10 % de inóculo, el valor de k (0.02534) es el más alto en comparación con las demás dosis y m (0.7609) el valor más pequeño, por lo que se sugiere un consumo más rápido del sustrato y una mejor adaptación de la bacteria.

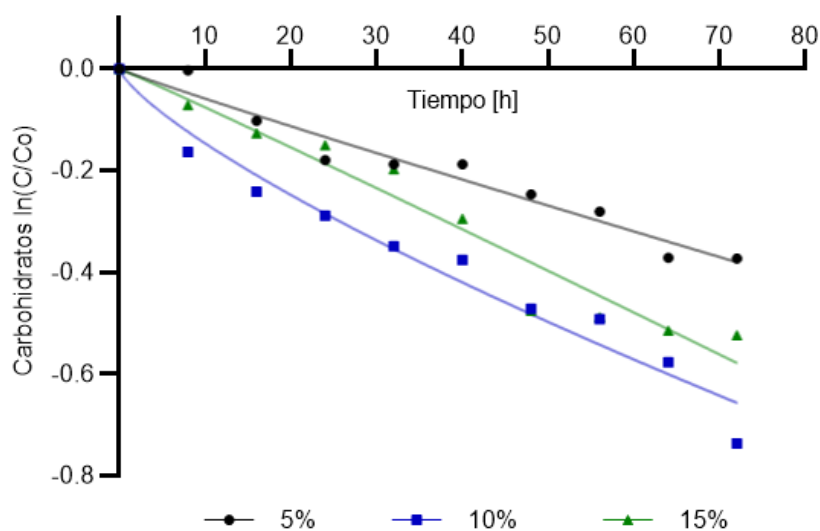


Figura 3.9. Consumo de sustrato a través del modelo de Hom con *Lactobacillus acidophilus*.

La Tabla 3.6 muestra los parámetros cinéticos obtenidos del proceso fermentativo utilizando la bacteria *Lactobacillus acidophilus*.

Tabla 3.6 Parámetros cinéticos del consumo de carbohidratos con *Lactobacillus acidophilus*.

Concentración de inóculo	k^*	m	R^2
5 %	0.006569	0.9488	0.9574
10 %	0.02534	0.7609	0.9648
15 %	0.007023	1.031	0.9492

3.6.3 *Lactobacillus fermentum*

La Figura 3.10 muestra como la curva del inóculo de 5% se encuentra más cercana a la pendiente, esto indica que el modelo se ajusta de manera adecuada, en comparación con las dos concentraciones restantes (10 y 15 %), esto se comprueba con el valor de R^2 (0.9043).

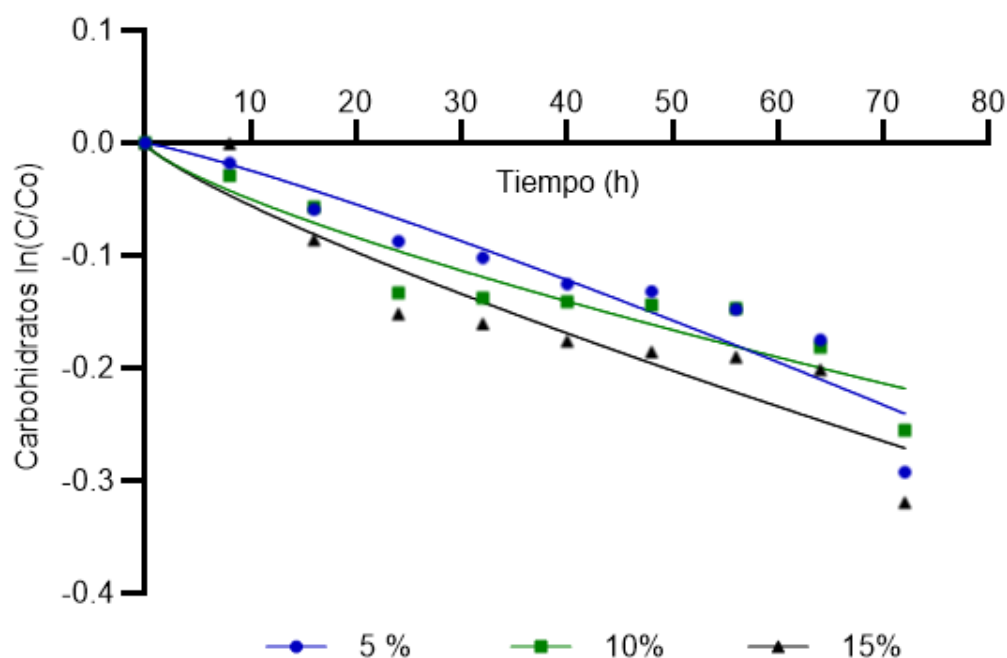


Figura 3.10 Consumo de sustrato a través del modelo de Hom con *Lactobacillus fermentum*.

La Tabla 3.7 contiene los valores de k y m para cada dosis. Al utilizar el inóculo de 10 %, la velocidad de consumo de sustrato, k (0.008884), y la constante de Hom, m (0.7484), sugieren un consumo y velocidad de reacción más rápida que las demás dosis utilizadas. A pesar de obtener un factor de correlación de 89%, es decir,

ligeramente más pequeño que al utilizar el inóculo de 5%, se estima que el ajuste es adecuado pues se está tratando con microorganismos vivos.

