

Evaluación de la actividad celulolítica de bacterias del género *Bacillus* y su aplicación en la degradación de residuos agroindustriales

Lizeth Natalia González Grandas y Jose Daniel Meiser Liévano

Trabajo de Grado para optar el Título de Ingeniero Químico

Directora

Viviana Sánchez Torres

Ph.D. en Ingeniería Química

Codirector

Jorge Luis Fuentes Lorenzo

Doctor en Ciencias Agrícolas

Tutor

Edgar Ricardo Oviedo Ocaña

Doctor en Ingeniería, Énfasis Ingeniería Sanitaria y Ambiental

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2026

**Dedicatoria**

*Primeramente, a Dios por darme la capacidad de realizar este trabajo y llevarme por este camino.*

*A mis padres Silvia y Jose Daniel por darme la vida y dar de sí todo lo posible para poder crecer y realizar mis sueños, no me alcanzara la vida para pagarles el amor que me han dado.*

*A mi hermano Jose Gabriel por su apoyo, respaldo y ser mi compañero en muchos proyectos que hemos llevado juntos, que siga por ese muy buen camino y que el futuro le recompense ese talento y dedicación.*

*A Pedro Ramírez y Diego Torres por inculcarme el gusto por la matemática y la ciencia, sin ellos nunca hubiese querido estudiar una carrera como esta.*

*Y a cada persona familiares y amigos que han aportado y dado su granito de arena para poder culminar este proceso.*

***Jose Daniel Meiser Lievano.***

*Desde que era una niña, mis padres me han apoyado incondicionalmente y han sido siempre un gran ejemplo para mí, demostrando que todo es posible cuando se tiene claridad en los objetivos y perseverancia para alcanzarlos.*

*Mi padre, **Eduardo González**, es un hombre que no ve problemas, sino soluciones. Su ingenio, admirable en todo sentido, ha sido una fuente constante de inspiración a lo largo de estos años, impulsando en mí un espíritu independiente y la convicción de que nada es imposible.*

*Mi madre, **Nancy Grandas**, es una mujer a la que nada le queda grande. Su determinación incansable y su carácter firme han sido fundamentales en mi formación personal, enseñándome a enfrentar los desafíos con mayor valentía.*

*Por todo esto, es un gran honor dedicar este logro a ellos. Su esfuerzo, sacrificio y amor durante estos 24 años han sido el pilar que me ha permitido llegar hasta aquí.*

*Con amor,*

**Lizeth Natalia González Grandas**

### **Agradecimientos**

*A la escuela de ingeniería química y la Universidad industrial de Santander por la formación académica.*

*A la profesora Viviana Sánchez Torres por su apoyo, orientación, paciencia, dedicación y disposición de material en todo el proceso de realizar este proyecto.*

*Al profesor Jorge Luis Fuentes por su instrucción, disposición de material y espacio de trabajo para nuestra capacitación en las técnicas de trabajo en microbiología.*

*A Diego Villamizar perteneciente al grupo LMAA por su orientación, paciencia y disposición para nuestra formación en las técnicas de trabajo en microbiología.*

*A Angelica Angarita perteneciente al grupo GIMBA por su guía, orientación y experiencia para el buen desempeño de este trabajo.*

*A la profesora Lilia Carolina Rojas por su guía y orientación en la técnica de DNS parte fundamental de este trabajo.*

*Al laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental de la Universidad Industrial de Santander (LMMA-UIS) y cada uno de sus miembros por el apoyo, el buen trato y recibimiento durante el proceso de formación en las técnicas de microbiología.*

*Al grupo de investigación en minerales, biohidrometalurgia y ambiente (GIMBA) y cada uno de sus miembros por el apoyo, el buen trato y disposición de espacio y equipos para la realización de este trabajo.*

*Y a cada una de las personas que de una u otra manera apoyaron la realización de este trabajo.*

**Tabla de contenido**

Introducción .....	12
1. Objetivos .....	14
1.1. Objetivo general.....	14
1.2. Objetivos específicos .....	14
2. Marco conceptual.....	15
2.1. lignocelulosa .....	15
3. Estado del arte.....	16
4. Metodología .....	18
4.1. Reactivación y acondicionamiento de las cepas bacterianas .....	18
4.2. Caracterización cualitativa de la actividad celulolítica.....	19
4.3. Caracterización cuantitativa de la actividad celulolítica.....	20
4.3.1. Sustratos celulósicos comerciales .....	20
4.3.2. Residuos agroindustriales .....	21
4.4. Análisis estadístico de los datos.....	22
5.1 Viabilidad de las cepas.....	22
5.2 Cuantificación de la actividad enzimática .....	24
5.2.1 Halos de hidrólisis.....	24
5.2.2 Caracterización cuantitativa.....	26
5.2.3 Actividad en residuos lignocelulósicos.....	29
6 Conclusiones .....	31
Referencias Bibliográficas .....	33

Apéndices.....35

**Lista de figuras**

<b>Figura 1.</b> Crecimiento bacteriano representativo de la cepa UIS-121 en medio de crecimiento complejo tras 48 horas de incubación.....	23
<b>Figura 2.</b> Morfología colonial representativa de la cepa UIS-121 observada bajo estereoscopio.....	23
<b>Figura 3.</b> Tinción de Gram representativa de la cepa UIS-132, evidenciando bacilos Gram positivos con presencia de endosporas.....	24
<b>Figura 4.</b> Formación de halos de hidrólisis por la cepa UIS-122. a) Crecimiento de la colonia bacteriana antes de la prueba (0.6 cm de diámetro). b) Halo de hidrólisis observado después de la prueba (2.5 cm de diámetro).....	25
<b>Figura 5.</b> Curva de calibración de glucosa para pruebas de cuantificación de azúcares reductores por DNS.....	27
<b>Figura 6.</b> Actividad celulolítica sobre diferentes sustratos en las cepas UIS122, UIS132, UIS1244 (control) y UIS1245 (control) con CMC y Avicel.....	28
<b>Figura 7.</b> Liberación de glucosa sobre cáscara de cacao.....	30
<b>Figura 8.</b> Liberación de glucosa en semillas de açaí.....	31

**Lista de tablas**

<b>Tabla 1.</b> Microorganismos por enzima y sustrato.....	17
<b>Tabla 2.</b> Prueba de actividad celulolítica con halos de hidrólisis.....	26
<b>Tabla 3.</b> Densidad óptica (D.O.) luego de 72 horas de reacción de las cepas en medio líquido.	27

**Apéndices**

<b>Apéndice A.</b> Protocolos para la preparación de medios de cultivo.....	35
<b>Apéndice B.</b> Protocolos para la esterilización de materiales de laboratorio. ....	38
<b>Apéndice C.</b> Protocolos para la reactivación y conservación de cepas bacterianas. ....	40
<b>Apéndice D.</b> Registro fotográfico del ensayo del halo de hidrólisis en cepas bacterianas evaluadas.....	44
<b>Apéndice E.</b> Protocolo de medición de la actividad celulolítica mediante la cuantificación de azúcares reductores con el reactivo DNS.....	45
<b>Apéndice F.</b> Tratamiento estadístico de los datos experimentales e imágenes de los halos de hidrólisis.....	51

### Resumen

**Título:** Evaluación de la actividad celulolítica de bacterias del género *Bacillus* y su aplicación en la degradación de residuos agroindustriales\*

**Autores:** Lizeth Natalia González Grandas, Jose Daniel Meiser Liévano\*\*

**Palabras Clave:** *Bacillus*, lignocelulosa, celulosa, degradación.

**Descripción:** Los procesos agroindustriales generan grandes volúmenes de residuos lignocelulósicos que pueden ser aprovechados como materia prima en otros procesos. La degradación de este material puede realizarse mediante diferentes estrategias, entre ellas el uso de microorganismos capaces de producir enzimas hidrolíticas. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la actividad celulolítica de bacterias del género *Bacillus* y su capacidad para degradar residuos lignocelulósicos. Las cepas evaluadas pertenecen al cepario del Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental de la Universidad Industrial de Santander (cepario LMMA-UIS) y fueron sometidas a pruebas de viabilidad y pureza para verificar su pertenencia al género *Bacillus*. La actividad celulolítica se evaluó de forma cualitativa mediante el ensayo de halo de hidrólisis calculando el coeficiente de hidrólisis (HC) como relación entre el diámetro del halo y el de la colonia. Posteriormente la actividad celulolítica se determinó de forma cuantitativa mediante la cuantificación de azúcares reductores utilizando el método del ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS). Las pruebas cuantitativas se realizaron utilizando sustratos comerciales tales como carboximetilcelulosa (CMC) y celulosa cristalina (Avicel), así como también se utilizó residuos agroindustriales de cáscara de cacao y semillas de açai. Los resultados evidenciaron diferencias en el desempeño de las cepas frente a los distintos sustratos. Las cepas UIS122, UIS126 y UIS134 mostraron los mayores valores de actividad celulolítica sobre sustratos comerciales, mientras que la cepa UIS-122 mostró la mayor liberación de azúcares reductores a partir de residuos agroindustriales (0.604 mg/mL en el cacao y 0.275 mg/mL en la semilla de açai en 2 horas de reacción). Adicionalmente, los ensayos cualitativos evidenciaron la formación de halos de hidrólisis en las cepas con mayor desempeño, lo cual fue consistente con los resultados obtenidos mediante el método DNS.

---

\* Proyecto de Grado. Modalidad de investigación.

\*\* Facultad de ingenierías Físicoquímicas. Escuela de ingeniería Química. Directora: Viviana Sánchez Torres. Ingeniera Química, PhD. Codirector: Jorge Luis Fuentes Lorenzo. Doctor en ciencias agrícolas PhD. Tutor: Edgar Ricardo Oviedo Ocaña. Ingeniero Sanitario, MSc, PhD.

### Abstract

**Title:** Evaluation of the cellulolytic activity of bacteria of the genus *Bacillus* and their application in the degradation of agro-industrial residues\*

**Author:** Lizeth Natalia González Grandas, Jose Daniel Meiser Liévano\*\*

**Key Words:** *Bacillus*, lignocellulose, cellulase, degradation.

**Description:** Agro-industrial processes generate large volumes of lignocellulosic residues that can be utilized as raw material in other processes. The degradation of this material can be carried out through different strategies, including the use of microorganisms capable of producing hydrolytic enzymes. The objective of this study was to evaluate the cellulolytic activity of bacteria belonging to the genus *Bacillus* and their capacity to degrade lignocellulosic residues. The evaluated strains belong to the strain collection of the Laboratory of Microbiology and Environmental Mutagenesis at the Universidad Industrial de Santander (LMMA-UIS collection) and were subjected to viability and purity tests to verify their classification within the genus *Bacillus*. Cellulolytic activity was qualitatively assessed using the hydrolysis halo assay, calculating the hydrolysis coefficient (HC) as the ratio between the halo diameter and the colony diameter. Subsequently, cellulolytic activity was quantitatively determined by measuring reducing sugars using the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method. Quantitative tests were performed using commercial substrates such as carboxymethyl cellulose (CMC) and crystalline cellulose (Avicel), as well as agro-industrial residues including cocoa husk and açai seeds. The results showed differences in strain performance depending on the substrate. Strains UIS122, UIS126, and UIS134 exhibited the highest cellulolytic activity values on commercial substrates, while strain UIS122 showed the highest release of reducing sugars from agro-industrial residues (0.604 mg/mL in cocoa husk and 0.275 mg/mL in açai seed after 2 hours of reaction). Additionally, qualitative assays demonstrated the formation of hydrolysis halos in the best-performing strains, which was consistent with the results obtained using the DNS method.

---

\* Undergraduate Thesis. Research modality.

\*\* Facultad de ingenierías Físicoquímicas. Escuela de ingeniería Química. Directora: Viviana Sánchez Torres. Ingeniera Química, PhD. Codirector: Jorge Luis Fuentes Lorenzo. Doctor en ciencias agrícolas PhD. Tutor: Edgar Ricardo Oviedo Ocaña. Ingeniero Sanitario, MSc, PhD.

