

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**IZTAPALAPA**



**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**PRODUCCIÓN DE CELULASAS Y XILANASAS POR  
FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO EN BIORREACTORES DE  
ESCALA SEMIPILOTO**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**M. en B. Nohemi López Ramírez**

Dr. Ernesto Favela Torres Director

Dra. Tania L. Volke Sepúlveda Asesor

Dra. Isabelle Gaime Perraud Asesor

Ciudad de México

Junio 2019

---

---

---

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana-  
Unidad Iztapalapa está incluido en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad  
(PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con la  
referencia 001466.

---

Ciudad de México a 4 de Junio de 2019

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

**PRODUCCIÓN DE CELULASAS Y XILANASAS POR FERMENTACIÓN EN  
ESTADO SÓLIDO EN BIORREACTORES DE ESCALA SEMIPILOTO**

Que presentó

**M. en B. Nohemi López Ramírez**

Comité tutorial:

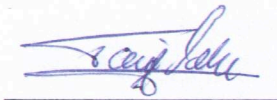
Director: Dr. Ernesto Favela Torres  
Biotecnología UAM-I

Asesores: Dra. Tania L. Volke Sepúlveda  
Biotecnología UAM-I

Dra. Isabel Gaime Perraud  
Instituto de Investigación para el Desarrollo-Francia

Jurado:

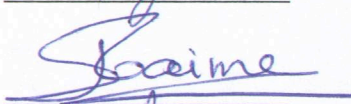
Presidente: Dra. Tania L. Volke Sepúlveda  
Biotecnología UAM-I



Secretario: Dr. J. Antonio Martínez Ruiz  
Biotecnología UAM-I



Vocal: Dra. Isabelle Gaime Perraud  
Instituto de Investigación para el Desarrollo-Francia



Vocal: Quentin Carboué  
Biotecnología UAM-I



---

---

# *Cristofer*

---

---

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres Emiliano y Praxédis, por darme el mejor regalo que es la vida y por guiarme en ella.

A Cris, quien es mi motivación y el gran amor de mi vida.

A los demás integrantes de mi familia (hermanos, cuñadas y sobrinos) por todo el apoyo incondicional que me han brindado.

A Ernesto por darme la oportunidad de trabajar con él, por todas las enseñanzas y por la infinita paciencia a lo largo de estos años. Principalmente por todo su apoyo y su sinceridad que ayudaron en mi crecimiento académico y personal.

A las Dras. Tania Volke e Isabelle Gaime por ser tan comprensivas, por escucharme y por sus consejos.

A los Dres. J. Antonio Martínez y Quentin Carboué por sus pertinentes comentarios y sugerencias que contribuyeron a la mejora de este documento.

Al profesor Francisco Valdés, quien me dio la oportunidad de conocer el complejo mundo de la simulación, y en ningún momento dejó que me rindiera, gracias por creer en mí.

A mi querido y adorado “compareishon” Goyito por ser el mejor amigo y compañero de trabajo, por escucharme y por todo su apoyo.

A todos mis amigos y compañeros que han estado presentes (aún a larga distancia) y a todos aquellos que se siguen sumando en la lista de esta gran travesía

---

---

# Contenido

Índice de Figuras .....	ix
Índice de Tablas .....	xii
RESUMEN.....	14
ABSTRACT .....	14
<b>1. Introducción</b> .....	16
<b>2. Revisión bibliográfica</b> .....	18
2.1. Celulasas y xilanasas.....	18
2.2. Celulasas .....	18
2.3. Xilanasas.....	19
2.4. Producción de enzimas celulasas y xilanasas en fermentación en estado sólido .....	20
2.5. Sustratos utilizados para la producción de celulasas y xilanasas mediante fermentación en estado sólido .....	20
2.5.1. Aserrín.....	22
2.5.2. Lirio acuático .....	23
2.6. Microorganismos utilizados para producción de enzimas celulolíticas en FES.....	24
2.7. Biorreactores para producción de enzimas en FES.....	26
2.8. Acumulación de calor en biorreactores de fermentación en estado sólido .....	28
2.9. La agitación en biorreactores de fermentación en estado sólido	29
<b>3. Antecedentes</b> .....	29
<b>4. Justificación</b> .....	32
<b>5. Hipótesis</b> .....	33
<b>6. Objetivos</b> .....	33
6.1. General .....	33
6.2. Particulares .....	33
<b>7. Métodos y materiales</b> .....	34

---

---

7.1. Microorganismo.....	34
7.2. Medios de cultivo .....	34
7.2.1. Medio de cultivo para la producción de esporas.....	34
7.2.2. Medio de cultivo para la producción de micelio .....	34
7.2.3. Medio de cultivo para la producción de celulasas y xilanasas.....	35
7.3. Soporte.....	35
7.3.1. Aserrín.....	35
7.3.2. Lirio acuático .....	35
7.4. Fermentación en estado sólido .....	36
7.4.1. Fermentación con aserrín .....	36
7.4.2. Fermentación con lirio acuático .....	37
7.5. Biorreactores .....	38
7.5.1. Biorreactores tubulares estáticos (BTE) .....	38
7.5.2. Biorreactor horizontal de tanque agitado (BHA) .....	39
7.6. Análisis de CO <sub>2</sub> y O <sub>2</sub> .....	41
7.7. Métodos analíticos .....	41
7.7.1. Determinación de pH .....	42
7.7.2. Humedad.....	42
7.7.3. Azúcares reductores .....	42
7.7.4. Actividad enzimática .....	42
7.8. Análisis estadístico.....	43
<b>8. Resultados .....</b>	<b>44</b>
8.1. Crecimiento de <i>T. harzianum</i> y producción de enzimas con aserrín de pino como soporte.....	44
8.1.1. Efecto de la temperatura de incubación sobre el crecimiento y la producción de enzimas con aserrín de pino en BTE.....	45
8.1.2. Efecto del diámetro del biorreactor (BTE) sobre la acumulación de calor metabólico, crecimiento y producción de enzimas en aserrín de pino .....	49
8.1.3. Efecto de la tasa de agitación sobre el crecimiento y la producción de enzimas con aserrín de pino en BHA.....	54

---

---

8.2. Efecto de la temperatura de incubación sobre el crecimiento y la producción de enzimas en lirio acuático .....	60
8.2.1. Establecimiento de condiciones de producción de inóculo....	60
8.2.2. Efecto de la temperatura en el crecimiento y producción de enzimas por <i>T. harzianum</i> en BTE.....	61
8.2.3. Efecto de la humedad sobre el crecimiento y la producción de enzimas utilizando como sustrato lirio acuático en BTE .....	65
8.2.4. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento y la producción de enzimas utilizando como sustrato lirio acuático en BTE .....	69
8.2.5. Efecto de la frecuencia de agitación sobre el crecimiento y la producción de enzimas utilizando como sustrato lirio acuático en BHA.....	73
<b>9. Conclusiones</b> .....	<b>82</b>
<b>10. Referencias</b> .....	<b>84</b>



---

---

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Biorreactores tubulares estáticos empacados con aserrín, inoculados con <i>T. harzianum</i> PBLA, incubados en un baño con agua a 30°C.....	39
<b>Figura 2.</b> Diagrama esquemático del biorreactor horizontal agitado (BHA) para fermentación en estado sólido (BHA).....	40
<b>Figura 3.</b> a) Tasa de producción de CO <sub>2</sub> . b) Producción de CO <sub>2</sub> en función del tiempo de incubación en FES por <i>T. harzianum</i> PBLA a diferentes temperaturas de incubación, en BTE. ....	45
<b>Figura 4.</b> a) Actividad xilanasa y b) Actividad celulasa obtenidas a las 48 h de la FES por <i>T. harzianum</i> PBLA a diferentes temperaturas de incubación. ....	48
<b>Figura 5.</b> a) Perfil de temperatura; b) Tasa de producción de CO <sub>2</sub> en función del tiempo en FES por <i>T. harzianum</i> PBLA en BTE con diámetros internos diferentes. ....	51
<b>Figura 6.</b> Gradiente radial de temperatura en función del diámetro de BTE.....	51
<b>Figura 7.</b> a) Actividad xilanasa y b) Actividad celulasa obtenidas a las 48 h en FES por <i>T. harzianum</i> PBLA, en biorreactores con diámetros internos diferentes. ....	53
<b>Figura 8.</b> Valores máximos de temperatura en el lecho del BHA en FES por <i>T. harzianum</i> PBLA. ....	55
<b>Figura 9.</b> a) Tasa de producción de CO <sub>2</sub> . b) Producción de CO <sub>2</sub> en función del tiempo en FES por <i>T. harzianum</i> PBLA a diferentes tasas de agitación en BHA.....	55
<b>Figura 10.</b> Consumo de azúcares reductores por <i>T. harzianum</i> PBLA durante 50 h de cultivo, bajo condiciones de FES, en función de la tasa de agitación (0, 0.5, 1 y 3 rpm) en BHA. ....	57

---



---

<b>Figura 11.</b> a) Actividad xilanasa y b) Actividad celulasa obtenidas en FES por <i>T. harzianum</i> PBLA en diferentes tasas de agitación (0, 0.5, 1 y 3 rpm). .....	58
<b>Figura 12.</b> Cinética de producción de inóculo de micelio en medio líquido YPD por <i>T. harzianum</i> PBLA a 30 °C, 150 rpm durante 72 h. ....	61
<b>Figura 13.</b> a) Tasa de producción de CO <sub>2</sub> . b) Producción de CO <sub>2</sub> en función del tiempo en FES por <i>T. harzianum</i> PBLA a diferentes temperaturas de incubación en BTE. ....	62
<b>Figura 14.</b> a) Actividad xilanasa, b) Actividad celulasa, obtenidas en FES por <i>T. harzianum</i> PBLA con lirio acuático bajo diferentes temperaturas de incubación (28, 30, 32, 34 y 36°C). ....	64
<b>Figura 15.</b> a) Tasa de producción de CO <sub>2</sub> y b) Producción de CO <sub>2</sub> en función del tiempo en FES por <i>T. harzianum</i> PBLA, bajo porcentajes de humedad (65, 70, 75 y 80 %) durante 96 h. ....	66
<b>Figura 16.</b> a) Actividad xilanasa y b) Actividad celulasa obtenidas en FES por <i>T. harzianum</i> PBLA en lirio acuático bajo diferentes porcentajes de humedad (65, 70, 75 y 80 %). ....	68
<b>Figura 17.</b> a) Tasa de producción de CO <sub>2</sub> y b) Producción de CO <sub>2</sub> en función del tiempo en FES por <i>T. harzianum</i> PBLA con diferentes sales de amonio (sulfato de amonio y nitrato de amonio) durante 96 h. ....	70
<b>Figura 18.</b> a) Actividad xilanasa y b) Actividad celulasa obtenidas al final de la FES por <i>T. harzianum</i> PBLA en lirio acuático con diferentes sales de amonio (sulfato de amonio y nitrato de amonio). ....	71
<b>Figura 19.</b> Valores máximos de temperatura medidas en el lecho del BHA para una agitación continua e intermitente registradas a las 48 y 64 h respectivamente en FES por <i>T. harzianum</i> PBLA. ....	74
<b>Figura 20.</b> Tasa de producción de CO <sub>2</sub> en FES con lirio acuático por <i>T. harzianum</i> PBLA a 30°C durante 72 h bajo diferentes frecuencias de agitación (continua e intermitente).. ....	75

---

---

<b>Figura 21.</b> Producción de CO <sub>2</sub> en FES con lirio acuático por <i>T. harzianum</i> PBLA a 30 °C durante 72 h bajo diferentes frecuencias de agitación. (continua e intermitente).....	76
<b>Figura 22.</b> Consumo de azúcares reductores en FES con lirio acuático por <i>T. harzianum</i> PBLA a 30 °C durante 72 h bajo diferentes frecuencias de agitación (continua e intermitente). ....	77
<b>Figura 23.</b> Actividad xilanasa obtenida en FES con lirio acuático por <i>T. harzianum</i> PBLA a 30°C durante 72 h con diferentes frecuencias de agitación (continua e intermitente) .....	78

---

---

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Composición lignocelulósica de lirio acuático .....	24
<b>Tabla 2.</b> Condiciones de operación de ensayos realizados con aserrín de pino .....	37
<b>Tabla 3.</b> Condiciones de operación de ensayos realizados con lirio acuático .....	38
<b>Tabla 4.</b> Parámetros asociados a la producción de CO <sub>2</sub> ; tasa máxima de producción de CO <sub>2</sub> (T <sub>máx</sub> PCO <sub>2</sub> ), producción máxima de CO <sub>2</sub> (P <sub>máx</sub> CO <sub>2</sub> ), tiempo Lag (t <sub>Lag</sub> ) y tasa específica de producción de CO <sub>2</sub> (μ <sub>CO2</sub> ), evaluados en BTE en FES con <i>T. harzianum</i> PBLA con aserrín de pino, bajo diferentes temperaturas de incubación.....	47
<b>Tabla 5.</b> Parámetros asociados a la producción de CO <sub>2</sub> ; tasa máxima de producción de CO <sub>2</sub> (T <sub>máx</sub> PCO <sub>2</sub> ), producción máxima de CO <sub>2</sub> (P <sub>máx</sub> CO <sub>2</sub> ), tiempo Lag (t <sub>Lag</sub> ) y tasa específica de producción de CO <sub>2</sub> (μ <sub>CO2</sub> ), evaluados en BTE en FES con <i>T. harzianum</i> PBLA con aserrín de pino, bajo diferentes tamaños de diámetro. ....	52
<b>Tabla 6.</b> Parámetros asociados a la producción de CO <sub>2</sub> ; tasa máxima de producción de CO <sub>2</sub> (T <sub>máx</sub> PCO <sub>2</sub> ), producción máxima de CO <sub>2</sub> (P <sub>máx</sub> CO <sub>2</sub> ), tiempo Lag (t <sub>Lag</sub> ) y tasa específica de producción de CO <sub>2</sub> (μ <sub>CO2</sub> ), evaluados en BHA en FES con <i>T. harzianum</i> PBLA con aserrín de pino bajo diferentes tasas de agitación (0, 0.5, 1 y 3 rpm). .....	56
<b>Tabla 7.</b> Parámetros cinéticos y tasa específica de producción de CO <sub>2</sub> , evaluados en BHA en FES por <i>T. harzianum</i> PBLA con aserrín de pino bajo diferentes tasas de agitación (0, 0.5, 1 y 3 rpm).....	59
<b>Tabla 8.</b> Parámetros asociados a la producción de CO <sub>2</sub> ; tasa máxima de producción de CO <sub>2</sub> (T <sub>máx</sub> PCO <sub>2</sub> ), producción máxima de CO <sub>2</sub> (P <sub>máx</sub> CO <sub>2</sub> ), tiempo Lag (t <sub>Lag</sub> ) y tasa específica de producción de CO <sub>2</sub>	

---



---

( $\mu_{CO_2}$ ), evaluados en BTE en FES con <i>T. harzianum</i> PBLA con lirio acuático bajo diferentes temperaturas de incubación. ....	63
<b>Tabla 9.</b> Composición de la biomasa lignocelulósica de aserrín de pino y lirio acuático .....	64
<b>Tabla 10.</b> Parámetros asociados a la producción de CO <sub>2</sub> ; tasa máxima de producción de CO <sub>2</sub> ( $T_{m\acute{a}x}PCO_2$ ), producción máxima de CO <sub>2</sub> ( $P_{m\acute{a}x}CO_2$ ), tiempo Lag ( $t_{Lag}$ ) y tasa específica de producción de CO <sub>2</sub> ( $\mu_{CO_2}$ ), evaluados en BTE en FES con <i>T. harzianum</i> PBLA con lirio acuático bajo diferentes porcentajes de humedad (65, 70, 75 y 80%). .....	67
<b>Tabla 11.</b> Parámetros asociados a la producción de CO <sub>2</sub> ; tasa máxima de producción de CO <sub>2</sub> ( $T_{m\acute{a}x}PCO_2$ ), producción máxima de CO <sub>2</sub> ( $P_{m\acute{a}x}CO_2$ ), tiempo Lag ( $t_{Lag}$ ) y tasa específica de producción de CO <sub>2</sub> ( $\mu_{CO_2}$ ), evaluados en BTE en FES con <i>T. harzianum</i> PBLA con lirio acuático bajo diferentes sales de amonio (sulfato de amonio y nitrato de amonio). .....	71
<b>Tabla 12.</b> Parámetros asociados a la producción de CO <sub>2</sub> ; tasa máxima de producción de CO <sub>2</sub> ( $T_{m\acute{a}x}PCO_2$ ), producción máxima de CO <sub>2</sub> ( $P_{m\acute{a}x}CO_2$ ), tiempo Lag ( $t_{Lag}$ ) y tasa específica de producción de CO <sub>2</sub> ( $\mu_{CO_2}$ ), evaluados en BHA en FES con <i>T. harzianum</i> PBLA con lirio acuático bajo diferente frecuencia de agitación (continua e intermitente). .....	76
<b>Tabla 13.</b> Actividades celulasas y xilanasas obtenidas en diferentes tipos de biorreactores. CMCasa: Carboximetilcelulasa BG: beta-glucosidasa FPasa: actividad sobre papel filtro .....	81

---

---

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la agitación sobre el crecimiento y la producción de celulasas y xilanasas por *Trichoderma harzianum* PBLA en FES, con el uso de residuos orgánicos (aserrín de pino y lirio acuático) en un biorreactor horizontal agitado (BHA). Previo a los estudios con agitación, se realizaron estudios en biorreactores tubulares estáticos (BTE), evaluando primeramente el efecto de la temperatura de incubación (26, 28, 30, 32, 34, 36 y 38°C). Para aserrín se encontró que intervalo de temperatura óptimo para el crecimiento y producción de xilanasas fue entre 26 - 36°C. Obteniendo la máxima actividad xilanasa ( $100.7 \pm 7.9$  U/g ms) entre 30 y 34°C, y, la máxima actividad celulasa ( $8.09 \pm 0.98$  U/g ms) sin diferencias significativas en el intervalo evaluado. Para lirio acuático, no hubo diferencias significativas en la actividad xilanasa ( $58.6 \pm 4.5$  U/g ms) en las temperaturas evaluadas, y la máxima actividad celulasa ( $19.2 \pm 3.3$  U/g ms) se obtuvo entre 28 y 34°C. Posteriormente, se evaluó el diámetro del biorreactor sobre la acumulación de calor metabólico obteniendo un incremento en la temperatura ( $1.08^\circ\text{C}/\text{cm}$ ) con el aumento del diámetro del BTE, obteniendo una temperatura máxima de  $34.6^\circ\text{C}$  con el BTE de 4.2 cm de diámetro. Para la el crecimiento y producción de xilanasas y celulasas con lirio acuático se evaluaron diferentes factores; humedad (65, 70, 75 y 80 %) y fuente de nitrógeno (nitrato de amonio y sulfato de amonio), encontrando que las mejores condiciones para el crecimiento y producción de enzimas fueron 65 % de humedad y nitrato de amonio como fuente de nitrógeno. Para los estudios con agitación, primeramente, los estudios fueron realizados con aserrín bajo diferentes tasas (0, 0.5, 1 y 3 rpm), obteniendo que, a 0.5 y 1 rpm, se permitió el crecimiento del hongo y el aumento en la producción de xilanasas. Además, mediante el modelo de Luedeking y Piret se determinó que ambas actividades enzimáticas están asociadas a la producción de  $\text{CO}_2$ . Para los estudios con diferentes frecuencias de agitación (continua e intermitente) se utilizó lirio acuático, encontrando que, una agitación continua favoreció el crecimiento del hongo, en contraste con las condiciones intermitentes. En ambos casos (aserrín y lirio) el uso de la agitación favoreció la producción de xilanasas, sin embargo, la producción de celulasas se vio afectada negativamente

---

---

## ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effect of stirring on the growth and production of cellulases and xylanases by *Trichoderma harzianum* PBLA in FES, with the use of organic residues (pine sawdust and water hyacinth) in a stirred horizontal bioreactor (SHB). Prior to the shaking studies, studies were performed on static tubular bioreactors (STB), evaluating first the effect of the incubation temperature (26, 28, 30, 32, 34, 36 and 38°C). For sawdust it was found that the optimal temperature range for the growth and production of xylanases was between 26 - 36°C. Obtaining maximum xylanase activity ( $100.7 \pm 7.9$  U/g dm) between 30 and 34°C, and, the highest cellulase activity ( $8.09 \pm 0.98$  U/g dm) without significant differences in the evaluated interval. For water hyacinth, there were no significant differences in xylanase activity ( $58.6 \pm 4.5$  U/g dm) at the temperatures evaluated, and the maximum cellulase activity ( $19.2 \pm 3.3$  U/g dm) was obtained between 28 and 34°C. Subsequently, the diameter of the bioreactor was evaluated on the accumulation of metabolic heat obtaining an increase in temperature ( $1.08^\circ\text{C}/\text{cm}$ ) with the increase in the diameter of the STB, obtaining a maximum temperature of  $34.6^\circ\text{C}$  with the STB of 4.2 cm of diameter. For the growth and production of xylanases and cellulases with water hyacinth, different factors were evaluated; humidity (65, 70, 75 and 80 %) and nitrogen source (ammonium nitrate and ammonium sulfate), finding that the best conditions for the growth and production of enzymes were 65 % humidity and ammonium nitrate as a source of nitrogen. For studies with stirring, first, the studies were conducted with sawdust under different rates (0, 0.5, 1 and 3 rpm), obtaining that, at 0.5 and 1 rpm, the growth of the fungus was allowed and the increase in the production of xylanases. In addition, through the Luedeking and Piret model, it was determined that both enzymatic activities are associated with the production of  $\text{CO}_2$ . For the studies with different frequencies of stirring (continuous and intermittent), water hyacinth was used, finding that a continuous stirring favored the growth of the fungus, in contrast with the intermittent conditions. In both cases (sawdust and water hyacinth) the use of stirring favored the production of xylanases, however, the production of cellulases was negatively affected.

---

---

## 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 *et al.*, 2006). Los sustratos sólidos son típicamente residuos agroindustriales de bajo costo, como salvado de trigo, rastrojo de maíz y paja de trigo (Brijwani *et al.* 2011).

