

---

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA



## PRODUCCIÓN DE XILANASAS Y CELULASAS POR *Trichoderma harzianum* EN FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

**I.B.I. NOHEMI LÓPEZ RAMIREZ**

DR. ERNESTO FAVELA TORRES

DR. GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA

DRA. LUZ MARIA ZENIT TOVAR CASTRO

DIRECTOR DE TESIS

ASESOR

ASESOR

---

---

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa está incluida en el Padrón Nacional de Posgrados de CONACYT, en el nivel de Competencia Internacional, con la referencia 001465.

---

---

México D.F. a 11 de Julio de 2014

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la  
tesis:

**“PRODUCCIÓN DE XILANASAS Y CELULASAS POR *Trichoderma  
harzianum* EN FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO”**

Que presentó

**I.B.I. Nohemi López Ramirez**

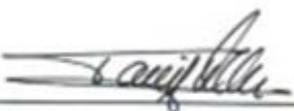
Comité tutorial:

Director: Dr. Ernesto Favela Torres

Asesores: Dr. Gerardo Saucedo Castañeda  
Dra. Luz María Zenit Tovar Castro

Jurado:

Presidente: Dra. Tania L. Volke Sepúlveda  
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa



---

Secretario: Dra. Luz Ma. Zenit Tovar Castro  
Universidad Autónoma de Querétaro



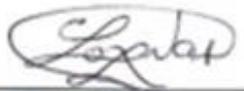
---

Vocal: Dra.: María Teresa Torres Mancera  
Tecnológico de Estudios Superiores de Coacalco



---

Vocal M. en C. Lorena Pedraza Segura  
Universidad Iberoamericana



---

---

*A Cristofer y Nokemi*

---

---

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres Emiliano y Praxedis por el gran amor y apoyo que me han brindado en todo momento.

A mis hermanos por estar siempre conmigo.

Al Dr. Ernesto Favela Torres, por darme la oportunidad de trabajar con él, por dirigir esta tesis, y por los consejos académicos y personales.

A las Dras. Tania, Tere, Lorena y Luz por sus pertinentes comentarios y sugerencias que llevaron a la mejora del presente documento.

A Gregorio Juárez Luna por el todo el apoyo que me brindó en la parte más laboriosa de este trabajo.

A mis compañeros de la Planta Piloto 4. A Isabel, Daniela, Gabriela, Susana, Nayeli, Javier, a todos gracias por sus consejos, observaciones, por apoyarme en los momentos más difíciles y hacer que el trabajo en el laboratorio fuera más agradable de lo que ya es.

---

---

# Contenido

Índice de Figuras.....	i
Índice de Tablas.....	iv
<b>1. Introducción</b> .....	1
<b>2. Revisión Bibliográfica</b> .....	3
2.1. Fermentación en Estado Sólido.....	3
2.2. Biorreactores.....	4
2.3. Tamaño del reactor.....	5
2.3.1. Biorreactores de escala laboratorio.....	5
2.3.2. Biorreactores a escala semipiloto/piloto.....	6
2.3.3. Biorreactores de escala piloto e industrial.....	7
2.4. Tipos de soporte.....	9
2.4.1. Sustratos naturales.....	9
2.4.2. Soportes inertes.....	9
2.5. Microorganismos.....	9
2.6. Celulasas y xilanasas.....	11
2.6.1. Celulasas.....	12
2.6.2. Xilanasas.....	13
<b>3. Justificación</b> .....	18
<b>4. Antecedentes</b> .....	17
<b>5. Hipótesis</b> .....	24
<b>6. Objetivos</b> .....	24
6.1. General.....	24
6.2. Particulares.....	24
<b>7. Materiales y métodos</b> .....	21
7.1. Microorganismo.....	21
7.2. Medios de cultivo.....	21
7.2.1. Medio de cultivo para la esporulación.....	21
7.2.2. Medio de cultivo para micelio.....	21
7.2.3. Medio de cultivo para la producción de celulasas y xilanasas.....	21

---

---

7.3.	Suspensión de esporas .....	21
7.4.	Soporte.....	22
7.5.	Fermentación .....	22
7.5.1.	Condiciones de operación .....	23
7.6.	Estimación indirecta del crecimiento microbiano.....	27
7.7.	Determinación de parámetros de crecimiento.....	28
7.8.	Determinación del coeficiente respiratorio (CR).....	29
7.9.	Métodos analíticos .....	30
7.9.1.	Determinación de pH.....	30
7.9.2.	Glucosa .....	30
7.9.3.	Actividad de agua .....	31
7.9.4.	Humedad.....	31
7.9.5.	Actividad enzimática .....	31
7.10.	Análisis estadístico.....	32
<b>8.</b>	<b>Resultados y discusión</b> .....	<b>33</b>
8.1.	Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y producción de enzimas por <i>T. harzianum</i> PBLA en FES.....	34
8.2.	Acumulación de calor metabólico en BRTV. ....	39
8.3.	Efecto de la concentración de MgSO <sub>4</sub> sobre la producción de CO <sub>2</sub> y la actividad enzimática con <i>T. harzianum</i> PBLA en FES. ....	44
8.4.	Cinética de crecimiento de <i>T. harzianum</i> PBLA y producción de enzimas 50	
8.5.	Crecimiento de <i>T. harzianum</i> PBLA y producción de enzimas en biorreactor de tanque agitado .....	56
<b>9.</b>	<b>Conclusiones</b> .....	<b>71</b>
<b>10.</b>	<b>Referencias bibliográficas</b> .....	<b>72</b>

---

---

## Índice de Figuras

- Figura 1.** Biorreactores tubulares verticales empacados con aserrín inoculado con *T. harzianum* PBLA incubados en un baño con agua a 30°C. ....23
- Figura 2.** Esquema de BRTV de 4.7 cm de diámetro. La distancia indica la altura en la que se colocaron los termopares. ....25
- Figura 3.** Diagrama del sistema de respirometría. 1: compresor de aire; 2: regulador de presión; 3: baño con agua; 4: columnas o BR; 5: columnas con sílica; 6: válvulas solenoide; 7: medidor de flujo; 8: detector de CO<sub>2</sub> infrarrojo; 9: detector de O<sub>2</sub>; 10: venteo; 11: controlador lógico programable (PLC); 12: Datalogger M6+; 13: computadora. ....28
- Figura 4.** Tasa de producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA en FES con diferentes temperaturas de incubación. ....34
- Figura 5.** Producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA en FES con diferente temperatura de incubación...35
- Figura 6.** Tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> ( $\mu_{CO_2}$ ) en función de las temperaturas evaluadas durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA en FES. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa en los valores de  $\mu_{CO_2}$  en las temperaturas evaluadas. ....36
- Figura 7.** Actividad xilanasas y celulasas al final del cultivo en función de la temperatura de incubación de *T. harzianum* PBLA en FES. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa en los valores de actividad enzimática en las temperaturas evaluadas. ....37
- Figura 8.** Perfil de temperatura en BRTV de 4.7 cm de diámetro durante el cultivo de *T. harzianum*. Fig. a) Corresponde al medio inoculado con esporas. Fig. b) Corresponde al medio inoculado con micelio. Los termopares se colocaron a 0, 3, 6 y 9 cm del fondo de los biorreactores.....40
- Figura 9.** Tasa de producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA. 10a) BRTV de 2.3 cm de diámetro inoculados con esporas. 10b) BRTV de 4.7 cm de diámetro inoculados con micelio. Las dos series de datos corresponden a duplicados.....41
- Figura 10.** Producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA. En (a) BRTV 2.3 cm de diámetro inoculados con esporas y (b) BRTV de 4.7 cm de diámetro inoculados con micelio. Las dos series de datos corresponden a duplicados.....42

<b>Figura 11.</b> Tasa de producción de CO <sub>2</sub> en función del tiempo durante el cultivo de <i>T. harzianum</i> PBLA en FES con diferente concentración de MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (21 y 0.42 g/L) en un tiempo de 50 h de cultivo, realizado por triplicado. ....	45
<b>Figura 12.</b> Producción de CO <sub>2</sub> y consumo de glucosa durante el cultivo de <i>T. harzianum</i> PBLA en FES con diferentes concentraciones de MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (21 y 0.42 g/L) en un tiempo de 50 h de cultivo. ....	46
<b>Figura 13.</b> BRTV empacados con aserrín utilizado como soporte, inoculado con <i>T. harzianum</i> PBLA después de 50 h de cultivo. a) 0.42g/L, b) 21g/L. ....	47
<b>Figura 14.</b> Cinética enzimática xilanasa con <i>T. harzianum</i> PBLA en FES con MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (21 y 0.42 g/L) en 50 h de cultivo. ....	48
<b>Figura 15.</b> Efecto de la concentración inicial de MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O sobre el pH, aw y humedad (%) durante la FES con <i>T. harzianum</i> PBLA.....	49
<b>Figura 16.</b> Tasa de producción de CO <sub>2</sub> en función del tiempo, durante el cultivo de <i>T. harzianum</i> PBLA en FES. En (a) BRTV con inóculo de esporas y (b) BRTV con inóculo de micelio. Cada serie de datos representa una réplica. ....	50
<b>Figura 17.</b> Producción de CO <sub>2</sub> en función del tiempo durante el cultivo de <i>T. harzianum</i> PBLA en FES. En (a) BRTV con inóculo de esporas y (b) BRTV con inóculo de micelio. Cada serie de datos representa una réplica. ....	51
<b>Figura 18.</b> Coeficiente respiratorio (CR) en función del tiempo durante el cultivo de <i>T. harzianum</i> PBLA en FES.....	52
<b>Figura 19.</b> Consumo de glucosa y producción de xilanasa en función del tiempo durante el cultivo de <i>T. harzianum</i> PBLA en FES.....	53
<b>Figura 20.</b> Valores de pH, humedad y actividad de agua durante el cultivo de <i>T. harzianum</i> PBLA en FES. a, b y c: corresponden al inóculo con esporas. d, e y f: corresponden al inóculo de micelio. ....	55
<b>Figura 21.</b> Tasa de producción de CO <sub>2</sub> en función del tiempo durante el cultivo de <i>T. harzianum</i> PBLA en FES utilizando biorreactores diferentes (símbolos llenos: BRTV, círculos vacíos: BRTH-1, cuadros vacíos: BRTH-2). ....	56
<b>Figura 22.</b> Producción de CO <sub>2</sub> en función del tiempo durante el cultivo de <i>T. harzianum</i> PBLA en FES utilizando biorreactores diferentes (figuras rellenas: BRTV, círculos vacíos: BRTH-1, cuadros vacíos: BRTH-2). ....	57
<b>Figura 23.</b> Actividad xilanasa y celulasa en función del tiempo durante el cultivo de <i>T. harzianum</i> PBLA en FES en BRTV y BRTH agitado. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa en los valores de	

---

en la actividad xilanasa y celulasa, en los tipos de biorreactor evaluados.....	58
<b>Figura 24.</b> Coeficiente respiratorio acumulado (CR) en función del tiempo durante el cultivo de <i>T. harzianum</i> PBLA en FES utilizando biorreactores diferentes (figuras rellenas: BRTV, círculos vacíos: BRTH-1, cuadros vacíos: BRTH-2). ....	59
<b>Figura 25.</b> Tasa de producción de CO <sub>2</sub> en función del tiempo durante el cultivo de <i>T. harzianum</i> PBLA en FES utilizando biorreactores diferentes (figuras rellenas: BRTV, círculos vacíos: BRTH-1, cuadros vacíos: BRTH-2). ....	61
<b>Figura 26.</b> Producción de CO <sub>2</sub> en función del tiempo durante el cultivo de <i>T. harzianum</i> PBLA en FES inoculado con micelio utilizando biorreactores diferentes (figuras rellenas: BRTV, círculos vacíos: BRTH-1, cuadros vacíos: BRTH-2). ....	62
<b>Figura 27.</b> Cinética enzimática de actividad xilanasa en función del tiempo durante el cultivo de <i>T. harzianum</i> PBLA en FES inoculado con micelio en BRTV y BRTH agitado.....	62
<b>Figura 28.</b> Consumo de glucosa en función del tiempo durante el cultivo de <i>T. harzianum</i> PBLA en FES inoculado con micelio en BRTV y BRTH....	63
<b>Figura 29.</b> Coeficiente respiratorio (CR) en función del tiempo durante el cultivo de <i>T. harzianum</i> PBLA en FES inoculado con micelio utilizando biorreactores diferentes (figuras rellenas: BRTV, círculos vacíos: BRTH-1, cuadros vacíos: BRTH-2). ....	64
<b>Figura 30.</b> Perfil de temperaturas en biorreactores agitados en FES con aserrín de pino como soporte inoculado micelio de <i>T. harzianum</i> PBLA.....	65
<b>Figura 31.</b> pH, aw y humedad (%) sobre cinética en BRTV y BRTH agitado ....	67

---

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Títulos de producción de actividades xilanasas y celulasa por diferentes microorganismos* .....	12
<b>Tabla 2.</b> Características de algunas xilanasas producidas por diferentes microorganismos* .....	15
<b>Tabla 3.</b> Condiciones de operación de los reactores .....	24
<b>Tabla 4.</b> Máxima producción de CO <sub>2</sub> en función del tiempo .....	35
<b>Tabla 5.</b> Valores de pH, aw y humedad (%) evaluadas a diferentes temperaturas al inicio y final del cultivo. ....	38
<b>Tabla 6.</b> Parámetros cinéticos de un cultivo de <i>T. harzianum</i> PBLA en BRTV inoculado con suspensión de esporas y micelio evaluados sobre la acumulación de calor metabólico .....	42
<b>Tabla 7.</b> Valores de pH, aw y humedad (%) en los cultivos realizados en BRTV de diferente diámetro al inicio y final del cultivo.....	43
<b>Tabla 8.</b> Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>T. harzianum</i> PBLA con diferentes concentraciones de MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	46
<b>Tabla 9.</b> Parámetros cinéticos de <i>T. harzianum</i> PBLA en FES en BRTV de 2.3 cm de diámetro.....	53
<b>Tabla 10.</b> Parámetros cinéticos de <i>T. harzianum</i> PBLA en BRTV y BRTH.....	59
<b>Tabla 11.</b> Valores de pH, aw y humedad (%) en BRTV y BRTH al inicio y final del cultivo .....	60
<b>Tabla 12.</b> Parámetros cinéticos de <i>T. harzianum</i> PBLA BTRV y BRTH.....	64
<b>Tabla 13.</b> Resumen de parámetros cinéticos y actividades enzimáticas obtenidos en los biorreactores de FES, bajo diferentes condiciones de cultivo. ....	68
<b>Tabla 14.</b> Producción de celulasas y xilanasas por diferentes cepas de <i>T. harzianum</i> reportadas en la literatura. ....	70

---

## RESUMEN

En los últimos años, el aprovechamiento de residuos agroindustriales a través de procesos biotecnológicos ha amentado significativamente. La fermentación en estado sólido (FES) ha contribuido enormemente a este propósito. Por el bajo contenido de agua libre, la FES es ventajosa para el crecimiento de hongos filamentosos. *Trichoderma* sp. es un género de hongos filamentosos implicado en la descomposición de residuos agrícolas, por lo que se considera buen productor de enzimas lignocelulolíticas.

El objetivo de este trabajo fue demostrar el efecto de la agitación sobre el crecimiento y producción de celulasas y xilanasas por *Trichoderma harzianum* en FES. Para lo anterior, se utilizó la cepa *T. harzianum* PBLA y aserrín de pino como soporte sólido. El crecimiento del microorganismo se determinó indirectamente por la respiración del mismo, mediante la producción en línea de CO<sub>2</sub> con el uso de un respirómetro. Se evaluaron biorreactores tubulares verticales (BRTV) y de tanque horizontal (BRTH).

En primer lugar, se evaluó la producción de CO<sub>2</sub> y de enzimas xilanasas y celulasas a diferentes temperaturas (28, 30, 32 y 34°C) en BRTV. La máxima tasa de producción de CO<sub>2</sub> fue de 6-7 mg CO<sub>2</sub>/g de materia seca inicial por hora (msi h) a las 23 h de cultivo, siendo independiente de la temperatura. La máxima producción de CO<sub>2</sub> fue de 70 mg CO<sub>2</sub>/g msi a 34°C, y la mayor actividad xilanasas y celulasas (79 y 8 U/g msi, respectivamente) se obtuvo a 30°C, eligiendo ésta temperatura para los siguientes estudios. Posteriormente, se evaluó la acumulación de calor metabólico en BRTV de 4.7 cm de diámetro. Se demostró que la acumulación de calor metabólico en BRTV fue menor cuando éstos se incubaron en agua que cuando se mantuvieron en una atmósfera de aire a temperatura controlada. Se obtuvieron gradientes de temperatura de hasta 5°C.

También se evaluó el efecto de la concentración de sulfato de magnesio (0.42 y 21 g/L). Como resultado se obtuvo que la concentración del sulfato de magnesio no tuvo un efecto sobre la máxima tasa y la producción de CO<sub>2</sub>, tasa específica de

---

producción de CO<sub>2</sub>, tiempo *lag*, actividad xilanasa y celulasa. La mayor actividad xilanasa fue de 15 U/g msi al final del cultivo (51 h) y no se detectó actividad celulasa. Para determinar el tiempo de cultivo de mayor actividad enzimática, se realizaron dos cinéticas con diferente tipo de inóculo (esporas y micelio), obteniendo una mayor tasa de producción de CO<sub>2</sub> con el inóculo de micelio (8.2 mg CO<sub>2</sub>/g msi h) a las 16 h de cultivo. La máxima actividad xilanasa se obtuvo, en ambos casos, una vez que se consumió toda la glucosa del medio; sin embargo, se obtuvo una mayor actividad cuando el inóculo fueron esporas (38 U/g msi) en comparación con el inóculo con micelio (26 U/g msi).

En la última etapa se evaluó el efecto de la agitación sobre la producción de CO<sub>2</sub> y la actividad enzimática en BRTH agitados. La producción de CO<sub>2</sub> fue mayor en BRTH agitados (96-111 mg de CO<sub>2</sub>/g msi) con respecto a la obtenida en BRTV (48-67 mg CO<sub>2</sub>/g msi), con una máxima tasa de producción de casi el doble. Los parámetros como  $\mu_{CO_2}$  y tiempo *lag* fueron similares en ambos sistemas. La mayor actividad xilanasa obtenida en los BRTH fue de 34 y 39 U/g msi a las 24 h de cultivo.

Con este trabajo se demuestra la factibilidad técnica del proceso de producción de xilanasas por *T. harzianum* PBLA en biorreactores horizontales con agitación intermitente.

## 1. Introducción

La fermentación en estado sólido (FES) implica el crecimiento de microorganismos en partículas sólidas húmedas, en las que los espacios entre las partículas contienen una fase continua de gas y un mínimo de agua. La mayoría del agua en el sistema está absorbida dentro de las partículas del sólido (Mitchell y col., 2006). Los sustratos sólidos son típicamente residuos agroindustriales de bajo costo, como el salvado de trigo, rastrojo de maíz, paja de trigo o de otra biomasa agrícola (Brijwani y col., 2011).

Durante las últimas dos décadas, la FES ha tenido un gran interés debido a las ventajas potenciales de este proceso biotecnológico en comparación con la fermentación sumergida. Estas ventajas incluyen reactores con volúmenes más pequeños, menores costos de procesamiento de agua, productividades superiores, es una técnica simple y se requiere menos energía. Por otro lado, la principal desventaja se relaciona con la dificultad en el control de parámetros de la fermentación, como el pH, temperatura y humedad (Hamidi y col, 2004).

Estrategias de operación, como la aireación y agitación tienen un efecto directo sobre la transferencia de O<sub>2</sub>, la eliminación de calor y el control de la humedad, lo que puede mejorar el rendimiento del crecimiento microbiano en biorreactores (Paula y col., 2007).

Los hongos filamentosos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y suelen crecer sobre materiales sólidos, como plantas, granos y animales. Estos organismos producen eficientemente diferentes enzimas para degradar estos materiales sólidos y utilizar los nutrientes para su supervivencia. Dentro de los hongos filamentosos con mayor capacidad de degradación de fibra de origen vegetal se encuentra el género *Trichoderma* (Ito y col., 2011).

La FES con hongos de rápido crecimiento se asocia con altas tasas de generación de calor metabólico. La eliminación eficiente del calor metabólico es un reto importante en el diseño de biorreactores de gran escala para los procesos de FES; especialmente para aquellos procesos realizados con hongos, en los que es deseable que el lecho de fermentación permanezca estático durante la mayor parte

del proceso, ya que un mezclado constante o frecuente causa daño a las hifas fúngicas al sustrato (Khanahmdi y col., 2006).

En la primera parte de este trabajo se hace una revisión de la literatura relacionada con la fermentación en estado sólido, tipos de biorreactores, microorganismos utilizados para la producción de enzimas celulasa y xilanasas, así como algunos aspectos generales de estas últimas. Posteriormente, se presenta la justificación, hipótesis y objetivos de este trabajo. A continuación, se presentan de manera detallada los métodos y materiales utilizados. En seguida se presentan los principales resultados obtenidos a lo largo del trabajo experimental; simultáneamente se discuten los resultados y; al final se presentan las principales conclusiones de este trabajo.

## **2. Revisión Bibliográfica**

### **2.1. Fermentación en Estado Sólido**

El término Fermentación en Estado Sólido (FES) indica el cultivo aerobio o anaerobio de microorganismos que crecen en la superficie o al interior de una matriz sólida porosa. Esta matriz puede estar constituida por un sustrato húmedo o por un soporte inerte capaz de absorber los nutrientes que se encuentran disueltos en una solución sin escurrimiento de líquidos (Roussos y Perraud 1996). La matriz sólida puede ser la fuente de nutrientes o bien, un soporte impregnado por los nutrientes apropiados, lo que permite el desarrollo de los microorganismos.

La FES se parece al hábitat natural de los hongos filamentosos y es, por lo tanto, la elección preferida para los microorganismos para crecer y obtener productos útiles de alto valor agregado. La FES tiene grandes aplicaciones industriales y, algunas de ellas, se ha experimentado un crecimiento sin precedentes (Rani y col., 2009). A continuación se presentan algunos ejemplos de aplicación de FES en bioprocesos de biorremediación de sitios contaminados y biodegradación de compuestos peligrosos, desintoxicación biológica de residuos agroindustriales y bioconversión de biomasa. La FES ha sido también estudiada para la producción de productos de alto valor agregado, tales como, antibióticos, alcaloides vegetales, factores de crecimiento, enzimas, ácidos orgánicos, biopesticidas, bioherbicidas, biosurfactantes, compuestos aromáticos, entre otros.

La FES tiene numerosas ventajas, es una técnica sencilla, con baja inversión de capital, reducción de energía, baja producción de aguas residuales, mejor recuperación de productos y ausencia de problemas por formación de espuma (Lonsane y col., 1985). Una ventaja adicional es que la concentración de los productos es mayor en la FES con respecto a la fermentación sumergida. Sin embargo, a pesar de su éxito en condiciones de laboratorio, las dificultades tecnológicas relacionadas con la transferencia de masa y energía, dificultan la aplicación en gran escala (Mitchell y col., 2002)

## **2.2. Biorreactores**

En todo proceso hay un equipo crítico donde se forman los productos a obtener, en este caso el equipo donde se lleva a cabo la fermentación es llamado biorreactor. Éste contiene al material biológico y proporciona las condiciones de operación adecuadas para que el microorganismo produzca el compuesto deseado. El diseño de biorreactores para la fermentación en estado sólido ha avanzado lentamente en la última década debido a problemas de operación, fenómenos de transporte y escalamiento, por lo que es un área de la biotecnología que se encuentra en un estado de intenso desarrollo (Ruiz y col., 2005).