Tabla 3.7 Parámetros cinéticos del consumo de carbohidratos con *Lactobacillus fermentum*.

Concentración de inóculo	k*	m	R ²
5 %	0.001683	1.160	0.9034
10 %	0.008884	0.7484	0.8965
15 %	0.008693	0.8042	0.8861

3.7 Calidad de la biomasa obtenida

Se realizó la caracterización de la biomasa obtenida de las cinéticas de fermentación con la finalidad de evaluar la calidad de la misma, ya que se pretende que pueda utilizarse como un producto alimenticio para ganado y revalorizar los residuos de maíz.

3.7.1 *Bacillus subtilis*

De acuerdo con los resultados, el porcentaje de ST en la biomasa obtenida utilizando *Bacillus subtilis* es muy similar al igual que el porcentaje de STV, donde el rango se encuentra de 14-16 % ST y 97-98 % STV. En cuanto al contenido de carbohidratos, el rango de concentración es de 8-9.5 g/L. El porcentaje de proteínas es similar en las dosis del 5 y 10% de inóculo, mientras que el porcentaje más alto de proteínas pertenece a la biomasa en la que se utilizó 15% de inóculo. La concentración celular en las biomasas obtenidas es relativamente baja para ser considerado como un alimento rico en probióticos, pues la concentración más alta de 2.3×10^3 . En la Tabla 3.8 se observan los valores obtenidos de la caracterización de la biomasa con *Bacillus subtilis* en las tres concentraciones utilizadas.

Tabla 3.8. Caracterización de biomasa de *Bacillus subtilis*.

Parámetros	Unidad	5%	10%	15%
ST	%m/m	14.4077	15.8263	16.5634
STV	%m/m	97.3018	97.2611	98.3279
Carbohidratos	g/L	9.5794	9.4766	8.1661
Proteínas	%	1.7983	1.9644	3.3519
Conteo celular	UFC/g	1.7×10^3	9.66×10^2	2.3×10^3

3.7.2 *Lactobacillus acidophilus*

La Tabla 3.9 comprende los resultados de la caracterización de la biomasa con *Lactobacillus acidophilus* en las tres dosis de inóculo ocupadas a lo largo de las cinéticas. De acuerdo con los datos el porcentaje de ST es similar para las tres dosis al igual que el porcentaje de STV, siendo este de 16-18 % ST y 97-99 % STV. La concentración de carbohidratos es muy parecida entre las tres dosis, siendo el promedio de concentración de 10.6 g/L. El contenido proteico es más alto en la biomasa con la que se utilizó 10% de inóculo, sin embargo, este valor se encuentra por debajo al reportado por Miranda Yuquilema *et al.* (2018), quienes obtuvieron un porcentaje de proteína cruda de 10.8 % en un preparado con melaza de caña de azúcar y vinaza de naranja adicionado con *L. acidophilus*, *L. bulgaris* y *S. thermophilus*. Finalmente, la concentración de probióticos presente en la biomasa fue de 3.1×10^9 , 2.2×10^9 y 1×10^9 UFC/ g para la biomasa con 5, 10 y 15 % de inóculo. Dichas concentraciones son favorables para considerar a la biomasa como un alimento funcional rico en probióticos.

Tabla 3.9. Caracterización de biomasa de *Lactobacillus acidophilus*.

Parámetros	Unidad	5%	10%	15%
ST	%m/m	17.89	18.4542	16.9177
STV	%m/m	98.9153	99.0622	97.4082
Carbohidratos	g/L	10.6093	10.6961	10.6465
Proteínas	%	2.7513	3.4972	2.6757
Conteo celular	UFC/g	3.1 x10 ⁹	2.2 x10 ⁹	6x10 ⁹

3.7.3 *Lactobacillus fermentum*

De igual manera, el porcentaje de ST y STV tiene similitud entre las biomásas obtenidas a partir de diferentes concentraciones de inóculo. El rango de porcentaje de ST oscila entre 14-17 % y de STV de 96-98 %. La concentración más alta de carbohidratos pertenece a la biomasa obtenida con 5% de inóculo, mientras que la más baja corresponde a la obtenida con 15 % de inóculo. En relación con el contenido de proteínas, la biomasa resultante de la cinética con 10 % de inóculo presento el mayor porcentaje de proteína. Por otro lado, el conteo celular demuestra que la biomasa del 5 y 10 % de inóculo presentan mayor concentración de probióticos con un valor de 1.75×10^5 y 2.1×10^5 respectivamente. Esta concentración es cercana a la concentración mínima requerida para garantizar la acción del probiótico, la cual es de 1×10^6 UFC/mL (Sosa Cossio *et al.*, 2020).

Tabla 3.10. Caracterización de biomasa de *Lactobacillus fermentum*.