Los microorganismos más utilizados en FES son los hongos filamentosos, ya que están ampliamente distribuidos en la naturaleza y crecen fácilmente sobre materiales sólidos. Estos organismos producen eficientemente diferentes enzimas para degradar estos materiales y utilizar los nutrientes para su supervivencia. Dentro de los hongos filamentosos con mayor capacidad de degradación de fibra de origen vegetal se encuentran los del género *Trichoderma* (Ito *et al.*, 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 de volumen más pequeño, menor costo de procesamiento, mayor productividad, es una técnica simple y se requiere menos energía, entre otras. La principal desventaja de la FES, se relaciona con la dificultad para controlar los parámetros de la fermentación, como el pH, la temperatura y la humedad (Hamidi-Esfahani *et al.*, 2004).

La FES con hongos de rápido crecimiento está asociada con altas tasas de generación de calor metabólico (Paula *et al.*, 2007). Para evitar lo anterior, se han implementado estrategias de operación como la aireación y agitación, ya que 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 crecimiento microbiano en biorreactores.

La eliminación eficiente del calor metabólico es un reto importante en el diseño de biorreactores a gran escala para los procesos de FES, especialmente para aquellos realizados con hongos, en los que es deseable que el lecho de fermentación permanezca estático durante la mayor parte del proceso. Un mezclado



---

---

constante o frecuente puede dañar las hifas o disminuir el tamaño de partícula del sustrato, lo que puede originar una disminución en el tamaño de poro en el lecho (Sánchez *et al.*, 2006).

En la primera parte de este trabajo se hace una revisión de la literatura relacionada con la producción de enzimas celulasas y xilanasas por fermentación en estado sólido, los tipos de soporte utilizador para la FES, los microorganismos utilizados, así como algunos aspectos generales de estas estas enzimas y tipos de biorreactores. 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. Celulasas y xilanasas

Las celulasas y xilanasas son enzimas de gran importancia industrial, que tienen numerosas aplicaciones y potencial biotecnológico para diversas industrias, entre ellas, productos químicos, combustibles, alimentos, cervecería, textiles, pulpa de papel y agricultura (Anwar *et al.*, 2014).

### 2.2. Celulasas

Celulasas es el nombre genérico que recibe el complejo de enzimas que cataliza la hidrólisis de la celulosa y los oligosacáridos relacionados. Son activas a un pH de 4.8 y un intervalo de temperaturas de 40-50°C (de Castro *et al.* 2010). La acción sinérgica de estas enzimas se lleva a cabo mediante tres tipos principales: endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas. Las endoglucanasas, representadas por la endo-1-4- $\beta$ -glucanasa (EG, EC 3.2.1.4), rompen aleatoriamente los enlaces glicosídicos internos de la región amorfa de la celulosa liberando polisacáridos con grados más bajos de polimerización, así como oligosacáridos solubles. Entre las principales enzimas exoglucanasas se encuentran la celobiohidrolasa (CBH, EC 3.2.1.91) y la glucanohidrolasa (GH, EC 3.2.1.74). La primera, cataliza la división de celobiosa (disacárido de glucosa, enlace  $\beta$ -1,4) desde los extremos reductores (CBH tipo I) o no reductores (CBH tipo II), mientras que la segunda libera directamente la glucosa de los extremos de la celulosa. Las  $\beta$ -glucosidasas incluyen a la  $\beta$ -1,4-glucosidasa (BGL, EC 3.2.1.21), que cataliza la hidrólisis de la celobiosa y de oligosacáridos solubles (Narra *et al.* 2012, Babbar y Oberoi 2014).

Las celulasas se utilizan en diversos procesos económicamente relevantes. La acción hidrolítica de las celulasas sobre la celulosa es liberar los monosacáridos de glucosa que la conforman, los cuales sirven para la producción de combustibles, así como la producción de otros productos químicos, algunos de ellos sustitutos potenciales para los derivados del petróleo (Kilikian *et al.*, 2014).

---

---

Las celulasas fúngicas tienen una arquitectura simple que contiene un dominio catalítico (DC) y un dominio de unión de celulosa (DUC) por medio de un péptido. El DUC se ancla al sustrato de celulosa que permite al DC realizar su función catalítica. EL DUC no está implicado en la hidrólisis, pero su eliminación reduce significativamente la actividad de la enzima hacia el sustrato (Juturu y Wu 2014).

### **2.3. Xilanasas**

Las xilanasas son glicosidasas cuyo tamaño va desde 6 hasta 80 KDa; son activas en un intervalo de pH de 4.5-6.5 y a temperaturas entre 40 y 60°C. 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 participan en la producción de xilosa, una fuente primaria de carbono para el metabolismo celular. 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 *et al.*, 2005, Butt *et al.*, 2008).

Las xilanasas tienen varias aplicaciones en la industria. Se utilizan para la producción de productos químicos a granel, tratamiento enzimático de alimento para animales, para liberar azúcares de pentosa, procesos de clarificación de jugos y vinos, procesos de biodecoloración de pulpa y pale, bio-blanqueo de pastas de madera, aditivos alimentarios en la industria de la panificación, ingredientes de detergentes o composiciones de cuidado de tejidos (Juturu y Wu 2012).

La mayoría de las celulasas y xilanasas comerciales son producidas por fermentación en estado líquido (FEL). Sin embargo, la FES se considera una tecnología ideal y rentable para la producción de enzimas celulolíticas. Las condiciones de la FES imitan el entorno natural de los hongos lo que resulta en una mayor productividad. Además, las celulasas y xilanasas producidas bajo FES son a menudo más termoestables y resistentes a diferentes valores de pH (Zimbardi *et al.*, 2013).

---

---

## **2.4. Producción de celulasas y xilanasas por fermentación en estado sólido**

La tecnología enzimática está notablemente vinculada al desarrollo de las fermentaciones, particularmente para la producción de enzimas (Pandey *et al.*, 1999). La FES es un proceso que implica el crecimiento microbiano en la superficie y dentro de una matriz porosa, en ausencia o casi ausencia de agua libre entre partículas. Cuando se tiene un bajo contenido de humedad, la fermentación sólo puede llevarse a cabo por un número limitado de microorganismos, principalmente levaduras y hongos, aunque también se han usado algunas bacterias (Couto y Sanromán 2006).

Se ha incrementado el interés por procesos de FES en la industria de la biotecnología, debido a su potencial para la producción de metabolitos y su amplia gama de aplicaciones en la industria de alimentos, combustibles, química y farmacéutica. La producción de enzimas es una de las aplicaciones más importantes de la FES, puesto que presenta ventajas sobre la fermentación sumergida, como la alta productividad volumétrica, bajo costo del equipo involucrado, mejor rendimiento del producto, menor generación de residuos y menor tiempo de proceso, entre algunas otras. Por tales razones, es una tecnología ambientalmente más amigable pues, además de lo anterior, se utilizan residuos agrícolas y agroindustriales como sustratos, evitando los problemas asociados a su eliminación (de Castro y Sato 2015).

El tipo de cepa, las condiciones de cultivo, la naturaleza del sustrato y la disponibilidad de nutrientes son otros factores importantes que afectan el rendimiento de la producción de enzimas por FES (Bhargav *et al.* 2008).

## **2.5. Sustratos utilizados para la producción de celulasas y xilanasas mediante fermentación en estado sólido**

Un factor importante en los procesos de FES es la naturaleza del sustrato sólido empleado, cuya selección depende principalmente de su costo y disponibilidad. El sustrato sólido suministra los nutrientes al cultivo y, además, sirve como anclaje para las células microbianas. Entre las cualidades que deben considerarse para la

---

---

selección de un sustrato particular son el tamaño de partícula, contenido de humedad/actividad de agua (Couto y Sanromán 2006).

Se pueden diferenciar dos tipos de sistemas de FES según la naturaleza del soporte sólido utilizado. El primero implica el cultivo en un soporte inerte (material sintético), mientras que el segundo sistema, y el más utilizado, implica el cultivo en un soporte natural (material orgánico). Ambos materiales (inerte y natural) son insolubles en agua, pero absorben agua en su matriz, lo que proporciona la humedad necesaria en el sistema para que el crecimiento y las actividades metabólicas de los microorganismos puedan llevarse a cabo. Esto requiere que los sustratos sólidos utilizados tengan la capacidad de retener agua en su matriz (Chen y He 2012,) (Daâssi *et al.* 2016).

La selección de sustratos adecuados para la FES se ha centrado principalmente en el uso de residuos agroindustriales, que presentan la ventaja de ser sustratos renovables de bajo costo. Además, constituyen una opción idónea, ya que su uso les da un valor comercial, aún después de haberse considerado como residuos (Thomas *et al.*, 2013). Esto, debido a que los grandes volúmenes generados, rebasan la capacidad de biodegradación natural, de manera que estos residuos se pueden acumular llegando a convertirse en un riesgo, ya sea porque son quemados o depositados sin control en grandes áreas, generándose de esta manera contaminación ambiental (Piña-Guzmán *et al.* 2016).

Los residuos agroindustriales se consideran como los mejores sustratos para los procesos de FES, ya que suministran los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos. Éstos incluyen bagazo de caña de azúcar, trigo, arroz, maíz y salvado de granos, pajas de trigo, arroz, coco, desperdicios de plátano, desechos de té y café, desperdicios de yuca, de palma de aceite, pulpa de remolacha azucarera, pulpa de sorgo, orujo de manzana, uva, harina de trigo y diversos desechos vegetales (Couto y Sanromán 2006).

Gran parte de los residuos agroindustriales se compone principalmente de celulosa (35 - 50 %), hemicelulosa y lignina (25 - 30 %), lo que favorece la formación

---

---

de enzimas, debido a que este tipo de polisacáridos inducen la producción de enzimas hidrolíticas y ligninolíticas (Zhao *et al.*, 2014, Yazid *et al.*, 2017).

Los residuos más prometedores para la FES, incluyen residuos agrícolas y forestales, que son muy abundantes. En México, la producción anual de madera es de aproximadamente 8 millones de m<sup>3</sup>. De este volumen, 70% se destina a la industria del aserrado de madera generando alrededor de 2.8 millones de m<sup>3</sup> de desechos, principalmente aserrín, virutas y cortezas. El manejo de estos residuos representa un problema, ya que se emplean principalmente como fuente de energía, afectando negativamente el ambiente, generando polvo en el aire y contribuyendo a la emisión de CO<sub>2</sub>. Además, perjudican la salud de trabajadores y habitantes de las zonas cercanas a los aserraderos, pues eventualmente pueden sufrir de autocombustión y causar incendios (Fregoso-Madueño *et al.*, 2017). Como una medida de control para la calidad del ambiente, existe una regulación federal que prohíbe la quema de aserrín por lo que, en los aserraderos, se regala o se vende a precios mínimos, o bien se tira de forma clandestina para evitar su acumulación en los aserraderos (Mateo-Sánchez *et al.*, 2002).

En consecuencia, es necesario encontrar alternativas de uso a residuos de esta naturaleza, ya que poseen características deseables para procesos industriales.

### **2.5.1. Aserrín**

El aserrín y la corteza de pino (*Pinus* spp.), provenientes de la industria maderera, tienen potencial como sustrato, además poseen alta disponibilidad por las grandes cantidades producidas en México (Ortega-Martínez *et al.*, 2010). En el sector agrícola, el aserrín puede mejorar las características físicas de los medios de crecimiento, permitiendo la germinación y el desarrollo de raíces. Los efectos favorables pueden compararse con los de la turba, tanto por la densidad de la masa como por la porosidad y aireación de los suelos arenosos y retención de agua en suelos arcillosos (Martínez-López *et al.*, 2012). En México, el aserrín se ha evaluado como sustrato de solanáceas; su efecto se refleja en un sistema eficiente, contribuyendo a la producción de plantas de buena calidad (Ortega-Martínez *et al.*

---

---

2010). Otra de las aplicaciones de aserrín puede ser como suplemento alimenticio para ganado; el uso de aserrín en la alimentación de rumiantes tiene impacto en la ganancia de peso para la producción de carne, disminuyendo el costo de fuentes comunes de fibra. Donde además de aportar fibra necesaria para la dieta, el aserrín puede utilizarse como fuente de energía sólo en caso de que los rumiantes cuenten con las condiciones adecuadas para la actividad de bacterias celulolíticas y hemicelulolíticas (Mateo-Sánchez *et al.*, 2002). Además, el interés por el uso de materiales lignocelulósicos como materia prima en procesos de transformación por microorganismos se ha incrementado desde hace varias décadas. El aserrín es utilizado para la producción de etanol, combustible y otros químicos (Palonen *et al.*, 2004).

El aserrín representa el principal subproducto de bajo valor, disponible en grandes cantidades, derivado de los procesos de transformación de la madera (Auxenfans *et al.*, 2014). Los principales componentes de la madera son celulosa (42 - 50 %), hemicelulosa (25 - 30 %), lignina (20 - 25 %) y extractos (5 %) (Kaushal, *et al.*, 2012).

### **2.5.2. Lirio acuático**

El lirio acuático, *Eichhornia crassipes*, es una planta acuática flotante de agua dulce perteneciente a la familia de las *Pontederiaceae*, originaria de la cuenca del río Amazonas y distribuido por todo el mundo (Sindhu *et al.*, 2017, Ganguly *et al.*, 2012). El lirio tiene una alta tasa de crecimiento (220 Kg/ha·día) debido a lo cual, genera algunos problemas ambientales (Narra *et al.*, 2017). La gran cantidad de plantas presentes en los cuerpos de agua dificulta el acceso a los sitios de pesca, provocando el bloqueo de ríos y canales, la elevación de los índices de evaporación y el impedimento del paso de luz al fondo de los estanques, lo que trae como consecuencia la eliminación de microalgas que son el alimento de algunos peces. Además, provoca deficiencia en la transferencia de oxígeno entre plantas y el ambiente (Malik 2007).

Sin embargo, el lirio acuático, así como todos los materiales vegetales, se componen en su mayoría de tres polisacáridos principales: celulosa, hemicelulosa y lignina. Además, cabe resaltar que la lignina es un compuesto polifenólico complejo que mejora la rigidez de la pared celular de las plantas. En el caso del lirio, la cantidad de lignina presente es baja (Tabla 1), de manera que la celulosa y hemicelulosa están más disponibles para ser hidrolizadas (Liu *et al.*, 2018). En ese sentido, el lirio tiene potencial para la producción de diversos productos de alto valor agregado tales como: enzimas, ácido levulínico, biogás, alimento para peces, briquetas de combustible, polímero muy absorbente, etc. (Sindhu *et al.*, 2017).

**Tabla 1.** Composición lignocelulósica de lirio acuático

<b>Componentes lignocelulósicos (%) base seca</b>			<b>Referencia</b>
<b>Hemicelulosa</b>	<b>Celulosa</b>	<b>Lignina</b>	
38.01 ± 1.26	24.00 ± 0.74	9.50 ± 0.84	(Narra <i>et al.</i> , 2017)
15 - 25	30 - 55	3 - 4	(Bayrakci y Kocar, 2014)
21.1	25.9	12.0	(Mishima <i>et al.</i> , 2006)

Industrialmente, la producción de enzimas de origen animal y vegetal ha presentado una tendencia menos importante, comparado con las enzimas producidas a partir de microorganismos. En especial las producidas por hongos ya que producen una amplia gama de enzimas extracelulares en las que se encuentran celulasas y hemicelulasas (Shah *et al.*, 2015).

## **2.6. Microorganismos utilizados para producción de enzimas celulolíticas en FES**

Un aspecto importante en la selección de una cepa, es su capacidad para producir el producto deseado. Sin embargo, la selección de una cepa particular es una tarea laboriosa, especialmente cuando se deben lograr rendimientos de enzimas comercialmente competentes (Krishna 2005).



---

---

Los principales grupos de microorganismos utilizados en la FES son hongos y bacterias. Los hongos filamentosos son ideales y los mejor adaptados para la FES ya que, el crecimiento fúngico se lleva a cabo mediante hifas con capacidad de cubrir la superficie del sustrato e incluso, entrar en los poros, de manera que se unen fuertemente al sustrato, dándoles ventajas en cuanto al uso de nutrientes, en comparación con microorganismos unicelulares (Raimbault 1998). Además, los hongos filamentosos presentan tolerancia a baja actividad de agua ( $a_w$ ) y resistencia a medios con alta presión osmótica (Gutierrez *et al.* 1995).

Los hongos filamentosos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y crecen sobre materiales sólidos, como plantas, granos y animales. Éstos producen eficientemente enzimas para degradar los materiales sólidos y utilizar los nutrientes para su sobrevivencia. El fácil crecimiento de los hongos filamentosos en medios sólidos se basa en la alta capacidad de síntesis de enzimas hidrolíticas (Kilikian *et al.*, 2014). Además, las enzimas celulolíticas producidas por algunos hongos generalmente involucran los tres tipos de enzimas que conforman el sistema enzimático (endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas), por lo que son muy útiles en la sacarificación de recursos celulósicos renovables (Xia y Cen 1999).

Las celulasas y xilanasas son en su mayoría producidas por hongos mesófilos y termófilos (Uday *et al.*, 2016, Kar *et al.*, 2013). Dentro de los hongos filamentosos con mayor capacidad de degradación de fibra de origen vegetal, se encuentra el género *Trichoderma* (Ito *et al.*, 2011). Los hongos de este género están ampliamente distribuidos en el suelo y en lugares de descomposición de la madera. Estos hongos crecen rápidamente y se caracterizan por presentar una estructura de conidióforos repetidamente ramificada, crecen en una amplia variedad de sustratos y se ajustan rápidamente a las condiciones ambientales existentes con crecimiento regulado, conidiación y producción de enzimas (Adav y Sze 2014). Sus conidios son principalmente ovoides, verdes y se agrupan en la parte superior de los tallos pequeños del micelio. *Trichoderma* spp. crece en medios con humedad superior al 90%. La temperatura y pH óptimos para su crecimiento fluctúan entre 20-28°C y 4.6-6.8, respectivamente (Singh *et al.*, 2014). En general, las fuentes de carbono

---

---

más utilizadas por *Trichoderma* son glucosa, fructosa, manosa, galactosa, xilosa, trehalosa y celobiosa (Gupta 2016).

El género *Trichoderma* tiene el potencial de sintetizar y liberar enzimas como polisacaridasas, celulasas, xilanasas y quitinasas, las cuales se han utilizado en procesos industriales (Argumedo-Delira *et al.*, 2009, Marx *et al.*, 2013). En particular, *T. reesei* se utiliza generalmente en la industria para la producción de celulasas. Sin embargo, la cantidad de  $\beta$ -glucosidasa secretada por *T. reesei* es insuficiente para una sacarificación eficaz (Jorgensen y Olsson 2006). Por fermentación sumergida la cepa *T. harzianum* P49P11, aislada de la selva amazónica, ha mostrado actividades  $\beta$ -glucosidasa y xilanasa relativamente altas cuando se utiliza bagazo de caña de azúcar y sacarosa tratada previamente (Delabona *et al.*, 2013). *Trichoderma harzianum* es uno de los productores de celulasas más eficientes para la degradación de celulosa, a partir de diversos materiales de desechos agroindustriales y sus derivados (Asgher *et al.*, 2014).

En todo proceso de fermentación, el reactor es fundamental, éste proporciona el ambiente para el crecimiento y la actividad de los microorganismos. Hay varios parámetros (aireación, pH, humedad, agitación, temperatura) relevantes para la selección de un biorreactor adecuado para cada proceso de fermentación en particular (Couto y Sanromán 2006).

## **2.7. Biorreactores para producción de enzimas por FES**

El biorreactor es el corazón en un proceso de fermentación, en el que la materia prima, bajo condiciones adecuadas se convierte en el producto deseado. La maximización de la tasa de formación y rendimiento del producto dentro del biorreactor es una parte clave de la optimización del proceso. En contraste con los sistemas de fermentación en estado líquido (FEL), los biorreactores para FES aún no han alcanzado un alto grado de desarrollo, debido principalmente, a problemas con la transferencia de calor y masa, así como en la deficiencia del mezclador en sólidos (Raghavarao *et al.*, 2003).

---

---

Entre los parámetros más importantes a considerar para el diseño de un biorreactor se encuentran la temperatura, humedad, agitación, aireación que favorezcan la transferencia de calor y masa durante el proceso. Por lo general, se utilizan dos estrategias de operación para el diseño de biorreactores de FES, mediante estas estrategias se pretende mejorar la transferencia de oxígeno, la remoción de calor, la distribución de agua y una mejor mezcla de los sustratos con un daño mínimo al micelio. Las dos estrategias básicas de aireación y agitación son las siguientes:

- a) Aireación forzada y no forzada
- b) Agitación continua, intermitente y sin agitación

Para ambas estrategias se puede utilizar aire seco o aire saturado (Manan y Webb 2017). Mitchell *et al.* (2011) clasificaron cuatro grupos de biorreactores según sus estrategias de aireación y agitación.

Grupo 1. Aireación no forzada sin agitación. Biorreactores en los que el lecho del sustrato no presenta aireación forzada y permanece estático durante todo el periodo de la fermentación, por ejemplo; biorreactor de charolas.

Grupo 2. Aireación forzada sin agitación. Biorreactores en los cuales el lecho del sustrato presenta aireación forzada, el lecho permanece estático durante todo el período de la fermentación, por ejemplo; lecho empacado.

Grupo 3. Aireación no forzada con agitación continua o intermitente. Biorreactores que no presentan aireación forzada, introduciendo el aire por la parte superior del lecho, pero el lecho es agitado, por ejemplo; biorreactores de tambor rotatorio o tanque agitado.

Grupo 4. Aireación forzada con agitación continua o intermitente, por ejemplo; biorreactores de lecho agitado, de tambor basculante o fluidizados gas-sólido.

Proporcionar un entorno adecuado para el crecimiento de los microorganismos es esencial y requiere el diseño del biorreactor. Entre los mayores desafíos en la

---

---

FES se encuentra la remoción del calor metabólico. La razón de esto es que las propiedades térmicas de una fase acuosa continua, es decir, la conductividad térmica del agua líquida, son superiores a las de un lecho sólido húmedo con aire entre partículas (Ashok *et al.*, 2017).

## **2.8. Acumulación de calor en biorreactores para FES**

Los biorreactores de uso común, como los biorreactores de bandeja, de lecho empacado, y de tambor horizontal son ejemplo de reactores que a pesar de sus ventajas presentan problemas en la transferencia de calor y masa, ya que en estos biorreactores el soporte se mantiene estático durante el proceso de fermentación (Kuhad *et al.*, 2016). Bajo esta condición se promueve la formación de una red micelial que se une a las partículas del sustrato, formando aglomerados. Estos aglomerados restringen el transporte de O<sub>2</sub> de la superficie de las partículas hacia el interior de estos (Schutyser *et al.*, 2003b).

