



SEP
SECRETARÍA
DE EDUCACIÓN
PÚBLICA



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE ORIZABA

DIVISIÓN DE ESTUDIO DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

TESIS PROFESIONAL

**“EVALUACIÓN DE LA BIOCONVERSIÓN DEL RESIDUO DE CAÑA DE
AZÚCAR (RAC) MEDIANTE EL *BACILLUS SUBTILIS*”**

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

PRESENTA:

I.Q. MERCEDES ROMERO JIMÉNEZ

DIRECTOR DE TESIS:

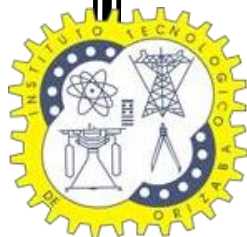
M.C. MARÍA ELENA GARCÍA REYES

CODIRECTOR DE TESIS:

M.I.Q. NORMA A. VALLEJO CANTÚ

Orizaba, Ver.

NOVIEMBRE 2022





EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Orizaba
División de Estudios de Posgrado e Investigación

Orizaba, Veracruz, [REDACTED]

Dependencia: División de Estudios de
Posgrado e Investigación

Asunto: Autorización de Impresión

OPCION: I

C. MERCEDES ROMERO JIMENEZ

Candidato(a) a Grado de Maestro en:

CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

P R E S E N T E.-

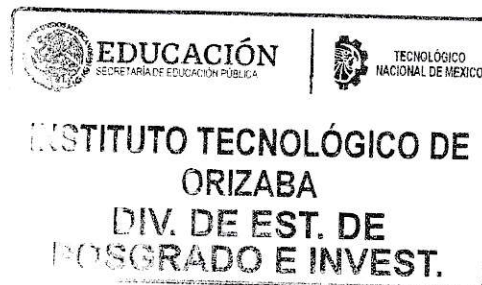
De acuerdo con el Reglamento de Titulación vigente de los Centros e Institutos Tecnológicos Federales del Tecnológico Nacional de México, de la Secretaría de Educación Pública, y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo respecto a su Trabajo Profesional titulado:

"Evaluación de la bioconversión del residuo de caña de azúcar (rac) mediante el bacillus subtilis."

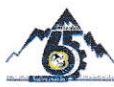
Comunico a Usted que este Departamento concede su autorización para que proceda a la impresión del mismo.

ATENTAMENTE
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



Av. Oriente 9 Núm.852, Colonia Emiliano Zapata. C.P. 94320 Orizaba, Veracruz. Tel. 01
(272)1105360 e-mail: depi_orizaba@tecnm.mx tecnm.mx | orizaba.tecnm.mx



2022 Flores
Año de
Magón
PRELACADO DE LA REVOLUCIÓN MEXICANA

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme permitido tener una buena experiencia dentro de la maestría y por permitir culminar una etapa más en el ámbito profesional en lo que tanto me apasiona.

A mis padres por siempre darme un ejemplo de superación y enseñarme a valorar todo lo que tengo, por su apoyo incondicional en todas las decisiones que he tomado y por haberme forjado la persona que soy en la actualidad.

A mi novio por siempre estar a mi lado apoyándome en todas mis decisiones y nunca dejarme sola y estar en los mejores momentos de mi vida.

A mis compañeros del laboratorio por siempre sacarme una sonrisa mientras trabajaba, a mi amiga Adriana por los buenos momentos vividos durante la maestría y por su apoyo incondicional en todo, a Israel por el apoyo que me brindo en el laboratorio y por los buenos consejos y su amistad.

RECONOCIMIENTOS ACADÉMICOS

A mi asesor de tesis, la M.C. María Elena García Reyes, por brindarme su apoyo siempre, por su paciencia infinita y por la confianza de creer en mis posibilidades para pertenecer a su grupo de investigación.

A la M.I.Q. Norma A. Vallejo Cantú, al Dr. Alejandro Alvarado Lassman y al Dr. Juan Manuel Méndez Contreras, por la ayuda otorgada durante todos los semestres de la maestría, por aportar sus conocimientos, dedicación y guiarme para ser mejor persona en el ámbito profesional.

A mis profesores de la maestría por tomarse el arduo trabajo de trasmitirme sus diversos conocimientos durante este periodo, siendo un gran punto de apoyo y motivación.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca número 1078867 otorgada durante el periodo comprendido septiembre 2020 a Julio 2022.

RESUMEN

Evaluación de la bioconversión del residuo de caña de azúcar (RAC) mediante el *Bacillus subtilis*.

Elaborado por: I.Q. Mercedes Romero Jiménez

Dirigido por: M.C. María Elena García Reyes

En México el cultivo de caña de azúcar representa un 1.9 % de la superficie cultivada a nivel mundial; lo que genera una considerable cantidad de residuos durante su cosecha. En general, estos residuos (RAC) son quemados provocando efectos negativos al medio ambiente como la emisión de gases CO₂, NO y NO₂, así mismo el hollín depositado en los campos disminuye los microorganismos benéficos para el suelo. Con el objetivo de desarrollar nuevas alternativas de aprovechamiento de los residuos y evitar la emisión de gases de efecto invernadero generando subproductos de alto valor nutricional, se presentan los resultados del estudio de los residuos RAC mediante su bioconversión con *Bacillus subtilis*. Para evaluar el crecimiento microbiano se utilizaron concentraciones de 5, 10 y 15 % v/v de inóculo, realizando fermentaciones anaerobias con tiempo de operación de 48, 72 y 96 horas. De acuerdo al análisis estadístico al optimizar los resultados de las cinéticas fermentativas se encontró el mejor tratamiento con 5 % de inóculo a un tiempo de 48 horas con una remoción de 4.02 g/L de carbohidratos, en la producción de ácido láctico se logró obtener el mejor resultado con 15 % de inóculo a un tiempo de 96 horas logrando obtener 11.25 g/L de ácido láctico, el mejor crecimiento microbiano se obtuvo con 10 % de inóculo a 72 horas con 7.70x10⁴ UFC/mL, así como la generación de biomasa con una concentración final de 25.39 g/L y un rendimiento de 2.37 g/L·g ST. En cuanto a la calidad de la biomasa final, se obtuvo un incremento en proteínas con un valor de 8.27 % y una concentración en microorganismos benéficos de 2.54x10⁴ al utilizar una concentración de 10 % v/v de inóculo en un periodo de 72 horas.

ABSTRACT

Evaluation of the bioconversion of sugarcane residue (SCR) by *Bacillus subtilis*

By: I.Q. Mercedes Romero Jiménez

Advisors: M.C. María Elena García Reyes

In Mexico, sugarcane cultivation represents 1.9 % of the world's cultivated area, which generates a considerable amount of waste during harvest. In general, these residues (SCR) are burned causing negative environmental effects such as the emission of CO₂, NO and NO₂ gases, and the soot deposited in the fields reduces the beneficial microorganisms for the soil. With the objective of developing new alternatives for waste utilization and at the same time avoiding the emission of greenhouse gases by generating by-products of high nutritional value, the results of the study of SCR waste by means of its bioconversion with *Bacillus subtilis* are presented. To evaluate microbial growth, concentrations of 5, 10 and 15 % v/v of inoculum were used, carrying out anaerobic fermentations with an operating time of 48, 72 and 96 hours. According to the statistical analysis when optimizing the results of the fermentation kinetics, the best treatment was found with 5 % of inoculum at a time of 48 hours with a removal of 4.02 g/L of carbohydrates. With respect to lactic acid production the best results were obtained with 15 % of inoculum and a time of 96 hours obtaining 11.25 g/L of lactic acid, the best microbial growth was obtained with 10 % inoculum at 72 hours with 7.70x10⁴ CFU/mL, as well as biomass generation with a final concentration of 25.39 g/L and a yield of 2.37 g/L-g ST. Regarding the quality of the final biomass, an increase in protein was obtained with a value of 8.27 % and a concentration in beneficial microorganisms of 2.54x10⁴ when using a concentration of 10 % v/v of inoculum in a period of 72 hours.

ÍNDICE

RESUMEN.....	III
ABSTRACT	IV
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABLAS.....	X
NOMENCLATURA.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS	2
CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	4
1.1 Producción de caña de azúcar.....	4
1.1.1 Producción de caña de azúcar en México.....	5
1.1.2 Subproductos de la caña de azúcar	5
1.1.3 Composición nutricional	8
1.1.4 Composición química de caña de azúcar.....	9
1.1.5 Residuos agrícolas de la cosecha de caña de azúcar RAC.....	11
1.1.6 Pérdidas de caña durante la zafra en el estado de Veracruz.....	11
1.1.7 Contaminación por quema de residuos de caña de azúcar RAC.....	12
1.1.8 Residuos lignocelulósicos (RAC).....	14
1.2 Tratamiento de los residuos lignocelulósicos.....	15
1.3 Hidrólisis enzimática	15
1.3.1 Modelo para hidrólisis enzimática.....	16
1.3.2 Pretratamientos.....	17
1.4 Bioconversión de residuos a partir de agentes microbiológicos	18
1.5 <i>Bacillus subtilis</i>	19
1.5.1 Crecimiento del <i>Bacillus subtilis</i>	20
1.6 Crecimiento microbiano.....	21
1.6.1 Consumo de sustrato	22
1.6.2 Conteo de células.....	23
1.7 Ecuación de Monod.....	25
1.7.1 Ecuación de Lineweaver-Burk.....	27
1.8 Rendimiento de biomasa.....	28
1.9 Evolución del estado del arte.....	29

CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS	33
2.1 Metodología experimental	34
2.2 Obtención de los residuos de caña de azúcar (RAC) y <i>Bacillus subtilis</i>	35
2.3 Pretratamiento de residuos	36
2.4 Caracterización del residuo de caña de azúcar RAC	36
2.4.1 Determinación de pH	37
2.4.2 Determinación de sólidos Totales.....	37
2.4.3 Determinación de Sólidos Totales Volátiles (STV)	38
2.4.4 Determinación de carbohidratos	38
2.4.5 Determinación de nitrógeno.....	39
2.4.6 Determinación de lignina.....	39
2.4.7 Determinación de Coliformes fecales.....	40
2.4.8 Determinación de <i>Salmonella spp.</i>	41
2.5 Propagación de la bacteria <i>Bacillus subtilis</i>	41
2.5.1 Identificación del <i>Bacillus subtilis</i>	42
2.6 Preparación del inóculo <i>Bacillus subtilis</i>	42
2.7 Pretratamiento del sustrato.....	42
2.8 Determinación de las cinéticas.....	43
2.9 Rendimiento de las cinéticas	43
2.9.1 Determinación de carbohidratos	44
2.9.3 Conteo celular	45
2.9.4 Crecimiento microbiano.....	45
2.9.5 Determinación de biomasa	46
2.10 Determinación de la calidad de biomasa obtenida	46
CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
3.1 Caracterización del residuo de caña de azúcar RAC	48
3.2 Propagación del <i>Bacillus subtilis</i>	50
3.3 Reconocimiento de <i>Bacillus subtilis</i>	51
3.4 Determinación de las cinéticas.....	51
3.5 Producción de ácido láctico y consumo de carbohidratos	52
3.5.1 Fermentación anaerobia de 48 horas	52
3.5.2 Fermentación anaerobia de 72 horas	54
3.5.3 Fermentación anaerobia de 96 hora	56

3.6	ANOVA para remoción de carbohidratos	58
3.7	Consumo de sustrato mediante modelo de Hom 48 horas	59
3.8	Consumo de sustrato mediante modelo de Hom 72 horas	60
3.9	Consumo de sustrato mediante modelo de Hom 96 horas	61
3.10	Crecimiento microbiano	62
3.10.1	Crecimiento microbiano 48 horas	62
3.10.2	Crecimiento microbiano 72 horas	63
3.10.3	Crecimiento microbiano 96 horas	63
3.11	ANOVA para crecimiento microbiano.....	64
3.12	Cuantificación de biomasa 48, 72, 96 horas	65
3.13	ANOVA para producción de biomasa	66
3.14	Calidad de biomasa obtenida de cinética fermentativa.....	66
3.14.1	Nitrógeno.....	67
3.14.2	Proteínas.....	68
3.14.2	Carbohidratos.....	69
3.14.3	Conteo celular en biomasa	70
3.7.4	Sólidos totales.....	71
CONCLUSIONES.....		73
Anexo I		75
Anexo II		77
Anexo III		78
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		80

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.1	Estados con mayor producción de caña de azúcar en México.	5
1.2	Productos y subproductos de caña de azúcar.	6
1.3	Forma de <i>Bacillus subtilis</i>	19
1.4	Crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> en medio de cultivo	21
1.5	Nutrientes necesarios para la producción de microorganismos.	22
1.6	Comportamiento de conteo en cámara de Neubauer	24
1.7	Representación gráfica de Lineweaver-Burk	28
2.1	Diagrama de la metodología	34
2.2	Residuos de caña de azúcar (RAC)	35
2.3	<i>Bacillus subtilis</i> SERENADE	35
2.4	Residuos de caña de azúcar RAC molidos	36
3.1	Crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i>	50
3.2	<i>Bacillus</i> Gram-positivos	51
3.3	Fermentación anaerobia	52
3.4	Producción de ácido láctico y consumo de carbohidratos 5 %- 48 h.	53
3.5	Producción de ácido láctico y consumo de carbohidratos 10 %- 48 h.	53
3.6	Producción de ácido láctico y consumo de carbohidratos 15 %- 48 h.	54

3.7	Producción de ácido láctico y consumo de carbohidratos 5 %- 72 h.	55
3.8	Producción de ácido láctico y consumo de carbohidratos 10 %- 72 h.	55
3.9	Producción de ácido láctico y consumo de carbohidratos 15 %- 72 h.	56
3.10	Producción de ácido láctico y consumo de carbohidratos 5 %- 96 h.	57
3.11	Producción de ácido láctico y consumo de carbohidratos 10 %-96 h.	58
3.12	Producción de ácido láctico y consumo de carbohidratos 15 %- 96 h.	58
3.13	Remoción de carbohidratos modelo de Hom 48 horas	60
3.14	Remoción de carbohidratos modelo de Hom 72 horas	61
3.15	Remoción de carbohidratos modelo de Hom 96 horas	61
3.16	Cinética de crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> 48 horas	62
3.17	Cinética de crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> 72 horas	63
3.18	Cinética de crecimiento <i>Bacillus subtilis</i> 96 horas	64
3.19	Biomasa obtenida de fermentación anaerobia	67
3.20	UFC de <i>Bacillus subtilis</i> en biomasa	70

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.1	Superficie de caña de azúcar cultivada a nivel mundial en comparación a los seis principales cultivos alimenticios	4
1.2	Composición química y mineral de subproductos de la agroindustria de la caña de azúcar <i>Sacharum spp.</i>	10
1.3	Valores promedio en toneladas de residuos y pérdidas durante el corte y recolección de caña de azúcar	12
1.4	Composición química del residuo de la caña de azúcar	14
2.1	Parámetros para la caracterización de los residuos de caña de azúcar (RAC).	37
2.2	Diseño experimental	43
3.1	Caracterización de residuos de caña de azúcar RAC	48
3.2	Concentraciones finales de biomasa	65
3.3	Rendimientos de biomasa	66
3.4	Parámetros de nitrógeno en biomasa	68
3.5	Valores de proteína en biomasa de residuos de caña de azúcar RAC	69
3.6	Carbohidratos en biomasa	69
3.7	ST en biomasa	71
3.8	STV en biomasa	71

NOMENCLATURA

Símbolo	Significado
RAC	Residuos agrícolas de la cosecha de caña
Ton	Toneladas
Ha	Hectáreas
MS	Materia seca
CEN	Cenizas
MO	Materia orgánica
EE	Extracto etéreo
FDN	Fibra en detergente neutro
FDA	Fibra en detergente ácido
HEMICEL	Hemicelulosa
CEL	Celulosa
LIG	Lignina
N	Nitrógeno
P	Fósforo
K	Potasio
Ca	Calcio
Mg	Magnesio
S	Azufre
Fe	Hierro
Cu	Cobre
Mn	Magnesio
Zn	Zinc
B	Boro
C	Carbono
UFC	Unidades formadoras de colonias

INTRODUCCIÓN

La agroindustria de la caña de azúcar es la fuente más importante de biomasa, por lo que la cosecha de la caña en verde tiene como consecuencia una cantidad considerable de residuos en el campo, conocidos como RAC, los residuos generados en su mayoría de los casos son quemados por los productores, generando gases como CO₂, NO y N₂O causando una serie de efectos negativos e inconvenientes como el aumento de plagas y la contaminación, por lo que esta biomasa podría ser aprovechada (Velasco-Velasco *et al.*, 2017). Debido a los inconvenientes y una alta contaminación que causan los residuos de caña RAC, es necesario buscar nuevas alternativas para reducir los daños ocasionados a la tierra y al medio ambiente, dándole un uso adecuado a toda la cantidad de residuos generados, la bioconversión o biotransformación es una alternativa la cual consiste en usar microorganismos o enzimas aisladas con el fin de transformar la biomasa en subproductos de alto valor. Por lo tanto, debido a los inconvenientes y un alto nivel de contaminación que causan los residuos RAC, es necesario buscar alternativas para reducir los daños ocasionados al medio ambiente, dándole un uso adecuado a los residuos generados.

El proyecto se realizó con la finalidad de disminuir y controlar la cantidad de RAC que se genera anualmente durante la zafra, evaluando la bioconversión del material lignocelulósico, caracterizando la biomasa a través de cinéticas químicas mediante el *Bacillus subtilis* y valorar la influencia de la actividad enzimática para degradar los residuos de caña de azúcar.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar las condiciones de operación recomendables para la bioconversión de residuo de caña de azúcar (RAC) mediante la especie *Bacillus subtilis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las propiedades fisicoquímicas del residuo denominado (RAC)
- Obtener y desarrollar la población de *Bacillus subtilis* a partir de un producto comercial de bajo costo.
- Determinar la dosis de lactobacilo y tiempo de reacción recomendables para el residuo (RAC).
- Determinar el rendimiento y la calidad de biomasa obtenida del proceso de bioconversión.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.1 Producción de caña de azúcar

Saccharum spp., mejor conocida como caña de azúcar es uno de los cultivos de mayor importancia en la provisión de alimentos e insumos para la industria sucroquímica, económicamente, es considerado una especie altamente productiva, es eficiente en el uso de insumos, recursos productivos y puede ser procesada de manera local, lo que hace un producto de primera importancia a nivel mundial (Gómez-Merino *et al.*, 2017), de todas las especies agrícolas, la caña de azúcar es una de las plantas que convierte la energía solar en energía química, sin embargo, sólo el 24 % de la materia seca acumulada durante se le atribuye valor comercial y el 76 % restante lo contribuye los residuos resultantes de la obtención del azúcar (Lagos-Burbano y Castro-Rincón, 2019).

El cultivo de caña de azúcar cubre un área superior a los 27 millones de hectáreas, representando un 1.9 % de la superficie total cultivada a nivel mundial produciendo 1,800 de toneladas de caña convirtiéndolo en el cultivo con mayor producción de biomasa (Gómez-Merino *et al.*, 2017), en la Tabla 1.1 se observa la producción de caña de azúcar en comparacion con otros alimentos cultivados.

Tabla 1.1 Superficie de caña de azúcar cultivada a nivel mundial en comparación a los seis principales cultivos alimenticios (Gómez-Merino *et al.*, 2017).

Cultivo	Producción (ton)	Superficie sembrada (ha)	Rendimiento promedio (ton ha)	Fracción de tierra cultivada que ocupa (%)
Caña de azúcar	1,884,426,253	27,124,725	72.1	1.9
Maiz	1,037,791,520	184,800,970	5.2	13.3
Arroz	741,477,712	162,716,863	4.2	11.7
Trigo	729,012,171	220,417,745	3.2	15.8
Papa	381,682,143	19,098,330	20.2	1.3
Remolacha azucarera	269,714,067	4,471,579	50.7	0.3

1.1.1 Producción de caña de azúcar en México

La producción en México es de 54.1 millones de toneladas, ubicándolo como el sexto productor mundial, los principales estados productores son: Veracruz, Jalisco y San Luis potosí, aportando alrededor de la mitad de volumen nacional. Datos oficiales mencionan que por cada hectárea cultivada se produce un promedio de 75 toneladas de caña de azúcar, generando 9 toneladas de paja y 29.25 toneladas de gabazo, con un promedio de 38.25 toneladas de residuos agroindustriales. (Ross-Alcudia *et al.*, 2017). En la Figura 1.1 se muestran los tres estados con mayor producción de caña de azúcar en México.



Figura 1.1 Estados con mayor producción de caña de azúcar en México.