Parámetros	Unidad	5%	10%	15%
ST	%m/m	14.6130	16.1717	17.0568
STV	%m/m	98.2897	96.5426	97.0698
Carbohidratos	g/L	9.2455	8.9875	7.9081
Proteínas	%	2.5458	2.8253	1.9955
Conteo celular	UFC/g	1.75×10^5	2.1×10^5	6.2×10^4

3.8 Análisis de varianza

De acuerdo con el análisis de varianza, el tipo de bacteria es un factor que influye en la cantidad de sustrato consumido, ya que el valor de p es menor a 0.05, siendo este $p=0$. Esto se comprueba con el diagrama de Pareto, mostrado en la Figura 3.11 A, en el cual se observa que la bacteria y la interacción entre bacteria e inóculo son factores estadísticamente significativos, mientras que el porcentaje de inóculo no es un factor que influya en la cantidad de carbohidratos consumidos, esto se comprueba con el valor de $p=0.195$ sobrepasando a 0.05.

La gráfica de efectos principales, mostrada en la Figura 3.11 B, demuestra que la bacteria 1, referida a la bacteria *Bacillus subtilis*, está relacionada con mayor cantidad de carbohidratos consumidos en comparación con las demás bacterias. En cuanto al porcentaje de inóculo, la dosis del 10 % también muestra una relación con cantidades altas de remoción de carbohidratos, esto concuerda con que dos de las tres bacterias (*Lactobacillus fermentum* y *acidophilus*) utilizadas presentaran un mejor ajuste al modelo de Hom, que brinda los parámetros cinéticos para la biotransformación del sustrato, ya que con estas dos especies el valor de m fue más alto lo que indica que las bacterias se adaptaron al sustrato, al igual que el valor de k que sugiere una velocidad de reacción más rápida. Por lo que para obtener mayor cantidad de sustrato consumido se podría recomendar la especie *Bacillus subtilis* con dosis de 10 % de inóculo.

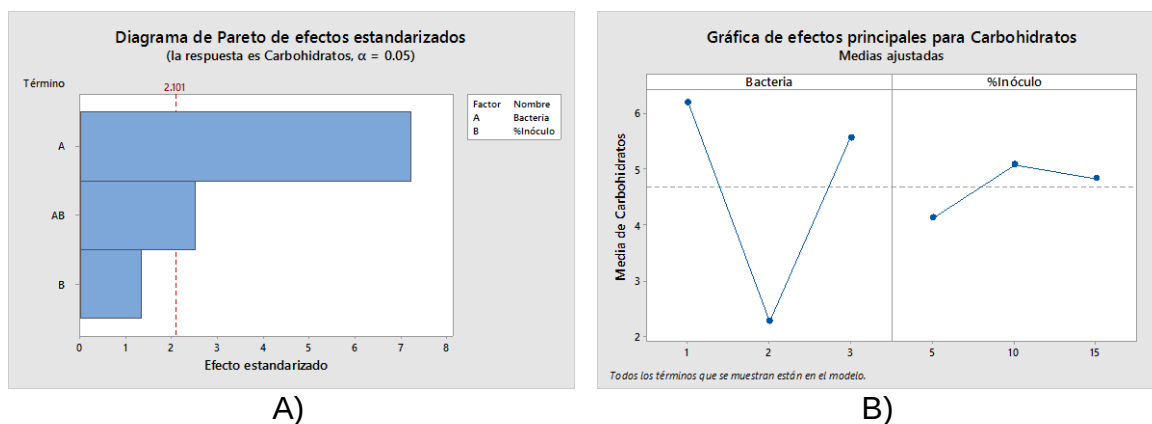


Figura 3.11 Análisis de varianza siendo la variable de respuesta la cantidad de carbohidratos consumidos. A) Diagrama de Pareto, B) Gráfica de efectos principales.

Del mismo modo, el factor A (bacteria) influye de manera significativa en la producción de AL, al igual que la interacción entre bacteria y porcentaje de inóculo, esto deducido a partir del Diagrama de Pareto ilustrado en la Figura 3.12 A.

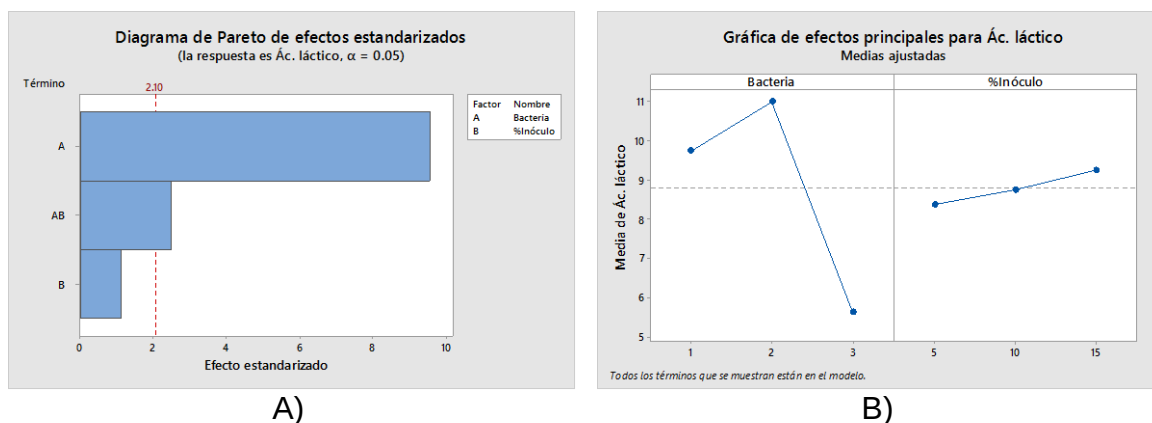


Figura 3.12 Análisis de varianza siendo la variable de respuesta la cantidad de carbohidratos consumidos. A) Diagrama de Pareto, B) Gráfica de efectos principales.