El uso de la FES se ha relacionado principalmente con microorganismos mesófilos, por lo que el rango de temperatura habitual empleado es de 25 a 32°C. La alta temperatura afecta el crecimiento, germinación de esporas y la formación de producto (Chen *et al.*, 2005).

Comúnmente, el calor generado durante la fermentación está directamente relacionado con las actividades metabólicas de los microorganismos. En las etapas iniciales de la fermentación, la temperatura es la misma en todas las ubicaciones del lecho. A medida que avanza la fermentación, el calor metabólico se acumula rápidamente debido a la deficiencia en la disipación debido a la mala conductividad térmica del sustrato (Kuhad *et al.*, 2016). Con el progreso de la fermentación, se produce una compactación en el lecho provocando la disminución de los espacios vacíos. En estas circunstancias, el gradiente de temperatura en un reactor de tipo estático puede llegar a ser 3.1°C/cm de altura del lecho sólido, lo que resulta en temperaturas suficientemente altas (48°C) dentro del lecho (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 1995). Además, la FES, es altamente exotérmica debido principalmente a la producción de CO<sub>2</sub> y consumo de O<sub>2</sub>; ya que por cada mol de CO<sub>2</sub> producido durante

---

---

la oxidación de carbohidratos se liberan 673 Kcal (Raimbault 1998) (Mansour *et al.*, 2016). Por esta razón, la temperatura se considera un parámetro crucial que contribuye al éxito del proceso de FES. Por lo anterior, se han realizado avances significativos en el diseño de biorreactores para superar problemas de transferencia de calor ya que se considera el mayor cuello de botella. Algunas de las estrategias propuestas para ayudar a contrarrestar dichos problemas se encuentran la agitación, la rotación y la aireación. Sin embargo, la fuerza de cizallamiento causadas por la agitación y la rotación afectan la porosidad del soporte y dañan los micelios fúngicos (Couto y Sanromán 2006, Chen *et al.*, 2014).

### **2.9. La agitación en biorreactores para FES**

La agitación ayuda a resolver problemas como la heterogeneidad, minimizando o evitando los gradientes de temperatura. Otro beneficio de la agitación es ayudar a que el flujo de aire se distribuya de manera uniforme, mejorando las condiciones para el crecimiento microbiano en el lecho fermentado (Manan y Webb 2017). Sin embargo, la agitación no se usa en muchos procesos de FES aerobios ya que, aunque puede mejorar significativamente los fenómenos de transferencia de calor y masa, no todos los hongos y sustratos sólidos toleran las fuerzas de corte (Fanaei y Vaziri 2009).

Se sabe que la agitación tiene efectos adversos sobre la porosidad del sustrato, debido a la compactación de partículas, la interrupción de la unión de los hongos a los sólidos y el daño al micelio fúngico debido a las fuerzas de corte en los sistemas de FES, dando como resultado una baja productividad. Por lo tanto, las condiciones de agitación deben ser diseñadas cuidadosamente para evitar fallas en el proceso (Arora *et al.*, 2017). En ese sentido, debe elegirse un soporte sólido que conserve su estructura y sea capaz de soportar la fuerza cortante causada por la agitación. De igual manera, el microorganismo debe ser capaz de soportar las fuerzas de corte (Krishna 2005).

---

---

### 3. Antecedentes

Delabona *et al.* (2012) produjeron un complejo de enzimas celulolíticas (actividad sobre papel filtro (FPasa), xilanasas y  $\beta$ -glucosidasa) a partir de *Trichoderma harzianum* cultivado en diferentes condiciones. Evaluaron diferentes fuentes de carbono en matraces agitados, así como diferentes valores de pH (5 - 6) en un biorreactor de tanque agitado (BioFlo115 Fermenter de 3L), con un volumen de operación de 1.5 L a 29°C, con agitación periódica. Se obtuvieron actividades de 1.2 FPasa/mL, 80 U/mL y 17.3 U/mL (FPasa, xilanasas y  $\beta$ -glucosidasa, respectivamente). Utilizaron el complejo enzimático para hidrolizar bagazo de caña pretratado, concluyendo que *T. harzianum* tiene potencial para la producción de estas enzimas.

Alam *et al.* (2009) usaron la biomasa lignocelulósica de la palma aceitera como sustrato para la producción de celulasas por FES (a 30°C) con la cepa *Trichoderma harzianum* T2008. El estudio se realizó en dos sistemas: matraces Erlenmeyer (500 mL) y un biorreactor de tambor rotatorio horizontal (50 L), con una agitación de 10 rpm. La mayor actividad celulasa (8.2 FPasa/gramo sustrato sólido) en matraces se alcanzó a las 96 h de cultivo, mientras que, para el biorreactor, la actividad fue de 10.1 FPasa/gramo de sustrato sólido a las 48 h. La estimación del crecimiento se realizó indirectamente por la cuantificación de glucosamina. Ellos observaron un crecimiento de 1.6 y 2.2 g/L para matraces y el biorreactor, respectivamente. Estos resultados sugieren que la agitación mejora la producción de celulasas, sin afectar el crecimiento fúngico.

Lee *et al.* (2017) desarrollaron FERMSOSTAT, un biorreactor a escala laboratorio para FES, que consiste en un tambor horizontal agitado de 70 L. La singularidad de este sistema es la capacidad para llevar a cabo la esterilización de sustrato *in situ* y la extracción de enzimas al final del proceso. En el trabajo se comparó el sistema FERMOSTAT con otros sistemas, mediante la producción de celulasas y xilanasas con *Aspergillus niger* y una mezcla de sustratos (bagazo de caña y palma de almendra). El cultivo se realizó a 30°C, con 70% de humedad, y

---

---

una agitación intermitente de 0.5 rpm durante 5 min cada 24 h, durante 6 días. Los resultados mostraron que al utilizar FERMSOSTAT, la actividad carboximetil celulasa (CMCasa) y xilanasa se incrementó 11.4 y 16.0%, respectivamente, en comparación con un sistema estático de charolas, obteniendo actividades de 63.4 y 397 U/g de sustrato fermentado para CMCasa y xilanasa, respectivamente.

Deschamps *et al.* (1985) produjeron celulasas con *T. harzianum* a partir de una mezcla de salvado y paja de trigo en FES, mediante sistemas estáticos y agitados en condiciones no asépticas. Utilizaron un mezclador comercial de panificación de 65 L para evaluar el efecto de la agitación. El sustrato fue colocado en el tanque del mezclador y se roció con una solución de sales y esporas. La aireación se administró pasando aire humidificado a través del fondo perforado del tanque. La temperatura fue monitoreada por una sonda instalada en el interior, y para garantizar la remoción de calor, el sistema se agitó ocasionalmente. El pH se controló a través de la adición de una solución amortiguadora durante los ciclos de agitación. Para determinar las condiciones óptimas del cultivo, se utilizaron columnas de vidrio en condiciones estáticas. Los valores máximos de actividad celulasa y endoglucanasa en columnas de vidrio fueron 18 FPasa/gramo de materia seca inicial y 198 U/gramo de materia seca inicial bajo condiciones óptimas de cultivo (30°C, 74% de humedad y pH de 5.8). Para el mezclador comercial las actividades celulasa y endoglucanasa fueron de 11 FPasa/gramo de materia seca inicial y 148 U/gramo de materia seca inicial, respectivamente.

---

---

## 4. Justificación

La fermentación en estado sólido presenta algunas ventajas en comparación con otros tipos de fermentaciones, en particular, la FES utiliza residuos orgánicos que, debido a su composición, pueden ser utilizados como sustratos, de esta manera se induce la producción de enzimas, además, se contribuye a la disminución de la contaminación debido a la acumulación de estos residuos. A pesar de sus ventajas, uno de los principales inconvenientes que presenta la FES es la generación de calor durante el cultivo, aunado a la falta de agua libre y la baja conductividad de las partículas sólidas, se pueden generar gradientes de calor que afectan negativamente el crecimiento del microorganismo.

En ese sentido, los lechos estáticos son generalmente preferidos para la operación de la FES, ya que el microentorno se asemeja al hábitat natural de los hongos filamentosos. Sin embargo, con una alta carga de sustrato, los lechos estáticos son propensos a la acumulación de calor, a la compactación y la heterogeneidad del lecho.

Una manera de resolver este tipo de problemas es mediante el diseño de estrategias de operación (agitación) que permitan mejorar la remoción de calor sin efectos adversos sobre los sustratos, microorganismos o los productos.



---

---

## 5. Hipótesis

El uso de la agitación de flujo cruzado en un biorreactor a escala banco favorecerá la transferencia de calor y masa, ayudando a la remoción de calor metabólico, así como a mejorar la producción de enzimas celulósicas, sin dañar el micelio de *Trichoderma harzianum* PBLA.

## 6. Objetivos

### 6.1. General

Determinar el efecto de la agitación sobre el crecimiento, remoción de calor metabólico y producción de celulasas y xilanasas por *T. harzianum* en un biorreactor de escala banco.

### 6.2. Particulares

- Evaluar el efecto de la temperatura de incubación sobre el crecimiento y producción de enzimas en un soporte orgánico (aserrín de pino) mediante biorreactores estáticos.
- Evaluar la acumulación de calor metabólico en biorreactores estáticos de diferente diámetro con aserrín de pino.
- Determinar las condiciones de cultivo como temperatura, humedad, fuente de nitrógeno sobre el crecimiento y producción de enzimas usando como soporte un sustrato natural (lirio acuático) mediante biorreactores estáticos.
- Determinar la velocidad de agitación que favorezca la producción de enzimas sin dañar el crecimiento del microorganismo mediante un biorreactor agitado con aserrín de pino.
- Evaluar la frecuencia de agitación (continua e intermitente) sobre el crecimiento y producción de enzimas en un biorreactor agitado con lirio acuático.

---

---

## **7. Métodos y materiales**

### **7.1. Microorganismo**

En este trabajo se utilizó la cepa PBLA de *Trichoderma harzianum*, proporcionada por el Dr. Alfredo Martínez Jiménez, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). La cepa fue conservada en chaquiras crioprotectoras (Technical Services Consultant LTD, Inglaterra) a -20°C.

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

Todos los medios de cultivo utilizados en el presente trabajo se prepararon con agua comercial Bonafont®.

#### **7.2.1. Producción de esporas**

La propagación de la cepa y la producción de esporas se llevó a cabo al esparcir una de las chaquiras (sección 7.1) en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio Agar-Papa-Dextrosa (PDA), incubados a 30°C por 7 días.

Después de 7 días de incubación, se obtuvo una suspensión de esporas mediante la cosecha superficial de dos matraces Erlenmeyer previamente preparados, adicionando al primer matraz (matraz 1) 20 mL de Tween-80 al 0.05 % (previamente esterilizado a 121°C, 15 psi, 15 min) y un agitador magnético. Posteriormente, el contenido del matraz 1 se adicionó al siguiente matraz (matraz 2), esto con la finalidad de obtener una suspensión de esporas concentrada. La concentración de esporas en la suspensión se determinó por conteo en cámara de Neubauer.

#### **7.2.2. Producción de micelio**

El crecimiento de micelio se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio YPD con la siguiente composición (g/L): extracto de levadura, 20; polipeptona, 40; dextrosa, 40. El medio de cultivo fue inoculado con la suspensión de esporas antes descrita (sección 7.2.1), con un tamaño de inóculo de  $1 \times 10^6$

---

---

esporas/mL de medio. Los matraces se incubaron a 30°C y 150 rpm durante 24 y 72 h (para fermentaciones de lirio y aserrín respectivamente).

### **7.2.3. Producción de celulasas y xilanasas**

Para la producción de celulasas y xilanasas se utilizó el medio reportado por Mekala *et al.*, 2008 debido a que utilizaron una cepa del mismo género para la producción de celulasas en FES. La composición del medio 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 5.

### **7.3. Soporte**

Con el fin de realizar la comparación entre diferentes tipos de soporte/sustrato sobre la producción de CO<sub>2</sub> y actividad enzimática, se utilizaron aserrín como soporte y lirio acuático como sustrato (llamados así por el tipo de pretratamiento sometidos).

#### **7.3.1. Aserrín**

Se utilizó aserrín de pino comercial “multiusos” adquirido en tiendas departamentales. El aserrín fue tamizado hasta obtener un tamaño de partícula entre 0.42 y 3.3 mm. Posteriormente, se lavó con abundante agua caliente, después con agua destilada fría y, finalmente, se secó a 60°C por 48 h hasta obtener una humedad menor al 10%.

#### **7.3.2. Lirio acuático**

Se utilizó lirio acuático recolectado en el embarcadero de Cuemanco-Xochimilco en la Ciudad de México. El lirio fue fraccionado en hojas, tallos y raíz, eliminando la fracción de raíz. Las hojas y tallos se secaron a 60°C durante 24 h en un secador de charolas hasta obtener una humedad menor al 10%. Posteriormente, se redujo el tamaño de partícula a 1 - 1.5 mm con un molino rotativo Brabender. El lirio

---

---

acuático a diferencia del aserrín fue sometido a un pretratamiento con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.25M como será descrito en la sección 7.4.2.

#### **7.4. Fermentación en estado sólido (FES)**

La producción de enzimas se llevó a cabo en cada uno de los soportes mencionados (aserrín y lirio acuático). Para ambos casos se utilizó micelio como inóculo (sección 7.2.2).

##### **7.4.1. Fermentación con aserrín**

Para la FES se utilizó el medio líquido mencionado en la sección 7.2.3. La mitad del medio líquido se mezcló con el aserrín y la otra mitad se colocó en un matraz Erlenmeyer. Posteriormente todo fue esterilizado a  $120^\circ\text{C}$  durante 15 min. En seguida, el medio de cultivo colocado en el matraz se mezcló con el inóculo de micelio (sección 7.2.2) en una proporción de 10 mL de inóculo por 90 mL de medio líquido. El aserrín esterilizado y humedecido con el medio líquido se mezcló con el medio inoculado contenido en el matraz. Así la humedad inicial de la FES sería alrededor del 65%. Después de mezclar manualmente, el sólido húmedo inoculado se transfirió a los biorreactores (BTE y BHA) para los estudios de producción de enzimas.

---

---

Las condiciones de operación de los ensayos realizados con aserrín se presentan en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Condiciones de operación de ensayos realizados con aserrín de pino

Ensayo	Condiciones de operación
Efecto de la temperatura de incubación <sup>1</sup>	Biorreactores tubulares estáticos, incubados en baños con agua a 26, 28, 30, 32, 34, 36 y 38°C, por 48 h.
Efecto del diámetro de biorreactor <sup>2</sup>	Biorreactores tubulares estáticos, con diferente diámetro 1.2, 2.3, 2.7, 3.6 y 4.2 cm de diámetro interno, incubados a 30°C, por 48 h (sin baño con agua).
Efecto de la agitación <sup>3</sup>	Biorreactor horizontal agitado, incubado a 30°C, a diferentes tasas de agitación, 0, 0.5, 1 y 3 rpm, por 48 h

<sup>1</sup> el número de muestras tratadas para cada una de las temperaturas estudiadas fueron las siguientes:

2 muestras para 26 y 28°C, 6 muestras para 30°C y 4 muestras para 32, 34, 36 y 38°C.

<sup>2</sup> muestras realizadas por duplicado.

<sup>3</sup> sin réplicas.

Todos los ensayos fueron realizados con una aireación de 1 VKgm (ml aire/min · gramo de materia húmeda).

#### 7.4.2. Fermentación con lirio acuático

La FES con lirio acuático se llevó a cabo de manera similar a lo descrito en la sección 7.4.1, sin embargo, la mitad del medio líquido correspondiente para impregnar el lirio fue sustituido por una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.25 M y la otra mitad del medio fue preparado con la misma composición (sección 7.2.3) a diferencia que la concentración fue del doble. Posteriormente todo fue esterilizado a 120°C durante 15 min. En seguida, el medio de cultivo colocado en el matraz se mezcló con el inóculo de micelio (sección 7.2.2) en una proporción de 10 mL de inóculo por 90 mL de medio líquido. El lirio esterilizado y humedecido con la solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.25M se mezcló con el medio inoculado contenido en el matraz. Así la humedad inicial de la FES sería alrededor del 65%. Después de mezclar manualmente, el sólido húmedo inoculado se transfirió a los biorreactores (BTE y BHA) para los estudios de producción de enzimas.

Las condiciones de operación de los ensayos realizados con lirio fueron las siguientes:

**Tabla 3.** Condiciones de operación de ensayos realizados con lirio acuático

<b>Ensayo</b>	<b>Condiciones de operación</b>
Efecto de la temperatura de incubación <sup>1</sup>	Biorreactores tubulares estáticos, incubados en baños con agua a 28, 30, 32, 34 y 36°C, durante 72 h.
Efecto del porcentaje de humedad <sup>1</sup>	Biorreactores tubulares estáticos, incubados a 30°C (sin baño con agua), a diferentes porcentajes de humedad (65, 70, 75 y 80 %), durante 72 h.
Efecto de la fuente de nitrógeno <sup>1</sup>	Biorreactores tubulares estáticos, incubados en a 30°C (sin baño con agua), bajo 2 fuentes de nitrógeno (NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> y (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ), durante 72 h.
Efecto de la frecuencia de agitación <sup>2</sup>	Biorreactor horizontal agitado a 1 rpm, durante 72 h bajo 2 frecuencias de agitación (continua e intermitente)

<sup>1</sup> muestras realizadas por duplicado

<sup>2</sup> sin duplicado

Todos los ensayos fueron realizados con una aireación de 1 VKgm (ml aire/min · gramo de materia húmeda).

## 7.5. Biorreactores

Se utilizaron dos tipos de biorreactores: tubulares estáticos (BTE) y horizontales agitados (BHA).

### 7.5.1. Biorreactores tubulares estáticos (BTE)

Los BTE son columnas de vidrio de 21 cm de largo y 2.3 cm de diámetro interno, cuentan con entrada y salida de aire y se incuban en un baño con agua (Fig. 1) o en un cuarto con temperatura controlada.

Para el llenado de los BTE, se registró el peso de cada BTE vacío; después, el soporte o sustrato (aserrín o lirio) impregnado con el medio inoculado fue introducido con una espátula y se empacó en el BTE, dando unos pequeños golpes para tener disperso el soporte en todo el BTE, evitando la compactación. Al final se registró el peso de cada BTE empacado.



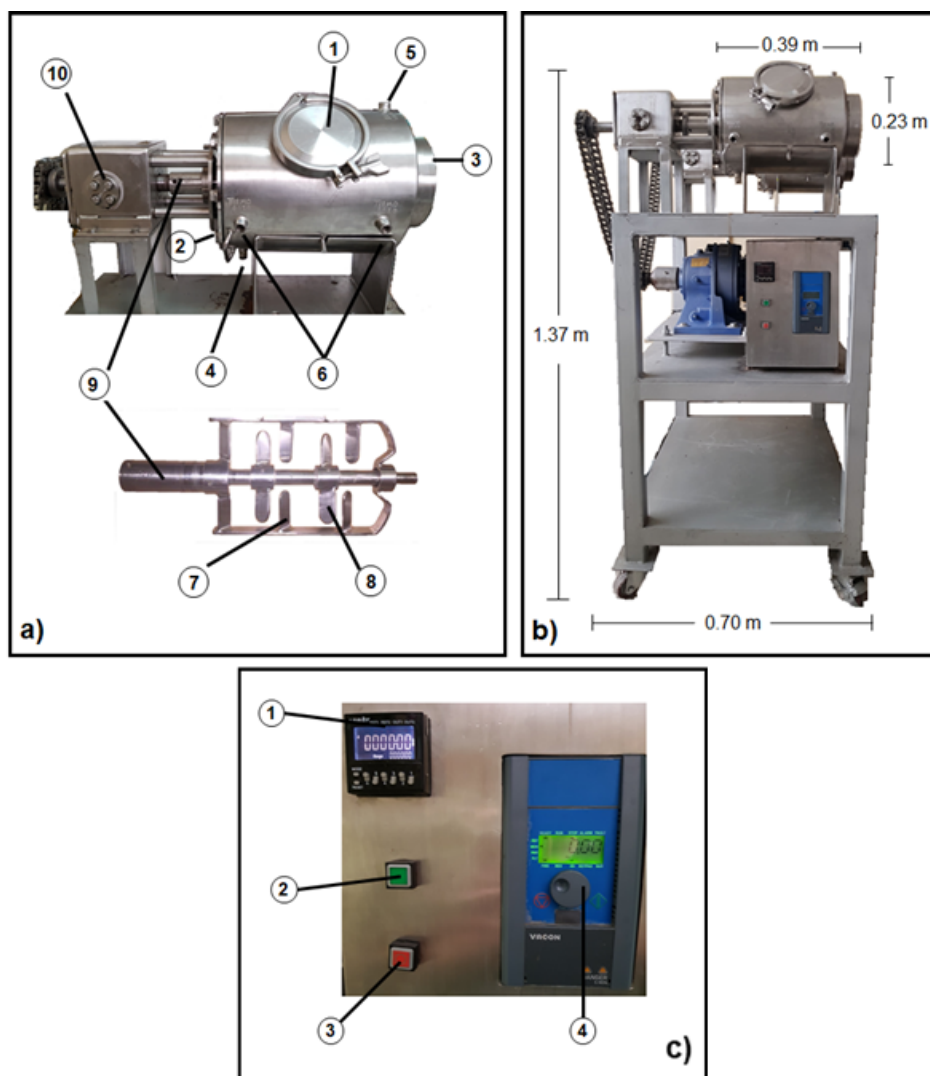
**Figura 1.** Biorreactores tubulares estáticos empacados con aserrín, inoculados con *T. harzianum* PBLA, incubados en un baño con agua a 30°C.

### 7.5.2. Biorreactor horizontal de tanque agitado (BHA)

El BHA es un módulo constituido por dos biorreactores de acero inoxidable de 6 L cada uno, de 39 cm de largo y 23 cm de diámetro interno. Cada biorreactor está equipado con un sistema de agitación mecánica, chaqueta de calentamiento, entrada y salida de aire, cuatro termopares tipo J (dos colocados en la pared del biorreactor, uno en la entrada de aire y uno en la salida de aire) además de un puerto de carga, descarga y toma de muestra. Dispone de un motorreductor de velocidad de tipo cicloidal que permite velocidades de hasta 3 rpm (Fig. 2). El sistema de agitación de doble efecto conocido como *cross flow* (flujo cruzado) está constituido por paletas internas y periféricas que giran en sentido y en contrasentido de las manecillas de reloj, respectivamente.

