



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

OPCIÓN I.- TESIS

TRABAJO PROFESIONAL

**“PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO, VIA FERMENTACIÓN MICROBIANA CON
(LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS), COMO ESTRATEGIA DE USO EFICIENTE
DE LA ENERGÍA, PRODUCIDA A PARTIR DE RESIDUOS DE LA
AGROINDUSTRIA PILONCILLERA”**

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

PRESENTA:
ING. ITZEL GONZALEZ DEL ROSARIO

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JUAN MANUEL MÉNDEZ CONTRERAS

CODIRECTOR DE TESIS:
M.C PEDRO VALLEJOS MAMANI



Orizaba, Veracruz, México

Noviembre, 2023



Orizaba, Veracruz, 09/noviembre/2023

Dependencia: División de Estudios de
Posgrado e Investigación

Asunto: Autorización de Impresión
OPCION: I

C. ITZEL GONZÁLEZ DEL ROSARIO

Candidato(a) a Grado de Maestro(a) 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:

"Producción de ácido láctico, vía fermentación microbiana con (*Lactobacillus acidophilus*), como estrategia de uso eficiente de la energía, producida a partir de residuos de la agroindustria piloncillera"

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®

Cuahtémoc Sánchez

Dr. CUAUHTÉMOC SÁNCHEZ RAMÍREZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



OG-13-F06



Orizaba, Veracruz, 30/octubre/2023
Asunto: Revisión de trabajo escrito

C. CUAUHTÉMOC SÁNCHEZ RAMÍREZ
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
P R E S E N T E.-

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

ITZEL GONZÁLEZ DEL ROSARIO

La cual lleva el título de:

“Producción de ácido láctico, vía fermentación microbiana con (*Lactobacillus acidophilus*),
como estrategia de uso eficiente de la energía, producida a partir de residuos de la
agroindustria piloncillera”

Y concluyen que se acepta.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®
CIENCIA – TÉCNICA - CULTURA®

PRESIDENTE: DR. JUAN MANUEL MÉNDEZ CONTRERAS

SECRETARIO: DR. ALEJANDRO ALVARADO LASSMAN

VOCAL: MIQ. NORMA ALEJANDRA VALLEJO CANTÚ

VOCAL SUP.: MC. PEDRO VALLEJOS MAMANI

FIRMA
FIRMA
FIRMA
FIRMA

TA-09-18

Declaración de originalidad y cesión de derechos

Orizaba, Veracruz, el día 15 del mes de Noviembre del año 2023.

El(la) que suscribe

C.ITZEL GONZALEZ DEL ROSARIO

Declaro que esta tesis, que tiene una extensión de 75 cuartillas, ha sido escrita por mí y constituye el registro escrito del trabajo de la tesis titulada

"(PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO, VÍA FERMENTACIÓN MICROBIANA CON (LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS), COMO ESTRATEGIA DE USO EFICIENTE DE LA ENERGÍA, PRODUCIDA A PARTIR DE RESIDUOS DE LA AGROINDUSTRIA PILONCILLERA)"

del programa: Maestría En Ciencias En Ingeniería Química bajo la asesoría y dirección del (la) Dr. Juan Manuel Méndez Contreras y M.C. Pedro Damián Vallejos Mamani no ha sido sometida en ninguna otra institución previamente.

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

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

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

Itzel Gonzalez Del Rosario
Nombre y firma

DEDICATORIA

Se fuerte y valiente. No temas ni te asustes por ellos, porque el Señor tu Dios va contigo; Él nunca te dejará ni te abandonará. (Deuteronomio 31:6), gracias padre por darme sabiduría, entendimiento y no permitirme caer, tú siempre fuiste fiel a mis plegarias y me permitiste lograr este triunfo que principalmente es tuyo.

A mi hijo Santiago, por acompañarme en esta aventura y ser parte fundamental en mi vida y mis proyectos, el amor que siento por ti me ayudo a no dejarme vencer a pesar de todos los obstáculos que se presentaron a lo largo de esta travesía.

A mis padres por ayudarme con sus porras y darme siempre una palabra de aliento cuando lo necesitaba, cobijarme con su amor y su cariño para conmigo, los amo infinitamente, son los mejores padres que dios y la vida pudo darme, sin ustedes no hubiese logrado este triunfo.

A mi hermana por tener una palabra de aliento y hacerme sonreír aun cuando hubo días que pintaron gris, gracias por escucharme, ayudarme, comprenderme y ser la mejor hermana que dios me permitió tener.

A mi sobrina que este sea un motivo para que tu seas mejor y te esfuerces, siempre podrás contar conmigo.

Pepe (Jose) que más puedo decir que no te haya dicho antes, gracias por tu paciencia, por motivarme a ser una mejor persona tanto profesional como personalmente por que eres el mejor maestro que yo he tenido y siempre sabes cómo ayudarme, gracias por todo.

A mis compañeros de Laboratorio Ambiental II (Chema, Joaquín, Itzel, Mandí, Diana, Roger, chicas de residencias (sara y fer)), gracias por ayudarme en todo momento sin ustedes la estancia no hubiese sido tan divertida, me llevo lo mejor que cada uno apporto a mi formación académica, y todos los momentos que pasamos juntos compartiendo instantes.

RECONOCIMIENTOS

Al Doctor Juan Manuel Méndez Contreras por permitirme pertenecer a su equipo de trabajo y confiar en mí, por ser tan persistente en este proyecto y aportar de sus conocimientos para que este proyecto se pudiera realizar de la mejor manera.

Al Dr. Alejandro Alvarado Lassman y la M.I.Q. Norma Alejandra Vallejo Cantú, por sus aportaciones a este trabajo, sus consejos, y observaciones que permitieron que este proyecto se lograra.

A los maestros que ayudaron en la formación académica en este trayecto, cada uno aportó conocimiento para formarme como profesional.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por otórgame la beca No. 801811, para realizar este proyecto.

RESUMEN

“Producción de ácido láctico, vía fermentación microbiana con (*Lactobacillus acidophilus*), como estrategia de uso eficiente de la energía, producida a partir de residuos de la agroindustria piloncillera”

Elaborado por: I.Q. Itzel Gonzalez Del Rosario

Dirigido por: Dr. Juan Manuel Méndez Contreras

Co-asesor: M.C. Pedro Vallejos Mamani

El uso de la caña de azúcar como materia prima para la producción de piloncillo, representa una de las principales actividades económicas en la región centro del estado de Veracruz, pero una problemática que enfrenta este sector es el deficiente manejo de los residuos generados en sus procesos, siendo la cachaza piloncillera (CP) y el agua de lavado de moldes (ALM) los que generan una mayor contaminación.

La caracterización de los residuos se determinó, mediante los siguientes análisis; ácido láctico conforme a la norma NMX-F-716-COFOCALEC-2014, la densidad celular por medio del método de placa vertida y el consumo de sustrato por medio del método de Kjendal, la (CP) tiene un contenido en carbohidratos de 172.42 g/L y el ALM 12.48 g/L, los valores obtenidos indican que los residuos son viables para llevar a cabo la fermentación anaerobia.

En el presente trabajo se realizó la fermentación láctica como alternativa para la valorización de los residuos generados en la producción de piloncillo, mediante el uso de la bacteria *Lactobacillus acidophilus*, encontrando que la mayor producción de ácido láctico (AL) fue de 12.37 g AL/L, durante la fermentación de la solución de 150 g CP/L.

Los parámetros cinéticos de crecimiento microbiano se determinaron mediante modelo de Gompertz, demostrando un buen ajuste con la información obtenida de manera experimental, con una $R^2 = 0.9074$ y alcanzando un valor de $\mu_{\max} = 1.242 \text{ h}^{-1}$, $\lambda = 20.46 \text{ h}$ y $A = 7.584 \text{ Log UFC/mL}$, lo que comprueba la viabilidad del proceso.

Estos resultados demuestran que la fermentación láctica es una opción viable para implementarse como una nueva estrategia para el aprovechamiento de los residuos generados en la producción de piloncillo, y reducir su impacto al medio ambiente.

ABSTRACT

“Production of lactic acid via microbial fermentation with *Lactobacillus acidophilus* as a strategy for the efficient use of energy produced from waste from the piloncillara agroindustry”

Prepared by: I.Q. Itzel Gonzalez Del Rosario

Directed by Dr. Juan Manuel Méndez Contreras

Coadvisor: M.C. Pedro Vallejos Mamani

The use of sugarcane as a raw material for the production of piloncillos represents one of the main economic activities in the central region of the state of Veracruz, but a problem that this sector faces is the poor management of the waste generated in its processes, with piloncillo cachaça (PC) and mold washing water (ALM) being those that generate the greatest pollution.

The characterization of the waste was determined through the following analyses: lactic acid according to standard NMX-F-716-COFOCALEC-2014, cell density by means of the poured plate method and substrate consumption by means of the Kjendal method. The PC has a carbohydrate content of 172.42 g/L, and the ALM has a carbohydrate content of 12.48 g/L. The values obtained indicate that the waste is viable for anaerobic fermentation.

In the present work, lactic fermentation was carried out as an alternative for the valorization of the waste generated in the production of piloncillo through the use of the bacteria *Lactobacillus acidophilus*, and the highest production of lactic acid (LA) was 12.37 g LA/L during the fermentation of the 150 g CP/L solution.

The kinetic parameters of microbial growth were determined using the Gompertz model, demonstrating a good fit with the information obtained experimentally, with an $R^2 = 0.9074$ and reaching a value of $\mu_{max} = 1.242 \text{ h}^{-1}$, $\lambda = 20.46 \text{ h}$ and $A = 7.584 \text{ Log CFU/mL}$, which proves the viability of the process.

These results demonstrate that lactic fermentation is a viable option to be implemented as a new strategy for the use of waste generated in piloncillo production and to reduce its impact on the environment.

INDICE

LISTA DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE TABLAS	VI
NOMENCLATURA.....	VII
INTRODUCCION	1
OBJETIVO GENERAL.....	2
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	2
CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEORICOS.....	4
1.1 Agroindustria piloncillera.....	4
1.2 Residuos Agroindustriales.....	4
1.2.1 Aplicación de residuos agroindustriales como energéticos.....	5
1.2.2 Contenido energético de los residuos agroindustriales.....	8
1.4 Producción de piloncillo.....	9
1.5 Aprovechamiento de cachaza	11
1.5.1 Caracterización y propiedades de la cachaza	11
1.6 Biodegradabilidad Anaerobia	12
1.7 Ácido láctico	13
1.8 Fermentación láctica	15
1.8.1 Bacterias ácido lácticas	16
1.8.2 <i>Lactobacillus Acidophilus</i>	17
1.8.3 Características genéticas y fisiológicas de bacterias lácticas	18
1.9.1 Pretratamientos aplicados para bioconversión de biomasa lignocelulósicas.....	21
1.10 Crecimiento Bacteriano	25
1.10.1 Comportamiento del crecimiento en la fermentación microbiana	26
1.10.2 La temperatura y pH en el crecimiento microbiano.....	27

1.11 Modelos Matemáticos para la Descripción del Crecimiento de Microorganismo.....	27
1.11.1 Modelo de Gompertz modificado	27
1.11.2 Modelo de Luedeking – Piret	28
1.12 Biorreactores	29
1.12.1 Características del biorreactor	29
1.12.2 Biorreactores batch.....	30
1.12.3 Biorreactor semicontinuo	31
1.13 ESTUDIOS PREVIOS	32
CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS	36
2.1 Metodología experimental	36
2.2 Obtención de Cachaza.....	37
2.3 Caracterización del Residuo Agroindustrial.....	38
2.3.1 Determinación de Potencial de Hidrógeno (pH).....	38
2.3.2 Determinación de Sólidos Totales (ST)	39
2.3.3 Determinación de Sólidos Totales Volátiles (STV)	39
2.3.4 Determinación de carbohidratos por el método de Antrona- Sulfúrico.....	40
2.3.5 Determinación de proteínas Nitrógeno Kjeldahl.....	40
2.4 Obtención y reproducción de <i>Lactobacillus Acidophilus</i>	41
2.4.1 Obtención de <i>Lactobacillus Acidophilus</i>	41
2.4.2 Reproducción del medio de cultivo	41
2.5 Evaluación de cinéticas para Ácido Láctico.....	42
2.5.1 Fermentación Láctica.....	42
2.5.2 Rendimiento de Ácido láctico.....	42
2.5.3 Determinación de las condiciones de operación para aumento de la producción de ácido láctico.....	43
2.6 Diseño Experimental	43
2.7 Cuantificación de Biomasa	43
2.8 Modelo matemático para la evaluación del proceso de fermentación láctica ..	44
CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
3.1 Caracterización de cachaza piloncillera	46

3.2 Propagación de inóculo <i>Lactobacillus acidophilus</i>	48
3.3 Cinéticas de fermentación láctica.....	49
3.3.1 Monitoreo de pH	50
3.3.2 Remoción de carbohidratos	51
3.3.3 Crecimiento microbiano	51
3.3.4 Producción de Ácido Láctico.....	52
3.4 Cuantificación de biomasa	54
3.5 Evaluación de condiciones operativas para la optimización del proceso de fermentación.....	55
3.6 Modelado matemático para la evaluación del proceso de fermentación láctica	55
3.6.1 Replicación del proceso en un reactor tipo Bach	55
CONCLUSIONES	60
RECOMENDACIONES	61
ANEXO A.....	63
ANEXO B.....	64
ANEXO C.....	65
ANEXO D.....	66
ANEXO E	66
ANEXO F	67
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1.1	Municipios productores de piloncillo	4
1.2	Ejemplos de residuos Agroindustriales	5
1.3	Ejemplos de Biomasa	8
1.4	Proceso productivo de panela	10
1.5	Agro-procesamiento del piloncillo	10
1.6	Cachaza piloncillera	12
1.7	Biodegradación Anaerobia	13
1.8	Ácido Láctico	14
1.9	Síntesis química en los isómeros D y L para la producción de Ácido Láctico	14
1.10	Proceso de obtención de ácido láctico	15
1.11	Bacterias Ácido Lácticas	16
1.12	Rutas metabólicas con BAL	17
1.13	<i>Lactobacillus Acidophilus</i>	18
1.14	Ruta de fermentación Homofermentativa y heterofermentativa	19
1.15	Proceso de Biocatálisis Molina	21
1.16	Estructura lignocelulósica	22
1.17	Pretratamiento Químico	24
1.18	Fases de la curva de crecimiento microbiano	27
1.19	Biorreactor	30
1.20	Diseño de un Biorreactor Batch	31
1.21	Biorreactor semicontinuo	32

2.1	Metodología de la investigación	36
2.2	Muestra de Cachaza piloncillera	37
2.3	Estufa Marca Felisa	39
2.4	<i>Lactobacillus Acidophilus</i>	41
2.5	Conteo celular por método de placa vertida	42
2.6	Incubadora con reactores para cuantificación de biomasa	43
3.1	Propagación de <i>Lactobacillus Acidophilus</i>	48
3.2	Colonias generadas por <i>Lactobacillus Acidophilus</i>	48
3.3	<i>Lactobacillus Acidophilus</i> por tinción de Gram	49
3.4	Reactores al 5,10 y 15 %	49
3.5	Comportamiento de pH a través del proceso de fermentación láctica para concentraciones de 5, 10 y 15 %.	50
3.6	Remoción de carbohidratos al 5,10 y 15 % de sustrato.	51
3.7	Comportamiento celular a través del proceso de fermentación láctica para concentración de 5, 10 y 15 % de sustrato.	52
3.8	Producción de Ácido láctico para concentración de 5,10 y 15 %.	53
3.9	Biomasa generada apartir de <i>Lactobacillus Acidophilus</i>	55
3.10	Reactor tipo batch para fermentacion ácido láctica	56

LISTA DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1.1	Procesos alternos para el aprovechamiento de residuos agroindustriales	6-7
1.2	Caracterización y propiedades de la cachaza.	12
1.3	Bacterias Acido Lácticas Homofermentativas y Heterofermentativas.	20
1.4	Variación de rendimiento de metano producida por el tipo de pretratamiento.	24
2.1	Parámetros para la caracterización de la cachaza piloncillera.	38
3.1	Caracterización de Cachaza Piloncillera al 5, 10 y 15 %	46
3.2	Comparativa de carbohidratos y proteínas con respecto a otros residuos	47
3.3	Caracterización de Agua de lavado de moldes como diluyente	47
3.4	Generación de biomasa inicial y final de las cinéticas de fermentación con <i>lactobacillus acidophilus</i>	54
3.5	Resultados del modelo de Gompertz	56-57
3.6	Parámetros obtenidos para la ecuación de Gompertz	57
3.7	Evaluación del Modelo de Gompertz	57

NOMENCLATURA

Nomenclatura	Significado	Unidades
AL	Ácido láctico	[-]
BAL	Bacterias ácido lácticas	[-]
°C	Grados Centígrados	[°C]
ED	Ruta de Entner-Duodoroff	[-]
EMP	Ruta Embden-Meyerhoff-Parnas	[-]
MRS	Man, Rogosa y Sharpe	[-]
pH	Potencial hidrógeno	[-]
PF	Ruta de las Pentosas Fosfato	[-]
PSI	Libras por pulgada cuadrada	[-]
ST	Sólidos Totales	% m/m
SV	Sólidos Volátiles	% m/m
UFC	Unidad Formadora de Colonias	[-]
CP	Cachaza piloncillera	[-]
ALM	Agua de lavado de moldes	[-]

INTRODUCCION

La agroindustria piloncillera es de tipo rural, y en México se caracteriza por una producción poco organizada, nula tecnificación, y de poca sustentabilidad. Uno de los principales problemas que presenta esta agroindustria es la generación de residuos (cachaza, bagazo, ceniza, aguas residuales, etc.), para los cuales se tiene un manejo inadecuado (Martínez *et al.*, 2019; Cabrera y Aguilar, 2019).