La gráfica de efectos principales (Figura 3.12 B) sugiere que la bacteria 2, referida a la especie *Lactobacillus fermentum*, se encuentra relacionada con cantidades de producción de AL mayores que las dos bacterias restantes, en efecto se obtuvieron mayores rendimientos de producción de AL empleando esta especie siendo para el inóculo 5, 10 y 15 % de 3.55, 3.26 y 4.05 g AL/g sustrato respectivamente. De tal modo que para obtener una mayor producción de AL podría utilizarse la bacteria *Lactobacillus fermentum* con hasta 15 % de inóculo.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

La caracterización fisicoquímica del sustrato, antes y después del tratamiento térmico presentó pequeñas variaciones, sin embargo, las concentraciones de nutrientes, como nitrógeno (0.94 %) y carbohidratos (20.01 g/L), fueron las suficientes para el crecimiento y desarrollo de la bacteria. La concentración baja de agentes patógenos puede deberse al secado que inicialmente se realizó al residuo de maíz, por lo que el proceso fermentativo se ve beneficiado al no competir con la presencia de otros microorganismos.

En cuanto a la propagación de las bacterias probióticas, la bacteria *Lactobacillus fermentum* requirió de menor manipulación y propagación pues se adquirió como cepa pura, por lo que fueron omitidos algunos pasos como la propagación en medio sólido. Las bacterias que fueron obtenidas a partir de productos comerciales (*Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis*) requirieron de mayor tiempo para su propagación, debido al contenido adicionado en el medicamento y en el fungicida que las contenía, no obstante presentaron funcionalidad en el proceso de biotransformación de los residuos de maíz.

Los parámetros cinéticos, obtenidos a través del modelo de Hom, sugieren que al utilizar concentraciones de 5 % de inóculo para la bacteria *Bacillus subtilis* y 10% de inóculo para las bacterias *L. fermentum* y *L. acidophilus*, la velocidad de reacción y el consumo de sustrato es acelerado en comparación con las otras dosis, esto de acuerdo con los valores de k , los cuales fueron 0.0592, 0.0253 y 0.0088 respectivamente, y la constante de Hom, cuyos valores fueron 0.5330, 0.7609 y 0.7484. Por tanto, las bacterias se adaptan a esta concentración logrando así la bioconversión de los residuos de maíz.

De acuerdo con el análisis de varianza, el factor bacteria influye de manera significativa ($p=0$) sobre la cantidad de sustrato consumido y producción de AL. De manera que la bacteria *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus acidophilus* fueron las que mayor porcentaje de remoción de carbohidratos obtuvieron (46.07 % y 55.32 %) y

a su vez mayor producción de AL, con un valor de 13.5 g/L y 6.75 g/L respectivamente.

Dicho esto, el uso de la bacteria *Bacillus subtilis* sugiere que se podrían utilizar concentraciones mayores de sustrato para lograr una mayor producción de AL, por lo que se podría catalogar como una bacteria con alto potencial para la biotransformación de residuos de maíz.

La calidad de biomasa obtenida, después del proceso fermentativo con probióticos, presenta un aumento del 251 % en el contenido proteico al utilizar la bacteria *Bacillus subtilis* con una concentración final de proteínas de 2.36 %, seguido de la bacteria *Lactobacillus fermentum* la cual incremento 260% la concentración de proteínas, siendo el valor final de 2.45 % de proteínas. Finalmente, la concentración más alta de proteínas se obtuvo a través de *Lactobacillus acidophilus* con 2.97 % de proteínas, incrementando su valor 315 % más. Además de que dicha biomasa aportará cierta cantidad de probióticos (1×10^6) que garantiza el efecto beneficioso de la bacteria hacia el huésped.

En cuanto a los rendimientos de biomasa, los experimentos en los cuales se utilizó el inóculo del 5 % con las bacterias *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus fermentum* se obtuvieron mayores rendimientos de producción de biomasa siendo estos valores 1.48 y 0.30 g biomasa/g sustrato respectivamente, mientras que para la bacteria *Lactobacillus acidophilus*, se alcanzó el rendimiento de producción más alto (2.26 g biomasa/g sustrato) empleando el inóculo de 15%.

Se concluye que los residuos de maíz blanco (*Zea Mays L.*) tienen potencial para ser utilizados como alimento para ganado debido al contenido nutricional obtenido después de la fermentación probiótica, sin mencionar que la biomasa generada tiene en su composición microorganismos vivos, que al ser ingeridos pueden mejorar las condiciones de la microbiota del huésped.

RECOMENDACIONES

Utilizar los residuos de maíz en conjunto con otro residuo líquido, como suero de leche, que facilite y proporcione más nutrientes para llevar a cabo el proceso de biotransformación.