En un proceso de fermentación, el biorreactor proporciona el entorno para el crecimiento y la actividad de los microorganismos que llevan a cabo las reacciones biológicas. Durante el periodo de fermentación, el biorreactor deberá prevenir la liberación de biomasa al medio ambiente, así como prevenir la entrada de sustancias extrañas en el medio de reacción. Un fermentador ideal deberá tener varias características, en particular, el material de construcción no debe ser tóxico ni ser afectado por corrosión química, y debe ser capaz de operar a presiones superiores a la atmosférica. El biorreactor debe contar con dispositivos adecuados para la aireación, agitación, toma de muestras, carga y descarga, un mecanismo de enfriamiento para controlar la temperatura dentro de éste.

Los parámetros del proceso son factores muy importantes a considerar en el diseño del biorreactor (Pandey, 1991). Los criterios más importantes para el diseño de un biorreactor pueden resumirse del siguiente modo, dependiendo del tipo de biorreactor y la fermentación a realizar (Mitchell y col., 2006):

- El tanque debe diseñarse para que funcione asépticamente durante el tiempo de duración del proceso biológico. Esto prevendrá la presencia de contaminantes durante el proceso.
- Debe permitir una gran área de contacto entre las fases biótica y abiótica del sistema, es decir, se debe proporcionar un sistema adecuado de aireación y agitación para cubrir las necesidades metabólicas de los microorganismos.

- El consumo de energía debe ser mínimo.
- Debe de contar con entradas para la adición de nutrientes y el control de pH.
- El crecimiento microbiano es generalmente exotérmico, por lo que, el biorreactor debe facilitar la transferencia de calor del medio hacia las células y viceversa, a medida que se produce el crecimiento celular, además de mantener estable la temperatura deseada.
- Mantener las células uniformemente distribuidas en todo el volumen del cultivo.
- Suministrar oxígeno a una velocidad tal que satisfaga su demanda.
- El diseño debe ser tal que permita mantener el cultivo puro, una vez que todo el sistema ha sido esterilizado y, posteriormente, inoculado con el microorganismo deseado.

El diseño y operación de los biorreactores deben ser optimizados para obtener la máxima concentración de productos de la fermentación, como son la biomasa microbiana y/o metabolitos en un tiempo mínimo y a menor costo de producción (Ruiz y col., 2007).

### **2.3. Tamaño del reactor**

Dentro de los procesos de fermentación en medio sólido existen tres categorías de biorreactores en función de sus dimensiones y/o capacidad de operación: i) escala laboratorio, utilizando cantidades de medio sólido menores a un kilogramo, ii) escala piloto, donde se utilizan varios kilogramos y iii) nivel industrial que puede utilizar hasta varias toneladas (Durand, 2003).

#### **2.3.1. Biorreactores de escala laboratorio**

Existen diversos diseños de biorreactores de escala laboratorio. Algunos de los biorreactores utilizados a escala laboratorio son cajas Petri, matraces Erlenmeyer y columnas verticales. Estos son utilizados por su simplicidad, control de asepsia y de temperatura de incubación en ausencia de acumulación de calor metabólico (Ruiz y col., 2007).

Biorreactor de columna. Es uno de los sistemas para fermentación en medio sólido a nivel laboratorio más utilizado. Fue desarrollado y patentado por el grupo del Instituto para la Investigación y Desarrollo (IRD) en Francia, entre 1975 y 1980. El sistema para fermentación está compuesto por pequeñas columnas de dos a cuatro centímetros de diámetro y veinte centímetros de altura, que son empacadas con un medio previamente inoculado y puesto en un termorregulador de agua. El equipo puede estar conectado a un dispositivo para análisis de gases de fermentación ( $O_2$  y  $CO_2$ ). Los requerimientos de oxígeno en procesos aerobios se cubren por aireación forzada utilizando compresores con sistemas de regulación de presión.

### **2.3.2. Biorreactores a escala semipiloto/piloto**

A continuación se detallan las principales características de los biorreactores a escala semipiloto.

- Tambor horizontal. Es uno de los biorreactores en estado sólido más utilizado. Se trata de un contenedor rotatorio, perforado o con paletas, con el fin de obtener una agitación continua del sustrato sólido para incrementar el contacto entre paredes del biorreactor y el sustrato, así como, para proveer mayor oxígeno al microorganismo. Los equipos rotatorios, desarrollados por el grupo Several, consisten en un cilindro, con o sin chaqueta con agua para el control de temperatura, el cual gira lentamente volteando el medio de cultivo ayudado de pestañas que se encuentran adheridas a la pared.
- Biorreactor Zymotis. Diseñado y desarrollado por el grupo ORSTOM (hoy IRD), el cual consiste en platos verticales por donde internamente hay transferencia de calor debido a la circulación de agua fría, mientras, que el aire previamente temporizado es introducido por el fondo del sistema. Entre cada plato se carga el medio sólido previamente inoculado, dicha cama se mantiene estática durante la fermentación. Este sistema es parecido a los biorreactores de columna, con la diferencia de que las capas de sustrato están verticalmente fijas, por lo tanto es difícil de trabajar en condiciones asépticas.

- Biorreactores de tornillo sinfín. Su principio es el empleo de un tornillo sin fin que sirve para alimentar y agitar el material sólido en el biorreactor. Los estudios correspondientes de mezclado, crecimiento fúngico y niveles de esporulación han sido llevados a cabo en condiciones exitosas de operación continua, debido a que el tiempo de residencia del complejo sustrato-microorganismo-enzima es menor que en los biorreactores convencionales y al estar en condiciones cerradas la asepsia es mayor.
- Biorreactor columna-charola. Este diseño fue realizado por el departamento de Investigación en Alimentos de la Universidad Autónoma de Coahuila. Consiste de una columna de 13 pulgadas de altura y un diámetro de 10 pulgadas. En su interior se encuentran ocho charolas perforadas, las cuales tienen una capacidad de 140 ml cada una. La transferencia de oxígeno es por burbujeo a través de un distribuidor de aire, permitiendo la transferencia un flujo de 194 ml/min. La temperatura es regulada por una chaqueta de enfriamiento y/o calentamiento, por lo que es posible controlar y medir cambios de temperatura.

### **2.3.3. Biorreactores de escala piloto e industrial**

El número de biorreactores utilizados a escala piloto y en la industria es más escaso debido a las siguientes limitantes en el proceso de fermentación (Durand, 2003):

- Por arriba de una cierta cantidad crítica de sustrato, la eliminación de calor se convierte en un problema difícil de resolver y restringe las estrategias de diseño posibles, el medio se compacta, afectando la transferencia de calor y masa.
- Las propiedades del microorganismo con respecto a su resistencia a la agitación mecánica, su necesidad de oxígeno y tolerancia a la temperatura. Cuando las hifas no tienen septos, pueden ser destruidas por agitación mecánica.
- La naturaleza del sustrato y la necesidad de pretratarlo

- Procedimientos requeridos para la esterilización de medio, inoculación y mantenimiento de condiciones asépticas durante el cultivo.
- Los problemas de transferencia de calor y masa se pueden relacionar con ausencia de agitación y/o bajas tasas de aireación.

A continuación se describen los principales tipos de biorreactores a nivel piloto e industrial.

- Biorreactor Biocon. Biocon diseñó, desarrolló y patentó un biorreactor llamado PlaFactor para llevar a cabo fermentaciones usando matrices sólidas. El sistema fue diseñado para su operación controlada y automatizada para un proceso similar al de cultivo en charola, el cual ya es utilizado eficientemente en plantas industriales en Biocon, en el desarrollo de productos de uso alimenticio. La fermentación se lleva a cabo en un biorreactor controlado por computadora. Todas las operaciones del proceso, como esterilización, enfriamiento, inoculación, control, recuperación de producto y post-esterilización, se realiza en un solo equipo. El equipo consta de charolas selladas colocadas una sobre la otra formando dos torres unidas por un eje central. Cada módulo cuenta con un brazo de mezclado, el cual rota alrededor axialmente, y con canales de remoción de calor metabólico, control de humedad, aireación y vapor para esterilización. Este equipo fue diseñado con el objetivo de remplazar los cuartos de incubación por un equipo más compacto.
- Biorreactor de lecho empacado. Sistema de operación de modo intermitente el cual puede ser operado por altos periodos de tiempo a un alto valor de productividad. Los primeros biorreactores constan de un cilindro de vidrio y/o acero inoxidable, con o sin chaqueta. En este tipo de biorreactores se presentan problemas de compactación similares a los presentados en los equipos de lecho empacado. La reducción del grado de empaque en el lecho de fermentación ha permitido un mejor funcionamiento de este sistema, ya que se utilizan pedazos de esponjas, troncos naturales, o polímeros

sintéticos. Dichos soportes son mezclados con el medio sólido a fermentar. El principio del diseño se basa en proveer aireación con un flujo de aire forzado a través del lecho de fermentación.

## **2.4. Tipos de soporte**

La selección de un sustrato apropiado es uno de los aspectos más importantes para la obtención de los productos de interés. Los materiales sólidos son no solubles y actúan como soporte físico e incluso como fuente de nutrientes. Las características del sustrato sólido están estrechamente relacionadas con los sistemas de FES. Una de estas características es la superficie sobre la que se desarrolla el proceso (Pandey y col., 2003). Hoy en día, según la naturaleza de la fase sólida utilizada se pueden distinguir dos tipos de sistemas de FES: i) FES en sustratos sólidos naturales y ii) FES en soportes inertes impregnados (Barrios, 2012).

### **2.4.1. Sustratos naturales**

Los sustratos utilizados suelen ser subproductos agroindustriales como granos de arroz, tubérculos de yuca, soya, salvado de trigo, harina de maíz y paja de trigo, entre otros. Estos sustratos pueden requerir de una preparación o de tratamiento previo. El picado o la molienda puede ser necesaria para reducir el tamaño de partícula. En ocasiones un pretratamiento térmico o hidrólisis química podrían ser necesarios para aumentar la susceptibilidad al ataque microbiano de macromoléculas dentro del sólido (Mitchell y col., 2002).

### **2.4.2. Soportes inertes**

La FES en soportes inertes impregnados se utilizó inicialmente para estudios básicos de FES, ya que la composición del medio de cultivo puede ser diseñada y determinada en cualquier momento del cultivo (Barrios, 2012). Algunos ejemplos de soportes inertes utilizados en FES son, vermiculita, amberlita, agrolita, espuma de poliuretano y poliestireno (Ooijkaas y col., 2000).

## **2.5. Microorganismos**

Los hongos filamentosos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y suelen crecer sobre materiales sólidos, como plantas, granos y animales. Estos organismos

producen eficientemente diferentes enzimas para degradar estos materiales sólidos y utilizar los nutrientes para su sobrevivencia. La FES ha sido utilizada para la producción de alimentos y bebidas tradicionales durante muchos años (Ito y col., 2011) y en algunos casos para obtener mejores niveles de producción de enzimas y metabolitos por hongos filamentosos, se prefiere realizar el cultivo sólido en lugar de cultivo líquido (Hölker y Lenz, 2004). Dentro de los hongos filamentosos con mayor capacidad de degradación de fibra de origen vegetal, se encuentra el género *Trichoderma*.

El descubrimiento de hongos del género *Trichoderma* se remonta a la segunda guerra mundial, cuando las fuerzas aliadas en el Pacífico Sur sufrieron la destrucción del algodón de sus ropas y tiendas de campaña. El invisible “enemigo” fue identificado como un microscópico hongo, *Trichoderma viride*. El hongo fue renombrado a *T. reesei* en honor a Elwyn Ressei, quien lo descubrió en 1940.

El informe de Mandels y Sternberg (1976) resume datos de más de 14000 hongos recolectados y examinados desde el punto de vista de su actividad celulasa. Debido a que no se encontraron competidores de *T. reesei*, con el tiempo se coronó como el “rey” de los hongos celulolíticos (Gusakov, 2011). *Trichoderma sp.* comprende un grupo de hongos de la división *Ascomycota*, aerobios, mesófilos, comunes en el suelo en todas las zonas climáticas y prevalecen en la hojarasca de los bosques húmedos (Nevalainen y col., 1994). Los hongos de este género son colonizadores de materiales celulósicos y, por lo tanto, a menudo pueden encontrarse en cualquier material vegetal en descomposición, así como en la rizósfera de plantas, donde se puede inducir resistencia sistémica frente a patógenos (Schuster y Schmoll, 2010).

La producción de celulasas por *Trichoderma sp.* está sujeta a una serie de controles genéticos y bioquímicos. Uno de los controles más importantes sobre la actividad de estas enzimas es la inhibición por producto final. La última enzima de la secuencia de hidrólisis de celulosa, la celobiosa, es inhibida por glucosa. Probablemente, el inconveniente más grave del complejo de celulasas de *Trichoderma sp.* es su ineficiencia debido a su baja actividad específica. Hasta hace

poco, las cepas disponibles producían celulasas con actividad específica de alrededor de 0.6 U/mg de proteína (Montenecourt, 1983). Las celulasas producidas por este hongo filamentoso tienen un alto interés industrial, ya que se utilizan ampliamente en las industrias alimentaria, textil y de pulpa y papel (Domínguez y col., 2000).

Otra especie importante del género *Trichoderma* es *T. harzianum*. A este hongo se le puede encontrar en suelos y materiales orgánicos, pues puede adaptarse a diferentes condiciones ambientales, lo que le facilita su amplia distribución. *T. harzianum* es también conocido por su capacidad de producción de toxinas y antibióticos. En una etapa temprana de crecimiento, *T. harzianum* muestra un micelio color blanco y, eventualmente, desarrolla un color verde oscuro después de la esporulación. Las colonias de *T. harzianum* crecen y maduran rápidamente, a los cinco días de incubación en medio de cultivo agar de papa y dextrosa (PDA) a 25°C. Las especies de este género prefieren un pH ácido de 4.5-5 y se desarrollan en áreas con un excesivo contenido de humedad. Además, *T. harzianum*, produce enzimas hidrolíticas que degradan componentes de la pared celular de muchos microorganismos, que pueden ser utilizados como fuente de nutrientes (Romero y col., 2009).

## **2.6. Celulasas y xilanasas**

Las enzimas celulolíticas ocupan sólo dos posiciones en la nomenclatura convencional (EC 3.2.1.4 y EC 3.2.1.91). Comprenden uno de los grupos más grandes en la clasificación moderna estructural de glicosil hidrolasas, que incluyen al menos 15 familias de proteínas y algunas subfamilias (Rabinovich y col., 2002).

Las hidrolasas constituyen aproximadamente el 75% del mercado de enzimas industriales, entre las cuales se encuentran las glicosidasas, celulasas, amilasas y hemicelulasas, constituyendo el grupo más grande después de las proteasas (Collins y col., 2005). En la Tabla 1 se presentan los principales microorganismos productores de celulasas y xilanasas.

Tabla 1. Títulos de producción de actividades xilanasa y celulasa por diferentes microorganismos\*

Microorganismo	Xilanasa (U/ml)	Celulasa (U/ml)	
		APF	CMCasa
<b>HONGOS</b>			
<i>Aspergillus awamori</i> VTT-D-75028	12	0.1	3.2
<i>Aspergillus niger</i> KKS	138	3.9	1.2
<i>Aspergillus niger</i> sp.	76.6	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i> VTT-D-80134	3.7	0.1	0.7
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	3576	-	-
<i>Phanerochate chrysosporium</i>	15-20	-	1.8-2.4
<i>Piromyces</i> sp.strain E 2	7.96	0.1	0.77
<i>Schizophyllum commune</i>	1244	65.3	5
<i>Talaromyces emersonii</i> CBS 814.70	56	26.7	2.41
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	650-780	0.01	0.01
<i>Trichoderma reesei</i> ATCC 56765	400	-	6
<i>Trichoderma reesei</i>	960	0.7	9.6
<i>Trichoderma viride</i>	188	0.55	-
<b>BACTERIAS</b>			
<i>Bacillus</i> SSP-34 506	506	0.4	0.2
<i>Bacillus circulans</i>	400	0.05	1.38
<i>Bacillus stearothermophilus</i> Strain T6	2.33	-	0.02
<i>Bacillus</i> sp.	120	-	0.05
<i>Bacillus</i> sp.	11.5	-	1.2
<i>Bacillus</i> sp. Cepa NCL 87-6-10	93	-	-
<i>Bacillus circulans</i> AB 16	19.28	-	-
<i>Bacillus stearothermophilus</i> SP	0.35-0.6	-	-
<i>Clostridium absonum</i> CFR-702	258	0	0
<i>Rhodothermus marinus</i>	1.8-4.03	0.05	0.025
<i>Streptomyces cuspidosporus</i>	22-35	-	0.29
<i>Streptomyces roseiscleroticus</i> NRRLB11019	16.2	-	0.21
<i>Streptomyces</i> sp.	3.5	0	0
<i>Streptomyces</i> sp. QG-11-3	96	-	-
<i>Thermoactinomyces thalophilus</i> subgrupo C	42	0	0

\*Tabla obtenida de Subramaniyan y Prema. (2002)

### 2.6.1. Celulasas

Celulasa es el nombre genérico para el grupo de enzimas que cataliza la hidrólisis de la celulosa y oligosacáridos relacionados. La acción sinérgica de los tres tipos de enzimas celulolíticas, es decir, endo-1-4-β-glucanasa (EG, EC 3.2.1.4),

celobiohidrolasa (CBH, EC 3.2.1.91) y  $\beta$ -glucosidasa (BGL, EC 3.2.1.21) es vital para la hidrólisis enzimática completa de la celulosa (Narra, 2012).

La acción característica de las celulasas inicia con un ataque por EG, seguido por la acción combinada de CBH y EG, con hidrólisis final de los oligosacáridos pequeños, de celobiosa a glucosa (Goyal y col., 1991).

Hasta la fecha, la producción de celulasas se ha estudiado ampliamente en procesos de cultivo sumergido, pero el costo relativamente alto de la producción de enzima ha obstaculizado la aplicación industrial de bioconversión de celulosa. Liu y col. (2007) reportaron que la fermentación en estado sólido es un proceso atractivo económicamente para producir celulasas, debido a la menor inversión de capital y menores gastos de operación en este tipo de bioprocesos

### **2.6.2. Xilanasas**

Las xilanasas son glicosidasas que van desde 6 hasta 80 KDa, son activas a pH 4.5-6.5 y a temperaturas entre 40 y 60°C. Las xilanasas de diferentes fuentes difieren en sus requerimientos de pH y temperatura. Las xilanasas son o-glicósido hidrolasas (EC 3.2.1.8) que catalizan la hidrólisis de los enlaces 1,4- $\beta$ -D-xilosídicos en el xilano. Son un amplio grupo de enzimas que participa en la producción de xilosa, una fuente primaria de carbono para el metabolismo celular. Son producidas por una gran cantidad de organismos, incluyendo bacterias, algas, hongos, protozoos y artrópodos. Su nombre sistemático es endo-1,4- $\beta$ -xilanasas, pero los términos comúnmente usados son xilanasas, endoxilanasas, 1,4- $\beta$ -D-xilano-xilano-hidrolasas, endo-1,4- $\beta$ -D-xilanasas,  $\beta$ -1,4-xilanasas y  $\beta$ -xilanasas (Collins y col, 2005, Sadiq y col, 2008).

Entre las fuentes microbianas, los hongos filamentosos son especialmente importantes, ya que secretan estas enzimas y sus niveles de xilanasas son mucho más altos que los encontrados en levaduras y bacterias (Tabla 1).

Las xilanasas pueden ser producidas industrialmente por fermentación en estado líquido o por FES, pero debe tenerse en cuenta que alrededor del 80-90% de todas

las xilanasas son producidas en FEL. En FES se utiliza salvado de trigo y arroz como inductores.

Las xilanasas comerciales son producidas industrialmente en Japón, Finlandia, Alemania, Irlanda, Dinamarca, Canadá y los EE.UU. Los microorganismos utilizados industrialmente para obtener estas enzimas son, además de algunas bacterias, *Aspergillus niger*, *Trichoderma* sp. y *Humicola insolens*. Las xilanasas comenzaron a ser utilizadas en la década de los 80. En 2005, las xilanasas y celulasas junto con las pectinasas, representaron el 29% del mercado mundial de enzimas (Polizeli y col, 2005).

Las xilanasas tienen amplias aplicaciones industriales. Se utilizan en la producción de productos químicos a granel, tratamiento enzimático para liberar azúcares de pentosa, bio-blanqueo de pastas de madera, como aditivos alimentarios en industrias de panificación, ingredientes de los detergentes de lavandería o composiciones de cuidados de tejidos (Juturu y Chuan, 2012). En la Tabla 2 presentan algunas características relevantes de xilanasas producidas por diferentes microorganismos.

Tabla 2. Características de algunas xilanasas producidas por diferentes microorganismos\*

Microorganismo	Peso Molecular (KDa)	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)
<i>Acrophialophora nainiana</i>	22	7	55
<i>Aspergillus aculeatus</i>	18, 26, 52	4, 4, 5	50, 50, 70
<i>Aspergillus awamori</i>	39, 23, 26	4-5.5	45-55
<i>Aspergillus fischeri</i>	31	6	60
<i>Aspergillus fumigatus</i>	19, 8.5	5.5	55
<i>Aspergillus kawachii</i>	35,26,29	5.5, 4.5, 2	60, 55, 50
<i>Aspergillus nidulans</i>	22,34	5.5, 6	62,56
<i>Aspergillus nidulans KK-99</i>	Nd	8	55
<i>Aspergillus oryzae</i>	35	5	60
<i>Aspergillus sojae</i>	33, 36	5, 5.5	60, 50
<i>Aspergillus sp.</i>	26	5	50
<i>Aspergillus terreus</i>	nd	7	50
<i>Aspergillus versicolor</i>	19	6	55
<i>Aureobasidium pullulans</i>	25	4.4	54
<i>Bacillus sp.</i>	99	6	75
<i>Cryptococcus sp.</i>	22	2	40
<i>Myceliophthora sp</i>	53	6	75
<i>Penicillium capsulatum</i>	22	3.48	48
<i>Penicillium sp.</i>	25	2	50
<i>Streptomyces sp</i>	24.5, 37.5, 38	6-8	55-60
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	24.7	6-6.5	70
<i>Trichoderma harzianum</i>	20	5	50
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	37.7	5-6	45
<i>Trichoderma reesei</i>	20,19	5-5.5, 4-4.5	45, 40
<i>Trichoderma viride</i>	22	5	53

nd = no determinada

\*Tabla obtenida de Polizeli y col. (2005).