Las bacterias ácido lácticas (LAB) son de los microorganismos más utilizados en la producción de alimentos fermentados, como lácteos, frutas y verduras, haciendo que los alimentos sean duraderos, mejoran la seguridad alimentaria, el sabor y la textura, así como mejorar el valor fisiológico e higiénico de los alimentos debido a la presencia de células viables y valiosas. Además, los productos obtenidos por los procesos de fermentación son de especial importancia para alimentos funcionales como los probióticos (Zapašnik *et al.*, 2022; Abedi y Hashemi, 2020).

La cepa *Lactobacillus* es las LAB más utilizadas en el proceso de fermentación, dentro de las cuales se encuentra el microorganismo *Lactobacillus acidophilus*, y éste se encuentra de manera natural en los tractos gastrointestinales de humanos y animales. En los alimentos fermentados, la actividad metabólica de este microorganismo resulta en la producción de sabor y aroma que causan propiedades organolépticas de los alimentos fermentados e inhiben el deterioro de los alimentos (Parvaneh y Tajabadi., 2011)

En el presente trabajo se analizará, la capacidad fermentativa de *Lactobacillus acidophilus* utilizando como sustrato los residuos generados en la agroindustria piloncillera, para la producción de ácido láctico, estableciendo una estrategia de preservación, adaptación científica y tecnológica para el cuidado del medio ambiente (Rojas *et al.*, 2019).

OBJETIVO GENERAL

Determinar las condiciones óptimas de operación para el proceso de obtención de ácido láctico a partir de la cachaza de la industria piloncillera, mediante la acción fermentativa del *Lactobacillus acidophilus*

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Realizar la caracterización fisicoquímica de la cachaza piloncillera.
- Definir la concentración adecuada de sustrato que incremente la producción de ácido láctico.
- Modelar la cinética del proceso de fermentación láctica utilizando la cepa *Lactobacillus acidophilus*.
- Determinar las condiciones de operación de fermentación que permitan incrementar la producción de ácido láctico.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

CAPÍTULO 1 FUNDAMENTOS TEORICOS

1.1 Agroindustria piloncillera

Es una actividad realizada desde la antigüedad, en las zonas del estado de Veracruz, pues tiene una importancia cultural muy importante y apoya además la economía de las localidades que conforman el estado, teniendo una mayor presencia en Zentla, Huatusco, Tlacotepec, Sochiapa, Tlaltetela y Tepatlaxco; municipios que presenta la mayor productividad son Huatusco y Zentla, localizados en la zona centro del estado Ver Figura 1.1. En Veracruz se encuentran aproximadamente 650 trapiches y 450 se localizan en el centro del estado (Martínez *et al.*, 2019).

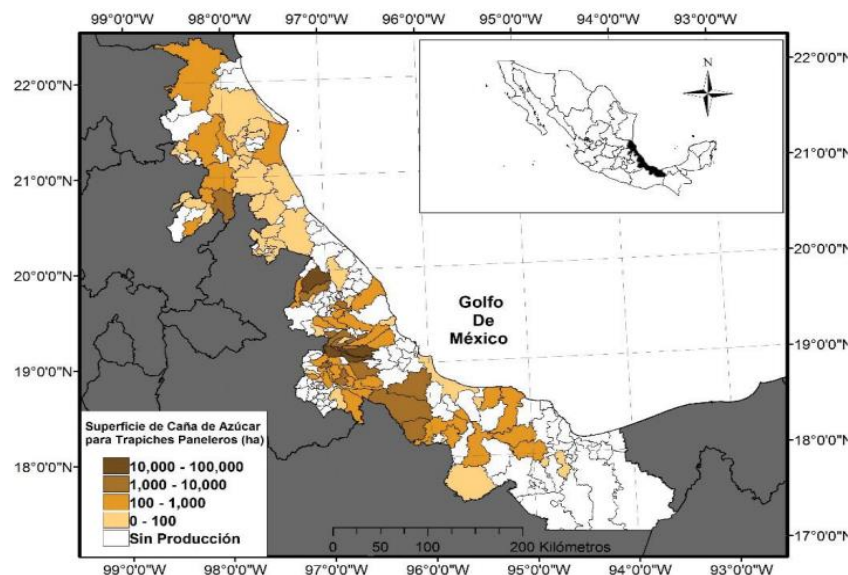


Figura 1.1 Municipios productores de piloncillo (Martínez *et al.*, 2019).

1.2 Residuos Agroindustriales

En los procesos agroindustriales, además de los productos, se obtienen una serie de productos no deseados que son materiales en estado sólido o líquido considerados residuos del proceso, aunque también pueden ser generados tras el uso del producto

desarrollado. Estos residuos son aptos para ser aprovechados debido al alto valor energético que presentan y a la capacidad para transformarse en otros productos, con un valor económico más elevado (Castro, 2022).

Los residuos agroindustriales también se conocen como biomasa, ya que estos provienen de animales, procesamiento de frutas, verduras, cultivo de plantas y procesos donde se ven incluidos materiales orgánicos. Diversas literaturas indican que de estos residuos se derivan productos como pectina, xilitol, papel, biomateriales, productores de energía, biofertilizantes, biofermentos, entre otros, Rojas *et al.*, (2019).

1.2.1 Aplicación de residuos agroindustriales como energéticos

Se define como la forma de obtener energía a partir de biomasa, proveniente de seres vivos, el proceso de generación es desarrollado a partir de residuos, ya sea agropecuarios, agrícolas o residuos municipales, en la Figura 1.2 se pueden apreciar algunos de los residuos que son utilizados y sometidos a procesos, los cuales son gasificados y como producto generan calor y electricidad (Velasco *et al.*, 2017).



Figura 1.2 Ejemplos de residuos Agroindustriales (Velasco *et al.*, 2017).

Es preciso señalar que las características de los residuos tienen un potencial disponible para diversos usos, algunos de ellos se pueden observar en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1 Procesos alternos para el aprovechamiento de residuos agroindustriales (Aguilar *et al.*, 2022).

Procedencia	Uso / alternativa	Descripción
Estiércol de producciones pecuarias	Biogás	Generalmente, el gas metano obtenido por biodigestión anaerobia y utilizado en sistemas de cogeneración de energía, producción de vapor y agua caliente.
Residuos de la industria de aceites, grasas, azucarera	Biodiesel	Un biocombustible producido generalmente por transesterificación, se obtiene 85% de biodiésel usado como combustible ecológico.
Hojas, fibras y pencas del agave	Resinas termoplásticas	Material obtenido por el procesamiento de los compuestos lignocelulósicos del agave para diversos usos industriales.
Bagazo de caña, residuos de cebada y yuca	Enzimas industriales	Enzimas obtenidas a partir de la inoculación del hongo <i>Penicillium janczewskii</i> en el sustrato orgánico.
Residuos de la industria azucarera y de cereales	Bioetanol	Biocombustible obtenido por fermentación de azúcares residuales de la caña de azúcar y cebada junto a compuestos celulósicos.
Cascarilla de arroz y ceniza	Bloques de concreto no estructural	Bloques ecológicos elaborados a partir de cascarilla de arroz y ceniza más componentes químicos, como alternativa de material para construcción.

Continuación de la Tabla 1.1		
Bagazo de maguey y caña de azúcar	Compostaje	Proceso de degradación de materia orgánica (lignocelulósicas, celulósicos) a través de la acción microbiana (<i>Aspergillus niger</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Trichoderma h</i> , <i>Trametes v.</i>) en condiciones anaerobias para obtener un producto estable rico en nutrientes y apto para uso en suelo agrícola como fertilizante o sustrato para cultivos hidropónico.
Residuos de producción bananera, bagazo de caña y desechos del frejol	Hongos comestibles	Mediante la fermentación en estado sólido de estos subproductos agroindustriales ricos en celulosa, CHON y otros nutrientes, se puede inocular una variedad amplia de cepas fúngicas comestibles, entre las cuales se destaca el <i>Pleurotus ostreatus</i> . Por sus propiedades nutricionales excepcionales (61 % de sacáridos, 26 % proteína, 12% fibra, vitaminas y minerales), se postula como una gran alternativa para producir alimentos funcionales para el consumo humano.
Saccharina y Leucaena	Comida para animales	A través de la FES se diseñan nuevas alternativas para la alimentación animal como suplemento alimenticio elaborado a partir de <i>Leucaena</i> y <i>Saccharina</i> gracias a su alta digestibilidad para bovinos a fin de ayudar a su crecimiento.

Actualmente, se generan 140 millones de toneladas anuales de biomasa en el sector agrícola en el mundo, con una transformación de la materia prima a energía podemos disminuir en la misma cantidad, el uso de combustibles fósiles, así como la eliminación de la emisión de gases de efecto invernadero provocados por los mismos, (Brahmachari *et al.*, 2016).

1.2.2 Contenido energético de los residuos agroindustriales

Los residuos agroindustriales presentan una biomasa con alto contenido energético, se ha demostrado que el poder calorífico que provenía del bagazo de caña y las puntas del tallo fueron de 57277234, 6 TJ de energía, utilizando 6 698332,1 TJ para las calderas que se encuentran en el país, estos datos fueron proporcionados por (Debernardi *et al.*, 2016), como también (Muñoz *et al.*, 2013), mezcló tres tipos de biomasa agroindustrial obteniendo un contenido energético de 15 623,35 kJ/kg, en la Figura 1.3 se muestran los distintos lugares, donde se puede obtener biomasa, siendo las ganaderas y agropecuarias el número uno en mayor producción.

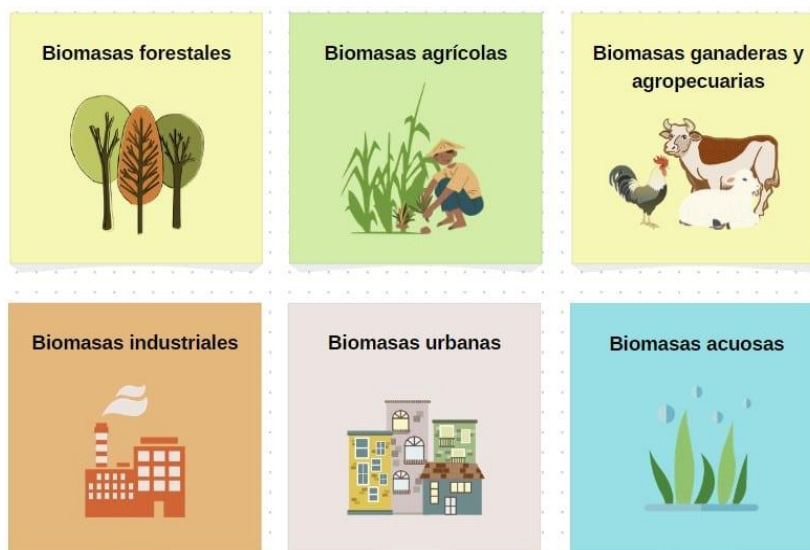


Figura 1.3 Ejemplos de Biomasa (Debernardi *et al.*, 2016)

También se clasificaron las biomásas por su valor potencial, el cual se basó por los principales componentes presentes en la bioconversión como lo son: su poder calorífico, contenido de azúcar, contenido de nitrógeno y contenido de celulosa.

La biomasa tiene un alto poder calorífico para la producción de energía y biocombustibles, usualmente las biomásas con un contenido elevado de nitrógeno son usadas para la elaboración de fertilizantes y enzimas, mientras que las biomásas con

altos contenidos de azúcares son empleadas en la fabricación de moléculas químicas, finalmente las biomásas con alto contenido de glucosa son manejadas para la elaboración de alimentos para consumo animal, y bioetanol, (Vuan, 2018)

1. 3 Impacto ambiental de los residuos agroindustriales

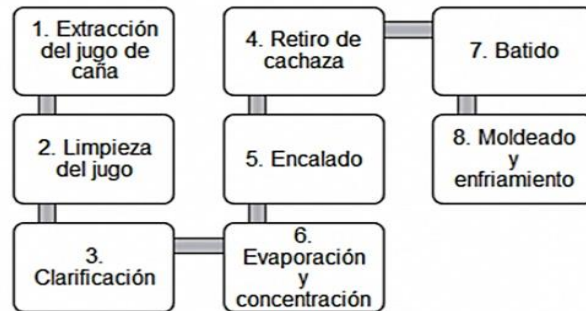
Actualmente, el crecimiento en la población ha generado la demanda de productos de consumo humano, como son la del azúcar, el refresco por mencionar algunos, esto ha ocasionado que la industria incremente la producción, y a su vez provoque problemas ambientales debido al mal manejo de los residuos. El manejo apropiado de los residuos agroindustriales, genera un beneficio en la conservación y preservación del medio ambiente y, por ende, de los recursos renovables y no renovables que lo componen. A estos residuos se les tiene como objetivo principal el uso en biotransformación energética, compostaje, generación de biomasa, e incluso de interés comercial. Los gases de efecto invernadero son uno de los principales contaminantes generados por las industrias, compuestos a su vez, por metano (CH_4), bióxido de carbono (CO_2) y óxido nitroso (N_2O), hidrofluorocarbonos (HFC), perfluorocarbonos (PFC) y hexafluoruro de azufre (SF_6), (Castro, 2022).

1.4 Producción de piloncillo

El proceso de obtención de piloncillo está conformado de 9 etapas, Ver Figura 1.4. (Martínez *et al.*, 2019).

1. Extracción de jugo de caña.
2. Limpieza de jugo de caña.
3. Clarificación.
4. Retiro de cachaza.
5. Encalado.
6. Evaporación concentración
7. Batido.
8. Moldeado.

9. Enfriamiento.

Figura 1.4 Proceso productivo de panela, (Martínez *et al.*, 2019).

Como se puede ver en la Figura 1.5 muestra las condiciones en las que se lleva a cabo la producción de piloncillo, estas representan un impacto negativo al medio ambiente, ya que la infraestructura con la que cuentan no es la adecuada para realizar dicha práctica, incluyendo también las vestimentas y la disposición final de los residuos, incumpliendo así con la normativa de producción y comercialización de panela de acuerdo a la NMX-F-596-SCFI-2016 y NOM-251-SSA1-2009 (Ramírez, 2016).



Figura 1.5 Agro-procesamiento del piloncillo (Ramírez, 2016).

1.5 Aprovechamiento de cachaza

La industria piloncillera genera una gran cantidad de subproductos, que pueden ser aprovechados, debió a que representan un valor comercial demasiado alto, cerca del 24 % del peso en materia seca y 76 % de desechos como hojas, paja, bagazo, melaza y cachaza como se puede ver en la Figura 1.6, esta principalmente nos puede otorgar un beneficio económico interesante, si lo ajustamos a un proceso optimo que lo requiera como materia prima (Madrigal, 2019).



Figura 1.6 Cachaza Piloncillera.

La cachaza también es usada como remediador de suelos contaminados de acuerdo a lo descrito por (García *et al.*, 2011), al igual para tratamiento de aguas residuales como lo indica (Durán, 2022), y la elaboración de abono orgánico con fuentes de estiércol analizada por (Corredor y Pérez, 2018).

1.5.1 Caracterización y propiedades de la cachaza

La cachaza proviene del tratamiento del jugo de caña de azúcar y se caracteriza de un color marrón oscuro conformado de fibras de caña, coloides coagulados, fosfato de calcio y sacarosa Ver Tabla 1.2 (Mendieta *et al.*, 2020a).

Tabla 1.2 Caracterización y propiedades de la cachaza (Mendieta *et al.*, 2020a).