Para futuras investigaciones se sugiere realizar experimentos en los cuales se utilice como inóculo una mezcla de las tres bacterias probióticas y analizar la concentración de carbohidratos, así como los rendimientos de producción de biomasa y de AL, para evaluar si existe un incremento en el consumo de sustrato en las cinéticas de fermentación anaerobia.

Analizar la fracción líquida, que es rica en AL, y emplearla para la obtención de dicho metabolito. Para ello se sugiere aplicar otras técnicas que permitan su determinación, tales como cromatografía de gases o mediante espectrofotometría.

ANEXOS

ANEXO A

Parámetros cinéticos obtenidos a través del software Graph Pad

Tabla A1. Parámetros cinéticos obtenidos en Graph Pad con la bacteria *Bacillus subtilis*.

	5%	10%	15%
Hom tiempo variable			
Best-fit values			
k	0.05928	0.03420	0.02012
m	0.5330	0.6333	0.8870
95% CI (profile likelihood)			
k	0.03076 to 0.1046	0.01782 to 0.06029	0.004945 to 0.06033
m	0.3849 to 0.7002	0.4870 to 0.7985	0.6075 to 1.234
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom	8	8	8
R squared	0.9568	0.9701	0.9325
Sum of Squares	0.01345	0.007101	0.06103
Sy.x	0.04100	0.02979	0.08734

Tabla A2. Parámetros cinéticos obtenidos en Graph Pad con la bacteria *Lactobacillus fermentum*.

	5 %	10%	15%
Hom tiempo variable			
Best-fit values			
k	0.001683	0.008884	0.008693
m	1.160	0.7484	0.8042
95% CI (profile likelihood)			
k	0.0001119 to 0.01035	0.001829 to 0.02869	0.001437 to 0.03184
m	0.7024 to 1.822	0.4458 to 1.142	0.4701 to 1.250
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom	8	8	8
R squared	0.9043	0.8965	0.8861
Sum of Squares	0.006054	0.005277	0.009559
Sy.x	0.02751	0.02568	0.03457

Tabla A3. Parámetros cinéticos obtenidos en Graph Pad con la bacteria *Lactobacillus acidophilus*.

	5%	10%	15%
Hom tiempo variable			
Best-fit values			
k	0.006569	0.02534	0.007023
m	0.9488	0.7609	1.031
95% CI (profile likelihood)			
k	0.002021 to 0.01715	0.01066 to 0.05253	0.001756 to 0.02161
m	0.7060 to 1.241	0.5745 to 0.9781	0.7479 to 1.373
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom	8	8	8
R squared	0.9574	0.9648	0.9492
Sum of Squares	0.006676	0.01430	0.01855
Sy.x	0.02889	0.04227	0.04816

ANEXO B

Análisis estadístico

Tabla B1. Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	164.625	20.578	16.26	0.000
Lineal	4	145.875	36.469	28.81	0.000
Bacteria	2	142.406	71.203	56.26	0.000
%Inóculo	2	3.469	1.734	1.37	0.279
Interacciones de 2 términos	4	18.750	4.688	3.70	0.023
Bacteria*%Inóculo	4	18.750	4.688	3.70	0.023
Error	18	22.781	1.266		
Total	26	187.406			

Tabla B2. Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1.125	87.84%	82.44%	72.65%

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abedi, E. y Hashemi, S. 2020. Lactic acid production - producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon*, **6**(10).

Almanaa, T. N., Vijayaraghavan, P., Alharbi, N. S., Kadaikunnan, S., Khaled, J. M. y Alyahya, S. A. 2020. Solid state fermentation of amylase production from *Bacillus subtilis* D19 using agro-residues. *Journal of King Saud University - Science*, **32**(2), 1555–1561.

Anisimova, E. y Yarullina, D. 2018. Characterization of Erythromycin and Tetracycline Resistance in *Lactobacillus fermentum* Strains. *International Journal of Microbiology* 2018.

Añez Zavala, R. M., Rondon, L., Heredia Rodriguez, M. T., Salvatierra Hidalgo, A. y Meneses Barrios, R. T. 2015. Probióticos: generalidades. *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría*, **78**(4), 123-128.

Asgher, M., Wahab, A., Bilal, M. y Nasir Iqbal, H. M. 2016. Lignocellulose degradation and production of lignin modifying enzymes by *Schizophyllum commune* IBL-06 in solid-state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, **6**, 195–201.

Badía, M. M. R., Hernández, B. T., Murrel, J. A. L., Mahillon, J. y Perez, M. H. 2011. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista Brasileira de Agroecologia*, **6**(1), 90-99.

Bernal Castro, C. A., Díaz-Moreno, C. y Gutiérrez Cortés, C. 2017. Probiotics and prebiotics in vegetable matrices: Advances in the development of fruit drinks. *Probiotics and Prebiotics in Vegetable Matrices: Advances in the Development of Fruit Drinks*, **44**(4), 383–392.

Borrás Sandoval, L. M., Valiño Cabrera, E. C. y Rodríguez Molano, C. E. 2017. Preparado microbiano con actividad ácido láctica como acelerante biológico en los procesos de fermentación para alimento animal. *Ciencia y Agricultura*, **14**(1), 7–13.