## Introducción

Actualmente la generación de residuos agroindustriales ha aumentado significativamente debido al crecimiento del sector, convirtiéndose en un desafío tanto ambiental como productivo. Estos residuos están compuestos principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, cuya estructura compleja dificulta su degradación natural. Por ende, su mala gestión genera impactos negativos en el medio ambiente, lo que ha impulsado la búsqueda de alternativas sostenibles para su valorización.

En el marco de los Objetivos de Desarrollo Sostenible, específicamente el ODS 9 se fomenta el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan un mejor aprovechamiento de residuos y subproductos, al tiempo que se minimiza el impacto ambiental (*Infraestructura - Desarrollo Sostenible*, n.d.). En este contexto los procesos biotecnológicos basados en el uso de microorganismos y enzimas son una alternativa viable para la transformación de estos residuos en productos de valor agregado como azúcares fermentables, biocombustibles y enzimas. (Kukreti et al., 2024)

Existen tres tipos de enzimas lignocelulósicas, llamadas celulasas, hemicelulasas y ligninasas. De estas las celulasas son las de mayor interés en estas aplicaciones biotecnológicas, ya que desempeñan un papel clave en la hidrólisis de la celulosa al catalizar la ruptura de los enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos, permitiendo la liberación de azúcares reductores (Ilić et al., 2023). No obstante, para tener resultados positivos en su aplicación, es necesario evaluar su actividad enzimática y caracterizar las condiciones que favorezcan su desempeño catalítico. En cuanto a los microorganismos productores de esta enzima destacan particularmente las bacterias del género *Bacillus* debido a su versatilidad metabólica, facilidad de cultivo y alta reproducibilidad (Outtrup & Jørgensen, 2008).

Si bien existen diversas investigaciones sobre la capacidad del género *Bacillus* para degradar material lignocelulósico, es necesario profundizar en la evaluación de cepas nativas cuyas capacidades enzimáticas no han sido estudiadas, como aquellas conservadas en el cepario del Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental de la Universidad Industrial de Santander (cepario LMMA-UIS). Para llevar a cabo esta caracterización es fundamental hacer uso de técnicas cualitativas como el ensayo del halo de hidrólisis y cuantitativas, como el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), las cuales permiten identificar los microorganismos con mayor potencial biotecnológico para el aprovechamiento de residuos agroindustriales (Hossain et al., 2021).

## 1. Objetivos

### 1.1. Objetivo general

Evaluar la actividad celulolítica de bacterias del género *Bacillus* y su aplicación en la degradación de residuos agroindustriales, mediante pruebas cualitativas y cuantitativas.

### 1.2. Objetivos específicos

Establecer protocolos experimentales para los procedimientos desarrollados durante la investigación, con el fin de generar una base metodológica que facilite la continuidad de la línea de investigación en el grupo Gimba.

Determinar preliminarmente el potencial de producción de celulasa de cepas del género *Bacillus* mediante ensayos en medios sólidos, comparado los halos de hidrólisis usando carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato.

Caracterizar la actividad enzimática de las cepas seleccionadas en cultivos líquidos, mediante la cuantificación de azúcares reductores con DNS usando diversas formas de celulosa.

Determinar el potencial de las cepas con mayor actividad enzimática de liberar azúcares reductores a partir de residuos agroindustriales lignocelulósicos.

## 2. Marco conceptual

Existe una gran variedad de residuos agroindustriales, teniendo como característica común la presencia de materia orgánica en su composición, sin embargo, el material compuesto principalmente por celulosa, lignina, hemicelulosa y pectina son considerados residuos lignocelulósicos (Oviedo Chávez & Vinueza Galárraga, 2020).

### 2.1. Lignocelulosa

La lignocelulosa es un biomaterial complejo que representa un tercio de los tejidos vegetales y se puede regenerar con fotosíntesis (LABRADOR & OSTO, n.d.). Su composición química varía dependiendo del material, en el caso de los tallos de madera blanda tiene una composición de 25 a 35% de lignina, 25 a 35% de hemicelulosa y 45 a 50% de celulosa (Sánchez, 2009).

El material lignocelulósico es comúnmente degradado por medio de procesos de hidrólisis ácida o tratamiento térmico; siendo estos ineficientes debido al costo y al impacto ambiental colateral. Además, los métodos más modernos como el uso de fluidos supercríticos necesitan alta presión, aumentando la demanda energética (Yiasmin et al., 2021). Como alternativa a estos métodos, existe la biodegradación, considerada renovable, amigable con el medio ambiente y económicamente viable, consistiendo en la remoción de la lignina y modificación de la estructura de la celulosa de la biomasa facilitando la conversión enzimática (Prasongsuk et al., 2022). Este proceso puede ser generado por hongos, bacterias o enzimas encargadas de la degradación del material. Entre los géneros que se ha visto este comportamiento se encuentran *Pseudomonas sp*, *Cellulomonas*, *Cellvibrio*, *Micrococcus* y *Bacillus*. De estos, el género *Bacillus* ha sido ampliamente estudiado debido a su alta capacidad para producir enzimas extracelulares, su estabilidad en condiciones variables de pH y temperatura, y su potencial aplicación en procesos biotecnológicos e industriales. Por esta

razón, el presente estudio se centra en la evaluación de cepas del género *Bacillus* con énfasis en la producción de enzimas celulolíticas.

La celulosa es un biopolímero lineal de unidades de glucopiranososa D- anhidrido unidos entre sí por enlaces  $\beta$ -1,4- glicosídicos. Estas moléculas tienden a formar puentes de hidrógeno intramoleculares a los que se le atribuye la rigidez de la cadena y también puentes intermoleculares responsable de formar la fibra vegetal. Estas fibras se pueden encontrar unidas entre sí formando una estructura con un arreglo similar al cristal, o de manera desordenada teniendo un comportamiento amorfo, siendo estas últimas más susceptibles a la degradación que la zona cristalina (LABRADOR & OSTO, n.d.).

### 3. Estado del arte

Las enzimas son catalizadores biológicos producidos por diferentes microorganismos que desempeñan un papel importante en procesos industriales gracias a su alta especificidad y eficiencia catalítica (Robinson, 2015). La evaluación de su desempeño se realiza comúnmente mediante el seguimiento del consumo de sustrato o la formación de productos de interés, lo que permite determinar su actividad y establecer condiciones óptimas de operación. El uso de materiales lignocelulósicos en procesos como el compostaje ha sido un reto ya que los compuestos recalcitrantes presentes dificultan la acción de los microorganismos degradadores aumentando el tiempo de producción y generando un producto de menor calidad (Ashokkumar et al., 2022). Sin embargo, existen estudios que han demostrado que la presencia de un inóculo bacteriano con actividad celulolítica incrementa la degradación de la lignocelulosa hasta 1.6 veces en comparación con un control sin inóculo, durante el compostaje de residuos verdes. Estos estudios concluyen que la adición de desechos de comida y roca fosfórica compensa el déficit de nutrientes, acelerando la degradación del material lignocelulósico por los microorganismos (Soto-Paz et al., 2022a).

En la Tabla 1 se reportan trabajos que estudian bacterias degradadoras de materiales lignocelulósicos, donde predomina el género *Bacillus*. Este género es conocido por ser la fuente principal de la mayoría de las enzimas industriales (Outtrup & Jørgensen, 2008), y en algunos casos cuenta con certificados de Generally Recognized As Safe (GRAS) como ocurre con la *Bacillus subtilis* PLSSC (Heimbach, n.d.) que produce las enzimas celulasa, xilasa y lacasa. La celulasa en presencia de material lignocelulósico hidroliza los enlaces  $\beta$ -glucosídicos de la celulosa (Ilić et al., 2023). La xilanasa se enfoca en la cadena principal 1,4  $\beta$ -D-xilano (Walia et al., 2017) mientras que la lacasa se enfoca en oxidar la lignina descomponiéndola en moléculas más pequeñas (Tiwari et al., 2023).

**Tabla 1**

*Microrganismos por enzima y sustrato.*

<b>Microrganismo</b>	<b>Enzima</b>	<b>Sustrato</b>	<b>Referencia</b>
<i>Bacillus pumilus</i>	Celulasa	Cáscara de plátano, bagazo de caña	(Camacho et al., 2021)
<i>Bacillus cereus</i>	Celulasa	CMC	(Chantarasiri, 2015)
<i>Bacillus</i>	Celulasa	CMC	(Maki et al., 2011)
<i>Bacillus spp</i>	Celulasa	CMC	(Hossain et al., 2021)
<i>Pseudomonas ssp</i>	Celulasa	CMC	(Hossain et al., 2021)
<i>klebsiella spp</i>	Celulasa	CMC	(Hossain et al., 2021)
<i>Bacillus subtilis</i>	Lacasa		(Chauhan et al., 2017)
<i>Bacillus spp</i>	Lacasa	Maltosa, galactosa	(Shukur, 2015)
<i>Pseudomonas spp</i>	Xilanasa	CMC	(Gong et al., 2017)
<i>Streptomyces griseorubens</i>	Xilanasa	CMC	(Gong et al., 2017)
<i>Bacilus arybhatai</i>	Xilanasa	CMC	(Gong et al., 2017)

Además, se han desarrollado diversas técnicas experimentales para la determinación de la producción de celulasas por microorganismos. Entre las más utilizadas se encuentra el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), el cual permite cuantificar los azúcares reductores liberados durante la hidrólisis del material lignocelulósico (Hossain et al., 2021).

De manera complementaria, la prueba del halo de hidrólisis es una técnica ampliamente utilizada para la identificación visual y cuantitativa de la actividad enzimática en medios sólidos. Mediante este método se han reportado relaciones entre el diámetro del halo de hidrólisis y el diámetro de la colonia con valores comprendidos entre 2.3 y 3.5, lo que indica una actividad celulolítica significativa (Li et al., 2023a).

#### **4. Metodología**

El desarrollo experimental se llevó a cabo utilizando 17 cepas bacterianas del género *Bacillus* donde 2 correspondieron a cepas de control previamente identificadas como productoras de celulasas UIS1244 y UIS1245 (Soto-Paz et al., 2022b), empleadas como referencia para la comparación de la actividad celulolítica, mientras que las quince restantes correspondieron a cepas no caracterizadas, identificadas con los códigos UIS121 a UIS135.

##### **4.1. Reactivación y acondicionamiento de las cepas bacterianas**

Las cepas bacterianas conservadas en el cepario del Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental de la Universidad Industrial de Santander (cepario LMMA-UIS) identificadas con los códigos UIS121 hasta UIS135, fueron inoculadas en medios de crecimiento líquido Reinforced Clostridial Medium (RCM), se realizó una siembra por agotamiento en estrías sobre medios sólidos RCM siguiendo el protocolo del apéndice A y la metodología de esterilización del apéndice B con el fin de obtener colonias aisladas durante 48 horas a 37 °C. Estas colonias se sometieron a una tinción de Gram y observación microscópica para confirmar la pertenencia al género *Bacillus* verificando la morfología y la ausencia de contaminantes según la aprobación del director del cepario. Una vez validadas, las colonias puras se cultivaron mediante siembra por extensión para aumentar la biomasa bacteriana. Finalmente, las cepas se conservaron en zeolita estéril como método de conservación a largo plazo con el procedimiento explicado a detalle en el apéndice C.

Una vez finalizada la reactivación de las cepas se realizó el acondicionamiento para las caracterizaciones posteriores. Para ello se utilizaron dos crioviales por cada cepa para tener réplicas independientes. Cada criovial se inoculó por separado en 7 mL de medio líquido de cultivo estéril, con composición (%p/v): 0.4% NaNO<sub>3</sub>, 0.1% KHPO<sub>4</sub>, 0.05% MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, 0.05% KCl, 1% CMC, 0.5% peptona y 0.3% extracto de levadura. Los cultivos se incubaron durante 72 horas a 37 °C.