Parámetro	Valor	Unidades
Sólidos Totales (ST)	227.97±0.29	$g\ ST\ kg^{-1}$
Sólidos Volátiles (SV)	93.94±0.09	$g\ SV\ kg^{-1}$
Humedad	77.20±0.03	%
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	402.30±0.41	$g\ DQO\ L^{-1}$
Ácidos Grasos Totales (AGV)	1760±69.3	$mg\ CH_3\ COOH\ L^{-1}$
Alcalinidad Total	1566.67±208.2	$mg\ CaCO_3\ L^{-1}$
pH	6.14±0.01	---
Capacidad buffer	1.10±0.12	$mg\ CH_3\ COOH\ mg^{-1}\ CaCO_3$
Proteínas totales (PT)	11.40±0.05	$g\ kg^{-1}$
Grasas totales (GT)	7.20±0.02	$g\ kg^{-1}$
Carbohidratos (C)		
Sacarosa	111.0±0.08	$g\ kg^{-1}$
Azúcares Reductores	53.2±0.03	$g\ kg^{-1}$
Celulosa	0.1±0.02	$g\ kg^{-1}$
Hemicelulosa	13.7±0.02	$g\ kg^{-1}$
Lignina	7.0±0.01	$g\ kg^{-1}$
Cenizas	11.7±0.03	$g\ kg^{-1}$
Carbono	67.4±0.04	$g\ kg^{-1}$
Nitrógeno	1.8±0.02	$g\ kg^{-1}$
Azufre	0.1±0.02	$g\ kg^{-1}$
Fósforo	0.5±0.03	$g\ kg^{-1}$
C/N	37/1	---

1.6 Biodegradabilidad Anaerobia

Es la acción de los microorganismos que en la ausencia de oxígeno degradan la materia orgánica en componentes más simples generalmente dióxido de carbono y metano, Ver Figura 1.7 (Giler y Molina, 2022).



Figura 1.7 Biodegradación Anaerobia (Giler y Molina, 2022).

También se denomina biometanización, ya que en este proceso el 90 % de la energía por oxidación se convierte en metano y el 10 % restante es transformada para el crecimiento bacteriano, este tratamiento es totalmente viable para la conversión de residuos en generadores de energía y bajo impacto medioambiental (Madrigal, 2019).

1.7 Ácido láctico

Es un ácido carboxílico empleado generalmente en procesos alimenticios como medio conservante y saborizante, aunque también tiene aplicaciones en la producción de lactato, acetaldehído, ácido propanoico y acrílico, su estructura se puede Ver en la Figura 1.8.

El ácido láctico ha incrementado su demanda, pues es utilizado en la producción de ácido poli láctico un compuesto biodegradable empleado en la producción de plástico. El ácido láctico es producido mediante la fermentación, y aunque también se puede obtener mediante la síntesis, se ha optado por la primera opción, ya que mitiga la producción de agente contaminante al medio ambiente, más del 90 % del ácido láctico,

se obtiene mediante la fermentación de azúcares en presencia de microorganismos anaerobios, (Quintero *et al.*, 2012).

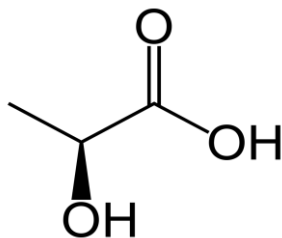
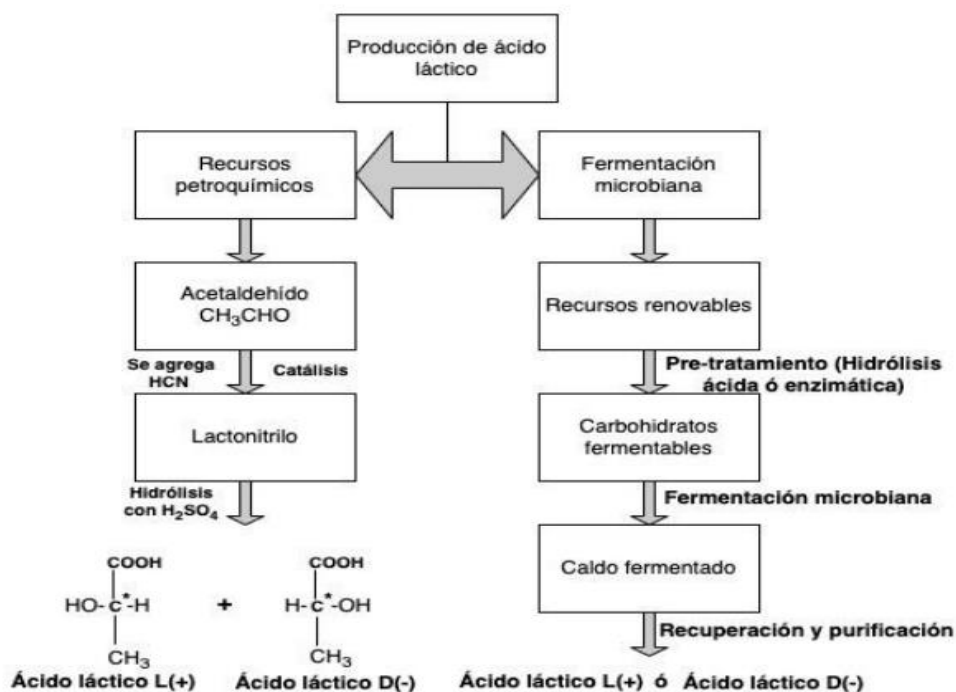


Figura 1.8 Ácido láctico, (Quintero *et al.*, 2012).

La síntesis química en los isómeros D y L ocasionan costos adicionales de producción a nivel industrial por el proceso de separación que estos presentan, por lo cual el uso de microorganismo para la transformación D o L es más económica por medio de la acción fermentativa (Castillo, 2022).



1.9 Síntesis química en los isómeros D y L para la producción de Ácido Láctico (Castillo, 2022).

1.8 Fermentación láctica

Tiene como objetivo principal la obtención de ácido láctico a partir de azúcares. El piruvato producido en la glucólisis se transforma en ácido láctico mediante la enzima lactato-Deshidrogenasa, este proporciona las características de acidez y sabor en los productos lácteos, por otro lado, mejorar la estabilidad microbiana en otros alimentos como la carne, vegetales y cereales, ya que mitiga el crecimiento de otras bacterias que las descomponen (Mathur *et al.*, 2020).

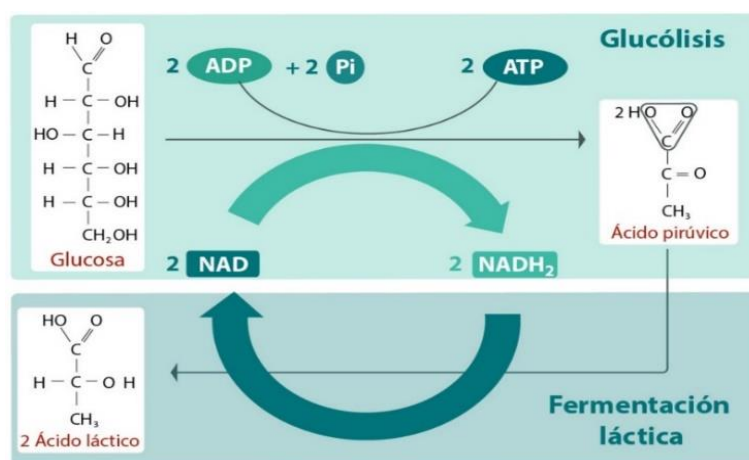


Figura 1.10 Proceso de obtención de ácido láctico (Mathur *et al.*, 2020).

El modo de acción involucra los siguientes factores, como lo son: el deterioro del mantenimiento potencial de la membrana celular (que es la inhibición del transporte activo, disminución de pH, funciones intracelulares e incluye diversas funciones metabólicas), que conlleva a la competencia por los nutrientes, la creación de un ambiente hostil y conflictivo por adhesión.

Por otro lado, la fermentación se considera un método tradicional caracterizado por la sostenibilidad, la naturalidad y la conservación no térmica, también parte del metabolismo que conlleva el proceso es la generación de metabolitos secundarios en donde se liberan compuestos almacenados en la estructura interna, lo que presenta

un fácil aumento de actividad antioxidante para romper la pared celular, (Benavides, 2019).

1.8.1 Bacterias ácido lácticas

Las BAL se encontraron por primera vez en productos derivados de la leche, y tiene un gran efecto en flora intestinal, agricultores que consumieron de manera constante yogurt vivieron una cantidad notable de años más, que las personas que no consumían el producto, esto gracias a las bacterias que contiene, las cuales ayudan a disminuir las molestias intestinales facilitando el tránsito de desechos.

Las bacterias ácido lácticas son gran positivas, no esporulados, de forma bacilar o esférica, su longitud varía con la especie y presenta un grosor entre los 0.5 a 0.8 μm Ver Figura 1.11, tiene la capacidad de desarrollarse en diversos sustratos bajo condiciones biológicas, a partir de la glucosa producen en mayor parte ácido láctico, tienen resistencia a pH entre 3.2- 9.6 y presenta un mayor crecimiento con un pH entre 4 – 4.5 lo que permite su creciente en entornos no favorables para otro tipo de microorganismos (Jamez *et al.*, 2017).



1.11 Bacterias Ácido Lácticas, (Jamez *et al.*, 2017).

Además, las BAL producen varios factores antibacterianos, como ácidos orgánicos, bacteriocinas, acetaldehídos y diacetilo, algunas bacterias también se usan para secretar expolisacaridos que afectan en la textura del alimento cuando son deseables, los polisacáridos extracelulares microbianos (EPS) sintetizados por las LAB juegan un papel importante en la producción de productos lácteos fermentados, ya que estos polímeros aumentan la viscosidad de la leche, reducen la susceptibilidad a la sinéresis y contribuyen a la estabilidad del producto final, Ver Figura 1.12.

Las BAL se identifica por medios de cultivos selectivos como lo son el Agar M17, el agar rogosa acidificado, o el agar MRS usado con mayor frecuencia para el aislamiento de cocos y bacilos (Thamires *et al.*, 2021).

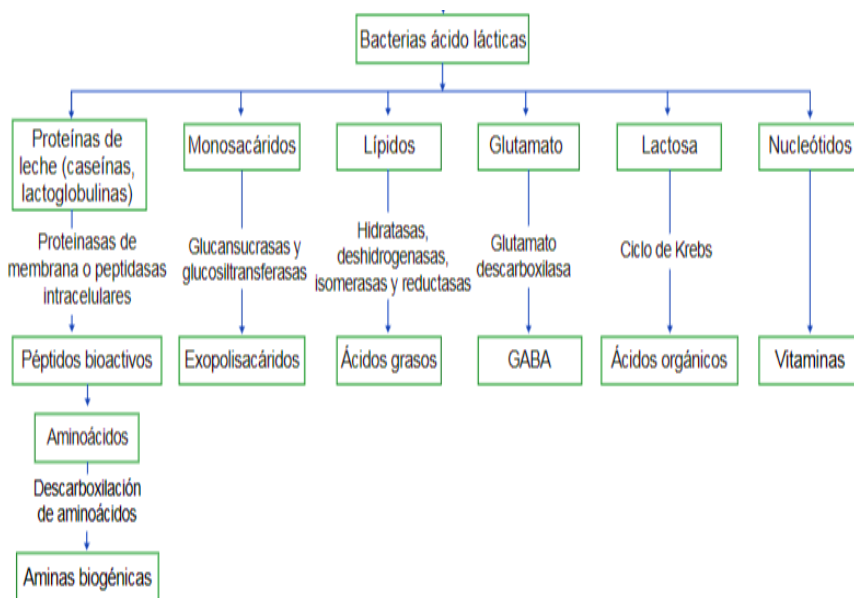


Figura 1.12 Rutas metabólicas con BAL (López *et al.*, 2023).

1.8.2 *Lactobacillus Acidophilus*

Es una bacteria grampositiva, y puede desarrollarse en un ambiente entre los 43-48°C Ver Figura 1.13, aunque la temperatura óptima para su desarrollo son 37°C, tiene la capacidad de catabolizar carbohidratos difíciles de asimilar y también es una especie Homofermentativa (Jamez *et al.*, 2017).



Figura 1.13 *Lactobacillus Acidophilus* (Jamez et al., 2017).

El *Lactobacillus acidophilus* es el más abundante en las secreciones vaginales y forma parte de la microbiota intestinal y vaginal normal, su función en el microbioma intestinal humano es ayudar a reducir las bacterias y hongos dañinos mediante la producción de lactasa, la cual es una enzima clave en la digestión de la leche, este bacilo a través de la mucosa vaginal reduce el pH local de 4 a 4.5 creando de ese modo un ambiente donde otras bacterias no puedan desarrollarse, estas acciones están descritas por dos mecanismos de acción, la primera por adhesión, en donde el epitelio forma una barrera para prevenir la colonización, lo que conlleva a la competencia por los receptores presentes en las células epiteliales y la segunda la sobreproducción de compuestos antimicrobianos como el ácido hidróxido, bacteriocinas y péptidos antimicrobianos (AMP) (Da Silva et al., 2023).

1.8.3 Características genéticas y fisiológicas de bacterias lácticas

Los organismos probióticos pertenecen a la taxonomía de bacterias ácido lácticas (BAL) y bifidobacterias. Las BAL están formados por gram-positivas y catalasas negativas, dependiendo al género o especie, estas bacterias podrán fermentar

azúcares para con ello producir ácido láctico o como también una mezcla de ácido láctico, etanol y dióxido de carbono (Guauque y Gómez, 2019).

Las BAL pueden estar presentes en el tracto digestivo, así también pueden ser obtenidas de diversos alimentos, basándose en sus rutas metabólicas, las BAL pueden tener diferentes tipos fermentativos:

- Homofermentativa: Esto sucede cuando los lactobacilos fermentan hexosas para producir ácido láctico, tomando la ruta Embden- Meyerhof- Parnas.
- Heterofermentativas facultativas: Aquí los lactobacilos degradan hexosas por la vía Embden-Meyorhof-Parnas (EMP), degradando también pentosas y gluconato.

Ver Figura 1.14.

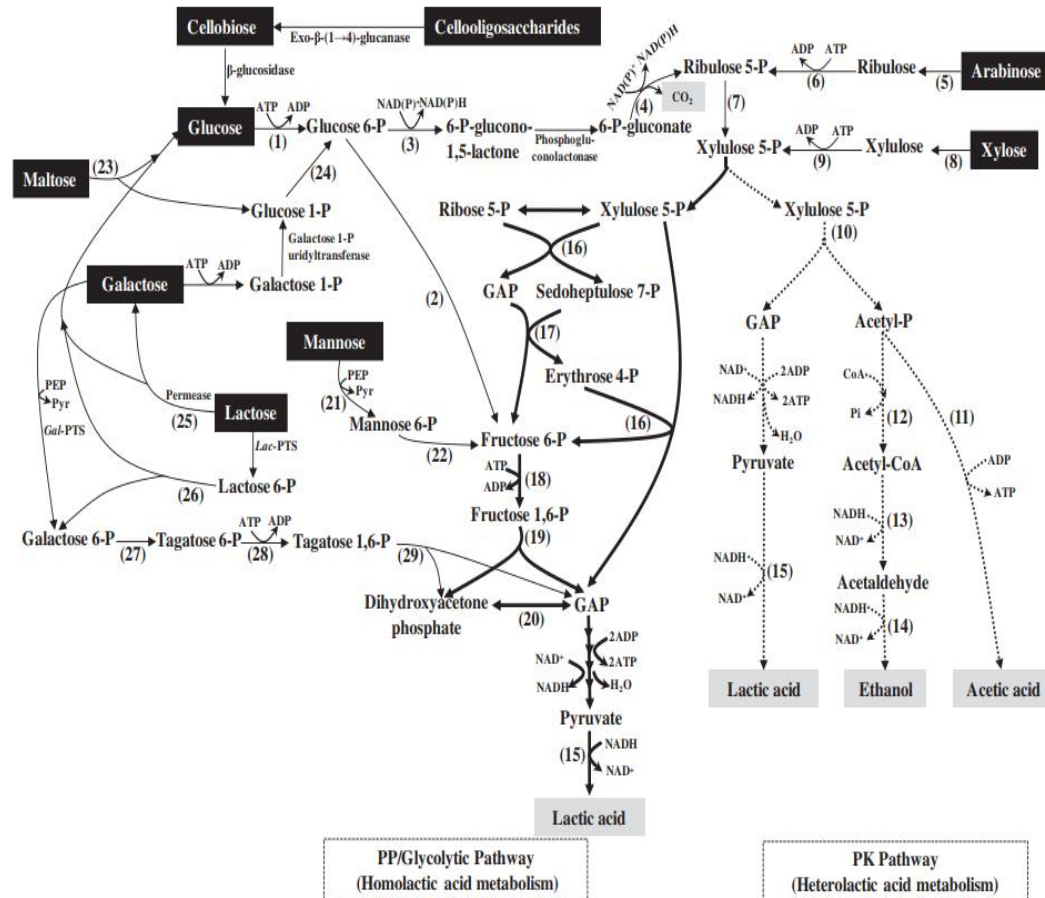


Figura 1.14 Ruta de fermentación Homofermentativa y heterofermentativa (Abdel et al., 2013).

Las principales vías para el metabolismo de hexosas y pentosas por las BAL se muestran a continuación en la siguiente Tabla 1.3.

Tabla 1.3 Bacterias Acido Lácticas Homofermentativas y Heterofermentativas (Abdel *et al.*, 2013).