Cai, J., He, Y., Yu, X., Banks, S. W., Yang, Y., Zhang, X., Yu, Y., Liu, R. y Bridgwater, A. V. 2017. Review of physicochemical properties and analytical characterization of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **76**(January), 309–322.

Caicedo, W., Moya, C., Tapuy, A., Caicedo, M. y Perez, M. 2019. Composición química y digestibilidad aparente de tubérculos de taro procesados por fermentación en estado sólido (FES) en cerdos de crecimiento. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, **30**(2), 580–589.

Carrillo Nieves, D., Rostro Alanís, M. J., de la Cruz Quiroz, R., Ruíz, H. A., Iqbal, H. M. N. y Parra Saldívar, R. 2019. Current status and future trends of bioethanol production from agro-industrial wastes in Mexico. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **102**, 63–74.

Castillo, L. (2016). Probióticos y prebióticos como alimentos funcionales en nutrición animal. *Zoociencia*, **3**(2), 15–21.

Chan, M. C., Ordoñez, Y. M., Tintoré, S. G., Guerrero, L. C. y Ancona, D. B. 2021. Caracterización química y nutrimental de variedades de maíz (*Zea Mays L.*) de alta calidad de proteína desarrolladas en Yucatán, México. *Biotecnia*, **23** (2), 11-21.

Cota Espericueta, A. D. y Ponce Corral, C. 2008. Eliminación de bacterias patógenas en lodos residuales durante el secado solar. *Revista internacional de contaminación ambiental*, **24**(4), 161-170.

Dalpaz, R., Konrad, O., Cândido, C., Panis, H., Hasan, C. y Guerini, M. 2020. Using biogas for energy cogeneration: An analysis of electric and thermal energy generation from agro-industrial waste. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, **40**(67), 100774.

Delgado Arroyo, M. D. M., Mendoza López, K. L., González, M. I., Tadeo Lluch, J. L. y Martín Sánchez, J. V. 2019. Assessment of the composting process of poultry manure using different mixtures of substrates. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, **35**(4), 965–977.

Ding, S., Yan, W., Ma, Y. y Fang, J. 2021. The impact of probiotics on gut health via alternation of immune status of monogastric animals. *Animal Nutrition*, **7**(1), 24–30.

Domínguez Gutiérrez G. A., Gaime Perraud I., Saucedo Castañeda G. y Rodríguez Serrano G.M. 2019. Diseño de un medio de cultivo de bajo costo para la optimización del crecimiento de bacterias ácido lácticas como control biológico de la producción de ocratoxina A. *Avances en Ingeniería Química*, **1**(1) p. 679-684.

Elahi, A. y Rehman, A. 2018. Bioconversion of hemicellulosic materials into ethanol by yeast, *Pichia kudriavzevii* 2-KLP1, isolated from industrial waste. *Revista Argentina de Microbiología*, **50**(4), 417–425.

Espinel Ríos, S., Palmerín Carreño, D., Hernández Orihuela, A. y Martínez-Antonio, A. 2018. A plackett-burman design for substituting mrs medium components with avocado seed hydrolysate for growth and lactic acid production by *lactobacillus sp.* *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, **18**(1), pp. 131-141.

Estrada García J. 2021. Determinación de las condiciones de operación y monitoreo reológico y simulación CFD de la bioconversión de *Lactobacillus acidophilus* de residuos agrocañeros y ganadero porcino. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.

Fina Martin, J. 2019. Caracterización funcional de la proteína de capa S(S-layer) de *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356. Tesis de grado. Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica. Argentina.

Fonseca López, D., Saavedra Montañéz, G. y Rodríguez Molano, C.E. 2018. Elaboración de un alimento para ganado bovino a base de zanahoria (*Daucus carota*

L.) mediante fermentación en estado sólido como una alternativa ecoeficiente. Revista Colombiana De Ciencias Hortícolas, **12**(1), 175–182.

Ganguly, P., Byrne, C., Breen, A. y Pillai, S. C. 2018. Antimicrobial activity of photocatalysts: Fundamentals, mechanisms, kinetics and recent advances. Applied Catalysis B: Environmental, **225**, 51–75.

Gao, T., Wong, Y., Ng, C. y Ho, K. 2012. L-lactic acid production by *Bacillus subtilis* MUR1. Bioresource Technology, **121**, 105–110.

Godoy Padilla, D. J., Daza La Plata, R., Fernández Curi, L. M., Layza Mendiola, A. E., Roque Alcarraz, R. E., Hidalgo Lozano, V., Gamarra Carrillo, S. G. y Gómez Bravo, C. A. 2020. Caracterización del valor nutricional de los residuos agroindustriales para la alimentación de ganado vacuno en la región de San Martín, Perú. Ciencia & Tecnología Agropecuaria, **21**(2), 1-14.

González Sánchez, M. E., Pérez Fabiel, S., Wong Villarreal, A. y Bello Mendoza, R. 2015. Residuos agroindustriales con potencial para la producción de metano mediante la digestión anaerobia. **47**(3).