1.1.2 Subproductos de la caña de azúcar

La industrialización se dedica a la obtención de azúcar morena o estándar (crudo), blanca o refinada en su mayoría, mínimamente mascabado, etanol, compostas y panela (piloncillo); y el uso de los subproductos melaza, bagazo, cachaza, cenizas y vinazas, (Aguilar-Rivera, 2017) , su uso se reconoció en la llamada “Revolución del azúcar” y triángulos de comercio en el siglo XVI Y XVII conociéndose como una de las industrias más antiguas del mundo (Debernardi-Vázquez *et al.*, 2017), de la caña de azúcar no se desperdicia nada, sus hojas y el gabazo son utilizadas como alimento

para animales, la fibra de la caña sirve para la fabricación de papel, esta fibra tiene características de ser biodegradable, apto para composta y reciclable. En la Figura 1.2 se observan los productos y subproductos de la caña de azúcar.

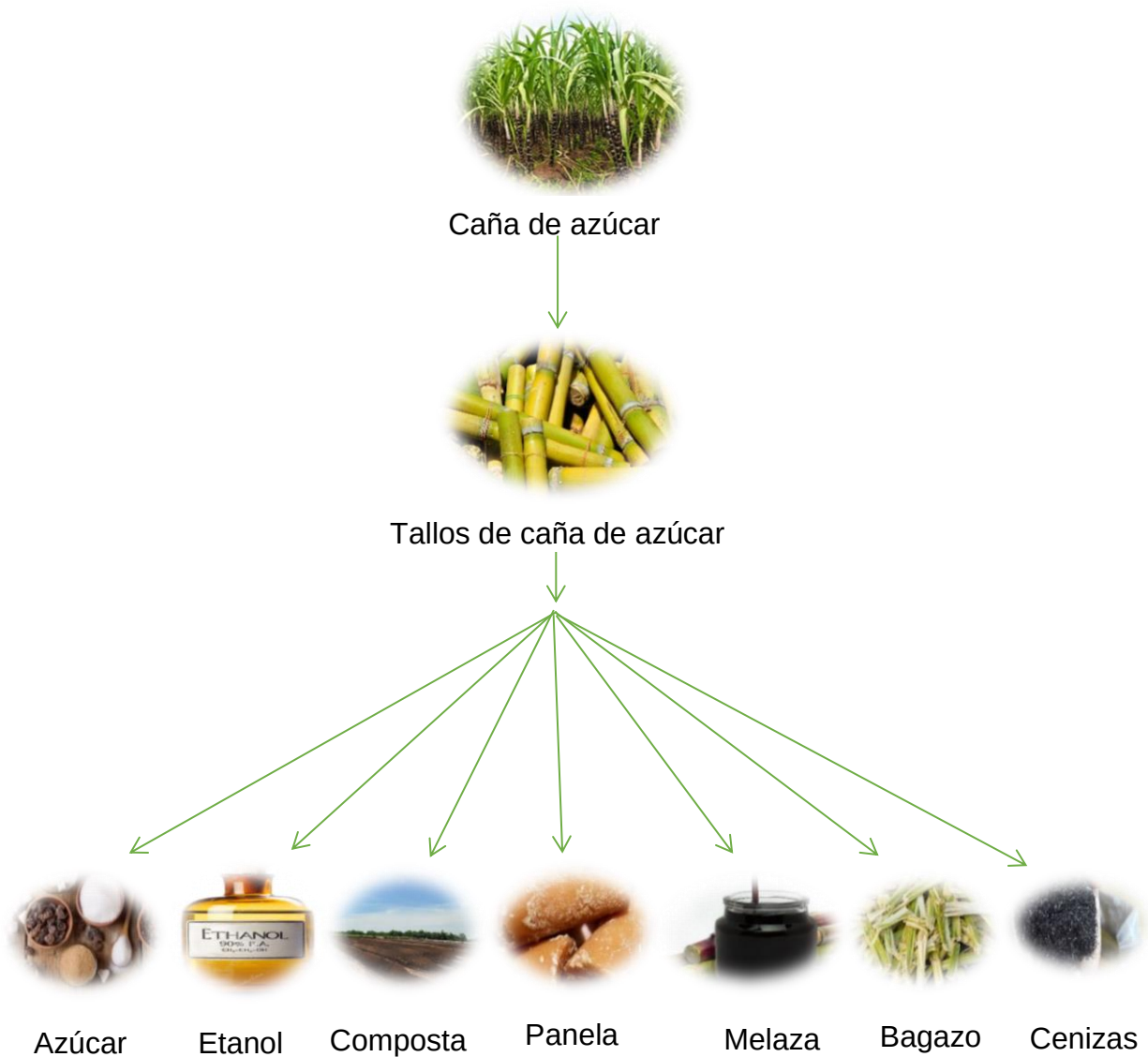


Figura 1.2 Productos y subproductos de caña de azúcar.

Etanol: principal producto en bebidas alcohólicas, el compuesto químico etanol o alcohol etílico es un alcohol que se presenta como un líquido incoloro e inflamable con punto de ebullición de 78 °C. Se obtiene fácilmente de la caña de azúcar.

Composta: es un abono orgánico que se forma por la degradación microbiana de diferentes materiales de origen orgánico acomodados en capas, los cuales son sometidos a un proceso biológico de descomposición.

Bagazo: es un residuo lignocelulósico que queda luego de que la caña de azúcar se le extrae el jugo azucarado. Los restos poseen una gran cantidad de fibras, que pueden ser utilizados para la producción de papel o producción de energía, contiene un 30 % de hemicelulosa.

Cenizas: es considerado un subproducto de la caña de azúcar, es un producto de los desechos, puede ser utilizado como combustible para el calentamiento en las calderas para generar el vapor utilizado en diversos equipos del proceso para la obtención de azúcar. También puede usarse en diversas actividades, como la agricultura, entre otros.

Melaza: líquido viscoso procesado, después de la extracción entre 80-85 °Brix, se utiliza para alimento de ganado, materia prima para la obtención de alcohol.

Vinazas: residuo principal de la destilería de alcohol producido de una porción de 13 L por cada litro de alcohol, el contenido de vinazas varía entre 10 y 15 L de vinazas por litro de alcohol (Bonilla-Pérez, 2018).

1.1.3 Composición nutricional

La caña de azúcar es rica en carbohidratos y una fuente energética, pero su contenido de proteínas es bajo, no supera el 5 % de la materia seca, dependiendo del estado de madurez, edad del cultivo y clima.

El contenido nutricional y la producción de biomasa son factores importantes de la edad de corte adecuada, se puede cosechar entre los tres a cuatro meses de edad con el fin de aprovechar el forraje integral tierno y de buena calidad debido que presentan mejores valores nutricionales, mejor relación hoja/tallo y altura adecuada para la cosecha, también puede ser cosechada entre ocho y doce meses dando una alta producción de biomasa, buen contenido de azúcares reductores y no reductores con ° Brix entre 12-16 y humedad adecuada que facilita su proceso degradativo (Lagos-Burbano y Castro-Rincón, 2019).

Los desechos originados de la caña de azúcar pueden ser utilizados para la elaboración de harinas, bloques, forrajes y ensilajes para alimentación de rumiantes aportando excelentes nutrientes, y de esta manera ser amigable con el medio ambiente. Existen variadas opciones para el uso de los residuos que se producen tanto en la agroindustria y en la zafra que van desde procesos biotecnológicos sostenibles y adecuadas para la producción de nuevos alimentos, productos químicos y farmacéuticos (Vera-Rodríguez *et al.*, 2021).

El contenido de nutrientes presentes en los residuos, muestran una aceptable composición según (Vera-Rodríguez *et al.*, 2021), analizaron los residuos de caña de azúcar obteniendo: la hoja verde está constituida por 4.44 % de proteína cruda, 1.46 % de grasa, 7.86 % de ceniza, 34.17 % de fibra, 52.07 % de extracto libre de nitrógeno, 32.69 % de materia seca total, 59.78 % de fibra detergente neutra, 32.50 % de fibra detergente ácida, 4.39 % lignina detergente ácida y un contenido de 4.44 (Mcal/kg) de energía bruta.

La hoja seca está compuesta por 2.88 % de proteína cruda, 1.82 % de grasa, 10.86 % de ceniza, 40.84 % de fibra, 43.60 % de extracto libre de nitrógeno, 86.68 % de materia seca total, 62.67 % de fibra detergente neutra, 39.42 % de fibra detergente acida, 5.24 % lignina detergente acida y un contenido de 4.30 (Mcal/kg) de energía bruta. El bagazo de caña de azúcar contiene 2.42 % de proteína cruda, 1.40 % de grasa, 2.48 % de ceniza, 34.62 % de fibra, 59.08 % de extracto libre de nitrógeno, 33.35 % de materia seca total, 68.03 % de fibra detergente neutra, 36.44 % de fibra detergente acida, 7.10 % lignina detergente acida y 4.67 (Mcal/kg) de energía bruta.

1.1.4 Composición química de caña de azúcar

La composición química de la caña de azúcar es sin duda uno de los elementos más importantes el cual permite conocer su valor nutritivo, el estudio de sus propiedades es importante, así mismo las variaciones que se pueden producir por diversos factores (Fernández-Gálvez *et al.*, 2018), es importante considerarlo con el fin de poder lograr un uso eficiente de este recurso.

La composición depende de muchos factores, entre los que se encuentra la variedad de caña y la sección de la planta. Debido a que la corteza, las hojas y los nudos de la planta muestran composiciones diferentes (Díaz-de los Ríos y Eduardo, 2020). En etapa madura, se compone de 71.82 % de tallos molibles, 12.58 % de cogollo, 8.7 % de hojas 6.9 % de chulquines, los cuales varían dependiendo de la variedad, edad y condiciones medioambientales (Lagos-Burbano y Castro-Rincón, 2019). En la Tabla 1.2 se observa la composición química de los subproductos de la agroindustria.

Su composición química también depende de la interacción de cultivar, edad de rebrote y fracción de la planta (integral, cogollo y planta) la PC es mayor para el cogollo (3.83 %), seguido de la caña integral (1.44 %) y los tallos (0.59 %); la FDN es mayor para el cogollo (74 %), intermedia para la caña integral (54.13 %) y menor para los tallos (35.21 %) debido a la cantidad de azúcares solubles en el contenido celular.

Tabla 1.2 Composición química y mineral de subproductos de la agroindustria de la caña de azúcar *Sacharum spp* (Lagos-Burbano y Castro-Rincón, 2019).

Componente	Cogollo	Bagazo	Cachaza	Melote
MS (%)	25.0	44.6	25.5	44.8
H (%)	75.0	55.4	74.5	55.2
CEN (%)	6.4	2.3	3.4	10.7
MO (%)	93.6	97.7	96.6	89.4
PC (%)	4.9	2.2	9.9	11.1
EE (%)	0.7	0.4	7.6	4.9
FC (%)	28.3	33.3	0.5	0.2
FDN (%)	68.2	71.8	-	-
FDA (%)	44.5	40.7	-	-
HEMICEL (%)	23.7	31.1	-	-
CEL (%)	40.3	34.1	-	-
LIG (%)	4.2	6.6	-	-
N (%)	0.7	0.5	18	1.1
P (%)	0.2	0.1	0.2	0.1
K (%)	2.1	1.9	1.8	0.5
Ca (%)	0.3	0.1	0.2	0.1
Mg (%)	0.2	0.1	0.1	0.1
S (%)	0.2	0.1	0.2	0.1
Fe (mg/kg)	78.2	1241.3	1330	1078.9
Cu (mg/kg)	<3	4.1	28.6	32.4
Mn (mg/kg)	34.1	36.1	45.2	45.1
Zn (mg/kg)	26.0	11.0	93.5	59.0
B (mg/kg)	1.6	1.9	2.1	4.5
C (mg/kg)	45.6	47.8	56.7	58.3

MO: materia orgánica; EMICEL: hemicelulosa; CEL: celulosa; LIG: lignina; N: nitrógeno; P: fósforo; K: potasio; Ca: calcio; Mg: magnesio; S: azufre; Fe: hierro; Cu: cobre; Mn: manganeso; Zn: zinc; B: boro; C: carbono / MO: materia orgánica

1.1.5 Residuos agrícolas de la cosecha de caña de azúcar RAC

Veracruz ocupa una superficie de 287,813 en cultivo de caña, con una producción de 2 230,901 toneladas de azúcar representando un 38 % en producción de azúcar en el país (Velasco-Velasco *et al.*, 2017), la principal característica en la producción de caña de azúcar es la producción de follaje, más del 90 % de la población dedicada a la caña de azúcar en México realizan quemas a fin de poder facilitar su corte eliminando gran parte importante de la biomasa producida, posterior a esta quema queda la paja de la caña (tlazole), puntas o cogollos que contribuyen entre un 20 % y 30 % de la biomasa generada, durante la cosecha se pueden producir entre 50 a 100 t/ ha de residuos vegetales factibles de aprovecharse (Velasco-Velasco *et al.*, 2017).

La composición en materia seca de caña de azúcar en su estado natural es de: 8.4 % cogollo y hojas verdes; hojas secas o paja 19.7 % y 28 % de residuos.

1.1.6 Pérdidas de caña durante la zafra en el estado de Veracruz

Las principales pérdidas de residuos durante el corte, varían de acuerdo a la cantidad de biomasa generada entre ellos se encuentra, manejo de cultivo, sistema de riesgo o temporal. En México, Veracruz ocupa el primer lugar como principal estado generador de residuos seguido de Jalisco y San Luis Potosí. Durante el periodo de la zafra el estado de Veracruz genera volúmenes considerables de residuos que son considerados basura. En la Tabla 1.3 se muestra el valor promedio en toneladas de residuos y pérdidas durante el corte y recolección en el estado de Veracruz. No solo de la cosecha se generan residuos, sino también de subproductos que generan los ingenios azucareros, esto depende del nivel de automatización, ya que entre más automatizado este el sistema de producción, habrá mayor capacidad para procesar la materia prima y, en consecuencia, un aumento de residuos (Velasco-Velasco *et al.*, 2017).

Tabla 1.3 Valores promedio en toneladas de residuos y pérdidas durante el corte y recolección de caña de azúcar (Velasco-Velasco *et al.*, 2017).

Rendimiento y residuos	Veracruz	
	Producción (2015-2016)	
	Temporal	Riesgo
Rendimiento (ton ha)	60-70	80-120
Residuos de hoja en (ton ha)	Nulo debido a la quema	Nulo debido a la quema
Tlazole (ton ha)	13-14	16-24
Punta/cogollo (ton ha)	Aprox. De 40	Aprox. De 60
Pérdida de caña por maquinaria en campo (ton ha)	Aprox. 3.5	Aprox. 4.2
Residuos por traslado	Por viaje (0.01 a 0.012).	Por viaje (0.01 a 0.012).
	Por turno (0.45 a 0.6)	Por turno (0.7 a 0.9)

1.1.7 Contaminación por quema de residuos de caña de azúcar RAC

En los últimos años, se ha notado la alta generación de residuos de caña RAC después de la zafra, afectando enormemente al planeta, siendo el medio ambiente de mayor interés. Entre las principales afectaciones de los residuos agrícolas resultantes de la cosecha de caña RAC son: el hollín liberado durante la quema de la paja de la caña de azúcar, depositándose en el suelo en forma de copos oscuros. Conteniendo alrededor de 70 productos químicos perjudiciales para el medio ambiente, estudios han demostrado que se obtiene 3-5.5 kg de ceniza por cada 100 kg de paja de caña de azúcar quemada (Gil-López *et al.*, 2016).

Las cenizas son diseminadas por el aire en un radio de hasta 8 km, llegando a las ciudades y contaminado, otra consecuencia de la quema, aunada a la mecanización

utilizada para aumentar la productividad de los suelos, tienen por consecuencia la reducción de la materia orgánica del suelo, el incremento de la erosión y la disminución de la densidad de poblaciones microbianas benéficas para los cultivos. (Ross-Alcudia *et al.*, 2017), la quema de la caña de azúcar puede tornarse una práctica peligrosa, debido a que el fuego puede volverse incontrolable, y poner en riesgo la seguridad de las personas, animales, instalaciones y plantaciones (Alfaro-Goicochea, 2020).

Otro problema a causa de la quema es la contaminación del aire debido a que el aire que respiramos está formado por muchos componentes químicos: nitrógeno (N_2), oxígeno (O_2), y vapor de agua (H_2O), también se encuentran pequeñas cantidades de otras sustancias, incluidas dióxido de carbono, argón, neón, helio, hidrógeno, y metano. En lo que respecta a la contaminación atmosférica las quemas agrícolas después de la cosecha ocasionan el deterioro de la calidad del aire. La adopción de la quema antes de la cosecha y de los residuos generados, tienen un impacto ambiental negativo sobre todo en poblaciones asentadas alrededor de áreas de cultivo de caña. La quema desprende gran cantidad de calor, incrementando los niveles de evaporación del agua contenida en la materia vegetal y el suelo.

El aire húmedo es sobrecalentado y eleva los vapores, así como partículas (cenizas) operando como núcleos higroscópicos en el momento en que la masa del aire alcanza la temperatura de condensación. Al aumentar la frecuencia, este tipo de prácticas sufren alteraciones que inciden en valores medios identificando el microclima de la zona afectada (Alfaro-Goicochea, 2020). Las partículas en suspensión generadas y los humos procedentes de la quema reducen la visibilidad y entran a formar parte del fenómeno denominado efecto invernadero.

La composición de la caña de azúcar comprende de celulosa, hemicelulosa y lignina. No sólo de la celulosa y la hemicelulosa se puede aprovechar la producción de azúcares, también de la lignina ya que contiene ácido p-cumárico y ácido ferúlico, en la Tabla 1.4 se observa la composición de los residuos de caña de azúcar.

Tabla 1.4 Composición química del residuo de la caña de azúcar
(Coronel-Regalado, 2020)

Componentes del residuo	Porcentaje (%)
lignocelulósicos	
Celulosa	43
Hemicelulosa	25
Lignina	21

1.1.8 Residuos lignocelulósicos (RAC)

La biomasa producida por vegetales, es conocido como biomasa lignocelulósicos y está constituida principalmente por celulosas, hemicelulosas y lignina, a estos residuos se les considera como materia orgánica con mayor abundancia en el planeta, por lo que se convierte en fuente importante de carbono orgánico presente en los cultivos, la utilización de biomasa lignocelulósica es prioritario para contrarestar los potenciales efectos del calentamiento global (Olivo-Urbina, 2018), en la actualidad los residuos o desechos agroindustriales y subproductos se han convertido en materia prima de procesos que generan productos de valor agregado sin embargo existen muchas limitantes para la degradación de la estructura lignocelulósica, considerando que estos residuos poseen grandes cantidades de fibra y celulosa, los nutrientes presentes en follajes y rastrojos pueden ser aprovechados una vez que estos sean sometidos a un tratamiento previo (Olivo-Urbina *et al.*, 2021).

La Hemicelulosa es conocida como una estructura compleja de carbohidrato, consiste en polímeros de diferentes azúcares como xilosa y arabinosa (pentosas), manosa, glucosa y galactosa (hexosas). El componente dominante de la hemicelulosa de plantas agrícolas es el xilano, su peso molecular es mas bajo que la celulosa, funciona como una conexión entre la lignina y las fibras de celulosa, brindando rigidez al conjunto de celulosa-hemicelulosa-lignina.

La lignina es uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza y se encuentra presente en la pared celular, su objetivo principal es dar a la planta el soporte estructural, impermeabilidad, y la resistencia contra el ataque de microorganismos y el estrés oxidativo (Luna-Martínez, 2018).

1.2 Tratamiento de los residuos lignocelulósicos

Uno de los tratamientos de materiales fibrosos es la hidrólisis enzimática, consiste en el tratamiento de la celulosa, esta acción la cumplen las células pertenecientes a las glicosilhidrolasas encargadas de la catálisis de los enlaces glucosídicos presentes entre dos o más hidratos de carbono. Este tipo de enzimas lo producen varios organismos comúnmente bacterias y hongos, las más utilizadas son las de origen fúngico debido al poder celulolítico, presentan dos módulos globulares independientes, uno responsable de la hidrólisis y el segundo responsable de la unión con la célula. Su función principal es mantener la enzima próxima al sustrato, lograr el reconocimiento con el sustrato y finalmente la disrupción de la estructura (Olivo-Urbina *et al.*, 2021).

La hidrólisis enzimática consta de dos mecanismos con dichas enzimas, la de conservación y de inversión de la configuración de carbono anomérico. Durante la hidrólisis por conservación, la degradación de la célula empieza por un proceso de glucosilación, obteniéndose de esta forma el producto hidrolizado.

El mecanismo de inversión, en esta solo se realiza en una sola etapa, donde se genera la incorporación de la molécula de agua entre la base y el azúcar (Olivo-Urbina *et al.*, 2021).

1.3 Hidrólisis enzimática

La ruptura de las cadenas de celulosa en las biomasas mediante enzimas resulta atractiva, esto sucede a 50 °C, permite evitar las condiciones más duras asociadas a la hidrólisis ácida. Un complejo lignocelulolítico de enzimas, generalmente derivado de

microorganismos fúngicos, está compuesto por tres clases de enzimas que actúan sinérgicamente. Este complejo está compuesto por endoglucanasas o 1,4- β -D-glucano-4-glucanohidrolasas, exoglucanasas (EGs) que pueden dividirse en celobiohidrolasas (CBHs) o 1,4- β -D-glucano celobiohidrolasas.