### **3. Justificación**

*T. harzianum* es un hongo termosensible que es utilizado para la producción de enzimas celulolíticas que pueden ser producidas por FES. Sin embargo, la FES presenta desventajas relacionadas con la transferencia de calor y masa, que dificultan su aplicación a gran escala. Estos inconvenientes pueden ser resueltos mediante estrategias de control de proceso; en particular, la remoción de calor metabólico, empleando estrategias asociadas con la aireación y agitación del cultivo, puede permitir mantener la temperatura necesaria para el desarrollo del microorganismo.

## 4. Antecedentes

Delabona y col. (2012) produjeron un complejo de enzimas celulolíticas (FPasa, xilanasas y  $\beta$ -glucosidasa) a partir de *T. harzianum* cultivado bajo diferentes condiciones. Primero evaluaron diferentes fuentes de carbono en un cultivo en matraz agitado. Posteriormente, la producción se evaluó bajo diferentes condiciones de pH (5-6), utilizando un biorreactor de tanque agitado (BioFlo115 Fermenter de 3L), el volumen de trabajo fue de 1.5 L a 29°C, con agitación periódica. Se obtuvieron actividades de 1.21 U/ml, 80 U/ml y 17.3 U/ml (FPasa, xilanasas y  $\beta$ -glucosidasa respectivamente). El complejo enzimático obtenido fue utilizado para hidrolizar bagazo de caña pretratado y lo compararon con enzimas de *T. reesei* RutC30, obteniendo un rendimiento similar. Por lo anterior, se considera que *T. harzianum* tiene potencial para la producción de éstas enzimas.

Rezende y col. (2002) produjeron xilanasas por *T. harzianum* usando bagazo de caña como sustrato. El bagazo se lavó, se secó, se molió y se humedeció con un medio mínimo de sales, los cultivos fueron crecidos a 28°C durante 7 días. Se realizaron dos métodos de extracción de enzimas: a) con Tween-80 0.1% (v/v), en solución salina fisiológica y b) con amortiguador de acetatos 50 mM, pH 5, bajo agitación de 180 rpm durante 15, 30 y 60 min. Después de una extracción simple, con ambos métodos de extracción se obtuvo una actividad media de xilanasas de 15 U/ml, independientemente del tiempo de agitación. En una segunda y tercera extracción se recuperó 10.4 y 6.6 U/ml de actividad xilanasas, respectivamente. El perfil de crecimiento de *T. harzianum* se monitoreó por 20 días en 14% (p/v) de bagazo, y la más alta actividad xilanasas (288 U/ml) se encontró en el séptimo día.

Böhmer y col. (2011) realizaron estudios de FES utilizando *Trametes hirsuta*, un basidiomiceto filamentoso. Como sustrato sólido, utilizaron 1.8 Kg de viruta de pino y 2.1 Kg de cascaras de naranja, en un reactor novedoso que permite la mezcla del material inoculado durante la fermentación. Se añadió sulfato de cobre o xilidina (2,5-dimetilanilina) para mejorar la producción de enzimas, especialmente lacasas.

Sus estudios demostraron que el efecto de los aditivos en FES fue bajo, mientras que la elección del material sólido y la rotación del recipiente del reactor mostraron una influencia significativa. También observaron que la viruta de pino no estimula la producción de lacasa; sin embargo, con la cáscara de naranja la producción de lacasas fue significativamente mayor  $207 \pm 4.4$  U/L (mmol/L min). Se demostró que los rendimientos de espacio-tiempo para las fermentaciones sobre sustratos de bajo costo puede producir enzimas extracelulares efectivamente a una velocidad suficiente por un método de cultivo que requiere un equipo de tecnología bajo.

Ghulam y col. (2003), llevaron a cabo FES con cáscara de cítricos y *T. harzianum* a pH 5.5 y 28°C durante 72h. Se observó que la adición de extracto de levadura y Tween-80 favoreció la producción de pectina liasa, mientras que la adición de peptona mostró un efecto negativo sobre el crecimiento microbiano. La máxima actividad de pectina liasa (24.1 U/mg) se registró después de 72h con 70% de humedad en presencia de extracto de levadura (0.4%), 2.5 ml de inóculo (25%) y 0.2% de Tween-80. Este grupo encontró un mayor rendimiento en FES (15.55 U/ml min) en comparación con FEL (10.57 U/ml min), en donde una unidad de actividad enzimática se definió como el cambio de absorbancia por hora por ml de extracto enzimático.

Rodríguez y col. (2011), utilizaron un biorreactor de tambor horizontal cargado con 2 Kg de sustrato con una humedad inicial de 60% con una solución nutritiva para la producción de pectinasas y xilanasas con *Aspergillus niger*, evaluando diferentes condiciones de aireación. El mejor flujo de aireación fue de 1 VKgM (flujo volumétrico de aire por kg de medio), lo que permitió una cantidad suficiente de O<sub>2</sub> para el crecimiento fúngico, donde se obtuvieron 256 U/g y 65 U/g de pectinasa y xilanasas respectivamente. La tasa de crecimiento específico y el rendimiento de oxígeno disminuyeron durante la fermentación, mientras que aumentó el coeficiente de mantenimiento para las diferentes fuentes de carbono.

## **5. Hipótesis**

La agitación mecánica con aireación forzada favorecerá la remoción de calor metabólico sin dañar la integridad del micelio durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA en biorreactores agitados de FES para la producción de celulasas y xilanasas.

## 6. Objetivos

### 6.1. General

Demostrar el efecto positivo de la agitación sobre la producción de xilanasas y celulasas por *T. harzianum* PBLA en biorreactores agitados de FES

### 6.2. Particulares

- Diseñar un medio de cultivo definido para los estudios de crecimiento y producción de enzimas por *T. harzianum* PBLA.
- Determinar el efecto de la temperatura sobre las diferentes fases de crecimiento y la producción de enzimas.
- Evaluar el crecimiento de *T. harzianum* PBLA y la producción de celulasas y xilanasas utilizando reactores estáticos y agitados.

## **7. Materiales y métodos**

### **7.1. Microorganismo**

El microorganismo utilizado en este trabajo fue *T. harzianum* PBLA. La cepa fue donada por el Dr. Alfredo Martínez Jiménez del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### **7.2. Medios de cultivo**

Todos los medios preparados en este trabajo se prepararon con agua comercial Bonafont®.

#### **7.2.1. Medio de cultivo para la esporulación**

El crecimiento del microorganismo se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de Agar-Papa-Dextrosa (PDA) y fueron incubados a 30°C por 7 días.

#### **7.2.2. Medio de cultivo para micelio**

El crecimiento de micelio se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 ml bafleados, que contenían entre 30 y 60 ml de medio YPD con la siguiente composición (g/L): extracto de levadura, 20; polipeptona, 20; dextrosa, 40. Fueron incubados 150 rpm a 30°C por 72 h.

#### **7.2.3. Medio de cultivo para la producción de celulasas y xilanasas**

La composición del medio de cultivo para la producción de celulasas y xilanasas fue la siguiente (g/L): glucosa, 50; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 5; urea, 2; MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0.42; CaCl<sub>2</sub>, 1; peptona, 5; NaCl, 5; 1ml/L de una solución de oligoelementos (g/100ml): FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0.5; MnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0.061; ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 0.1; CoCl<sub>2</sub>\*H<sub>2</sub>O, 0.036; el pH se ajustó a pH 6 (Kumar y col., 2008).

### **7.3. Suspensión de esporas**

La suspensión de esporas se obtuvo adicionando 10 ml de una solución de Tween-80 al 0.05% a cada matraz Erlenmeyer previamente inoculado con *T. harzianum*

PBLA en medio PDA e incubados a 30°C por 7 días. La cosecha de esporas se hizo mediante un agitador magnético y una parrilla con agitación.

La concentración de esporas en la suspensión se determinó en una cámara de Neubauer.

#### **7.4. Soporte**

El soporte utilizado fue aserrín de pino “multiusos” adquirido en tiendas departamentales. El aserrín fue pretratado antes de utilizarse, de acuerdo con el siguiente procedimiento. El aserrín fue tamizado con tamices de malla 12, 16 y 40. Se seleccionó la fracción retenida entre las mallas 16 y 40 (tamaño de partícula 0.42 a 3.3 mm). Posteriormente, se lavó con abundante agua caliente, después se lavó con agua destilada fría y, finalmente, se secó a 60°C por 48 h.

#### **7.5. Fermentación**

Para llevar a cabo la fermentación, el aserrín fue impregnado con el medio de cultivo previamente inoculado con  $2 \times 10^7$  esporas por gramo de aserrín seco. Se utilizó una relación medio de cultivo líquido inoculado:aserrín de pino 1.85:1 (v/p); resultando en una humedad inicial cercana a 65% (p/p). El aserrín impregnado con el medio inoculado se colocó en los fermentadores y se incubó a 30°C.

Se utilizaron dos tipos de biorreactores: columnas y tanque agitado, que serán denominados de la siguiente manera.

- Biorreactor tubular vertical (BRTV): son columnas de vidrio de 2.3 cm y 4.5 cm de diámetro y 20 cm de altura, cuentan con entrada y salida de aire. Estos se incubaron en un baño con agua o en un cuarto de incubación (Fig. 1).
- Biorreactor tubular horizontal agitado (BRTH): que por cuestiones de confidencialidad no será descrito.

Para empacar los biorreactores se realizó el siguiente procedimiento:

BRTV: Se registró el peso de cada BRTV vacío, después fueron empacados con el aserrín ya impregnado del medio inoculado y se volvieron a pesar.

BRTH: El aserrín se colocó en una bolsa de plástico, se mezcló con el medio inoculado, se pesó la bolsa, se empacó el reactor y nuevamente se pesó la bolsa. Este procedimiento se realizó bajo condiciones asépticas.



Figura 1. Biorreactores tubulares verticales empacados con aserrín inoculado con *T. harzianum* PBLA incubados en un baño con agua a 30°C.

### **7.5.1. Condiciones de operación**

Los ensayos experimentales realizados en este trabajo, son descritos en forma general en la Tabla 4 y, a continuación serán descritas a detalle.

Debemos resaltar que el uso de un inóculo con micelio fue debido al bajo índice de esporulación, lo que impedía inocular las cantidades de aserrín necesarias en los ensayos.

Tabla 3. Condiciones de operación de los reactores

Capítulo	Tipo de biorreactor	Sulfato de magnesio (g/L)	Tipo de inóculo	Tipo de incubación
8.1	BRTV 2.3 cm Ø	21	Esporas	B-agua
8.2	BRTV 2.3 cm Ø y 4.7 cm Ø	0.021	Esporas	B-agua: para BRTV de 2.3 y a-gaseosa para BRTV de 4.7
		0.42*	Micelio	
8.3	BRTV 2.3 cm Ø	21 y 0.42	Esporas	B-agua
8.4	BRTV 2.3 cm Ø	0.42*	Esporas Micelio	B-agua
8.5	BRTV de 2.3 cm Ø y BRTH	0.42*	Micelio	B-agua y chaqueta

(\*)Estos ensayos fueron preparados por error con una concentración de Urea de 5 g/L, generalmente en el medio su concentración fue de 2g/L (Sección 7.2.2).

B-agua: es baño con agua a 30°C; a-gaseosa: atmósfera gaseosa a 30°C.

#### 7.5.1.1. (Capítulo 8.1) Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y producción de enzimas por *T. harzianum* PBLA en FES

Se incubaron 8 BRTV de 2.3 cm de diámetro interno. Se evaluaron 4 temperaturas; 28, 30, 32 y 34°C (dos BRTV para cada temperatura) y se incubaron durante 48 h con un flujo de aire húmedo de 40 y 45 ml/min, aproximadamente 0.5 VKgM, donde 1 VKgM se define como el flujo volumétrico de aire por kilogramo de materia húmeda (Rodríguez y col., 2011). Dado que la acumulación de calor metabólico inicia después de la fase de germinación, todos los cultivos se iniciaron a 28°C en un baño con agua al terminar la fase de germinación, después de 16 h, se cambió la temperatura de incubación a la temperatura de estudio. El crecimiento se determinó indirectamente a través de la producción de CO<sub>2</sub>.

### **7.5.1.2. (Capítulo 8.2) Acumulación de calor metabólico en BRTV.**

Para determinar el efecto de la acumulación de calor metabólico sobre la producción de CO<sub>2</sub>, xilanasas y celulasas se usaron BRTV de 2.3 y 4.7 cm de diámetro inoculados con esporas y micelio. El micelio se produjo en medio líquido con medio YPD (Sección 7.2.2), y se inóculo en una proporción de 10% v/v respecto al medio líquido usado para impregnar el aserrín.

Para favorecer la acumulación de calor metabólico, los BRTV de 4.7 cm de diámetro se incubaron en atmósfera gaseosa. Como control, se determinó la producción de CO<sub>2</sub> y de enzimas en BRTV de 2.3 cm incubados en agua. En todos los casos la aireación fue de 1VKgM. Para determinar la acumulación de calor metabólico en los BRTV, se colocaron cuatro termopares a diferentes distancias axiales (Fig. 8).

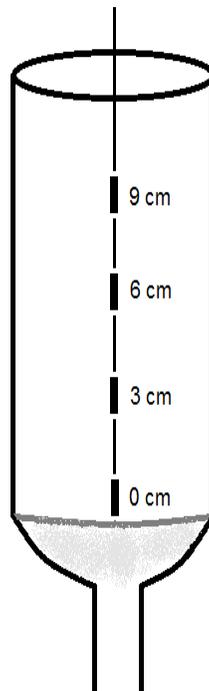


Figura 2. Esquema de BRTV de 4.7 cm de diámetro. La distancia indica la altura en la que se colocaron los termopares.

Para este estudio se modificó la composición del medio de cultivo; en particular, se redujo la concentración de sulfato de magnesio heptahidratado de 21 a 0.021 g/L. Este cambio fue debido a, que observamos que el medio utilizado por Kumar y col. (2008) fue muy alta (21g/L), por lo cual se decidió disminuirla por ese momento a 0.021 g/L y, posteriormente evaluar bien el efecto que este obtendría.

#### **7.5.1.3. (Capítulo 8.3) Efecto de la concentración de MgSO<sub>4</sub> sobre la producción de CO<sub>2</sub> y la actividad enzimática con *T. harzianum* PBLA en FES.**

Para este estudio se evaluaron dos concentraciones de MgSO<sub>4</sub> (21 y 0.42 g/L). Se utilizaron 8 BRTV de 2.3 cm de diámetro para cada uno y se incubaron en un baño con agua a 30°C durante 51. Se tomaron muestras a las 23, 29, 47 y finalmente a las 51 h, es decir, se retiraron dos BRTV en cada uno de estos tiempos, sólo en el tiempo de 51 h se retiraron 3 BRTV, que fueron los utilizados para el monitoreo de la producción de CO<sub>2</sub>. La aireación fue de aproximadamente 0.5 VKgM.

#### **7.5.1.4. (Capítulo 8.4) Cinética de crecimiento de *T. harzianum* PBLA y producción de enzimas**

En este estudio se realizaron dos cinéticas de producción de enzimas para estimar el tiempo de mayor actividad enzimática, utilizando dos tipos de inóculo (suspensión de esporas y micelio). Para ello, se usaron 16 y 14 BRTV de 2.3 cm de diámetro para el ensayo con inóculo de esporas y micelio, respectivamente. Los biorreactores fueron incubados a 30°C en un baño de agua, con un flujo de aire de aproximadamente 1-1.3 VKgM. El medio fue preparado con 0.021 y 0.42 g/L de sulfato de magnesio para inóculo con esporas y micelio, respectivamente.

#### **7.5.1.5. (Capítulo 8.5) Crecimiento de *T. harzianum* PBLA y producción de enzimas en biorreactor de tanque agitado**

Para definir el periodo de agitación del BRTV se utilizaron como referencia  $\mu_{CO_2}$  obtenida en capítulos anteriores. Es decir, se calculó el valor de tiempo de duplicación a partir de la tasa específica de producción de  $CO_2$ . Con base en ello, la agitación en los BRTV fue de 3 rpm cada 1.5 h. Los BRTV y BRTH se incubaron en un baño con agua y chaqueta, respectivamente durante 38 h. Los BRTV agitados se operaron con aproximadamente 800 g de materia húmeda, el flujo utilizado fue de 400 ml de aire/min (0.5 VKgM). Los biorreactores fueron monitoreados en línea para la producción de  $CO_2$ .

Posteriormente se realizó una cinética en BRTV y BRTH durante 62 h, bajo las mismas condiciones, es decir, se tomaron muestras a las 12, 18, 24, 40, 48 y finalmente a las 62 h. En el BRTH las muestras se tomaron de la siguiente manera; en cada tiempo de muestreo se abría el biorreactor y se colocó un termómetro de mercurio en el lecho del mismo, posteriormente se tomaban muestras de la parte del centro y cerca de la entrada y salida del BRTH, estas muestras se colocaron en bolsas de plástico previamente taradas, registrando el peso del aserrín para después corregirlo en el cálculo de los parámetros. Los estudios se realizaron por cuadruplicado en BRTV y por duplicado en BRTH.

#### **7.6. Estimación indirecta del crecimiento microbiano**

El crecimiento microbiano fue determinado indirectamente por respirometría, a través de la producción de  $CO_2$  y el consumo de  $O_2$  durante el cultivo, que fueron monitoreados mediante un sistema en línea. El sistema consiste en un respirómetro que cuantifica el  $CO_2$  y  $O_2$  en la corriente gaseosa de la salida de los fermentadores. La corriente pasa, a través de un medidor de flujo, a los detectores de  $CO_2$  y  $O_2$  y los datos son almacenados en un Datalogger M6 (Fig. 3, Solicitud de patente MX/a/2013/004638).

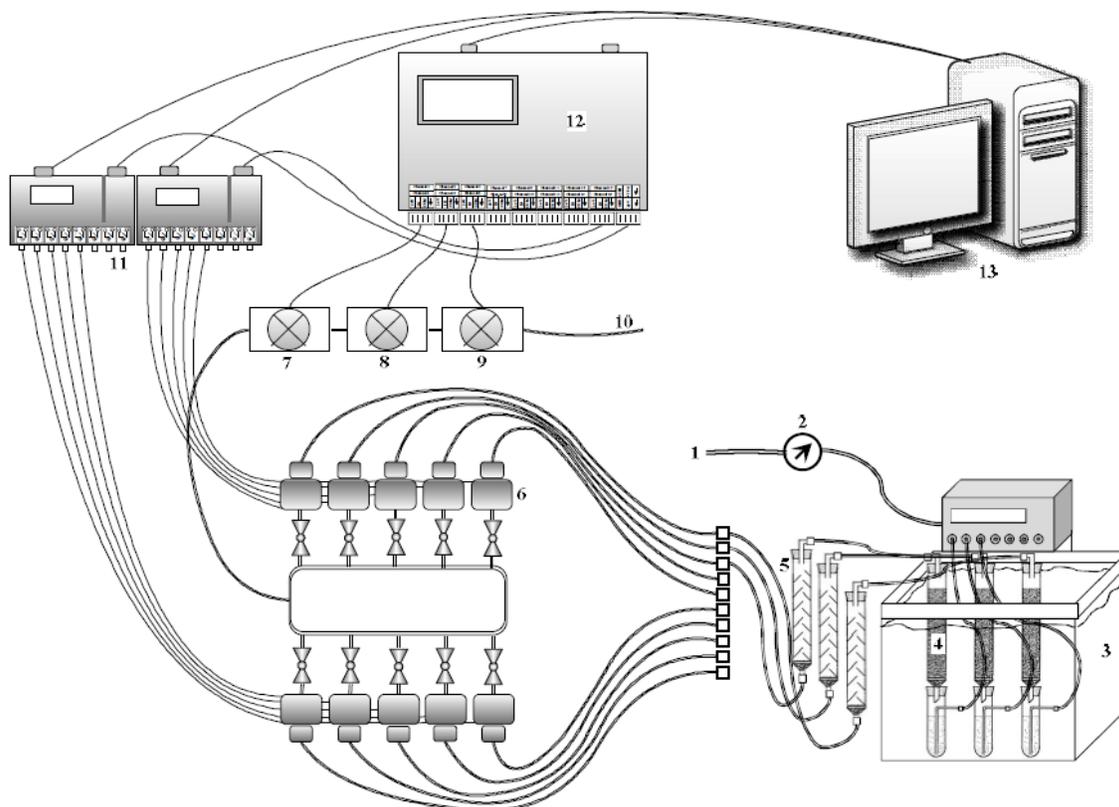


Figura 3. Diagrama del sistema de respirometría. 1: compresor de aire; 2: regulador de presión; 3: baño con agua; 4: columnas o BR; 5: columnas con sílica; 6: válvulas solenoide; 7: medidor de flujo; 8: detector de CO<sub>2</sub> infrarrojo; 9: detector de O<sub>2</sub>; 10: venteo; 11: controlador lógico programable (PLC); 12: Datalogger M6+; 13: computadora.

### 7.7. Determinación de parámetros de crecimiento

Los valores de flujo, CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> se cuantificaron con el metabolímetro antes descrito (Torres-Mancera, 2013) en intervalos de 20 a 50 minutos, obteniéndose al menos 40 datos para cada unidad experimental.

La tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> ( $\mu_{CO_2}$ ) se determinó de acuerdo con lo reportado por Saucedo y col. (1994). Para ello, los valores de producción de CO<sub>2</sub> expresados como mg CO<sub>2</sub>/g msi, se ajustaron con dos modelos diferentes (exponencial (Ec. 1 y 2) y logístico (Ec. 3 y 4), seleccionando el modelo exponencial. Para la estimación de  $\mu_{CO_2}$  se seleccionó el intervalo desde el tiempo inicial al tiempo

en el que se obtiene la máxima tasa de producción de CO<sub>2</sub>. La producción de CO<sub>2</sub> se obtuvo por integración numérica de los datos de tasa de producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo.

Forma diferencial	Forma integrada
$\frac{dX}{dt} = \mu X$ (Ec. 1)	$X = X_0 e^{\mu t}$ (Ec. 2)

El modelo logístico (Ec. 3 y 4) es de los modelos más utilizados para ajustar los datos de crecimiento microbiano, ya que la curva logística integrada es sigmoideal y simétrica con respecto al punto central de inflexión y consta de tres fases, similares a una curva de crecimiento microbiano.

Forma diferencial	Forma integrada
$\frac{dX}{dt} = \mu X \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)$ (Ec. 3)	$X = \frac{X_m}{1 + \left(\frac{X_m}{X_0} - 1\right) e^{-\mu t}}$ (Ec. 4)

El tiempo *lag* de producción de CO<sub>2</sub> se estimó a través de la intersección de una recta obtenida de la función logaritmo natural de la integral de CO<sub>2</sub> en función del tiempo, considerando el intervalo entre el final del tiempo *lag* y el tiempo de la máxima tasa de producción de CO<sub>2</sub>.

### **7.8. Determinación del coeficiente respiratorio (CR)**

El coeficiente respiratorio fue determinado con base a la relación de los valores acumulados de producción de CO<sub>2</sub> entre los valores acumulados del consumo de O<sub>2</sub>.