Caracterización	Homofermentativa	Heterofermentativa
Productos	Ácido Láctico.	Ácido láctico, etanol, diacetilo, formiato, acetoina o ácido acético, y dióxido de carbono.
Vía metabólica	Hexosa: vía Embden Meyerhof Pentosa: ruta de las pentosas fosfato.	Hexosa: vía del fosfogluconato y la fosfocetolasa. Vía de las pentosas: fosfocetolasa.
Rendimiento teórico de ácido láctico a azúcares	Hexosa: 1.0 g/g (2.0 mol/mol) Pentosa: 1.0 g/g (1.67 mol/mol)	Hexosa: 0.5 g/g (1.0 mol/mol) Pentosa: 0.6 g/g (1.0 mol/mol)
Genero	Lactococcus, Streptococcus, Pediococcus, Enterococcus, algunos Lactobacillus.	Lactobacillus Leuconostoc, Oenococcus, y algunas otras especies de Lactobacillus.
Disponibilidad para la producción comercial de ácido láctico	Disponible de acuerdo a la alta selectividad	No disponible debido a la alta formación de subproductos

Por otra parte, existen tres caminos importantes en las que las BAL se involucran para la elaboración de alimentos fermentados como lo son la glucólisis (que es la fermentación de azúcares), lipólisis (descomposición de grasas) y el último la proteólisis (degeneración de proteínas) (Reygaerte, 2018)

1.9 Probióticos en la bioconversión

Los probióticos son organismos vivos que aportan un beneficio a la salud tanto en humanos como animales, estos microorganismos a su vez deben cumplir con algunas características para ser empleados y particularmente se usan más los del género

Lactobacillus, por que forman demasiadas esporas las cuales son resistentes a condiciones ambientales altas y su comercialización no es complicada, con respecto a (Molina, 2019), en la Figura 1.15 se observa el proceso de la bioconversión mediante organismos vivos.

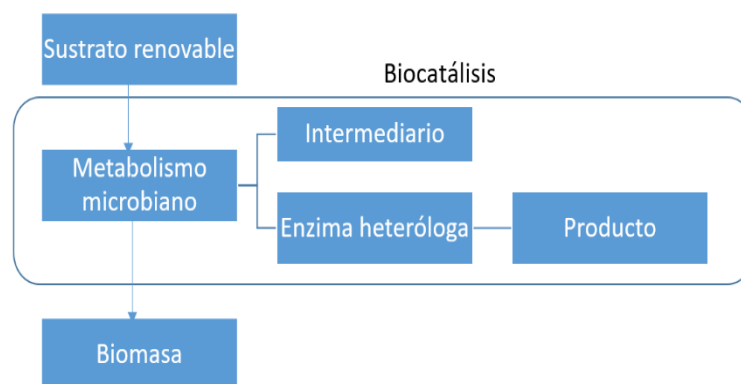


Figura 1.15 Proceso de Biocatálisis (Molina, 2019).

La biomasa lignocelulósica es la fuente más importante para la producción de combustibles y compuestos de valor agregado, la formación de compuestos lignocelulósicos comprende en primera parte la celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina, lo que al interactuar crean una configuración de biomasa resistente y recalcitrante.

En tanto a la manufactura de prebióticos brinda un margen para las industrias, ya que la materia prima es económica y su disposición es abundante, produciendo prebióticos mediante la hidrólisis de biomasa lignocelulósica usando enzimas microbianas (Brahmachari *et al.*, 2016).

1.9.1 Pretratamientos aplicados para bioconversión de biomasa lignocelulósicas

Uno de los distintos medios orgánicos mayoritariamente abundantes a nivel mundial son la biomasa lignocelulósica, ya que por este medio se obtiene energía renovable

considerada actualmente como una fuente fósil de carbono y gas natural, con una amplia utilidad en la producción de fertilizantes, biopolímeros, entre otros, su composición es variable dependiendo la fuente, por mencionar algunas como: maderas duras, residuos agroindustriales y cultivos de energía.

Principalmente, está organizada por tres compuestos poliméricos: la celulosa, lignina y hemicelulosa (Chávez, 2019).

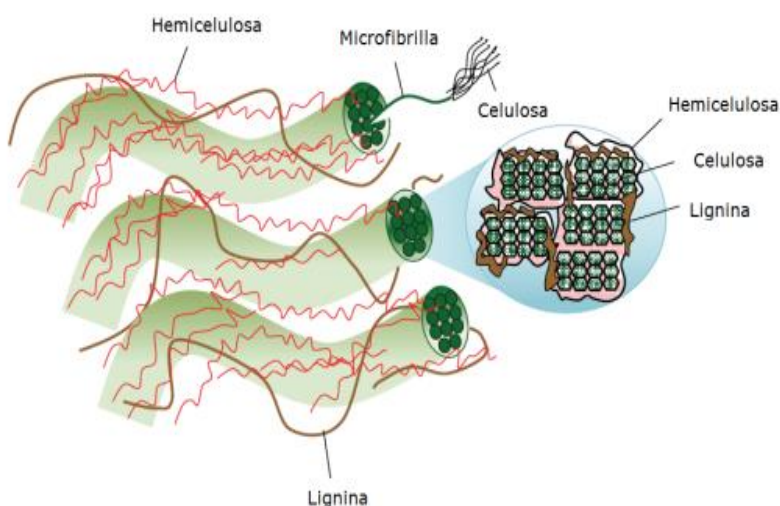


Figura 1.16 Estructura lignocelulósica (Chávez, 2019).

Los pretratamientos de materiales lignocelulósicos son los siguientes: físicos (mecánico e irradiación), químicos (álcalis, ácidos, oxidantes y órgano solventes), físico-químicos (extrusión, hidrotérmico y explosión de vapor) y biológicos (microorganismos y enzimáticos) (Espinosa *et al.*, 2021).

- Pretratamiento Físico

En este tratamiento el tamaño de partículas reduce, lo cual genera un incremento en el área superficial y tamaño de poro, por ende, se disminuye la cristalinidad y el nivel de polinización de la celulosa.

- Pretratamiento Químico

Su función principal es eliminar la hemicelulosa y lignina en la biomasa, su modo de operación depende del intermediario químico (ácido, álcalis, oxidativo y orgánico, así como también de las condiciones de operación, Ver Tabla 1.4 se observa el rendimiento de metano producido por el efecto del pretratamiento al que fue sometido Ver Figura 1.17.

En cachaza se ha encontrado que el hidróxido de sodio y la cal, actúan de manera óptima de acuerdo a los incrementos en el rendimiento de metano.

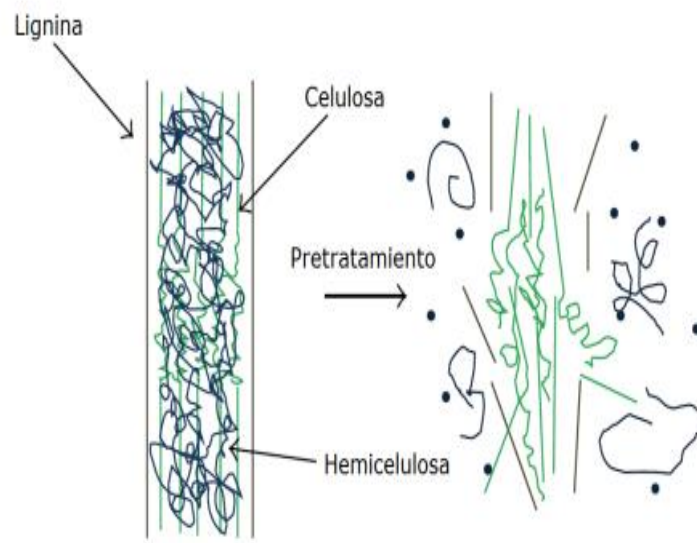


Figura 1.17 Pretratamiento Químico (Espinosa *et al.*, 2021).

Tabla 1.4 Variación de rendimiento de metano producida por el tipo de pretratamiento (Espinosa *et al.*, 2021).

Pretratamiento	Condiciones	Sustrato	Variación en el rendimiento de Metano	Referencia
Acido	H ₂ SO ₄ (5%),121°C, 60min.	Jacinto de Agua	+131%	(Sarto <i>et al.</i> , 2019)
	H ₂ SO ₄ , HCl, CH ₃ COOH y H ₂ O ₂ (1 ;2 ;3 y 4 %), 25 °C, 7 días.	Rastrojo de maíz	+115(3% H ₂ O ₂)	(Song <i>et al.</i> , 2014)
Alcalino	Ca (OH) ₂ ,100°C, 60 min, CA: 9,5 g/100g _{st} .	Cachaza	+32%	(López, 2016)
	NaOH, 45°C, 30 min, CA: 1,5; 3 y 6 g/100g _{mf} .	Cachaza	+12 % (CA=1,5) +38 % (CA=3) +40 % (CA=6)	(Janke <i>et al.</i> ,2016)
	NaOH, 121°C, 30 min, CA: 6 g/100g _{mf} .	Cachaza	+8%	(Janke <i>et al.</i> , 2019)
Oxidante	H ₂ O ₂ (2,68%), 6-18 días.	Paja de Arroz	+88%	(Song <i>et al.</i> ,2013)
	H ₂ O ₂ (4%), 55°C, 24 h.	Tallo de girasol	+33%	(Monlau <i>et al.</i> , 2011)
Orgánico	Etanol (50%), 180°C, 1 h.	Paja de trigo	+15%	(Mancini <i>et al.</i> , 2018)

- Pretratamientos físico-químicos

En este pretratamiento se rompen los enlaces de hidrógeno y aumenta el área superficial a temperaturas entre 50-300 °C. Un factor importante es el tiempo, ya que, si la exposición al calor es de larga duración se crea una mayor cantidad de inhibidores (Espinosa *et al.*, 2021).

- Pretratamiento Biológico

Son usados por acción de bacterias y hongos, así como también de enzimas las cuales aumenta el rendimiento con respecto a biomasa sin pretratamiento desde un 20% a un 100%, también son amigables con el ambiente, debido a que usan menos energía y no son tóxicos (Zambrano, 2017).

1.10 Crecimiento Bacteriano

Para los microorganismos, el crecimiento es la respuesta más importante a su entorno, es el resultado de la replicación y los cambios en el tamaño celular, los microorganismos pueden crecer en una variedad de condiciones físicas, químicas y nutricionales, además generan compuestos biológicos a partir de los nutrientes de su entorno, algunos de estos nutrientes se utilizan para producir energía, mientras que otros se consumen.

El crecimiento de la masa microbiana se puede describir mediante la siguiente ecuación.



Donde: S = Sustrato, X = Células, P = Productos extracelulares y nX = más células

La tasa de crecimiento está relacionada con la concentración celular, y la reproducción celular es el resultado normal de esta reacción.

La tasa de crecimiento microbiano se caracteriza por la tasa de crecimiento específica neta, definida como:

$$\mu_{net} = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (1.2)$$

$$\mu_{net} = \mu_g - k_d \quad (1.3)$$

Donde: X = Concentración de masa celular, t = Tiempo, μ_{net} = Crecimiento específico neto, μ_g = tasa de crecimiento específico bruto y k_d = tasa de pérdida de masa celular por muerte celular o metabolismo endógeno (Shuler *et al.*, 2002).

1.10.1 Comportamiento del crecimiento en la fermentación microbiana

En este proceso catabólico de oxidación de materia orgánica, para la producción de otros compuestos orgánicos y energía, se realiza por bacterias y levaduras de forma anaerobia.

La fermentación no afecta el transporte de electrones, por lo que el receptor de electrones del NADH que se obtiene es un compuesto con bajo poder oxidante, tiende a reducirse para oxidarse nuevamente. Las moléculas ATP obtenidas son consumidas por los mismos microorganismos. En la Figura 1.18 se observan las fases en el crecimiento de microorganismos.

La fermentación conserva los alimentos más tiempo, debido al alcohol y ácidos obtenidos en el proceso, estos forman compuestos con sabor, aroma y texturas únicos mediante la fermentación, como lo son el sabor del queso, el aroma de la mantequilla, vinos, yogur, etc. (Condado y Huerta, 2022a).

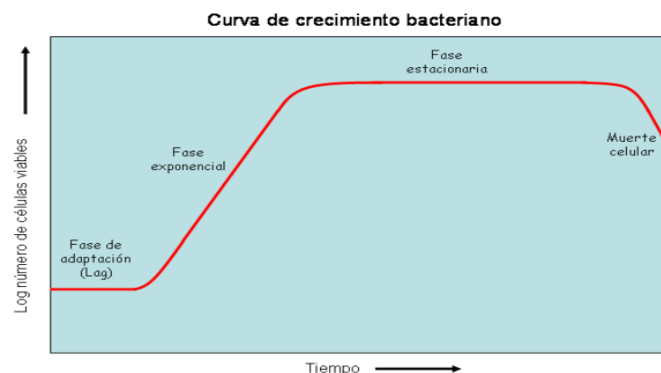


Figura 1.18 Fases de la curva de crecimiento microbiano (Condado y Huerta, 2022a).

1.10.2 La temperatura y pH en el crecimiento microbiano

La temperatura y pH tienen un efecto significativo en la tasa de crecimiento microbiano, pues los microorganismos son sensibles a los cambios bruscos de los mismos, con una temperatura baja, la velocidad de crecimiento se ve mitigada y un cambio en el pH puede matar a los microorganismos presentes en el proceso dando lugar a la descomposición de los productos (Jiménez *et al.*, 2017).

1.11 Modelos Matemáticos para la Descripción del Crecimiento de Microorganismo

Los modelos matemáticos son utilizados para predecir el comportamiento que tendrán los microorganismos con información previamente recaudada de anteriores investigaciones, la aplicación de este método reduce los costos, pues reduce en gran parte la pérdida de reactivos y material que se ocupan de manera experimental, para poder describir los procesos los modelos matemáticos se apoyan en variables macroscópicas como la temperatura, pH y densidad celular, también se tiene la capacidad de modelar los sistemas biológicos para dar una comprensión detallada sobre las comunidades microbianas, su caracterización y cuantificación (Wade *et al.*, 2016).

1.11.1 Modelo de Gompertz modificado

Los modelos cinéticos en microbiología se clasifican en primarios los cuales describen la relación entre la cantidad de población de microorganismos y el tiempo de proceso, mientras que los modelos secundarios estudian la relación de los parámetros del modelo primario y las condiciones que lo rodean, el modelo de Gompertz ha mostrado buenos resultados y es uno de los más utilizados este se basa en la relación de la tasa de crecimiento bacteriana y la densidad de la población, la ecuación que describe este modelo se representa mediante (Yanez y Vega, 2021).

$$\log \left(\frac{N}{N_0} \right) = A \exp \left\{ -\exp \left[\frac{\mu_{max}}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (1.4)$$

Donde:

$\log \left(\frac{N}{N_0} \right)$ = Logaritmo en base 10 de las UFC/mL

t = Tiempo transc. urrido (variable dependiente del modelo).

A = Logaritmo en base 10 de la concentración inicial de microorganismos (Log10 UFC/mL).

μ_{max} = Describe la velocidad de crecimiento máxima relativa al tiempo t

λ = Es el tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento (h).

1.11.2 Modelo de Luedeking – Piret

Es un modelo cinético que permite evaluar la producción de ácido láctico producido por la bacteria *Lactobacillus delbrueckii* mediante la fermentación por lotes a temperatura constante y pH controlado. Luedeking y Edgar L. Piret, encontraron que la velocidad de formación de componentes depende de manera lineal de la tasa de crecimiento y la concentración celular (Castillo *et al.*, 2020).

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (1.5)$$

Dónde:

$\frac{dp}{dt}$ = Tasa de formación del producto (mg L⁻¹ día⁻¹)

p = Concentración del producto (mg L⁻¹)

α = Coeficiente de correlación de crecimiento (mg mg⁻¹)

β = Coeficiente de no-correlación de crecimiento (mg mg⁻¹)

1.12 Biorreactores

Se refiere a un recipiente que se encuentra en condiciones ambientales aptas, para el crecimiento de microorganismos, así como también estas pueden ser optimizadas para la reproducción de microorganismos, que nos dé como resultado un producto de interés determinado o eliminación del mismo (Mera *et al.*, 2022), en la Figura 1.19 se puede observar el prototipo de un biorreactor, el cual cumple con las características que después se mencionan.



Figura 1.19 Biorreactor (Mera *et al.*, 2022).

1.12.1 Características del biorreactor

Se encuentra una extensa variedad de biorreactores, en su mayoría estos están involucrados en distintos proyectos biotecnológicos. Entre los sistemas se suelen encontrar dos grupos, unos son los biorreactores tubulares y los biorreactores tipo tanque, los últimos usualmente utilizados a escala de laboratorio y en procesos industriales. Entre los reactores comúnmente usados hay diferencias geométricas en los sistemas tipo tanque, resaltando el modo en el que están diseñados sus agitadores,

el número de agitadores contenidos, espacio entre impulsores y la manera en cómo se relaciona el diámetro con respecto a la altura del depósito (Gil y León, 2021).