Posteriormente se realizó una nueva siembra por estría y agotamiento en placas de medios sólido con agar al 1.7 % (p/v) y se seleccionó una colonia representativa por cepa para continuar con los ensayos experimentales.

#### **4.2. Caracterización cualitativa de la actividad celulolítica**

La caracterización cualitativa de la actividad celulolítica se llevó a cabo mediante el ensayo del halo de hidrólisis utilizando carboximetilcelulosa (CMC) como fuente de carbono. Se tomó una colonia seleccionada utilizando la punta de un palillo de madera estéril y se inoculó en el centro de las placas de agar. La composición (%p/v) del medio fue: 0.2% NaNO<sub>3</sub>, 0.34% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.56% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.085% MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, 0.05% KCl, 0.5% CMC, 0.05% extracto de levadura y 1.7% agar. Para cada cepa se realizaron tres réplicas del ensayo. Las placas fueron incubadas durante 48 horas a 37 °C.

Transcurrido el tiempo de incubación las placas se sometieron a tinción con aproximadamente 5 mL de Lugol (0,32% yodo sublimado y 0,65% yoduro potásico en agua destilada) de manera que toda la superficie quedara cubierta durante 5 minutos (Soto-Paz et al., 2022b). Pasado el tiempo se retiró el exceso de colorante, se tomó registro fotográfico de cada placa y se midió tanto el diámetro de la colonia como el diámetro del halo de hidrólisis formados alrededor de esta, el registro fotográfico se encuentra en el apéndice F.

A partir de las medidas obtenidas se calculó el índice de hidrólisis (HC) dado por la división del diámetro del halo de hidrólisis (cm) entre el diámetro de la colonia (cm), el cual se utilizó como criterio para evaluar la actividad celulolítica (Hossain et al., 2021). Los valores obtenidos fueron comparados con los de las cepas de control y aquellas cepas que mostraron índices menores a 3 fueron descartadas de las etapas experimentales posteriores.

#### **4.3. Caracterización cuantitativa de la actividad celulolítica**

Las cepas seleccionadas a partir de la caracterización cualitativa fueron sometidas a ensayos cuantitativos de actividad celulolítica mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Hossain et al., 2021). Para ello, se prepararon dos cultivos por cepa a partir de una colonia individual con un volumen de 10 mL cada uno del medio de cultivo empleado en la caracterización cualitativa, pero sin agar. Los cultivos se incubaron durante 72 horas a 37 °C y 200 rpm con el objetivo de permitir tanto el crecimiento como la producción de enzimas extracelulares. El crecimiento microbiano se verificó mediante la medición de la densidad óptica (D.O.) de los cultivos a través de un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-VIS (Thermo Scientific, USA) a una longitud de onda de 600 nm.

Posteriormente, los cultivos fueron centrifugados en una microcentrífuga PRISM™ (Labnet, USA) a 1200 rpm durante 20 min y se recuperó el sobrenadante, el cual fue utilizado como fuente enzimática para los ensayos.

##### **4.3.1. Sustratos celulósicos comerciales**

La actividad celulolítica se evaluó empleando dos sustratos celulósicos comerciales: carboximetilcelulosa (CMC) y la celulosa microcristalina (Avicel). Para cada sustrato se prepararon tubos de ensayo que contenían 0.25 g de CMC o Avicel, a los cuales se les adicionó 1 mL de buffer de acetato de sodio (50 mM, pH 4.8) para el control del pH de la reacción.

Para cada enzima obtenida, se prepararon ensayos por triplicado. Antes de la adición de la enzima los tubos se precalentaron a 50 °C y 100 rpm durante 10 minutos, con el fin de facilitar la acción enzimática. Posteriormente se agregó la enzima correspondiente y las mezclas se incubaron durante 1 hora a 50 °C y 100 rpm.

Finalizado el tiempo de incubación se realizó el ensayo con el reactivo DNS. Para ello se tomó 1 mL de la solución y se adicionaron 1 mL de buffer de acetato de sodio y 2 mL del reactivo DNS (Li et al., 2023b). La mezcla se homogeneizó y se calentó durante 5 minutos en baño maría a 100 °C para el desarrollo de la reacción. Posteriormente las mezclas se enfriaron abruptamente en agua con hielo con el fin de detener la reacción y proceder al análisis de la absorbancia en un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-VIS (Thermo Scientific, USA) a una longitud de onda de 540 nm.

A partir de los valores de los azúcares liberados calculados con las absorbancias y una curva de calibración de glucosa realizada previamente se descartaron aquellas cepas que no destacaron en comparación con las cepas de control. El procedimiento, se detallan en el Apéndice D.

#### **4.3.2. Residuos agroindustriales**

En el caso de los residuos agroindustriales, el procedimiento fue similar al empleado para los sustratos celulósicos comerciales con algunas modificaciones. Los residuos utilizados fueron cáscara de cacao y semillas de açai, los cuales fueron previamente sometidos a procesos de secado y trituración hasta un tamaño de partícula entre 1 y 2 mm. En cada tubo se añadieron 7 mL de buffer de acetato de sodio al 50 mM seguido de la adición de 0.25 g del sustrato correspondiente. Los tubos se precalentaron a 50 °C y 100 rpm durante 10 minutos antes de la adición de la enzima, y posteriormente se incubaron durante 6 horas. Se tomaron muestras cada

2 horas para realizar el ensayo DNS y cuantificar los azúcares reductores liberados. Todos los ensayos se realizaron por triplicado para las enzimas cada cepa seleccionada.

Considerando que residuos lignocelulósicos como la cáscara de cacao y las semillas de açai pueden presentar azúcares reductores de forma natural, se realizaron ensayos de control sin la adición de enzimas, manteniendo las mismas condiciones experimentales (Mensah et al., 2020). La concentración de azúcares reductores liberados se calculó restando a la concentración de la muestra la medida dada por el blanco.

#### **4.4. Análisis estadístico de los datos**

Los resultados experimentales se expresaron como el promedio de tres réplicas  $\pm$  desviación estándar. En los ensayos de actividad celulolítica sobre sustratos comerciales, se empleó la prueba  $t$  de Student y análisis de varianza (ANOVA) de un factor, según correspondiera, con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . En el caso de los residuos agroindustriales, se utilizó un ANOVA de dos factores analizar la influencia de la cepa, el tiempo de reacción y su interacción sobre la liberación de azúcares reductores, seguido de una prueba de Tukey para para comparar las medias (D. C. Montgomery, 2017). El tratamiento estadístico completo de los datos experimentales se presenta en el Apéndice E.

### **5. Análisis y discusión de resultados**

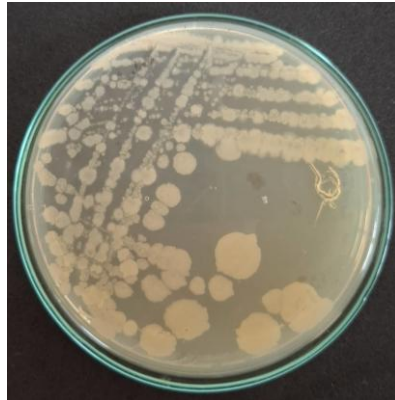
#### **5.1 Viabilidad de las cepas**

A partir de la siembra por estría se evidenció el crecimiento bacteriano de todas las cepas evaluadas, permitiendo la obtención de colonias aisladas con morfología característica del género *Bacillus*. La uniformidad y definición de estas colonias demostraron que los cultivos estaban en óptimas condiciones fisiológicas y libres de contaminantes aparentes. La figura 1

muestra un ejemplo representativo del crecimiento bacteriano observado en las cepas evaluadas.

### **Figura 1**

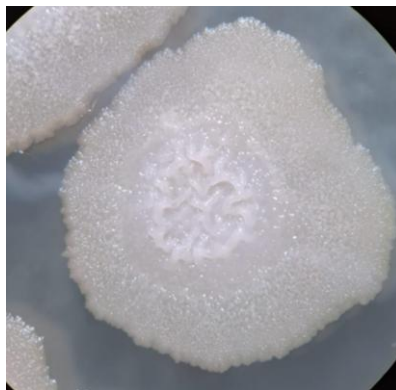
*Crecimiento bacteriano representativo de la cepa UIS121 en medio de crecimiento complejo tras 48 horas de incubación.*



La observación macroscópica de las colonias bajo estereoscopio permitió identificar características morfológicas consistentes, tales como bordes irregulares, textura rugosa y un color blanco sin brillo, lo cual reforzó la evidencia de pureza de los cultivos. Un ejemplo representativo de la morfología colonial observada se presenta en la Figura 2.

### **Figura 2.**

*Morfología colonial representativa de la cepa UIS121 observada bajo estereoscopio.*



La tinción de Gram confirmó un comportamiento Gram positivo representado con la presencia de color morado o azul en las bacterias, una morfología bacilar es decir de forma cilíndrica con los extremos redondeados y la existencia de zonas claras que dejan pasar la luz en el centro de la estructura, lo que podría significar la presencia de una endospora central, rasgos esperados en este género. La figura 3 es un ejemplo representativo.

**Figura 3.**

*Tinción de Gram representativa de la cepa UIS132, evidenciando bacilos Gram positivos con presencia de endosporas.*



Estos resultados confirmaron que las cepas de la UIS121 a UIS135 junto a las cepas de control UIS1244 y UIS1245 correspondieron a cultivos viables y puros, aptos para su conservación en zeolita y posterior evaluación de la actividad celulítica.

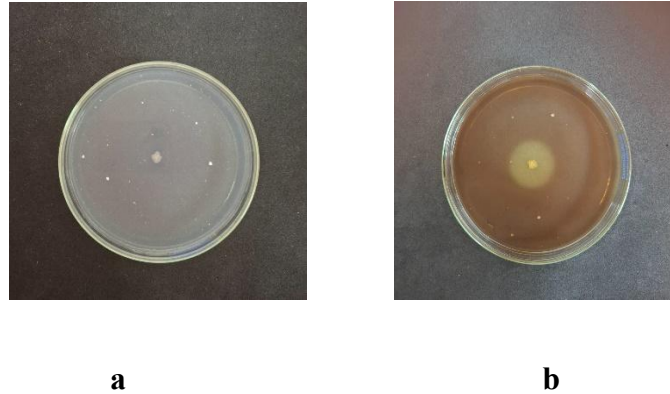
## **5.2 Cuantificación de la actividad enzimática**

### **5.2.1 Halos de hidrólisis**

La formación de halos de hidrólisis fue observada en las cepas evaluadas, evidenciando la capacidad de degradación del sustrato celulósico. En la figura 4a se observa el crecimiento de la colonia en el centro del medio de cultivo, mientras que en la figura 4b se evidencia un halo de hidrólisis alrededor de la colonia. Esto indica que ocurrió la degradación de la carboximetilcelulosa, asociada a la producción de enzimas celulolíticas extracelulares.

**Figura 4.**

*Formación de halos de hidrólisis por la cepa UIS122. a) Crecimiento de la colonia bacteriana antes de la prueba (0.6 cm de diámetro). b) Halo de hidrólisis observado después de la prueba (2.5 cm de diámetro).*



Los resultados presentados en la tabla 2 y respaldado por las imágenes del apéndice D observan que las cepas UIS124, UIS125, UIS127, UIS129 y UIS131 no reportaron formación del halo de hidrólisis a pesar de observarse un crecimiento de las bacterias, siendo descartadas para las pruebas de reacción en medio líquido, junto a las cepas UIS121, UIS123, UIS128 y UIS133 ya que no superaron el criterio impuesto de un coeficiente de hidrólisis (HC)  $\geq 3$ . Mientras las cepas UIS126 y UIS130 presentaron valores superiores al criterio, pero según la revisión estadística y el criterio establecido por Wood y Bhat (%CV  $\leq 15\%$ ) no tienen mucha fiabilidad (Wood & Bhat, 1988) y por ende quedaron descartadas para las siguientes pruebas, a diferencia de las cepas UIS122, UIS132 y UIS134 que además de tener valores por encima del criterio cuentan con fiabilidad estadística. En la tabla 2 se puede observar junto a las cepas de trabajo las pertenecientes a los códigos UIS1244 y UIS1245 que son cepas de control caracterizadas en trabajos anteriores (Soto-Paz et al., 2022b), las cuales superaron el criterio de selección además de cumplir el requerimiento estadístico.