## **7.9. Métodos analíticos**

Los métodos analíticos se realizaron sobre las muestras obtenidas en cada ensayo. Como se mencionó en la Sección 7.5.1., en algunos estudios realizados las muestras fueron tomadas al final del cultivo, y en las cinéticas las muestras corresponden a cada uno de los tiempos de muestreo. En todos los casos las muestras fueron tratadas como se describe a continuación. Inmediatamente después de la toma de muestra, el BRTV o la muestra del BRTH se mantuvieron a 4°C por 30 min para detener el metabolismo microbiano. Posteriormente, la muestra se homogeniza por mezclado mecánico y se toman 10 g para análisis de humedad, pH,  $a_w$ , glucosa y actividades celulasa y xilanasas.

Para los análisis de pH, glucosa y actividad enzimática, se tomó aproximadamente 1 g de muestra húmeda y se adicionaron 10 ml de agua destilada, se agitó en vórtex por 30 segundos y se tomaron 4 ml que se distribuyeron en 2 tubos Eppendorf que se congelaron inmediatamente (extractos) hasta su posterior análisis de glucosa y actividades enzimáticas.

### **7.9.1. Determinación de pH**

El pH se determinó por potenciometría en un equipo Conductronic pH-120 y fue medido en la suspensión obtenida al adicionar 10 ml de agua a 1 g de materia húmeda fermentada. La calibración del equipo se realizó con soluciones amortiguadoras estándar pH 4 y 7 (J.T. Baker).

### **7.9.2. Glucosa**

Para el análisis de glucosa se utilizaron los extractos obtenidos después de adicionar 10 ml de agua sobre 1 g de muestra húmeda. Se utilizó un Kit enzimático de glucosa (Glucose-LQ SPINREACT). En tubos de ensayo se colocaron 1 ml del reactivo de Glucose-LQ y se adicionó 0.1 ml del extracto, se incubaron a 30°C a temperatura ambiente y al término de este tiempo se determinó la absorbancia a 505 nm con un espectrofotómetro SHIMADZU UV Spectrophotometer UV-1800.

### **7.9.3. Actividad de agua**

La actividad de agua ( $a_w$ ) se midió directamente sobre la materia húmeda previamente homogeneizada. Se colocó aproximadamente 1 g de materia húmeda en un contenedor para el equipo Aqua Lab II CX-2 Labsen Scientific. El equipo fue calibrado con agua destilada ajustando el valor a 1.

### **7.9.4. Humedad**

La humedad se midió directamente sobre la materia húmeda previamente homogeneizada. Se colocó 1 g de materia húmeda en un contenedor para en una termobalanza (Ohaus MB 45).

### **7.9.5. Actividad enzimática**

Las actividades enzimáticas celulasa y xilanasas fueron determinadas en los extractos. Como sustratos se utilizó carboximetilcelulosa y xilano de abedul (0.25%, p/v), respectivamente, en amortiguador de citratos 0.1M a pH 5.2. A continuación se describe el procedimiento para cada enzima.

#### **7.9.5.1. Actividad celulasa**

Se colocaron tubos de vidrio en un baño con agua a 40°C con 0.9 ml de solución de carboximetilcelulosa (0.25%, p/v). Posteriormente, cada 15 segundos, se adicionaron 0.1 ml de extracto en el tubo correspondiente, se incubó 30 minutos y la reacción se detuvo con la adición de 1.5 ml de reactivo DNS cada 15 segundos. El tiempo de 15 segundos fue para garantizar que todos los tubos tuvieran el mismo tiempo de reacción, ya que cada tubo tenía una diferencia 15 segundos desde el momento de adicionar el extracto. Una Unidad de actividad celulasa (U), se define como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de azúcares reductores (glucosa) por minuto en las condiciones de reacción.

#### **7.9.5.2. Actividad xilanasas**

Se colocaron tubos de vidrio en un baño con agua a 40°C con 0.9 ml de solución de xilano de abedul (0.25%, p/v). Posteriormente, cada 15 segundos se adicionaron 0.1 ml de cada extracto en el tubo correspondiente, se incubó por 15 minutos, y la

reacción se detuvo adicionando 1.5 ml de reactivo DNS cada 15 segundos. El tiempo de 15 segundos fue para garantizar que todos los tubos tuvieran el mismo tiempo de reacción, ya que cada tubo tenía una diferencia 15 segundos desde el momento de adicionar el extracto Una unidad xilanasa se define como la cantidad de enzima que libera 1 $\mu$ mol de azúcares reductores (xilosa) por minuto en las condiciones de reacción.

Para determinar la concentración de azúcares reductores en el extracto, se prepararon tubos control adicionando 0.9 ml de agua destilada, 1.5 ml de reactivo DNS y 0.1 ml de cada extracto enzimático. Para determinar la concentración de azúcares reductores en los sustratos (CMC y xilano de abedul) se prepararon dos tubos de cada sustrato con 0.9 ml de sustrato, 1.5 ml de reactivo DNS y 0.1 ml de agua. Se utilizaron como estándar glucosa y xilosa con una concentración de 1 g/L. Después del tiempo de incubación los tubos se colocaron en un baño con agua fría por 10 minutos y se determinó la absorbancia a 640 nm con un espectrofotómetro SHIMADZU UV Spectrophotometer UV-1800.

#### **7.10. Análisis estadístico**

Los datos se analizaron mediante el software IBM-SPSS 18. Las medias se compararon por la prueba de Tukey con un  $\alpha=0.05$ . Con respecto a la tasa de producción de CO<sub>2</sub>, producción de CO<sub>2</sub> y cinéticas enzimáticas, el análisis estadístico se realizó con los máximos valores obtenidos.

## **8. Resultados y discusión**

En una primera etapa se determinó la composición del medio de cultivo evaluando diferentes concentraciones de MgSO<sub>4</sub> y el efecto de la temperatura sobre la producción de CO<sub>2</sub>, celulasas y xilanasas por *T. harzianum* en biorreactores tubulares verticales (BRTV). Posteriormente, se realizaron estudios de acumulación de calor en BRTV. Finalmente, se determinó el efecto de la producción de CO<sub>2</sub> y producción de enzimas en biorreactores tubulares horizontales (BRTH) con agitación.

Cada ensayo se realizó de forma similar; sin embargo, se varió la composición del medio de cultivo (contenido de sulfato de magnesio), el tipo de inóculo (esporas o micelio) y el tipo de incubación (baño con agua, chaqueta, o atmósfera gaseosa). En la Tabla 4 se presentan los detalles de los ensayos realizados durante el trabajo experimental que corresponden a cada uno de los capítulos que se irán mostrando durante este escrito.

### 8.1. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y producción de enzimas por *T. harzianum* PBLA en FES

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *T. harzianum* PBLA.

En la Figura 4 se presenta la tasa de producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo (Fig. 4) y en la Figura 5 se muestra la producción acumulada de CO<sub>2</sub> en función del tiempo a las 4 temperaturas evaluadas. En todos los casos se obtuvo la máxima tasa de producción de CO<sub>2</sub> a las 23 h de incubación. Además, los valores de la tasa máxima de producción de CO<sub>2</sub> obtenida en cada temperatura fueron entre 6 y 7 mg CO<sub>2</sub>/g msi h, no habiendo diferencia significativa.

A pesar de que los perfiles de producción de CO<sub>2</sub> (Fig. 5) fueron similares, la producción final total de CO<sub>2</sub> se encontró entre 50 y 70 mg CO<sub>2</sub>/g msi, siendo mayor (entre 4 y 11 unidades) a 32 y 34°C con respecto a 28 y 30°C (Tabla 4), sin embargo, no hubo diferencia significativa.

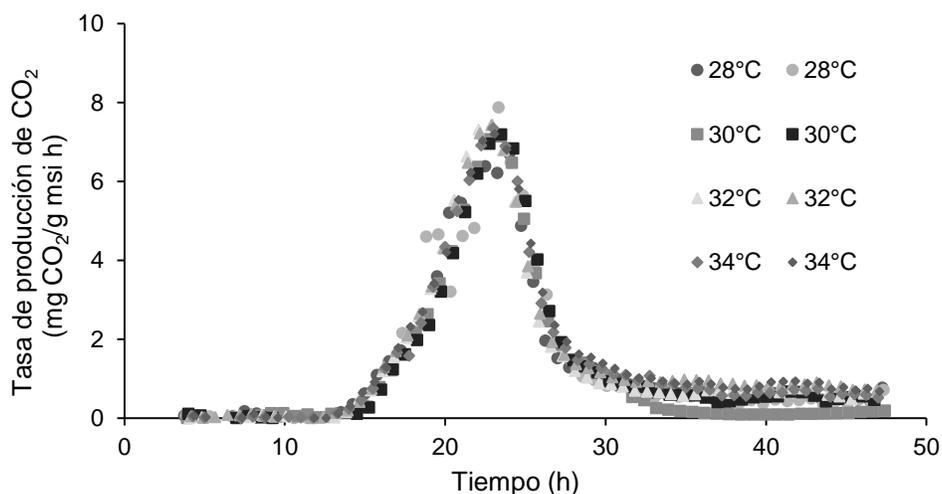


Figura 4. Tasa de producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA en FES con diferentes temperaturas de incubación.

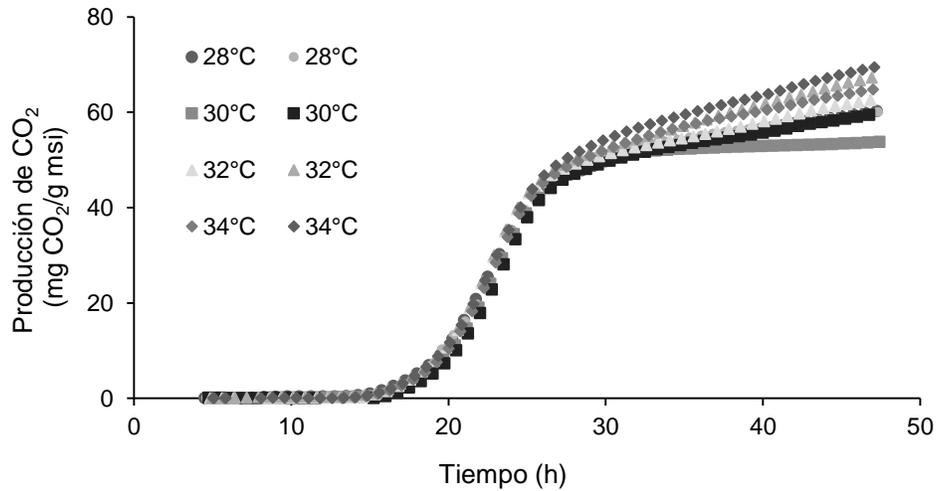


Figura 5. Producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA en FES con diferente temperatura de incubación.

Tabla 4. Máxima producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo

Temperatura (°C)	28	30	32	34
Producción de CO <sub>2</sub>	60.14 ± 0.16 <sup>a</sup>	56.57 ± 3.99 <sup>a</sup>	64.89 ± 3.29 <sup>a</sup>	67.08 ± 3.28 <sup>a</sup>

Letras iguales indican que no hay diferencia significativa en los valores de máxima producción de CO<sub>2</sub> en las temperaturas evaluadas.

En la Figura 6 se presentan los valores de la tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> ( $\mu_{CO_2}$ ) en función de la temperatura. Estos valores fueron obtenidos con los modelos exponencial y logístico en su forma integral.

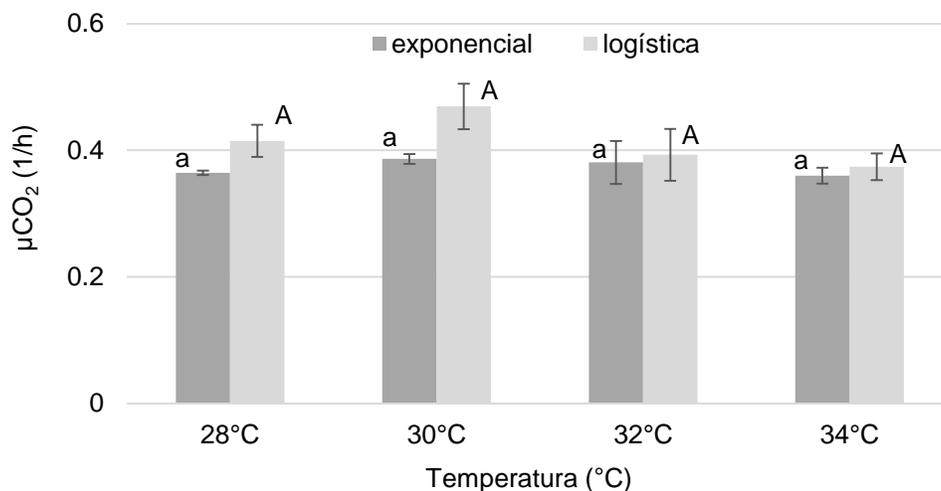


Figura 6. Tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> ( $\mu_{CO_2}$ ) en función de las temperaturas evaluadas durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA en FES. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa en los valores de  $\mu_{CO_2}$  en las temperaturas evaluadas.

Los valores de las tasas específicas de producción de CO<sub>2</sub> obtenidos con el modelo logístico fueron ligeramente mayores a los obtenidos con el modelo exponencial y también presentaron desviaciones estándar mayores. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) para ambos modelos fue superior a 99%, lo que demuestra que ambos explican un alto porcentaje de la variabilidad de los datos. Sin embargo, se puede ver (Fig. 5) que después de la fase de desaceleración, la producción de CO<sub>2</sub> aumentó sin llegar a ser asintótica. Por esta razón se decidió utilizar el modelo exponencial para la estimación de la tasa específica de producción de CO<sub>2</sub>.

En la Fig. 7 se muestran las actividades xilanas y celulasas en función de la temperatura de incubación.

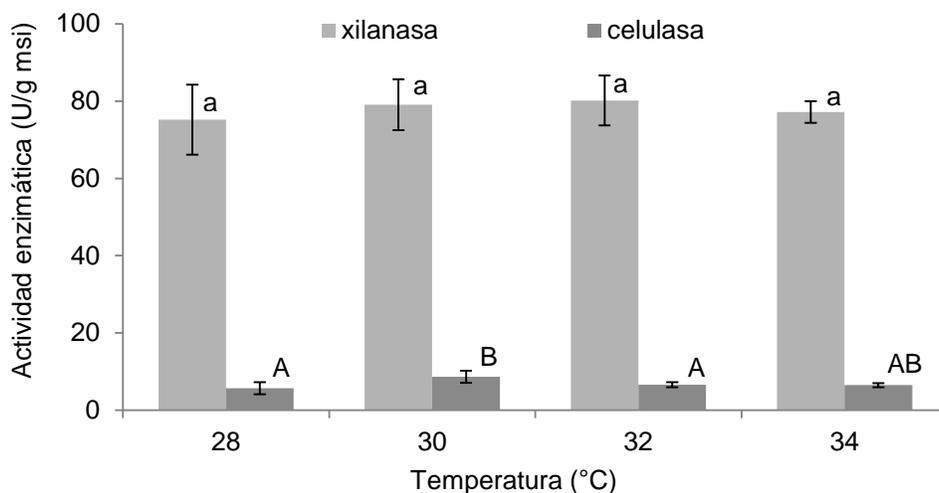


Figura 7. Actividad xilanasa y celulasa al final del cultivo en función de la temperatura de incubación de *T. harzianum* PBLA en FES. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa en los valores de actividad enzimática en las temperaturas evaluadas.

Los resultados muestran que hubo mayor actividad xilanasa respecto a la actividad celulasa. La máxima actividad xilanasa fue de 80 U/g msi con una temperatura de 32°C, sin embargo, podemos observar que no hubo diferencia significativa, por lo cual la actividad xilanasa fue independiente de la temperatura de incubación. En cambio, la actividad celulasa fue significativamente diferente, donde la mayor actividad fue de 8 y 6 U/g msi con temperaturas de 30 y 34 °C, respectivamente, y al no haber diferencias entre estas dos temperaturas y, que energéticamente es menos costoso mantener condiciones a 30°C con respecto a 34°C, se decidió que 30°C fue la temperatura adecuada para la producción de estas enzimas con *T. harzianum*.

Deschamps y col. (1985) produjeron celulasas en reactores estáticos y agitados en FES con *T. harzianum* F-470, obteniendo 18 U/g en columnas y 11 U/g en tanque agitado. Estos autores observaron que la temperatura óptima para la producción de enzimas fue de 30°C. Esta temperatura es la misma en la que en el presente trabajo se obtuvo la mayor actividad celulasa en las cuatro temperaturas evaluadas. El hecho de que la actividad enzimática reportada por Deschamps y col. (1985) sea

de un poco más del doble que la reportada en este trabajo, podría atribuirse a las diferencias entre la cepa usada, o bien, al tipo de sustrato.

En la Tabla 5 se presentan los valores de pH, actividad de agua ( $a_w$ ) y humedad de las muestras al inicio y final de la fermentación, en donde puede verse que los valores finales son muy similares a los iniciales.

Tabla 5. Valores de pH,  $a_w$  y humedad (%) evaluadas a diferentes temperaturas al inicio y final del cultivo.

Temperatura	Tiempo (h)	pH	$a_w$	Humedad (%)
	0	$6.3 \pm 0.03$	$0.988 \pm 0.002$	$62.0 \pm 0.86$
28°C	47	$6.2 \pm 0.03^a$	$0.991 \pm 0.001^A$	$63.5 \pm 0.77^*$
30°C	47	$6.3 \pm 0.04^b$	$0.991 \pm 0.001^A$	$63.3 \pm 0.44^*$
32°C	47	$6.6 \pm 0.05^c$	$0.991 \pm 0.002^A$	$63.5 \pm 1.43^*$
34°C	47	$6.5 \pm 0.02^d$	$0.990 \pm 0.001^A$	$62.3 \pm 1.01^*$

Letras y símbolos indican que no hay diferencia significativa en los valores de pH, actividad de agua ( $a_w$ ) y humedad, en las temperaturas evaluadas.

Sin embargo, en los valores de pH podemos observar que hay un ligero aumento conforme aumenta la temperatura, donde se obtuvo el valor más alto (6.6) a 32°C, pero observamos que a 30°C el pH se mantuvo. Por lo tanto, al no haber un efecto significativo sobre la tasa de producción de CO<sub>2</sub>, producción de CO<sub>2</sub>, tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> ( $\mu_{CO_2}$ ) y actividad enzimática xilanasas, se determinó que 30°C fuera la temperatura adecuada para realizar los demás ensayos experimentales.

## 8.2. Acumulación de calor metabólico en BRTV.

En la Figura 8 se presentan los perfiles de temperatura en 4 puntos axiales de los BRTV de 4.7 cm de diámetro para ambos inóculos (esporas y micelio) en función del tiempo. En ambos casos se demuestra que, en el fondo del lecho (0 cm), la temperatura fue ligeramente menor con respecto a las demás alturas evaluadas (3, 6 y 9 cm). También se observa un incremento importante de la temperatura al transcurrir el tiempo de cultivo, obteniéndose una temperatura máxima de 35°C a las 20 h en el cultivo inoculado con esporas. El cultivo inoculado con micelio alcanzó una máxima temperatura de 35.8°C a las 17 h de incubación. Esto es debido a la menor duración del tiempo *lag* con inóculo de micelio.

Lo anterior indica que el gradiente de temperatura fue mayor a 5°C con respecto a la temperatura de incubación. Este perfil de temperatura fue similar al de la tasa de producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo (Fig. 9). La mayor tasa de producción de CO<sub>2</sub> obtenida en los BRTV de 2.3 cm de diámetro inoculados con esporas que fue de 9.8 mg CO<sub>2</sub>/g msi a las 23 h (Fig. 9a), mientras que la mayor tasa de producción de CO<sub>2</sub> obtenida en BRTV de 4.7 cm de diámetro inoculados con micelio fue de 6.65 mg CO<sub>2</sub>/g msi a las 16 h de incubación (Fig. 9b). En ambos casos el tiempo en que se alcanzó la máxima tasa de producción, es aproximadamente el mismo tiempo en el que se obtuvo la temperatura más alta.

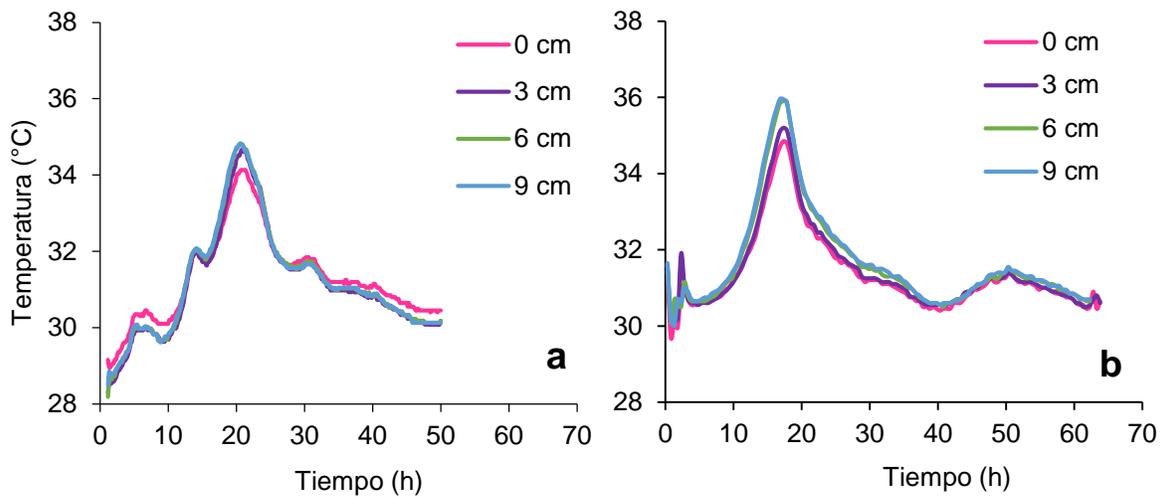


Figura 8. Perfil de temperatura en BRTV de 4.7 cm de diámetro durante el cultivo de *T. harzianum*. Fig. a) Corresponde al medio inoculado con esporas. Fig. b) Corresponde al medio inoculado con micelio. Los termopares se colocaron a 0, 3, 6 y 9 cm del fondo de los biorreactores.

Posiblemente la reducción en la tasa de producción de CO<sub>2</sub> después de las 16 h de cultivo en los reactores inoculados con micelio, se deba a la temperatura en el medio (35.8°C) en ese tiempo. Ya que se sabe que *T. harzianum* es un hongo termosensible y a pesar que en este trabajo se demostró que temperaturas de incubación entre 28 y 34°C no tienen efecto sobre la producción de CO<sub>2</sub> por esta cepa, no sabemos que pasa en temperaturas más altas. También debemos considerar que, las tasas de producción fueron obtenidas con BRTV de diferente diámetro además, fueron incubados de forma distinta. Donde podemos observar que la mayor tasa de producción de CO<sub>2</sub> (9.2 mg CO<sub>2</sub>/g msi h) se obtuvo en los BRTV incubados en agua, en comparación con los incubados en atmósfera gaseosa que fue de 6 mg CO<sub>2</sub>/g msi h. La acumulación de calor metabólico es el resultado de la tasa de generación de calor y la tasa de remoción por diferentes mecanismos (Figueroa y col. 2011). En particular, la remoción de calor bajo las condiciones del estudio es menor debido a la incubación de los BRTV en un medio con aire seco en lugar de los tradicionales baños de agua utilizados en estos sistemas.