Para el BHA, se registró el peso de la bolsa con el medio ya homogeneizado (peso inicial), posteriormente se empacó el biorreactor vertiendo el soporte con ayuda de una espátula hasta obtener un llenado del 50 % de su capacidad,

finalmente se registró el peso de la bolsa con el soporte que quedó después de empacar (peso final). El peso final de la bolsa fue restado del peso inicial con la finalidad de conocer el peso de materia húmeda con el cual fue empacado el BHA.



**Figura 2.** Diagrama esquemático del biorreactor agitado para FES. (a) 1) puerta de llenado y muestreo, 2) entrada de aire, 3) salida de aire, 4) entrada de la chaqueta de agua, 5) salida de la chaqueta de agua, 6) termopozos, 7) paletas externas (ejercen movimiento en el sentido de las agujas del reloj), 8) paletas centrales (ejerce movimiento en sentido anti-horario), 9) eje (flecha) del sistema de agitación, 10) sistema de transmisión. (b) Dimensiones del biorreactor (en m): longitud 0,39, diámetro externo 0,23, diámetro interno 0,17. (c) Panel para la programación de agitación: 1) programación del tiempo de agitación y reposo, 2) botón de inicio, 3) botón para detener la agitación, 4) programación de la velocidad de agitación (rpm).



---

---

## 7.6. Análisis de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> y estimación de parámetros cinéticos

El crecimiento microbiano fue determinado indirectamente por respirometría, a través de la producción de CO<sub>2</sub> y el consumo de O<sub>2</sub> durante el cultivo, los cuales fueron monitoreados mediante un sistema en línea. El sistema cuantifica el CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> en la corriente gaseosa a la salida de los biorreactores. La corriente pasa a través de un medidor de flujo a los detectores de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> y los datos son almacenados en un Datalogger M6 (Torres-Mancera *et al.*, 2018).

Las mediciones de flujo, CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> en el respirómetro se realizaron cada 5 min, obteniéndose entre 70 y 120 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-Castañeda *et al.* (1994). Para ello, los valores de producción de CO<sub>2</sub>, expresados como miligramo de CO<sub>2</sub> por gramo de materia seca inicial (mg CO<sub>2</sub>/g msi), se ajustaron con el modelo exponencial (Ec. 1). Para este ajuste se seleccionó el intervalo del tiempo inicial hasta el tiempo de 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>.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{CO_2} X \quad \text{Ec. 1}$$

El tiempo *Lag* ( $t_{Lag}$ ) 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  $t_{Lag}$  y el tiempo de tasa máxima de producción de CO<sub>2</sub> (Pirt, 1975).

## 7.7. Métodos analíticos

Para los análisis de pH, azúcares reductores y actividad enzimática, se tomó 1 g de materia húmeda fermentada (gmhf) y se adicionaron 10 mL de agua destilada. Se agitó en vórtex por 1 min y se tomaron 4 mL del sobrenadante (extracto) que fueron distribuidos en 2 viales de 2 mL (Eppendorf) para congelarse inmediatamente hasta su análisis.

---

---

### **7.7.1. pH**

El pH fue determinado con un potenciómetro (BANTE instrument), directamente en los extractos obtenidos a partir de la materia húmeda fermentada (gmhf).

### **7.7.2. Humedad**

La humedad de la materia húmeda previamente homogeneizada se midió en una termobalanza (Ohaus MB 45) a 105°C.

### **7.7.3. Azúcares reductores**

Para conocer la cantidad de azúcar inicial (dextrosa) y el consumo durante la FES, se cuantificó la concentración de azúcares reductores mediante el método de DNS (Miller, 1960), la cual fue medida en cada extracto obtenido durante el muestreo del cultivo. Se colocaron 0.1 mL de extracto, 0.9 mL de agua destilada y 1.5 mL de reactivo DNS. Las muestras se incubaron durante 10 min en un baño con agua en ebullición, se dejaron enfriar y se determinó la absorbancia a 640 nm por espectrofotometría (SHIMADZU UV Spectrophotometer UV-1800). Como estándar se utilizó glucosa y xilosa en una concentración de 1 g/L.

### **7.7.4. Actividad enzimática**

Las actividades enzimáticas celulasa y xilanasa fueron determinadas en los extractos. Se utilizaron carboximetilcelulosa y xilano de abedul al 1% (p/v) como sustratos, los cuales fueron disueltos en amortiguador de citratos 0.1 M a pH 5.2. La actividad fue determinada mediante la liberación de azúcares reductores, usando como estándar glucosa y xilosa con una concentración de 1 g/L.

#### **7.7.4.1. Actividad celulasa**

Por cada muestra a analizar, se colocó un tubo de vidrio en un baño con agua a 40°C con 0.9 mL de solución de carboximetilcelulosa. Posteriormente, cada 15 s se adicionaron 0.1 mL de extracto de cada muestra. La mezcla se incubó 30 min y la reacción se detuvo adicionando 1.5 mL de reactivo DNS.

---

---

#### **7.7.4.2. Actividad xilanasa**

Por cada muestra a analizar, se colocó un tubo de vidrio en un baño con agua a 40 °C con 0.9 mL de solución de xilano de abedul. Cada 15 s se adicionaron 0.1 mL de extracto de cada muestra. La mezcla se incubó 15 min y la reacción se detuvo adicionando 1.5 mL de reactivo DNS.

Para determinar la concentración de azúcares reductores liberados por la actividad enzimática se cuantificaron los azúcares reductores presentes en los extractos y en los sustratos. Para esto, se prepararon tubos control con 0.9 mL de agua destilada, 1.5 mL de reactivo DNS y 0.1 mL de extracto enzimático. Para determinar la concentración de azúcares reductores en los sustratos (CMC y xilano de abedul) se prepararon tres tubos de cada sustrato con 0.9 mL de sustrato, 1.5 mL de reactivo DNS y 0.1 mL de agua. Como referencia se prepararon tres tubos de cada solución estándar (glucosa y xilosa) con 1.0 mL de solución estándar y 1.5 mL de reactivo DNS. Una vez concluido el tiempo de incubación, los tubos se dejaron enfriar y se determinó la absorbancia a 640 nm por espectrofotometría.

#### **7.8. Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron mediante el ANOVA de un factor y la comparación de medias se realizó con las pruebas de Tukey-Kramer y Duncan ( $\alpha = 0.05$ ). Los análisis se realizaron utilizando IBM-SPSS 18. Los gráficos se realizaron con la herramienta de Microsoft Office Excel.

---

---

## 8. Resultados

Una de las principales desventajas que presenta la FES es el aumento de temperatura dentro de los biorreactores que es perjudicial para el crecimiento de microorganismos termosensibles. *Trichoderma harzianum* crece en un intervalo entre 25 y 30°C, sin embargo, los hongos de este género inhiben su crecimiento a temperaturas superiores a 30°C.

Uno de los factores que influye en la remoción de calor metabólico, es la naturaleza y composición del soporte-sustrato utilizado. En la primera parte de este trabajo se evaluó el uso de aserrín de pino como soporte inerte para el crecimiento de *T. harzianum*. El uso de este material permitió mantener características constantes del soporte. En la segunda parte se evaluó el lirio acuático como soporte-sustrato para la FES. A diferencia del aserrín de pino, el lirio acuático modifica su composición durante el cultivo microbiano.

Para ambos tipos de soporte se evaluaron los efectos de: a) la temperatura de incubación en biorreactores estáticos tubulares (BET) de escala laboratorio y b) el efecto de la agitación en biorreactores agitados (BHA) de escala laboratorio sobre el crecimiento del hongo, la producción de enzimas y la acumulación de calor metabólico (incremento de temperatura en el lecho de crecimiento).

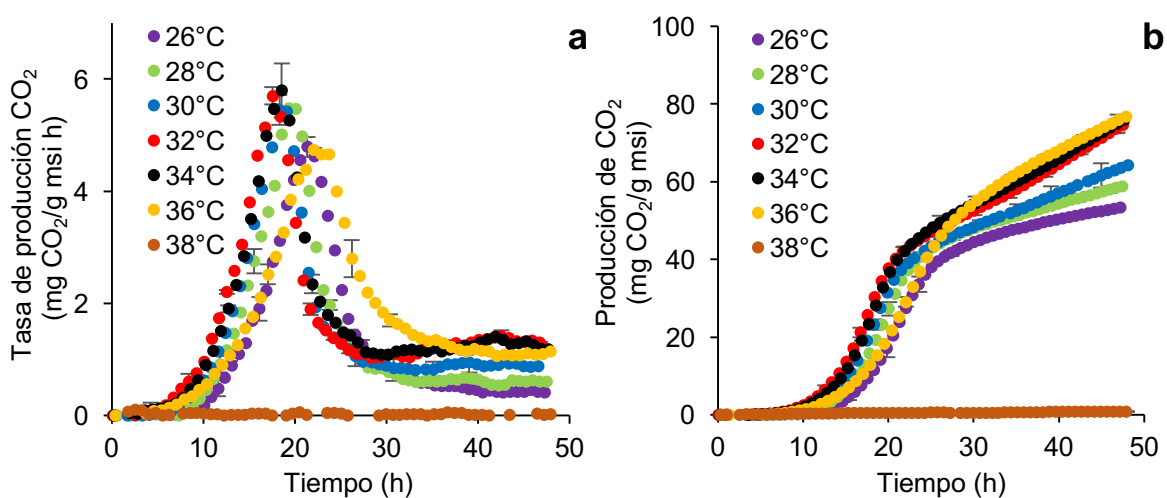
### 8.1. Crecimiento y producción de xilanasas y celulasas por *T. harzianum* con aserrín de pino como soporte.

En esta sección se presentan los resultados de crecimiento y producción de xilanasas y celulasas por *T. harzianum* en FES con aserrín como soporte.

### 8.1.1. Efecto de la temperatura de incubación sobre el crecimiento y la producción de enzimas en BTE.

En este estudio, se utilizaron BTE de 2.3 cm de diámetro interno y 16 cm de largo. Se evaluaron 7 diferentes temperaturas (26 a 38°C). Como variables de respuesta se midieron la producción de CO<sub>2</sub> y el consumo de O<sub>2</sub> en función del tiempo de incubación y la actividad celulasa y xilanasa al final de cultivo. Además se obtuvieron los parámetros cinéticos y rendimientos asociados a la producción de CO<sub>2</sub>.

Con temperaturas de incubación entre 28 hasta 34°C la tasa máxima de producción de CO<sub>2</sub> se obtuvo entre las 17 y 19 h de cultivo y para temperaturas de 26 y 36°C, la tasa máxima se obtuvo a las 21 h de cultivo. Los valores de la tasa máxima que se obtuvieron a 26 y 36°C, disminuyeron un 18 % con respecto a los valores obtenidos con temperaturas de 28 a 34°C. Cuando el cultivo se incubó a 38°C no hubo producción de CO<sub>2</sub> (Fig. 3a).



**Figura 3.** a) Tasa de producción de CO<sub>2</sub>. b) Producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo de incubación en FES por *T. harzianum* PBLA a diferentes temperaturas de incubación, en BTE.

---

---

La producción de CO<sub>2</sub> aumentó linealmente al incrementar la temperatura de incubación de 26 hasta 32 °C, obteniendo la máxima producción de CO<sub>2</sub> al incubar entre 32 y 36°C (Fig. 3b). Reetha *et al.* (2014) evaluaron el crecimiento de *T. harzianum* en cajas Petri con medio PDA, incubadas a diferentes temperaturas (entre 20 y 40°C) durante 8 días, determinando la tasa de crecimiento a partir del crecimiento radial, observando que *T. harzianum* creció más rápido a 25 y 30°C, lentamente a 35°C y a 40°C no hubo crecimiento. Resultados similares fueron encontrados por Zhang y Yang (2015), quienes evaluaron la esporulación de *T. harzianum* en un FES con salvado de trigo y paja de maíz bajo diferentes temperaturas de incubación (entre 20 y 37°C) durante 6 días. Estos autores observaron que la esporulación se correlacionó con la temperatura; obteniendo el máximo número de esporas a 30°C. Temperaturas inferiores a 28 o superiores a 32°C no favorecen la germinación de esporas, mientras que, a 35°C, el crecimiento se redujo un 75 % y a 37°C no hubo crecimiento. Los resultados encontrados demuestran que la cepa utilizada en este estudio posee un intervalo de crecimiento entre 30 y 36 °C.

Los parámetros cinéticos obtenidos a partir del análisis respirométrico se presentan en la Tabla 4. Se observó que el  $t_{lag}$  fue entre 7 y 11 h y que la tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> no mostró diferencias significativas en un intervalo de temperatura de 26 a 34°C; sin embargo, a 36°C la tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> se redujo en un 30 %.

**Tabla 4.** Parámetros asociados a la producción de CO<sub>2</sub>; tasa máxima de producción de CO<sub>2</sub> (T<sub>máx</sub>PCO<sub>2</sub>), producción máxima de CO<sub>2</sub> (P<sub>máx</sub>CO<sub>2</sub>), tiempo *Lag* (t<sub>Lag</sub>) y tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> (μ<sub>CO2</sub>), evaluados en BTE en FES con *T. harzianum* PBLA con aserrín de pino, bajo diferentes temperaturas de incubación.

Temperatura (°C)	T <sub>máx</sub> PCO <sub>2</sub> (mg CO <sub>2</sub> /g msi h)	P <sub>máx</sub> CO <sub>2</sub> (mg CO <sub>2</sub> /g msi)	t <sub>Lag</sub> (h)	μ <sub>CO2</sub> (h <sup>-1</sup> )
26*	4.83 ± 0.12 <sup>a</sup>	53.59 ± 0.18 <sup>a</sup>	11.12 ± 0.41 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.00 <sup>a</sup>
28*	5.49 ± 0.02 <sup>ab</sup>	58.88 ± 0.81 <sup>b</sup>	10.18 ± 0.47 <sup>ab</sup>	0.30 ± 0.02 <sup>a</sup>
30 <sup>■</sup>	5.87 ± 0.63 <sup>ab</sup>	68.85 ± 2.05 <sup>c</sup>	9.02 ± 0.78 <sup>abc</sup>	0.30 ± 0.02 <sup>a</sup>
32 <sup>Δ</sup>	6.14 ± 0.52 <sup>b</sup>	74.60 ± 1.44 <sup>d</sup>	7.34 ± 1.29 <sup>c</sup>	0.30 ± 0.03 <sup>a</sup>
34 <sup>Δ</sup>	6.10 ± 0.46 <sup>b</sup>	77.10 ± 1.53 <sup>d</sup>	7.95 ± 0.28 <sup>bc</sup>	0.29 ± 0.01 <sup>a</sup>
36 <sup>Δ</sup>	4.81 ± 0.08 <sup>a</sup>	75.51 ± 4.13 <sup>d</sup>	8.25 ± 0.15 <sup>bc</sup>	0.22 ± 0.01 <sup>b</sup>

Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias para cada temperatura. El número de muestras tratadas para cada una de las temperaturas estudiadas fueron las siguientes: (\*); 2 muestras, (■); 6 muestras y (Δ); 4 muestras.

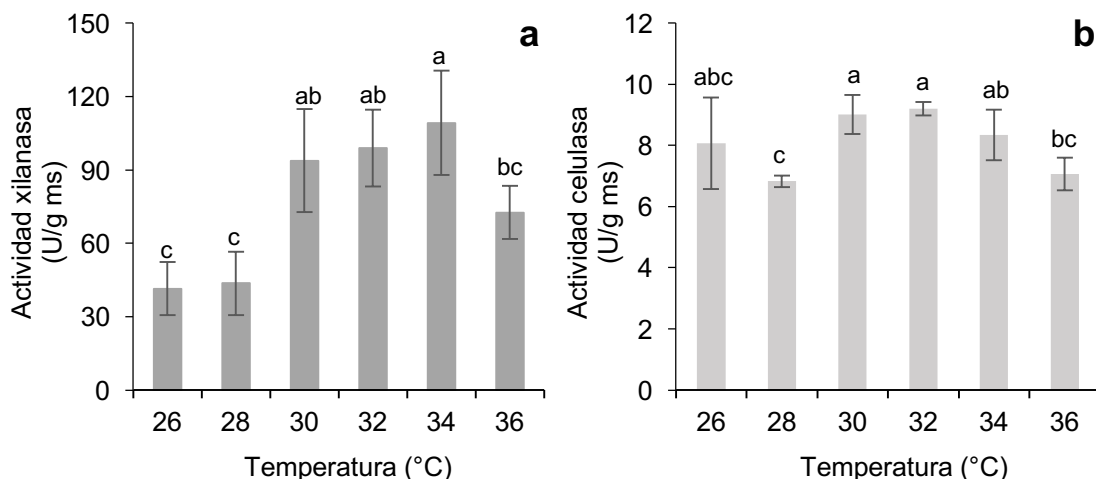
Rodríguez-León *et al.* (1999) reportaron una tasa específica de crecimiento de 0.11 h<sup>-1</sup> para *T. harzianum* en FES con bagazo de caña a 30°C con una duración de 41 h, obteniendo un t<sub>lag</sub> de 15 h y una tasa máxima de crecimiento a las 23 h. Por otro lado, Toscano *et al.* (2013) realizaron un FEL con *T. harzianum* a 29°C durante 144 h para la producción de lipasas, estimando el crecimiento mediante la cuantificación de biomasa por peso seco, obteniendo un tiempo *Lag* (t<sub>Lag</sub>) de 24 h, seguida por un crecimiento exponencial entre las 24 y 72 h, durante el cual se registró una tasa específica de crecimiento de 0.04 h<sup>-1</sup>. En el presente trabajo, la FES de *T. harzianum* PBLA con aserrín de pino bajo condiciones similares de temperatura (30°C) con respecto al trabajo de Rodríguez-León *et al.* (1999), presentó una tasa específica de crecimiento 2.7 veces más rápida que la obtenida con bagazo de caña (Rodríguez-León *et al.*, 1999) y 7.5 veces más rápida que en un medio líquido (Toscano *et al.*, 2013). Estas diferencias pueden ser debidas a la transferencia de O<sub>2</sub>, pues en un medio líquido el microorganismo crece en forma de pellets, aumentando la viscosidad del medio y afectando negativamente la transferencia de O<sub>2</sub>, dando como consecuencia una disminución en el crecimiento (Gabelle *et al.*, 2012). Algo similar pudo ocurrir en el trabajo de Rodríguez-León *et al.* (1999), ya que no se menciona el tamaño de partícula que utilizaron; si el

---

---

estudio se realizó con partículas pequeñas, éstas tienden a compactarse disminuyendo la porosidad del sistema de cultivo y dificultando la transferencia de O<sub>2</sub>. Si el tamaño de partícula fue grande puede mejorar la transferencia de O<sub>2</sub>, sin embargo, se proporciona una superficie limitada para las reacciones metabólicas del microorganismo (Krishna, 2005).

La temperatura de incubación no tuvo un efecto significativo sobre la producción de celulasas, obteniendo valores máximos de actividad de alrededor de 8 U/g ms. Sin embargo, para la actividad xilanasa en un rango de 30 a 34°C se obtuvo la mayor actividad (alrededor de 100 U/g ms). Temperaturas mayores a 36°C, provocaron la disminución de la actividad xilanasa hasta en un 28% (Figura 4). Mohamed *et al.* (2013) evaluaron el efecto de la temperatura de incubación (20-45°C) sobre la producción de xilanasas por *T. harzianum* en FES, obteniendo la máxima actividad (74 U/g de sólido) a 28°C.



**Figura 4.** a) Actividad xilanasa y b) actividad celulasa obtenidas a las 48 h de la FES por *T. harzianum* PBLA a diferentes temperaturas de incubación.

Haq *et al.* (2006), evaluaron un intervalo de temperatura más amplio (22 - 38°C) en FES para la producción de celulasas por *T. harzianum* y encontraron una máxima actividad de 11 U/g msi a 28°C. En ambos trabajos (reportados en la literatura) se



---

---

encontró que la actividad enzimática disminuye al aumentar la temperatura de incubación. Por arriba de los 35 y 36°C se presenta una disminución del 60 y 80 % para actividad xilanasa y celulasa respectivamente, con respecto a la máxima actividad registrada. Sun *et al.*, (2010) evaluaron la producción de celulasas con *Trichoderma* sp en FES con pulpa de manzana a diferentes temperaturas (25, 28, 30, 32, 35 y 40°C), obteniendo la máxima actividad (3.9 U/g ms) a 32 °C; a 25 y 40°C, la actividad fue 54 y 74% menor. Rubeena *et al.* (2013) produjeron celulasas en medio líquido con *T. harzianum*, evaluando el efecto de la de temperatura (entre 25 y 37°C), observando una máxima actividad celulasa (146 U/mL) a 28°C; a medida que la temperatura aumentó, la actividad celulasa disminuyó progresivamente a 117.8 U/mL a 31°C; 88.8 U/mL a 33°C y 13.8 U/mL a 35°C. Los estudios mencionados y este trabajo muestran que la actividad xilanasa y celulasa se incrementan con la temperatura hasta alcanzar un máximo, posteriormente, la actividad disminuye independientemente del tipo de cultivo (sólido o líquido). Esto puede deberse al hecho de que una temperatura alta reduce o inhibe la actividad metabólica del microorganismo.

Con base en los resultados obtenidos se demostró que *T. harzianum* PBLA alcanza su máxima tasa de producción de CO<sub>2</sub> y de actividad celulasa y xilanasa en un intervalo de temperatura de 26 a 36°C. Por lo tanto, si se quiere trabajar con esta cepa en sistemas no isotérmicos o en sistemas donde la remoción de calor sea deficiente, deben considerarse mecanismos de enfriamiento que eviten la formación de gradientes de temperatura dentro del BTE, para evitar problemas con el crecimiento y producción de enzimas.