Gutiérrez, R. y Salas, E. 2018. Cepas de bacterias probióticas como terapia coadyuvante en el tratamiento de la enfermedad periodontal. Revisión de la literatura. Revista Odontológica de Los Andes, **13**(1), 62–78.

Heredia Castro, P. Y., Hernández Mendoza, A., González Córdova, A. F. y Vallejo Cordoba, B. 2017. Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: Mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. Interciencia, **42**(6), 340–346.

Hernández Melchor, D. J., Ferrera Cerrato, R. y Alarcón, A. 2019. Trichoderma: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. Chilean journal of agricultural & animal sciences, **35**(1), 98-112.

Herrera, F.R., Elías, A., Núñez, O., García, Y., Dieppa, O. y Albelo, N. 2008. Crecimiento de bacterias ácido lácticas y levaduras durante la fermentación líquida de excretas de pollos de ceba para la obtención de probióticos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, **42**(2), 195-197

Jiang, S., Xu, P. y Tao, F. 2019. L-Lactic acid production by *Bacillus coagulans* through simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic corncob residue. *Bioresource Technology Reports*, **6**, 131–137.

Khattab, I. M., Abdel Wahed, A. M., Khattab, A. S., Anele, U. Y., El-Keredy, A. y Zaher, M. 2020. Effect of dietary probiotics supplementation on intake and production performance of ewes fed Atriplex hay-based diet. *Livestock Science*, **237**, 104065.

Kidist Fikre W., Henok K. y Yassin H. 2019. Probiotication of Fruit Juices by Supplemented Culture of *Lactobacillus acidophilus*, *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, **9** (2), 45-48.

Limongi, R. F., Alarcón Cobeña, D. F., Zambrano Zambrano, E. E. y Navarrete Cedeño, J. B. 2019. Desarrollo de una variedad de maíz tropical de grano blanco con calidad de proteína para consumo en fresco. *ACI Avances En Ciencias E Ingenierías*, **11**(1), 30-39.

Louhasakul, Y., Cheirsilp, B., Intasit, R. y Maneerat, S. 2020. International Biodeterioration & Biodegradation Enhanced valorization of industrial wastes for biodiesel feedstocks and biocatalyst by lipolytic oleaginous yeast and biosurfactant-producing bacteria. *International Biodeterioration and Biodegradation*, **148**, 104911.

Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H. y Stahl D.A. 2015. Brock. Biología de los microorganismos. 14^a ed. Pearson Educación, S.A. Madrid, España.

Markowiak, P., y Śliżewska, K. 2018. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut pathogens*, **10**, 21.

Matos, M. M., Valdivia, A., Rodríguez, Z., Boucourt, R., Brizuela, M. A., Portilla, Y., Rubio, Y. y Ramírez, H. L. 2018. Producción de xilanasas por *Bacillus subtilis* E44 en condiciones de fermentación sumergida. Cuban Journal of Agricultural Science, **52**(3), 329-336.

Matos Trujillo, M., Pérez Hernández, Y., Valdivia Avila, A., Ranilla, M. J., Rodríguez Alonso, Z., Rubio Fontanills, Y., Díaz Reyes, A., Jardines González, S. y Camacho Campos, C. 2020. Use of agroindustrial residues for producing enzymes by *Bacillus subtilis* E 44. Cuban Journal of Agricultural Science, **54**(1), 35–44.

Mejías, N., Orozco, E. y Galáan, H. 2016. Aprovechamiento de los residuos agroindustriales y su contribución al desarrollo sostenible de México Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales, **2**(6), 27–41.

Méndez Matías, A., Robles, C., Ruiz Vega, J. y Castañeda Hidalgo, E. 2018. Compostaje de residuos agroindustriales inoculados con hongos lignocelulósicos y modificación de la relación C/N. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, **9**(2), 271–280.

Méndez Úbeda, J., Flores Hernández, M. y Páramo Aguilera, L. 2018. Aislamiento e identificación de *Bacillus subtilis* y evaluación del antagonismo in vitro frente hongos fitopatógenos. Nexa Revista Científica, **30**(2), 96–110.

Miranda Yuquilema, J. E., Marin Cárdenas, A., Sánchez Macías, D. y García Hernández, Y. 2018. Obtaining, characterization and evaluation of two candidate preparations for probiotics developed with agroindustrial waste. Revista MVZ Cordoba, **23**(1), 6487–6499.

Molina, A. 2019. Probiotics and their mechanism of action in animal feed. Agronomy Mesoamerican, **30**(2), 601–611.

Olivera De la Cruz A.R., Ortega Jiménez, E., Díaz Rivera P., Aranda Ibáñez, E., Ramos Juaréz, J. y Mendoza Martínez, G. 2019. *Pleurotus ostreatus* Effects on agricultural waste degradation. Agrociencia **53**, 25-33.

Peñaranda González L. V., Montenegro Gómez S. P. y Giraldo Abad P. A. 2017. Aprovechamiento de residuos agroindustriales en Colombia. Revista de Investigación Agraria y Ambiental, **8** (2), 141–150.

Peng, W., Meng, D., Yue, T., Wang, Z. y Gao, Z. 2021. Effect of the apple cultivar on cloudy apple juice fermented by a mixture of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, and *Lactobacillus fermentum*. Food Chemistry, 340, 127922.