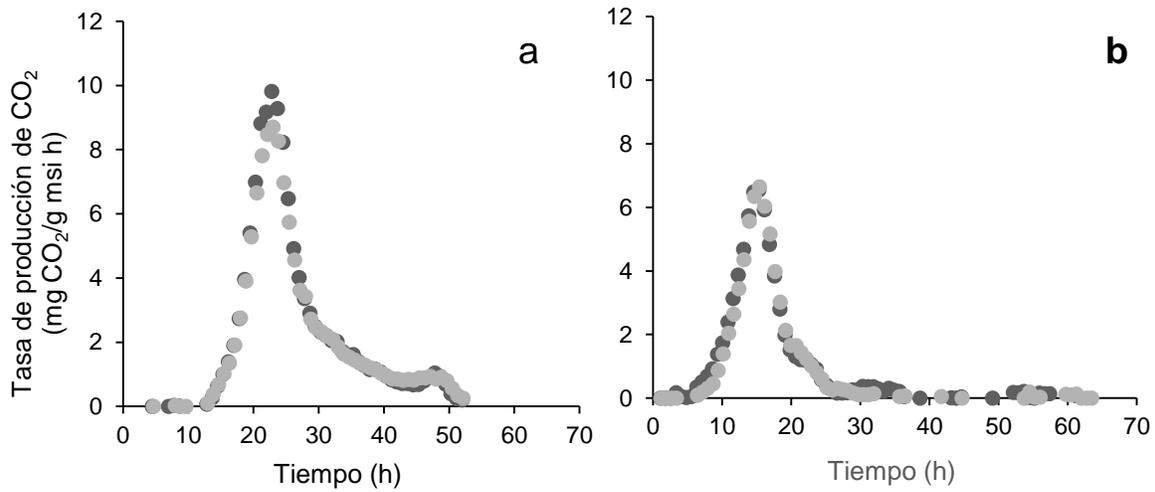


Figura 9. Tasa de producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA. 10a) BRTV de 2.3 cm de diámetro inoculados con esporas. 10b) BRTV de 4.7 cm de diámetro inoculados con micelio. Las dos series de datos corresponden a duplicados.

En la Figura 10 se muestra el perfil de producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo para los cultivos realizados con BRTV de 2.3 cm de diámetro inoculados con esporas (Fig. 10a), en donde se registró una producción final de CO<sub>2</sub> de  $100.4 \pm 3.9$  mg CO<sub>2</sub>/g msi. En los BRTV de 4.7 cm de diámetro inoculados con micelio (Fig. 10b) se obtuvo una producción final de CO<sub>2</sub> de  $49.8 \pm 3.6$  mg CO<sub>2</sub>/g msi.

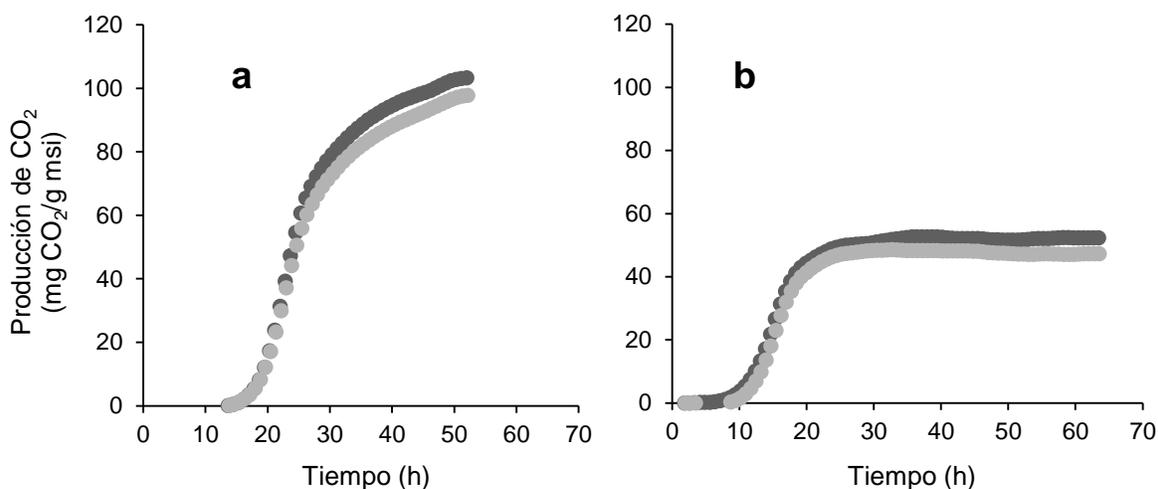


Figura 10. Producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA. En (a) BRTV 2.3 cm de diámetro inoculados con esporas y (b) BRTV de 4.7 cm de diámetro inoculados con micelio. Las dos series de datos corresponden a duplicados.

En la Tabla 6 se presentan los valores de la tasa específica de producción de CO<sub>2</sub>, y tiempo *lag* obtenidos durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA a partir de los dos tipos de inóculo.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de un cultivo de *T. harzianum* PBLA en BRTV inoculado con suspensión de esporas y micelio evaluados sobre la acumulación de calor metabólico

Diámetro (cm)	inóculo	Incubación	$\mu_{CO_2}$ (1/h)	Tiempo <i>lag</i>
2.3	esporas	baño con agua	$0.373 \pm 0.009$	$14.56 \pm 0.07$
4.7	micelio	atmósfera gaseosa	$0.263 \pm 0.004$	$8.26 \pm 1.45$

Podemos observar que la tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> fue menor con un BRTV de 2.3 cm de diámetro, con respecto a la obtenida con el BRTV de 4.7 cm de diámetro, esta diferencia viene ligada desde la máxima tasa de producción de CO<sub>2</sub>, lo que por el momento fue atribuido al tipo de incubación, donde se mencionó que el baño con agua tiene mayor remoción de calor en comparación al aire. Con respecto al tiempo *lag*, podemos observar que, el uso de un inóculo con micelio

reduce el tiempo de casi el doble con respecto al tiempo *lag* con esporas, esto puede ser atribuido a que el microorganismo está en un estado más activo, ya que se hizo crecer primero en el medio YPD antes de ser inoculado en el aserrín, y cuando está como esporas, le cuesta más trabajo adaptarse en el aserrín.

Al final del cultivo, en los BRTV tanto de 2.3 cm como de 4.7 cm de diámetro, no se detectó actividad enzimáticas xilanasa ni celulasa. Esto puede atribuirse al aumento de la temperatura en los BRTV de 4.7 cm de diámetro y, en el caso de los BRTV de 2.3 cm incubados en un baño con agua, se puede deber a que la actividad enzimática se midió al final del cultivo y la máxima actividad podría registrarse durante una parte intermedia del cultivo.

En la Tabla 7 se presentan los valores de pH, actividad de agua ( $a_w$ ) y humedad de las muestras al inicio y final del cultivo.

Tabla 7. Valores de pH,  $a_w$  y humedad (%) en los cultivos realizados en BRTV de diferente diámetro al inicio y final del cultivo.

Inóculo	diámetro (cm)	Tiempo (h)	pH	$a_w$	Humedad (%)
esporas		0	6.1 ± 0.03	0.995 ± 0.001	63.5 ± 0.23
	2.3	52	7.9 ± 0.03	0.998 ± 0.001	64.3 ± 0.70
	4.7	52	7.4 ± 0.03	0.999 ± 0.001	64.0 ± 0.78
micelio		0	6.4 ± 0.04	0.986 ± 0.001	61.4 ± 0.23
	2.3	63	7.9 ± 0.03	0.988 ± 0.000	58.9 ± 3.10
		0	6.4 ± 0.05	0.986 ± 0.000	63.3 ± 0.10
	4.7	63	8.1 ± 0.06	0.988 ± 0.001	61.5 ± 0.71
	4.7	63	8.1 ± 0.11	0.989 ± 0.001	61.2 ± 0.45

Los valores de humedad y actividad de agua al inicio y al final de la FES son muy similares. El pH aumentó (1.3-1.8 unidades) al final del cultivo en todos los casos, lo cual puede indicar actividad proteolítica (actividad no medida en este trabajo) y,

por lo tanto, ausencia de actividades xilanasa y celulasa. Es importante resaltar que en los cultivos hubo un cambio en la concentración de sulfato de magnesio y en el medio inoculado con micelio hubo un cambio en la concentración de amonio (Tabla 3). Lo anterior, también pudo haber ocasionado el aumento en el pH al final del cultivo.

Una observación importante es que la actividad enzimática se midió al final del cultivo, por lo que es posible que la máxima actividad se registre en tiempos intermedios, y por esta razón no se obtuvo actividad enzimática. Para corroborar la hipótesis anterior, se realizó una cinética del perfil de producción de enzimas en función del tiempo. Para ello, primero se evaluó el efecto de la concentración de sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), ya que se trabajó con concentraciones diferentes a las de la sección 8.1, donde sí se registró actividad enzimática.

### **8.3. Efecto de la concentración de $\text{MgSO}_4$ sobre la producción de $\text{CO}_2$ y la actividad enzimática con *T. harzianum* PBLA en FES.**

Como ya se mencionó, la primera parte de los estudios realizados y presentados en este documento se realizaron con una concentración de 21 g/L de sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). A pesar de considerar que tal concentración es muy alta, se decidió no modificar la composición del medio de cultivo propuesto por Kumar y col. (2008) para la producción de celulasas con *Trichoderma* sp. en FES. Se han reportado estudios de producción de xilanasas y celulasas con *Trichoderma* sp., con concentraciones de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  de 0.3 a 0.5 g/L. Sin embargo, por los bajos valores de actividad celulasa y la fuerte pérdida de actividad xilanasa al final del cultivo, se evaluó el efecto de la concentración de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  sobre la producción de  $\text{CO}_2$  y la actividad enzimática. Para lo anterior, se realizaron cinéticas en medios de cultivo con concentraciones de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  de 0.42 y 21 g/L.

En la Figura 11 se puede observar que el valor máximo de la tasa de producción de CO<sub>2</sub> en los medios con diferente concentración de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O se alcanzó al mismo tiempo de cultivo (27-28 h); sin embargo, el valor máximo de esta tasa depende de la concentración inicial de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O en el medio. Se obtuvieron valores de 7.3 y 4.8 mg CO<sub>2</sub>/g msi h para las concentraciones de 0.42 y 21 g/L de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, respectivamente.

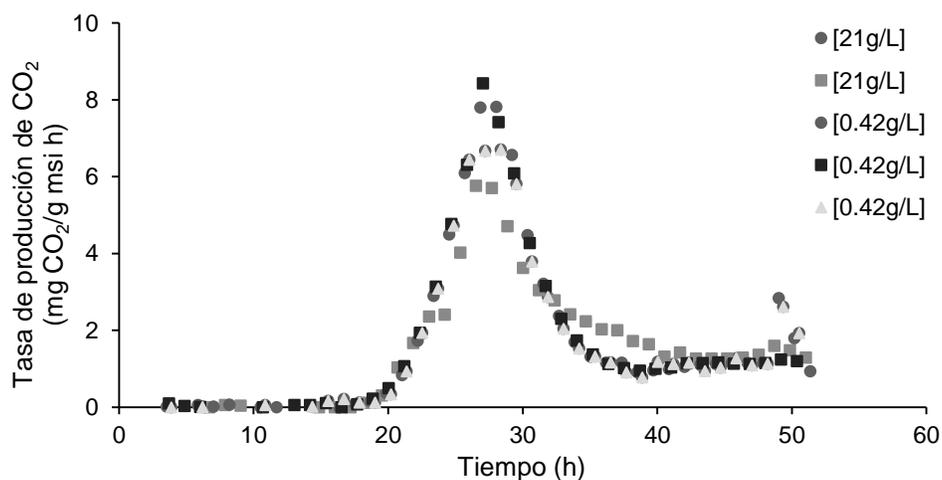


Figura 11. Tasa de producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA en FES con diferente concentración de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O (21 y 0.42 g/L) en un tiempo de 50 h de cultivo, realizado por triplicado.

En la Figura 12 se presenta la producción de CO<sub>2</sub>. En ambos medios de cultivo, la duración del tiempo *lag* fue similar (20 h). Sin embargo, después de este tiempo, la producción de CO<sub>2</sub> fue mayor en el medio con baja concentración de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, alcanzando hasta 82.6 mg CO<sub>2</sub>/g msi, en comparación con una máxima producción total de 59.6 mg CO<sub>2</sub>/g msi cuando el cultivo se realizó con 21 g/L de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O. En cuanto a la glucosa, ésta se consumió totalmente desde las 30 h de cultivo, tiempo en el que se obtiene el 50% del CO<sub>2</sub> final.

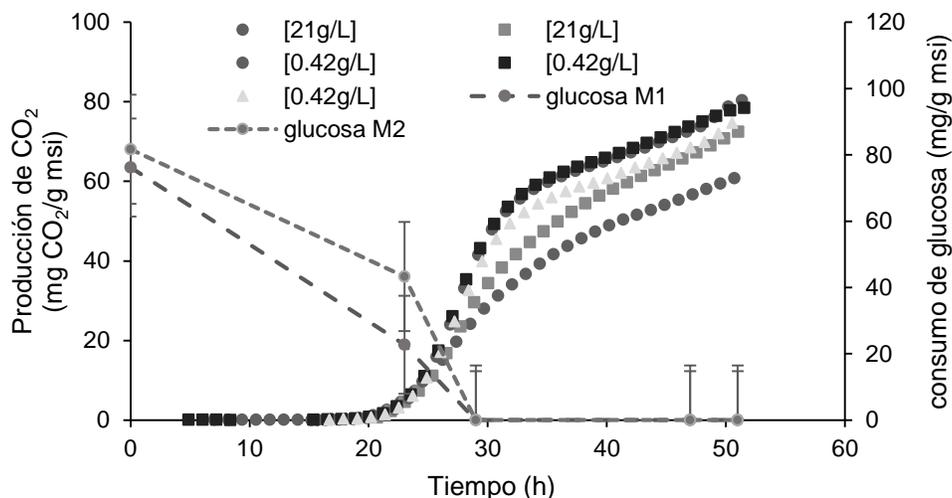


Figura 12. Producción de CO<sub>2</sub> y consumo de glucosa durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA en FES con diferentes concentraciones de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O (21 y 0.42 g/L) en un tiempo de 50 h de cultivo.

En la Tabla 8 se presenta la tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> ( $\mu_{CO_2}$ ) y el tiempo *lag* obtenidos con las dos concentraciones de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O evaluadas, donde se puede observar que el tiempo *lag* se mantiene en las dos concentraciones de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O y la  $\mu_{CO_2}$  es ligeramente menor con la concentración de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O alta (21 g/L) con respecto a la baja (0.42 g/L).

Tabla 8. Parámetros cinéticos de crecimiento de *T. harzianum* PBLA con diferentes concentraciones de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O.

Parámetro	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O = 21 g/L	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O = 0.42 g/L
$\mu_{CO_2}$ (1/h)	0.37 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.41 ± 0.01 <sup>a</sup>
Tiempo <i>lag</i> (h)	19.8 ± 0.88*	20.4 ± 0.21*

Letras y símbolos indican que no hay diferencia significativa en los valores de  $\mu_{CO_2}$  y tiempo *lag*, en las concentraciones de MgSO<sub>4</sub> evaluadas.

De acuerdo al análisis estadístico, la concentración de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O en el medio de cultivo, no tuvo efecto significativo sobre la producción de CO<sub>2</sub>, la tasa de producción de CO<sub>2</sub>,  $\mu_{CO_2}$  y el tiempo *lag*. No obstante, sí se observó una diferencia en la

esporulación (Figura 13), siendo mayor en los BRTV con la concentración más baja de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.42 g/L) comparada con la de mayor concentración 21 g/L.



Figura 13. BRTV empacados con aserrín utilizado como soporte, inoculado con *T. harzianum* PBLA después de 50 h de cultivo. a) 0.42g/L, b) 21g/L.

La esporulación corresponde con los resultados mostrados anteriormente, la máxima tasa de producción de  $\text{CO}_2$  y la máxima producción de  $\text{CO}_2$  fueron ligeramente mayores en el medio con menor concentración de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

La producción de xilanasa también resultó independiente de la concentración de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en el medio de cultivo, el análisis estadístico mostró que no hubo diferencia significativa ( $P=0.459$ ) (Fig. 14). La actividad empezó a detectarse a las 30 h de cultivo y alcanzó su máximo valor (15 U/g msi) a las 50 h. Fandel (2001), reportó la producción de xilanasas por FES, utilizando harina de sorgo como soporte y *T. harzianum* F-416 a 33°C. Uno de los parámetros que estudió fue el tiempo en el cual se obtuvo la mayor actividad enzimática, encontrando 300 U/g a las 48 h. Aunque los valores de actividad obtenidos en este trabajo son mucho menores a los reportados por Fandel (2001), el tiempo en el que se alcanzó la mayor actividad es similar. Para la actividad celulasa, se registraron valores muy cercanos a cero en ambas concentraciones de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

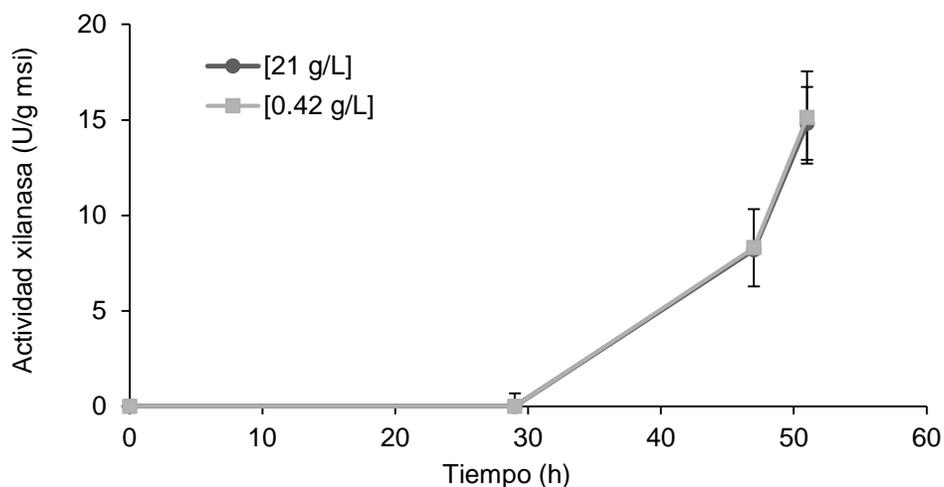


Figura 14. Cinética enzimática xilanasa con *T. harzianum* PBLA en FES con  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (21 y 0.42 g/L) en 50 h de cultivo.

En la Figura 15 se muestran los valores de pH, actividad de agua ( $a_w$ ) y humedad (%) de las muestras tomadas durante el cultivo. La humedad y la actividad de agua se mantienen constantes como en los ensayos anteriores. En cuanto al pH, se observó un cambio conforme pasa el tiempo con respecto al valor inicial; en ambos medios los valores más bajos de pH correspondieron a las 23 y 29 h. Romero y col. (2009), estudiaron las características de *T. harzianum*, en cultivo de hongos comestibles y encontraron que *T. harzianum* (Rifai) invadió rápidamente el sustrato y obstaculizó el crecimiento del micelio de otros hongos. Dicha respuesta se atribuyó a la producción de toxinas y antibióticos, durante el tiempo en el que se observó un descenso en el valor de pH hasta valores de 4-5, que son favorables para su desarrollo.

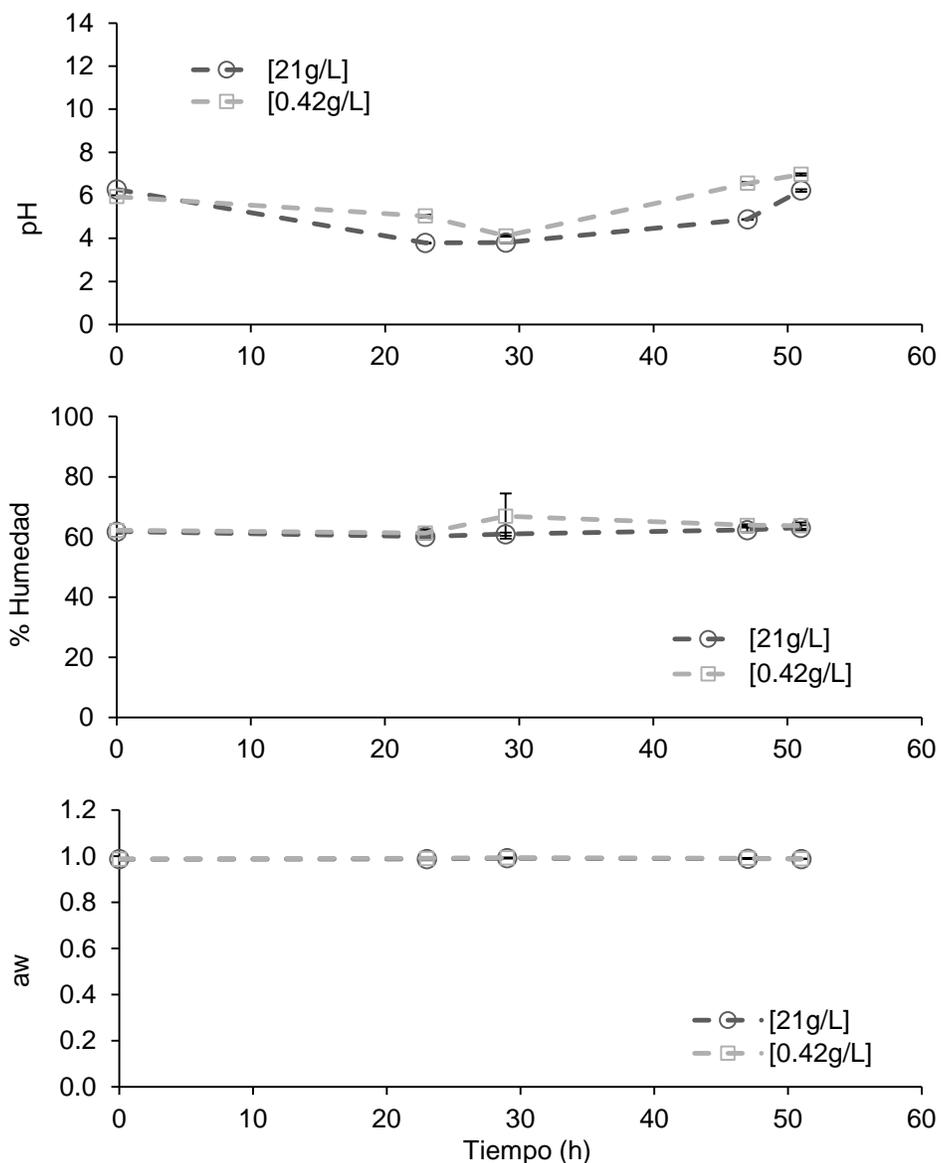


Figura 15. Efecto de la concentración inicial de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  sobre el pH,  $a_w$  y humedad (%) durante la FES con *T. harzianum* PBLA.