### **8.1.2. Efecto del diámetro del biorreactor (BTE) sobre la acumulación de calor metabólico, el crecimiento y la producción de enzimas**

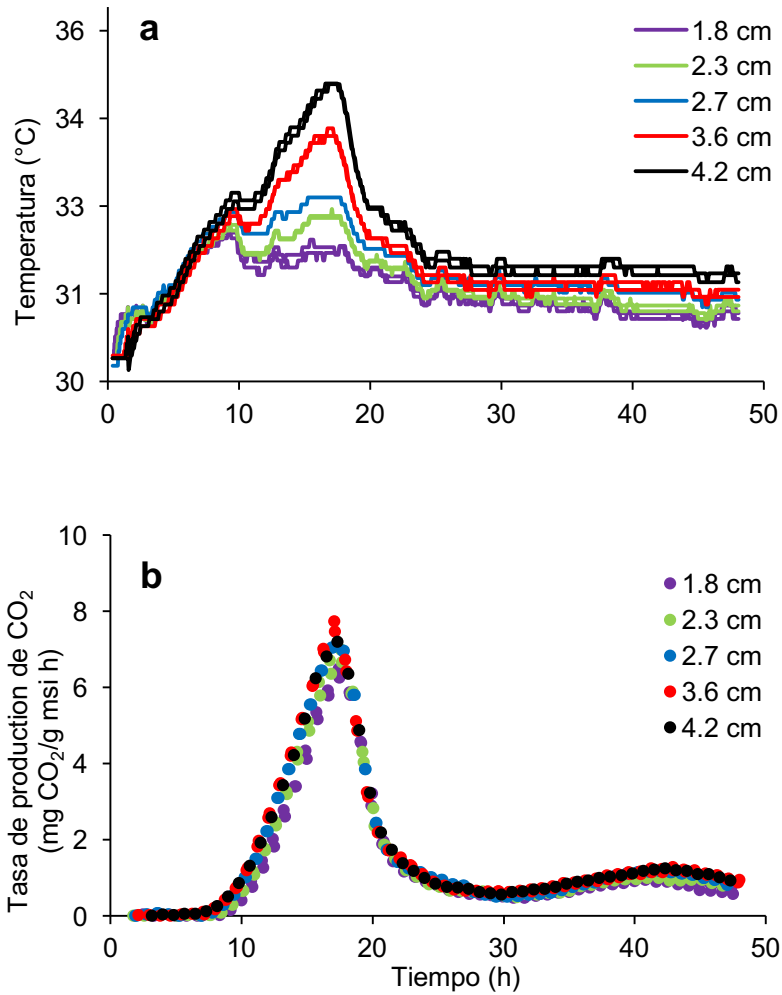
Una vez determinado el efecto de la temperatura de incubación en sistemas isotérmicos, se evaluó el efecto de la acumulación de calor en sistemas no isotérmicos; para ello, se usaron BTE de 1.8 a 4.2 cm de diámetro, incubados a 30°C (sin baño con agua, Tabla 2), ya que es típico de un sistema de FES observar

---

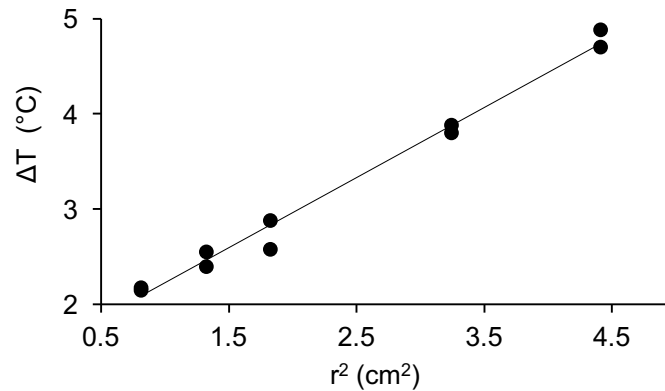
---

variaciones en la temperatura del lecho debido a la acumulación de calor metabólico (un indicativo directo del crecimiento del microorganismo).

El incremento de temperatura por acumulación de calor metabólico fue mayor en los BTE de mayor diámetro (Fig. 5a), alcanzando la máxima temperatura (34.7°C) en el BTE de 4.2 cm. En todos los casos, la máxima temperatura se obtuvo aproximadamente a las 17 h de cultivo, tiempo en el que se registró la máxima tasa de producción de CO<sub>2</sub> (Fig. 5b). El gradiente radial de temperatura en los BTE fue proporcional al diámetro (Fig. 6). Aunque la máxima temperatura obtenida fue en los BTE de mayor diámetro (34.68°C), el valor de la tasa máxima de producción de CO<sub>2</sub> (6.36 a 7.47 mgCO<sub>2</sub>/g msi h) resultó independiente del diámetro de los BTE evaluados. En general, el aumento de la temperatura en los BTE no tuvo efectos significativos en las variables asociadas a la producción de CO<sub>2</sub> (Tabla 5).



**Figura 5.** a) Perfil de temperatura; b) Tasa de producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo en FES por *T. harzianum* PBLA en BTE con diámetros internos diferentes.



**Figura 6.** Gradiante radial de temperatura en función del diámetro de BTE ( $r^2=0.98$ )

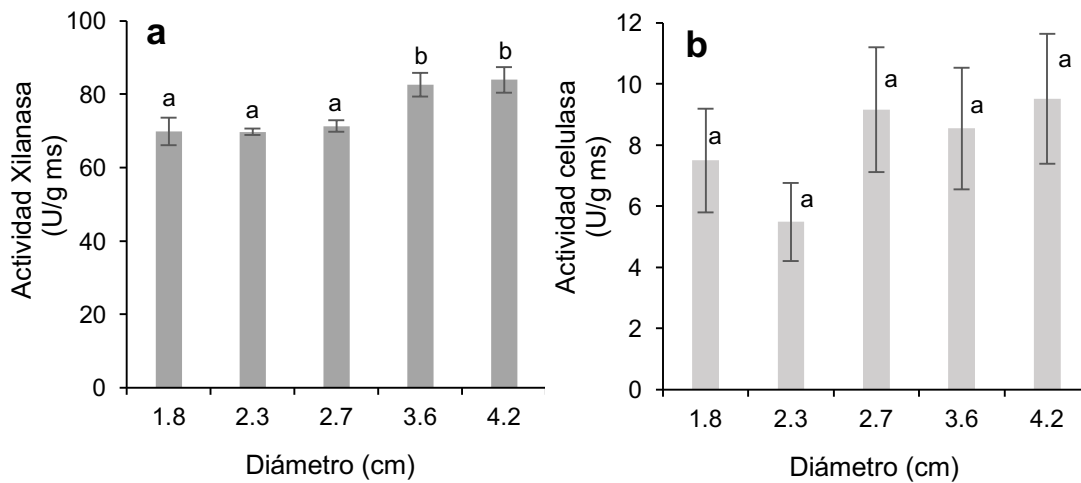
La acumulación de calor en este tipo de biorreactores (BTE) se debe a una limitación en la transferencia conductiva de calor por la baja conductividad térmica de los materiales agroindustriales utilizados en procesos de FES (Raghavarao *et al.*, 2003). Oostra *et al.*, (2000) reportan que incrementos en el diámetro del biorreactor de 0.2 a 1 m provocan incrementos en la temperatura de 6 a 11°C, respectivamente.

**Tabla 5.** Parámetros asociados a la producción de CO<sub>2</sub>; tasa máxima de producción de CO<sub>2</sub> (T<sub>máx</sub>PCO<sub>2</sub>), producción máxima de CO<sub>2</sub> (P<sub>máx</sub>CO<sub>2</sub>), tiempo *Lag* (t<sub>Lag</sub>) y tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> (μ<sub>CO2</sub>), evaluados en BTE en FES con *T. harzianum* PBLA con aserrín de pino, bajo diferentes tamaños de diámetro.

Diámetro (cm)	T <sub>máx</sub> PCO <sub>2</sub> (mg CO <sub>2</sub> /g msi h)	P <sub>máx</sub> CO <sub>2</sub> (mg CO <sub>2</sub> /g msi)	t <sub>Lag</sub> (h)	μ <sub>CO2</sub> (h <sup>-1</sup> )
1.8	6.37 ± 0.17 <sup>a</sup>	60.51 ± 1.58 <sup>a</sup>	10.17 ± 0.68 <sup>a</sup>	0.37 ± 0.01 <sup>a</sup>
2.3	6.83 ± 0.24 <sup>ab</sup>	65.48 ± 1.68 <sup>ab</sup>	9.74 ± 0.23 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.00 <sup>ab</sup>
2.7	6.97 ± 0.11 <sup>ab</sup>	71.15 ± 0.31 <sup>ab</sup>	9.04 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.01 <sup>ab</sup>
3.6	7.60 ± 0.18 <sup>b</sup>	74.27 ± 0.93 <sup>b</sup>	9.13 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.00 <sup>ab</sup>
4.2	7.46 ± 0.36 <sup>b</sup>	69.43 ± 5.56 <sup>ab</sup>	11.75 ± 4.23 <sup>a</sup>	0.33 ± 0.01 <sup>b</sup>

Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias para cada tamaño de diámetro.

La producción de xilanasas incrementó 15% en los BTE de mayor diámetro (3.6 y 4.2 cm) (Fig. 7a) y la producción de celulasas fue independiente del diámetro de BTE (Fig. 7b). Estos resultados coinciden con los obtenidos en los estudios en condiciones isotérmicas (sección 8.1.1), demostrando que el efecto de la temperatura de incubación (reactores isotérmicos) y endógena (reactores no isotérmicos) tiene el mismo efecto en el crecimiento y en la producción de enzimas por *T. harzianum* en el intervalo de temperaturas evaluado (de 28 a 34°C).



**Figura 7.** a) Actividad xilanasa y b) Actividad celulasa obtenidas a las 48 h en FES por *T. harzianum* PBLA, en biorreactores con diámetros internos diferentes.

En general los trabajos reportados en la literatura con sistemas similares al BTE, evalúan variaciones en la aireación como una alternativa para minimizar los gradientes de temperatura dentro del lecho. Por ejemplo, Ghildyal *et al.* (1994) evaluaron diferentes tasas de aireación (5, 10, 15, 20 y 25 litros por minuto (LPM)) sobre el crecimiento de *Aspergillus niger* para la producción de amiloglucosidasas en FES, usando un biorreactor de lecho empacado de 15 cm de diámetro y 34.5 cm de largo; la temperatura fue medida axialmente sobre el lecho (7, 17 y 28 cm) y sus resultados mostraron que: 1) la temperatura aumentó al incrementar la altura del lecho, y 2) la temperatura disminuyó con el aumento de la tasa de aireación, es decir, considerando la altura de 17 cm al utilizar una tasa de aireación de 5 LPM hubo un incremento de 22°C y para una tasa de aireación de 25 LPM el incremento sólo fue de 5°C. Además, la máxima actividad enzimática se obtuvo con una tasa de 25 LPM por el contrario, para una tasa de 5 LPM se registró una disminución del 70%. Chen *et al.* (2005) evaluaron cambios en la aireación mediante pulsaciones (0, 0.5, 1, 1.5 y 2 MPa) sobre la acumulación de calor en un biorreactor de charolas con *Penicillium decumbens* a diferentes alturas del lecho (0, 3, 6 y 9 cm); este grupo observó que la temperatura aumentó con la altura del lecho (5°C para 0 cm y 7°C para 9 cm), y que la remoción de calor mejoró a medida que aumentó la pulsación

---

---

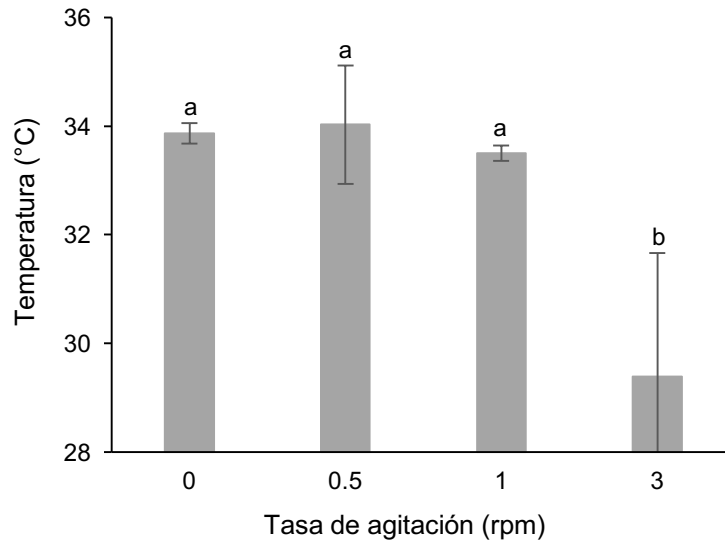
de la presión del aire. Es bien sabido que la aireación es una de las estrategias utilizadas para contrarrestar la acumulación de calor metabólico en FES, prueba de ello es que, al utilizar flujos de aire altos se mejora la remoción de calor y la actividad enzimática. Sin embargo, uno de los principales inconvenientes de la aplicación de flujos de aire altos es la disminución de la humedad en los sustratos sólidos, provocando cambios en la actividad metabólica de los microorganismos.

Otra manera de contrarrestar los problemas asociados a la acumulación de calor en FES es con el uso de agitación. Entre las ventajas de la agitación esta la homogeneización, evitando además problemas de compactación del lecho y favoreciendo la transferencia de O<sub>2</sub> debido al aumento en el área de superficie del soporte sólido, exponiéndolo al aire de entrada del sistema. Por esta razón y con base en los resultados obtenidos, se usó un biorreactor horizontal agitado (BHA) con un diámetro 10 veces mayor con respecto a los BTE.

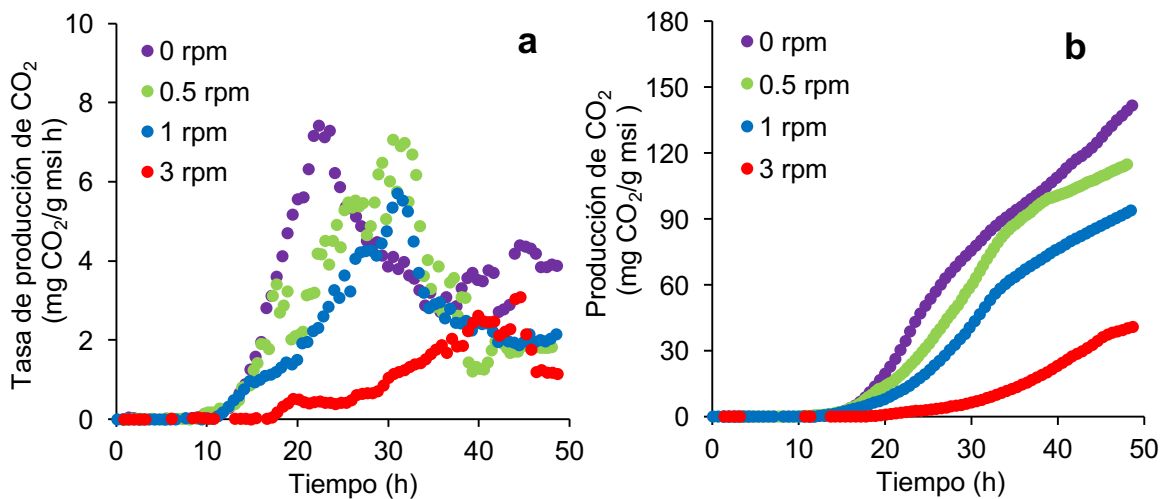
### **8.1.3. Efecto de la tasa de agitación sobre el crecimiento y la producción de enzimas en BHA**

Para determinar el efecto de la agitación sobre el crecimiento y producción de enzimas por *T. harzianum*, se evaluaron tasas de agitación de 0 a 3 rpm. La máxima temperatura alcanzada fue de  $33.80 \pm 0.27^{\circ}\text{C}$  en BHA con tasas de agitación de 0 a 1 rpm (Fig.8). Al agitar el biorreactor a 3 rpm, la temperatura máxima obtenida fue de  $29.39^{\circ}\text{C}$ , lo cual puede indicar que, bajo esta condición, la remoción de calor fue más eficiente. Sin embargo, la tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> ( $\mu_{\text{CO}_2}$ ), la producción de CO<sub>2</sub> y los parámetros asociados a la producción de CO<sub>2</sub> disminuyeron a medida que se aumentó la tasa de agitación (Figura 9a, 9b y Tabla 6). Esto indica que el aumento en la tasa de agitación tuvo un efecto negativo en el crecimiento fúngico, por ejemplo, la fase *lag* se retrasó alrededor de 6 h. A pesar de que no se observaron diferencias significativas entre  $\mu_{\text{CO}_2}$  de 0.5 y 1 rpm, los máximos valores de  $\mu_{\text{CO}_2}$  y producción de CO<sub>2</sub> fueron hasta 3 veces mayores que los obtenidos con 3 rpm. Esto indica que *T. harzianum* puede crecer de manera favorable con tasas de agitación de 0.5 y 1 rpm, mientras que tasas más altas (3 rpm) afectan el crecimiento, probablemente por daños a la integridad del micelio.

Por ejemplo, Nagel *et al.* (2000) reporta el uso de un tambor rotatorio con agitación continua de 0.5 rpm con granos de trigo comercial, y observaron que no hubo crecimiento superficial, sin embargo, las observaciones microscópicas demostraron que hubo crecimiento de *A. oryzae* ocurrió dentro de los granos de trigo.



**Figura 8.** Valores máximos de temperatura en el lecho del BHA en FES por *T. harzianum* PBLA.



**Figura 9.** a) Tasa de producción de CO<sub>2</sub>. b) Producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo en FES por *T. harzianum* PBLA a diferentes tasas de agitación en BHA.

**Tabla 6.** Parámetros asociados a la producción de CO<sub>2</sub>; tasa máxima de producción de CO<sub>2</sub> (T<sub>máx</sub>PCO<sub>2</sub>), producción máxima de CO<sub>2</sub> (P<sub>máx</sub>CO<sub>2</sub>), tiempo *Lag* (t<sub>Lag</sub>) y tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> (μ<sub>CO2</sub>), evaluados en BHA en FES con *T. harzianum* PBLA con aserrín de pino bajo diferentes tasas de agitación (0, 0.5, 1 y 3 rpm).

Tasa de agitación (rpm)	T <sub>máx</sub> PCO <sub>2</sub> (mg CO <sub>2</sub> /g msi h)	P <sub>máx</sub> CO <sub>2</sub> (mg CO <sub>2</sub> /g msi)	t <sub>Lag</sub> (h)	μ <sub>CO2</sub> (h <sup>-1</sup> )
0	7.42	139.30	12.74	0.31
0.5 <sup>1</sup>	7.06	114.82	10.13	0.15
1 <sup>2</sup>	5.71	108.96	12.24	0.13
3 <sup>1</sup>	2.88	40.16	17.76	0.13

<sup>1</sup> Agitación continua.

<sup>2</sup> Agitación continua a partir de las 10 h del inicio del cultivo.

Ahamed y Vermette (2010) evaluaron la producción de celulasas por *T. reesei* en FEL con y sin agitación, observaron que la morfología del microorganismo se vio afectada bajo condiciones de agitación, ya que se produjo una disminución en la longitud de las hifas debido a la fragmentación del micelio. Felse y Panda (2000) evaluaron diferentes tasas de agitación en la producción de quitinasas por *T. harzianum* en FEL, observando un incremento en el crecimiento conforme se aumentó la tasa de agitación hasta 224 rpm, por arriba de ésta, el crecimiento disminuyó. Como se mencionó, no todos los microorganismos tienen la misma resistencia a los esfuerzos de corte, por lo que es necesario encontrar una tasa de agitación adecuada que permita el crecimiento.

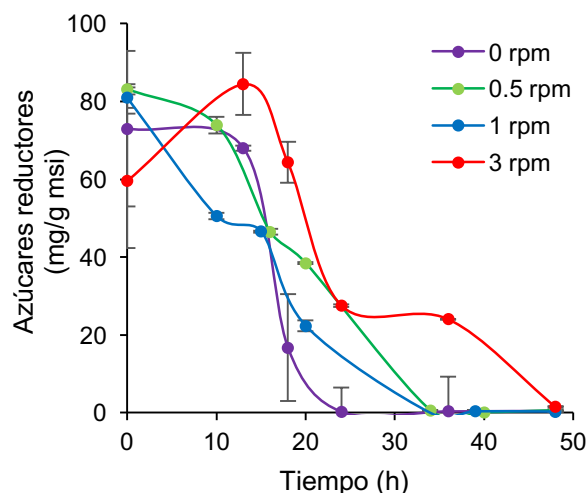
En la Figura 9a se observa que los valores máximos de la tasa de producción de CO<sub>2</sub> se obtuvieron en tiempos diferentes, es decir, el tiempo en el que dicho valor se alcanzó se incrementó a medida que aumentó la tasa de agitación. En cuanto a los perfiles de consumo de glucosa (Figura 10) se observa que, al igual que el perfil de la tasa de producción de CO<sub>2</sub>, el consumo fue más lento conforme se aumentó la tasa de agitación; se encontró que sin agitación, los azúcares reductores se consumieron totalmente a las 24 h, para 0.5 y 1 rpm el consumo total se alcanzó a las 34 h y para 3 rpm a las 48 h. Este comportamiento puede atribuirse al incremento



---

---

en la tasa de agitación, puesto que se afecta el crecimiento, por daños a la integridad del micelio.

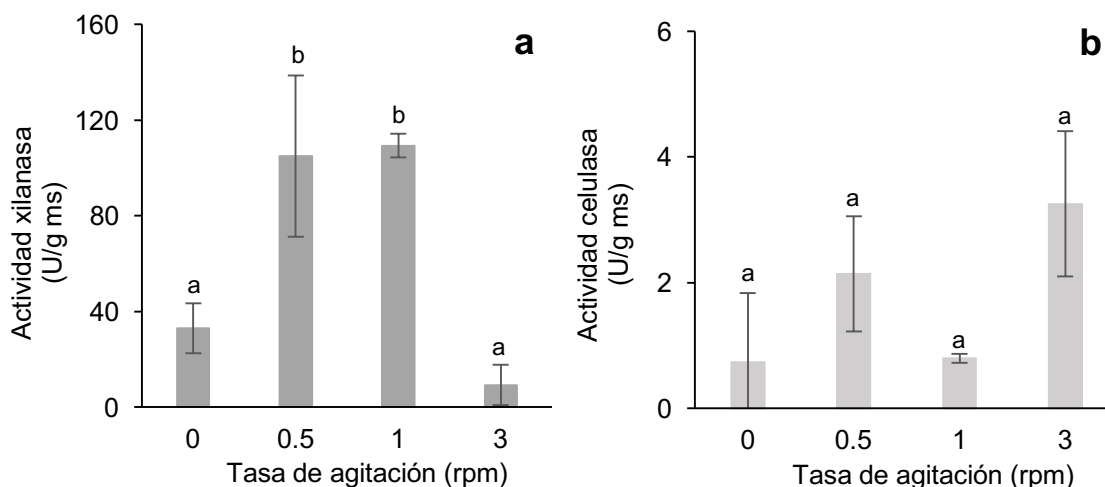


**Figura 10.** Consumo de azúcares reductores por *T. harzianum* PBLA durante 50 h de cultivo, bajo condiciones de FES, en función de la tasa de agitación (0, 0.5, 1 y 3 rpm) en BHA.