1.12.2 Biorreactores batch

Estos reactores operan de la misma forma que los fed-Batch, ya que al principio se cargan los reactantes (nutrientes) y posteriormente se inocula agregando una concentración de microorganismos de iniciación, hay un tiempo de latencia en el cual no se genera producto, una vez alcanzado el punto máximo, se cambia el volumen conocido que está contenido y es reemplazado por otra cantidad igual de nutrientes presentes en un inicio, haciendo que el proceso actual inicie desde la fase de crecimiento exponencial de microorganismos y al mismo tiempo proveer nuevos nutrientes. Este sistema es factible, ya que permite eliminar tiempos muertos en la etapa de producción Ver Figura 1.20 (Gil y León, 2021).



Figura 1.20 Diseño de un Biorreactor Batch (Gil y León, 2021).

En estos biorreactores la fermentación es más simple porque los sustratos de carbono no se añaden durante la fermentación, solo se controla el pH, este sistema es completamente cerrado por lo cual previene la contaminación con otros

microorganismos esporulantes en el ambiente y se obtienen concentraciones mayores de ácido láctico en comparación a otros métodos de fermentación (Abdel *et al.*, 2013).

1.12.3 Biorreactor semicontinuo

A estos reactores se les agrega una carga conocida de microorganismos, ya que generalmente los sistemas de este tipo se manejan a través de disoluciones ricas en nutrientes a lo cual también es caracterizado por tener una actividad en serie Ver Figura 1.21, y el beneficio primordial que nos ofrece es, mantener un control de crecimiento, así como también de manera constante (Gil y León, 2021).

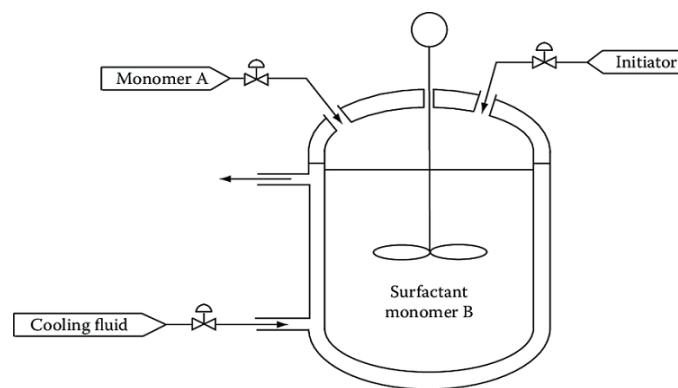


Figura 1.21 Biorreactor semicontinuo (Gil y León, 2021).

En este reactor el sustrato se alimenta de manera secuencial sin realizar la eliminación del caldo fermentado, este caso es de gran ventaja para sistemas que en donde las concentraciones altas de sustrato afectan el crecimiento microbiano y la producción del producto a obtener, influyen varios factores como lo son los tiempos de alimentación, la concentración de sustrato a mantener y cómo alimentar el sustrato para poder llevar a cabo la fermentación de manera exitosa (Abdel *et al.*, 2013).

1.13 Estudios previos

Sánchez *et al.*, (2017). Estudiaron la producción de Bioetanol a partir de Cachaza, se estudió la fermentación de Cachaza usando cargas de sulfato de amonio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ y cepa de *Saccharomyces cerevisiae* para producir la mayor concentración de etanol con la mínima cantidad de impurezas en anticipación de facilitar una mayor purificación y reformado de bioetanol para la producción de H_2 . Los resultados mostraron que la producción de etanol a partir de la fermentación de Cachaza fue de unos $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ y la adición de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ no afectó su producción. Sin embargo, redujo significativamente la producción de alcoholes ramificados.

Sánchez *et al.*, (2020). Estudiaron el efecto del pretratamiento en la producción de etanol y alcohol fusel durante la fermentación de cachaza de caña de azúcar. Aplicaron un diseño experimental de parcelas divididas para evaluar el efecto de la temperatura y las cargas de HNO_3 , durante el pretratamiento del lodo de prensado de caña de azúcar para su posterior fermentación, sobre el contenido de alcohol de etanol y fusel. Los resultados mostraron que la temperatura de pretratamiento tiene un efecto importante sobre la concentración de etanol durante la fermentación debido a la formación de azúcar reductor durante pretratamiento.

Sánchez *et al.*, (2019). Estudiaron los *Lactobacilos* en la industria alimentaria y sus medios de cultivo, se expusieron las principales tendencias de investigación y desarrollo para la producción de LAB para fines industriales con énfasis en los medios de cultivo requeridos para su crecimiento. Las bases de datos de la web of Science, así como la se utilizó la herramienta Google Patent Search para recopilar y analizar la información científica y técnica publicada en los últimos doce años relacionados con las LAB y sus medios de cultivo. El uso de leche, suero de queso industrial, melaza de caña, almidones hidrolizados, materiales lignocelulósicos, residuos de alimentos orgánicos y plasma sanguíneo bovino, entre otros, han sido propuestos para sembrar lactobacillus con el objetivo de reducir costos y aumentar su producción

Rocafuerte (2022). Desarrolló el proceso de bioconversión de los residuos provenientes de café (*Coffea arábica*) mediante la acción anaerobia fermentativa de lactobacilo (*Bacillus subtilis*), en el cual se usó el residuo de café, se le realizó la caracterización fisicoquímica y microbiológica. Llevaron a cabo cinéticas, con el propósito de evaluar: la remoción de carbohidratos, la producción de ácido láctico, el crecimiento bacteriano y la generación de biomasa.

Obteniendo como resultado que la producción ácido láctico fue de 8.4 g/L y se removieron hasta 23.27 g/L de carbohidratos, también se consiguió la propagación de *Bacillus subtilis* de hasta 2.83×10^8 UFC/mL utilizando residuos de café y se logró generar hasta 7.223 g/L de biomasa.

Romero et al., (2018). Estudiaron la acción fermentativa de *lactobacillus: acidophilus*, *reuteri* y *fermentum* en la bioconversión de sustratos orgánicos en productos con potencial alimenticio, tuvo como finalidad el aprovechamiento del residuo porcícola con el fin de suministrar los nutrientes que estos residuos contienen en el cultivo poblacional de *lactobacillus*, para la generación de ácido láctico, posteriormente se caracterizó de manera fisicoquímica y microbiológica, se determinó que el tiempo de residencia para que los *lactobacillus* produzcan la mayor cantidad de ácido láctico fue entre las 48 y 72 horas, y que si se hubiese dado un pretratamiento al residuo este hubiese presentado una diferencia notable en los valores de biomasa, así como en el grado de inactivación de microorganismos patógenos.

Coşansu et al., (2021). Estudiaron la cinética de crecimiento y supervivencia de *lactobacillus acidophilus* en leche de arroz negro, El *L. acidophilus* fue almacenado en arroz negro y leche de arroz blanco a 4°C duran 20 días. Se determinó la fase de latencia a (1.45 h) y la densidad de población máxima más alta (7.48 log CFU/mL) estaban en leche negra de arroz ($P < 0.05$). El tiempo de generación en la leche de arroz negro (1.31 h) fue mayor que en la leche de arroz blanco (0.58 h) pero más corta que en MRS Broth (2,22 h, $P < 0,05$). La población de *L. acidophilus* disminuyó tanto en la leche a 4°C, pero mayor en arroz negro que en arroz blanco al final del período

de almacenamiento. Se concluyó que el arroz negro apoya el crecimiento de *L. acidophilus* en comparación con el arroz blanco.

Alvarado *et al.*, (2021). Estudiaron el efecto de la Biocelulosa, como sustrato para la producción de ácido láctico con la finalidad de reducir costos de producción, se utilizó un proceso de separación de aguas abajo (DSP) para la recuperación de ácido láctico, el cual fue necesario para mejorar la competitividad global del proceso. En el presente estudio, el ácido láctico fue producido a partir de biopulpa municipal obteniendo un rendimiento y título de $82.6 \pm 2,3\%$ g/g de azúcares totales y 16.1 ± 0.4 g/L, respectivamente. También investigaron dos procesos posteriores para la recuperación ácido láctico del caldo de fermentación. DSP1 consistió en un paso de prepurificación (centrifugación, ultrafiltración y activación carbón) seguido de intercambio iónico y destilación al vacío. DSP2, se incluyó una unidad de nanofiltración después del paso de prepurificación, lo que dio como resultado una mayor pureza de ácido láctico de $82.0 \pm 1.5 \%$ pero comprometiendo la recuperación, es decir, $65.0 \pm 1.5 \%$. Los resultados del presente estudio indican la viabilidad de utilizar biopulpa municipal como materia prima de bajo costo.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Metodología experimental

En la Figura 2.1 se presenta la metodología, para la fermentación del ácido láctico de la cachaza piloncillera.

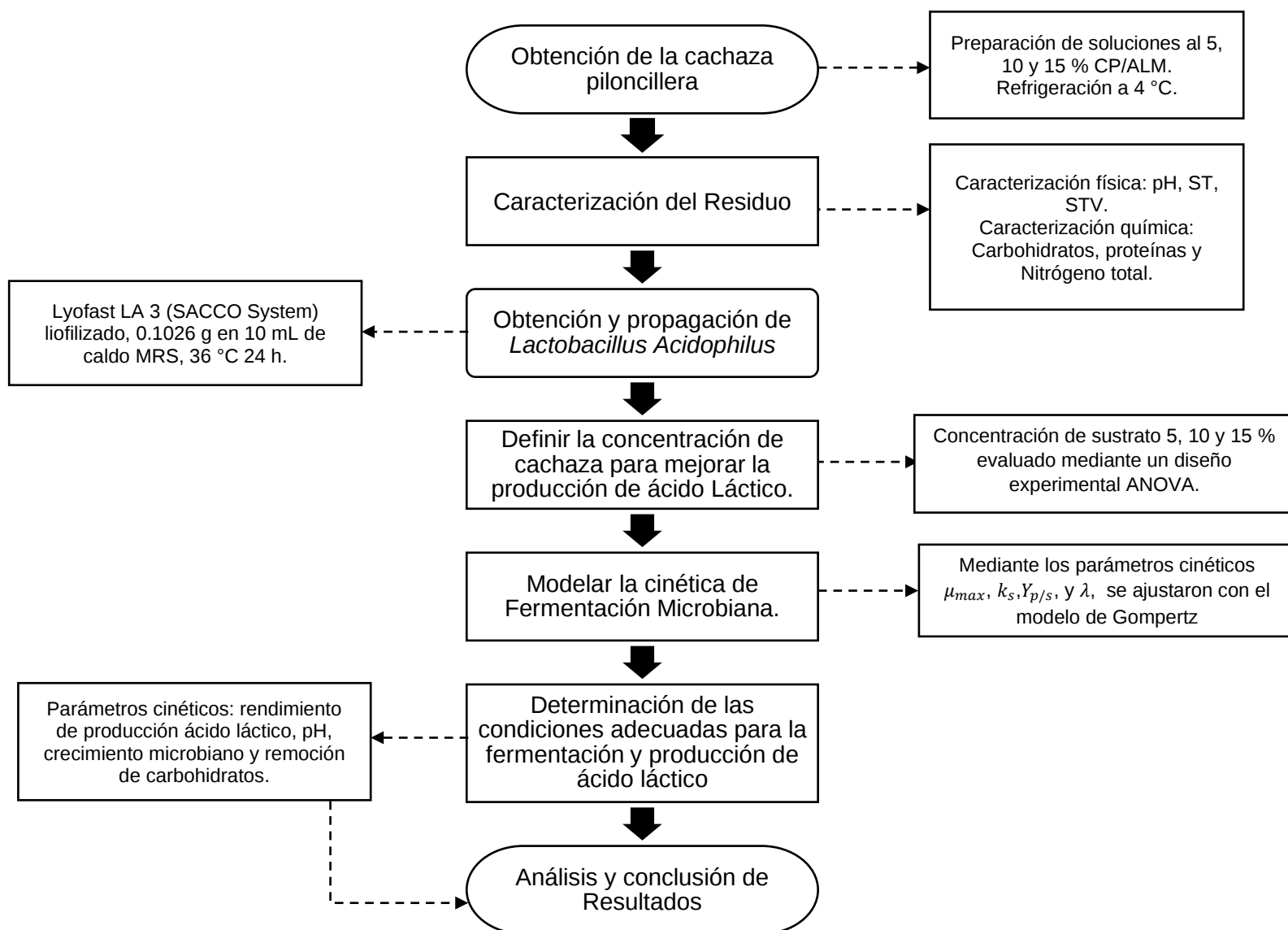


Figura 2.1 Metodología de la investigación.

2.2 Obtención de Cachaza

Este residuo agroindustrial se obtuvo de los trapiches ubicados en la localidad de Zentla Veracruz (19°05'24.9"N 96°48'04.3"W), la muestra se tomó de los contenedores de descarga, provenientes de la filtración y lavado de los lodos sedimentados en el proceso de clarificación, mezclados con bagacillo, en la Figura 2.2, se puede observar el proceso empleado para la toma de muestra, también se recolectaron 2 L de agua la cual forma parte del proceso de lavado de moldes de piloncillo, esto con el fin de complementar el proceso de fermentación.



Figura 2.2 Muestra de Cachaza piloncillera

La cachaza desemboca en unos contenedores, en los cuales se encontraba a una temperatura de 90 °C, esto ayuda a mitigar la presencia de organismos patógenos al momento de tomar la muestra.

Posteriormente, se prepararon soluciones en concentraciones de 5, 10 y 15 % de cachaza piloncillera, utilizando agua de lavado de moldes como disolvente. Esto, para ajustar el contenido de sólidos totales a un valor en el rango de 2 a 5 % y evaluar el efecto de esta concentración en el proceso fermentativo. Enseguida, las soluciones se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

2.3 Caracterización del Residuo Agroindustrial

La caracterización de la cachaza se realizó con respecto a tres diluciones, en la primera se diluyeron 6.75 g de cachaza piloncillera + 128.25 mL de agua de lavado de moldes, esto para tener una concentración al 5 % v/v, la segunda consistió en agregar 13.5 g de cachaza piloncillera + 121.5 mL de agua de lavado de moldes para una concentración al 10 %, y en la tercer dilución se adicionaron 20.25 g de cachaza piloncillera + 114.75 mL de agua de lavado de moldes con el objetivo de obtener una concentración al 15 %, los parámetros evaluados son descritos en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Parámetros para la caracterización de la cachaza piloncillera.

Físicos	Método Empleado	Parámetro (Unidad de medida)
pH	Potenciómetro	--
Sólidos Totales (ST)	2540 E Standard Methods	[%]
Sólidos Totales Volátiles (STV)	2540 G Standard Methods	[%]
Químicos	Método Empleado	Parámetro (Unidad de medida)
Nitrógeno Total	4500-NTK C SM	[%]
Carbohidratos	Antrona- Sulfúrico	[g/L]
Proteínas	Nitrógeno Kjeldahl	[%]

2.3.1 Determinación de Potencial de Hidrógeno (pH)

Se realizó en un equipo electrónico de la marca SCIENCE MED (modelo SM-3BW), el cual le otorga una mayor precisión en la lectura de los datos en comparación con otros instrumentos, para calibrar el equipo se utilizaron soluciones buffer.

La determinación se llevó a cabo siguiendo la norma NMX-AA-008-SCFI-2011 Análisis de agua - Determinación del pH - Método de prueba.

2.3.2 Determinación de Sólidos Totales (ST)

La determinación fue realizada por triplicado en una estufa, se colocaron 3 muestras en los crisoles previamente pesados a peso constante, a una temperatura de 150 °C, por 24 horas. Trascurrido el tiempo, fueron retirados y colocados en el desecador, para atemperarlos, posteriormente se tomó el peso final.

Se siguió la técnica basada en el método estándar 2540G de la APHA-AWWA-WPFC (1999), bajo la norma NOM-AA-34-1976. El equipo utilizado fue de la marca Felisa Ver Figura 2.3. La ecuación para determinar ST se encuentra en el Anexo A.

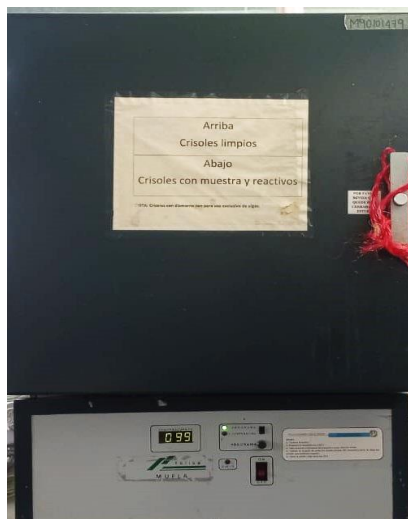


Figura 2.3 Estufa Marca Felisa.