Las EGs rompen los enlaces β -1,4 glicosídicos del polímero de forma aleatoria, actuando principalmente sobre la región amorfa de la celulosa, generando oligómeros de todos los tamaños y, en consecuencia, extremos reductores y no reductores. Esta acción enzimática disminuye drásticamente el grado de polimerización y la resistencia de la fibra generados por las EGs son reconocidos y atacados por las CBHs. Las CBHs rompen los enlaces β -1,4, generando celobiosa como producto principal (Almedia y Ladisch, 2020).

1.3.1 Modelo para hidrólisis enzimática

Existen modelos cinéticos propuestos para la reacción de hidrólisis enzimática, a estos modelos se les conoce como modelos semi-mecánicos (Luna-Martínez, 2018), las enzimas son moléculas que actúan como catalizadores biológicos, la mayoría de las enzimas son proteínas aunque algunas son moléculas de ARN catalíticas, como todos los catalizadores las enzimas aumentan las velocidades de las reacciones sin sufrir ningún cambio químico. Logran su efecto uniéndose temporalmente al sustrato, y al hacerlo reduce la energía de activación necesaria para convertirla en producto (Marasovic-Maja *et al.*, 2017).

Matemáticamente, la relación entre la concentración de sustrato y la velocidad de reacción pueden modelarse mediante la ecuación de Michaelis-Menten, usado durante mucho tiempo para catalizar la cinética de reacciones entre un sustrato y un tipo de enzima en sistema homogéneos; empleado para describir la hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos. Este modelo es válido cuando la concentración del sustrato es mayor que la de la enzima. Este modelo es capaz de describir el cambio sufrido en

la velocidad de reacción (V_0), catalizada por una enzima al variar la concentración del sustrato $[S]$, mostrada en la Ecuación 2.1.

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (2.1)$$

V_{max} representa la velocidad máxima, obtenida cuando la velocidad de reacción se hace independiente de la concentración del sustrato S , K_m es la constante de Michaelis, dada por la concentración del sustrato a la mitad de la velocidad máxima. Cuándo menor sea la velocidad de K_m menor será la cantidad de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima, debido a que será mayor la afinidad de la enzima sobre el sustrato (Luna-Martínez, 2018).

1.3.2 Pretratamientos

Los residuos lignocelulósicos deben someterse a un proceso de TP para poder romper la matriz rígida y liberar carbohidratos, uno de los TP más utilizados es el TP hidrotermal, termohidrólisis o de agua caliente líquida, en el que se aprovecha la influencia del agua caliente a presión alta en procesos de conversión de biomasa, las ventajas son que el método evita el uso de reactivos químicos o generar cualquier tipo de corrosión, reduciendo costos operativos. El aumento de lignina expuesta, así como el aumento de la carga, pueden promover la adsorción no productiva de enzimas en la lignina. Por tanto, la lignina interfiere con la producción de bioetanol: sacarificación (hidrólisis enzimática) y fermentación (Almedia y Ladisch, 2020), después del TP, la biomasa lignocelulósica debe sacarificarse mediante hidrólisis enzimática de celulosa, así como hidrólisis de hemicelulosa.

1.4 Bioconversión de residuos a partir de agentes microbiológicos

La generación de altos volúmenes de residuos generados, es un problema que actualmente ocasiona daños al planeta y al medio ambiente, se han buscado nuevas alternativas para el control de la biomasa generada las cuales están basadas generalmente en el reciclado y reutilización de la materia desechada, este tipo de residuos requieren un interés especial, debido a que son un beneficio ecológico al disminuir la fuente de contaminación.

La bioconversión es conocida como una biotransformación en donde la materia orgánica es sometida mediante procesos o agentes biológicos en productos utilizables, el proceso de bioconversión a través de agentes biológicos es una opción muy favorable, considerando que representa una solución muy valiosa para la gestión de residuos (Salomone *et al.*, 2016). El objetivo más importante de la gestión de residuos es maximizar los beneficios económicos y, al mismo tiempo salvaguardar el medio ambiente, estas condiciones han impulsado estudios sobre diversas alternativas para mejorarlas mediante enzimas microbianas.

Los agentes biológicos son una diversa gama de microorganismos incluyendo numerosas variedades de hongos. Debido a que ciertos microorganismos pueden descomponer la célula, sólo un número de ellos produce cantidades significativas de componentes para hidrolizar completamente la célula.

Existen gran variedad de especies Gram-negativas que producen células, entre las que se encuentran *treptomyces spp.*, *Clostridium thermocellum*, *Ruminococcus spp.*, *Cellulomonas spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Proteus*, *Serratia*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus spp.* Es importante señalar que la especie *Bacillus* es conocida por su capacidad de llegar a condiciones de reposo y ser productoras de metabolitos secundarios (Sarsaiya *et al.*, 2019).

El *Bacillus subtilis*, es conocido como un microorganismo Gram-Positivo, con el que se estará trabajando, evaluando las condiciones adecuadas de los residuos de caña de azúcar RAC para la realización de una bioconversión a partir de estudios fisicoquímicos, y mediante cinética química se evaluarán el comportamiento del *Bacillus* y su crecimiento.

1.5 *Bacillus subtilis*

El *Bacillus subtilis* es una bacteria Gram-positiva formadora de esporas, en forma de bastón, como se observa en la Figura 1.3, este microorganismo pertenece a la familia Bacillaceae, ofrece una alternativa como agente de control biológico (Castañeda-Alvarez y Consuelo-Sánchez, 2016), tiene la capacidad de formar esporas, es decir forman una pared gruesa que rodea su ADN, haciéndola resistente e inmune a temperaturas extremas, químicos, factores ambientales y algunos tipos de radiación (Jiménez-Delgadillo et al., 2018), así como producir numerosas cantidades de compuestos microbianos, favorecen su distribución ubicua en el suelo, los entornos acuáticos, los alimentos y la microbiota intestinal de artrópodos y mamíferos (Caulier-Simon et al., 2019).

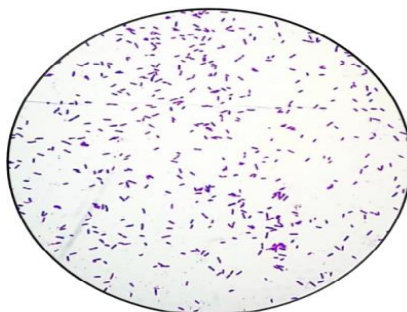


Figura 1.3 Forma de *Bacillus subtilis* (Chiza-Romo, 2019).

Su clase predomina en ser de naturaleza proteica, en cuanto a sus condiciones de crecimiento, esta crece de forma libre (células plantónicas) o desarrollando biopelículas sobre el sustrato que coloniza (Sarti y Cura, 2019), para *Bacillus subtilis* se estima que al menos el 4-5 % de su genoma se dedica a la producción de compuestos

antimicrobianos, estas moléculas son principalmente péptidos antimicrobianos. Sus estructuras suelen ser cíclicas, hidrofóbicas y contienen elementos peculiares como los D-aminoácidos, además los metabolitos volátiles también constituyen una gran familia de antimicrobianos que desempeñan numerosos papeles metabólicos y funcionales (Caulier-Simon *et al.*, 2019).

1.5.1 Crecimiento del *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis es una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal por la producción de metabolitos como auxinas, sideróforos, ácidos orgánicos y antibióticos, se ha reportado que todas las cepas de *B. subtilis* tienen el mismo efecto promotor de crecimiento (Anguiano-Cabello *et al.*, 2019), aun produciendo distintas concentraciones de metabolitos, como también puede constituir medidas efectivas de control biológico. Su crecimiento se basa por la cantidad de sustratos esenciales como fuente de carbono y nitrógeno, al ser limitado de estos requerimientos, los *Bacilos* se estresan y esporulan siendo definitivos como fuente de carbono (Castañeda-Alvarez y Consuelo-Sánchez, 2016).

Esta bacteria no es patogénica, puede ser cultivada y manipulada genéticamente con relativa facilidad, es eficaz en la secreción de proteínas y metabolitos, también es utilizado como fungicida, actúa colonizando el sistema radicular de las plantas impidiendo el desarrollo de organismos causantes de enfermedades, debido a su comportamiento multicelular y la producción de una gran variedad de sustancias tóxicas actuando como un potente agente de biocontrol (Jiménez-Delgadillo *et al.*, 2018), en la Figura 1.4 se observa el crecimiento del *Bacillus subtilis* en medio de cultivo.

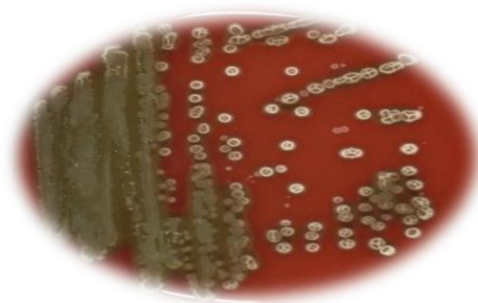


Figura 1.4 Crecimiento de *Bacillus subtilis* en medio de cultivo (Castañeda-Alvarez y Consuelo-Sánchez, 2016).

Entre el grupo de *Bacillus subtilis* existen dos principales enzimas las cuales exhiben actividades antagónicas unas de ellas son las enzimas líticas y las implicadas en la extinción del quórum (QQ), varias cepas del *Bacillus* han sido identificados por su capacidad de producir enzimas líticas con potencial de biocontrol, estas incluyen celulasas, glucanasas, proteasas y quitinasas y generalmente se denominan enzimas degradantes de la pared celular (Simon-Caulier *et al.*, 2019).

Este microorganismo fue catalogado como aerobio estricto por mucho tiempo, hasta que en (1993) se dio a conocer por Priest que esta bacteria tiene la habilidad para crecer en condiciones anaeróbicas. En varios estudios se presentan la habilidad de *Bacillus subtilis* para desarrollarse en ausencia de oxígeno bajo respiración de nitratos o también por la fermentación en medios ricos con proteína (Cobo-Salcedo, 2017).

1.6 Crecimiento microbiano

En bioprocesos, los reactivos son los nutrientes que el microorganismo necesita para poder crecer (reproducirse) y mantenerse vivos. Para sobrevivir los microorganismos requieren una fuente de carbono (FC), fuente de energía (FE), fuente de nitrógeno (FN), macro y micro nutrientes, O₂. En la Figura 1.5 se observa el esquema de los nutrientes necesarios para la producción de microorganismos.

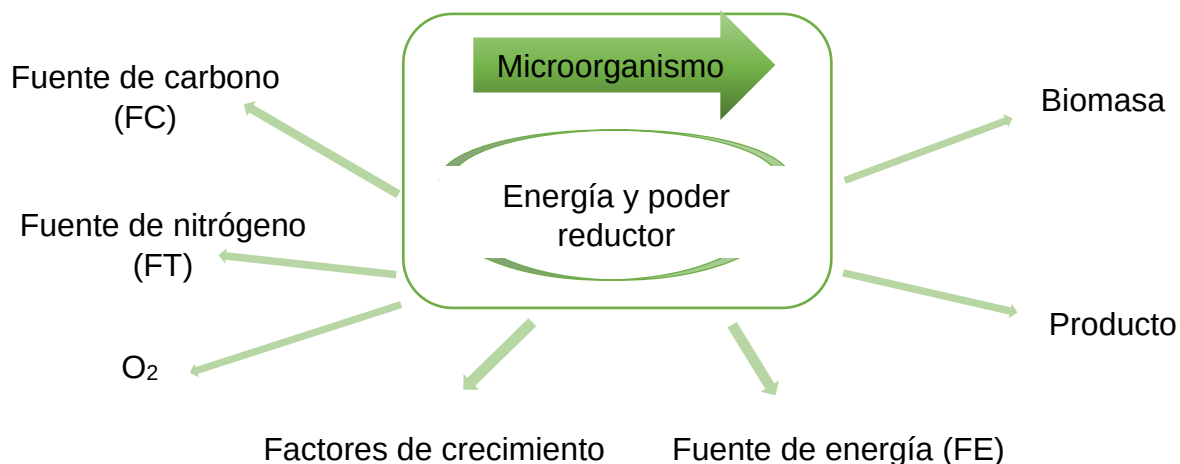


Figura 1.5 Nutrientes necesarios para la producción de microorganismos.

Los microorganismos dependiendo del medio y de las condiciones de cultivo pueden generar productos no ligados al metabolismo energético, como son alcoholes, ácidos orgánicos, lípidos, polímeros, antibióticos entre otros productos. La biotransformación no sucede de manera espontánea, sino que en medida de una serie de reacciones bioquímicas que construyen el metabolismo de un microorganismo, los reactivos y productos se relacionan con el metabolismo microbiano, se considera que el microorganismo funciona como un bioreactor donde los sustratos se asimilan a partir de reacciones catabólicas para poder obtener energía y poder reductor (Catañeda, 2019).

1.6.1 Consumo de sustrato

La velocidad en que el sustrato se consume depende directamente de la concentración de nutrientes disponibles en el medio y las condiciones utilizadas para el crecimiento celular como lo son la temperatura y el pH. Al inicio de la fase de adaptación las células teniendo alimento a los nutrientes del sustrato realizan procesos de mantenimiento, reparación celular, síntesis de proteínas y la producción de energía esto con el fin para poder sobrevivir a condiciones del medio, posteriormente el sustrato es consumido a

mayor velocidad y la fase larga se presenta hasta que el sustrato ha sido consumido en su totalidad (Alvarado-López y Valdez-Arcentales, 2019).

1.6.2 Conteo de células

Muchos microorganismos actualmente son cultivados a escala industrial debido a su versatilidad y variedad de aplicaciones, de igual manera con frecuencia es necesario cultivar los microorganismos para aumentar su cantidad y establecer tasas de crecimiento y muerte celular (Zambrano-Romero *et al.*, 2019), el conteo de partículas es una herramienta muy importante y de gran utilidad que puede aplicarse en gran cantidad de procesos, la estimación celular puede llevarse a cabo a través de diferentes métodos o técnicas, entre los que se encuentra.

- Conteo celular a través del microscopio.
- Recuento celular a través de contadores de partículas automáticos.
- Determinación de los cambios de densidad óptica del cultivo por espectrofotometría.
- Cuantificación de biomasa en peso seco.

El conteo celular mediante microscopía óptica es una de las técnicas más utilizadas para estimar la densidad celular por ser un método sencillo y de menor costo, el conteo celular consta de una serie de fases que son: toma de alícuota, dilución de la muestra, llenado de cámara, recuento celular y finalmente estimar la densidad microbiana (Gallego-Albiach y Pérez-Gualada, 2021), el cultivo de microorganismos continúa siendo fundamental para la identificación, aislamiento y recuento de células viables o para establecer su uso potencial en aplicaciones biotecnológicas subsecuentes.

El cultivo de microorganismos incluye la recolección de muestras, la preparación de diluciones, la siembra en medios selectivos de cultivo, y la incubación bajo condiciones controladas y reproducibles, en medios sólidos de cultivo, el crecimiento microbiano se evidencia en el desarrollo de agrupaciones de muchas bacterias, formadas a partir de

una o varias células viables (unidades formadoras de colonias, UFC), denominadas colonias (Zambrano-Romero *et al.*, 2019).

El recuento celular se lleva a cabo en cámara bajo el microscopio mediante el lente 10x como se observa en la Figura 1.6, la lente del microscopio se debe cambiar a una de 20x o 40x así colocar el área que se desea encontrar para observar las células en suspensión. El conteo puede realizarse tanto en el cuadro central (a 40x) como en los cuatro cuadros de las esquinas (a 20x) todo dependerá del tamaño de las células que se esté leyendo.

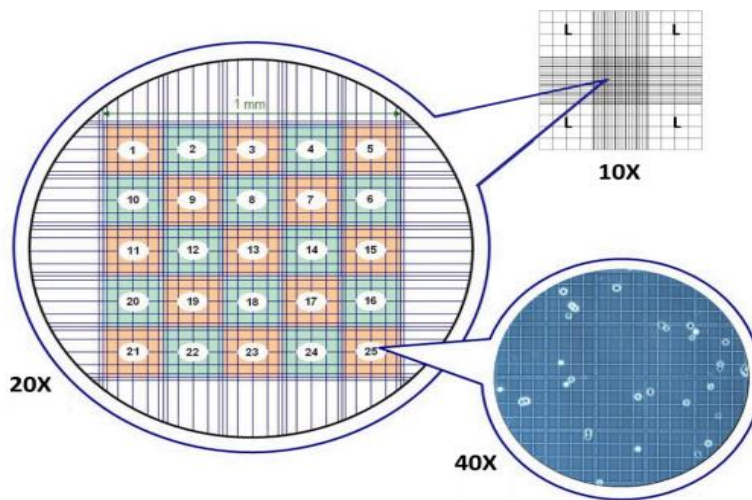


Figura 1.6 Comportamiento de conteo en cámara de recuento (Neubauer)

La estimación de la densidad celular expresa la relación entre la masa (o número) y el volumen de un cuerpo o sustancia, el número celular se conoce a partir del conteo y el volumen se presenta a partir de las diluciones seriadas realizadas. Para el cálculo se toma la Ecuación 2.2. (Gallego-Albiach y Pérez -Gualada, 2021).

$$\text{densidad} = \frac{\text{Número de células contadas}}{\text{superficie de conteo (mm}^2\text{) } \times \text{profundidad (mm) } \times \text{dilución}} \quad (2.2)$$

1.7 Ecuación de Monod

Este modelo describe la curva de crecimiento, en donde se presenta una primera etapa de adaptación al medio que depende el número de células y del sistema metabólico. Posteriormente, se presenta un crecimiento exponencial a una velocidad máxima, la duración de la etapa depende de la concentración inicial del sustrato limitante, así mismo la facilidad de adaptación del microorganismo a la disminución de sustrato, cuando el sustrato es limitado, la velocidad específica del crecimiento se comporta de acuerdo a la Ecuación 2.2 (Alvarado-López y Valdez-Arcentales, 2019).

Es importante conocer del microorganismo en cuestión, los parámetros cinéticos, comportamiento en la formación de biomasa, consumo de sustrato, rendimiento de biomasa y la velocidad específica de crecimiento.

La ecuación de Monod relaciona la velocidad máxima de crecimiento con la concentración de sustrato limitante y lo expresa con la Ecuación 2.3.

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} \quad (2.3)$$

En el cálculo de rendimiento de biomasa ($Y_{x/s}$) se determina a partir de la Ecuación 2.4 y el consumo de sustrato (CS) se emplea la Ecuación 2.5 (Alfonso-Acosta *et al.*, 2019).

$$Y_{x/s} = -\frac{X_o - X}{S_o - S} \quad (2.4)$$

$$CS = \frac{(S_o - S)}{S_o} * 100 \quad (2.5)$$

Donde:

X = concentración final de biomasa (g/L)

X_o = concentración inicial de biomasa (g/L)

S = concentración final de proteínas totales (g/L)

S_o = concentración inicial de proteínas totales (g/L)

μ = velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

$\mu_{m\acute{a}x}$ = velocidad específica máxima de crecimiento (h^{-1})

K_s = constante de saturación (g/L)

El valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ y la constante de saturación K_s se obtiene por el método del recíproco, a partir de la gráfica $\frac{1}{\mu}$ vs $\frac{1}{S}$, aplicando a los datos exponenciales.

Por otra parte la Ecuación de Contois 1956, mostrada en la Ecuación 2.6, tiene en cuenta el efecto de inhibición debido a la biomasa.

$$\mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x} S}{BX + S} \quad (2.6)$$

$\mu_{m\acute{a}x}$ = máxima velocidad de crecimiento específico

B = coeficiente de crecimiento expresión de Contois

La ecuación de Contois es una variante del modelo de Monod, donde la velocidad específica de crecimiento es inhibida por la concentración de biomasa X , para considerar el efecto de inhibición por altas concentraciones de sustrato se emplea la Ecuación 2.7 de Andrews (Rincón-Santamaría *et al.*, 2018).

$$\mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x} S}{K_s + S + S^2/K_i} \quad (2.7)$$

K_i = constante de inhibici3n relacionada con el sustrato S . Para este fin se aplica la Ecuaci3n 2.8.

$$\mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x} S}{K_s + S} \exp(-K_i S) \quad (2.8)$$

K_i = constante de inhibici3n por sustrato

1.7.1 Ecuaci3n de Lineweaver-Burk

Lineweaver-Burk emplearon una nueva herramienta para calcular par3metros cin3ticos de una enzima, utilizando el modelo de Monod, donde grafica los rec3procos de la velocidad y concentraci3n de sustrato, obteniendo una l3nea recta durante la fase exponencial. Se emplea la Ecuacion 2.9, donde lo usa como herramienta para calcular par3metros cin3ticos de una enzima. Se basa en que el rec3proco de la cin3tica Michaelis-Menten, que es f3cilmente representable (Luna-Mart3nez, 2018).