Piña Guzmán, A. B., Nieto Monteros, D. A. y Robles Martínez, F. 2017. Utilización de residuos agrícolas y agroindustriales en el cultivo y producción del hongo comestible seta (*Pleurotus spp.*). Revista Internacional De Contaminación Ambiental, **32**, 141–151.

Pleissner D., Anna Katrin, N., Mehlmann K., Scheider R., Puerta Quintero G. I. y Venus J. 2016. Fermentative lactic acid production from coffee pulp hydrolysate using *Bacillus coagulans* at laboratory and pilot scales. Bioresource Technology **218**, 167-173.

Renschler, M. A., Wyatt, A., Anene, N., Robinson Hill, R., Pickerill, E. S., Fox, N. E., Griffith, J. A. y McKillip, J. L. 2020. Using nitrous acid-modified de Man, Rogosa, and Sharpe medium to selectively isolate and culture lactic acid bacteria from dairy foods. Journal of dairy science, **103**(2), 1215–1222.

Rocafuerte Peña J. de I. 2022. Desarrollo del proceso de biconversión de los residuos provenientes de café (*Coffea arabica*) mediante la acción anaerobia fermentativa de lactobacilo *Bacillus subtilis*. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.

Rodríguez de Olmos, A., Correa Deza, M. A. y Garro, M. S. 2017. Selected *Lactobacillus* and bifidobacteria development in solid state fermentation using soybean paste. Revista Argentina de Microbiología, **49**(1), 62–69.

Rodríguez Martínez N., Sánchez Herrera S. G., Ponce Lira B. y Alva González E. D. 2018. Evaluación de coliformes totales en sustrato de olote en la región del valle del Mezquital. *Revista de Investigación y Desarrollo*. 4-11: 1-5.

Romero Mota, D.I., Estrada García, J., Alvarado Lassman, A., Bolaños Reynoso, E. y Méndez Contreras, J.M., 2021. Modelación matemática del consumo de sustrato en el proceso de bioconversión de residuos agrocañeros con *Lactobacillus acidophilus*. *Avances en Ingeniería Química*, **1**(3).

Ruiz, G. B., Retamoso, R. M. y Benítez Ahrendts, M. 2021. *Bacillus subtilis* aislada de cutículas de hormigas que anidan en colmenas como antifúngico de hongos patógenos de abejas. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, **37**(3), 270-276.

Santiago, S. G., Trably, E., Latrille, E., Buitrón, G. y Moreno Andrade, I. 2019. The hydraulic retention time influences the abundance of *Enterobacter*, *Clostridium* and *Lactobacillus* during the hydrogen production from food waste. *Letters in Applied Microbiology*, **69**(3), 138–147.

Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. 2020. Reporte del Mercado de Maíz.

Shuler, M.L., Kargi, F. y DeLisa, M. 2017. *Bioprocess Engineering Basic Concepts*. Prentice Hall. Nueva York.

Sigüencia Avila, J. M., Delgado Noboa, J. W., Posso Rivera, F. R. y Sánchez Quezada, J. P. 2020. Estimación del potencial de producción de bioetanol a partir de los residuos de la corteza del cacao en Ecuador. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, **21**(3), 1-20.

Sosa Cossio, D., García Hernández, Y., Dustet Mendoza, J. C., García Curbelo, Y., Martínez Pérez, M., Sosa Ceijas, A. y García Quiñones, D. 2020. Efecto del aditivo probiótico *Lactobacillus pentosus* LB-31 en pollos de ceba. *Revista MVZ Cordoba*, **26**(1), 1–9.

Toribio Cuaya, H., Sgastury Breña, S. I., De Abiega Quintana, I., Hernández Martínez, H., Arcelus Arrillaga, P. y Pedraza Segura, L. 2019. Determinación rápida de la composición química en residuos agroindustriales por medio de termogravimetría. Investigaciones científicas y agro tecnológicas para la seguridad alimentaria, 402.

Vargas Corredor, Y. A. y Pérez Pérez, L. I. 2018. Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. Revista Facultad De Ciencias Básicas, **1**(1), 59-72.

Vera Mejía, R. R., Vega Cañizares, E. y Sánchez Miranda, L. 2018. Efecto de *Lactobacillus plantarum* como probiótico en cerdos al destete. Revista de Salud Animal, **40**(3), 1–7.

Vera Mejía, R., Sánchez Miranda, L., Zambrano Gavilares, P. y Rodríguez Perdomo, Y. 2021. Obtaining a probiotic candidate of *Lactobacillus plantarum* 22 LMC from a natural culture medium with agro- based raw materials. Revista de Salud Animal, **43**(3).

Villarreal Delgado M.F., Villa Rodríguez E.D., Cira Chávez L.A., Estrada Alvarado M.I., Parra Cota F.I. y De los Santos Villalobos S. 2017. The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. Revista Mexicana de Fitopatología **36**(1): 95-130.

Zhang, H., Kong, B., Liu, H., Sun, F. y Chen, Q. 2021. Physiology and antioxidant activity of *Pediococcus pentosaceus* R1 and *Lactobacillus fermentum* R6 in response to lactic acid stress. LWT, 149, 111878.