Con base en los resultados de la tasa de producción de  $\text{CO}_2$ , la producción de  $\text{CO}_2$ , la tasa específica de producción de  $\text{CO}_2$ , la duración del tiempo *lag* y la actividad xilanasa, que fueron prácticamente independientes de la concentración inicial de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , en los ensayos posteriores se trabajó con una concentración de 0.42 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

#### 8.4. Cinética de crecimiento de *T. harzianum* PBLA y producción de enzimas

Las Figuras 16 y 17 presentan los valores de la tasa de producción de CO<sub>2</sub> y la producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo, respectivamente.

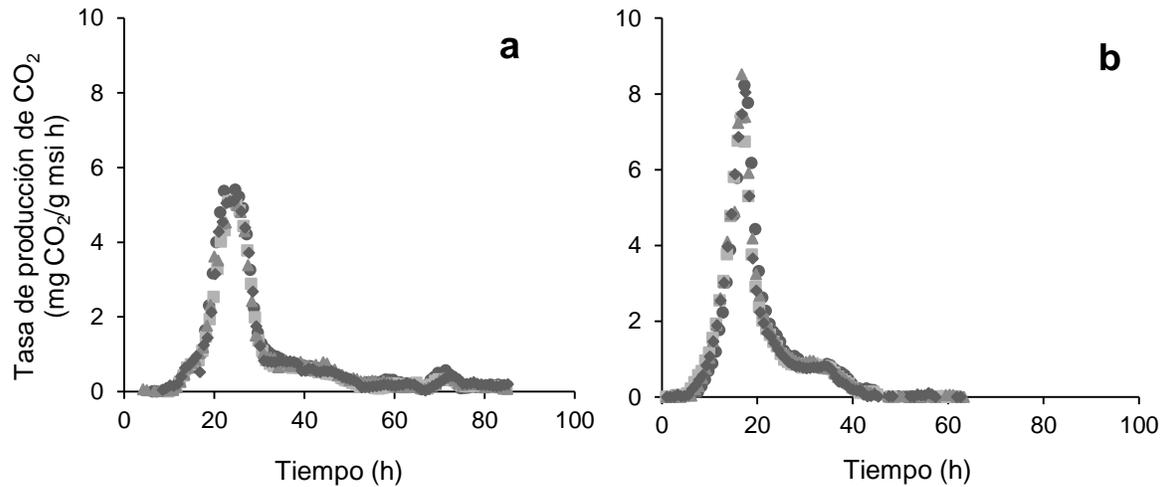


Figura 16. Tasa de producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo, durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA en FES. En (a) BRTV con inóculo de esporas y (b) BRTV con inóculo de micelio. Cada serie de datos representa una réplica.

Los perfiles de tasa de producción de CO<sub>2</sub> fueron similares para las cuatro replicas en cada ensayo pero se obtuvo una mayor tasa de producción de CO<sub>2</sub> (8.23 mg CO<sub>2</sub>/g msi h) con el inóculo de micelio (Fig. 16b) a las 16 h de cultivo. La máxima tasa de producción de CO<sub>2</sub> con inóculo con esporas (Fig. 16a) fue de 5.4 mg CO<sub>2</sub>/g msi h a las 25 h de cultivo.

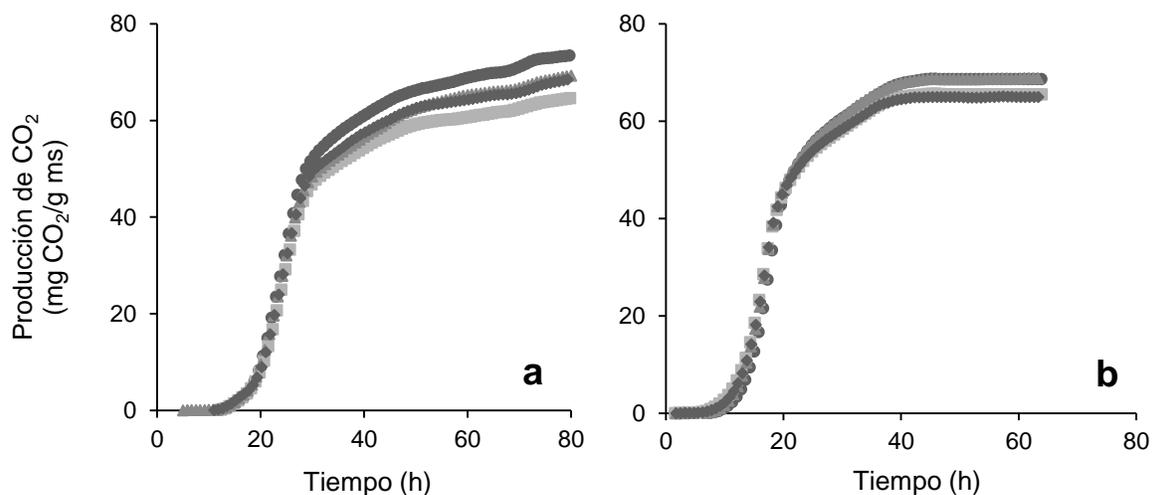


Figura 17. Producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA en FES. En (a) BRTV con inóculo de esporas y (b) BRTV con inóculo de micelio. Cada serie de datos representa una réplica.

En la Figura 17 se puede observar que la producción de CO<sub>2</sub> inició después de las 12 h de fermentación (Fig. 17a) cuando los BRTV se inocularon con esporas y después de las 6 h (Fig. 17b) cuando se inoculó con micelio. En la Figura 18 se muestra la evolución del coeficiente respiratorio (CR) en función del tiempo de cultivo. Dónde se puede observar que después de las 11 h hubo un incremento en el CR (Fig. 18a) ligeramente arriba de 1 (mmol CO<sub>2</sub>/mmol O<sub>2</sub>) y después de las 6 h en la Figura 18b sólo llegó hasta 0.7 (mmol CO<sub>2</sub>/mmol O<sub>2</sub>). El valor del CR empezó a disminuir después de las 30 y 22 h (Fig.18 a y b, respectivamente) hasta el fin de la fermentación. Rodríguez y col. (2011) evaluaron el comportamiento de los parámetros cinéticos durante la producción de pectinasa y xilanasa por FES; estos autores indican que la disminución del CR puede ser debido al incremento del coeficiente de mantenimiento y, a su vez, debido al incremento en la síntesis de enzimas. Al mismo tiempo, ocurre un aumento gradual de la energía utilizada en el proceso endógeno de microorganismo, puesto que se vuelve más difícil la digestión de las fuentes de carbono (Rodríguez y col., 2011). Esta respuesta se muestra en las Figuras 18 y 19, ya que, el tiempo en el que el CR empieza a decrecer,

corresponde al tiempo en el que se produjo la máxima actividad xilanasa (Fig. 19). Muchas enzimas hidrolíticas se producen en forma de metabolitos secundarios, es decir, bajo condiciones de no crecimiento o durante fases con tasas específicas de crecimiento lentas. A esta respuesta se le llama producción no asociada al crecimiento (Whitehurst y Van Oort, 2010).

Sin embargo, en este trabajo se encontró que hasta las 36 h de incubación, la producción de xilanasa tuvo un perfil similar al de CO<sub>2</sub>. Adicionalmente, la producción de xilanasa inició cuando todavía hay glucosa presente en el medio de cultivo. Lo anterior refleja ausencia de represión catabólica para la síntesis de xilanasas. Esto se puede ver claramente en la Figura 19, ya que la máxima actividad se alcanzó a las 36 y 24 h (Fig. 19 a y b, respectivamente), donde se obtuvo la máxima actividad tanto para el inóculo de esporas (38.08 U/g msi, Fig.19a) como de micelio (26.6 U/g msi, Fig.19b).

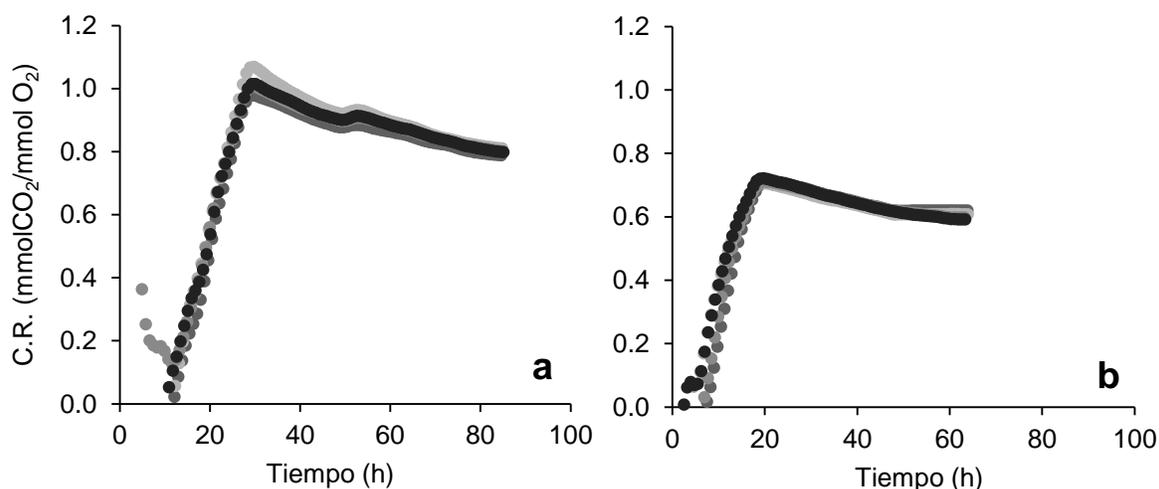


Figura 18. Coeficiente respiratorio (CR) en función del tiempo durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA en FES.

También en ambos casos la glucosa se consumió en las primeras 36 h y 24 h de cultivo, con inóculo con esporas y micelio, respectivamente. A los mismos tiempos, se alcanzó el máximo valor del CR (Fig. 18), lo cual corrobora la relación con la mayor actividad enzimática. Lareo y col. (2006) caracterizaron el crecimiento y la

esporulación de *Mucor bacilliformis* en FES usando un soporte inerte. Encontraron que la producción de esporas se inicia cuando la glucosa se ha agotado; en este momento, la pendiente del perfil de producción de CO<sub>2</sub> fue cercano a cero, lo cual corresponde a la fase estacionaria, en donde se observaron que la producción de CO<sub>2</sub> continuó aumentando gradualmente después de que la glucosa se agotara.

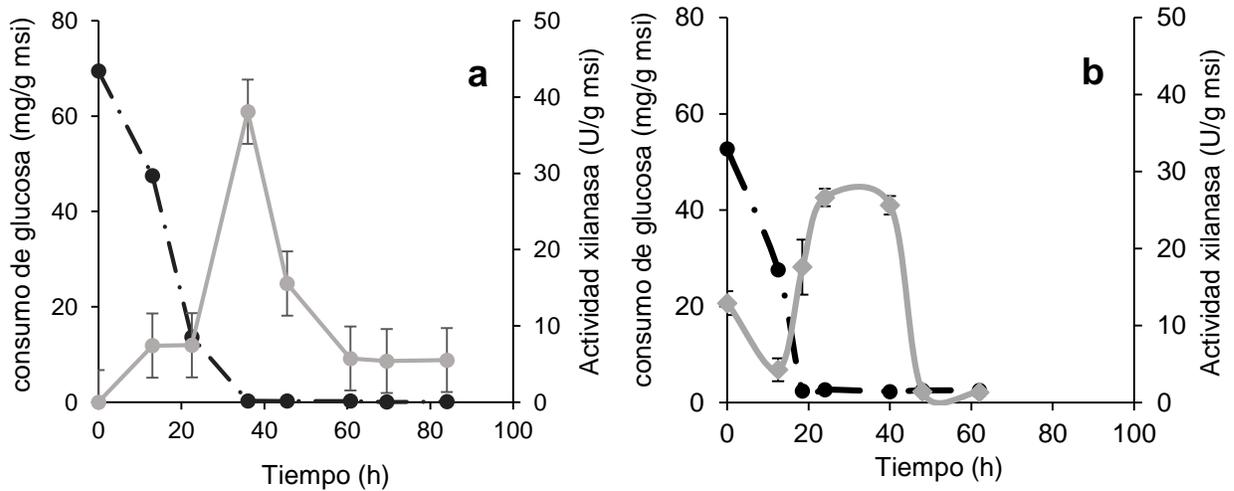


Figura 19. Consumo de glucosa y producción de xilanasa en función del tiempo durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA en FES.

En la Tabla 9, se muestran los valores de tasa específica de producción de CO<sub>2</sub>, y tiempo *lag* obtenidos durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA.

Tabla 9. Parámetros cinéticos de *T. harzianum* PBLA en FES en BRTV de 2.3 cm de diámetro.

Inóculo	$\mu_{CO_2}$ (1/h)	Tiempo <i>lag</i> (h)
esporas	0.32 ± 0.02	13.51 ± 0.36
micelio	0.22 ± 0.04	8.43 ± 0.87

Hasta el momento, las tasas específicas de producción de CO<sub>2</sub> ( $\mu_{CO_2}$ ) en los tres ensayos realizados en medio inoculado con esporas han sido similares (0.3 1/h), así como para el medio inoculado con micelio y 0.2 (1/h). El tiempo *lag* también se ha mantenido entre 13-20 h con inóculo de esporas y de 8 h con inóculo de micelio. Esto refleja la reproducibilidad de los resultados. Esto quiere decir que la  $\mu_{CO_2}$  y el tiempo *lag* fueron independientes de las variables modificadas en cada ensayo, como la temperatura, diámetro del biorreactor y concentración de MgSO<sub>4</sub>, lo único que se ha mantenido constante ha sido el tipo de soporte, el cual, puede ser el responsable de que estos parámetros se mantengan.

En la Figura 20 se muestran los valores de pH, actividad de agua ( $a_w$ ) y humedad (%) de las muestras tomadas durante el cultivo en los BRTV. Los valores de humedad y  $a_w$  se mantuvieron constantes durante todo el cultivo (Fig. b, c, e y f). Sin embargo, cuando los reactores se inocularon con esporas, el pH disminuyó a partir de las 13 h y se mantuvo alrededor de 4.5 hasta las 22 h (Fig. 20a), para registrar un aumento (3 unidades) a las 36 h. En los reactores inoculados con micelio (Fig. 20b) el pH disminuyó a las 12 h hasta valores cercanos a 5.9; a partir de las 12 h, el pH aumentó hasta 7.7 y se mantuvo así hasta el final del cultivo. Como se mencionó, la disminución del pH hasta valores de 4-5, por el crecimiento de *T. harzianum*, puede atribuirse a la producción de toxinas y antibióticos, favoreciendo su desarrollo. La disminución en los valores de pH pueden relacionarse con la producción de CO<sub>2</sub> (Figura 17), la cual inició a partir de las 12 y 6 h (inóculo con esporas y micelio, respectivamente). En ambos casos, el intervalo de tiempo en el que disminuye el pH corresponde, al intervalo de tiempo donde se obtiene la máxima tasa de producción de CO<sub>2</sub> (Fig. 16a y b).

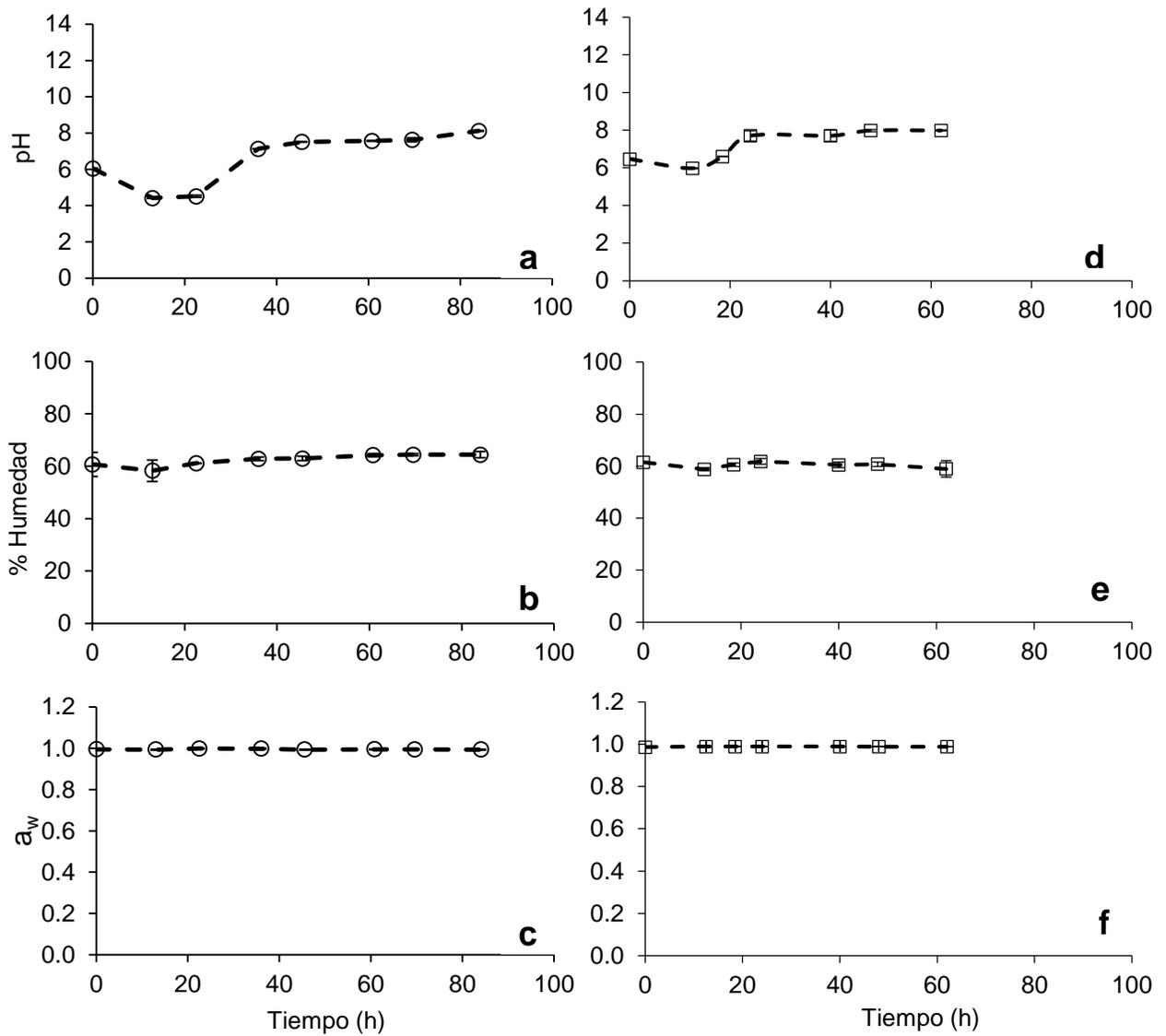


Figura 20. Valores de pH, humedad y actividad de agua durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA en FES. a, b y c: corresponden al inóculo con esporas. d, e y f: corresponden al inóculo de micelio.

### 8.5. Crecimiento de *T. harzianum* PBLA y producción de enzimas en biorreactor de tanque agitado

En esta sección se presentan los resultados de fermentaciones en BRTV de 2.3 cm y BRTH agitado inoculados con micelio. En un primer estudio se determinaron las condiciones iniciales y finales y, en el segundo, se realizó una cinética.

En la Figura 21 se muestra la tasa de producción de CO<sub>2</sub> obtenida en ambos tipos de biorreactores en los cuáles se obtuvo la máxima tasa de producción al mismo tiempo de cultivo (16.5 h). Sin embargo, ésta fue mayor en los BRTH (9.24 mg CO<sub>2</sub>/g msi h) que en los BRTV (5.75 mg CO<sub>2</sub>/g msi h), pero del análisis estadístico se observó que no hubo diferencia significativa (P = 0.058).

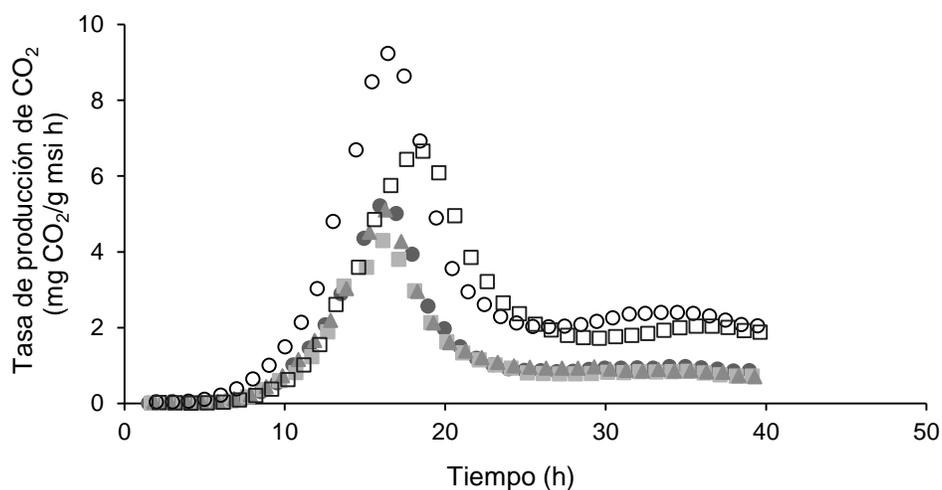


Figura 21. Tasa de producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA en FES utilizando biorreactores diferentes (símbolos llenos: BRTV, círculos vacíos: BRTH-1, cuadros vacíos: BRTH-2).

En la Figura 22 se muestra que la producción de CO<sub>2</sub> en los BRTH fue aproximadamente el doble que la obtenida en BRTV, (106, 85 y 49 mg CO<sub>2</sub>/g msi, para el BRTH-1, BRTH-2 y BRTV, respectivamente), el análisis estadístico corroboró que hay diferencia significativa con respecto al máximo valor de producción de CO<sub>2</sub>, con respecto al tipo de biorreactor. Sin embargo, en ambos

casos el tiempo *lag* tuvo una duración de 10 h y la fase de desaceleración se inició a las 19 h.

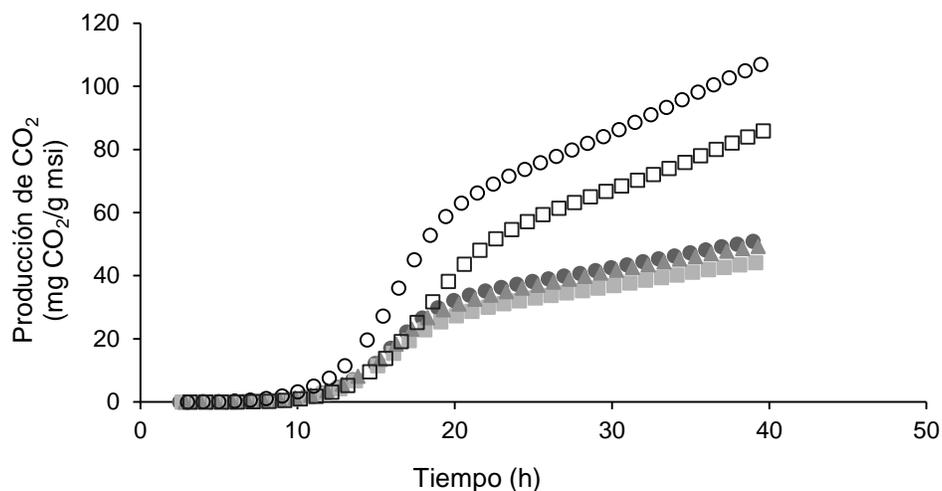


Figura 22. Producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA en FES utilizando biorreactores diferentes (figuras rellenas: BRTV, círculos vacíos: BRTH-1, cuadros vacíos: BRTH-2).