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (2.9)$$

La representaci3n gr3fica de Lineweaver-Burk permite identificar a K_m (constante de Michaelis-Menten) y $V_{m\acute{a}x}$ velocidad m3xima, como se observa en la Figura 1.4. El punto de corte con el eje de ordenadas es equivalente a la inversa de $V_{m\acute{a}x}$, y en las abscisas es el valor de $-1/K_m$.

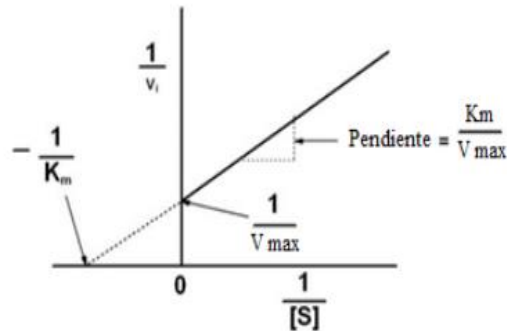


Figura 1.7 Representación gráfica de Lineweaver-Burk

1.8 Rendimiento de biomasa

La determinación de factores de conversión del sustrato a biomasa y de sustrato a producto así como la productividad de biomasa y producto debe calcularse con el rendimiento de la biomasa obtenido después de la cinética, se pueden utilizar los coeficientes estequiométricos que se expresan como rendimientos donde $y_{x/s}$ es el rendimiento en biomasa, $y_{p/s}$ es el rendimiento en producto. Al finalizar la cinética la cantidad que se colocó al inicio de cada nutriente disminuirá, e incluso aparecerán productos derivados del metabolismo microbiano y habrá un crecimiento de biomasa importante resultante de la producción celular.

El cálculo del rendimiento se debe prever en función de las medidas experimentales de las concentraciones de las variables que intervienen en el mismo con la Ecuación 2.10 y 2.11 (Catañeda, 2019).

$$y_{x/s} = \frac{\text{Biomasa producida}}{\text{FCE consumida}} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_f - X_o}{S_o - S_f} \quad (2.10)$$

$$y_{p/s} = \frac{\text{Producto producido}}{\text{FCE consumida}} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_f}{S_o - S_f} \quad (2.11)$$

X = biomasa

S = sustrato

P = producto

y_p = cantidad de producto producido

$y_{x/s}$ = cantidad de biomasa producido

1.9 Evolución del estado del arte

Cardona-López *et al.*, (2021), evaluaron el efecto de la enzima lacasa proveniente de *Aspergillus sp.*, con el fin de exponer la celulosa en bagazos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y cactánea (*Opuntia-ficus*), llevando a cabo determinaciones de parámetros cinéticos de la enzima en cada una de las muestras evaluadas, en términos de la velocidad inicial a diversas proporciones de bagazo (10 g:L a 50 g:L) con un tiempo de reacción de 1 hora, bajo condiciones evaluadas, evidenció remoción de extraíbles. A partir de análisis cinéticos obtuvo como resultado, que la enzima utilizada presentó una mejor afinidad a la remoción de lignina, indicando que el tipo de proceso utilizado tiene buena perspectiva con este tipo de residuos agroindustriales.

Chiza-Romo, (2019), realizó el aislamiento, identificación, secuencia y pruebas de antagonismo *in vitro* de la bacteria *Bacillus subtilis* para el control de *Phytophthora Infestans*, aisló *Bacillus subtilis* mediante el cultivo MRS para obtener cepas puras, identificó las cepas mediante pruebas de identificación fenotípica (macroscópica y microscópica), los resultados obtenidos de los análisis demostraron que la bacteria *Bacillus subtilis* presenta un efecto antagonista ante *Phytophthora Infestans*, el proceso de aislamiento permitió la propagación y purificación *in vitro* de la bacteria, todos los procesos evaluados demostraron que *Bacillus subtilis* posee un control antagónico, sin embargo, el efecto antagónico de *Bacillus subtilis* y otros biocontroladores genera un proceso lento en comparación con la utilización de los agroquímicos.

Shuang-Qi *et al.*, (2018), estudiaron la paja de trigo para su bioconversión mediante varios métodos de prueba, revisaron el estado de la investigación, el método de procesamiento y la aplicación integral de la paja de trigo, explica los principales métodos de procesamiento y bioproductos de la paja de trigo, así como los nuevos métodos de pretratamiento y bioproductos durante la utilización integral de la paja de trigo. También mencionan la bioconversión de la lignocelulosa en bioproductos como el bioetanol, biohidrógeno y biocompuestos, para su bioconversión comparan los diferentes métodos para ver su eficiencia; método de pretratamiento, pretratamiento físico, pretratamiento químico, pretratamiento ácido, pretratamiento alcalino, pretratamiento de líquido iónico y pretratamiento con microorganismos, menciona que el método con microorganismo es de menor costo debido a que no involucra la adición de ningún tipo de reactivos.

Ruiz-Cisneros *et al.*, (2018), estudiaron el efecto de tres cepas de *Bacillus* solas y en interacción con tres hongos fitopatógenos mediante el crecimiento de plantas de jitomate y calidad del fruto. Las tres especies evaluadas fueron *Bacillus* (*B. amyloliquefaciens*, *B. methylotrophicus* y *B. subtilis*). Y después con tres hongos fitopatógenos del jitomate, finalizando el ciclo de producción, se determinó, altura y peso de las plantas; longitud y peso de raíces, clorofila en hojas y rendimiento. La incubación con las cepas dio como resultado valores altos en variables evaluadas, *Bacillus subtilis* mostró efectos positivos en el diámetro y firmeza del fruto, contenido de proteínas y longitud de raíz. Las cepas evaluadas promovieron el rendimiento y tamaño de frutos en jitomate.

Cobo-Salcedo, (2017), evaluó el crecimiento de *Bacillus subtilis* en diferentes medios de cultivo líquidos sobre la concentración final de UFC (unidades formadoras de colonia), como el crecimiento exponencial y en fase estacionaria, los resultados obtenidos fueron analizadas estadísticamente a través de ANOVA, según el ANOVA la primera fase de estudio presentó diferencias significativas entre sí, mientras que la mejor prueba fue mediante tuckey del tratamiento a base de bebida de soya fortificada

y lactosuero demostrando ser mejor en la producción de este microorganismo, mientras que el cultivo a base de lactosuero funciona mejor para la multiplicación de *Bacillus subtilis*.

Romero-Mota, (2017), realizó la caracterización fisicoquímica y microbiológica al residuo porcícola y evaluó las cinéticas a diferentes concentraciones de carbohidratos, así como pH, manteniendo las muestras en constante agitación a temperatura de 36 °C, monitoreándolo durante 72 horas, evaluó la concentración de carbohidratos y producción de ácido láctico y biomasa. Como resultado el residuo fue un sustrato susceptible al crecimiento de *Lactobacillus: acidophilus, fermentum y reuteri*, concluye que las condiciones óptimas para la producción de ácido láctico y la supervivencia de los *Lactobacillus* se encuentra en la concentración de 8.2 g/L de carbohidratos y pH de 5.5 a 6.7, el tiempo de residencia para que los *Bacillus* produzcan mayor cantidad de ácido láctico, se encuentra entre las 48 y 72 horas.

Joelmy *et al.*, (2017), emplearon la Espectroscopia infrarroja (FT-IRART) como herramienta para la caracterización del bagazo de caña de azúcar, determinaron las propiedades fisicoquímicas del bagazo de caña, pH, humedad, cenizas, celulosa total y lignina, los resultados obtenidos en la caracterización del bagazo de caña, se observó que los parámetros fisicoquímicos tienen una gran similitud en sus valores de pH, humedad, cenizas y celulosa total, así como el contenido de lignina y grasas. En cuanto al FTIR-ATR este análisis presentó bandas vibracionales características de los azúcares, demostrando que la espectroscopia infrarroja (FT-IR-ATR) es una herramienta que permite caracterizar al bagazo de caña estructuralmente de forma fácil y rápida.

Castañeda-Alvarez y Consuelo-Sánchez., (2016), evaluaron el crecimiento de cuatro especies *sp.* Nativas a escala de 10 mL. El procedimiento para evaluar el crecimiento se llevó a cabo utilizando espectrofotometría y recuento directo en placa, las bacterias evaluadas fueron; *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus*

cereus, todas las cepas evaluadas presentaron antagonismo in vitro. Uno de los *Bacillus* más predominantes fue *Bacillus subtilis*, demostró ser de mayor capacidad antagónica, teniendo una velocidad de crecimiento mucho mayor que las otras cepas, demostrando que este género de *Bacillus* puede ser para control biológico de hongos.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Metodología experimental

En la Figura 2.1 se muestra la metodología utilizada para la realización del proyecto. En la que se describen los pasos que se utilizarán para la bioconversión de los residuos de caña de azúcar, así como las técnicas utilizadas para cada determinación, para poder obtener las condiciones adecuadas que permitan una mejor bioconversión de la materia orgánica.

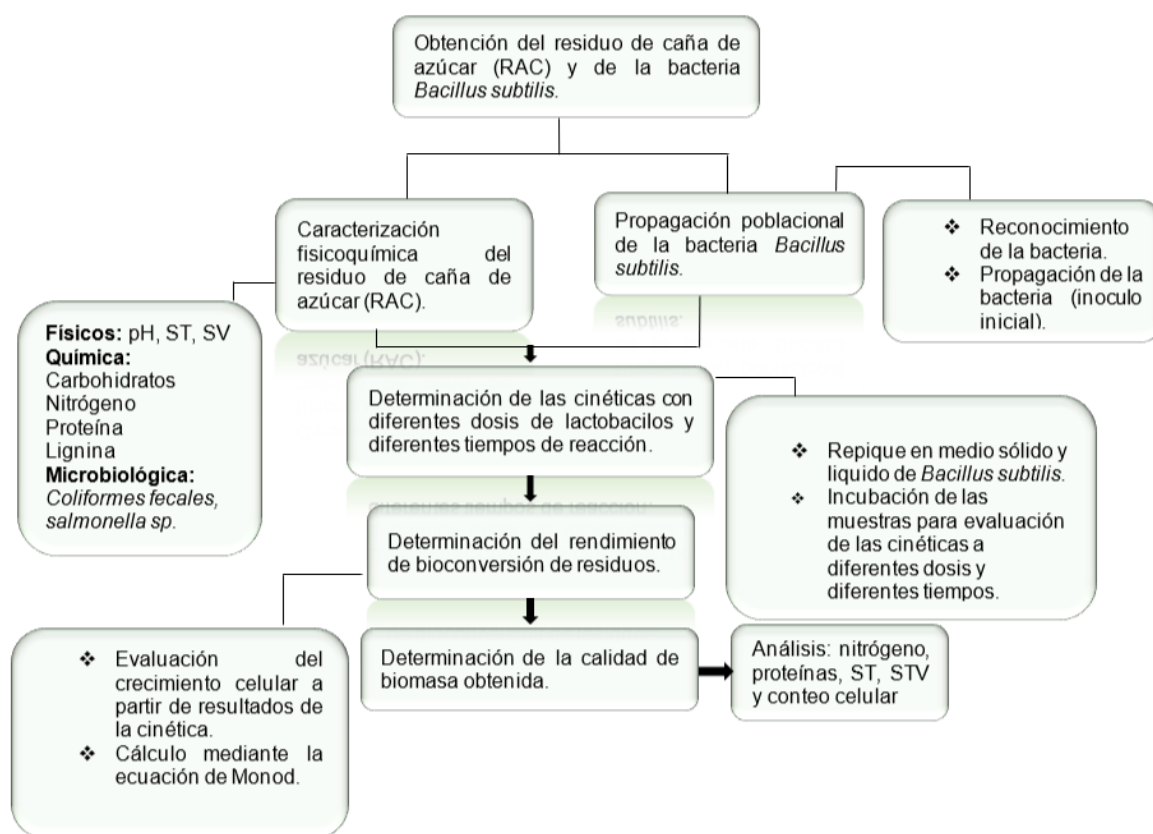


Figura 2.1 Diagrama de la metodología

2.2 Obtención de los residuos de caña de azúcar (RAC) y *Bacillus subtilis*

El residuo agroindustrial de caña de azúcar (RAC), se obtuvo del Municipio de Atzacan, Veracruz que colinda con la ciudad de Orizaba, Veracruz. Esta localidad cuenta con muchas hectáreas de siembra de caña de azúcar, la muestra está conformada por tallos secos y hojas como se muestra en la Figura 2.2.



Figura 2.2 Residuos de caña de azúcar (RAC).

El *Bacillus subtilis* fue proporcionado por el laboratorio, de la marca comercial SERENADE *Bacillus subtilis* mostrada en la Figura 2.3. El *Bacillus* está almacenada en un lugar fresco libre de humedad.



Figura 2.3 *Bacillus subtilis* SERENADE

2.3 Pretratamiento de residuos

La biomasa fue sometida a un pretratamiento para disminuir su tamaño. Se cortó en trozos pequeños llevó a la estufa a secado por 24 horas. Una vez que se eliminó la humedad completamente, se llevó a un molino de mano en donde la muestra fue triturada, hasta obtener un polvo fino como se observa en la Figura 2.4, se realizó un tamizado en malla de 50 mm, la muestra se mantuvo en almacenamiento en un lugar libre de humedad.



Figura 2.4 Residuos de caña de azúcar RAC molidos.

2.4 Caracterización del residuo de caña de azúcar RAC

A los residuos se les realizó la caracterización fisicoquímica y microbiológica con el propósito de conocer sus propiedades y así mismo los niveles de contaminantes presentes. En la Tabla 2.1 se muestran los parámetros evaluados, al igual que los métodos con los cuales se realizó cada determinación.

Previo a la caracterización se realizó una dilución 1:15 a la muestra molida de los residuos de caña de azúcar, se trabajó con una muestra cruda y una tratada térmicamente. La muestra tratada se mantuvo en calentamiento por 30 minutos a 90 °C.

Tabla 2.1 Parámetros para la caracterización de los residuos de caña de azúcar (RAC).

	Parámetro [unidad]	Método
Físicos	pH	Potenciómetro
	Sólidos Totales [%]	Método estándar 2540 de la APHA-AWWA-WPFC (1999)
	Sólidos Totales Volátiles	Método estándar 2540 de la APHA-AWWA-WPFC (1999)
Químicos	Carbohidratos [g/L]	Método Antrona-sulfúrico
	Proteínas [%]	Método 4500-NH ₃ B ESTÁNDAR METHODS,1989)
	Lignina	Acid-insoluble lignin in wood and pulp (Reaffirmation of T 222 om-02)
Microbiológicos	Nitrógeno Total [%]	Nitrógeno Kjeldahl
	Coliformes fecales [NMP/g ST]	NOM-004-SEMARNAT-2002
	<i>Salmonella spp.</i> [NMP/g ST]	NOM-004-SEMARNAT-2002

2.4.1 Determinación de pH

El pH se midió mediante el potenciómetro HI 2210/HI 2211 (medidor de sobremesa de pH/Mv/°C), fue calibrado con buffer 4 y 7, las muestra medidas fueron tanto cruda y muestra tratada a temperaturas de 24 °C.

2.4.2 Determinación de sólidos Totales

Para la determinación de sólidos totales (ST) se pesaron 3 g de las muestras diluidas 1:15 en crisoles, se llevaron a evaporación en estufa de calentamiento por 24 horas a 105 °C de acuerdo a lo indicado en el método estándar 2540 de la APHA-AWWA-WPFC (1999). Finalizado el tiempo se calcula el porcentaje mediante la Ecuación 2.1.

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

Donde:

P_1 = peso del crisol a peso constante

P_2 = peso de la muestra

P_3 = peso del crisol a peso constante + muestra seca

2.4.3 Determinación de Sólidos Totales Volátiles (STV)

Los Sólidos Totales Volátiles se determinaron siguiendo el método 2540 de la APHA-AWWA-WPFC (1999), para muestra cruda y tratada, las muestras previamente secas de la determinación de (ST) se llevaron a calcinación en una mufla Thermo Sciencitic a 550 °C durante 2 horas. Los Sólidos Totales Volátiles se calcularon utilizando la Ecuación 2.2.

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

Donde:

P_1 = peso del crisol a peso constante

P_2 = peso de la muestra

P_3 = peso del crisol a peso constante + muestra seca

P_4 = peso del crisol a peso constante + peso de la muestra calcinada

2.4.4 Determinación de carbohidratos

La determinación de carbohidratos fue realizada mediante el método de Antrona-Sulfurico, consistió en disolver 1 mL de las muestras diluidas 1:15 (muestra cruda y tratada), para tener una relación 1:50, de esta dilución se tomaron 0.5 mL a la cuales se les adicionó 2 mL de Antrona previamente preparada.

Preparadas las muestras se llevaron a calentamiento por 12 minutos a 94 °C, se dejaron enfriar y se leyeron en el espectrofotómetro Thermo Scientific modelo Genesys 20 a una longitud de onda de 620 nm.

2.4.5 Determinación de nitrógeno

La determinación de nitrógeno consistió en tomar 50 mg de muestra, la cual se le adicionó 0.5 g de sulfato de potasio, 0.2 g de sulfato de cobre, 3 mL de ácido sulfúrico y una pizca de selenio que actúa como catalizador, se llevó a digestión durante 2 horas.

Trascurrido el tiempo se llevó al microdestilador Kjeldahl, donde se le adicionó de 12-15 mL de hidróxido de sodio al 40 %, el destilado fue recolectado en un vaso de precipitado en baño de hielo, el vaso contenía 10 mL de solución ácido bórico y 2 gotas de indicador azul-rojo de metilo. La solución recolectada se tituló con ácido sulfúrico hasta tornar un color rosa claro, registrando el volumen gastado de ácido. Mediante la Ecuación 2.3 se calculó la cantidad de nitrógeno presente y por factor de conversión (6.25), la cantidad de proteínas.

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

G = mL de la solución

N = normalidad de la solución

0.014= mL equivalente

M = peso de la muestra en g o volumen en mL

6.25= factor de conversión

2.4.6 Determinación de lignina

La determinación de lignina se llevó a cabo mediante la Norma TAPPI 222 OM-02, se pesaron 5 gramos de muestra la cual se le realizó lavado con etanol-benceno y

agua caliente, la muestra se llevó a secado por 24 horas, posteriormente de la muestra seca se tomó 1 gramo la cual se le adicionó 15 mL de ácido sulfúrico al 72 %, se incubó a baño María por 2 horas manteniendo la muestra en constante agitación. Finalizada el tiempo de incubación se adicionó a un matraz con 575 mL de agua hasta ebullición por 4 horas adicionando constantemente agua caliente.

Trascurrido el tiempo se sacó la muestra y dejó en reposo de manera inclinada por 24 horas, una vez sedimentada la muestra se pasó a filtración por un crisol y papel filtro, la muestra sólida junto con el crisol se llevó a secado en estufa hasta peso constante.

2.4.7 Determinación de Coliformes fecales

Para la determinación de coliformes se siguió el método de acuerdo a la Norma NOM-004-SEMARNAT-2002, en donde se realizó diluciones de la muestra en medios de cultivo, incubando por 24 horas, posterior al período de incubación se leyeron muestras positivas y negativas. A las muestras positivas se les realizó la prueba confirmativa cultivándolos en medio EC. Durante 24 horas, las muestras positivas permitieron dar una estimación de la población bacteriana contenida en los residuos de caña de azúcar el cuál se reporta en NMP/g ST.

El NMP de Coliformes fecales presente se obtiene a partir de los resultados positivos que se cultivaron en medio EC. En donde se inoculó las series positivas utilizando diferentes volúmenes, obteniendo el código de resultados positivos en series consecutivas el cual se calcula con la Ecuación 2.4.

$$NMP = (NMP \text{ de tablas}) * (10/\text{mayor volumen inoculado})(1) \quad (2.4)$$

2.4.8 Determinación de *Salmonella* spp.

La determinación de *salmonella* se llevó a cabo mediante la Norma NOM-004-SEMARNAT-2002, indicando que el método se basa en el requerimiento con medios selectivos, que contienen sustancias inhibidoras, reconstruyendo a su vez la vitalidad de las células dañadas y, de igual forma, impidiendo el desarrollo de bacterias. Se prepararon los medios de cultivo indicados en donde se suspendieron gramos de la muestra correspondiente a 4 g de ST para obtener una dilución de 10^{-1} incubándolo durante 24 horas.