**Tabla 2***Prueba de actividad celulolítica con halos de hidrólisis.*

Cepa	HC*	desviación estándar	%CV
UIS121	1.67	0.88	52.92
UIS122	3.83	0.29	7.53
UIS123	2.05	0.08	4.03
UIS124	1.00	0.00	0.00
UIS125	1.00	0.00	0.00
UIS126	5.40	2.13	39.34
UIS127	1.00	0.00	0.00
UIS128	2.51	0.38	15.26
UIS129	1.00	0.00	0.00
UIS130	3.64	0.81	22.38
UIS131	1.00	0.00	0.00
UIS132	3.47	0.46	13.32
UIS133	1.39	0.10	6.93
UIS134	3.14	0.35	11.19
UIS135	1.00	0.00	0.00
UIS1244 (control)	3.11	0.40	12.79
UIS1245(control)	4.60	0.53	11.50

*Nota:* HC representa la división del diámetro del halo de hidrólisis entre el tamaño de la colonia. Los valores reportados son el promedio de tres réplicas realizadas.

### 5.2.2 Caracterización cuantitativa

Por medio de la densidad óptica presentada en la tabla 3 se pudo comprobar la presencia de crecimiento bacteriano, donde las cepas UIS122 y UIS132 presentaron valores más altos representando un mayor crecimiento bacteriano. Posteriormente se obtuvo el sobrenadante de los cultivos el cual contiene la enzima extracelular y se realizaron las pruebas de DNS a reacciones que tuvieron como fuente de carbono la carboximetilcelulosa (CMC) y la celulosa microcristalina (Avicel), sirviendo como prueba del comportamiento de la actividad enzimática en distintas partes de la molécula siendo la acción en la zona amorfa representada por los valores referentes a CMC y la zona cristalina a los valores correspondientes al Avicel.

**Tabla 3**

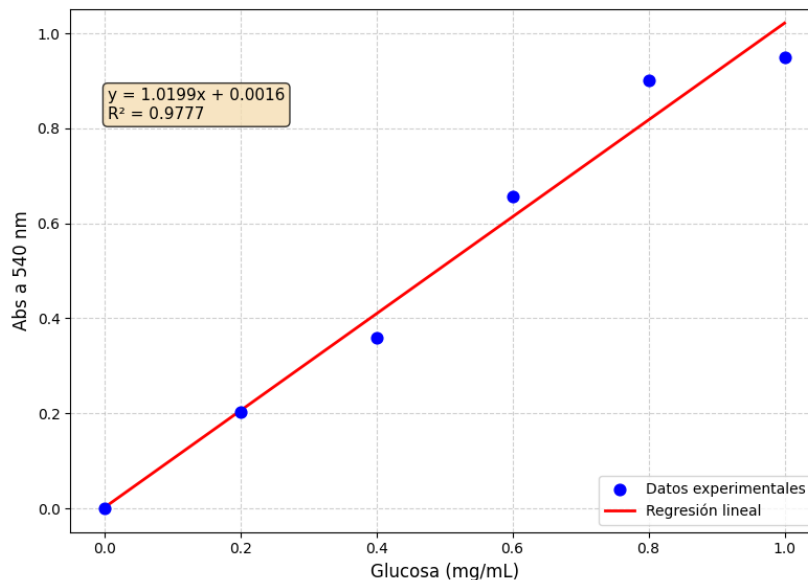
*Densidad óptica (D.O.) luego de 72 horas de reacción de las cepas en medio líquido.*

Cepa	D.O.
UIS122	0.50
UIS132	0.59
UIS134	0.23
UIS1244 (control)	0.05
UIS1245 (control)	0.32

Antes del proceso de determinación de azúcares reductores se realizó la curva de calibración de glucosa (figura 5) que sirvió para comparar la medida de absorbancia a 540 nm con la cantidad de glucosa (mg/mL) liberada.

**Figura 5.**

*Curva de calibración de glucosa para pruebas de cuantificación de azúcares reductores por DNS.*

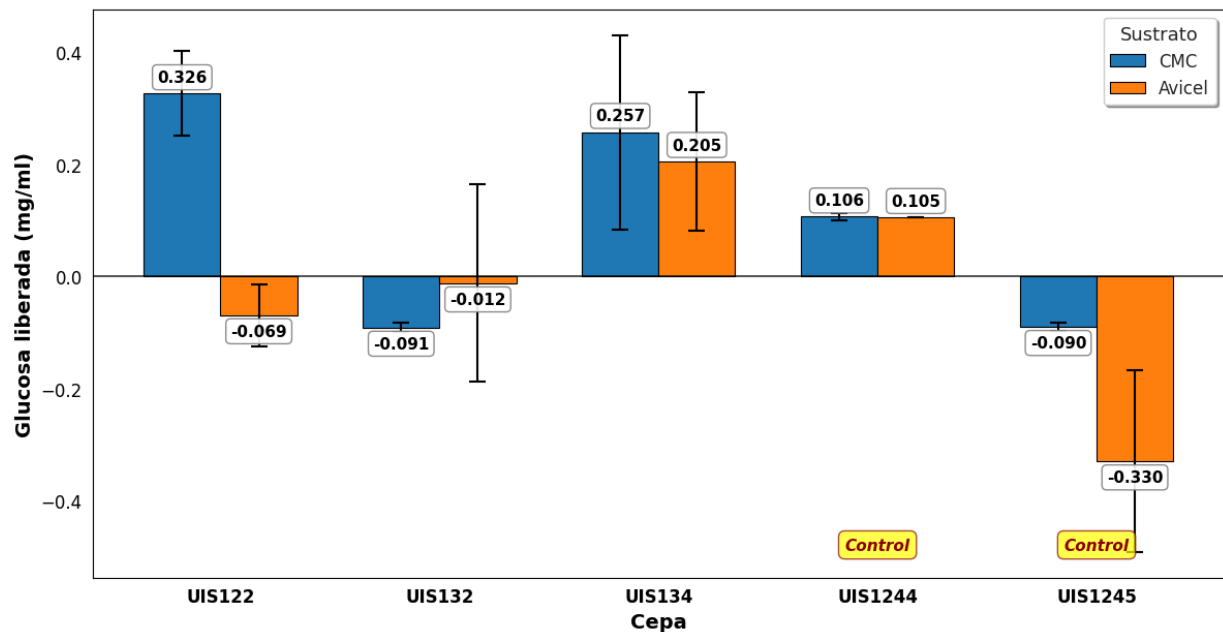


En la figura 6 se observa la actividad enzimática de las cepas estudiadas respecto a los 2 sustratos de trabajo (CMC y Avicel). El protocolo elaborado por IUPAC establece que el valor de absorbancia medido respecto al blanco es una medida neta (Ghose, 1987), por ende,

los valores deben ser positivos, en caso de ser negativos significa que la medida de la muestra es interpretable como nula actividad enzimática.

**Figura 6.**

*Actividad celulolítica sobre diferentes sustratos en las cepas UIS122, UIS132, UIS1244 (control) y UIS1245 (control) con CMC y Avicel.*



La carboximetilcelulosa (CMC) es degradada por las endoglucanasas ya que estas trabajan en el enlace  $\beta$ -1,4 de las regiones amorfas (Lynd et al., 2002) de la celulosa de este sustrato. Respecto al Avicel al ser la zona cristalina de la molécula es mucha más compleja la degradación, para su degradación suele ser necesaria un complejo enzimático (Lynd et al., 2002) que contiene celobiohidrolasas encargadas de degradar la zona cristalina y liberar celobiosas; endoglucanasas que tienen la función de aumentar la accesibilidad de las celobiohidrolasas, mientras las  $\beta$ -glucosidasas tienen una acción indirecta formando glucosa a partir de celobiosas.

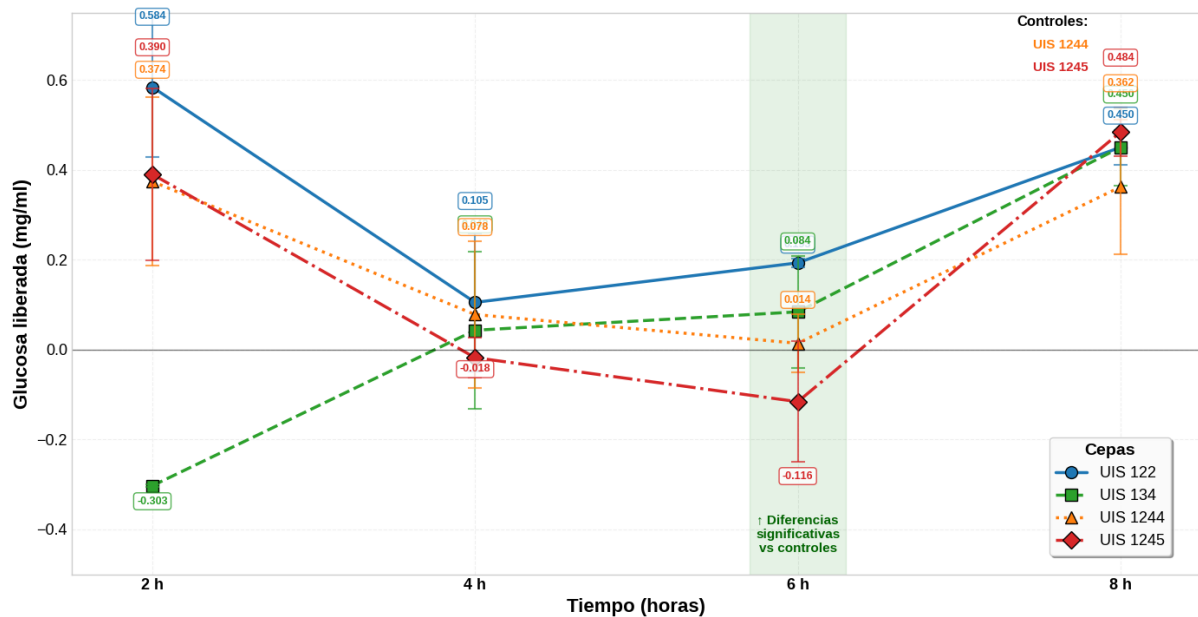
Los datos presentados en la figura 6 indican que las cepas UIS122 y UIS134 presentaron una mayor actividad enzimática en la carboximetilcelulosa (CMC) en comparación

con el control (UIS1244), lo que sugiere una posible liberación principalmente de endoglucanasas. La cepa UIS134 evidencia con la celulosa cristalina (Avicel) una liberación de 0.2053 mg/mL de glucosa lo que prueba la presencia de celobiohidrolasas y una presencia limitada de endoglucanasas. Respecto al punto de vista estadístico el análisis se determinó una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la cepa UIS122 respecto a las cepas de control al tener un valor p de 0.025 en la carboximetilcelulosa, mientras que en la celulosa cristalina se mostró un comportamiento significativamente mayor de la cepa UIS134 respecto a la cepa UIS122 y a las cepas de control UIS1244 y UIS1245 como se ve en la prueba HSD de Tukey, el análisis estadístico se encuentra detallado en el apéndice F.