2.3.3 Determinación de Sólidos Totales Volátiles (STV)

Esta metodología analítica fue realizada de acuerdo con el método estándar 2540G de la APHA-AWWA-WPFC (1999), bajo la norma NOM-AA-34-1976, el equipo utilizado fue de la marca Thermo Scientific thermolyne, con una temperatura constante de 550

°C en un lapso de 2 horas. Esta determinación se realizó mediante la ecuación que se encuentra en el Anexo A.

2.3.4 Determinación de carbohidratos por el método de Antrona- Sulfúrico

Se utilizó una muestra diluida con relación 1:25 de la cual se tomaron 2 mL de muestra en tubos de ensaye y 2 mL de agua destilada para el blanco, así mismo se ocuparon 2 mL Antrona- Sulfúrico, los tubos fueron calentados a baño maría por un tiempo de 12 min a una temperatura aproximada de 95 °C. Posteriormente, se enfriaron y se leyeron las muestras en el espectrofotómetro, Thermo Scientific modelo Genesys 20, con una absorbancia de 620 nm, fue necesario calibrar con un blanco de agua destilada.

En esta determinación debe tenerse en cuenta que la solución Antrona - Sulfúrico se deteriora con facilidad, además presentan una reacción exotérmica, por lo cual se deben tomar precauciones para poder emplearla. El ácido sulfúrico cuando entra en contacto con el reactivo Antrona son convertidos en furfural-6-hidroxi-metil, conocido como furfural, estos compuestos forman parte de compuestos aromáticos produciendo un color en función de los carbohidratos contenidos en la muestra.

2.3.5 Determinación de proteínas Nitrógeno Kjeldahl

La determinación se realizó bajo la norma NMX-AA-026-SCFI-2010. Se utilizaron 0.05 g de muestra, 0.05 g de catalizador selenio en polvo aproximadamente, 0.2 g de sulfato de cobre, 0.5 g de sulfato de potasio y 3 mL de ácido sulfúrico. Estos se colocaron en un matraz kjendahl y se llevaron a digestión en un tiempo de 15 min, durante los cuales adquirieron un color verde esmeralda, indicando la presencia de proteínas, al mismo tiempo se colocó en el destilador hidróxido de sodio al 40 % lentamente por que se produce una reacción exotérmica, recibiendo finalmente el destilado, al cual se le agregaron unas gotas de indicador azul-rojo de metilo y se tituló. Para realizar el cálculo se utilizó la ecuación Ver Anexo B.

2.4 Obtención y reproducción de *Lactobacillus Acidophilus*

2.4.1 Obtención de *Lactobacillus Acidophilus*

El *Lactobacillu* fue obtenido de un producto comercial denominado Lyofast LA 3 (SACCO System). Esta cepa se encuentra en estado liofilizado y fue adquirido de la empresa Raff, la cual se dedica a vender materia prima y brindar servicios en el ramo de la industria alimenticia, especializados en la industria de la leche y sus derivados. El cultivo contiene aproximadamente 10 dosis, con un número de lote C326781A, Ver Figura 2.4.



Figura 2.4 *Lactobacillus Acidophilus*

2.4.2 Reproducción del medio de cultivo

Para el cultivo el *Lactobacillus Acidophilus* se preparó el caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe) agregando 100 mL de agua destilada y 5.5 g con una agitación constante y temperatura de 90 °C hasta que se disolviera. Posteriormente, en el tubo semilla se añadieron 10 mL de caldo y 0.1026 g de *lactobacillu* liofilizado. Una vez propagado, se utilizaron 9 tubos con 13.5 mL de caldo MRS previamente esterilizados y se inocularon con el tubo madre, adicionando a cada tubo 1.5 mL de inóculo.

2.4.3 Conteo celular

Se realizó el conteo de colonias por placa vertida realizando diluciones en serie en base 10 de cada muestra y transfiriendo 1 mL por dilución a cada caja Petri a fin de obtener entre 30 y 300 UFC. Se calcularon las UFC/mL multiplicando el número de colonias por el inverso de la dilución.

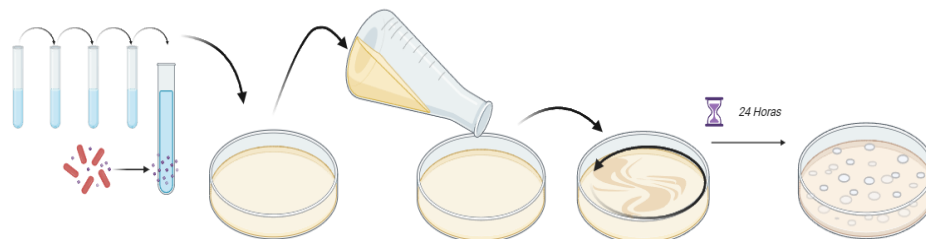


Figura 2.5 Conteo celular por método de placa vertida

2.5 Evaluación de cinéticas para Ácido Láctico

2.5.1 Fermentación Láctica

Propagado el inóculo, se montaron 9 matraces de 250 mL con 15 mL de inóculo y 180 mL de cachaza al 5, 10 y 15 %, se cuidó el pH de 6.0 a 6.5 y la temperatura se mantuvo a 37°C. Además, se ajustó la velocidad de agitación de 100 a 120 rpm en una incubadora de marca ZHWY-100B. Se tomaron lecturas cada 4 horas.

Se cuantificó la concentración de azúcares, biomasa, ácido láctico y se evaluó el rendimiento del mismo.

2.5.2 Rendimiento de Ácido láctico

Para estimar el rendimiento de ácido láctico, se realizó por medio de la metodología descrita por la norma NMX-F-716-COFOCALEC-2014, la cual tiene como fundamento titular la muestra con NaOH 0.1 N. La ecuación para su determinación se puede observar en el Anexo C.

2.5.3 Determinación de las condiciones de operación para aumento de la producción de ácido láctico.

Para evaluar las condiciones óptimas de operación, se trabajó con el inóculo en condiciones mesofílicas debido a que esta temperatura $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ es recomendable para su crecimiento, se evaluaron las condiciones para su desarrollo de acuerdo a experimentaciones realizadas anteriormente y se atendieron para evitar reacciones adversas.

2.6 Diseño Experimental

Se empleó un diseño experimental Unifactorial (ANOVA), en el cual se evaluaron tres diferentes concentraciones de sustrato: 5 ,10 y 15 %, teniendo como variable de respuesta la producción de ácido láctico, así mismo se monitoreó el consumo de carbohidratos por el método de Antrona-Sulfúrico, pH y crecimiento microbiano con cámara de Neubauer.

2.7 Cuantificación de Biomasa

Para la determinación de la biomasa obtenida, se tomó en cuenta la muestra inicial y la muestra final por diferencia de pesos, este reactor se mantuvo cerrado por 72 horas con una agitación constante de 120 rpm.



2.6 Incubadora con reactores para cuantificación de biomasa.

2.8 Modelo matemático para la evaluación del proceso de fermentación láctica

Para obtener los parámetros cinéticos μ_{max} , k_s , $Y_{p/s}$, y λ (tiempo acondicionamiento) se determinaron con la ecuación de Gompertz, dado que en las gráficas se presenta un comportamiento similar al proporcionado por este modelo, Ver Anexo D.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de cachaza piloncillera

En la Tabla 3.1 se muestran los resultados de la caracterización fisicoquímica de cachaza piloncillera al 5, 10 y 15 %, los resultados de la caracterización demostraron que el contenido de proteínas y carbohidratos está dentro del rango adecuado sobre los requerimientos nutricionales para realizar la fermentación láctica, la cachaza al ser un residuo obtenido del procesamiento de la caña de azúcar es rico en carbohidratos con un valor entre los 21 y 50 g/L y para las proteínas de entre el 3 y 7 %.

Con referencia a lo reportado por los siguientes autores: Rocafuerte (2022), trabajó con residuos provenientes del café *coffea arábica*, señalando que tiene un contenido de carbohidratos de 26.55 g/L y un porcentaje de proteínas 1.42 %, Estrada (2022), realizó la investigación con los residuos agrocañeros con un contenido en carbohidratos de 58.46 g/L, y proteínas de 1.54 %, al mismo tiempo realizó la evaluación con porcínaza, dando un valor de 3,68 g/L en carbohidratos y 2.62 % de proteínas respectivamente; finalmente Romero (2017), trabajó con residuos porcícolas reportando un contenido de carbohidratos de 3.92 g/L, y proteínas de 11.51 %, se incluyó una tabla comparativa 3.2, de datos para futuras evaluaciones con otros residuos.

Tabla 3.1 Caracterización de Cachaza Piloncillera al 5,10 y 15 %.

Determinación	Concentración de Cachaza %		
	5	10	15
pH	6.39	6.62	6.70
Solidos Totales	27.44 g ST/kg	39.47 g ST/kg	51.19 g ST/kg
Solitos Totales Volátiles	89.07 g STV/kg	86.13 g STV/kg	89.61 g STV/kg
Nitrógeno Total	0.60 %	0.84 %	1.05 %
Carbohidratos	21.41 g/L	36.6 g/L	49.97 g/L
Proteínas	3.75 %	5.25 %	6.56 %

Tabla 3.2 Comparativa de carbohidratos y proteínas con respecto a otros residuos.

Residuo	Carbohidratos	Proteínas
Cachaza Piloncillera	172.42 g/L	8.35 %
Café coffea arábica	26.55 g/L	1.42 %
Agrocañeros	58.46 g/L	1.54 %,
Porcínaza	3.68 g/L	2.62 %
Porcícola	3.92 g/L	11.51 %

Con respecto al pH, es óptimo para el crecimiento del microorganismo con respecto a lo reportado por Jamez *et al.*, (2017), el cual se mantuvo un rango de pH de 6 a 8.5 en la cepa *Lactobacillus Acidophilus* ATCC* 314, el cual presentó un aumento favorable en la biomasa.

Para diluir la cachaza, se usó agua de lavado de moldes, ya que, al ser un residuo del mismo proceso, se pensó en darle una utilidad y complementar de manera positiva el proceso, dado que respecto a la evaluación fisicoquímica que se realizó es rico en carbohidratos, Ver Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Caracterización de Agua de lavado de moldes como diluyente

Agua de Lavado de moldes	
pH	5.6
Solidos Totales	1.93 %
Solidos Totales Volátiles	74.6 %
Carbohidratos	12.48 g/L

3.2 Propagación de inóculo *Lactobacillus acidophilus*

El *Lactobacillus acidophilus* fue sembrado en caldo MRS, con 0.1 g de *Lactobacillus* liofilizado a una concentración de 1.4×10^{10} UFC /g en 10 mL de caldo, en la Figura 3.1 se observa un precipitado blanco lechoso indicando la presencia de *Lactobacillus*, para confirmar ésto se realizó un recuento en placa de tal manera que se propagó en Agar MRS dejando 24 horas en la estufa dando como resultado colonias de color blanco con forma circular Ver Figura 3.2 y por tinción de Gram, se observó que los *Bacillus* se colorearon de color morado ya que son Gram positivos, lo que indica la presencia de *Lactobacillus acidophilus*, el microorganismo se puede apreciar en la Figura 3.3.



Figura 3.1 Propagación de *Lactobacillus Acidophilus*

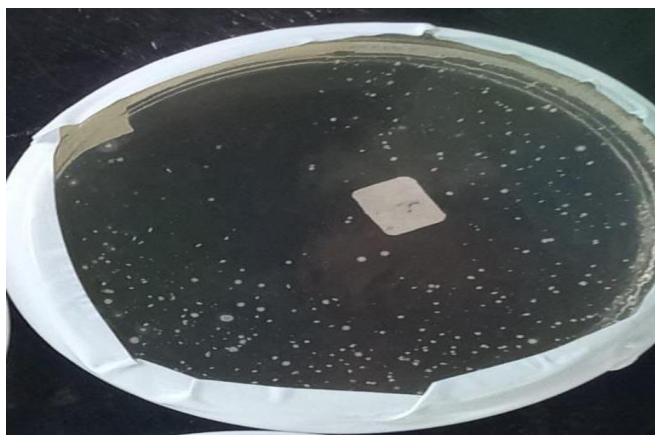


Figura 3.2 Colonias generadas por *Lactobacillus Acidophilus*

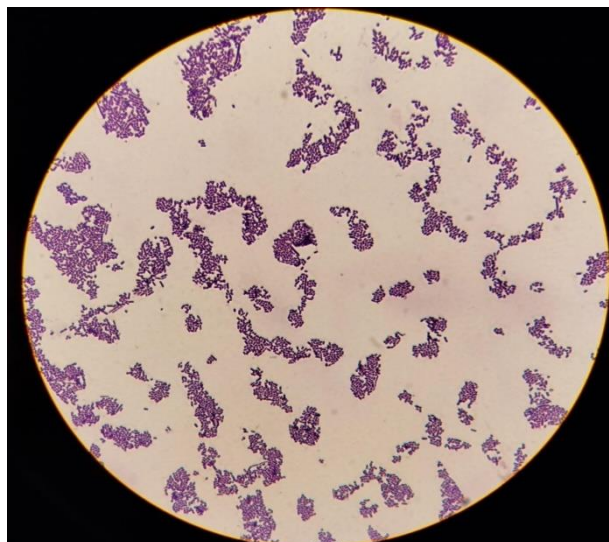


Figura 3.3 *Lactobacillus Acidophilus* por tinción de Gram.

3.3 Cinéticas de fermentación láctica

En la Figura 3.4 se muestra los reactores que fueron montados para su evaluación en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con un volumen útil de 150 mL las concentraciones de los reactores fueron de 5,10 y 15 % de sustrato y agua de lavado de moldes, los matraces fueron colocados en una incubadora modelo ZHWY-100B, manteniendo una temperatura constante de $36^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ y una velocidad de agitación de 120 rpm, durante 48 horas y tomando muestra cada 4 horas. Para cada muestra se determinaron pH, carbohidratos, densidad celular mediante la técnica de placa vertida en agar MRS y ácido láctico de acuerdo a la metodología descrita en la norma mexicana.



Figura 3.4 Reactores al 5,10 y 15%.

3.3.1 Monitoreo de pH

En la Figura 3.5 se muestra como fue cambiando significativamente el pH durante la cinética.

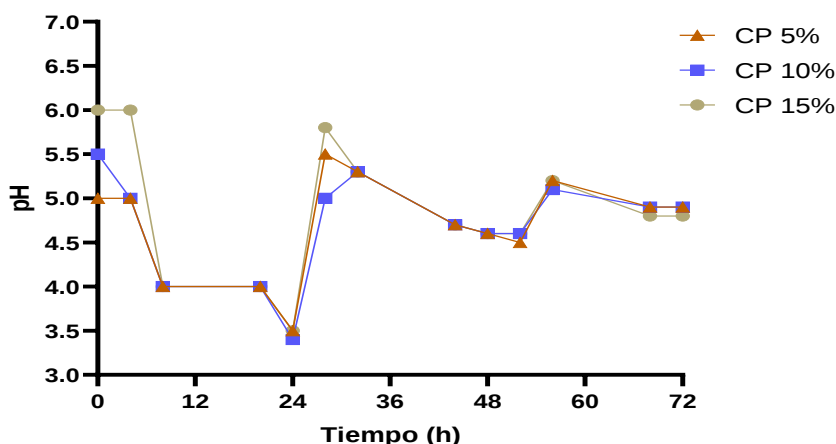


Figura 3.5 Comportamiento de pH a través del proceso de fermentación láctica para concentraciones de 5, 10 y 15%.

La concentración de cachaza presentó un efecto positivo en el aumento de pH de las muestras a analizar, sufriendo un decaimiento en paralelo en las primeras 8 horas con un pH de 4, el cual se mantuvo estable hasta la hora 20. El pH llegó a un punto mínimo al finalizar el día 1, con un pH de 3.5, por lo cual se procedió a agregar hidróxido de sodio al 40 % para aumentar el pH hasta obtener un valor oscilatorio entre 5 - 6 de pH en la solución de cada matraz, esto con la finalidad de mantener activos los microorganismos en el medio, al agregar hidróxido de sodio para incrementar el pH se puede notar que todas las soluciones muestran un comportamiento similar ante la adición del agente estabilizador

Se puede notar de la misma manera que a partir de la hora 25 y hasta las 72 horas se mostró la cinética más estable con respecto a las primeras horas, manteniendo un pH

entre los 4.5 y 5, por lo cual ya no se tuvo que agregar más hidróxido de sodio al sistema.

3.3.2 Remoción de carbohidratos

En la Figura 3.6 podemos observar que la cantidad de carbohidratos es mayor al 15%, esto es entendible pues a mayor concentración de cachaza mayor cantidad de carbohidratos presentes en el medio, tras el paso de 4 horas se empezó a notar una tendencia decreciente y con remociones notables en el microreactor, tras el paso de las primeras 20 horas se presenta una caída abrupta de pH a lo cual se realiza una estabilización al sistema con hidróxido de sodio y a la hora 24 la cantidad de carbohidratos se estabilizó, por lo cual se llegó al punto máximo de consumo por parte de nuestros organismos.