En la Figura 23 se muestran las actividades xilanasa y celulasa obtenidas al final del cultivo para ambos sistemas. En el caso de los BRTH se presenta el promedio de muestras tomadas de diferentes partes de los BRTH (centro, entrada de aire y entrada de agua a la chaqueta del BRTH). La producción de xilanasa en los BRTV fue mayor (24 U/g msi) que en los BRTH (9.2 U/g msi). La actividad celulasa fue la misma en ambos biorreactores, (1.31 y 1.3 U/g msi, para BRTV y BRTH, respectivamente). La menor actividad enzimática encontrada en estos últimos pudo deberse a una mayor acumulación de calor metabólico en el BRTH; sin embargo, en este estudio no se registró la temperatura.

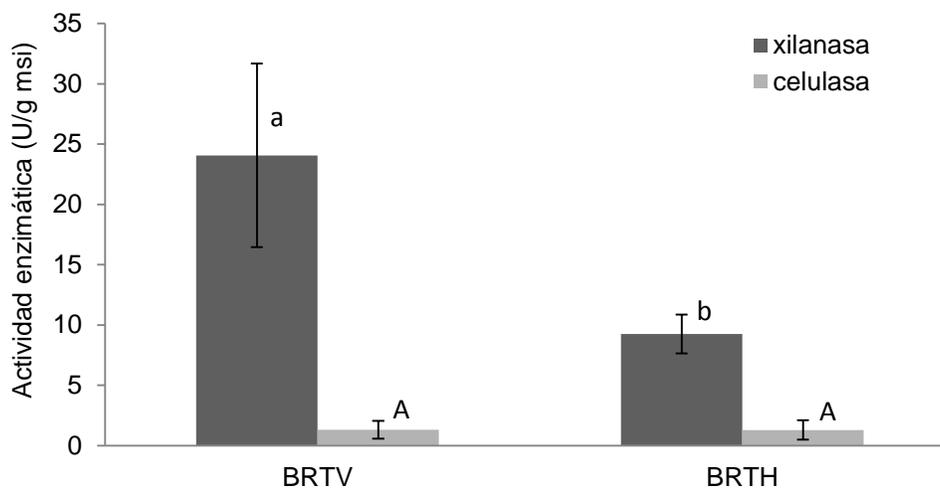


Figura 23. Actividad xilanasa y celulasa en función del tiempo durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA en FES en BRTV y BRTH agitado. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa en los valores de en la actividad xilanasa y celulasa, en los tipos de biorreactor evaluados.

En la Figura 24 se presenta el CR y se observa el incremento del mismo después de las 7 h de fermentación, tiempo que corresponde al tiempo *lag*. Después de dicho periodo, se observó un incremento en el CR hasta llegar a un máximo de 0.71 mmol CO<sub>2</sub>/mmol O<sub>2</sub>. A partir de las 20 h, el CR comenzó a decrecer ligeramente, con una tendencia casi constante hasta el fin del cultivo. Esto quiere decir que, a partir de las 7 h que empezó el incremento en CR, indica que el carbono en el medio se está mineralizando, se está formando CO<sub>2</sub> principalmente, una vez que llega a su máximo valor (0.71 mmol CO<sub>2</sub>/mmol O<sub>2</sub>), el carbono del medio de cultivo se está utilizando para la formación de biomasa o proteínas.

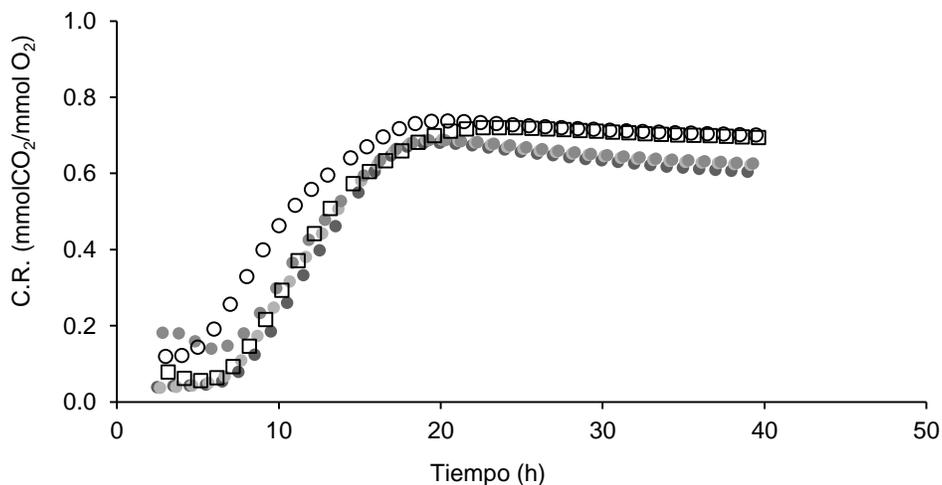


Figura 24. Coeficiente respiratorio acumulado (CR) en función del tiempo durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA en FES utilizando biorreactores diferentes (figuras rellenas: BRTV, círculos vacíos: BRTH-1, cuadros vacíos: BRTH-2).

Los parámetros cinéticos obtenidos a partir de los datos de CO<sub>2</sub> se muestran en la Tabla 10. Se puede observar que, la  $\mu_{CO_2}$  y el tiempo *lag* son ligeramente mayores en el BRTV con respecto al BRTH, sin embargo, el análisis estadístico mostró que no hubo diferencia significativa sobre los parámetros cinéticos en ambos sistemas.

Tabla 10. Parámetros cinéticos de *T. harzianum* PBLA en BRTV y BRTH.

Biorreactor	$\mu_{CO_2}$ (1/h)	Tiempo <i>lag</i> (h)
BRTV	$0.37 \pm 0.03^a$	$9.3 \pm 0.24^*$
BRTH	$0.33 \pm 0.02^a$	$8.35 \pm 1.5^*$

Letras y símbolos iguales indican que no hay diferencia significativa en los valores de  $\mu_{CO_2}$  y tiempo *lag*, en los tipos de biorreactor evaluados.

En la Tabla 11 se muestran los valores de pH, actividad de agua ( $a_w$ ) y humedad (%) de las muestras tomadas al inicio y final del cultivo.

Tabla 11. Valores de pH,  $a_w$  y humedad (%) en BRTV y BRTH al inicio y final del cultivo

Biorreactor	Tiempo (h)	pH	$a_w$	Humedad (%)
BRTV	0	6.23 ± 0.007	0.988 ± 0.000	62.38 ± 0.06
	38	6.85 ± 0.030 <sup>a</sup>	0.990 ± 0.000 <sup>*+</sup>	62.11 ± 0.27 <sup>A</sup>
BRTH-1	0	6.37 ± 0.007	0.989 ± 0.001	63.21 ± 0.74
	38	6.35 ± 0.080 <sup>b</sup>	0.990 ± 0.000 <sup>*+</sup>	69.69 ± 1.27 <sup>B</sup>
BRTH-2	0	6.36 ± 0.021	0.985 ± 0.002	61.71 ± 0.78
	38	6.82 ± 0.120 <sup>a</sup>	0.990 ± 0.000 <sup>*</sup>	64.70 ± 1.60 <sup>A</sup>

Letras y símbolos iguales indican que no hay diferencia significativa en los valores de pH,  $a_w$  y humedad, en los tipos de biorreactor evaluados.

Se encontró un ligero aumento de pH (0.5-0.6 unidades) en el BRTV y en el BRTH-2, mientras que en BRTH-1, no hubo diferencias significativas en el pH al final del cultivo, con respecto al valor inicial. La actividad de agua se mantuvo constante hasta el final del cultivo y la humedad sólo se mantuvo igual en los BRTV. En los BRTH, se registró un aumento (3-6 unidades) en el contenido de humedad al final del tiempo de cultivo. Ghulam y col. (2003) reportan la producción de pectinasa por *T. harzianum* en FES con cáscara de cítricos, encontrando la mayor actividad pectinasa utilizando una humedad de 70%. Así mismo, Deschamps y col. (1985) evaluaron la producción de celulasas con *T. harzianum* en FES con reactores estáticos y agitados, obteniendo una mayor actividad con una humedad inicial de 74%. Con base en la literatura decimos que, aunque aumentó la humedad en el BRTH, no hubo un efecto sobre la producción de  $CO_2$ ,  $\mu_{CO_2}$ , tiempo *lag*, y actividad celulasa así como la actividad celulasa.

Debido a la falta de datos de actividad enzimática y temperatura en función del tiempo, se compararon ambas variables en los BRTV y el BRTH en función del tiempo. En este último ensayo se trabajó bajo las mismas condiciones del ensayo anterior, pero se cuantificó la actividad xilanasa con respecto al tiempo de cultivo comparando los BRTH con los BRTV.

En la Figura 25 se muestra la tasa de producción de CO<sub>2</sub> en ambos tipos de biorreactores. Los perfiles obtenidos en los BRTV fueron similares entre ellos y similar al BRTH-2. El perfil del BRTH-1 fue diferente con respecto a los BRTV y BRTH-2. Sin embargo, el análisis estadístico mostró que no hubo diferencia significativa sobre el valor de la máxima tasa de producción de CO<sub>2</sub> (P= 0.214). Las máximas tasas de producción de CO<sub>2</sub> fueron, 8, 5 y 8 mg CO<sub>2</sub>/g msi h para el BRTV, BRTH-1 y BRTH-2, respectivamente. La producción de CO<sub>2</sub> (Fig. 26) fue menor en los BRTV y muy reproducible en comparación con los BRTH; sin embargo, la obtenida en ambos BRTH fue muy diferente entre sí (C.V. = 22%), esto fue corroborado en el análisis estadístico, ya que mostró que hubo diferencia significativa en los valores de máxima producción de CO<sub>2</sub>. La falta de reproducibilidad de los BRTH puede ser debida a que el agua de enfriamiento en estos reactores, se encontraba conectada en serie, provocando una mayor temperatura en el segundo BRTH.

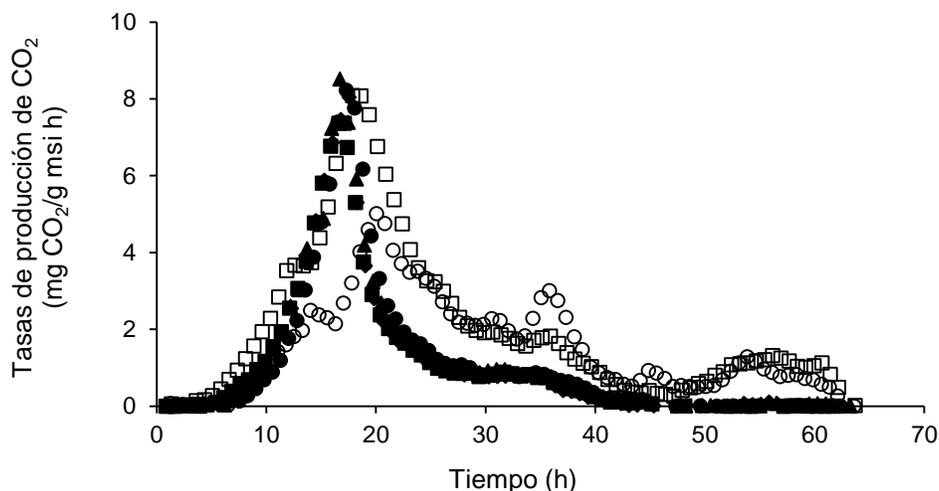


Figura 25. Tasa de producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA en FES utilizando biorreactores diferentes (figuras rellenas: BRTV, círculos vacíos: BRTH-1, cuadros vacíos: BRTH-2).

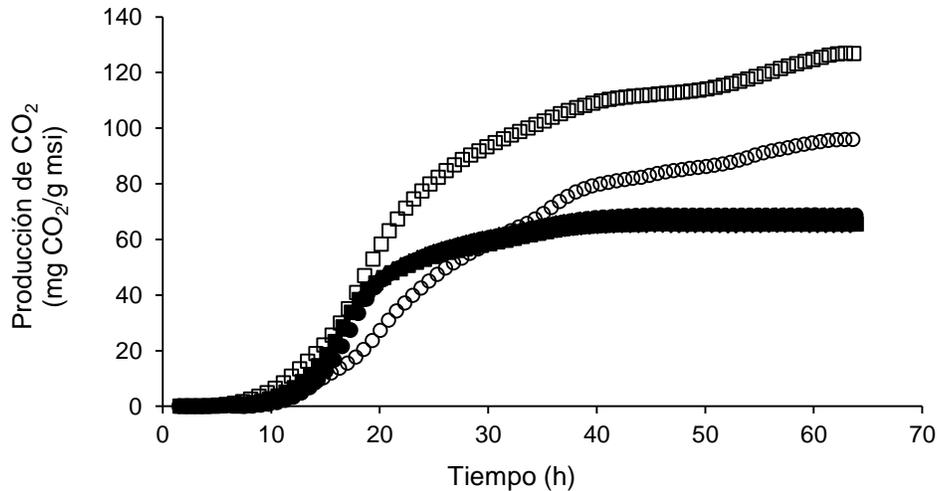


Figura 26. Producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA en FES inoculado con micelio utilizando biorreactores diferentes (figuras rellenas: BRTV, círculos vacíos: BRTH-1, cuadros vacíos: BRTH-2).

En la Figura 27 se presenta la cinética de producción de xilanasa. En este caso no se detectó actividad celulasa. En el caso de los BRTH se presenta el promedio de valores de actividad de muestras tomadas en diferentes partes de los BRTH (centro del BR, entrada de aire y entrada de la chaqueta).

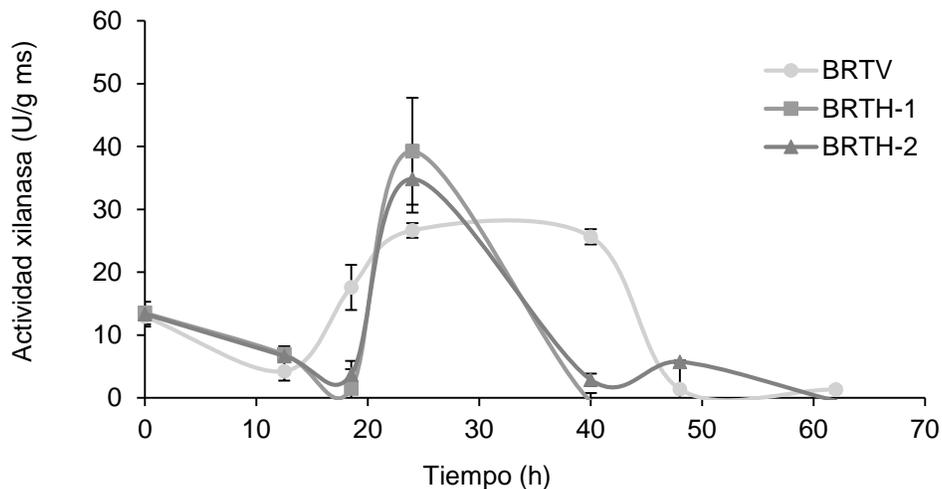


Figura 27. Cinética enzimática de actividad xilanasa en función del tiempo durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA en FES inoculado con micelio en BRTV y BRTH agitado.

La mayor producción de xilanas se obtuvo a las 24 h de cultivo para los dos sistemas evaluados (BRTV, 26.6 U/g msi y BRTH, 39.2 y 34.8 U/g msi). Aunque la actividad enzimática fue menor en los BRTV, ésta se mantuvo hasta las 40 h. El análisis estadístico, evaluado sobre los valores de máxima actividad xilanasa mostró que no hubo diferencia significativa ( $P=0.680$ ), en la actividad xilanasa sobre los diferentes tipos de biorreactor.

En la Figura 28 se presenta el consumo de glucosa en función del tiempo para ambos sistemas.

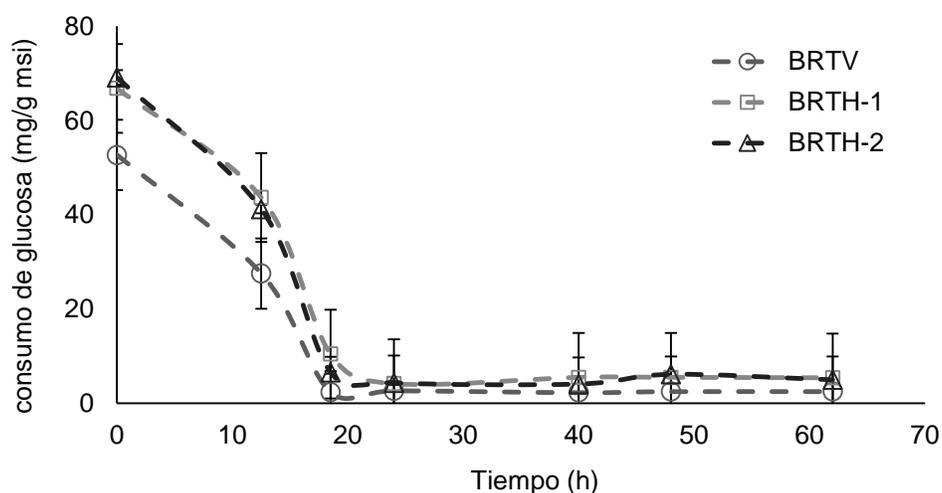


Figura 28. Consumo de glucosa en función del tiempo durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA en FES inoculado con micelio en BRTV y BRTH.

La glucosa se consumió casi en su totalidad antes de 18.5 h del cultivo, tiempo que corresponde al de inicio de producción de xilanas (Fig. 27).

En la Figura 29 se muestran los valores del CR para ambos tipos de biorreactores. Se identifican dos etapas, la primera de 0 a 15 h de cultivo, en donde el incremento en el CR es diferente en cada tipo de biorreactor. Después de las 20 h de cultivo, los perfiles del CR fueron muy similares. En todos los casos se observó un CR máximo cercano a 0.72 mmol CO<sub>2</sub>/mmol O<sub>2</sub>. Después de las 20 h el CR comienza a decrecer ligeramente hasta el final del cultivo. Esta disminución en el CR puede estar asociada con el proceso de producción de esporas (Lareo y col., 2006).

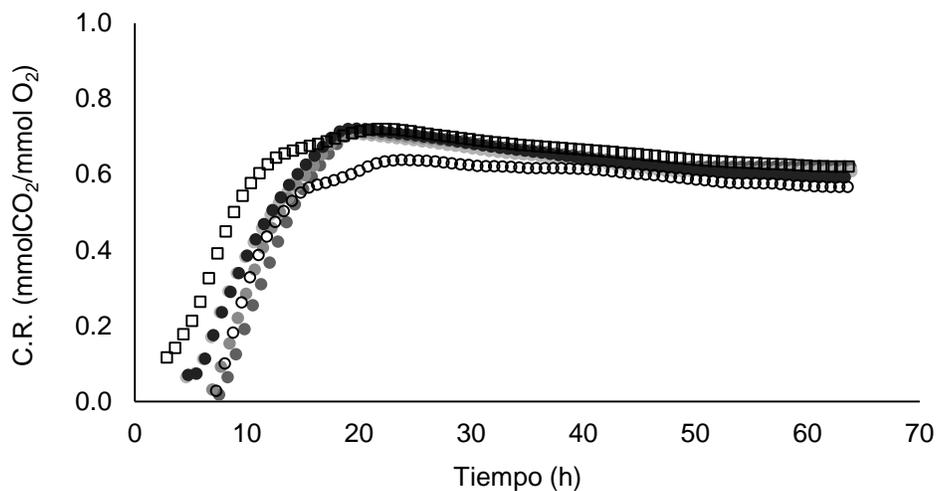


Figura 29. Coeficiente respiratorio (CR) en función del tiempo durante el cultivo de *T. harzianum* PBLA en FES inoculado con micelio utilizando biorreactores diferentes (figuras rellenas: BRTV, círculos vacíos: BRTH-1, cuadros vacíos: BRTH-2).

Los parámetros cinéticos obtenidos a partir de los datos de CO<sub>2</sub> se muestran en la Tabla 12. Donde se puede observar que los parámetros cinéticos se mantienen constantes, es decir, el análisis estadístico mostró que no hubo diferencia significativa en  $\mu_{CO_2}$  y el tiempo *lag* en los diferentes tipos de biorreactor.

Tabla 12. Parámetros cinéticos de *T. harzianum* PBLA BTRV y BRTH.

Biorreactor	$\mu_{CO_2}$ (1/h)	Tiempo <i>lag</i> (h)
BRTV	$0.22 \pm 0.04^a$	$8.43 \pm 0.87^*$
BRTH	$0.20 \pm 0.01^a$	$6.25 \pm 1.13^*$

Letras y símbolos iguales indican que no hay diferencia significativa en los valores de  $\mu_{CO_2}$  y tiempo *lag*, en los tipos de biorreactor evaluados.

En la Figura 30 se presenta el perfil de temperaturas, donde se evaluó la temperatura de dos termopares colocados en el cuerpo del biorreactor y dos más

colocados en la entrada y la salida de aire de los biorreactores. En este ensayo, cada vez que se tomó una muestra, se colocaba un termómetro de mercurio en el interior de los biorreactores. Estas mediciones, se señalan en la Figura 30 con los puntos indicados como “muestreo”.