Trascurrido el tiempo de incubación se prepararon diluciones en donde se adicionó por triplicado 1 mL de estas en caldo de selenio cistina incubando las muestras por 24 horas hasta cambio de color (anaranjado intenso). Donde se obtiene el código de los resultados positivos en series consecutivas. Calculando el NMP mediante la Ecuación 2.5.

$$NMP = (NMP \text{ tablas}) * (10/\text{mayor volumen inoculado}) \quad (2.5)$$

2.5 Propagación de la bacteria *Bacillus subtilis*

La propagación de la bacteria se llevó a cabo en medio de cultivo (Agar nutritivo), se preparó el medio y adicionó en cajas Petri previamente esterilizadas, tomando una cantidad considerable mediante asa del recipiente SERENADE (*Bacillus subtilis*), se sembró en formas de estrías a las cajas Petri conteniendo el medio, incubando las muestras en estufa de cultivo por 24 horas, con la tapa hacia abajo para evitar la contaminación o entrada de microorganismos presentes en el exterior. Trascurrido el tiempo de cultivo, se observó el crecimiento del *Bacillus subtilis*, notando que crece a una velocidad considerable.

2.5.1 Identificación del *Bacillus subtilis*

La identificación fue llevada a cabo mediante tinción de Gram, la prueba consiste en el reconocimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Se tomó una pequeña cantidad del cultivo colocándolo en porta objetos conteniendo una gota de solución salina, por medio de mechero se secó hasta evaporar el líquido y mediante periodo de tiempo de 5 minutos se le adicionó, (cristal violeta, lugol, alcohol acetona y safranina).

Trascurrido el tiempo de evaporación se le realizó lavados con agua destilada, dejando secar al medio ambiente. Posteriormente, se leyó en el microscopio a 10 x, adicionando a la muestra 1 gota de aceite de inmersión, en donde se observaron colonias en forma de bastón de color morado.

2.6 Preparación del inóculo *Bacillus subtilis*

Una vez propagado el *Bacillus* la muestra se mantuvo en incubación en medio de cultivo a 37 °C, en un periodo de 5 días, trascurrido el tiempo se hacía un cambio del medio de cultivo para evitar la muerte de la bacteria.

Para la preparación del inóculo se llevó a cabo en medio de cultivo de caldo MRS, se preparó el medio de cultivo 50 mL y se esterilizó en la autoclave se añadió al matraz 20 mL y mediante asa se tomó una pequeña cantidad del cultivo *Bacillus subtilis*, la muestra se llevó a en constante agitación en una incubadora modelo ZHWY-100B.

2.7 Pretratamiento del sustrato

Se preparó 1500 mL de muestra, pesando 100 g de sustrato para obtener una dilución 1:15, la muestra fue tratada térmicamente en una parrilla a 90 °C durante 30 minutos, con el fin de eliminar todos patógenos que se encuentran presentes en los residuos de caña de azúcar.

Se dejó enfriar por aproximadamente una hora y colocó en refrigeración por una noche, hasta el inicio de las cinéticas.

2.8 Determinación de las cinéticas

Los estudios cinéticos se realizaron en diferentes matraces Erlenmeyer con capacidad de 250 mL, en donde se colocó un volumen útil de 150 mL de muestra tratada, variando la concentración de inóculo y el tiempo de reacción. Las muestras fueron colocadas en agitación en una incubadora modelo ZHWY-100B. Se propuso un diseño factorial de efectos aleatorios, con la finalidad de comparar la remoción de carbohidratos, ácido láctico producido y biomasa generada, las combinaciones de las cinéticas se muestran en la Tabla 2.2.

Los resultados obtenidos se comprobaron estadísticamente mediante la utilización del software Minitab 19, para las etapas de determinación de remoción de carbohidratos, ácido láctico producido, biomasa genera y crecimiento microbiano.

Tabla 2.2. Diseño experimental			
Muestra	Inóculo % v/v		
	5	10	15
	Tiempo t(h)		
	48, 72, 96	48, 72, 96	48, 72, 96

2.9 Rendimiento de las cinéticas

Para la evaluación del rendimiento de las cinéticas a diferentes dosis y tiempos de reacción, se analizaron diferentes parámetros, como lo son ácido láctico producido, carbohidratos, biomasa y conteo celular.

2.9.1 Determinación de carbohidratos

A partir de diluciones se determinaron los carbohidratos presentes a cada una de las muestras que se tomaron en periodos de 6 horas, la determinación se llevó a cabo a partir del método Antrona sulfúrico. Se tomó 0.5 mL de cada una de las muestras por separado y aforo en matraces de volumen de 50 mL, tomando 0.5 mL de esta dilución agregando en tubos con 2 mL de Antrona preparada con anterioridad, se llevaron las muestras a baño María por 12 minutos a 90 °C, la lectura de la muestra se llevó a cabo en un espectrofotómetro Thermo Scientific modelo Genesys 20 a una longitud de onda de 620 nm.

2.9.2 Determinación de ácido láctico

Las muestras tomadas durante el periodo de incubación de las cinéticas se le evalúan la producción de ácido láctico de acuerdo a la Norma NMX-F-716-COFOCALEC-2014, este método consiste en realizar diluciones de las muestras, tomar entre 30-40 mL y titular con NaOH al 0.1 %, el cálculo se realiza con la Ecuación 2.6.

$$\text{Ácido lactico} = \frac{g}{L} = \frac{V \cdot N \cdot 90}{M} \quad (2.6)$$

Donde:

V = Volumen gastado de NaOH (mL)

N = Normalidad de NaOH

M = Volumen de la muestra (mL)

2.9.3 Conteo celular

Para la cuantificación celular se emplea el uso de la cámara de Neubauer, se realizaron diluciones de las muestras tomadas durante periodos de incubación de las cinéticas.

Las preparaciones de las muestras se llevaron a cabo mediante el método de placa vertida, en donde se tomó 1 mL de las diluciones, colocándolo en cajas Petri con Agar nutritivo, incubando las muestras en estufa de cultivo por 24 horas.

Para el cálculo se llevó a cabo contando el número de células por mililitro calculándola mediante la Ecuación 2.7 descrita por (Gallego-Albiach y Pérez-Gualada, 2021).

$$\frac{UFC}{mL} = No. de colonias \times \frac{1}{Vol. sembrado} \times \frac{1}{Dilución} \quad (2.7)$$

2.9.4 Crecimiento microbiano

El crecimiento microbiano se evaluó a partir de los resultados del conteo celular de cada una de las muestras tomadas durante las cinéticas en un periodo de 6 horas, en donde se observa el crecimiento de microorganismos y consumo de sustrato a menudo que pasa el tiempo.

El cálculo se determinó a partir de la Ecuación de Monod utilizando el modelo de Hoftee de acuerdo a (Luna-Martínez, 2018). Por la Ecuación 2.8.

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} \quad (2.8)$$

μ = velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

μ_{max} = tasa máxima de crecimiento (h^{-1})

S = concentración de sustrato

K_S = constante de saturación (g/L)

2.9.5 Determinación de biomasa

La cuantificación de biomasa de cada una de las muestras de las cinéticas se realizó por diferencia de peso, tomando 10 mL de muestra y añadiendo a los tubos, se colocaron en la centrifuga durante 10 minutos a 1000 rpm.

A las muestras se les realizó dos lavados con agua destilada, una vez finalizado el lavado, la muestra sólida se colocó en crisoles anotando el peso y llevo a la estufa a una temperatura de 120 °C hasta peso constante, por diferencia de peso se obtuvo la biomasa.

2.10 Determinación de la calidad de biomasa obtenida

El análisis de la calidad de biomasa se determinó a partir de las muestras de fermentación anaerobia. Las muestras evaluadas fueron de 48, 72 y 96 horas en concentraciones de 5, 10 y 15 % v/v de inóculo, fueron centrifugadas en centrifuga Hermle Laboratory GMB H a 10,000 rpm durante 10 minutos, se retiró el medio líquido y a la biomasa obtenida se le realizó análisis de Nitrógeno, Proteínas, Carbohidratos, ST y conteo celular.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos durante las etapas experimentales realizadas a lo largo del proyecto de investigación, los resultados son mencionados en el mismo orden de acuerdo al capítulo 2.

3.1 Caracterización del residuo de caña de azúcar RAC

En la Tabla 3.1 se presentan los análisis que se realizaron para la caracterización fisicoquímica y microbiológica a los residuos de caña de azúcar RAC, obtenidos de campos agrícolas del municipio de Atzacan, Veracruz, antes de cada tratamiento la muestra se cortó en trozos pequeños y llevó a molienda hasta obtener un polvo fino, cabe mencionar que todos los parámetros determinados se hicieron por medio de una muestra y dos réplicas.

Tabla 3.1 Caracterización de residuos de caña de azúcar RAC

Parámetros	Muestra cruda valor	Muestra tratada valor	Unidad
Físicos			
ST	5.22	7.50	% m/m
STV	95.77	96.05	% m/m
pH	4.51	4.17	--
Químicos			
Carbohidratos	18.73	23.65	g/L
Nitrógeno total	0.13	0.15	g/kg ST
Proteínas	0.83	0.97	%
Lignina	27.22	20.6	%
Microbiológicos			
Coliformes fecales	93,000	<1000	NMP/g ST
Salmonella spp.	56,000	<1000	NMP/g ST

Los parámetros como ST, STV, proteínas y lignina, se reportan mediante una media aritmética, con la experimentación de una muestra y dos réplicas.

El valor obtenido de pH a los residuos de caña RAC, dio como resultado 4.51 en muestra cruda y 4.17 en muestra tratada térmicamente a una temperatura de 24.9 °C por lo que se puede observar que se encuentra en un pH ácido, esto puede

deberse al estado en que se encontraban los residuos recolectados y a los cambios climáticos que se sometió en su crecimiento.

En la caracterización química también se determinó la cantidad de sólidos totales presentes en los residuos, se realizó una dilución 1:15, encontrando un valor de 5.22 unidades para las muestras analizadas.

De igual manera se cuantificó la presencia de los tres componentes principales del sustrato: como es la presencia de carbohidratos con un valor de 23.65 g/L, mismo que es menor al valor promedio de 39.53 % obtenido por (Cabrera-Ayala y Novoa-Izaguirre, 2016), seguido del nitrógeno con un promedio de 0.15 g/kg ST y proteínas con un valor de 0.97 unidades, menor que 1.15 % obtenido por (Cabrera-Ayala y Novoa-Izaguirre, 2016). Los componentes analizados son los principales nutrientes que consumen los *Bacillus subtilis* para su crecimiento poblacional.

Otro de los componentes principales que se determinó es la lignina, el cual es fundamental para conocer su función como barrera que impide la descomposición de la celulosa por los microorganismos, dando un valor con una media aritmética de 27.22 % mayor a 23.8 % reportado por (Cabrera-Ayala y Novoa-Izaguirre, 2016), en bagazo de caña de azúcar.

En cuanto a los aspectos microbiológicos son considerados de suma importancia, ya que se trata de una muestra que se encuentra expuesta a la intemperie y es sometida a diferentes cambios ambientales, cultivada en una región montañosa con problemas ambientales que dañan al cultivo como la quema, emisiones de CO₂, entre otros. Este aspecto se determinó para conocer la cantidad de microorganismos presentes en el sustrato mostrada en la Tabla 3.1.

Las determinaciones microbiológicas rebasaron los límites máximos permisibles, para los coliformes fecales con un valor de 93,000 y para *Salmonella spp.* 56,000

de acuerdo a lo mencionado en la norma NOM-004-SEMARNAT-2002 (<1000 NMP/g ST).

Sin embargo, para poder eliminar estos contaminantes presentes se realizó un pretratamiento térmico a 90 °C por 30 minutos, dando como resultado una disminución favorable de contaminantes con valores por debajo de los límites máximos permisibles, para coliformes fecales <1000 y *salmonella spp.* Obteniendo un biosólido de clase A.

3.2 Propagación del *Bacillus subtilis*

Con respecto a la activación y adaptación del *Bacillus subtilis*, la bacteria logró propagarse de manera adecuada sin problemas en medio de Agar nutritivo, mostrando los resultados en la Figura 3.1 donde se puede observar el crecimiento del *Bacillus subtilis*, permitiendo evidenciar las características macroscópicas, arrojando mismos resultados que (Castañeda-Alvarez y Consuelo-Sánchez, 2016) al aislar *Bacillus subtilis* en agar sangre.

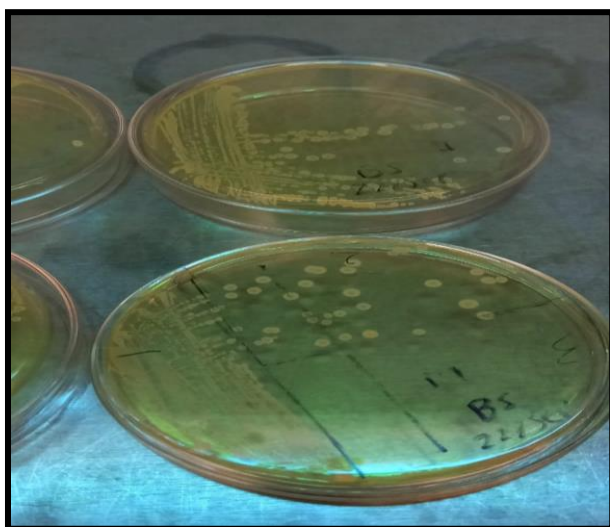


Figura 3.1 Crecimiento de *Bacillus subtilis*.

3.3 Reconocimiento de *Bacillus subtilis*

El *Bacillus subtilis* logró propagarse de manera adecuada en medio de Agar nutritivo. Observando *Bacillus* Gram-positivos delgados y de regular tamaño, como se muestra en la Figura 3.2, tomada de las pruebas de crecimiento enzimático, comprobándose el crecimiento esperado de acuerdo con la literatura (Zalazar-Quispe *et al.*, 2019).

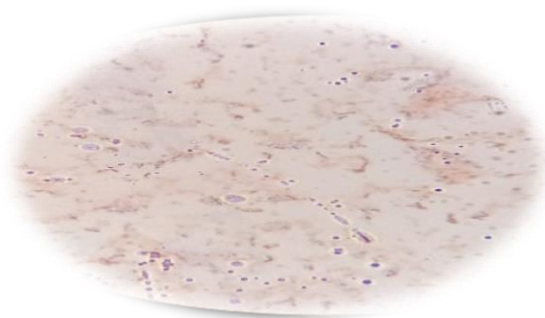


Figura 3.2 Bacillus Gram-positivos

3.4 Determinación de las cinéticas

Las fermentaciones anaerobias se determinaron a partir de la preparación de inóculo mediante *Bacillus subtilis*, posterior a la preparación del inóculo se procedió a realizar la fermentación anaerobia, llevándose a cabo en diferentes matraces Erlenmeyer con capacidad de 250 mL, colocándose un volumen útil de 150 mL de sustrato e inóculo (5, 10 y 15 % v/v) evaluándolas en (48, 72 y 96 horas). Las muestras fueron colocadas en agitación en una incubadora modelo ZHWY-100B a temperatura constante de 36 °C y agitación de 110 rpm, cada una de las muestras fueron monitoreadas tomando 6 mL de muestra cada 6 horas Figura 3.3.



Figura 3.3 Fermentación anaerobia

3.5 Producción de ácido láctico y consumo de carbohidratos

A continuación, se presentan los resultados de disminución de carbohidratos mediante la fermentación anaerobia y la producción de ácido láctico en periodo de tiempo de 48, 72 y 96 horas con concentraciones de 5, 10 y 15 % v/v de inóculo.

3.5.1 Fermentación anaerobia de 48 horas

En la Figura 3.4 se presenta el consumo de sustrato y la producción de ácido láctico mediante la fermentación con *Bacillus subtilis*, en un tiempo de 48 horas, la concentración de ácido láctico producido durante este periodo fue de 2.50 g/L con inóculo de 5 % v/v siendo la mejor concentración, con un valor menor a lo obtenido por (Camacho-Torres y Lizarazo-Cala, 2021) de 16225.2 ug/mL al evaluar pulpa de café con 2.5 % de inóculo en tiempo de 60 h. En cuanto a la disminución de la concentración de carbohidratos se redujeron 4.02 g/L con una concentración final de 29.09 g/L.

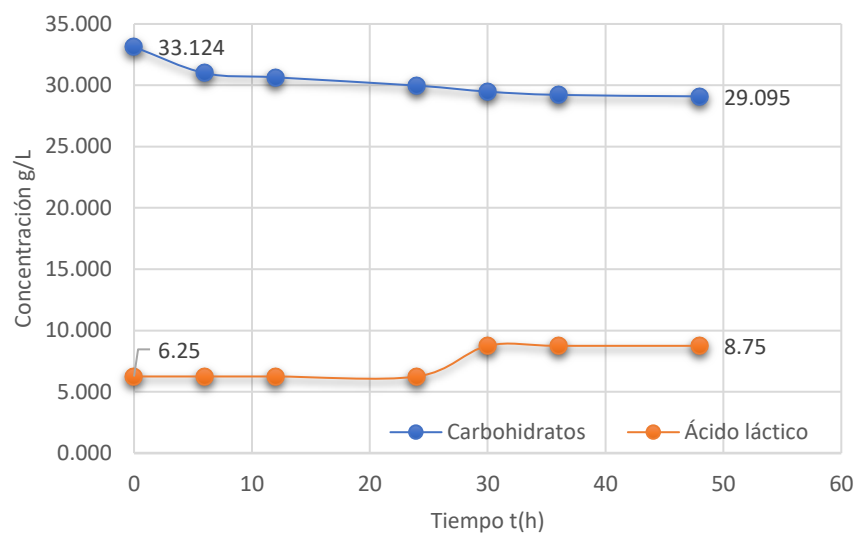


Figura 3.4 Producción de ácido láctico y consumo de carbohidratos 5 %-48 h.

Para una concentración de 10 % de inóculo v/v, el consumo de carbohidratos fue de 24.49 g/L y una concentración final de 19.43 g/L, mostrada en la Figura 3.5, en cuanto a la producción de ácido láctico se tuvo un decremento con una concentración final de 1.25 g/L producido, siendo la concentración más baja en comparación de 5 y 10 % v/v de inóculo.

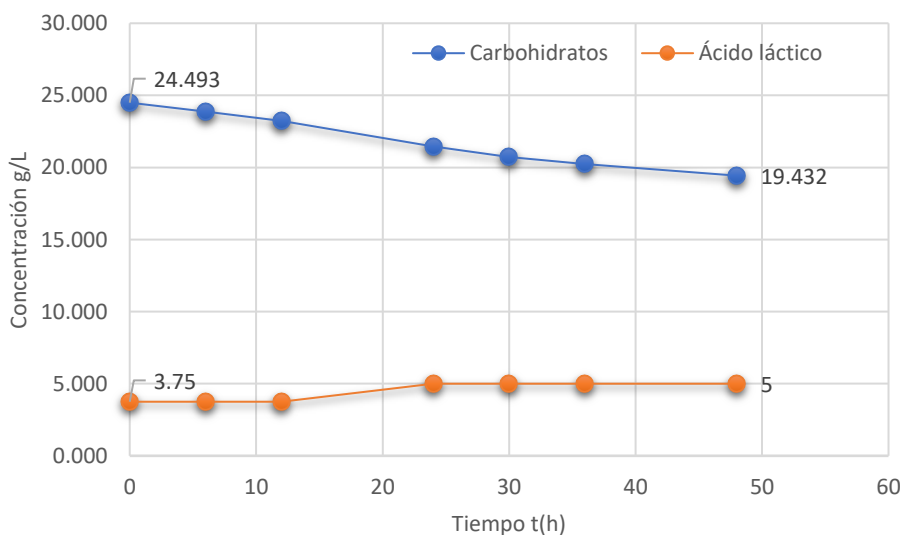


Figura 3.5 Producción de ácido láctico y consumo de carbohidratos 10 %-48 h.

En la Figura 3.6 se muestra la producción de ácido láctico para una concentración de 15 % v/v, obteniendo la mayor producción, con un valor de 3.75 g/L y una remoción de carbohidratos de 6.96 g/L, y una concentración final de 24.31 g/L, para un tiempo de 48 horas se obtuvo mejores resultados con inóculo de 15 % con mejor remoción de carbohidratos y una mayor producción de ácido láctico.

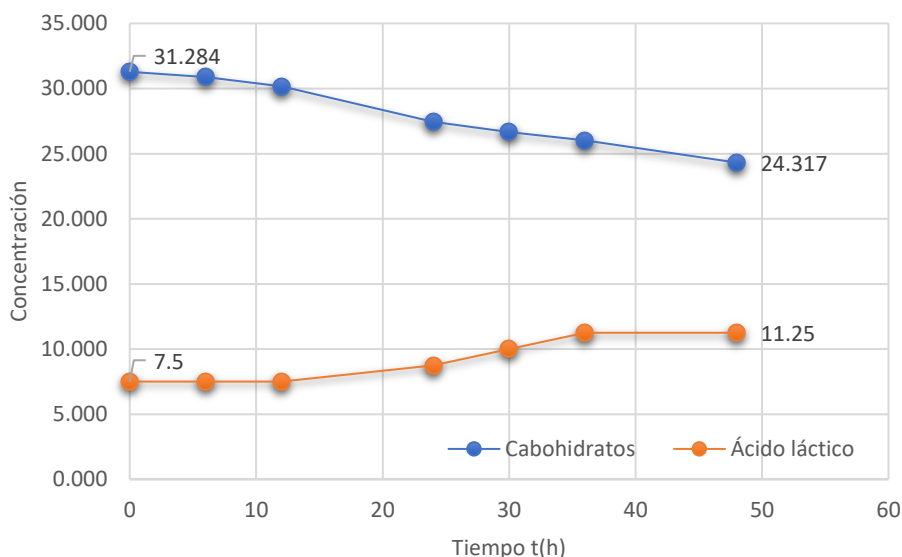


Figura 3.6 Producción de ácido láctico y consumo de carbohidratos 15 %-48 h.