La máxima actividad xilanasa ( $107.09 \pm 3.15$  U/g ms) se registró en las tasas de agitación de 0.5 y 1 rpm (Fig. 11a), mientras que a 3 rpm se redujo en un 90 % (9.20 U/g ms). En cuanto a la actividad celulasa (Figura 11b), no se encontraron diferencias significativas en función de la tasa de agitación, obteniendo  $1.73 \pm 1.21$  U/g ms considerando todas las tasas de agitación evaluadas. Sin embargo, la actividad celulasa en los BHA fue 5 veces menor que la obtenida en los BTE, por lo tanto, para la actividad celulasa, el uso de la agitación si mostró un efecto negativo sobre la misma.

En dos estudios acerca de la producción de celulasas en FES con *Aspergillus awamori* (Díaz *et al.*, 2009) y *Trichoderma reesei* (Flodman y Nouredini, 2013), indican niveles de actividad mayores en condiciones estáticas, 3.5 U/g ms y 12.5 U/g msi, respectivamente. Por otro lado, bajo condiciones de agitación Gunjekar *et al.* (2001) mencionan que la celulasa producida por *T. reesei* se desactiva cuando es sometida a fuerzas de cizallamiento, el grado de desactivación aumenta con el aumento en la tasa de agitación. Puesto que, de las tres enzimas que componen el

complejo de celulasas (endoglucanasas, exoglucanasas y b-glucosidasa), la exoglucanasa mostró una desactivación más rápida, siendo ésta la que más contribuye a la desactivación del complejo.



**Figura 11.** a) Actividad xilanasa y b) Actividad celulasa obtenidas en FES por *T. harzianum* PBLA en diferentes tasas de agitación (0, 0.5, 1 y 3 rpm).

A partir de los datos de producción de CO<sub>2</sub> y de actividades enzimáticas, se estimaron los parámetros cinéticos mediante el modelo de Luideking y Piret (Ec. 2) (Aguilar *et al.* 2001). De acuerdo con la Ec 2, α (U/mg CO<sub>2</sub>) corresponde a la actividad enzimática asociada a la producción de CO<sub>2</sub> y β (U/mg CO<sub>2</sub> h) es la actividad enzimática no asociada a la producción de CO<sub>2</sub>. En la Tabla 7 se observa que el coeficiente de correlación (R<sup>2</sup>) del modelo de Luideking y Piret fue cercano a 1 para todas las tasas de agitación excepto para la actividad celulasa a 3 rpm, donde el coeficiente fue menor. Lo anterior indica que los valores obtenidos a 3 rpm no son descritos por el modelo. Los valores obtenidos para los coeficientes del modelo (α y β) revelaron que tanto la actividad xilanasa como la celulasa están asociadas a la producción de CO<sub>2</sub> ya que bajo las condiciones estudiadas los valores de β tendieron a cero, por lo que este término se puede considerar despreciable.

$$\frac{dE}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad \text{Ec.2}$$

La obtención de valores negativos en  $\beta$  se asoció con la disminución en la actividad enzimática, es decir, que se alcanzó un valor máximo durante la fermentación (Luedeking y Piret 1959). Por el contrario, los valores positivos en  $\beta$  indicaron que la actividad de las enzimas secretadas presentó cierta estabilidad en el extracto, donde la actividad no disminuyó, por tanto, no hubo valores máximos (Aguilar et al. 2001). De manera similar, Kalogeris *et al.* (2003) usó el modelo de Luedeking y Piret para demostrar que la producción de celulasas y xilanasas en FES por *Thermoascus aurantiacus* está asociada al crecimiento, ya que los valores de  $\beta$  fueron 0 y 0.02 para celulasa y xilanasas, respectivamente. Gamarra *et al.* (2010), obtuvieron valores para  $\beta$  de -1.5 y -13 para endoglucanasa y xilanasas, respectivamente, por *Aspergillus niger* en FES, estos valores indican una disminución rápida en la actividad enzimática.

**Tabla 7.** Parámetros cinéticos y tasa específica de producción de CO<sub>2</sub>, evaluados en BHA en FES por *T. harzianum* PBLA con aserrín de pino bajo diferentes tasas de agitación (0, 0.5, 1 y 3 rpm).

Velocidad de agitación (rpm)	Actividad enzimática (U/g dm)	$\mu_{CO_2}$ (h <sup>-1</sup> )*	$\alpha$ (U/mg CO <sub>2</sub> )	$\beta$ (U/mg CO <sub>2</sub> h)	R <sup>2</sup>
<b>Xilanasas</b>					
0	33.04 ± 8.41	0.27	0.327 ± 0.04	-0.002 ± 0.00	0.99
0.5	104.86 ± 33.71	0.22	1.018 ± 0.08	-0.007 ± 0.01	1.00
1	109.32 ± 4.91	0.15	1.022 ± 0.00	-0.000 ± 0.00	1.00
3	9.20 ± 10.43	0.19	0.835 ± 0.12	-0.001 ± 0.01	1.00
<b>Celulasa</b>					
0	0.73 ± 1.15	0.27	0.034 ± 0.00	-0.013 ± 0.00	0.99
0.5	2.14 ± 0.92	0.22	0.004 ± 0.00	0.000 ± 0.00	1.00
1	0.79 ± 0.07	0.15	0.003 ± 0.00	0.000 ± 0.00	1.00
3	3.25 ± 1.10	0.19	0.012 ± 0.01	-0.001 ± 0.00	0.22

\*La tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> fue obtenida mediante el modelo logístico. La actividad enzimática asociada a la producción de CO<sub>2</sub> ( $\alpha$ ) y la tasa de actividad enzimática no asociada a la producción de CO<sub>2</sub> ( $\beta$ ), fueron estimadas mediante el modelo de Luedeking y Piret.

---

---

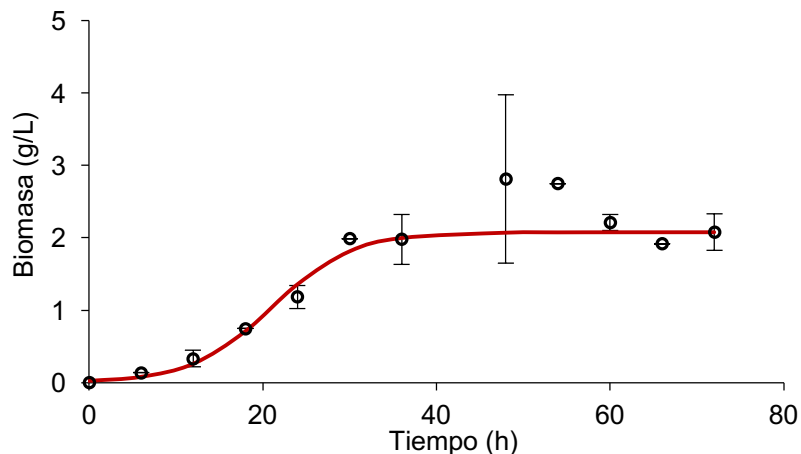
Una vez determinadas las mejores condiciones de agitación (0.5 y 1 rpm) para la FES en BHA, se evaluó el uso de lirio acuático como soporte/sustrato para la producción de xilanasas y celulasas en biorreactores a escalas banco.

## **8.2. Efecto de la temperatura de incubación sobre el crecimiento y la producción de enzimas por *T. harzianum* en lirio acuático**

Se decidió usar lirio acuático como soporte-sustrato, con el fin de utilizar un residuo más económico ayudando a su vez a resolver problemas ambientales ocasionados por el mismo. Para ello fue necesario modificar el protocolo para producción de inóculo, seguida por el efecto la temperatura, humedad y fuente de nitrógeno sobre el crecimiento y la producción de enzimas por *T. harzianum*. Finalmente, se usaron BTE y BHA de escala banco para determinar el efecto de la agitación sobre el crecimiento y producción de enzimas por *T. harzianum*, a partir de lirio acuático como soporte y fuente de carbono.

### **8.2.1. Establecimiento de condiciones para la producción de inóculo**

En esta etapa, se evaluó inicialmente el tiempo de incubación para la producción del inóculo, ya que, en estudios previos (aserrín) se trabajó con un inóculo incubado durante 72 h. En la Figura 12 se muestra la cinética de producción de biomasa en función del tiempo, donde, a partir de las 36 h el crecimiento alcanzó el estado estacionario. Por lo tanto, se redujo el tiempo de incubación del inóculo debido a que a las 72 h el crecimiento de *T. harzianum* ya se encontraba en la fase estacionaria. Con base en este resultado, los estudios posteriores con lirio acuático se realizaron con un inóculo de micelio incubado durante 24 h.

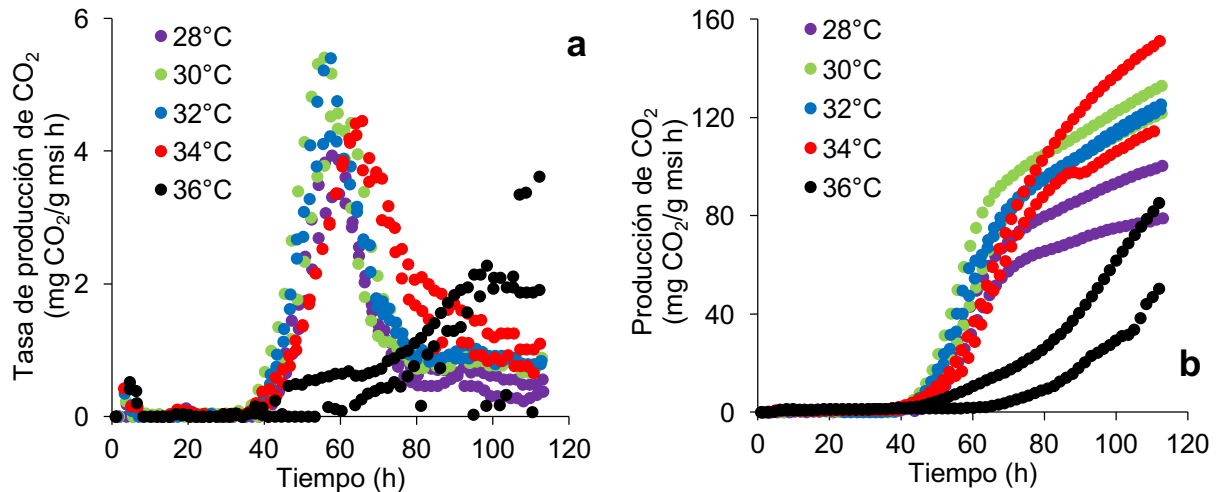


**Figura 12.** Cinética de producción de inóculo de micelio en medio líquido YPD por *T. harzianum* PBLA a 30 °C, 150 rpm durante 72 h.

### 8.2.2. Efecto de la temperatura en el crecimiento y producción de enzimas por *T. harzianum* en BTE

Con base en estudios previos con aserrín como soporte, se determinó que *T. harzianum* PBLA crece y produce enzimas en un intervalo de temperatura entre 28 y 34°C. Sin embargo, se sabe que la conductividad térmica de algunos sustratos utilizados en FES varía según su composición (Kuhad *et al.*, 2016); por esta razón, se evaluó el efecto de la temperatura en un intervalo de 28 a 36°C, considerando las temperaturas ensayadas previamente con aserrín.

En la Figura 13a se observa que los valores máximos de tasa de producción de CO<sub>2</sub> se obtuvieron a 30 y 32°C, temperaturas similares a las obtenidas con aserrín de pino; sin embargo, el tiempo en el cual se obtuvieron los máximos valores aumentaron, mientras que con aserrín de pino los valores máximos se obtuvieron entre las 17 - 19 h del cultivo, con lirio se obtuvieron a las 57 - 65 h. También se observó que la tasa de producción de CO<sub>2</sub> disminuyó a medida que se aumentó la temperatura de incubación, para las temperaturas de 34 y 36°C hubo una disminución en la tasa máxima de producción de CO<sub>2</sub> del 11 y 40 %, respectivamente, con respecto a las demás temperaturas evaluadas (28, 30 y 32°C).



**Figura 13.** a) Tasa de producción de CO<sub>2</sub>; b) Producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo en FES por *T. harzianum* PBLA a diferentes temperaturas de incubación en BTE. Se muestran duplicados para cada temperatura de incubación.

La producción máxima de CO<sub>2</sub> (Figura 13b) se obtuvo en un intervalo entre los 30 y 34°C. Para 28 y 36°C la producción de CO<sub>2</sub> fue 30 y 60 % menor, respectivamente.

No hubo diferencias significativas en los parámetros cinéticos determinados (Tabla 8), con excepción de la  $\mu_{CO_2}$ , cuyos valores disminuyeron a medida que aumentó la temperatura. Por otro lado, el  $t_{Lag}$  presentó un retardo de 28 h comparado con el  $t_{Lag}$  obtenido en los cultivos con aserrín (10 – 11 h).

Estos resultados muestran que *T. harzianum* PBLA crece más rápido entre 28 y 32°C, sin embargo, el crecimiento sobre lirio fue más lento que sobre aserrín. Lo anterior, se corroboró con los valores de  $\mu_{CO_2}$  entre 28 y 32°C, que fueron 1.7 veces menores que los obtenidos con aserrín (28 - 34°C). Esta diferencia pudo deberse a que el lirio acuático no fue lavado con agua caliente como en el caso del aserrín. Juárez-Luna (2014) resalta la importancia del pretratamiento (lavado) del aserrín, pues en FES con *A. versicolor* con aserrín lavado como soporte, el  $t_{Lag}$  fue de 23 h, mientras que, en el cultivo con aserrín sin lavar, el  $t_{Lag}$  se alargó hasta 42 h. Lo anterior, se atribuyó a la presencia de compuestos con actividad antimicrobiana y

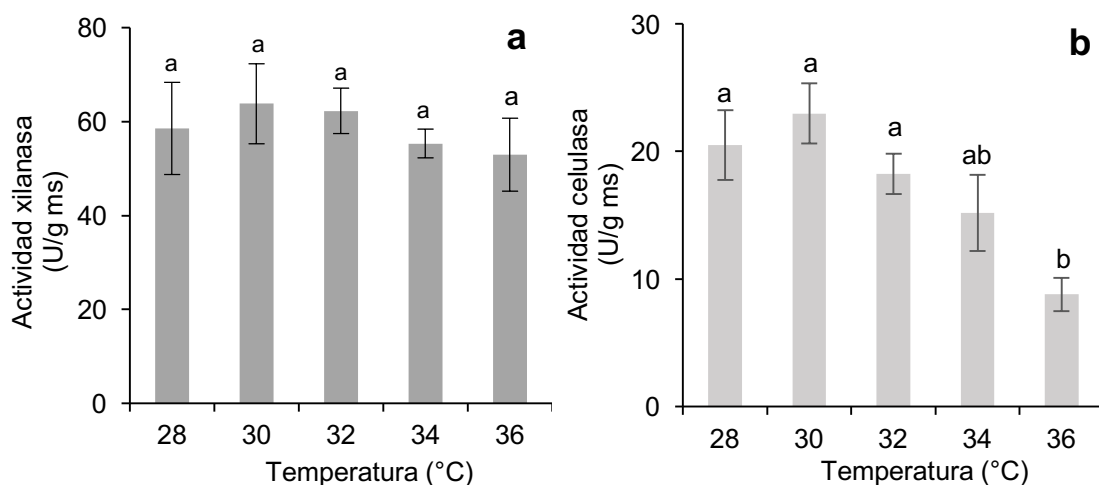
antifúngica en la madera de pino (Lee *et al.*, 2005), los cuales fueron removidos durante el lavado con agua caliente y fría antes de ser secado. Además, observaron que, en el aserrín sin lavar, el pH del medio disminuyó, probablemente debido a que no se removieron sustancias ácidas. Esto coincide con los valores registrados en este trabajo, dado que el pH inicial en los cultivos con aserrín fue de  $5.91 \pm 0.19$ , y para lirio fue de  $4.55 \pm 0.04$ , por lo que el pH pudo ser un factor para que el crecimiento fuera más lento en lirio con respecto al aserrín.

**Tabla 8.** Parámetros asociados a la producción de CO<sub>2</sub>; tasa máxima de producción de CO<sub>2</sub> (T<sub>máx</sub>PCO<sub>2</sub>), producción máxima de CO<sub>2</sub> (P<sub>máx</sub>CO<sub>2</sub>), tiempo *Lag* (t<sub>Lag</sub>) y tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> (μ<sub>CO2</sub>), evaluados en BTE en FES con *T. harzianum* PBLA con lirio acuático bajo diferentes temperaturas de incubación.

Temperatura (°C)	T <sub>máx</sub> PCO <sub>2</sub> (mg CO <sub>2</sub> /g msi h)	P <sub>máx</sub> CO <sub>2</sub> (mg CO <sub>2</sub> /g msi)	t <sub>Lag</sub> (h)	μ <sub>CO2</sub> (h <sup>-1</sup> )
28	3.65 ± 0.41 <sup>a</sup>	89.63 ± 15.10 <sup>a</sup>	41.89 ± 3.44 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.02 <sup>a</sup>
30	4.97 ± 0.63 <sup>a</sup>	127.42 ± 7.88 <sup>a</sup>	38.58 ± 1.41 <sup>a</sup>	0.17 ± 0.00 <sup>ab</sup>
32	4.81 ± 0.83 <sup>a</sup>	124.32 ± 1.64 <sup>a</sup>	38.05 ± 1.89 <sup>a</sup>	0.17 ± 0.01 <sup>ab</sup>
34	4.35 ± 0.15 <sup>a</sup>	132.79 ± 25.80 <sup>a</sup>	36.03 ± 4.71 <sup>a</sup>	0.12 ± 0.01 <sup>b</sup>
36	2.95 ± 0.95 <sup>a</sup>	67.77 ± 24.74 <sup>a</sup>	36.96 ± 14.82 <sup>a</sup>	0.05 ± 0.00 <sup>c</sup>

Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias para cada temperatura de incubación.

En cuanto a la actividad xilanasa (Figura 14a), no se observó diferencia significativa en el intervalo de temperatura evaluado, obteniendo como máximo  $58.60 \pm 4.58$  U/g ms; esta actividad fue un 42% menor que la obtenida con aserrín de pino ( $100.66 \pm 7.88$  U/g ms). En cambio, para la actividad celulasa se encontró una disminución significativa al aumentar la temperatura de incubación (Fig. 14b). Es importante mencionar que la máxima actividad celulasa obtenida con lirio fue de  $19.23 \pm 3.32$  U/g ms (en un intervalo de 28-34°C), la cual fue 2.2 veces mayor que la obtenida con aserrín de pino ( $8.66 \pm 0.54$  U/g ms). Esta diferencia en la actividad celulasa pudo deberse, a la variación en la composición de cada sustrato (Tabla 9); sin embargo, se puede ver que el aserrín tiene mayor cantidad de celulosa, por lo que podría esperarse mayor actividad celulasa en dicho soporte.



**Figura 14.** a) Actividad xilanasa, b) Actividad celulasa, obtenidas en FES por *T. harzianum* PBLA con lirio acuático bajo diferentes temperaturas de incubación (28, 30, 32, 34 y 36°C).

**Tabla 9.** Composición de la biomasa lignocelulósica de aserrín de pino y lirio acuático

Soporte	Componentes lignocelulósicos (%) base seca			Referencia
	Hemicelulosa	Celulosa	Lignina	
Aserrín de pino	27.48 ± 0.87	41.81 ± 0.43	25.12 ± 0.36	Hosseinizand y col., 2018
Lirio acuático	15 - 25	30 - 55	3 - 4	Bayrakci y col., 2014
Lirio acuático	21.1	25.9	12.0	Mishima y col., 2006

La lignina es uno de los obstáculos más difíciles de superar en la hidrólisis de fibras vegetales. El uso de pretratamientos térmicos y químicos favorecen la eliminación de lignina de la matriz formada por celulosa y hemicelulosa (Toquero y Bolado 2014). En ese sentido, el aumento en la actividad celulasa al utilizar lirio acuático, puede atribuirse al pretratamiento al cual fue sometido ( $H_2SO_4$ , 0.25 M). Harun *et al.* (2011), utilizaron un pretratamiento con ácido sulfúrico al 5% donde, al analizar los extractos mediante HPLC, encontraron mayor cantidad de pentosas que



---

---

de hexosas, que se relacionan con un mayor contenido de hemicelulosa. Este resultado también sugiere que el uso del ácido diluido hidroliza principalmente a la hemicelulosa, y deja intacta la celulosa, este podría ser el motivo por el cual se encontró mayor actividad celulasa con lirio que con aserrín. La disminución de la actividad xilanasa también puede deberse a la hidrólisis de la hemicelulosa durante el pretratamiento, evitando la inducción de las mismas.

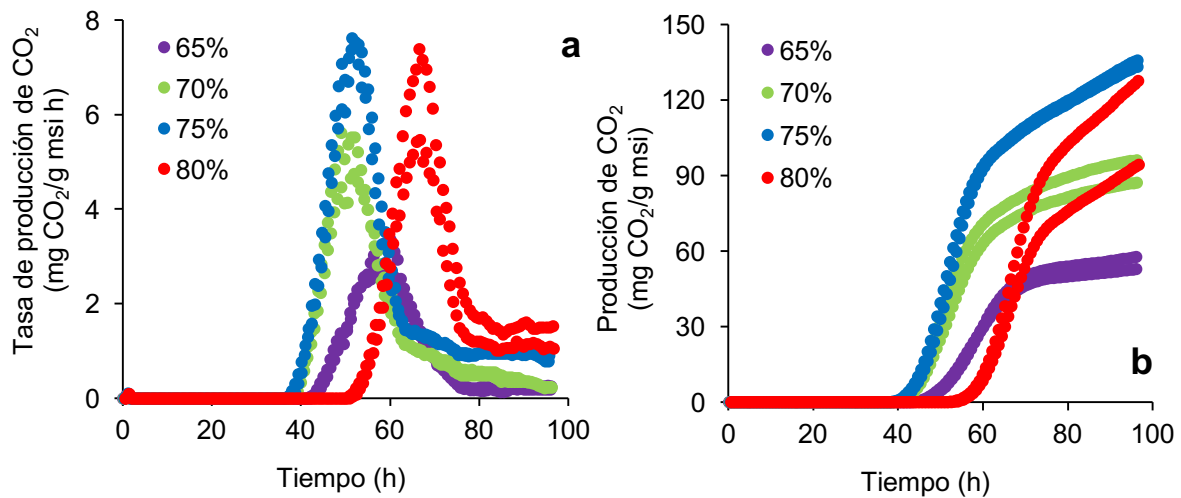
### **8.2.3. Efecto de la humedad sobre el crecimiento y la producción de enzimas en BTE**

Las variables que afectan los procesos de FES pueden dividirse, de manera general, en biológicas, físicas y ambientales, incluida la humedad del sustrato (Wittmann y Liao 2016). Por esta razón se evaluó el contenido de humedad del lirio acuático para la producción de enzimas por *T. harzianum*.