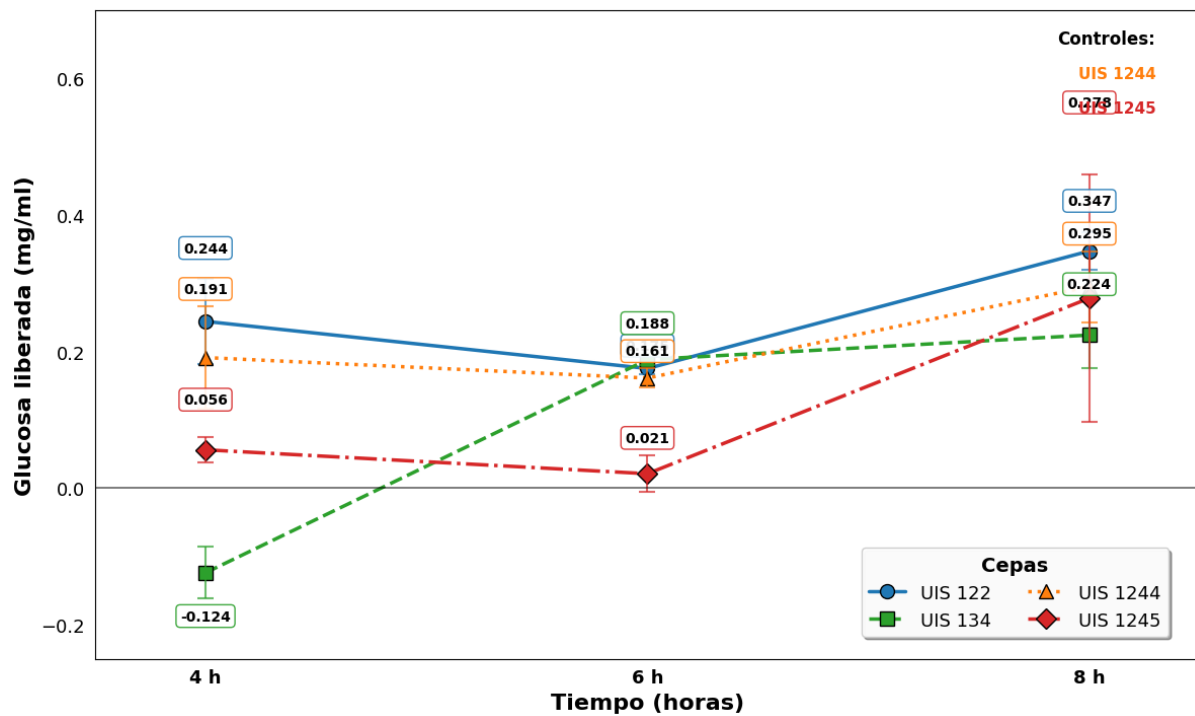
### **5.2.3 Actividad en residuos lignocelulósicos**

Para el ensayo con residuos lignocelulósicos se utilizó semillas de açái y cáscara de cacao en periodos de tiempo de 2, 4, 6 y 8 horas para determinar el comportamiento de la actividad enzimática.

Respecto a la cáscara de cacao según lo observado en la figura 7, es probable la presencia de una estructura amorfa dentro del material, susceptible a la degradación con endoglucanasas ya que la cepa UIS122 fue la de mayor liberación de glucosa, donde en las dos horas al contar con la mayor cantidad del material dio el pico más alto actividad y además de posiblemente se atenuó su progresión debido a el consumo de gran parte de la zona amorfa de ese material, mientras tanto en la cepa UIS134 se observa un aumento progresivo en la liberación de glucosa sugiriendo una posible dificultad al principio para liberar azúcares y la predisposición vista anteriormente para degradar más fácilmente las zonas cristalinas. Estadísticamente solo se vio un comportamiento significativamente distinto en la cepa UIS134, mientras que la UIS122 se comportó de acorde a las de control, sugiriendo un comportamiento metabólico distinto al resto en la cepa UIS134.

**Figura 7.***Liberación de glucosa sobre cáscara de cacao*

En la figura 8 se observa el comportamiento de la actividad enzimática cuando se utiliza como sustrato las semillas de açaí, teniendo valores menores respecto a los presentados en la figura 7 que corresponden a la cáscara de cacao, esto posiblemente debido al alto contenido de fenoles de la semilla (Gordon et al., 2012) siendo este un gran inhibidor de enzimas (Ximenes et al., 2010). A pesar de tener valores bajos de actividad enzimática, los datos se mantuvieron un aumento progresivo, dando solamente valores negativos a las 2 horas de la cepa UIS134 significando nula liberación de azúcares en ese punto. Respecto al comportamiento de las cepas se observó una mayor actividad en la cepa UIS122 similar a lo presentado en el ensayo con cacao, mientras que a diferencia de ese estudio no se vio un comportamiento significativamente mayor ni de la cepa UIS122 ni de la cepa UIS134 respecto a las de control.

**Figura 8.***Liberación de glucosa en semillas de açai*

## 6 Conclusiones

Se desarrollaron y documentaron protocolos detallados para la reactivación de cepas bacterianas, la esterilización de materiales de laboratorio y la preparación de medios de cultivo. Estos procedimientos estandarizados contribuyeron a asegurar la fiabilidad y reproducibilidad de la investigación, facilitando un control riguroso de las condiciones experimentales.

El análisis de la actividad celulolítica basado en la evaluación de los halos de hidrólisis, teniendo como criterio de selección valores de HC mayores a 3 y su comparación con las cepas control (UIS1244 y UIS1245), permitió identificar 3 cepas sobresalientes: UIS122 (HC = 3.83), UIS132 (HC = 3.47) y UIS134 (HC = 3.14). La cepa UIS122 se destacó como la de mayor potencial celulolítico, al presentar el mayor valor promedio de HC y superar a ambas cepas control.

El análisis de la actividad celulolítica extracelular, evaluada a partir del sobrenadante de los cultivos mediante el método de determinación de azúcares reductores, permitió cuantificar la liberación de glucosa a partir de celulosa amorfa (CMC) y celulosa microcristalina (Avicel). En comparación con las cepas control (UIS1244 y UIS1245), la cepa UIS122 presentó la mayor liberación de glucosa a partir de CMC (0.3259 g/mL), asociada principalmente a endoglucanasas. Por su parte la cepa UIS134 mostró el mayor desempeño sobre Avicel (0.2053 g/mL) sugiriendo la presencia de celulasas con afinidad por celulosa cristalina, como las exoglucanasas o celobiohidrolasas. Estos resultados confirman un comportamiento enzimático dependiente del sustrato entre las cepas evaluadas.

El análisis de la actividad celulolítica extracelular a partir del sobrenadante de los cultivos evidenció un comportamiento dependiente del sustrato agroindustrial utilizado. En la cáscara de cacao, la cepa UIS122 presentó el mayor valor de liberación de glucosa, alcanzando su máximo (0.604 g/mL) a las 2 horas de incubación. Por otro lado, al utilizar semillas de açaí, se obtuvieron valores de liberación de glucosa menores, donde la cepa UIS122 alcanzó su máximo a las 8 horas (0.347 g/mL), aunque sin mostrar superioridad frente a los controles. En conjunto, los resultados indican que la actividad celulolítica extracelular de las cepas evaluadas es mayor sobre cáscara de cacao que sobre semillas de açaí bajo las condiciones estudiadas.

**Referencias Bibliográficas**

- Ashokkumar, V., Venkatkarthick, R., Jayashree, S., Chuetor, S., Dharmaraj, S., Kumar, G., Chen, W. H., & Ngamcharussrivichai, C. (2022). Recent advances in lignocellulosic biomass for biofuels and value-added bioproducts - A critical review. *Bioresource Technology*, *344*, 126195. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.126195>
- Camacho, V., Soto, R., Guzmán, H., & Vargas, V. A. (2021). CELLULASE PRODUCTION BY MICROORGANISMS ISOLATED FROM LAGUNA BLANCA, POTOSÍ-BOLIVIA. *Revista Boliviana de Química*, *38*(4), 148–154. <https://doi.org/10.34098/2078-3949.38.4.2>
- Chantarasiri, A. (2015). Aquatic *Bacillus cereus* JD0404 isolated from the muddy sediments of mangrove swamps in Thailand and characterization of its cellulolytic activity. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, *41*(3), 257–264. <https://doi.org/10.1016/J.EJAR.2015.08.003>
- Chauhan, P. S., Goradia, B., & Saxena, A. (2017). Bacterial laccase: recent update on production, properties and industrial applications. *3 Biotech*, *7*(5), 1–20. <https://doi.org/10.1007/S13205-017-0955-7/METRICS>
- D. C. Montgomery. (2017). Design and Analysis of Experiments, John Wiley & Sons. *Mycological Research*, *106*(11), 1323–1330.
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, *59*(2), 257–268. <https://doi.org/10.1351/PAC198759020257/XML>
- Gong, G., Lee, S. M., Woo, H. M., Park, T. H., & Um, Y. (2017). Influences of Media Compositions on Characteristics of Isolated Bacteria Exhibiting Lignocellulolytic Activities from Various Environmental Sites. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *183*(3), 931–942. <https://doi.org/10.1007/S12010-017-2474-8/METRICS>
- Gordon, A., Cruz, A. P. G., Cabral, L. M. C., De Freitas, S. C., Taxi, C. M. A. D., Donangelo, C. M., De Andrade Mattietto, R., Friedrich, M., Da Matta, V. M., & Marx, F. (2012). Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açai fruits (*Euterpe oleraceae* Mart.) during ripening. *Food Chemistry*, *133*(2), 256–263. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.11.150>
- Grupo de Investigación de Valorización de Residuos y Fuentes Agrícolas e Industriales para Sostenibilidad Enegetica. (2018). *Protocolo de medición de azúcares reductores. Universidad Industrial de Santander.*
- Heimbach, J. T. (n.d.). *A DMIN ISTRATIO N CENTER FOR FOOD SAFETY & APPLIED NUTRITION*. Retrieved January 11, 2026, from [www.fda.gov](http://www.fda.gov)
- Hossain, Md. A., Ahammed, Md. A., Sobuj, S. I., Shifat, S. K., & Somadder, P. D. (2021). Cellulase Producing Bacteria Isolation, Screening and Media Optimization from Local

- Soil Sample. *American Journal of Microbiological Research*, Vol. 9, 2021, Pages 62-74, 9(3), 62–74. <https://doi.org/10.12691/AJMR-9-3-1>
- Ilić, N., Milić, M., Beluhan, S., & Dimitrijević-Branković, S. (2023). Cellulases: From Lignocellulosic Biomass to Improved Production. *Energies* 2023, Vol. 16, Page 3598, 16(8), 3598. <https://doi.org/10.3390/EN16083598>
- Infraestructura - Desarrollo Sostenible*. (n.d.). Retrieved September 1, 2025, from <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/infrastructure/>
- Kukreti, N., Kumar, P., & Kataria, R. (2024). Sustainable biotransformation of lignocellulosic biomass to microbial enzymes: An overview and update. *Industrial Crops and Products*, 222, 119432. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2024.119432>
- LABRADOR, H., & OSTO, S. (n.d.). CARACTERIZACIÓN DE LA CELULOSA PROVENIENTE DEL LODO PAPELERO Y SU ESTERIFICACIÓN. *Revista de La Facultad de Ciencias*, 10(2), 67–81.
- Li, H., Zhang, M., Zhang, Y., Xu, X., Zhao, Y., Jiang, X., Zhang, R., & Gui, Z. (2023). Characterization of Cellulose-Degrading Bacteria Isolated from Silkworm Excrement and Optimization of Its Cellulase Production. *Polymers* 2023, Vol. 15, Page 4142, 15(20), 4142. <https://doi.org/10.3390/POLYM15204142>
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 66(3), 506–577. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002>
- Maki, M. L., Broere, M., Leung, K. T., & Qin, W. (2011). Characterization of some efficient cellulase producing bacteria isolated from paper mill sludges and organic fertilizers. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2(2), 146. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3180100/>
- Mary Jo Zimbro, E., David Power, M. A., Miller, S. M., George Wilson, M. E., & Julie Johnson, M. A. (n.d.). *Difco* □ & *BBL* □ *Manual Manual of Microbiological Culture Media Second Edition*.
- Mensah, M., Asiedu, N. Y., Neba, F. A., Amaniampong, P. N., Boakye, P., & Addo, A. (2020). Modeling, optimization and kinetic analysis of the hydrolysis process of waste cocoa pod husk to reducing sugars. *SN Applied Sciences* 2020 2:7, 2(7), 1160-. <https://doi.org/10.1007/S42452-020-2966-Y>
- Outtrup, H., & Jørgensen, S. T. (2008). The Importance of Bacillus Species in the Production of Industrial Enzymes. *Applications and Systematics of Bacillus and Relatives*, 206–218. <https://doi.org/10.1002/9780470696743.CH14;CTYPE:STRING:BOOK>
- Oviedo Chávez, A., & Vinuesa Galárraga, J. (2020). ESTUDIO DE CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS Y SUS USOS, UNA REVISIÓN. *InfoANALÍTICA*, 134–148. <https://doi.org/10.26807/IA.VI.174>