3.5.2 Fermentación anaerobia de 72 horas

A continuación, en la Figura 3.7 se observa el incremento de la producción de ácido láctico en un periodo de 72 horas, el incremento para las tres concentraciones se observó de manera concordante con el consumo de sustrato, empezando a las 12 horas de la fermentación con una producción de 1.25 g/L para 5 % de inóculo y una producción final a las 72 horas con 5 g/L, siendo la mayor concentración obtenida, en cuanto a la disminución de carbohidratos se obtuvo una remoción de 15.77 g/L, y una concentración final de 13.69 g/L.

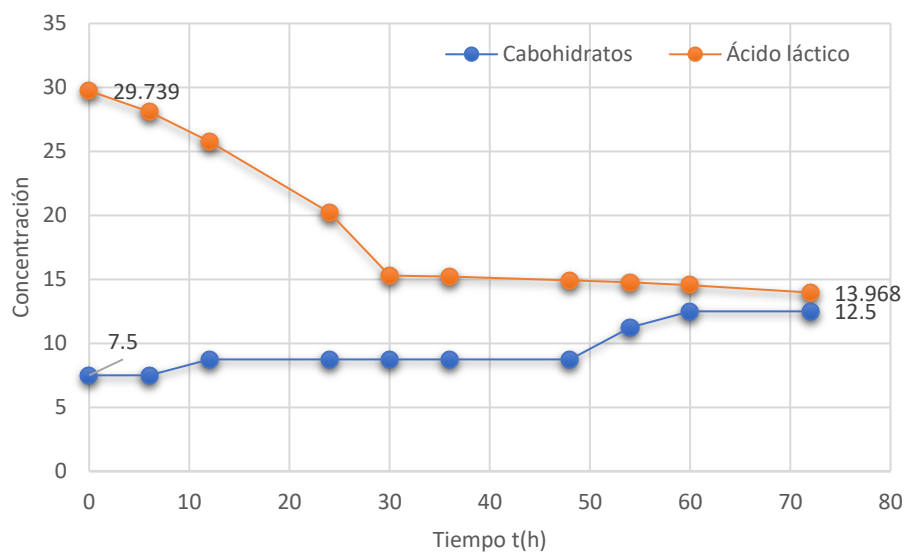


Figura 3.7 Producción de ácido láctico y consumo de carbohidratos 5 %-72 h.

En la Figura 3.8 se muestra la remoción de carbohidratos con inoculo de 10 % v/v en un tiempo de 72 horas, la remoción obtenida fue de 10.701 g/L de carbohidratos con una concentración final de 15.08 g/L, y una producción de ácido láctico de 1.25 g/L a partir de la hora 54 y una producción final de 3.75 g/L con una concentración de 11.25 g/L.

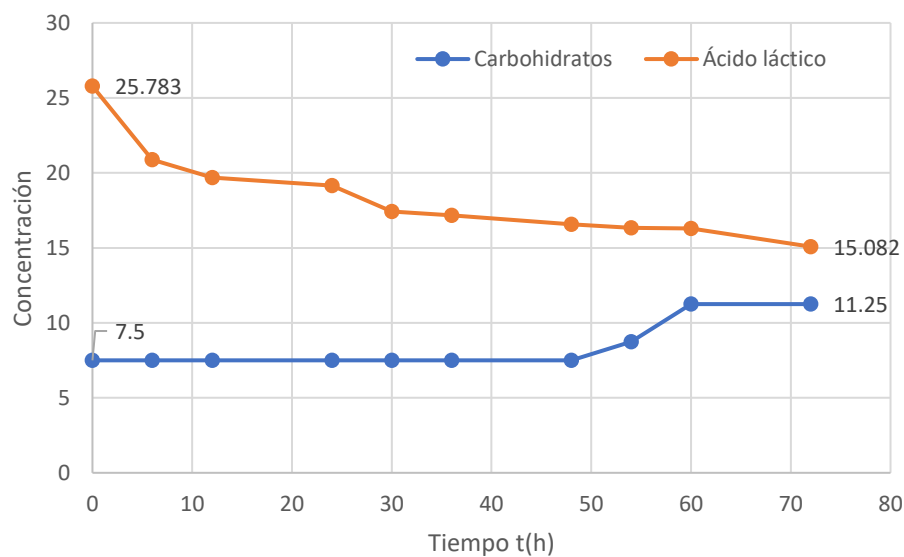


Figura 3.8 Producción de ácido láctico y consumo de carbohidratos 10 %-72 h.

Para inóculo de 15 % v/v la producción de ácido láctico se comportó de la misma manera que con inóculo del 10 %, con una producción de 1.25 g/L a partir de la hora 54 y una producción final de 3.75 g /L con una concentración final de 11.25 g/L de ácido láctico producido, para la remoción de carbohidratos se obtuvo un valor de 6.98 g/L, siendo la menor concentración de carbohidratos consumido en comparación de 5 y 10 % de inóculo.

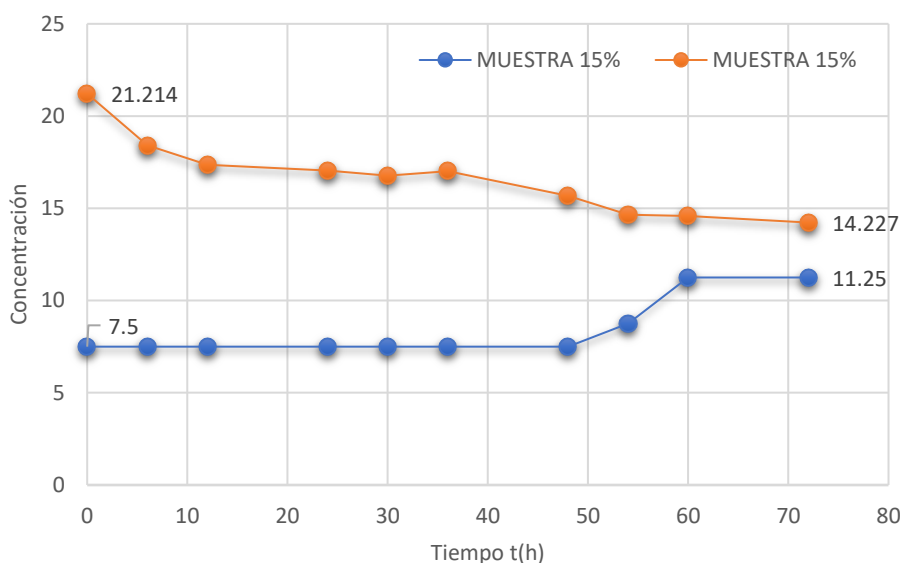


Figura 3.9 Producción de ácido láctico y consumo de carbohidratos 15 %-72 h.

3.5.3 Fermentación anaerobia de 96 hora

La producción de ácido láctico en fermentación de 96 horas se muestra en la Figura 3.10 donde se puede observar que existe un incremento de ácido láctico más pronunciado a partir de la hora 36 con 3.75 g/L con 5 % de inóculo v/v, con una concentración final de 11.25 g/L producido. En cuanto al consumo de carbohidratos, se obtuvo una remoción de 9.42 g/L con una concentración final de 12.38 g/L.

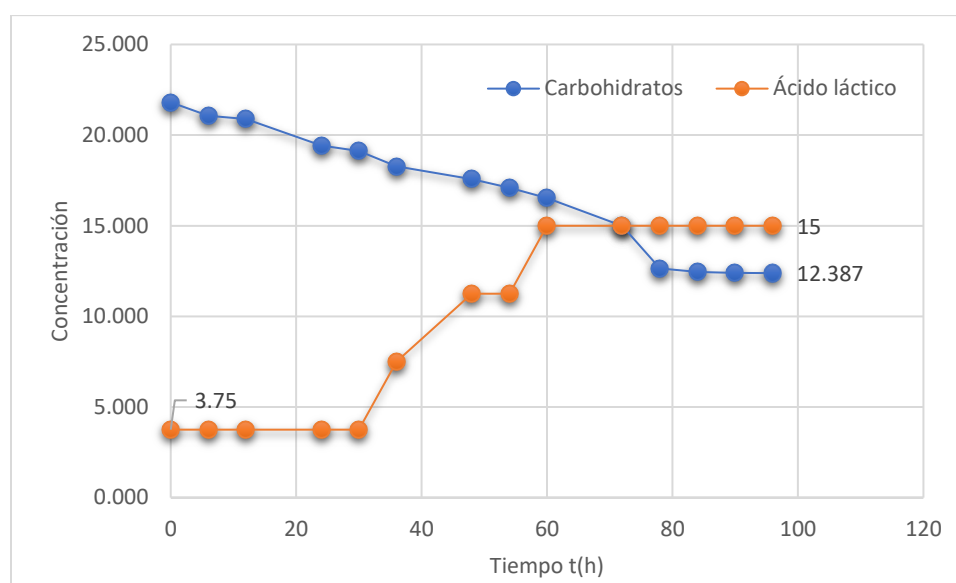


Figura 3.10 Producción de ácido láctico y consumo de carbohidratos 5 %-96 h.

Para 10 % de inóculo su incremento fue a partir de la hora 30 con 3.75 g/L, obteniendo una producción final de 7.50 g/L igual que con inóculo de 5 % y disminución de carbohidratos de 9.69 g/L, mostrada en la Figura 3.11 y 3.12 para 15 % de inóculo, obteniendo la misma producción que con inóculo de 5 y 10 % v/v, de acuerdo a las tres concentraciones utilizadas no existió diferencias significativas para la remoción de carbohidratos ya que todas se encuentran en un rango de 9.42 g/L a 9.58 g/L, en comparación a (Castells-Román, 2018) que obtuvo una producción menor con un valor de 5 g/L de ácido láctico al evaluar 8 especies diferentes de *Bacillus subtilis* en condiciones aeróbicas y anaeróbicas utilizando glucosa como sustrato.

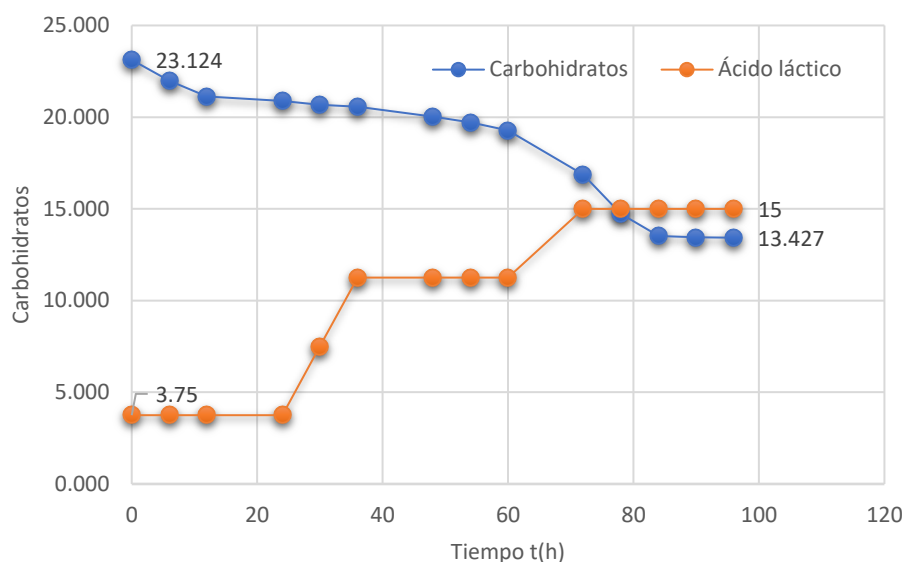


Figura 3.11 Producción de ácido láctico y consumo de carbohidratos 10 %-96 h.

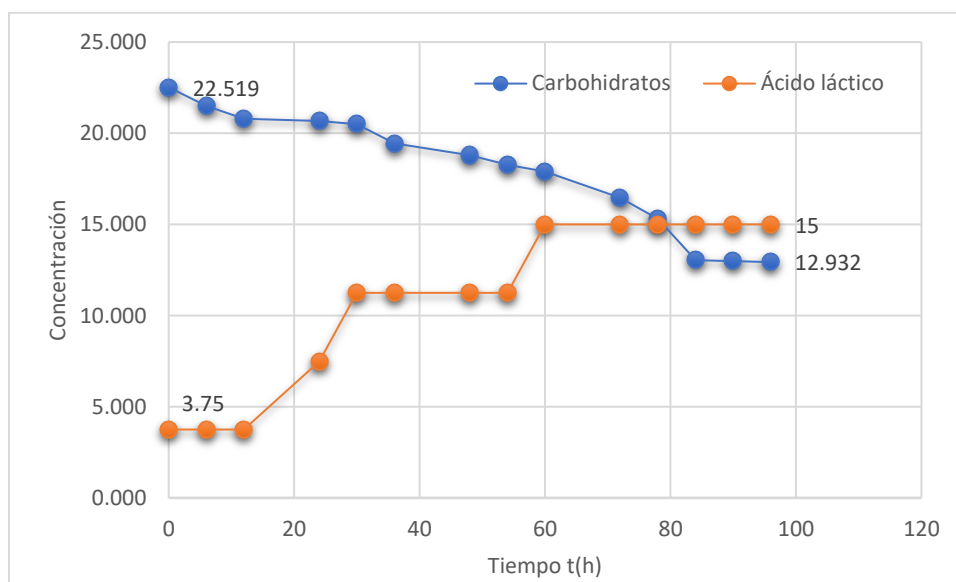


Figura 3.12 Producción de ácido láctico y consumo de carbohidratos 15 %-96 h.

3.6 ANOVA para remoción de carbohidratos

De acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) realizado, se encontró que el factor % de inóculo resultó ser significativo en la variable de respuesta para el consumo de carbohidratos Anexo I, debido a que presenta un valor de P (0.022), siendo este

valor menor al valor de significancia $\alpha=0.05$, de igual manera el factor del tiempo fue significativo en la variable respuesta al obtener una $P=0.000$. Ambos factores resultaron ser significativos, para la interacción de factores (inóculo*tiempo) obteniendo una $P=0.000$.

En cuanto al optimizador de respuesta los mejores resultados obtenidos para la remoción de carbohidratos al combinar el % inóculo y tiempo, se obtuvo como mejor resultado la concentración de 5 % de inóculo en periodo de tiempo de 48 horas, con una disminución en carbohidratos de 4.02 g/L.

Para el análisis estadístico de ácido láctico mostrada en el Anexo II, se observó que el factor % inóculo resultó afectar a la variable de respuesta para la producción de ácido láctico, obteniendo una $P= 0.138$ siendo mayor al (valor $P < \alpha$) $\alpha=0.05$, para el factor tiempo este valor se muestra significativo a la variable respuesta obteniendo un valor de $P= 0.002$. Para los factores (Inóculo*Tiempo) los resultados afectan a la variable de producción de ácido láctico al obtener un $P= 0.283$.

En cuanto al optimizador de respuesta los mejores resultados obtenidos para la producción de ácido láctico al combinar % de inóculo y tiempo, el mejor resultado se obtuvo con 15 % de inóculo en tiempo de 96 horas, con una producción de 7.5 g/L de ácido láctico, siendo mayor a lo obtenido por (Rocafuerte-Peña, 2022) de 4.75 g/L utilizando *Bacillus subtilis* en residuos de café con una misma concentración de inóculo.

3.7 Consumo de sustrato mediante modelo de Hom 48 horas

En la Figura 3.12 se puede apreciar el comportamiento de consumo de sustrato, representado por la remoción de carbohidratos durante la fermentación anaerobia, con las concentraciones utilizadas de inóculo 5, 10 y 15 % (v/v). De acuerdo al análisis de los resultados obtenidos se logró observar el comportamiento gráfico, similar a la cinética de primer orden, obteniendo una pendiente de 45° , con

excepción del inóculo de 5% que es similar a un comportamiento tipo cresta, correspondiente a una cinética de primer orden, en el cual el modelo de Hom describe adecuadamente su comportamiento. A sí mismo, se indican los resultados de las velocidades del consumo de sustrato, obteniendo mejor ajuste al modelo con 15 % al obtener una R^2 (0.990), en cuanto al valor más pequeño de m 0.395 logró con inóculo de 5 % y una velocidad de consumo de sustrato de 0.012, siendo mayor a la concentración de 10 y 15 %. Los valores obtenidos son representativos de una velocidad de remoción “lenta” del sustrato representando una resistencia a la remoción por parte del *Bacillus subtilis*, cumpliendo una función en tiempos prolongados.

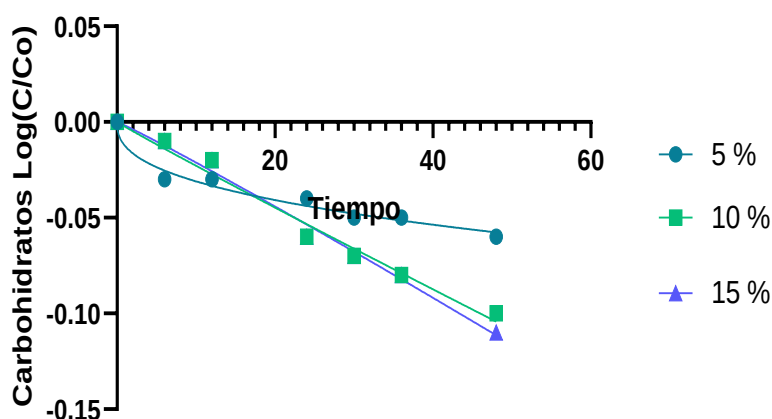


Figura 3.13 Remoción de carbohidratos modelo de Hom 48 horas

3.8 Consumo de sustrato mediante modelo de Hom 72 horas

Así mismo, en la Figura 3.13 se muestran los resultados de la remoción de carbohidratos en un periodo de 72 horas, en base a los datos obtenidos, se muestra un comportamiento gráfico similar a la cinética de primer orden, con excepción del inóculo de 10 y 15 % v/v, al presentar un comportamiento tipo cresta, la mejor remoción se obtuvo con inóculo de 10 % con una R^2 (0.983), así mismo, una m (0.377) y una velocidad de consumo de sustrato k (0.044), siendo esta la velocidad más alta, en comparación a inóculo de 5 y 15 % v/v.

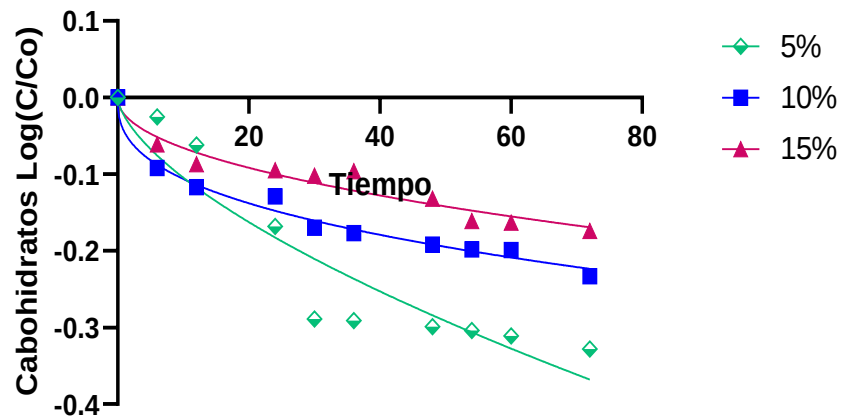


Figura 3.14 Remoción de carbohidratos modelo de Hom 72 horas

3.9 Consumo de sustrato mediante modelo de Hom 96 horas

En la Figura 3.14 podemos observar los resultados de la cinética fermentativa en período de 96 horas, en donde se aprecia el comportamiento gráfico para las tres concentraciones de inóculo utilizadas, observado una pendiente de 45° similar a la cinética de primer orden, así mismo la mejor remoción se obtuvo con inóculo de 5 % al obtener una R^2 (0.968), m (1.375) y una velocidad de consumo de sustrato de k (0.0005) siendo mayor a 10 y 15 % v/v de inóculo, obteniendo la misma concentración para 48 horas de fermentación.