El contenido de humedad es un factor crucial en cualquier proceso biológico ya que influye en el crecimiento y la biosíntesis, así como en la secreción de diferentes metabolitos (Jecu, 2000). También debe tomarse en cuenta la naturaleza del sustrato, ya que algunos sustratos lignocelulósicos tienen la capacidad de absorber más agua (Yoon *et al.* 2014). Para la producción de celulasas y xilanasas por FES, existen estudios que reportan contenidos de humedad de 40 - 90 % (Farinas, 2015). Sin embargo, contenidos elevados de humedad están asociados con problemas de contaminación en los cultivos. Por esta razón, se evaluaron contenidos de humedad de 65 a 80 %.

En la Figura 15a se muestra la tasa y la máxima producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo de incubación para cada uno de los niveles de humedad evaluada. Conforme incrementa el contenido de humedad, la tasa de producción de CO<sub>2</sub> aumenta, obteniendo un valor máximo (7.58 mg CO<sub>2</sub>/g msi) para 75 % de humedad. Con 80 % de humedad se observó un valor similar (7.39 mg CO<sub>2</sub>/g msi), pero con retraso de 15 h. Para 65 % de humedad, la tasa de producción de CO<sub>2</sub> se obtuvo 6 h después y fue 2.48 veces menor que la máxima. Para 70 % de humedad la tasa

máxima fue 1.46 veces menor que la humedad del 75 % a pesar de que la tasa máxima se haya obtenido al mismo tiempo.



**Figura 15.** a) Tasa de producción de CO<sub>2</sub> y b) Producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo en FES por *T. harzianum* PBLA, bajo porcentajes de humedad (65, 70, 75 y 80 %) durante 96 h.

La Tabla 10 presenta los parámetros asociados con la producción de CO<sub>2</sub>. Se observó que con 65 y 80 % de humedad, el  $t_{Lag}$  aumentó 5 y 14 h, respectivamente, con respecto al  $t_{Lag}$  obtenido con 70 y 75 %. No se encontraron diferencias significativas en  $\mu_{CO_2}$ , lo cual indica que ésta variable fue independiente del contenido de humedad evaluado por lo cual, *T. harzianum* puede crecer a la misma velocidad independientemente del porcentaje de humedad, lo que podrá ser favorable para procesos donde se tenga limitaciones con el agua.

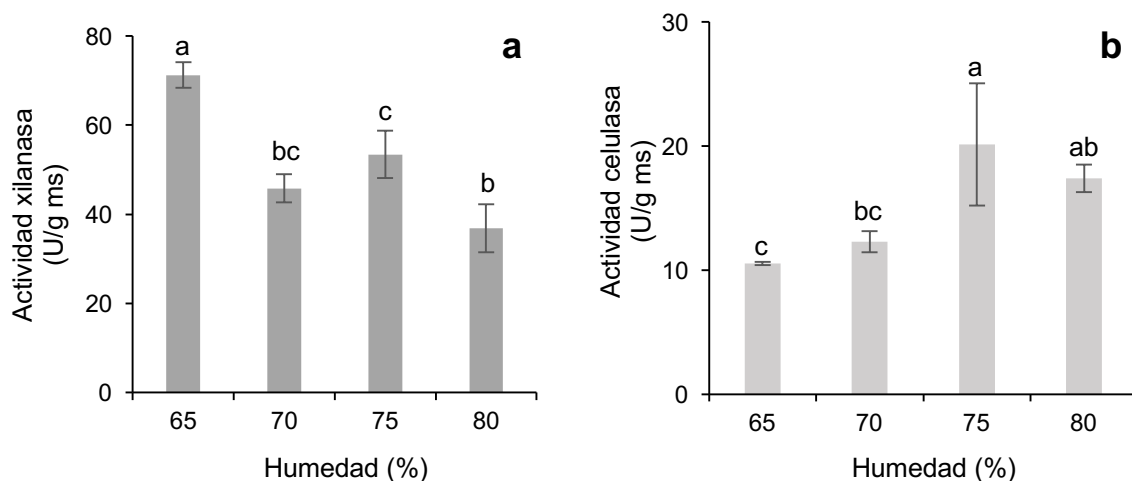
**Tabla 10.** Parámetros asociados a la producción de CO<sub>2</sub>; tasa máxima de producción de CO<sub>2</sub> (T<sub>max</sub>PCO<sub>2</sub>), producción máxima de CO<sub>2</sub> (P<sub>max</sub>CO<sub>2</sub>), tiempo *Lag* (t<sub>Lag</sub>) y tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> (μ<sub>CO2</sub>), evaluados en BTE en FES con *T. harzianum* PBLA con lirio acuático bajo diferentes porcentajes de humedad (65, 70, 75 y 80 %).

Humedad (%)	T <sub>max</sub> PCO <sub>2</sub> (mg CO <sub>2</sub> /g msi h)	P <sub>max</sub> CO <sub>2</sub> (mg CO <sub>2</sub> /g msi)	t <sub>Lag</sub> (h)	μ <sub>CO2</sub> (h <sup>-1</sup> )
65	3.06 ± 0.43 <sup>a</sup>	55.23 ± 3.42 <sup>a</sup>	44.19 ± 0.76 <sup>b</sup>	0.18 ± 0.01 <sup>a</sup>
70	5.18 ± 0.61 <sup>ab</sup>	91.60 ± 6.27 <sup>ab</sup>	39.56 ± 0.26 <sup>a</sup>	0.26 ± 0.05 <sup>a</sup>
75	7.58 ± 0.05 <sup>b</sup>	134.32 ± 1.76 <sup>b</sup>	38.52 ± 0.21 <sup>a</sup>	0.23 ± 0.00 <sup>a</sup>
80	6.43 ± 1.36 <sup>b</sup>	110.88 ± 23.50 <sup>b</sup>	53.08 ± 0.59 <sup>c</sup>	0.22 ± 0.00 <sup>a</sup>

Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias para cada porcentaje de humedad.

Se sabe que el crecimiento de *Trichoderma* se favorece con un contenido de humedad 60 % (Martínez *et al.* 2013). Sin embargo, en el presente estudio, los parámetros asociados con la producción de CO<sub>2</sub> por *T. harzianum* PBLA fueron mayores con 75 % de humedad. Wittmann y Liao (2016), mencionan que el contenido de humedad óptimo para cultivos con hongos puede variar entre 50 y 60 %. Un menor contenido de humedad causa una reducción en la solubilidad de los nutrientes del sustrato, mientras que niveles más altos, pueden causar una reducción en los espacios entre partículas (porosidad) de la matriz sólida, interfiriendo así con la transferencia de oxígeno. Además, el uso de niveles altos de humedad favorece la contaminación por bacterias.

En la Figura 16 se presentan los resultados de la actividad xilanasa y celulasa. La mayor actividad xilanasa (71 U/g ms) se alcanzó con 65 % de humedad (Figura 16a); al incrementar el contenido de humedad, la actividad disminuyó hasta aproximadamente la mitad (80 % de humedad). En contraste, la actividad celulasa aumentó a medida que se incrementó la humedad, alcanzando una actividad máxima de 18.77 ± 3.60 U/g ms con contenidos de humedad de 75 y 80 % (Figura 16b).



**Figura 16.** a) Actividad xilanasa y b) Actividad celulasa obtenidas en FES por *T. harzianum* PBLA en lirio acuático bajo diferentes porcentajes de humedad (65, 70, 75 y 80%).

Existen reportes en la literatura que evalúan el efecto de diferentes contenidos de humedad sobre la actividad enzimática xilanasa y celulasa. Por ejemplo, Sun *et al.* (2010) reportaron 70 % como el contenido de humedad óptimo para la producción de celulasas (3.5 U/g ms) con *Trichoderma sp.* en FES con pulpa de manzana como sustrato. Este grupo observó que al utilizar niveles de humedad diferentes al óptimo, la actividad enzimática se redujo, para un nivel de humedad bajo se reduce la solubilidad de nutrientes y hay una mayor tensión superficial del agua y para un nivel de humedad mayor, se disminuye la porosidad y se disminuye la transferencia de oxígeno. Pathak *et al.*, (2014) produjeron celulasas y xilanasas con *T. harzianum* por FES con salvado de trigo, evaluaron 5 niveles de humedad (50, 65, 75, 80 y 85 %), obteniendo los mejores resultados con 75 % (27.49 y 2.16 U/g ms de actividad celulasa y xilanasa, respectivamente); contenidos de humedad menores al óptimo disminuyeron la producción de enzimas debido a la reducción en la difusión de nutrientes y gases; niveles de humedad mayores al óptimo afectan negativamente la producción de enzimas debido a la disminución de la porosidad, alteración en la estructura de las partículas y disminución en la transferencia de O<sub>2</sub>. Deschamps *et al.* (1985) produjeron celulasas con *T. harzianum* en FES con paja y

---

---

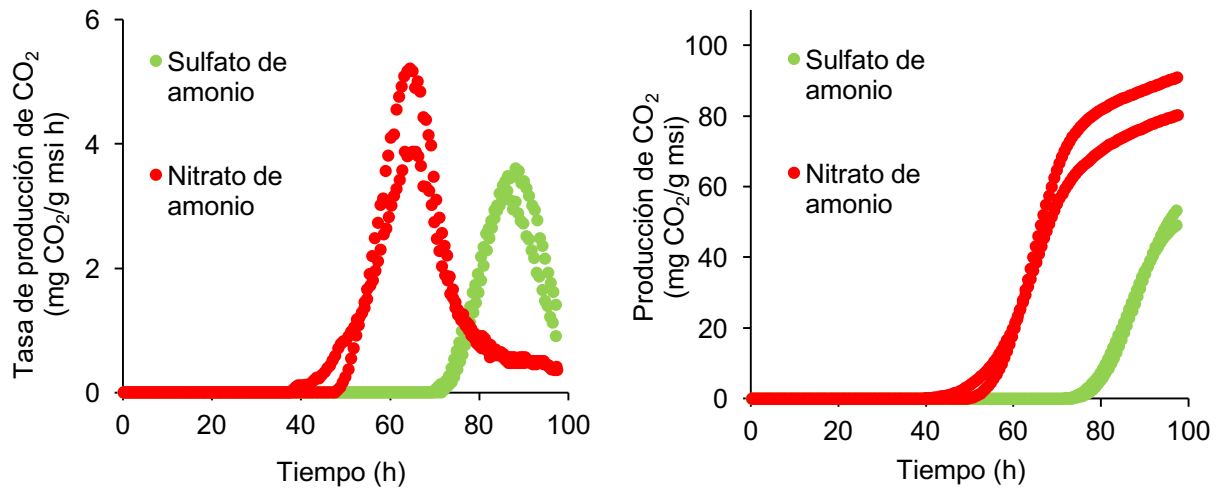
salvado de trigo, evaluaron 4 contenidos de humedad (55, 67, 74 y 80 %), obteniendo la mayor actividad celulasa (18 U/ g msi) con 74 %; al aumentar la humedad, la actividad celulasa disminuyó 33 % y con 55 % de humedad, la actividad fue tres veces menor. La similitud entre el valor máximo de actividad registrado por Deschamps *et al.* (1985) y el obtenido en este trabajo (20.13 U/g ms con una humedad del 75 %), pudo deberse a valores de retención de agua similares en el lirio acuático y la mezcla de paja con salvado de trigo. Bharti *et al.* (2018) y Kumar *et al.* (2018) produjeron celulasas y xilanasas con *A. niger* en FES con salvado de trigo, evaluando contenidos de humedad de 50 a 85 %, encontrando un óptimo de 70 y 65 % para la producción de celulasa y xilanasas, respectivamente (38.37 y 948.20 U/g ms). Estos contenidos de humedad fueron similares a los obtenidos en este trabajo. Esta serie de resultados sugiere que la producción de xilanasas requiere mayor concentración de O<sub>2</sub>, con respecto a la actividad celulasa. Las diferencias entre los resultados reportados en la literatura con los obtenidos en este trabajo se deben a que los microorganismos tienen requisitos específicos en términos de disponibilidad de humedad para su óptimo crecimiento y producción de enzimas.

#### **8.2.4. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre el crecimiento y la producción de enzimas en BTE**

En los dos ensayos anteriores con lirio acuático se observó en las cinéticas de tasa y máxima producción de CO<sub>2</sub> (Figura 13b y 15b) que el tiempo del cultivo fue más largo comparado con el tiempo de cultivo con aserrín de pino, donde se obtuvo un tiempo Lag con una diferencia de 28h. En ese sentido, se hizo la consideración que si se utilizaba una fuente de nitrógeno más reducida ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) que con la que se había estado trabajando (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) se reduciría el t<sub>Lag</sub> y por lo tanto se reduciría el tiempo del cultivo.

En las Figuras 17a y b se encontró que el uso del nitrato de amonio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) aumentó la tasa máxima de producción de CO<sub>2</sub> (4.54 ± 0.95 mg CO<sub>2</sub>/ g msi h), y esto ocurrió 23 h antes que con el uso del sulfato de amonio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Del mismo modo, la producción de CO<sub>2</sub> fue mayor (97.52 ± 10.89 mg CO<sub>2</sub>/g msi) al utilizar

nitrato de amonio, estas diferencias pudieron ser debidas justamente al grado de óxido reducción de las fuentes de nitrógeno evaluadas.



**Figura 17.** a) Tasa de producción de CO<sub>2</sub> y b) Producción de CO<sub>2</sub> en función del tiempo en FES por *T. harzianum* PBLA con diferentes sales de amonio (sulfato de amonio y nitrato de amonio) durante 96 h.

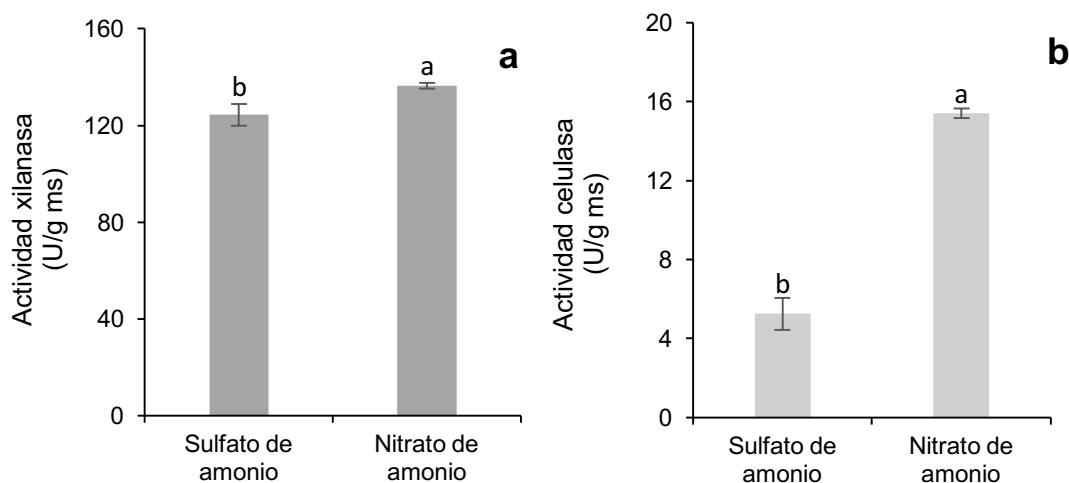
El  $t_{Lag}$  y el tiempo de cultivo total, también resultaron menores empleando nitrato de amonio (Tabla 11). Ya que, para el  $t_{Lag}$  hubo una diferencia de 27 h entre ambas fuentes de nitrógeno.

**Tabla 11.** Parámetros asociados a la producción de CO<sub>2</sub>; tasa máxima de producción de CO<sub>2</sub> (T<sub>máx</sub>PCO<sub>2</sub>), producción máxima de CO<sub>2</sub> (P<sub>máx</sub>CO<sub>2</sub>), tiempo Lag (t<sub>Lag</sub>) y tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> (μ<sub>CO2</sub>), evaluados en BTE en FES con *T. harzianum* PBLA con lirio acuático bajo diferentes sales de amonio (sulfato de amonio y nitrato de amonio).

Fuente de Nitrógeno	T <sub>máx</sub> PCO <sub>2</sub> (mg CO <sub>2</sub> /g ms h)	P <sub>máx</sub> CO <sub>2</sub> (mg CO <sub>2</sub> /g msi)	t <sub>Lag</sub> (h)	μ <sub>CO2</sub> (1/h)
Sulfato de amonio	3.42 ± 0.26 <sup>a</sup>	51.16 ± 2.90 <sup>a</sup>	73.09 ± 2.59 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.00 <sup>a</sup>
Nitrato de amonio	4.54 ± 0.95 <sup>a</sup>	97.52 ± 10.89 <sup>b</sup>	46.28 ± 4.77 <sup>b</sup>	0.18 ± 0.04 <sup>a</sup>

Letras diferentes indican diferencias significativas entre medias para cada fuente de nitrógeno.

Las actividades xilanasas (Figura 18a) y celulasas (Figura 18b) fueron dependientes de la fuente de nitrógeno, obteniendo los valores máximos con nitrato de amonio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>): 136.42 U/g ms y 15.41 U/g ms, respectivamente.



**Figura 18.** a) Actividad xilanasas y b) Actividad celulasas obtenidas al final de la FES por *T. harzianum* PBLA en lirio acuático con diferentes sales de amonio (sulfato de amonio y nitrato de amonio).

---

---

Sin embargo, se debe considerar que para ambas fuentes de nitrógeno la actividad enzimática (xilanasas y celulasas) fue medida al final del cultivo (97h), donde se observó (Figura 17b) que para el nitrato de amonio el cultivo ya se encontraba en la fase estacionaria, y por otro lado, el cultivo con sulfato de amonio aun no alcanzaba esta fase. Es decir, a pesar de que llevaban el mismo tiempo de cultivo (97 h) los cultivos, se encontraban en fases diferentes.

Goyal *et al.* (2008) evaluaron diferentes fuentes de nitrógeno (incluidos nitrato y sulfato de amonio) para la producción de xilanasas por *T. reesei* en FEL; el valor máximo de actividad xilanasas, lo obtuvieron con nitrato de sodio (2506 U/L), seguido por sulfato de amonio (2239 U/L) y nitrato de amonio (1599 U/L). Saini *et al.* (2017) produjeron celulasas por *T. reesei* en FES con una planta (*Parthenium hysterophorus*) como sustrato, este grupo evaluó el efecto de varias sales de amonio sobre la actividad enzimática; la máxima actividad fue obtenida con molibdato de amonio (20.41 U/g ms), seguida por sulfato de amonio (18 U/g ms) y nitrato de amonio (16 U/g ms). Vyas *et al.* (2005) evaluaron el efecto de nitrato y sulfato de amonio sobre la producción de celulasas por *A. terreus* en FES con cáscara de cacahuete como sustrato, obteniendo valores de actividad muy similares con ambas fuentes de nitrógeno (2.56 y 2.83 U/mL, respectivamente). Ellos mencionan que, el nitrógeno es el principal constituyente del protoplasma y de las proteínas y que por lo tanto, la estimulación de la actividad celulasas por la sal de amonio en su caso, por el sulfato de amonio, pudo deberse a su entrada directa a la síntesis de proteínas. Se sabe que el nitrógeno es un nutriente esencial para el crecimiento y los hongos pueden utilizar una amplia variedad de compuestos como fuentes de nitrógeno (Wong *et al.* 2008). Sin embargo, el uso de diferentes compuestos de nitrógeno es selectivo, y se utilizan preferentemente fuentes de nitrógeno fácilmente asimilables. En este trabajo, se observó que el uso de nitrato de amonio dio los mejores resultados, tanto para el crecimiento como para la actividad enzimática. Esto quiere decir que el nitrato de amonio fue para *Trichoderma harzianum* PBLA una fuente fácilmente asimilable en comparación con el sulfato de amonio.



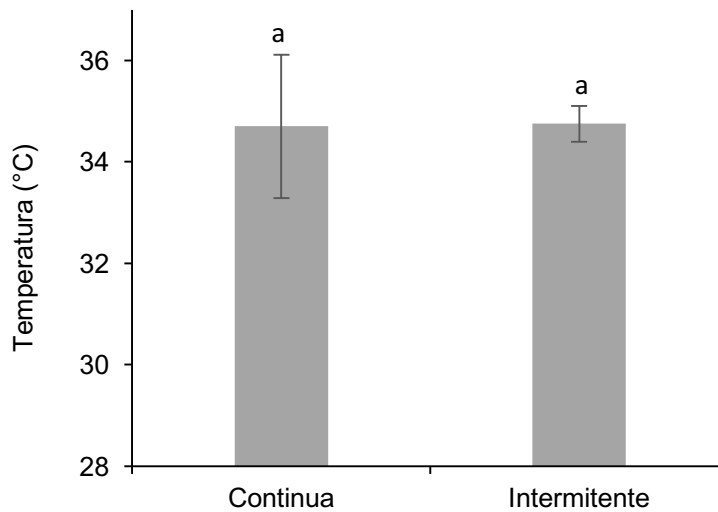
---

---

### 8.2.5. Efecto de la frecuencia de agitación sobre el crecimiento y la producción de enzimas en BHA

Una vez determinadas las mejores condiciones de cultivo con lirio acuático (30°C, 65 % de humedad y NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) se evaluó el efecto de la agitación continua e intermitente en los BHA a 1 rpm, ya que fue la tasa de agitación en la cual no se afectó negativamente el crecimiento y se mejoró la actividad xilanasa (estudios con aserrín). Para determinar el tiempo de agitación, para la condición intermitente, se utilizó el tiempo de duplicación calculado a partir del modelo exponencial, considerando la  $\mu_{CO_2}$  de 0.3 h<sup>-1</sup> obtenida a 30°C con aserrín de pino en BTE, se determinó un tiempo de 2.3 h. Con base en lo anterior, la agitación intermitente fue establecida a 1 rpm durante 1 minuto cada 2.3 h.