- Prasongsuk, S., Bankeeree, W., Lotrakul, P., Abd-Aziz, S., & Punnapayak, H. (2022). Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. *Biorefinery of Oil Producing Plants for Value-Added Products: Volume 1, 1*, 161–177. <https://doi.org/10.1002/9783527830756.CH9;SUBPAGE:STRING:ACCESS>
- Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, 59, 1–41. <https://doi.org/10.1042/BSE0590001/88345>
- Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27(2), 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>
- Shukur, Y. N. (2015). Determination of Optimal Conditions for the Production of Laccase Enzyme by Local Isolate of Bacillus sp. *Iraqi Journal of Science*, 56(1A), 132–139. <https://www.ij.s.uobaghdad.edu.iq/index.php/eijs/article/view/10666>
- Soto-Paz, J., Oviedo-Ocaña, E. R., Angarita-Rangel, M. A., Rodríguez-Flórez, L. V., Castellanos-Suarez, L. J., Nabarlatz, D., & Sanchez-Torres, V. (2022b). Optimization of lignocellulolytic bacterial inoculum and substrate mix for lignocellulose degradation and product quality on co-composting of green waste with food waste. *Bioresource Technology*, 359, 127452. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2022.127452>
- Tiwari, A., Chen, C. W., Haldar, D., Patel, A. K., Dong, C. Di, & Singhania, R. R. (2023). Laccase in Biorefinery of Lignocellulosic Biomass. *Applied Sciences 2023, Vol. 13, Page 4673, 13*(8), 4673. <https://doi.org/10.3390/APP13084673>
- Walia, A., Guleria, S., Mehta, P., Chauhan, A., & Parkash, J. (2017). Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. *3 Biotech 2017 7:1*, 7(1), 11-. <https://doi.org/10.1007/S13205-016-0584-6>
- Wood, T. M., & Bhat, K. M. (1988). Methods for measuring cellulase activities. *Methods in Enzymology*, 160(C), 87–112. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)60109-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)60109-1)
- Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N., Dien, B., & Ladisch, M. (2010). Inhibition of cellulases by phenols. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(3–4), 170–176. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2009.11.001>
- Yiasmin, M., Waleed, A.-A., & Hua, X. (2021). *International Journal of Agriculture and Environmental Research METHODS FOR PRETREATMENT OF LIGNOCELLULOSIC BIOMASS AND BY-PRODUCTS FOR LIGNOCELLULOLYTIC ENZYMES MODIFICATION: A REVIEW*. <https://doi.org/10.51193/IJAER.2021.7108>

## Apéndices

**Apéndice A.** Protocolos para la preparación de medios de cultivo.

---

<b>Objetivo</b>	<b>Alcance</b>
Preparar medios de cultivo sólidos y líquidos de forma estandarizada, asegurando la correcta disolución de los componentes y esterilización.	Este protocolo aplica para la preparación de medios utilizados en ensayos microbiológicos.

---

### **Materiales**

- Agua destilada
- Nutrientes en polvo
- Agar (para medios sólidos)
- Espátula
- Probeta
- Recipientes resistentes al calor
- Cajas de Petri
- Tubos de ensayo
- Mechero de alcohol
- Guantes y bata de laboratorio

### **Equipos**

- Balanza de precisión
- Autoclave
- Plancha de calentamiento

### **Metodología:**

- **Preparación de la mezcla**

1. Definir el volumen total de medio a preparar y el número de cajas o tubos necesarios.
2. Calcular las cantidades requeridas de cada ingrediente según la formulación del medio.
3. Pesar los componentes sólidos en la balanza de precisión.
4. Medir la cantidad de agua destilada en una probeta y transferirla a un recipiente resistente al calor.
5. Añadir los ingredientes al agua y mezclar con espátula hasta obtener una solución homogénea.
6. Para los medios líquidos, calentarla en la plancha hasta su completa disolución.

- **Dispensación antes de esterilizar**

1. Para medios líquidos: distribuir la mezcla en tubos de ensayo con tapa.
2. Para medios sólidos: mantener la mezcla en un único frasco sin dispensar aún.

- **Esterilización**

1. Cerrar parcialmente los recipientes para permitir la liberación de presión.
2. Introducir los recipientes al autoclave.
3. Configurar el ciclo de esterilización en “material líquido” a una temperatura de 121 °C y 1 Bar durante 20 minutos.

- **Post-esterilización**

1. Para medios líquidos: retirar los tubos al finalizar el ciclo, cerrar completamente las tapas y llevarlos a incubación para su prueba de esterilidad.
2. Para medios sólidos: retirar el frasco, dejar que enfríe hasta aproximadamente 50 °C y verter en cajas de Petri estériles cerca del mechero.
3. Dejar enfriar las cajas hasta que el agar solidifique para luego envolverlas en papel vinipel y llevarlas a incubar.

**Precauciones y consideraciones**

- No cerrar completamente los recipientes antes de autoclave; pueden explotar.
- No verter el medio en las cajas si está demasiado caliente ya que puede generar condensación en la superficie, lo que se puede afectar su desempeño a futuro.
- Comprobar el nivel de agua del autoclave antes de iniciar el ciclo.
- Usar guantes térmicos al retirar material caliente del autoclave.
- Manipular las cajas de Petri rápidamente y cerca del mechero para evitar contaminación.
- No cerrar completamente los recipientes antes de autoclave; pueden explota

**Apéndice B.** Protocolos para la esterilización de materiales de laboratorio.

<b>Objetivo</b>	<b>Alcance</b>
Establecer el procedimiento para la esterilización de materiales de vidrio y plástico utilizados en el laboratorio, garantizando condiciones libres de contaminación microbiana.	Este protocolo aplica para la esterilización de materiales empleados en prácticas microbiológicas.

**Materiales**

- Papel Kraft
- Cajas de Petri
- Tubos de ensayo
- Puntas de pipeta
- Guantes térmicos
- Guantes y bata de laboratorio

**Equipos**

- Horno de secado
- Autoclave
- Guantes térmicos

## **Metodología**

### **Esterilización de material de vidrio**

1. Lavar cuidadosamente todo el material con agua y detergente.
2. Dejar reposar durante 12 horas en una solución de agua con hipoclorito de sodio al 30%.
3. Enjuagar, secar y envolver en papel Kraft.
4. Esterilizar en horno a 150 °C durante 3 horas.
5. Dejar enfriar parcialmente antes de retirar.
6. Retirar el material utilizando guantes térmicos y mantenerlo envuelto hasta su uso.

### **Esterilización de material de plástico**

1. Envolver el material en papel Kraft.
2. Esterilizar en autoclave a 121 °C y 1 bar durante 15–20 minutos.
3. Esperar la despresurización completa antes de abrir.
4. Retirar el material con ayuda de guantes térmicos y dejar enfriar a temperatura ambiente.

### **Precauciones y consideraciones**

- No abrir el autoclave mientras esté presurizado.

- No sobrecargar el equipo para permitir la adecuada circulación del aire o vapor.
- Usar guantes térmicos para retirar material caliente.

### Apéndice C. Protocolos para la reactivación y conservación de cepas bacterianas.

Objetivo	Alcance
Describir el procedimiento para la reactivación de cepas bacterianas conservadas en zeolita, mediante su transferencia a medios líquidos de cultivo estériles, con el fin de restablecer su actividad metabólica y permitir su posterior caracterización.	Este protocolo aplica para la reactivación de cepas bacterianas conservadas en diferentes tipos de matrices, incluyendo zeolita y medios granulados.

### Materiales

- Crioviales con zeolita cargada con biomasa
- Mechero de alcohol
- Tubos estériles (15 mL o según disponibilidad)
- Placas de Petri estériles
- Asa bacteriológica
- Hisopo estéril
- Portaobjetos
- Colorantes para tinción de Gram
- Zeolita estéril (para conservación)
- Solución salina estéril
- Marcador indeleble
- Cinta y Parafilm

### Reactivos y medios

- Medio líquido de reactivación (según lo definido para cada cepa, en este caso RCM)
- Medio sólido para aislamiento (misma formulación)

### **Equipos**

- Cabina de bioseguridad
- Incubadora
- Microscopio óptico
- Autoclave

### **Metodología**

#### **Reactivación en medio líquido**

1. Rotular los tubos con: código de cepa, fecha y medio de cultivo.
2. Encender el mechero de alcohol y trabajar cerca de la llama para mantener un área estéril.
3. Abrir el criovial con zeolita y el tubo con medio líquido estéril cerca de la llama.
4. Tomar 200  $\mu$ L de medio de cultivo líquido estéril.
5. Adicionar el volumen al criovial y homogenizar suavemente mediante pipeteo hasta humedecer completamente la zeolita.
6. Transferir la suspensión obtenida al tubo que contiene el medio líquido estéril.
7. Incubar el cultivo a la temperatura y tiempo específicos para cada cepa.

#### **Aislamiento de colonias mediante estría por agotamiento.**

1. Rotular placas de medio sólido con: cepa, fecha y tipo de medio.

2. Esterilizar el asa bacteriológica mediante flameo hasta alcanzar color rojo incandescente.
3. Dejar enfriar el asa y tomar una alícuota del cultivo reactivado.
4. Abrir parcialmente la placa con medio sólido, manteniéndola cerca de la llama.
5. Realizar estrías paralelas en el primer cuadrante de la placa, distribuyendo la carga bacteriana.
6. Esterilizar nuevamente el asa, dejarla enfriar y arrastrar desde el borde del primer cuadrante hacia un segundo cuadrante, disminuyendo la concentración bacteriana.
7. Repetir el proceso de esterilización, enfriado y estriado hasta completar un total de cuatro cuadrantes.
8. Cerrar, invertir e incubar las placas bajo condiciones adecuadas.

### **Tinción y observación microscópica**

1. Seleccionar una o dos colonias aisladas obtenidas tras la incubación en medio sólido.
2. Depositar una pequeña cantidad de biomasa sobre un portaobjetos limpio utilizando un asa estéril.
3. Adicionar 20–30  $\mu\text{L}$  de solución salina estéril y homogenizar la suspensión.
4. Fijar la muestra pasando el portaobjetos rápidamente sobre la llama en dos o tres ocasiones.
5. Realizar la tinción de Gram siguiendo el procedimiento estándar.
6. Eliminar el exceso de colorante y secar la muestra.
7. Observar la muestra en microscopio óptico utilizando el objetivo de 100X con aceite de inmersión.

### **Producción de biomasa mediante siembra por extensión**

1. Recolectar biomasa de una colonia pura utilizando un asa bacteriológica estéril.

2. Suspender la biomasa en un tubo con solución salina estéril.
3. Homogenizar la suspensión mediante pipeteo repetido.
4. Tomar 500  $\mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana con una micropipeta estéril.
5. Depositar el volumen en el centro de una placa con medio sólido.
6. Distribuir la suspensión uniformemente sobre la superficie del agar.
7. Cerrar la placa cuidadosamente para evitar contaminación.
8. Invertir la placa e incubarla hasta obtener un crecimiento abundante y homogéneo.