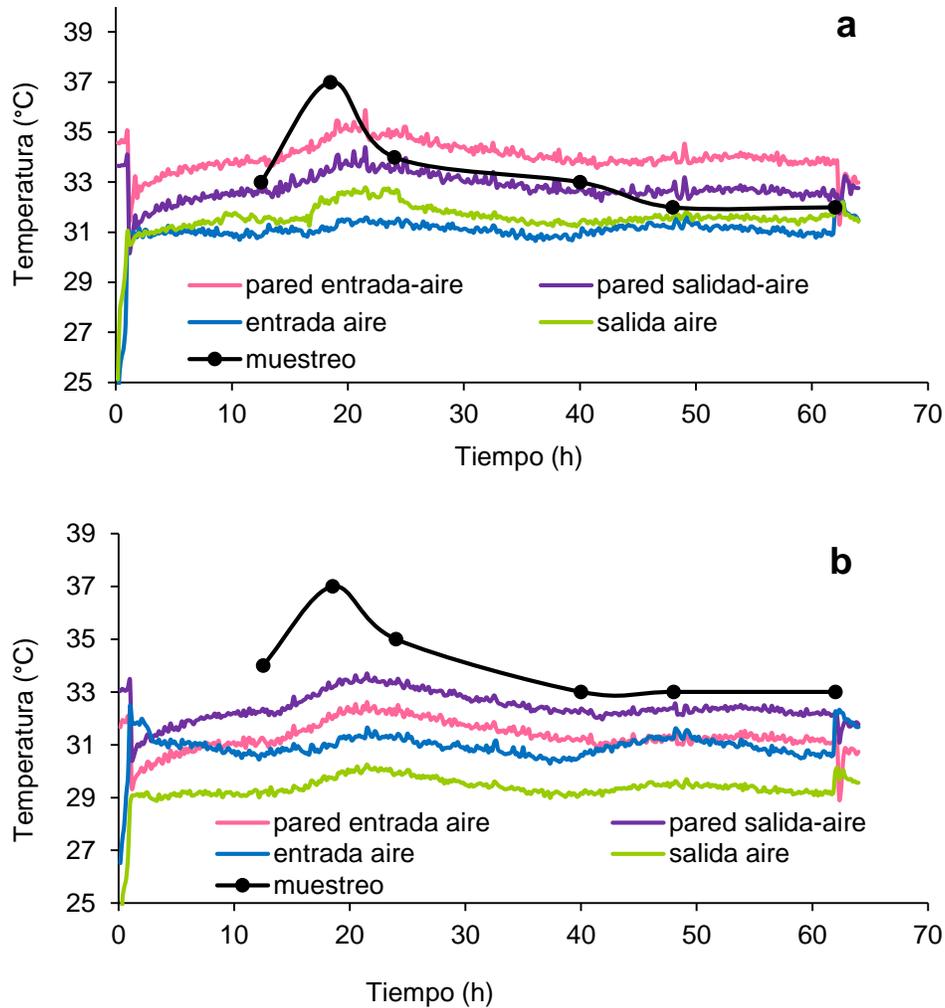


Figura 30. Perfil de temperaturas en biorreactores agitados en FES con aserrín de pino como soporte inoculado micelio de *T. harzianum* PBLA. a: corresponde al BRT-1. b: corresponde al BRT-2

Los perfiles de temperatura que corresponden a los termopares colocados en las paredes de los biorreactores fueron mayores (2 °C) que los que se encuentran en la entrada y salida de aire; sin embargo, la temperatura medida directamente en la masa fermentada fue mayor que la de los termopares y alcanzó valores máximos de 37°C a las 18.5 h. Dicho tiempo corresponde a la máxima tasa de producción de CO<sub>2</sub> como se mostró en la Figura 25. También se observó que las temperaturas son ligeramente mayores en el BRTH-1 con respecto al BRTH-2, como hipótesis proponemos que, pudo deberse a que los biorreactores se encontraban conectados en serie. Del recirculador se encontraba conectado primero el BRTH-2 seguido del BRTH-1, es decir, el agua que entraba al BRTH-2 pudo haber salido a una temperatura más alta comparada con la salida del recirculador y por lo tanto, provocó que el agua de la entrada del BRTH-1 fuera más alta.

En la Figura 31 se muestran los valores de pH, actividad de agua ( $a_w$ ) y humedad (%) de las muestras tomadas durante el cultivo.

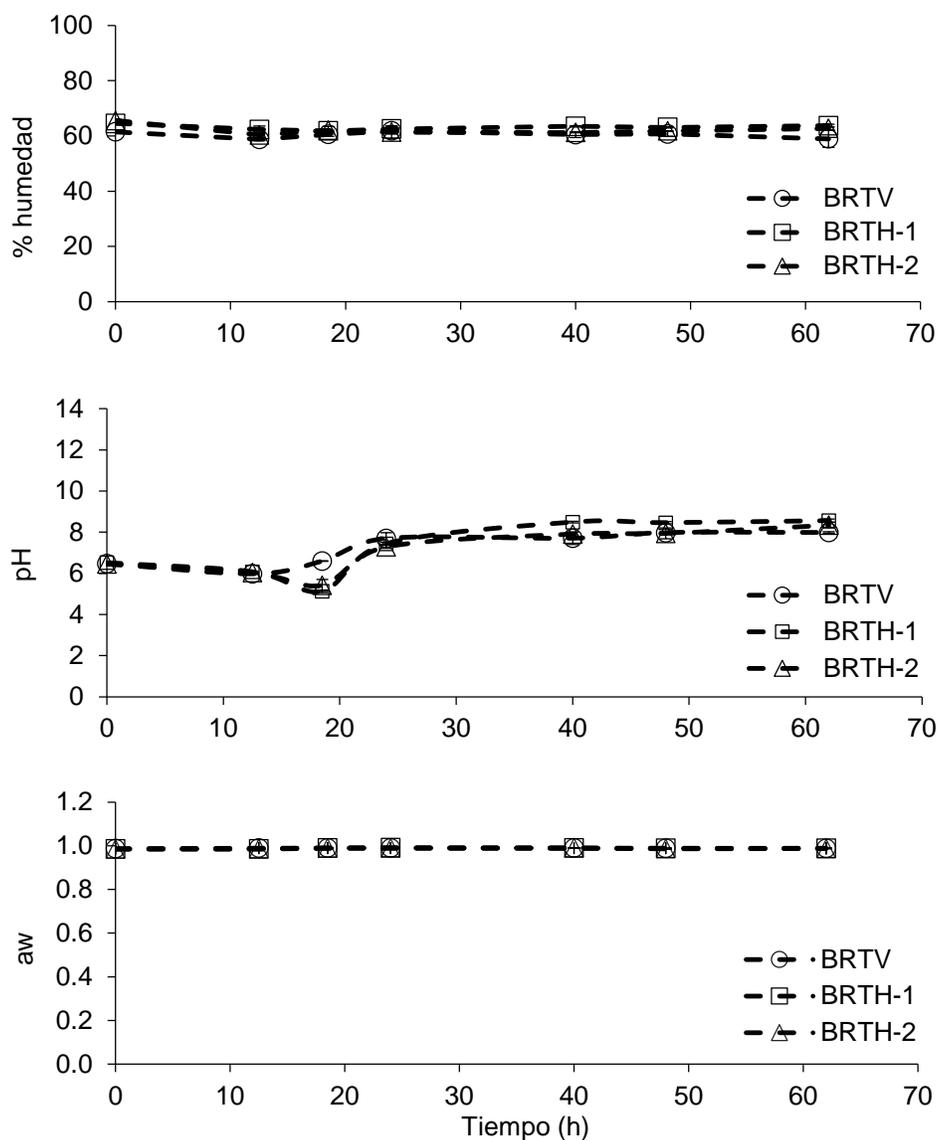


Figura 31. pH,  $a_w$  y humedad (%) sobre cinética en BRTV y BRTH agitado

Los valores de humedad y actividad de agua se mantuvieron constantes durante el todo el cultivo. El pH mostró una disminución (1 unidad), con respecto al valor inicial, a las 13 h del cultivo y se mantuvo así hasta las 18 h, tiempo en el cual se obtuvo la mayor tasa de producción de  $\text{CO}_2$  (Figura 25). Después de las 18 h, los valores de pH aumentaron (1-2 unidades) y se mantuvieron así hasta el final del cultivo. Este

comportamiento fue similar en el ensayo anterior, lo cual se puede atribuir a la presencia de actividad proteolítica, sin embargo no se midió dicha actividad.

Finalmente, en la Tabla 13 se muestra un resumen de los parámetros y actividades xilanasa y celulasa obtenidos en los ensayos realizados en este trabajo.

Tabla 13. Resumen de parámetros cinéticos y actividades enzimáticas obtenidos en los biorreactores de FES, bajo diferentes condiciones de cultivo.

Capítulo		dCO <sub>2</sub> (mg/g msi h)	CO <sub>2</sub> máx (mg/g msi)	Tiempo lag (h)	μ <sub>CO2</sub> (1/h)	Xilanasa (U/g msi)	Celulasa (U/g msi)
8.1		7.1 ± 0.0	56.6 ± 3.9	15.6 ± 0.13	0.38	79.1 ± 6.6	8.6 ± 1.50
8.2	e*	9.2 ± 0.8	100.5 ± 3.8	14.5 ± 0.07	0.37	-	-
	m <sup>+</sup>	6.6 ± 0.1	50.6 ± 2.8	8.26 ± 1.45	0.26	1.0 ± 0.3	-
8.3		7.6 ± 0.9	77.8 ± 2.9	20.4 ± 0.21	0.41	15.1 ± 2.4	1.7 ± 0.44
8.4	e*	5.2 ± 0.1	68.6 ± 3.7	13.5 ± 0.36	0.32	38.0 ± 5.2	-
	m <sup>+</sup>	8.0 ± 0.5	67.0 ± 2.0	8.4 ± 0.87	0.22	26.0 ± 0.5	-
8.5	BRTV	4.8 ± 0.5	48.1 ± 3.5	9.3 ± 0.24	0.37	24.0 ± 7.6	1.3 ± 0.70
	BRTH	7.9 ± 1.8	96.4 ± 15.0	8.3 ± 1.55	0.33	9.2 ± 11.4	1.3 ± 2.26
	BRTV	8.0 ± 0.5	67.0 ± 2.0	8.4 ± 0.87	0.22	26.0 ± 0.5	-
	BRTH	6.5 ± 2.2	111.3 ± 21.8	6.2 ± 1.13	0.20	37.0 ± 3.1	-

e\*: inóculo con suspensión de esporas.

m<sup>+</sup>: inóculo con micelio.

Los valores de la tasa máxima de producción de CO<sub>2</sub> y la producción de CO<sub>2</sub> por *T. harzianum* PBLA oscilaron entre 4-9 mg CO<sub>2</sub>/g msi h y 50-111 mg CO<sub>2</sub>/g msi, respectivamente. El tiempo lag se encontró entre 13-21 h cuando se inoculó con una suspensión de esporas y éste disminuyó casi el doble al utilizar un inóculo con micelio, para el cual se encontró un tiempo lag de aproximadamente 9 h. La tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> (μ<sub>CO2</sub>), se mantuvo constante en todos los ensayos, con un valor alrededor de 0.3 1/h; este parámetro puede ser comparado con la tasa específica de crecimiento (μ) obtenida en otros trabajos. Por ejemplo, Rodríguez y col. (1999), produjeron esporas de *T. harzianum* sobre melaza y bagazo de caña en FES, donde obtuvieron una μ de 0.108 1/h. Agosin y col. (1997),

determinaron este parámetro con *T. harzianum* en cultivo líquido, donde obtuvieron una  $\mu$  de 0.11 1/h.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que, indirectamente, se obtuvo una tasa específica mayor que las reportadas en la literatura, es decir, que *T. harzianum* PBLA crece más rápido al utilizar aserrín de pino como soporte sólido, en comparación con melaza y bagazo de caña y crece más rápido en un cultivo sólido comparado con un cultivo líquido.

En la Tabla 13 puede observarse que las actividades xilanasa y celulasa obtenidas en este estudio se encontraron en un rango de 15 a 38 U/g msi y entre 1.3 y 1.7 U/g msi, respectivamente, sin embargo, en el primer capítulo se obtuvieron 79 U/g msi de actividad xilanasa y 8 U/g msi de actividad celulasa, pero estos resultados no pudieron ser reproducibles en los capítulos posteriores. En la Tabla 14 se presentan algunos valores de actividad enzimática reportados en otros trabajos, donde puede verse que los valores obtenidos en nuestro estudio resultaron menores a que algunos de los reportados en la literatura. Sin embargo, las actividades enzimáticas varían en función del sustrato y la cepa utilizados. Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los reportados por Deschamps y col. (1985), quienes obtuvieron valores similares de actividad celulasa y xilanasa al utilizar un biorreactor estático, comparado con un biorreactor agitado, también nuestros resultados coinciden con el trabajo de Roussos y col. (1992), donde se obtuvieron valores de actividad celulasa similares.

Tabla 14. Producción de celulasas y xilanasas por diferentes cepas de *T. harzianum* reportadas en la literatura.

<b>Cepa</b>	<b>Actividad</b>	<b>Referencia</b>
<i>T. harzianum</i> F-470	18 U/g sustrato inicial en BRTV y 11 U/g SI en tanque agitado (celulasa)	Deschamps y col., 1985
<i>T. harzianum</i> CCMF-470	1.23 U/g solido fermentado (celulasa)	Roussos y col., 1992
<i>T. harzianum</i> F-416	438 U/g sustrato inicial, proporción de humedad de 1:1.2, pH 4.5, 48 h a 33°C. (xilanasa)	Fadel, 2001
<i>T. harzianum</i> T2008	8.2 U/g sólidos secos en el matraz y 10.1 U/g sólidos secos en el tanque agitado.	Zahangir y col., 2009
<i>T. harzianum</i> P49P11	0.78U/ml y 36.96 U/ml de celulasa y xilanasa respectivamente en matraz. 1.21U/ml y 80 U/ml de celulasa y xilanasa respectivamente en el reactor de tanque agitado	Delabona y col., 2012.

## 9. Conclusiones

Se demostró que las temperaturas de incubación evaluadas (28, 30, 32 y 34°C), no tuvieron un efecto significativo sobre los parámetros determinados a excepción de la actividad celulasa, por lo cual se eligió la temperatura de 30°C como la adecuada realizar para este trabajo.

También se observó que durante el cultivo en estado sólido de *T. harzianum* PBLA se llevó a cabo la acumulación de calor metabólico con un incremento de 5°C.

La concentración de sulfato de magnesio no tuvo efecto sobre los parámetros asociados a la producción de CO<sub>2</sub> y enzimas.

La mayor actividad xilanasas se obtuvo durante la parte intermedia del cultivo, se obtuvo 38 y 26 U/g msi para cultivos inoculados con esporas y micelio respectivamente.

Utilizar un inóculo de micelio, permite una reducción del tiempo *lag* del doble comparado con el inóculo de esporas.

La  $\mu_{CO_2}$  obtenida en este trabajo fue mayor comparada con las reportadas en la literatura, lo que indica que, *T. harzianum* PBLA crece más rápido al utilizar aserrín de pino como soporte sólido comparada con otros soportes.

La agitación en los BRTH favoreció la producción de CO<sub>2</sub>, sin afectar la integridad del micelio, permitiendo la remoción de calor metabólico.

## 10. Referencias bibliográficas

- Archana A. y Satyanarayana. (1997). "Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid-state fermentation". *Enzyme and Microbial Technology*. 21:12-17.
- Astolfi V., Joris J., Verlindo R., Vladimir O. J., Maugeri F., Mazutti M. A., Oliveira D. de, y Treichel H. (2011). "Operation of a fixed-bed biorreactor in batch and fed-batch modes for production of inulinase by solid-state fermentation". *Biochemical Engineering Journal*. 58-59:39-49.
- Barrios G. J. (2012). "Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochemistry*. 47:175-185.
- Böhmer U., Frömmel S., Bley T., Müller M., Frankenfeld K., y Miethe P. (2011). "Solid-state fermentation of lignocellulosic materials for the production of enzymes by the white-rot fungus *Trametes hirsute* in a modular bioreactor". *Engineering in Life Sciences*. 11:395-401.
- Collins T., Gerday C., y Feller G. (2005). "Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases". *FEMS Microbiology Reviews*. 29:3-23.
- Delabona Priscila da Silva, Sanchez Farinas C., Ribeiro da Silva M., Freitas Azzoni S., de laCruz Pradella J. G. (2012). "Use of new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production". *Bioresource Technology*. 107:517-521.
- Deschamps F., Giuliano C., Asther M., Huet M.C. y Roussos S. (1985). "Cellulase production by *Trichoderma harzianum* in static and mixed solid-state fermentation reactors under nonaseptic conditions". *Biotechnol. Bioeng.* 27:1385-1388.
- Domingues F. C., Queiroz J. A., Cabral J.M.S., y Fonseca L.P. (2000). "The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30". *Enzyme and Microbial Technology*. 26:394-4021.
- Durand A. (2003). "Bioreactor designs for solid state fermentation". *Biochemical Engineering Journal*. 13:113-125.
- Farinas C. S., Vitcosque G. L., Fonseca R. F., Bertucci N. V., y Couri S. (2011). "Modeling the effects of solid state fermentation operating conditions on

endoglucanase production using an instrumented bioreactor". *Industrial Crops and Products*. 34:1186-1192.

Figuroa M. A., Esparza I. T., Saucedo C. G., Huerta O. S., Gutiérrez R. M., Favela T. E. (2011). "Improvement of heat removal in solid state fermentation tray bioreactors by forced air convection". *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 86: 1321-1331.

Ghulam N. N., Asgher M., Shah A. H., Sheikh M. A. y Asad M. J. (2003). "Production of pectinase by *Trichoderma harzianum* in solid state fermentation of citrus peel". *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*. 40:193-201.

Goyal A., Ghosh B., y Eveleigh D. (1991). "Characteristics of Fungal Cellulases". *Bioresource Technology*. 36:37-50.

Gusakov A. V. (2011). "Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production". *Trends in Biotechnology*. 29: 419-425.

Hölker U., Höfer M., y Lenz J. (2004). "Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi". *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64:175-186.

Ito K., Kawase T., Sammoto H., Gomi K., Kariyama M., y Miyake T. (2011). "Uniform culture in solid-state fermentation with fungi and its efficient enzyme production". *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 111:300-305.

Juturu V., y Chuan W. Jin. (2012). "Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications". *Biotechnology Advances*. 30:1219-1227.

Kumar N., Rani R., Sukumaran R., y Pandey A. (2008). "Cellulase Production Under Solid-State Fermentation by *Trichoderma reesei* RUT C30: Statistical Optimization of Process Parameters". *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 151:122–131.

Lareo C., Sposito A. F., Bossio A. L., y Volpe D.C. (2006). "Characterization of growth and sporulation of *Mucor bacilliformis* in solid state fermentation on an inert support" *Enzyme and Microbial Technology*. 38:391-399.

Liu J., Li D. B., y Yang J. C. (2007). "Operating Characteristics of solid-state fermentation biorreactor with air pressure pulsation". *Applied Biochemistry and Microbiology*. 43:211-216.

Lonsane B. K., Ghildyal N. P., Budiartman S. y Ramakrishna S. V. (1985). "Engineering aspects of solid state fermentation" *Enzyme and Microbial Technology*. 7: 258-265.

Madamwar D., Patel S. y Parikh H. (1989). "Solid State Fermentation for cellulase and  $\beta$ -glucosidase production by *Aspergillus niger*". *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 67:424-426.

- Mitchell D. A., Berovic M. y Krieger N. (2002). "Overview of solid state bioprocessing". *Biotechnology Annual Review*. 8:183-225.
- Mitchell D. A., Berovic M. y Krieger N. (2006). "Solid-state Fermentation bioreactor Fundamentals: Introduction and Overview". *Solid-state Fermentations bioreactors: fundamentals of design and operation*. 1-12.
- Montenecourt B. S. (1983). "*Trichoderma reesei* cellulases". *Trends in Biotechnology*. 1:156-161.
- Narra M., Dixit G., Divecha J., Madamwar D., y Shah A. R. (2012). "Production of cellulases by solid state fermentation with *Aspegillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild alkali-treated rice Straw". *Bioresource Technology*. 121:355-361.
- Nevalainen H., Suominen P., y Taimisto K. (1994). "On the safety of *Trichoderma reesei*". *Journal of Biotechnology*. 37:193-200.
- Ooijkaas L.P., Weber F. J., Buitelaar R. M, Tramper J. y Rinzema R. (2000). "Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems". *Tibtech*. 18:356-360.
- Pandey A. (1991). "Effect of particle size of substrate on enzyme production in solid-state fermentation". *Bioresource Technology*. 37:169-172.
- Pandey A. (2003). "Solid-state fermentation". *Biochemical Engineering Journal*. 13:81-84.
- Pandey A. y Radhakrishnan S. (1992). "Packed-bed column bioreactor for production of enzyme". *Enzyme Microbiology and Technology*. 14:486-488.
- Paula E. M., Castillo L. C. J. P. y Vahan K. B. (2007). "Effect of agitation pattern on growth of *Monascus* in SSF in drum type biorreactor". *Journal of Biotechnology*. 131S:133-187.
- Polizeli M. L. T. M., Rizzatti A. C. S., Monti R., Terenzi H. F., Jorge J. A., y Amorim D. S. (2005). "Xylanases from fungi: properties and industrial applications". *Applied Microbiology and Biotechnology*. 67:577-591.
- Rabinovich M. L., Melnik M. S., y Bolobova A. V. (2002). "Microbial Cellulases (Review)". *Applied Biochemistry and Microbiology*. 38:305-321.
- Rani Singhania Reeta, Kumar Patel Anil, Soccol Carlos R, y Pandey Ashok. (2009) "Recent advances in solid-state fermentation". *Biochemical Engineering Journal*. 44: 13-18.
- Rezende M. I., Barbosa A. de Melo, Dalberto Vasconcelos A. F., Sakurada Endo A., (2002) "Xylanase production by *Trichoderma harzianum* Rifai by solid state

- fermentation on sugarcane bagasse". *Brazilian Journal of Microbiology*. 33:67-72.
- Rodríguez F. D. E., Rodríguez León J. A., Carvalho J. C. de, Sturm W. y Soccol C. R. (2011). "The behavior of kinetic parameters in production of pectinase and xylanase by solid-state fermentation". *Bioresource Technology*. 102:10657-10662.
- Romero A. O., Huerta L. M., Damián H. M. A., Dominguez H. F. y Arellano V. D. A. (2009). "Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles". *Revista Colombiana de Biotecnología*. 11:143-151.
- Roussos S. y Perraud G. I. (1996). "Fisiología y Bioquímica de microorganismos utilizados en procesos de Fermentación en Estado Sólido". *Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería*. Pp. 341-348.
- Roussos S., Olmos A., Rimbault M., Saucedo Castañeda G. y Losane B. K. (1991). "Strategies for large scale inoculum development for solid state fermentation system: conidiospores of *Trichoderma harzianum*". *Biotechnology Techniques*. 5:415-420.
- Ruiz Leza H. A., Rodríguez Jasso R. M., Rodríguez Herrera R., y Contreras J. C. (2007) "Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido". *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 6:33-40.
- Sadiq Butt Masood, Thair Nadeem Muhammad, Ahmad Zulfiqar, y Tauseef Sultan Muhammad. (2008). "Xylanases and their applications in baking industry". *Food Technology and Biotechnology*. 46:22-31.
- Saucedo C. G., Trejo H. M. R., Losane J. M., Roussos S. Dufour D. y Raimbault M. (1994). "On-line automated monitoring and control systems for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in aerobic and anaerobic solid-state fermentations". *Process Biochemistry*. 29: 13-24.
- Schuster A. y Schmoll M. (2010). "Biology and biotechnology of *Trichoderma*". *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87:787-799.
- Subramaniyan S., y Prema P. (2002). "Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology and Application". *Critical Reviews in Biotechnology*. 22:33-46.
- Sukumaran R. K., Rani S. R. y Pandey A. (2005). "Microbial cellulases: Production, applications and challenges". *Journal of Scientific & Industrial Research*. 64:832-844.
- Torres- Mancera Ma. T. "Obtención de ácido clorogénico de la pulpa de café a partir de extractos enzimáticos producidos por fermentación en medio sólido".

(2013). Tesis para obtener el grado de doctora. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México D. F.

Solicitud de patente MX/a/2013/004638, 2013. Sistema de respirometría con administración remota para el monitoreo en línea de la concentración de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> y flujo de los gases de salida en procesos biológicos. Cuyos inventores son Jesús Gerardo Saucedo Castañeda, Ernesto Favela Torres, Gustavo Viniegra González, María Teresa Torres Mancera, Arturo Alejandro Figueroa Montero y Gabriel Rosales Zamora.