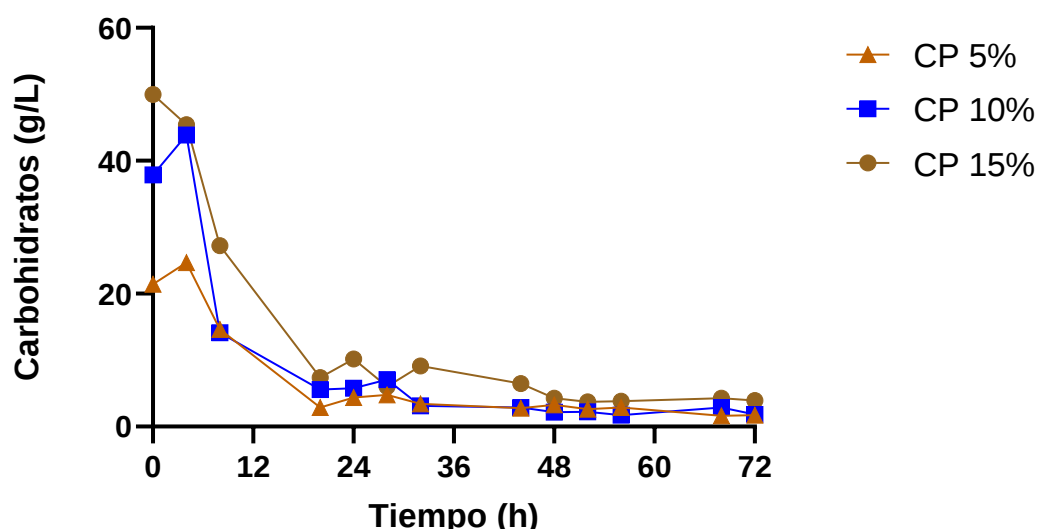


Figura 3.6 Remoción de carbohidratos al 5,10 y 15 % de sustrato.

3.3.3 Crecimiento microbiano

En la Figura 3.7 se observa que la concentración inicial fue entre los 8.3×10^5 células/mL, aumentando entre las 8 h del proceso, de 8.4 a 8.6×10^5 células/mL, teniendo un incremento entre las 11 y 12 h con un valor máximo de 8.7×10^5 células/mL, dado que el pH disminuyó, este a las 20 h presentó un incremento que finalizó a las

28 h, tomando en cuenta que el pH afectó de manera importante al proceso, y en este caso en el crecimiento de los lactobacillus, manteniendo un proceso estable a partir de las 32 h con un contenido celular de 8.36 a 8.37×10^5 células/mL, terminando con 8.18×10^5 células/mL.

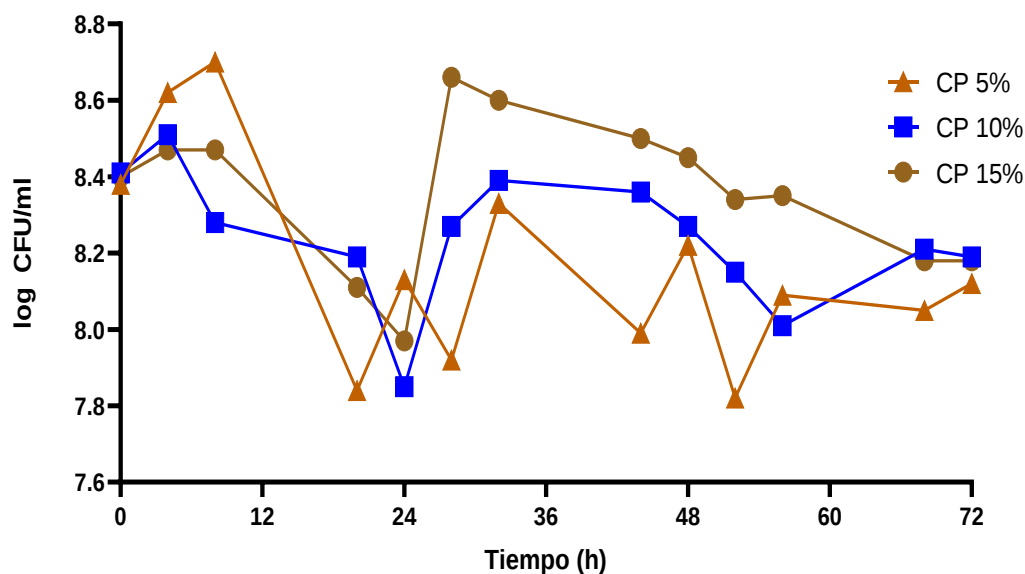


Figura 3.7 Comportamiento celular a través del proceso de fermentación láctica para concentración de 5, 10 y 15 % de sustrato.

3.3.4 Producción de Ácido Láctico

El proceso presentó un incremento significativo a las 8 h, como se puede observar en la Figura 3.8, llegando a un punto máximo de obtención de ácido láctico para la muestra al 15 %, los efectos de la concentración del 10 y 15% mostraron un comportamiento similar al inicio del proceso, pero la cantidad de materia orgánica benefició a la concentración más enriquecida en las horas posteriores, en la hora 18 la concentración del 10 % llegó a un máximo de rendimiento superando a la concentración del 15 %, solo en ese momento, esto pudo ser provocado por un cambio significativo en su pH, lo que mitigó la producción de ácido láctico en la concentración del 15 % en ese momento, estabilizando la producción en la h 56 en los tres casos.

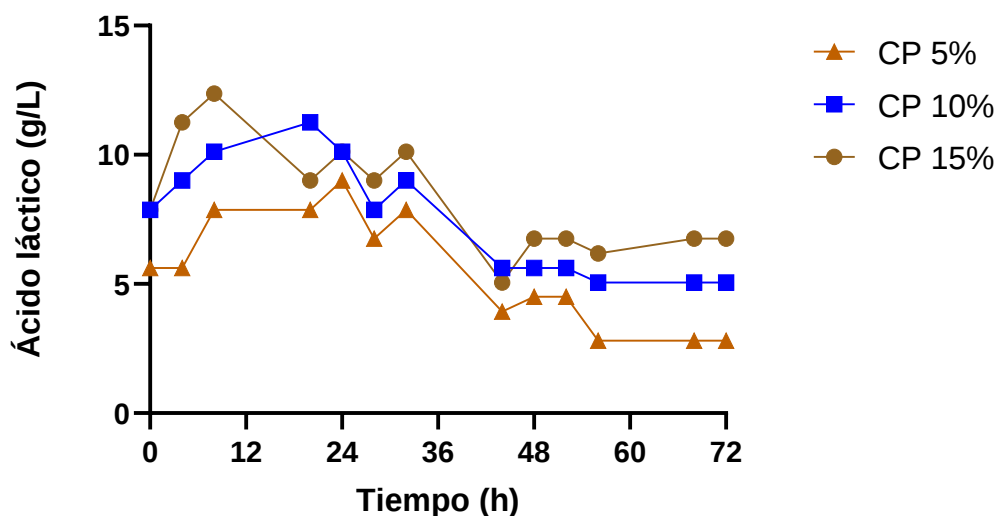


Figura 3.8 Producción de Ácido láctico para concentración de 5,10 y 15%

De acuerdo a lo reportado por Huang *et al.*, (2023), obtuvieron valores de producción máxima de ácido láctico en melaza de betabel con *Lactobacillus paracasei* de 1.42 g/L, valores debajo al obtenido en el presente trabajo, con un máximo de 12.37 g/L, con una concentración de sustrato al 15 %.

3.3.4.1 ANOVA

Se planteó un diseño de experimentos unifactorial con dos réplicas, cuyo factor fue la concentración de la cachaza a las tres diferentes concentraciones y la variable de respuesta es la cantidad de ácido láctico producida y el porcentaje de remoción de carbohidratos.

El análisis de varianza (ANOVA), mostrado en el Anexo A, muestra que es significativa la concentración de cachaza con respecto a la producción de ácido láctico al obtener una $F_{0.05} = 19$ y un valor de $P = 0.020$, esto se sabe, ya que se tiene un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ concluyendo que la concentración del residuo tiene un impacto significativo en la cantidad de ácido láctico producido.

Con respecto al método de LSD de Fisher y un nivel de confianza del 95 %, se concluye que la concentración cachaza en nivel 2, corresponde al 14.63 g/L, en donde se obtiene mayor producción de ácido láctico.

3.4 Cuantificación de biomasa

El rendimiento de la biomasa se puede observar en la Tabla 3.4, en la cual se registraron los datos con pesos iniciales y finales, lo cuales corresponden a un volumen útil de 150 mL, Romero *et al.*,(2023b), usaron *lactobacillus acidophilus* con residuos de caña de azúcar obteniendo un valor de 154.65 g/L⁻¹ de biomasa generada al final de la fermentación, de modo que el valor obtenido en el presente es de 66.42 g/L⁻¹, esto debido a la poca cantidad de sustrato que consumieron los organismos durante la fermentación láctica. En la Figura 3.9, se puede observar el proceso para obtener la biomasa final. Al término de las cinéticas se observa que presentan un color café lechoso debido a la formación del precipitado blanco que indica la propagación de *lactobacillus acidophilus*.

Tabla 3.4 Generación de biomasa inicial y final de las cinéticas de fermentación con *lactobacillus acidophilus*.

Concentración de Cachaza piloncillera	Biomasa (g/L)	
	Biomasa Inicial 0 h	Biomasa Final 72 h
5 %	11.35	21.46
10 %	11.75	31.22
15 %	42.42	66.42

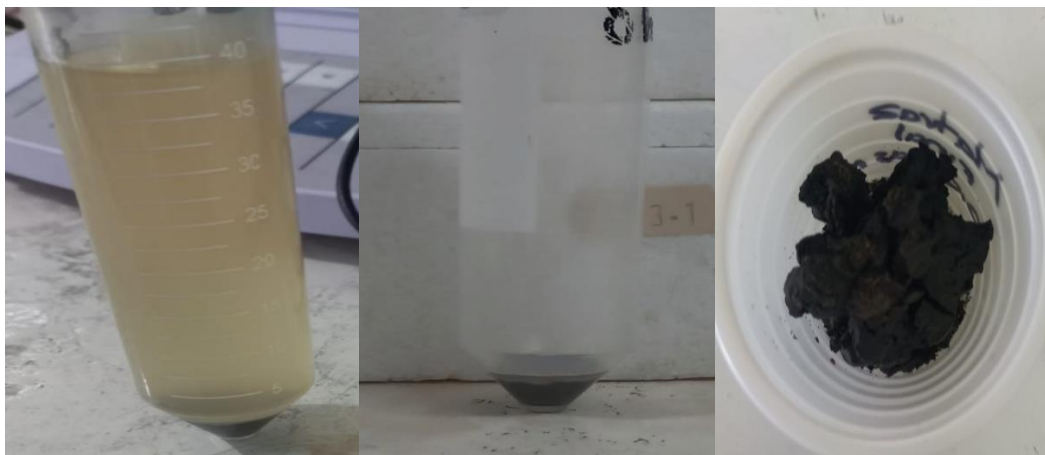


Figura 3.9 Biomasa generada apartir de *Lactobacillus Acidophilus*

3.5 Evaluación de condiciones operativas para la optimización del proceso de fermentación.

Para evaluar las condiciones operativas, se tomó en cuenta los parámetros cinéticos que se presentaron a lo largo de 72 h, evaluando la influencia que estos pueden tener sobre los rendimientos de producción de ácido láctico, así como también el comportamiento microbiológico, destacando que las condiciones óptimas para la producción de ácido láctico y para la supervivencia estable de los lactobacilos, se encuentra en una concentración de sustrato al 15 %, mientras que el pH en el intervalo de 4 a 6.5 y el tiempo de residencia para que los lactobacillus produzcan la mayor cantidad de ácido láctico, se obtuvo entre las 0 a 8 h.

3.6 Modelado matemático para la evaluación del proceso de fermentación láctica

3.6.1 Replicación del proceso en un reactor tipo Bach

Para la aplicación del proceso, se usaron los datos obtenidos anteriormente, y los siguientes parámetros, una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5$, agitación de 120 rpm mediante un agitador magnético y un volumen útil de 0.4 L, se agregó inóculo en proporción 1/10. Con un tiempo de proceso de 72 h.

Se realizaron muestreos cada 2 h en las primeras 24 h de proceso, y posteriormente cada 4 h en las 48 h posteriores al mismo.



Figura 3.10 Reactor tipo batch para fermentación ácido láctico.

3.6.2 Aplicación de la Ecuación de Gompertz para la obtención del Modelo matemático

Todos los valores de los parámetros cinéticos, se determinaron mediante iteraciones en el programa Excel.

Tabla 3.5 Resultados del modelo de Gompertz.

Gompertz	
0	6.89
2	7.08
4	7.21
6	7.31
8	7.39
10	7.44
22	7.56
24	7.57
26	7.57

Continuación de la Tabla 3.5	
34	7.58
48	7.58
58	7.58
72	7.58

Tabla 3.6 Parámetros obtenidos para la ecuación de Gompertz.

Parámetro	Valores
A [Log cel/mL]	7.585
$\mu_{\max}$ [h⁻¹]	1.2420
λ[h]	20.46

Los ajustes presentados en la tabla anterior muestran que el incremento logarítmico de la población es de 7.585 Log cel/mL, mientras que la fase de latencia es alta con un valor de 20.46 h lo cual indica un periodo largo de adaptación del microorganismo al sustrato.

Los resultados del ajuste y mínimos cuadrados se presentan en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7 Evaluación del Modelo de Gompertz.

Evaluación del Modelo de Gompertz	
R²	0.9074
MSE	0.0628

Los parámetros cinéticos presentan un buen ajuste a los datos experimentales obtenidos con un valor de $R^2 = 0.9074$ así mismo alcanzo un valor de tasa de crecimiento específica $\mu_{\max}=1.2420$, y un valor de mínimos cuadrados de 0.0628.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

La caracterización fisicoquímica del residuo de la agroindustria piloncillera presentó un alto contenido en sólidos totales, por lo cual se tenía que realizar una dilución antes de iniciar el proceso fermentativo, para evitar que estos interfieran en el proceso ya que pueden disminuir los niveles de oxígeno disuelto necesarios para la fermentación ácido láctica.

En cuanto a los carbohidratos, que son los principales nutrientes en el proceso fermentativo para la degradación de ácidos orgánicos, aminoácidos, piridinas y pirimidinas, se obtuvo en un intervalo de (21-49.97 g/L) y un contenido de nitrógeno de (1.05 %), por lo que son suficientes para el crecimiento de los lactobacillus.

La cachaza piloncillera tiene potencial para ser empleada en fermentaciones futuras con otros lactobacillus siempre que se cuide sus condiciones de crecimiento, y también tiene propiedades benéficas para los porcinos, en cuanto a nutrición.

Durante el monitoreo del proceso de fermentación, se observó que el mayor crecimiento celular se presentó para la solución de 5 %, donde hubo un incremento de 8.38 a 8.70 log UFC/mL, mientras que la mayor producción de ácido láctico ocurrió en la solución de 15 % con 12.37 g/L. En cuanto al consumo de carbohidratos, éste fue del 85 % para las tres soluciones. Estos resultados muestran que la fermentación láctica es una opción viable para implementarse como una nueva estrategia para el aprovechamiento de los residuos generados en la producción de piloncillo, permitiendo valorizarlos y disminuir su impacto en el medio ambiente.

Los resultados del modelo demuestran un buen ajuste, con la información obtenida de manera experimental, obteniendo una $R^2 = 0.9074$ y alcanzando un valor de 1.242 h^{-1} con el modelo de Gompertz, lo que demostró una tasa de crecimiento específica bastante superior a la obtenida, por Estrada *et al.*, (2023) y demostrando así la viabilidad del proceso.

RECOMENDACIONES

Sería interesante explorar el comportamiento de otros lactobacillus con estos residuos, para observar la producción de ácido láctico en el proceso y si esto favorece su aumento.

Usar el ALM por sí sola no es recomendable ya que carece de los carbohidratos necesarios para llevar a cabo la fermentación.

Cuidar el pH durante el proceso para no mitigar el crecimiento de las bacterias.

ANEXOS

ANEXO A

Cálculos para la determinación de Sólidos Totales y Sólidos Totales Volátiles.

Para realizar el cálculo se usó la siguiente Ecuación 2.1.

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

Donde:

P_1 = Peso del Crisol a peso constante considerado en gramos.

P_2 = Peso de la muestra a evaporar en gramos

P_3 = Peso del crisol + peso del residuo seco en gramos.

La determinación de los STV se realizó mediante la siguiente Ecuación 2.2.

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

Dónde:

P_1 = Peso del crisol a peso constante en gramos.

P_2 = Peso de la muestra considerado en gramos.

P_3 = Peso del crisol a peso constante + muestra seca en gramos.

P_4 = Peso del crisol a peso constante + peso de la muestra calcinada en gramos.

ANEXO B

Para la determinación de proteínas Nitrógeno Kjeldahl, se utilizó la Ecuación 2.3.

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

Dónde:

G = mL gastados en la titulación de ácido sulfúrico.