### **Conservación de cepas bacterianas en zeolita**

1. Seleccionar biomasa fresca proveniente de cultivos con un tiempo de crecimiento no mayor a 48 h.
2. Recolectar la biomasa utilizando un hisopo estéril.
3. Suspender la biomasa en un tubo que contenga solución de glicerol estéril al 30 %.
4. Dejar reposar la suspensión durante aproximadamente 1 hora.
5. Homogenizar la suspensión mediante pipeteo suave.
6. Tomar 500  $\mu\text{L}$  de la suspensión y adicionarlos a crioviales que contienen zeolita estéril.
7. Cerrar adecuadamente los crioviales para evitar contaminación.
8. Almacenar los crioviales bajo las condiciones de conservación establecidas por el laboratorio.

### **Precauciones y consideraciones**

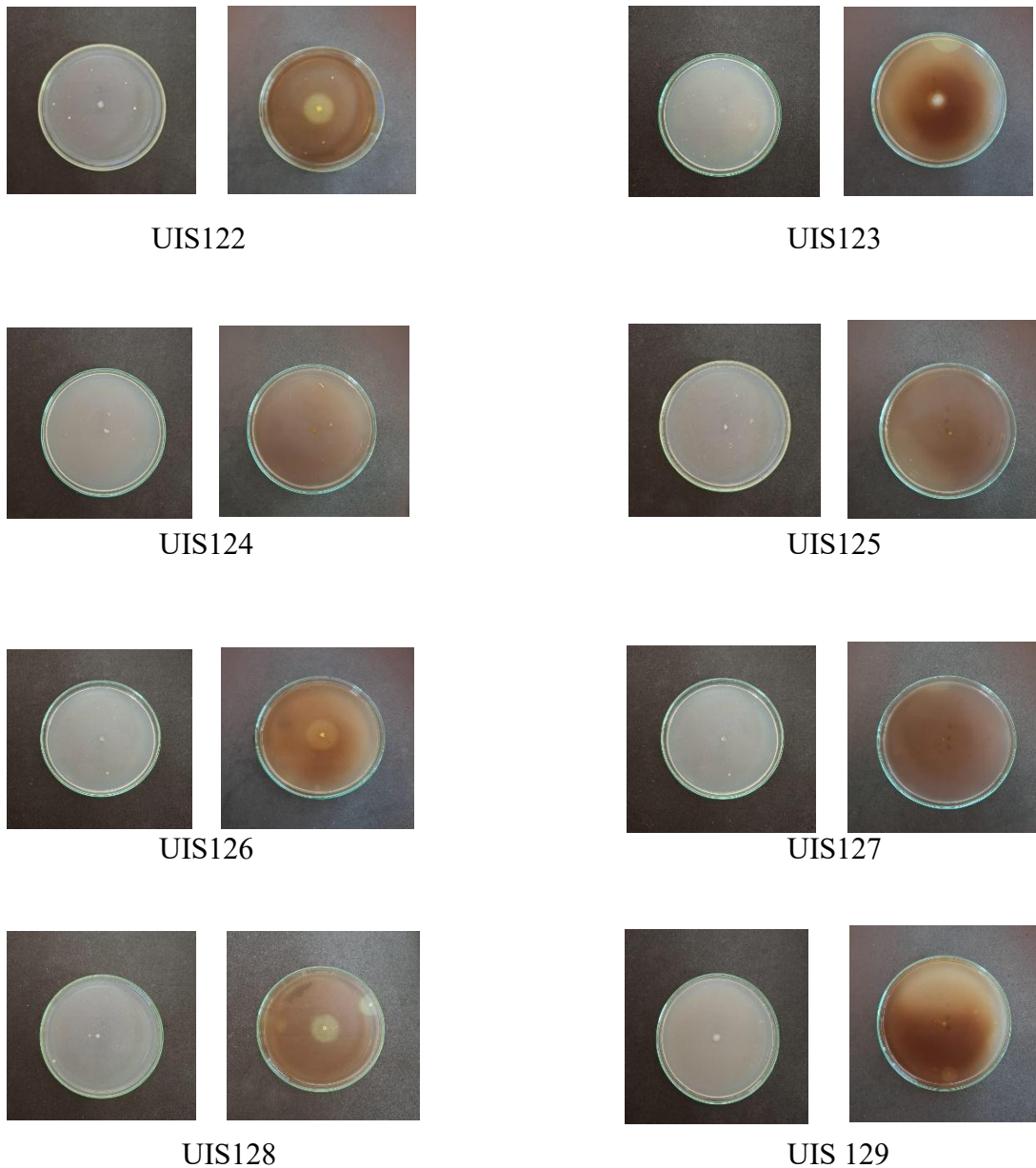
- Mantener condiciones estrictas de asepsia durante todas las etapas del protocolo para evitar contaminación cruzada.
- Evitar la exposición prolongada de los medios de cultivo y materiales estériles al ambiente, manteniendo los recipientes abiertos únicamente el tiempo necesario.

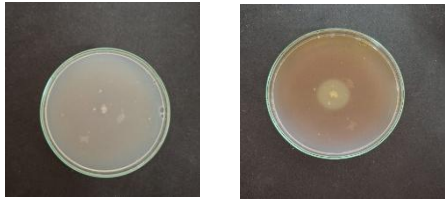
- Rotular adecuadamente todos los materiales para asegurar trazabilidad
- Para la conservación de las cepas, emplear únicamente biomasa proveniente de cultivos puros y en buen estado fisiológico, evitando el uso de colonias envejecidas o con crecimiento deficiente.

**Apéndice D.** Registro fotográfico del ensayo del halo de hidrólisis en cepas bacterianas evaluadas

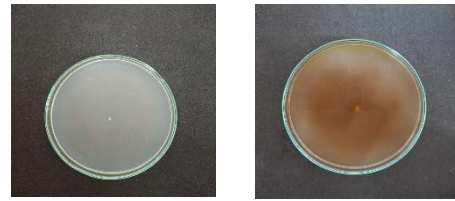
**Figura D1.**

*Mosaico de halos de hidrólisis de cepas de trabajo y control.*

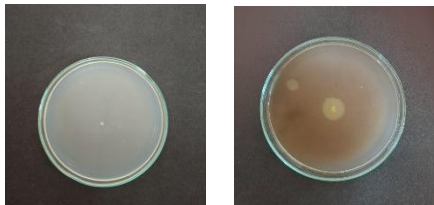




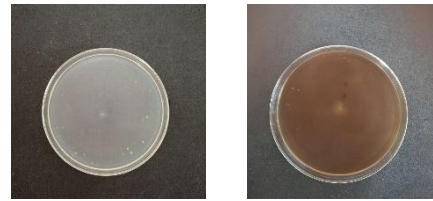
UIS130



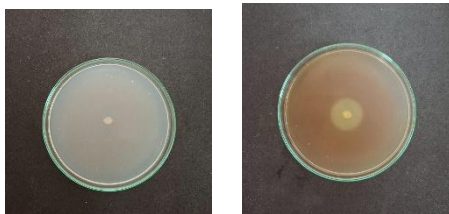
UIS131



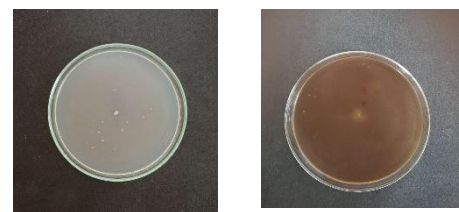
UIS132



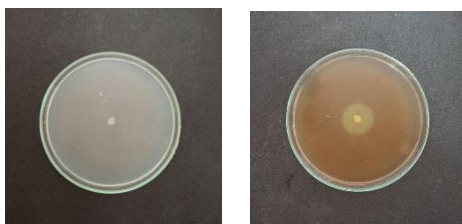
UIS133



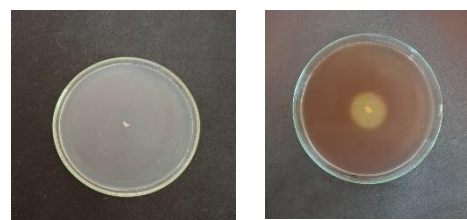
UIS134



UIS135



UIS1244



UIS 1245

**Apéndice E.** Protocolo de medición de la actividad celulolítica mediante la cuantificación de azúcares reductores con el reactivo DNS

<b>OBJETO</b>	<b>ALCANCE</b>
---------------	----------------

Describir el procedimiento para la preparación de la curva de calibración y las muestras para la determinación de la cantidad de glucosa en pruebas de DNS.	Aplicar el procedimiento a muestras líquidas a las que se le aplica el método de DNS.
---	---

### **Materiales**

- Tubos de ensayo
- Gradilla
- Marcador
- Cinta de papel
- Micropipeta de 1000  $\mu$ L
- Rack de puntas de pipeta de 1000
- Vasos de precipitado
- Hielo

### **Reactivos**

Glucosa

Ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS)

Agua destilada

Muestra

### **Equipos**

- Balanza
- Vortex
- plancha de calentamiento

**E1. Preparación de soluciones**

Preparación Ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS): Mezclar agua destilada (1416 mL) con ácido 3,5 dinitrosalicílico (10.6 g) y NaOH (19.8 g). Luego adicionar y disolver sal de Rochel tártaro de Na-K (306 g), fenol fundido a 50°C 7.6 mL y metabisulfito de sodio (19.8 g) asegurando un color entre naranja y amarillo. Si llega a ponerse marrón oscuro descartar y repetir. (Ghose, 1987).

Solución madre de glucosa: Disolver 100 mg de glucosa en un valor aforado de 100 mL disolviendo y luego llegando al aforo.

**E2. Procedimiento**

E2.1) Preparación de mezclas modelo: Preparar 5 tubos de ensayo marcados del 1 al 5 y uno que diga blanco para luego preparar las muestras siguiendo la tabla 5.

En el caso de las muestras se aplica igualmente este procedimiento.

**Tabla E1.**

*Diluciones del patrón de glucosa*

DILUCIÓN	Blanco	1	2	3	4	5
Volumen de solución I (mL)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Volumen de agua (mL)	0,5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
Concentración de glucosa (mg/mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0

E2.2) reacción: En tubos de ensayo diferentes a los anteriores agregar 0.5 mL de la solución preparada en el paso 2.1 con 3 mL de la solución DNS y marcar con el mismo número de la

disolución, para luego llevarlo durante 10 minutos a agua hirviendo, culminado el tiempo dejar enfriar en agua con hielo durante 5 minutos.

E2.3) Medición: En un espectrofotómetro medir la absorbancia en una longitud de onda de 540 nm y guardar el dato

E2.4) Gráfica: Graficar la concentración de glucosa mg/ml en función de la absorbancia medida a 540 nm como se observa en la ilustración 8. Revisando el  $R^2$  con un valor  $\geq 0.95$ , en caso de ser menor repetir.

E2.5) preparación de muestras: Para el uso de muestras reales de sebo incluir en un tubo de ensayo de vidrio 1000  $\mu$ L de la muestra a trabajar, 1000  $\mu$ L del buffer a utilizar (En el caso de este trabajo acetato de sodio al 50 mM) y 2000  $\mu$ L del reactivo DNS.