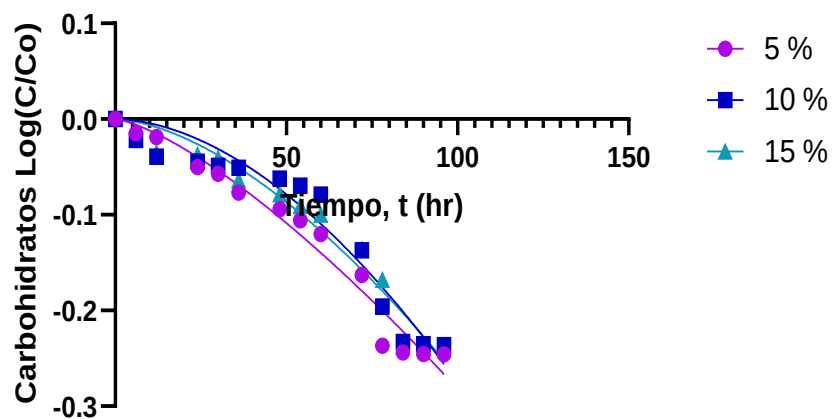


Figura 3.15 Remoción de carbohidratos modelo de Hom 96 horas

3.10 Crecimiento microbiano

A continuación, se presenta el crecimiento de *Bacillus subtilis* como producto de la fermentación anaerobia a diferentes tiempos, contabilizado en unidades formadoras de colonias por mL.

3.10.1 Crecimiento microbiano 48 horas

En la evaluación de la curva de crecimiento microbiano se observa la fase exponencial a partir de las 26 horas evaluándose hasta las 48 horas como se muestra en la Figura 3.15, confirmando su adaptación al sustrato utilizado. Obteniendo un tiempo similar de crecimiento que (Salazar-Quispe *et al.*, 2019). De acuerdo a las concentraciones utilizadas, el mayor crecimiento poblacional se obtuvo con un inóculo del 10 %, sugiriendo una velocidad mucho mayor con una tasa máxima de crecimiento de 0.045 indicando una mejor adaptación del microorganismo al sustrato y una velocidad mayor de crecimiento para esa concentración.

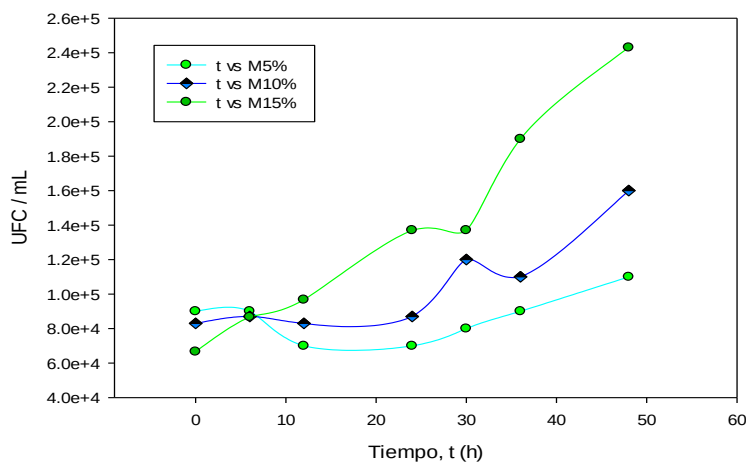


Figura 3.16 Cinética de crecimiento de *Bacillus subtilis* 48 horas

3.10.2 Crecimiento microbiano 72 horas

La evaluación de la curva de crecimiento para un tiempo de 72 horas se muestra en la Figura 3.16, en donde se observa el crecimiento en las primeras horas de incubación para las tres concentraciones, en la curva del 15 % podemos observar una mayor concentración de células en la hora 12, sin embargo, a partir de la hora 18 existió un incremento ligero, iniciando su fase exponencial a las 18 horas para las tres concentraciones, hasta llegar a la hora 54 donde se mantuvieron en fase estacionaria, con una tasa máxima de crecimiento de 0.0014, con inóculo de 5 % lo que nos indica su rápido crecimiento.

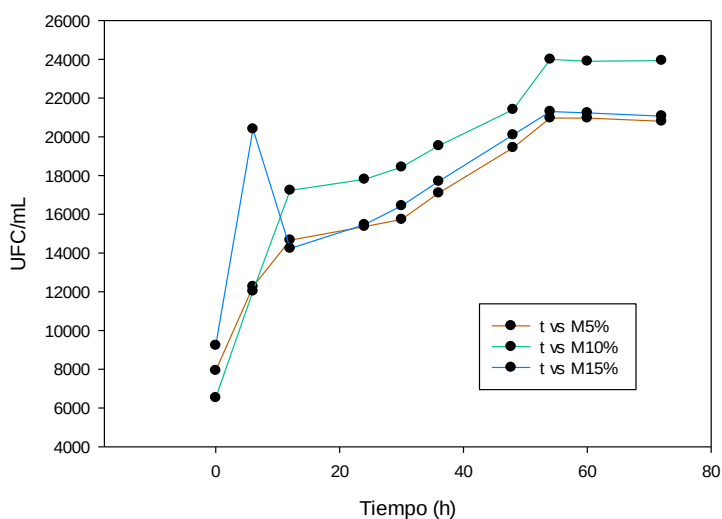


Figura 3.17 Cinética de crecimiento de *Bacillus subtilis* 72 horas

3.10.3 Crecimiento microbiano 96 horas

En la Figura 3.17 se observa la tasa de crecimiento celular para un período de incubación de 96 horas, observando un incremento ligero desde la hora 6, sin embargo, no existió una misma secuencia de crecimiento para las tres concentraciones ya que su multiplicación celular tuvo diferencias para cada una de las horas evaluadas, por lo que afectó la falta de agitación durante el período de incubación de las fermentaciones anaerobias, sin embargo, hubo un decremento celular a partir de la hora 54 para todas las concentraciones, lo que indica una menor

concentración de sustrato para su desarrollo. De acuerdo a los valores de crecimiento, la velocidad máxima se obtuvo con inóculo de 5 % v/v con un valor de 0.0013, indicando una mejor adaptación al sustrato.

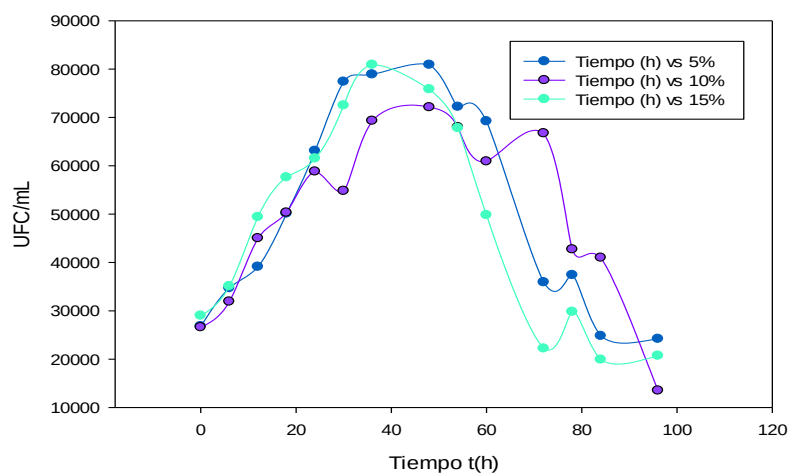


Figura 3.18 Cinética de crecimiento *Bacillus subtilis* 96 horas

3.11 ANOVA para crecimiento microbiano

De acuerdo a las cinéticas de crecimiento microbiano con la bacteria *Bacillus subtilis* se comprueban los resultados que se tuvieron al utilizar los porcentajes de 5, 10 y 15 % de inóculo en el incremento de colonias UFC/mL, analizando el mejor crecimiento obtenido a las diferentes horas de exposición.

El análisis de varianza (ANOVA), Anexo II, mostro que el factor % de inóculo resulto ser significativo a la variable de crecimiento microbiano, al presentar un valor de $P= 0.000$, siendo menor al valor de significancia ($\alpha < 0.005$), de igual manera el factor tiempo demostró ser significativo en la variable respuesta, al obtener un $P= 0.000$, para la interacción (Inóculo*Tiempo) resulto ser significativo obteniendo una $P= 0.000$.

Los resultados obtenidos al utilizar el optimizador de respuesta para encontrar el mejor crecimiento al combinar los factores % de inóculo y tiempo, demostró ser con 10 % de inóculo a un tiempo de 48 horas, obteniendo un crecimiento de 7.70×10^4

UFC/mL. Dado que (Matos-Trujillo *et al.*, 2020) mencionan que el bagazo de caña de azúcar es un buen sustrato para el desarrollo microbiano al contener una buena concentración de carbohidratos con un valor de aproximadamente el 70 %.

3.12 Cuantificación de biomasa 48, 72, 96 horas

En la Tabla 3.2 se observan los valores obtenidos del producto formado de la fermentación anaerobia en los diferentes periodos de tiempo, para un tiempo de 48 horas se obtuvo un mayor incremento con inóculo de 15 % v/v con 20.21 g/L con un rendimiento $Y_{xs}= 2.90$ g/g mostrada en la Tabla 3.3, para 72 horas se observó un incremento de 29.28 g/L con un rendimiento de 4.19 g/g en 15 % de inóculo, también se pudo observar que la concentración de biomasa no varía significativamente en 24 y 72 horas de fermentación al modificar la concentración utilizada, mientras que el rendimiento se obtiene un aumento mínimo para todas las concentraciones.

Durante la fermentación de 96 horas, el incremento que se obtuvo para cada una de las concentraciones tuvo variaciones significativas, los mejores resultados se obtuvieron con 10 % de inóculo con un incremento de 35.04 g/L de biomasa producida y un rendimiento de $Y_{xs}=3.61$ g/g de biomasa producida por gramos de sustrato consumido, mayor a 0.48 g/g reportado (Bazán-Lugo *et al.*, 2017) al evaluar paja de trigo empleando *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabla 3.2 Concentraciones finales de biomasa

	Tiempo (h)	% de inóculo		
		5	10	15
Concentración de biomasa (g/L)	48	19.66	2.02	20.21
	72	50.89	55.15	59.70
	96	46.40	48.34	47.90

Tabla 3.3 Rendimientos de biomasa

	Tiempo (h)	% de inóculo		
		5	10	15
Rendimiento de biomasa g/L*g ST	48	4.87	0.39	2.90
	72	1.67	2.37	4.19
	96	3.35	3.61	2.94

3.13 ANOVA para producción de biomasa

El análisis de varianza (ANOVA), Anexo III, muestra que el factor % inóculo resulto afectar a la variable respuesta en la producción de biomasa al obtener un valor de $P= 0.084$, siendo mayor al valor $\alpha < 0.05$, para el factor tiempo demostró ser significativo en la variable respuesta al obtener un valor de $P= 0.000$. En la interacción (inóculo*Tiempo) fueron significativos con un valor de $P= 0.001$ para el crecimiento de biomasa.

Los resultados obtenidos al utilizar el optimizador de respuesta para encontrar la mejor producción de biomasa al combinar los factores % de inóculo y tiempo, fue con una concentración de 10 % de inóculo en un tiempo de 72 horas, obteniendo un incremento de la biomasa de 25.39 g/L mayor 0.48 g/g reportado por (Bazán-Lugo *et al.*, 2017) al evaluar paja de trigo empleando *Pseudomonas aeruginosa*.

3.14 Calidad de biomasa obtenida de cinética fermentativa

La calidad nutricional de la biomasa se determina a partir de su contenido nutricional y de su capacidad de proveer nutrientes, es de vital importancia tener una buena calidad de la biomasa debido a que serán factores importantes que aportaran a los rumiantes para su posible alimentación, para evaluar el análisis de la calidad, la biomasa resultante se sometió a un análisis de: carbohidratos, nitrógeno, proteínas, ST, y STV, obteniendo un importante efecto sobre la calidad, los resultados

obtenidos se muestran en los siguientes puntos, así mismo en la Figura 3.18 se observa la biomasa obtenida posterior a la fermentación anaerobia utilizando los residuos de caña de azúcar RAC como sustrato en presencia con el microorganismo *Bacillus subtilis*.

Para la obtención de la biomasa se procedió a una eliminación del líquido de las muestras finalizando la fermentación, las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm por 10 minutos en centrifuga Hermle Laboratory GMB H, retirando el medio líquido.



Figura 3.19 Biomasa obtenida de fermentación anaerobia

3.14.1 Nitrógeno

En la Tabla 3.4 se presentan los resultados del análisis de nitrógeno en biomasa obtenida de los residuos de caña de azúcar, como puede apreciarse, el contenido de nitrógeno presenta un intervalo entre 0.33 a 1.32 g/Kg ST, para inóculo de 5 % presenta un alto contenido con un valor de 0.96 g/Kg ST en un tiempo de 96 horas, con 10 % de inóculo los resultados resaltan con un valor de 1.32 g/Kg ST obteniendo un valor mayor a 1.10 % reportado por (Ruilova-Cueva y Hernández-Monzón, 2014) en bagazo de caña.

El valor mayor obtenido de nitrógeno en la biomasa tratada por fermentación anaerobia mediante el *Bacillus subtilis*, se obtuvo con 10 % de inóculo con un valor de 1.32 g/kg ST teniendo un incremento al tener relación directa con el contenido de proteína.

Tabla 3.4 Parámetros de nitrógeno en biomasa

Concentración de inóculo	Cinética fermentativa 48 h	Cinética fermentativa 72 h	Cinética fermentativa 96 h	Unidad
5%	0.57	0.95	0.96	g/kg ST
10%	0.33	1.32	1.06	g/kg ST
15%	0.65	0.76	1.03	g/kg ST

13.14.2 Proteínas

Las proteínas son compuestos de: carbono, hidrogeno, oxígeno y nitrógeno, constituyen un componente esencial del fotoplasmas celular y de la dieta animal. La formación de proteínas es una unión grande de aminoácidos, estos son sintetizados por plantas y bacterias. El análisis químico en los resultados muestra un incremento favorable en proteínas al utilizar residuos de caña de azúcar con *Bacillus subtilis*, el mayor porcentaje se obtuvo con 10 % de inóculo con 8.27 % en un tiempo de 72 horas, obteniendo resultados favorables en su incremento, siendo menor a 12.69 % generado por (Aguirre *et al.*, 2017) en residuos de rastrojo de maíz y (Oviedo *et al.*, 2016) al evaluar residuos de papa y yuca con *Paecilomyces variotti* mediante la fermentación en estado sólido, obteniendo un enriquecimiento proteico de 166.29 % en papa y un 171.05 % para yuca.

Es importante señalar que el contenido de nutrientes presentes en la biomasa obtenida de la fermentación, muestran una aceptable composición nutricional, constituyendo un producto utilizable para alimentación de especies ganaderas.

Tabla 3.5 Valores de proteína en biomasa de residuos de caña de azúcar RAC

Concentración de inóculo	Cinética fermentativa 48 h	Cinética fermentativa 72 h	Cinética fermentativa 96 h	Unidad
5%	3.62	5.99	6.01	%
10%	2.11	8.27	6.67	%
15%	4.09	4.79	6.47	%

13.14.2 Carbohidratos

En la Tabla 3.13 se muestra los resultados de carbohidratos obtenidos de la biomasa de las fermentaciones anaerobias en los diferentes tiempos de exposición (48, 72, 96 h), de acuerdo a los valores obtenidos en tiempo de 48 horas se tuvo una mejor remoción con inóculo de 10 % v/v, al obtener 12.02 g/L de carbohidratos finales, en tiempo de exposición de 72 horas con inóculo de 15 % v/v se obtuvo 11.35 g/L y en un periodo de 96 horas la mejor remoción de carbohidratos se obtuvo con 15 % con 10.49 g/L de carbohidratos. Resultados similares obtuvo (Bazán-Lugo *et al.*, 2017) con una degradación biológica de 76.5 % al evaluar paja de trigo empleando *Pseudomonas aeruginosa*. Para los diferentes tiempos de exposición y la mejor remoción de carbohidratos se tuvo en un periodo de 96 horas con inóculo de 15 % v/v.

Tabla 3.6 Carbohidratos en biomasa

Concentración de inóculo	Cinética fermentativa 48 h	Cinética fermentativa 72 h	Cinética fermentativa 96 h	Unidad
5%	15.45	13.52	11.09	g/L
10%	12.02	13.85	12.11	g/L
15%	13.03	11.35	10.49	g/L

3.14.3 Conteo celular en biomasa

En la Figura 3.19 se puede observar los resultados del estudio de densidad de unidades formadoras de colonia (UFC), en la biomasa en sus concentraciones de 5, 10 y 15 % de inóculo, para tiempo de 48, 72 y 96 horas. Los resultados arrojaron mayores cantidades de (UFC) en 10 % de inóculo con 1.76×10^4 en tiempo de 48 horas, al igual que con inóculo de 10 % con 2.54×10^4 UFC para 72 horas y 2.27×10^4 con 10% de inóculo en 96 horas, demostrado que con inóculo de 10 % a un tiempo de 72 horas se obtiene mayor cantidad de microorganismo presentes en la biomasa, logrando obtener un valor menor a 2.53×10^8 UFC·mL⁻¹ lo obtenido por (Díaz-Monroy *et al.*, 2018) al analizar residuos de zanahoria con bacterias ácido-lácticas.

De acuerdo a (Yuquilema *et al.*, 2017), mencionan que los probióticos son microorganismos vivos como (bacterias y levaduras), son empleados con la finalidad de mejorar la salud y rendimiento de hospedero, la cual puede ser utilizada como una alternativa como alimento para la reducción de la incidencia de los trastornos intestinales y mejorar la salud animal.

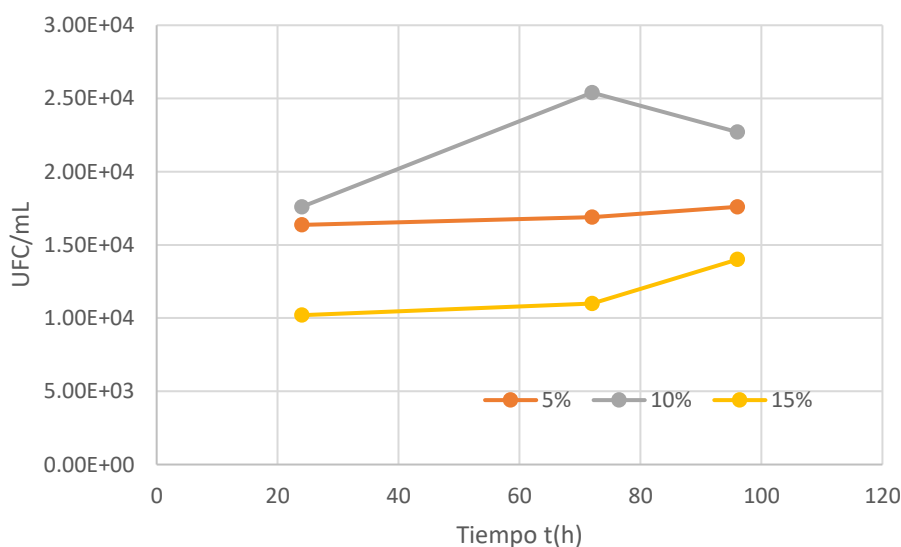


Figura 3.20 UFC de *Bacillus subtilis* en biomasa

3.7.4 Solidos totales

En la Tabla 3.7 se muestran los resultados obtenidos de ST en biomasa para cada una de las cinéticas, en concentraciones de (5, 10 y 15 % v/v) de inóculo con tiempo de 48, 72 y 96 horas. Los datos obtenidos presentan un intervalo de 13.43 % a 29.05 % ST, para inóculo de 5 % se obtuvo mayor cantidad con un tiempo de 96 horas, para 10 % de inóculo se obtuvo con 72 horas y en 15 % de inóculo en un tiempo de 48 horas, obteniendo una mayor concentración en comparación con inóculo de 5 y 10 % v/v. De acuerdo a (González-Suárez *et al.*, 2019) reportaron ST (g ST/g biomasa) de (0.7073) y SV (g SV/g biomasa) de (0.0532), para gabazo de caña de azúcar con pretratamiento alcalino en un intervalo de SV (% ST) 98 %, así mismo menciona que el pretratamiento alcalino es una alternativa que puede ser utilizada para incrementar la biodegradabilidad del bagazo de caña de azúcar. Todas las muestras analizadas muestran un incremento favorable en ST, debido a la cantidad de biomasa generada durante la fermentación.

Así mismo en la tabla 3.8 se muestran los resultados de los STV, la cual es importante considerar debido a que estiman la cantidad de materia orgánica que queda en la biomasa tratada mediante la fermentación anaerobia con *Bacillus subtilis*.

Tabla 3.7 ST en biomasa

Concentración de inóculo	Cinética fermentativa 48 h	Cinética fermentativa 72 h	Cinética fermentativa 96 h	Unidad
5%	14.12	16.86	17.11	% m/m
10%	18.04	42.11	16.46	% m/m
15%	29.05	13.43	16.64	% m/m

Tabla 3.8 STV en biomasa

Concentración de inóculo	Cinética fermentativa 48 h	Cinética fermentativa 72 h	Cinética fermentativa 96 h	Unidad
5%	95.87	96.19	97.29	% m/m
10%	94.37	91.38	97.09	% m/m
15%	96.68	94.62	96.44	% m/m

CONCLUSIONES

La caracterización fisicoquímica de los residuos de caña de azúcar RAC, pretratados térmicamente, presentó valores en los componentes principales del sustrato con 23.65 g/L en carbohidratos, 0.15 g/kg ST en nitrógeno y 0.97 % en proteínas, con un valor en ST de 7.50 % y STV 96.05 %, en cuanto a los microorganismos microbiológicos se obtuvo una disminución favorable al realizar tratamiento térmico obteniendo valores de <1000 por debajo de los límites máximos permisibles, permitiendo el crecimiento adecuado y desarrollo del *Bacillus subtilis* en el sustrato.