N = normalidad de la solución en la titulación.

M = peso de la muestra en gramos.

- El valor de 0.014 corresponde a los miliequivalentes de Nitrógeno.

ANEXO C

Cálculos para determinar el rendimiento de ácido láctico mediante la Ecuación 2.4.

$$\text{Ácido láctico } \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right) = \left(\frac{V \cdot N \cdot 90}{M}\right) \quad (2.4)$$

Dónde:

V = Volumen consumido de NaOH en mL.

N = Normalidad del NaOH.

M = Volumen total de la muestra en mL.

ANEXO D

Ecuación de Gompertz para evaluación de proceso en fermentación ácido láctica.

$$\log \left(\frac{N}{N_0} \right) = A \exp \left\{ -\exp \left[\frac{\mu_{max}}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (2.5)$$

Donde:

$\log \left(\frac{N}{N_0} \right)$ = Logaritmo en base 10 de las UFC/mL

t = Tiempo transcurrido (variable dependiente del modelo).

A = Logaritmo en base 10 de la concentración inicial de microorganismos (Log10 UFC/mL).

μ_{max} = Describe la velocidad de crecimiento máxima relativa al tiempo t

λ = Es el tiempo requerido para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento (h).

ANEXO E

ANALISIS ESTADISTICO

Producción de ácido láctico con *L. acidophilus*

Tabla A1. Análisis de Varianza

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Concentración de Cachaza	2	32.063	16.0313	19.00	0.020
Error	3	2.531	0.8437		
Total	5	34.594			

Tabla A2. Comparación de parejas de Fisher

Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Concentraci on de Cachaza	N	Media	Agrupación
15	2	14.63	A
10	2	11.25	B
5	2	9.000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANEXO F

Evaluación de Fermentación Ácido Láctica en un Biorreactor tipo batch.

Para mejorar el proceso de la fermentación ácido láctica, se implementó un reactor tipo batch con las siguientes especificaciones:

Matraz	3 bocas, tapa de 2,4 cuellos
Capacidad	500mL
Abrazadera	Acero inoxidable con apertura PTFE
Junta	24/40
Resiste	Corrosión acida y alcalina
Ra_{int}	7.7 cm
Ra_{exterior}	9.1 cm
h_{int}	10.5 cm
h_{ext}	12 cm
Vchaqueta	292 mL
h_{total}	15.7 cm

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarado, M. Kuglarz, M. Tsapekos, P. y Angelidaki, I. 2021. *Municipal biopulp as substrate for lactic acid production focusing on downstream processing*. Journal of Environmental Chemical Engineering, **9**(2), 105136. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105136>.

Abedi, E., Hashemi, S. M. B. 2020. "Lactic acid production—producing microorganisms and substrates sources-state of art", Heliyon, Vol. 6, No. 10, p. e04974.

Abdel, R, M. S., Tashiro, Y., Sonomoto, K. 2013a. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. Biotechnology Advances, **31**(6), 877-902. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.002>.

Aguiar, S., Enríquez, M. A., Uvidia, H. 2022b. Residuos agroindustriales: su impacto, manejo y aprovechamiento. ResearchGate.
https://www.researchgate.net/publication/366205033_Residuos_agroindustriales_su_impacto_manejo_y_aprovechamiento.

Benavides, M.A, 2019. Aplicación de la fermentación láctica como estrategia de transformación y valorización de matrices vegetales. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental Bogotá D.C., Colombia.

Brahmachari, G. 2016. Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications. Academic Press.

Bintsis, T. 2018. Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. AIMS microbiology, **4**(4), 665-684. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>

Cabrera M, H., Aguilar R, N. 2019 "Competitiveness of the piloncillo agribusiness in the central region of Veracruz", Textual, No. 73, p. 297-329.

Castillo, O, S., López, P, A., Gutiérrez, M., Aguilar, R., Peña, V. 2020. Diseño de un Nuevo controlador no lineal con aplicación de un biorreactor para producción de microalgas. *Research in Computing Science* **149**(10).

Castillo, J.F. 2022. Diseño de un proceso de producción de ácido láctico utilizando bacterias ácido lácticas aisladas del proceso de extracción de sacarosa. Tesis de maestría. Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas.

Castro A. 2022. Técnicas para la biotransformación de residuos agroindustriales y disminución de sus impactos ambientales. Facultad de Ingeniería y Arquitectura. Universidad Católica de Trujillo. Perú.

Condado, M. C. 2022. Evaluación de formación de biopelículas por bacterias ácido lácticas en presencia de fructanos comerciales originarios de agave. Tesis de Maestría. Universidad autónoma del estado de Morelos. México

Coşansu, S. Toupal, S. Aslan, Ö. 2021. *Growth kinetics and survival of Lactobacillus acidophilus in black rice milk. Gida / The Journal Of Food*, 1440–1449. <https://doi.org/10.15237/gida.gd21132>.

Corredor, Y. C. M., y Pérez, L. P. 2018. Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 59-72. <https://doi.org/10.18359/rfcb.3108>.

Chávez M. 2019. La biomasa Fuente alternative de combustible y compuestos químicos, *RSEQ. An. Quim.*, **115**(5), 399-407

Da Silva, S. S., & Chandel, A. K. 2012. D-Xylitol: Fermentative Production, Application and Commercialization. Springer Science & Business Media.

Debernardi H, Ortiz, H., Rosas, D. 2016. Energía disponible a partir de biomasa de residuos de caña de azúcar. *Agroproductividad*, 9(7):68-73.

Duran, M.C. 2022. Aprovechamiento de los subproductos del procesamiento de la caña de azúcar: Bagazo, cachaza, vinazas, metano, polifenoles, aguas residuales tratadas, etc. RD-ICUAP. Año 8. No.23, pp.115-130.

Espinoza, A.M. López, L.M. Casdelo, N.L. 2021. Pretratamientos aplicados a biomasa lignocelulósicas: una revisión de los principales métodos analíticos utilizados para su evaluación. Revista Cubana de Química, vol. 34, núm. 1, pp. 87-110.

Estrada, J. 2021. Determinación de las condiciones de operación y monitoreo reológico y simulación cfd de la bioconversión de *Lactobacillus Acidophilus* de residuos agrocañeros y ganadero porcino. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Orizaba. México.

Estrada, G, J., Méndez, C, J.M., Alvarado, L, A., Hernández, A, E. 2020. Determinación de la hidrodinámica de un lodo porcícola en un reactor anaerobio mediante CFD. Journal CIM. 8(1): 1228-1235.

Fang, J.W. 2020. Caracterización de bacterias ácido lácticas (bal) aisladas de ensilados de piña como microorganismos con potencial probiótico y determinación de su aplicabilidad como cultivo bioprotector en leche agria. Tesis de Maestría. Universidad de Costa Rica. Costa Rica.

Freire, T. T., Silva, A. L. T. E., Ferreira, B., Santos, T. V. D. 2021. Bactérias ácido lácticas suas características e importância: revisão. Research, Society and Development, 10(11), e513101119964. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i11.1996>.

Gallego, A. Pérez, V. María, L. 2021. Estimación de la densidad celular mediante el uso de cámaras de recuento. Universidad Politécnica de Valencia.

García, R., Ríos, L, E., Martínez, Á., Ramos, F. R., Cruz, S, J. S., Del Carmen Cuevas, D, M. 2011. Uso de cachaza y bagazo de caña de azúcar en la remoción de hidrocarburos en suelo contaminado. Revista Internacional De Contaminación Ambiental, 27(1), 31-39. <http://scielo.unam.mx/pdf/rica/v27n1/v27n1a3.pdf>.

Gil, L.A. y león, C.A. 2021. Diseño y construcción de un biorreactor batch tipo tanque agitado y aireado para la producción de proteína unicelular. *Revista de Investigación científica REBIOL* **41**(1):16-22.

Gil, J. G. R. 2017. Characterization of traditional production systems of sugarcane for panela and some prospects for improving their sustainability. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 70(1), 8045-8055. <https://doi.org/10.15446/rfna.v70n1.61763>

Giler, J. M. 2022. Elaboración de bolsas de plástico biodegradable a base del almidón de papa (*Solanum Tuberosum* L.) variedad superchola, espam MFL. Tesis de Ingeniería. Politécnica Agropecuaria de Manabí. Ecuador.

González, A. F. R., Flórez, M. C., López, R. D. 2019. Prospectivas de aprovechamiento de algunos residuos agroindustriales. *Revista Cubana de Química*, 31(1), 31-52. <http://scielo.sld.cu/pdf/ind/v31n1/2224-5421-ind-31-01-31.pdf>

Huillca, E.C. 2021. Diseño del biorreactor a nivel banco para la producción de KÉFIR de leche. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional del Callao/Facultad de Ingeniería Química. Perú.

Huang, J., Wang, J. y Liu, S. 2023. Técnicas avanzadas de fermentación para la producción de ácido láctico a partir de residuos agrícolas. *Fermentation*, **9**(8), 765; <https://doi.org/10.3390/fermentation9080765>.

Jamez, M. Velastegui, E. y Cruz, A. 2017. Evaluación de las condiciones de cultivo de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* a nivel de laboratorio, con inulina como fuente de carbono. *Revista Biotanura*. **2**(1): 235-240.

Jimenez, R. Valdés, S. E. y Olalde, V. 2017. Effect of pH and temperature on the growth and antagonistic activity of *Bacillus subtilis* on *Rhizoctonia solani*. *Revista mexicana de fitopatología*. **36**(2): 256-27.

Li, W., Zhang, Y., Li, H., Luo, Y., Zhang, J., Uddin, J., Liu, X. 2020. Effect of soybean oligopeptide on the growth and metabolism of *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132. *RSC Advances*, 10(28), 16737-16748. <https://doi.org/10.1039/d0ra01632b>.

López, M, J., Adriano, A, L., Gálvez, L, D., Vázquez, O, A. 2023. Compuestos bioactivos en quesos: biosíntesis, actividad biológica y contribución de las bacterias ácido lácticas. *Agronomía mesoamericana*, 51432. <https://doi.org/10.15517/am.v34i2.51432>.

Martínez, M. Pardo, V. y Riveros, H. 2018. *Bioquímica de Laguna y Piña. El manual moderno*. México.

Martinez, E. Muñiz, D. B. De la Rosa, M. y Aguilar, P. 2019. Estudio de factores que influyen en la producción de piloncillo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) empleando un diseño de Plackett Burman. *Revista Multidisciplinary Scientific Journal*. **29**(1): 1-11.

Madrigal, G. B. 2019. Influencia de la dilución sobre la digestión anaerobia de la Cachaza, residuo producido en la agroindustria panelera de Colombia. Tesis de Ingeniería. Universidad Peruana unión. Perú.

Mathur, H. Beresford, T. Cotter P. 2020. Health Benefits of Lactic Acid Bacteria (LAB) Fermentates. Food for Health Ireland. Teagasc Food Research Centre, Moorepark, Fermoy, P61 C996 Co. Cork, Ireland.

Mendieta, O., Castro, L., Rodríguez, J., & Escalante, H. (2020a). Synergistic effect of sugarcane scum as an accelerant co-substrate on anaerobic co-digestion with agricultural crop residues from non-centrifugal cane sugar agribusiness sector. *Bioresource technology*, 303, 122957. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122957>

Mendieta, O., Madrigal, G., Castro, L., Rodríguez, J., & Escalante, H. (2020b). Sugarcane scum as a novel substrate for rapid biogas production from the non-centrifugal cane sugar agribusiness sector in developing countries. *Bioresource Technology*, 297, 122364. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122364>

Mera, G., Reinozo, P., Gómez, Y., Riera, M. 2022. Diseño de un biorreactor tipo batch para la producción de ácido láctico. *Revista Arbitraria venezolana. Impacto Científico*. Volumen 17. Número 1.pp. 197-211

Molina A. 2018. Probióticos y su mecanismo de acción en alimentación animal. *Agronomía Mesoamericana*, vol. 30, núm. 2, pp. 601-611, 2019. <https://doi.org/10.15517/am.v30i2.34432>

Muñoz, D. Cuatín, M. y Pantoja, A. 2013. Potencial energético de residuos agroindustriales del departamento del Cauca, a partir del poder calorífico inferior. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(2): 56 -163.

Parvaneh, J., y Tajabadi, E, M. 2011.Lactobacillus acidophilus cell structure and aplication. *African Journal of microbiology research*, vol 5(24), pp. 4033-4042. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.630>.

Quintero, J.E. Acosta, A. Megia, C. Rios, R. y Torres, A.N. 2012. Lactic acid production vía cassava-flourhydrolysate fermentation. *Revista facultad de química farmacéutica*. **19**(3): 287-293.

Rawoof, S. A. A., Kumar, P. S., Jang, H. W., Devaraj, K., Mani, Y., Devaraj, T., & Sivanesan, S. 2021. Production of optically pure lactic acid by microbial fermentation: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(1), 539-556. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01083-w>.

Reygaert, W.C. 2018. Una visión general de los mecanismos de resistencia antimicrobiana de las bacterias[J]. *AIMS Microbiology*, 4(3): 482-501. doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482

Rocafuerte, I. J. 2022. Desarrollo del proceso de bioconversión de los residuos provenientes de café (coffea arabica) mediante la acción anaerobia fermentativa de lactobacilo (*bacillus subtilis*). Tesis de maestría. Instituto Tecnológico Nacional De México. Orizaba.

Romero, D.I. Méndez, J.M. Alvarado, A. y Vallejo, N.A. 2017a. Acción fermentativa de *Lactobacillus: acidophilus, fermentum* y *reuteri* en la bioconversión de sustratos orgánicos. Journal CIM. **5**(2): 1380-1385.

Romero, M, D.I., Estrada G, J., Alvarado, L, A. 2023b. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* durante el proceso de biotransformación anaeróbica de residuos de caña de azúcar agrícola. Valorización de Biomasa y Residuos. <https://doi.org/10.1007/s12649-023-02100-z>

Sanchez, N. Ruiz, R. Infante, N. y Cobo, M. 2017. *Bioethanol production from Cachaza as hydrogen feedstock: Effect of ammonium sulfate during fermentation. Energies*, **10**(12), 2112. <https://doi.org/10.3390/en10122112>

Sánchez, Ó. J. Barragán, P. J. y Serna, L. 2019. *Review of Lactobacillus in the food industry and their culture media*. Revista colombiana de biotecnología, **21**(2),63–76

Sanchez, N. Ruiz, R. Plazas, A. Vásquez, J. y Cobo, M. 2020. *Effect of pretreatment on the ethanol and fusel alcohol production during fermentation of sugarcane press mud*. Biochemical Engineering Journal, **161** (107668), 107668. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107668>

Saval, S.2012 Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. Biotecnología, 16(2). http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2012_2/Saval_Residuosagroindustriales.pdf

Shuler, M.L. Kargi, F. Lisa, M. 2002. Bioprocess Engineering Basic Concepts. Prentice Hall. Nueva York.

Vargas, Y.A. Pérez, L.I. 2017. Aprovechamiento de residuos agroindustriales para el mejoramiento de la calidad del ambiente. Revista Facultad de Ciencias Básicas. Vol. 14 (1) 2018, 59-72. <http://dx.doi.org/10.18359/rfcb.3108>.

Velasco, J. Gómez, F.C. Hernández, A.S. Salinas, J. Guerrero, A. 2017. Organic residues from the sugar cane agroindustry: challenges and opportunities. *Agroproductividad*: Vol. 10, Núm. 11, pp: 99-104.

Wade, M., Harmand, J., Benyahia, B., Bouchez, T., Chaillou, S., Cloez, B., Godon, J., Lobry, C., Boubjemaa, B. M., Rapaport, A., Sari, T., & Arditi, R. 2016. Perspectives in mathematical modelling for microbial ecology. *Ecological Modelling*, 321, 64-74. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2015.11.002>.

Yanez, H. K. 2021. Influencia de la dilución sobre la digestión anaerobia de la Cachaza, residuo producido en la agroindustria panelera de Colombia Evaluación de lactosuero como medio de cultivo para la producción de biomasa de bacterias ácido lácticas (BAL) nativas de leche bovina cruda proveniente de haciendas ganaderas de Paschoa, Pichincha, Ecuador. Tesis de Ingeniería. Universidad Fuerzas armadas. Ecuador.

Yafetto, L. Tawia, G. Wiafe, M. 2023 Valorization of agro-industrial wastes into animal feed through microbial fermentation: A review of the global and Ghanaian case. a Department of Molecular Biology and Biotechnology, School of Biological Sciences, College of Agriculture and Natural Sciences, University of Cape Coast, Ghana. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14814>

Zambrano, M.A. 2017. Formación de un complejo enzimático lignocelulolítico a partir de hongos de pudrición de la madera para hidrolizar paja de trigo. Santiago de Chile. Tesis de Maestría. Universidad de Chile.

Zapaśnik, A., Sokołowska, B., Bryła, M. 2022. Role of Lactic Acid Bacteria in Food Preservation and Safety. *Foods*, 11.