Para este trabajo los datos obtenidos con este material fueron los siguientes:

**Tabla E2.**

*Actividad celulolítica sobre CMC y Avicel para las cepas UIS122, UIS 134, UIS1244 y UIS 1245.*

Cepa	Sustrato	Medida	1	2	3	Promedio	D.S.
UIS122	CMC	Absorbancia (540 nm)	0.411	0.257	0.334	0.334	0.077
		Glucosa (mg/ml)	0.4014	0.2504	0.3259	0.3259	0.0755
	Avicel	Absorbancia (540 nm)	-0.069	-0.013	-0.125	-0.069	0.056
		Glucosa (mg/ml)	-0.0692	-0.0143	-0.1241	-0.0692	0.0549
UIS134	CMC	Absorbancia (540 nm)	0.252	0.099	0.44	0.2637	0.1708
		Glucosa (mg/ml)	0.2455	0.0955	0.4298	0.2569	0.1674
	Avicel	Absorbancia (540 nm)	0.211	0.085	0.337	0.211	0.126
		Glucosa (mg/ml)	0.2053	0.0818	0.3289	0.2053	0.1236
UIS1244	CMC	Absorbancia (540 nm)	0.114	0.113	0.103	0.11	0.0061
		Glucosa (mg/ml)	0.1102	0.1092	0.0994	0.1063	0.006
	Avicel	Absorbancia (540 nm)	0.109	0.109	0.109	0.109	0
		Glucosa (mg/ml)	0.1053	0.1053	0.1053	0.1053	0
UIS1245	CMC	Absorbancia (540 nm)	-0.094	-0.095	-0.082	-0.0903	0.0072
		Glucosa (mg/ml)	-0.0937	-0.0947	-0.082	-0.0901	0.0071
	Avicel	Absorbancia (540 nm)	-0.374	-0.154	-0.476	-0.3347	0.1646
		Glucosa (mg/ml)	-0.3683	-0.1526	-0.4683	-0.3297	0.1613

**Tabla E3.**

*Azúcares reductores liberados de la cáscara de cacao en 2, 4, 6 y 8 horas por cepas UIS122, UIS134, UIS1244 (control) y UIS1245(control)*

Tiempo (h)	Cepa	Medida	1	2	3	Promedio	D.S.	
2	UIS122	Absorbancia (540 nm)	1.092	0.836	0.919	0.949	0.1306	
		Glucosa (mg/ml)	0.744	0.493	0.604	0.6137	0.1258	
	UIS1244	Absorbancia (540 nm)	0.91	0.53	0.703	0.7143	0.1903	
		Glucosa (mg/ml)	0.566	0.193	0.363	0.374	0.1867	
	UIS1245	Absorbancia (540 nm)	0.504	0.891	0.797	0.7307	0.2018	
		Glucosa (mg/ml)	0.1677	0.5471	0.4549	0.3899	0.1979	
	UIS134	Absorbancia (540 nm)	0.0245	0.027	0.022	0.0245	0.0025	
		Glucosa (mg/ml)	-0.3025	-0.3	-0.3049	-0.3025	0.0025	
	4	UIS122	Absorbancia (540 nm)	0.605	0.919	0.716	0.7467	0.1592
			Glucosa (mg/ml)	-0.034	0.274	0.075	0.105	0.1562
		UIS1244	Absorbancia (540 nm)	0.894	0.562	0.704	0.72	0.1666
			Glucosa (mg/ml)	0.249	-0.0765	0.0628	0.0784	0.1633
UIS1245		Absorbancia (540 nm)	0.57	0.67	0.625	0.6217	0.0501	
		Glucosa (mg/ml)	-0.069	0.029	-0.015	-0.0183	0.0491	
UIS134		Absorbancia (540 nm)	0.513	0.874	0.673	0.6867	0.1809	
		Glucosa (mg/ml)	-0.1245	0.2294	0.0324	0.0458	0.1773	
6		UIS122	Absorbancia (540 nm)	0.635	0.652	0.6435	0.6435	0.0085
			Glucosa (mg/ml)	0.184	0.201	0.193	0.1927	0.0085
		UIS1244	Absorbancia (540 nm)	0.515	0.388	0.48	0.461	0.0656
			Glucosa (mg/ml)	0.0667	-0.0578	0.0324	0.0138	0.0643
	UIS1245	Absorbancia (540 nm)	0.49	0.232	0.263	0.3283	0.1409	
		Glucosa (mg/ml)	0.0422	-0.2108	-0.1804	-0.1163	0.1381	
	UIS134	Absorbancia (540 nm)	0.461	0.684	0.454	0.533	0.1308	
		Glucosa (mg/ml)	0.0137	0.2324	0.0069	0.0843	0.1283	
	8	UIS122	Absorbancia (540 nm)	0.738	0.668	0.736	0.714	0.0398
			Glucosa (mg/ml)	0.474	0.405	0.472	0.4503	0.0393
		UIS1244	Absorbancia (540 nm)	0.779	0.618	0.475	0.624	0.1521
			Glucosa (mg/ml)	0.514	0.356	0.216	0.362	0.1491
UIS1245		Absorbancia (540 nm)	0.731	0.702	0.81	0.7477	0.0559	
		Glucosa (mg/ml)	0.467	0.439	0.545	0.4837	0.0549	
UIS134		Absorbancia (540 nm)	0.626	0.8	0.713	0.713	0.087	
		Glucosa (mg/ml)	0.364	0.535	0.45	0.4497	0.0855	

**Tabla E4.**

*Azúcares reductores liberados de la cáscara de cacao en 2, 4, 6 y 8 horas por cepas UIS122, UIS134, UIS1244 (control) y UIS1245(control)*

Tiempo (h)	Cepa	Medida	1	2	3	Promedio	D.S.	
2	UIS122	Absorbancia (540 nm)	1.092	0.836	0.919	0.949	0.1306	
		Glucosa (mg/ml)	0.744	0.493	0.575	0.604	0.128	
	UIS1244	Absorbancia (540 nm)	0.91	0.53	0.703	0.7143	0.1903	
		Glucosa (mg/ml)	0.566	0.193	0.363	0.374	0.1867	
	UIS1245	Absorbancia (540 nm)	0.504	0.891	0.797	0.7307	0.2018	
		Glucosa (mg/ml)	0.1677	0.5471	0.4549	0.3899	0.1979	
	UIS134	Absorbancia (540 nm)	0.0245	0.027	0.022	0.0245	0.0025	
		Glucosa (mg/ml)	-0.3025	-0.3	-0.3049	-0.3025	0.0025	
	4	UIS122	Absorbancia (540 nm)	0.605	0.919	0.716	0.7467	0.1592
			Glucosa (mg/ml)	-0.034	0.274	0.075	0.105	0.1562
UIS1244		Absorbancia (540 nm)	0.894	0.562	0.704	0.72	0.1666	
		Glucosa (mg/ml)	0.249	-0.0765	0.0628	0.0784	0.1633	
UIS1245		Absorbancia (540 nm)	0.57	0.67	0.625	0.6217	0.0501	
		Glucosa (mg/ml)	-0.069	0.029	-0.015	-0.0183	0.0491	
UIS134		Absorbancia (540 nm)	0.513	0.874	0.673	0.6867	0.1809	
		Glucosa (mg/ml)	-0.1245	0.2294	0.0324	0.0458	0.1773	
6		UIS122	Absorbancia (540 nm)	0.635	0.652	0.6435	0.6435	0.0085
			Glucosa (mg/ml)	0.184	0.201	0.193	0.1927	0.0085
	UIS1244	Absorbancia (540 nm)	0.515	0.388	0.48	0.461	0.0656	
		Glucosa (mg/ml)	0.0667	-0.0578	0.0324	0.0138	0.0643	
	UIS1245	Absorbancia (540 nm)	0.49	0.232	0.263	0.3283	0.1409	
		Glucosa (mg/ml)	0.0422	-0.2108	-0.1804	-0.1163	0.1381	
	UIS134	Absorbancia (540 nm)	0.461	0.684	0.454	0.533	0.1308	
		Glucosa (mg/ml)	0.0137	0.2324	0.0069	0.0843	0.1283	
	8	UIS122	Absorbancia (540 nm)	0.738	0.668	0.736	0.714	0.0398
			Glucosa (mg/ml)	0.474	0.405	0.472	0.4503	0.0393
UIS1244		Absorbancia (540 nm)	0.779	0.618	0.475	0.624	0.1521	
		Glucosa (mg/ml)	0.514	0.356	0.216	0.362	0.1491	
UIS1245		Absorbancia (540 nm)	0.731	0.702	0.81	0.7477	0.0559	
		Glucosa (mg/ml)	0.467	0.439	0.545	0.4837	0.0549	
UIS134		Absorbancia (540 nm)	0.626	0.8	0.713	0.713	0.087	
		Glucosa (mg/ml)	0.364	0.535	0.45	0.4497	0.0855	

**Apéndice F.** Tratamiento estadístico de los datos experimentales e imágenes de los halos de hidrólisis.

**Tabla F1.**

*Prueba t-student de los azúcares reductores liberados por la carboximetilcelulosa para cepas UIS122, UIS134, UIS1244 (control) y UIS1245 (control)*

cepa	1	2	3	Promedio	D.E.	Prueba t
UIS122	0.4014	0.2504	0.3259	0.3259	0.0755	0.00250
UIS134	0.252	0.099	0.44	0.2637	0.1708	0.10507
UIS1244	0.114	0.113	0.103	0.1100	0.0061	
UIS1245	-0.094	-0.095	-0.082	-0.0903	0.0072	

**Tabla F2.**

*análisis ANOVA de un factor para azúcares liberados por la celulosa cristalina para cepas UIS122, UIS134, UIS1244 (control) y UIS1245 (control)*

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
UIS122		3	-0.207	-0.069 0.003136
UIS134		3	0.791	0.263666667 0.02917233
UIS1244		3	0.327	0.109 0
UIS1245		3	-1.004	-0.334666667 0.02708133

análisis de varianza				
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F
Entre grupos	0.593770917	3	0.197923639	13.3305102
Dentro de los grupos	0.118779333	8	0.014847417	
Total	0.71255025	11		

Probabilidad	Valor crítico para F
0.001768763	4.066180551

**Tabla F3.**

*Análisis anova de dos vías para azúcares reductores liberados por cáscara de cacao para las cepas UIS122, UIS134, UIS1244 (control) y UIS1245 (control)*

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	p
Tiempo	3	1.8589	0.6196	28.02	0.000001
Cepa	3	0.6714	0.2238	10.12	0.000043
Interacción					
Tiempo×Cepa	9	0.8059	0.0895	4.05	0.000762
Error	48	1.3296	0.0277		
Total	63	4.6658			

\* Nota:  $P < 0.001$  (altamente significativo).

**Tabla F4.**

*Prueba HSD de Tukey para azúcares reductores liberados por cáscara de cacao para las cepas UIS122, UIS134, UIS1244 (control) y UIS1245 (control)*

Comparación	p-ajustada	Significancia
UIS122 vs UIS1244	0.9971	no significativo ( $P > 0.05$ )
UIS122 vs UIS1245	0.7418	no significativo ( $P > 0.05$ )
UIS122 vs UIS134	0.0217	$P < 0.05$
UIS1244 vs UIS1245	0.8319	no significativo ( $P > 0.05$ )
UIS1244 vs UIS134	0.0111	$P < 0.05$
UIS1245 vs UIS134	0.0008	$P < 0.01$

**Tabla F5.**

*Análisis anova de dos vías para azúcares reductores liberados por semillas de açai para las cepas UIS122, UIS134, UIS1244 (control) y UIS1245 (control)*

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	p
Tiempo	3	1.2774	0.4258	27.34	$< 0.001^*$
Cepa	3	0.4368	0.1456	9.35	$< 0.001^*$
Interacción					
Tiempo×Cepa	9	1.1573	0.1286	8.26	$< 0.001^*$
Error	32	0.4983	0.0156		

**Tabla F6.**

*Prueba HSD de Tukey para azúcares reductores liberados por semillas de açai para las cepas UIS122, UIS134, UIS1244 (control) y UIS1245 (control)*

Comparación	p-ajustada	Significancia
UIS122 vs UIS1244	0.6038	no significativo (P>0.05)
UIS122 vs UIS1245	0.4733	no significativo (P>0.05)
UIS122 vs UIS134	0.0661	no significativo (P>0.05)
UIS1244 vs UIS1245	0.9966	no significativo (P>0.05)
UIS1244 vs UIS134	0.5637	no significativo (P>0.05)
UIS1245 vs UIS134	0.6945	no significativo (P>0.05)