La bacteria comercial de marca SERENADE ASO, *Bacillus subtilis* cepa QST 713 logró propagarse adecuadamente en medio Agar Nutritivo, a temperatura de 35 °C y su reconocimiento de forma alargada de color morado y de regular tamaño.

De acuerdo a las fermentaciones anaerobias en concentraciones de (5 %, 10 % y 15 %) v/v en tiempos de (48 h, 72 h, 96 h), su comportamiento fue variado en la remoción de carbohidratos, crecimiento microbiano, biomasa obtenida y ácido láctico para cada una de las diferentes horas de exposición. Según el análisis estadístico se encontró que los mejores resultados con interacción de los factores % inóculo y tiempo fueron significativos en la remoción de carbohidratos, al optimizar los resultados se encontró el mejor tratamiento con 5 % de inóculo a un tiempo de 48 horas, al optimizar la producción de ácido láctico se logró obtener el mejor resultado con 15 % de inóculo a un tiempo de 96 horas logrando obtener 11.25 g/L de ácido láctico, para el crecimiento microbiano se obtuvo con 10 % de inóculo a 72 horas. En cuanto a la generación de biomasa la mayor producción de tuvo con 10 % de inóculo a 72 horas con una concentración de 25.39 g/L con un rendimiento de 2.37 g/L·g ST.

Con base a los resultados obtenidos, se lograron los objetivos planteados al inicio de la tesis. La biomasa obtenida con 10 % de inóculo y 72 h, presento un alto porcentaje de proteínas (8.27 %), en esta misma cinética se presentó una remoción favorable de carbohidratos, obteniéndose una concentración final de 10.49 g/L y una mayor concentración de microorganismo de 2.54×10^4 en el inóculo, demostrado ser una biomasa rica en agentes probióticos.

Por otra parte, el uso de agentes microbiológicos mediante la fermentación, es una alternativa para mejorar el valor nutritivo de los residuos y evitar las quemas agrícolas que provocan gases de efecto invernadero, CO₂ y NO liberados al medio ambiente, contribuyendo con el desarrollo de nuevas estrategias de manejo de los residuos sólidos agrícolas, mejorando la calidad del ambiente y teniendo grandes beneficios de la rentabilidad para los productores de productos primarios.

Así mismo la actividad microbiana en la biomasa presento una buena concentración final de agente probióticos, la cual puede ser utilizada para la alimentación de diferentes especies ganaderas contribuyendo a la mejora del ecosistema intestinal de huésped, favoreciendo el desarrollo de bacterias benéficas y mejorando la digestión alimentaria, la implementación de este proceso permite el incremento de las utilidades de los productores de caña de azúcar durante su cosecha, al obtener subproductos con alto valor comercial.

Anexo I

Análisis estadístico

Cinética de remoción de carbohidratos para un tiempo de 48, 72 y 96 horas

Tabla A. Análisis de varianza % inóculo y Tiempo remoción de carbohidratos

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Sec. Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Inóculo	2	34.00	1.31%	94.45	47.23	3.97	0.022
Tiempo	2	1276.27	49.20%	1276.27	638.14	53.66	0.000
Inóculo*Tiempo	4	284.73	10.98%	284.73	71.18	5.99	0.000
Error	84	998.98	38.51%	998.98	11.89		
Total	92	2593.99	100.00%				

Tabla B. Optimizador de respuesta en remoción de carbohidratos

Solución

Solución	Inóculo	Tiempo	Resultado Deseabilidad	
			Ajuste	compuesta
1	5	48	30.3609	0.866727

Cinética de producción de ácido láctico para un tiempo de 48, 72 y 96 horas

Tabla C Análisis de varianza % inóculo y Tiempo producción de ácido láctico

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Sec. Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tiempo	2	165.77	12.94%	165.77	82.88	6.82	0.002
Inóculo	2	31.55	2.46%	49.28	24.64	2.03	0.138
Inóculo*Tiempo	4	62.38	4.87%	62.38	15.59	1.28	0.283
Error	84	1021.25	79.73%	1021.25	12.16		
Total	92	1280.95	100.00%				

Optimizador de respuesta en producción de ácido láctico

Solución

Solución	Inóculo	Tiempo	Resultado Deseabilidad	
			Ajuste	compuesta
1	15	96	10.9821	0.642857

Anexo II

Análisis estadístico

Cinética de crecimiento microbiano para un tiempo de 48, 72 y 96 horas

Tabla A. Análisis de varianza en crecimiento microbiano *Bacillus subtilis*

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Inóculo	2	23434177440	11717088720	45.10	0.000
Tiempo	2	18101309686	9050654843	34.84	0.000
Inóculo*Tiempo	4	37850464579	9462616145	36.42	0.000
Error	84	21823681505	259805732		
Total	92	89686713078			

Tabla B. Optimizador de respuesta para crecimiento microbiano

Solución

Solución	Inóculo	Tiempo	Resultado Deseabilidad	
			Ajuste	compuesta
1	10	48	104286	0.650328

Anexo III

Análisis estadístico

Cinética de producción de biomasa para un tiempo 48, 72, 96 horas

Tabla A. Análisis de varianza en producción de biomasa

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Inóculo	2	4.799	2.3996	2.55	0.084
Tiempo	2	17.012	8.5060	9.05	0.000
Inóculo*Tiempo	4	18.933	4.7334	5.03	0.001
Error	84	78.970	0.9401		
Total	92	118.208			

Tabla B. Optimizador de respuesta para producción de biomasa

Solución

Solución	Inóculo	Tiempo	Resultado	
			Ajuste	Deseabilidad compuesta
1	10	72	4.15508	0.608747

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aguilar-Rivera, N. (2017). Cadena de valor de la diversificación de la agroindustria de la caña de azúcar en México. *Agro-productividad*, 21-28.
- Aguirre, L., Abad, R., Apolo, V., Torres, K., Curay, I., Jaramillo, D., . . . Córdova, J. (2017). Caracterización y mejoramiento de residuos agrícolas para uso en la alimentación animal. *Libro de Memorias del I Simposio de Investigación Científica de la Universidad Nacional de Loja*. Universidad Nacional de Loja.
- Alfaro-Goicochea, C. A. (2020). Alteración de la calidad del aire por quema de caña de azúcar (saccharum) en casa grande, la libertad. *Titulo de Licenciatura*. Universidad Nacional Agraria la Molina, Lima-perú.
- Alfonso-Acosta, Y., Pérez-Rojas, A., y Yll-Lavín, M. (2019). Diseño de un biorreactor para la producción de inóculo de Salmonella enteritidis. *Revista Cubana de Química*, 120-136.
- Alvarado-López, A. I., y Valdez-Arcentales , M. E. (2019). Determinación de los parámetros cinéticos como: la velocidad máxima de reacción y la constante de crecimiento en el proceso fermentativo del mucílago de cacao CCN-51. *Tesis de Licenciatura*. Universidad de Cuenca, Cuenca-Ecuador.
- Anguiano-Cabello, J., Flores-Olivas, A., Olalde-Portugal, V., Arredondo-Valdés, R., y Laredo-Alcalá, E. I. (2019). Evaluation of Bacillus Subtillis as promotores of plant growth. *Bio-Ciencia*, 1-13.
- Bazán-Lugo, E., Álvarez-Cárdenas, C. G., y Totosa-S., A. (2017). Efecto del pretratamiento de la paja de trigo sobre el rendimiento de biomasa y la producción de un extracto con actividad celulolítica empleando Pseudomonas aeruginosa. *Acta Universitaria*, 27(5).
- Bonilla-Pérez, W. D. (2018). Generación de residuos agrícolas de cosecha de variedades de caña de azúcar y su utilización como fuente de energía. *Titulo de Licenciatura*. Universidad Rafael Landívar, Guatemala.
- Cabrera-Ayala, C., y Novoa-Izaguirre, C. (2016). Influencia de la concentración y temperatura de fermentación de azúcares reductores obtenidos a partir de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar, en la obtención de un biopolímero

- empleando *Bacillus subtilis*. *Agroindustrial Science*, 17-28.
doi:<https://doi.org/10.17268/agroind.science.2016.01.02>
- Camacho-Torres, Y. K., y Lizarazo-Cala, Y. N. (2021). Producción de ácido láctico a partir del proceso de fermentación de la pulpa de café. Universidad libre de Colombia/Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias.
- Cardona-López, N. R., Marín, J. A., Medina-Vargas, O. J., Ríos, L. A., y Caicedo-Pineda, G. A. (2021). Comparación de la cinética de remoción de la lignina de bagazos de caña de azúcar (*Saccharum Officinarum*) y cactácea (*Opuntia Ficus-Indica*), utilizando enzima lacasa. *Ciencia en desarrollo*, 79-89.
doi:<https://doi.org/10.19053/01217488.v12.n1.2021.12449>
- Castañeda-Alvarez, E., y Consuelo-Sánchez, L. (2016). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova*, 14(26), 53-62.
- Castells-Román, A. (2018). Evaluación del potencial de producción de ácido láctico mediante cepas de *Bacillus subtilis*. *Tesis de Licenciatura*. Universidad San Francisco de Quito USFQ Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales.
- Catañeda, M. T. (2019). Estequiometría y cinética del crecimiento microbiano. *Doctoral dissertation*. Universidad Tecnológica Nacional-Facultad Regional la plata.
- Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., y Mahillon, J. (2019). Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group. *Frontiers in Microbiology*, 1-19.
doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>
- Chiza-Romo, E. R. (2019). Evaluación in vitro de la bacteria *Bacillus subtilis* aislada de la rizosfera de papa (*Solanum tuberosum*) como potencial antagonista en el control de *Phytophthora infestans*. *Tesis de Licenciatura*. Escuela de Ciencias agrícolas y Ambientales, Ecuador.
- Cobo-Salcedo, C. F. (2017). Evaluación de medios de cultivo líquidos para la multiplicación de la bacteria *Bacillus subtilis*. *Proyecto de investigación*. Universidad San Francisco de Quito USFQ, Quito.

- Coronel-Regalado, E. K. (2020). Evaluación del potencial energético de los residuos agrícolas de cosecha (RAC) de la caña de azúcar para generar energía eléctrica en la empresa Agroindustrial Pomalca. *Tesis de grado*. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque – Perú.
- Debernardi-Vázquez, T., Aguilar-Rivera, N., y Herrera-Paz, H. (2017). Subproductos, coproductos y derivados de la agroindustria azucarera. *Agro-productividad*, 10(11), 13-20.
- Díaz-de los Ríos, M., y Hernández-Ramos, E. (2020). Composición de la cera de caña de azúcar y el empleo de solventes para su extracción y fraccionamiento. *ICIDICA*, 54(3), 13-22.
- Díaz-Monroy, B., Chacha, E., y Baquero, F. (2018). Zanahoria amarilla (*Daucus carota* L.) como alimento biotecnológico para vacas. *Ciencia y Agricultura*, 15(2), 83-97. doi:DOI: <http://doi.org/10.19053/01228420.v15.n2.2018.8442>
- Fernández-Gálvez, Y., Pedraza-Olivera, R. M., Llanes-Díaz, A., Hermida-Baños, Y., Torres-Varela, I. C., Montalván-Delgado, J., . . . Daniel-Ortega, Y. (2018). Indicadores de la composición química en caña de azúcar según edad de rebrote, cultivar y fracción de la planta. *Revista de Producción Animal*, 30(1), 1-7.
- Gallego-Albiach, V., y Pérez-Igualada, L. M. (2021). Estimación de la densidad celular mediante el uso de cámaras de recuento. *Informe*. Universidad Politécnica de València.
- Gil-López, D., Lois-Correa, J., Sánchez-Pardo, M., y Orta-Guzmán, V. (2016). Creando conciencia acerca de un uso racional de los residuos de la agroindustria azucarera (RAC). *Encuentro Nacional de Investigación Científica y Tecnológica del Golfo de México*, 6-12.
- Gómez-Merino, F., Trejo-Téllez, L., Salazar-Ortiz, J., Pérez-Sato, J., Senties-Herrera, H., Bello-Bello, J., y Aguilar-Rivera, N. (2017). La diversificación de la agroindustria azucarera como estrategia para México. *Agro-productividad*, 10(11), 7-12.
- González-Suárez, A., Hernández-Alfonso, G., y Pereda-Reyes, I. (2019). Pretratamiento alcalino de bagazo de caña para mejorar la producción de biometano. *Centro Agrícola*, 79-88.

- Jiménez-Delgadillo, R., Valdés-Rodríguez, S. E., y Olalde-Portugal, V. (2018). Efecto del pH y temperatura sobre el crecimiento y actividad antagónica de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia solani*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(2), 256-275. doi:<https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1711-3>.
- Joelmy, Z., Yegres, F., Vargas, N., Morales, S., Cubillan, L., Navas, P., y Márquez-Riquel, M. (2017). Empleo de la Espectroscopia Infrarroja (FT-IR-ATR) como herramienta para la Caracterización del bagazo de caña proveniente de la Sierra Falconiana. *Química Viva*, 16(3), 17-24.
- Lagos-Burbano, E., y Castro-Rincón, E. (2019). Caña de azúcar y subproductos de la agroindustria azucarera en la alimentación de rumiantes. 30(3), 917-934. doi:[doi:10.15517/am.v30i3.34668](https://doi.org/10.15517/am.v30i3.34668)
- Luna-Martínez, J. S. (2018). Obtención de un biocatalizador para la hidrólisis de residuos deslignificados de la caña de azúcar. *Tesis de grado/ Ingeniero Químico*. Universidad del Valle Facultad de Ingeniería, Colombia.
- M.R.G-Almedia, R., y R.-Ladisch, M. (2020). Enzyme interactions on lignocellulosic biomass structure. *Recent Advances in Bioconversion of Lignocellulose to Biofuels and Value Added Chemicals within the Biorefinery Concept*, 33-59. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818223-9.00003-5>
- Marasovic, M., Marasovic, T., y Miloš, M. (2017). Robust Nonlinear Regression in Enzyme Kinetic Parameters Estimation. *Hindawi*, 1-12. doi:<https://doi.org/10.1155/2017/6560983>
- Matos-Trujillo, M., Pérez-Hernandez, Y., Valdivia-Ávila, A., Ranilla, M. J., Rodríguez-Alonso, Z., Rubio-Fontanills, Y., . . . Camacho-Campos, C. (2020). Aprovechamiento de residuos agroindustriales para la producción de enzimas por *Bacillus subtilis* E 44. *Revista cubana de Ciencias Agropecuarias*, 54(1).
- Miranda-Yuquilema, J. E., Marin Cárdenas, A., Sánchez Macías, D., y García Hernández, Y. (2017). Obtención, caracterización y evaluación de dos preparados candidatos a probióticos desarrollados con residuos. *MVZ Córdoba*, 23(1), 6487-6499. doi:[10.21897/rmvz.1243](https://doi.org/10.21897/rmvz.1243)

- Olivo-Urbina, M. (2018). Optimización de la hidrólisis para el tratamiento de residuos lignocelulósicos con enzimas de *Aspergillus niger*. *Revista Ingeniería y Región*, 12(1), 99-111. doi:<https://doi.org/10.19053/01217488.v12.n1.2021.12820>
- Olivo-Urbina, M., Díaz-Monroy, B., Haro-Barroso, C., y Borrás-Saldoval, L. (2021). Optimización de la hidrólisis para el tratamiento de residuos lignocelulósicos con enzimas *Aspergillus niger*. *Ciencia en desarrollo*, 12(1), 99-111. doi:<https://doi.org/10.19053/01217488.v12.n1.2021.12820>
- Oviedo-L., J. C., Zapata-R., D. L., García-E., L., Echeverri-S, N., y Echeverri-S, D. (2016). Evaluación del enriquecimiento proteico de residuos de papa y yuca con (*Paecilomyces variotti*). *Revista Ingeniería y Región*, 16(2), 73-84. doi:<http://dx.doi.org/10.25054/22161325.1301>
- Rincón-Santamaría, A., Cuellar-Gil, J. A., Valencia-Gil, L. F., y Sanches-Toro, O. J. (2018). Cinética de crecimiento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* usando melasa de caña y sacarosa. 24(1), 38-57. doi:<https://doi.org/10.15446/abc.v24n1.70857>
- Rocafuerte-Peña, J. D. (2022). Acción fermentativa de *Bacillus Subtilis* en la bioconversión de sustratos orgánicos. *Revista UPIICSA Investigación Interdisciplinaria*, 8(1), 24-32.
- Romero-Mota, D. I. (2017). Acción fermentativa de *Lactobacillus acidophilus*, *reuteri* y *fermentum* en la bioconversión de sustratos orgánicos en productos con potencial alimenticio. *Tesis de Maestría*. Instituto Tecnológico Nacional de México/ Instituto Tecnológico de Orizaba, Orizaba.
- Ross-Alcudia, R., Bolio-López, G., Veleza, L., Azamar-Barrios, J., Hernández-Villegas, M., Pérez-Romero, J., . . . Córdova-Sánchez, S. (2017). Planta piloto para obtención de celulosa de residuos de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) y elaboración de recipientes biodegradables. *Agro-productividad*, 10(11), 60-65.
- Ruilova-Cueva, M. B., y Hernández-Monzón, A. (2014). Evaluación de residuos agrícolas para la producción del hongo *Pleurotus ostreatus*. *ICIDCA*, 48(1), 54-59.

- Ruiz-Cisneros, M. F., Ornelas-Paz, J. J., Olivas-Orozco, G., Acosta- Muñiz, C. H., Sepúlveda-Ahumada, D. R., Zamudio-Flores, P. B., . . . Rios-Velasco, C. (2018). Effect of *Bacillus* strains alone and in interaction with phytopathogenic fungi on plant growth and tomato fruit quality. *Bio-Ciencia*, 1-17. doi:<https://doi.org/10.15741/revbio.06.e541>
- Salomone, R., Saija, G., Mondello, G., Giannetto, A., Fasulo, S., y Savastano, D. (2016). Environmental impact of food waste bioconversion by insects: application of Life Cycle Assessment to process using *Hermetia illucens*. *Journal of Cleaner Production* , 1-39. doi:10.1016/j.jclepro.2016.06.154
- Sarsaiya, S., Jain, A., Kumar-Awasthi, S., Duan, Y., Kumar-Awasthi, M., y Shi, J. (2019). Microbial dynamics for lignocellulosic waste bioconversion and its importance with modern circular economy, challenges and future perspectives. *Bioresource Technology*, 1-50. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121905>
- Sarti, G. C., Cristobal-Miguez , A. E., y Curá, A. J. (2019). Optimización de las condiciones de cultivo para el desarrollo de una biopelícula bacteriana y su aplicación como biofertilizante en *Solanum lycopersicum* L. var. Río grande. *Revista de Protección Vegetal*, 34(2), 1-13.
- Shuang-Qi, T., Ren-Yong, Z., y Zhi-Cheng, C. (2018). Review of the pretreatment and bioconversion of lignocellulosic biomass from wheat straw materials. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 483-489. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.113>
- Simon, C., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., y Mahillon, J. (2019). Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group. *Frontiers in Microbiology*, 1-19. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>
- Velasco-Velasco, J., Gómez-Merino, F., Hernández-Cázares, A., Salinas-Ruiz, J., y Guerrero-Peña, A. (2017). Residuos orgánicos de la agroindustria azucarera: retos y oportunidades. *Agro-productividad*, 10(11), 99-104.
- Vera-Rodríguez, J., Medranda-Parraga, T., Siguencia-Chuya, J., Mendieta-Franco, R., y Pérez-Guallpa, M. (2021). Caracterización nutricional de los residuos orgánicos en la caña de azúcar del cantón La Troncal. *Hombre, Ciencia y Tecnología*, 25(2), 110-119.

- Zalazar-Quispe, I. J., Zúñiga-Llanos, A., Naquiche-Calero, J., Ferrer-Villena, C., y Castellanos-Cabrera, R. (2019). Caracterización enzimática de una celulasa, producida por *Bacillus* sp. (GCB-13) para la degradación de sustratos lignocelulósicos. *Ciencia y desarrollo*, 18, 25(2), 61-67. doi:doi.org/10.33326/26176033.2019.25.865
- Zambrano-Romero, A., Herrera-Moreno, N., Trueba, G., Sierra-Álvarez, R., León-Reyes, A., y Ochoa-Herrera, V. (2019). Construcción y operación de una cámara anaeróbica de bajo costo para la siembra y el cultivo de bacterias sulfato reductoras. *Acta Avances en Ciencias e Ingenierías*, 11 (18), 44-59. doi:https://doi.org/10.18272/aci.v11i2.1303