En la Figura 19 se presentan los valores máximos de temperatura obtenidos en cada condición de agitación evaluada (continua e intermitente). En ambos casos, la máxima temperatura fue de 34.7°C, sin embargo, dichos valores se obtuvieron en diferentes tiempos del cultivo: 48 y 64 h para agitación continua e intermitente, respectivamente. Estos tiempos coinciden con los tiempos en los que se obtuvieron los valores máximos de tasa de producción de CO<sub>2</sub> (Figura 20a y 20b) además, la máxima temperatura alcanzada en ambos estudios (continua e intermitente) no presentó efecto negativo sobre el crecimiento de *T. harzianum* PBLA, debido a que esta temperatura (34.7°C) estuvo dentro del rango de temperatura evaluado (28 – 36°C, sección 8.2.2) en el cual, se demostró que, en el intervalo evaluado no se presentaron diferencias significativas sobre la producción de CO<sub>2</sub>.

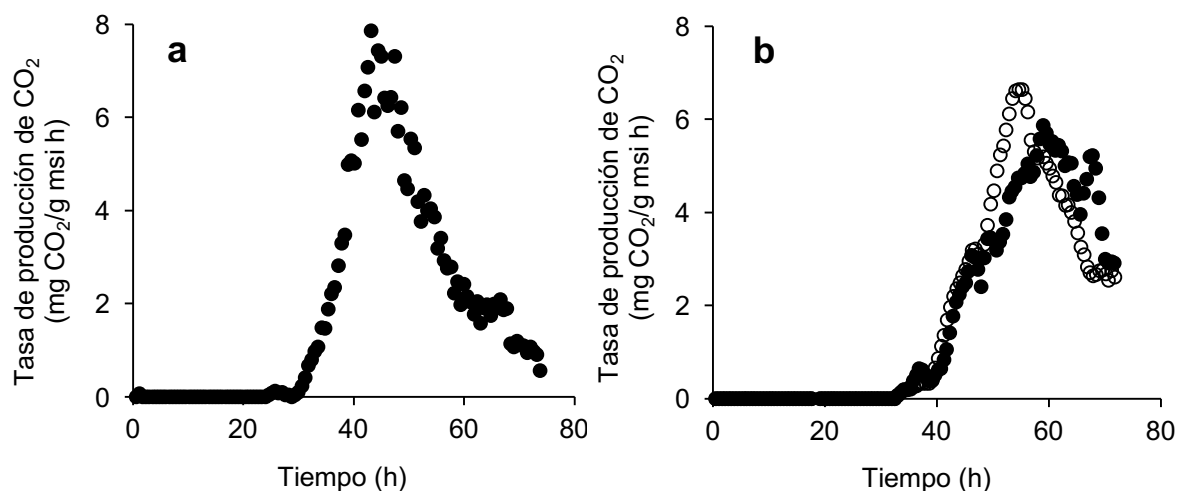


**Figura 19.** Valores máximos de temperatura medidas en el lecho del BHA para una agitación continua e intermitente registradas a las 48 y 64 h respectivamente en FES por *T. harzianum* PBLA.

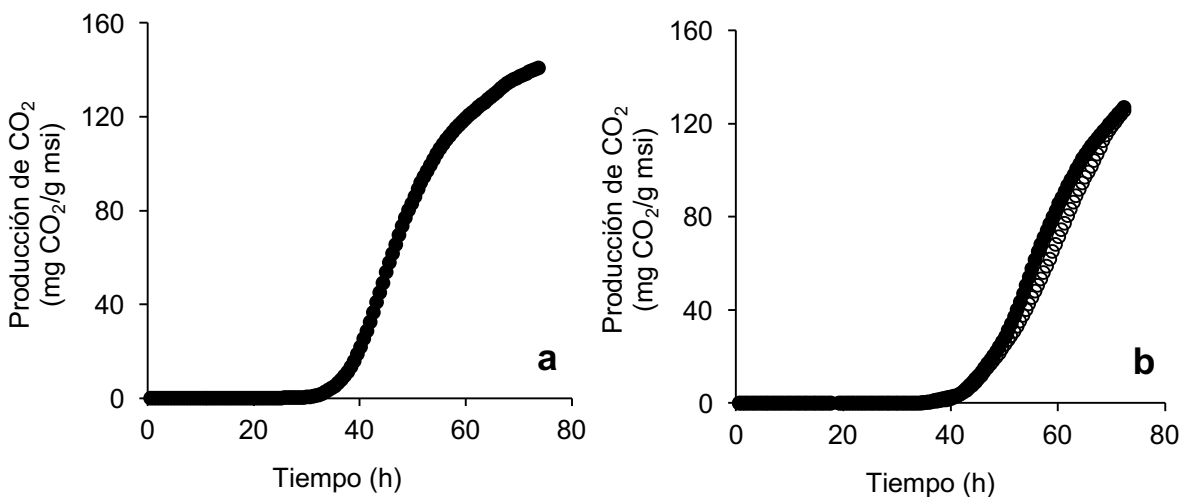
Finkler *et al.* (2017) evaluaron el efecto de agitación intermitente en la producción de pectinasas por *A. niger* en FES en un biorreactor de lecho empacado de escala piloto, agitado a 5 rpm durante dos minutos en diferentes tiempos; la agitación se llevó a cabo mediante rotación alrededor del eje central del biorreactor. La aplicación de la agitación intermitente minimizó la aglomeración, y además, los valores máximos de temperatura obtenidos en estas condiciones fueron menores que los obtenidos bajo condiciones sin agitación. La temperatura del aire en la entrada se mantuvo alrededor de 30°C, y se registró una temperatura máxima de 41°C en la fermentación sin agitación, mientras que en las fermentaciones con agitación intermitente se alcanzaron 35°C. En este estudio se observó que el incremento en la temperatura del lecho fue independiente de la frecuencia de agitación, esto debido a que previamente se determinó la tasa de agitación (sección 8.1.3) que no afectara el crecimiento del microorganismo, además que, con este tipo de BHA, la máxima temperatura alcanzada se encontró dentro del rango en el cual el hongo puede desarrollarse (28 - 36°C).

En las Figuras 20 y 21 se presentan los perfiles de la tasa máxima y máxima producción de CO<sub>2</sub>, donde se observó que los máximos valores obtenidos fueron

7.87 y 6.25 mg CO<sub>2</sub>/g msi h para agitación continua e intermitente, respectivamente. La tasa de producción de CO<sub>2</sub> con agitación continua fue 1.2 veces mayor que con una agitación intermitente. Con agitación continua, la máxima tasa de producción de CO<sub>2</sub> se obtuvo 11 h antes que la máxima tasa de producción de CO<sub>2</sub> con agitación intermitente. De igual manera, la máxima producción de CO<sub>2</sub> fue 1.2 veces mayor con agitación continua con respecto a la agitación intermitente (155 y 126.48 mg CO<sub>2</sub>/ g msi). El  $t_{Lag}$  (Tabla 12) para la agitación continua tuvo una diferencia de 4 h menos que la agitación intermitente. La  $\mu_{CO_2}$  fue 1.8 veces mayor con agitación continua, lo que indica que el crecimiento fue más rápido.



**Figura 20.** Tasa de producción de CO<sub>2</sub> en FES con lirio acuático por *T. harzianum* PBLA a 30°C durante 72 h bajo diferentes frecuencias de agitación. a) Continua (un BHA), b) Intermitente (dos BHA).



**Figura 21.** Producción de CO<sub>2</sub> en FES con lirio acuático por *T. harzianum* PBLA a 30 °C durante 72 h bajo diferentes frecuencias de agitación. a) Continua (un BHA), b) Intermitente (dos BHA).

**Tabla 12.** Parámetros asociados a la producción de CO<sub>2</sub>; tasa máxima de producción de CO<sub>2</sub> ( $T_{\max}PCO_2$ ), producción máxima de CO<sub>2</sub> ( $P_{\max}CO_2$ ), tiempo *Lag* ( $t_{Lag}$ ) y tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> ( $\mu_{CO_2}$ ), evaluados en BHA en FES con *T. harzianum* PBLA con lirio acuático bajo diferente frecuencia de agitación (continua e intermitente).

Frecuencia de agitación	$T_{\max}PCO_2$ (mg CO <sub>2</sub> /g msi h)	$P_{\max}CO_2$ (mg CO <sub>2</sub> /g msi)	$t_{Lag}$ (h)	$\mu_{CO_2}$ (h <sup>-1</sup> )
Continua*	7.87	148.80	30.23	0.25
Intermitente <sup>+</sup>	6.25 ± 0.54	126.48 ± 1.03	34.49 ± 1.44	0.14 ± 0.03

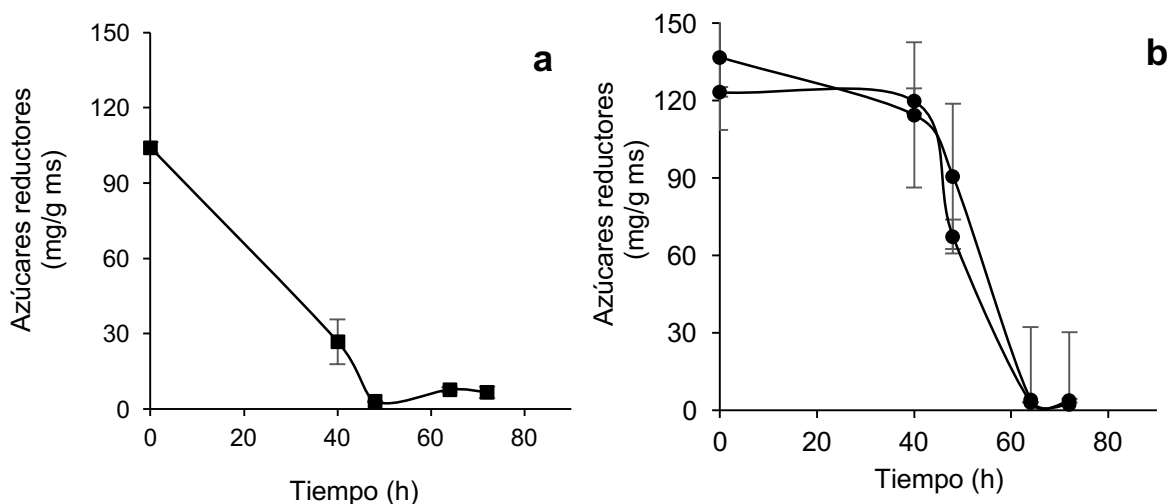
\*Un BHA

+Dos BHA

Varios estudios han demostrado que el lecho de sustrato sólido puede mezclarse continuamente sin efectos perjudiciales. Por ejemplo, Oostra *et al.* (2000) encontraron que un mezclado continuo a 0.2 rpm, no impidió la formación de esporas de *Coniothyrium minitans* cultivadas en granos de avena. Nagel *et al.* (2001) estudiaron el mezclado continuo a 2.5 rpm en FES con granos de trigo y *A. oryzae*, llegaron a la conclusión de que el mezclado continuo mejoró el control del proceso, ya que permitió la adición y distribución de agua durante la fermentación, reduciendo los gradientes en el lecho y mejorando la transferencia de calor hacia la

pared del fermentador. Schutyser *et al.* (2003a) observaron que un mezclado discontinuo o intermitente a permite el desarrollo de hifas aéreas provocando la agregación de partículas debida a la formación de enlaces entre las mismas. Por esta razón, los parámetros asociados con la producción de CO<sub>2</sub> fueron mayores al utilizar agitación continua, permitiendo una mejor transferencia de calor y oxígeno en el BHA, favoreciendo de esta manera el crecimiento de *T. harzianum*.

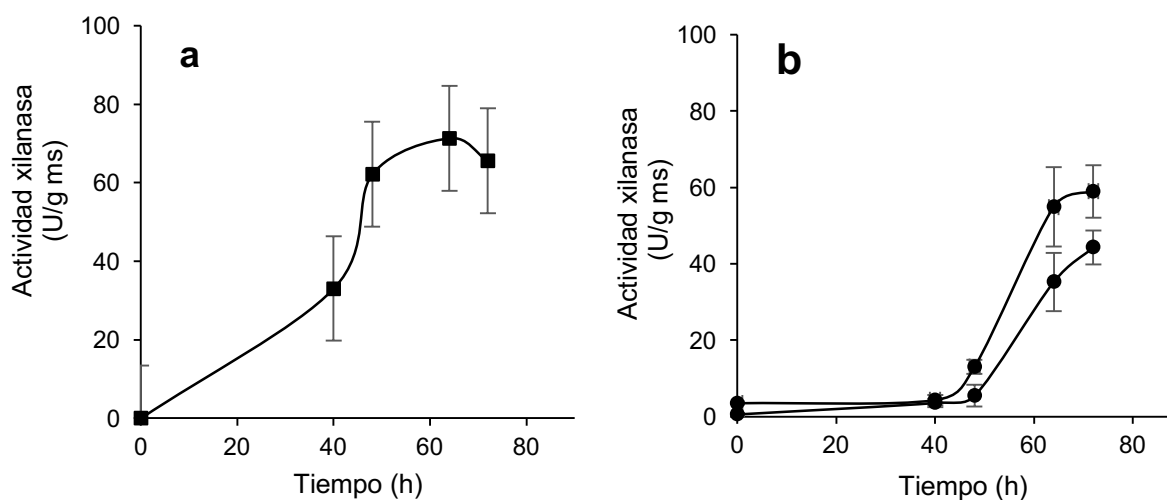
La diferencia en la rapidez del crecimiento también se observó en el consumo de azúcares reductores (Figura 22 a y b). A pesar de que hubo una diferencia de 25.86 mg/g ms en la concentración de azúcares reductores inicial, para las condiciones de agitación continua, el consumo fue mayor y más rápido, ya que a las 40 h de cultivo el consumo fue del 74.29%. Y para la condición intermitente, considerando el mismo tiempo (40 h) sólo se consumió el 7.82 %, lo que se relaciona con las diferencias en la obtención de los máximos valores de la producción de CO<sub>2</sub>, así como en la producción de xilanasas.



**Figura 22.** Consumo de azúcares reductores en FES con lirio acuático por *T. harzianum* PBLA a 30 °C durante 72 h bajo diferentes frecuencias de agitación. a) Continua (un BHA), b) Intermitente (dos BHA).

En la Figura 23 a y b se observa que la actividad xilanasa fue mayor bajo condiciones de agitación continua ( $69.17 \pm 6.79$  U/g ms), con una diferencia de

10.74 U/g ms con respecto a la agitación intermitente. El tiempo en el cual se obtuvo la mayor actividad fue a partir de las 48 h y 64 h para agitación continua e intermitente, respectivamente. La mayor actividad con agitación continua corrobora los resultados obtenidos con los BHA y aserrín, ya que se favorece la aireación en el lecho del biorreactor, evitando la formación de aglomerados. Sin embargo, la actividad obtenida con lirio acuático fue 1.6 veces menor que la obtenida con aserrín de pino. Esta diferencia puede atribuirse a la estructura del soporte, ya que el lirio suele tener una estructura más blanda que el aserrín, lo que pudo afectar la porosidad del lecho, teniendo un sistema menos aireado en comparación con los ensayos con aserrín.



**Figura 23.** Actividad xilanasa obtenida en FES con lirio acuático por *T. harzianum* PBLA a 30°C durante 72 h con diferentes frecuencias de agitación. a) Continua (un BHA), b) Intermitente (dos BHA).

En cuanto a la actividad celulasa, la máxima actividad obtenida fue entre 3 y 4 U/g ms para condiciones de agitación continua e intermitente, respectivamente. Esta actividad enzimática (3 y 4 U/g ms) comparada con la obtenida con aserrín, tuvo un aumento de 1 y 2 unidades, sin embargo, el comportamiento fue similar al obtenido con aserrín, ya que el uso de la agitación (independientemente de la tasa de agitación) tuvo un efecto negativo sobre la actividad. Se observó una disminución del 82 % respecto a la máxima actividad obtenida bajo condiciones estáticas en

---

---

BTE. El cambio de aserrín a lirio sólo se favoreció bajo condiciones estáticas, ya que hubo un aumento del doble de actividad.

Flodman y Nouredini (2013) evaluaron el efecto de la agitación sobre la producción de celulasas por *T. reesei* en FES con granos de maíz, en matraces Erlenmeyer agitados a 2000 rpm durante 30 s con frecuencias de 0, 1, 2, 3 y 6 d<sup>-1</sup>; (donde 0 es sin agitación y 1, 2, 3 y 6 corresponde al número de veces que fueron agitados por día) la mayor actividad celulasa (12.5 FPU/g ms) fue obtenida bajo condiciones estáticas a las 138 h del cultivo. La actividad celulasa en los sistemas agitados varió entre 11.2 a 11.8 FPU/g ms a las 113 h del cultivo. Los autores indican que la producción de celulasas se favorece bajo condiciones estáticas. Cassaro *et al.* (2015) evaluaron el efecto de agitación intermitente en la producción de celulasas y xilanasas por *T. reesei* en FES con una mezcla de salvado de trigo y bagazo de caña; los ensayos se realizaron en matraces Erlenmeyer agitados a 10 rpm cada 2 h y en condiciones estáticas. Bajo condiciones estáticas, los valores máximos de actividad fueron 51.25 y 654.79 U/g msi para celulasa y xilanasas, respectivamente; para condiciones con mezclado intermitente, los máximos valores de actividad fueron 49.65 y 918.08 U/g msi para celulasa y xilanasas, respectivamente. La disminución en la actividad celulasa se atribuyó a los daños mecánicos causados por la agitación sobre las hifas, propiciando la ruptura de las mismas o bien resultaron comprimidas cuando se compactó el sustrato, de esta manera se modificó la porosidad dando como resultado la dificultad en la captación de oxígeno. Sin embargo, la disminución en la actividad celulasa producida por *T. reesei* pudo deberse a la desactivación de la enzima por las fuerzas de cizallamiento (Gunjekar *et al.* 2001).

Díaz *et al.* (2009) evaluaron el efecto de la agitación continua e intermitente, en la producción de celulasas y xilanasas por *A. awamori* por FES, en frascos de vidrio de 7 cm de diámetro; la agitación se llevó a cabo mediante un sistema de 5 cilindros que rotan continuamente. Las frecuencias de agitación para la condición intermitente fueron: una agitación de 1 min por día y 2 agitaciones de 10 min por día. Los valores máximos de actividad enzimática fueron 52 y 4 U/g msi para

---

---

xilanasas y celulasas bajo condiciones estáticas, y para agitación continua e intermitente, los valores de actividad fueron similares (aproximadamente 46 y 2 U/g msi para xilanasas y celulasas, respectivamente). Ellos atribuyen la disminución de la actividad enzimática a daños al microorganismo debido a los esfuerzos de corte por la agitación.

En la Tabla 13 se muestra una comparación de los resultados obtenidos en este trabajo (valores máximos obtenidos de actividad celulasas y xilanasas en BHA) con resultados de la literatura. En algunos casos, nuestros resultados fueron menores que los reportados en la literatura, sin embargo, la actividad de las enzimas varía según el sustrato utilizado y el tipo de microorganismo además, de las diferentes técnicas utilizadas para la cuantificación de la actividad. La mayoría de los trabajos utilizaron tambores rotarios, que como bien se sabe, este tipo de sistemas presenta algunos inconvenientes con la agitación, debido a la formación de aglomerados. Lo anterior tiene como consecuencia una deficiencia en la transferencia de calor y masa, en contraste con el sistema de agitación utilizado en este trabajo, que permitió un mezclado adecuado, favoreciendo la aireación del lecho (reflejado en el aumento en la actividad xilanasas con aserrín) sin afectar el crecimiento del hongo.



**Tabla 13.** Actividades celulasas y xilanasas obtenidas en diferentes tipos de biorreactores. CMCasa: Carboximetilcelulasa BG: beta-glucosidasa FPasa: actividad sobre papel filtro

Referencia	Kalogeris et al. 2003	Díaz et al. 2009	Alam et al. 2009	Ortiz et al. 2015	Este trabajo
<b>Tipo de biorreactor</b>	Tambor rotatorio	Tambor rotatorio	Tambor rotatorio	Tambor rotatorio	Tanque horizontal con agitación tipo flujo cruzado
<b>Volumen (L)</b>	10	0.25	50	-	6
<b>Agitación</b>	Intermitente	Continuo, intermitente	Continuo, 10 rpm	Continuo, 2 rpm	Continuo, 1 rpm
<b>Sustrato</b>	Paja de trigo	Orujo de uva	Racimos de palma	Residuos agro-industriales	Aserrín de pino / lirio acuático
<b>Microorganismo</b>	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Trichoderma harzianum</i> PBLA
<b>Actividad enzimática (U/g ms)</b>					
<b>CMCasa</b>	1709	3.69	-	11.5	0.79 / 3
<b>BG</b>	79	-	-	-	
<b>FPasa</b>	5.48	-	10.1	6.5	
<b>Xilanasa</b>	4490	54.42	-	-	109.32 / 69.17

---

---

## 9. Conclusiones

Los estudios con BTE bajo condiciones isotérmicas permitieron definir que el intervalo de temperatura óptimo para el crecimiento y producción de xilanasas y celulasas por *T. harzianum* PBLA fue entre 26 y 36°C con aserrín de pino y entre 28 y 34°C con lirio acuático.

Se confirmó que la acumulación de calor metabólico en la FES se incrementa con el aumento del diámetro del BTE, obteniendo una temperatura máxima de 34.6°C con un BTE de 4.2 cm de diámetro interno.

Las mejores condiciones para la producción de xilanasas y celulasas con *T. harzianum* PBLA mediante FES con lirio acuático fueron 65 % de humedad y nitrato de amonio como fuente de nitrógeno.

La agitación a bajas tasas (0.5 y 1 rpm), permitió el crecimiento del hongo y el aumento en la producción de xilanasas, a diferencia de las condiciones estáticas (BTE). Una agitación continua permitió un mejor crecimiento del hongo, en contraste con las condiciones intermitentes. Aunque se favoreció la producción de xilanasas, la producción de celulasas se vio afectada negativamente.

El uso de un BHA con agitación tipo flujo cruzado, es un sistema con amplio potencial para la producción de xilanasas utilizando residuos agroindustriales. La flexibilidad para su control, permite evaluar diferentes tasas y frecuencias de agitación, tales que favorezcan el desarrollo de hongos filamentosos de interés.

Para trabajos futuros, se propone evaluar el efecto de la agitación sobre la expresión de celulasas como; exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas, de esta manera, se evaluaría la producción de un complejo enzimático que sea capaz de hidrolizar completamente la celulosa hasta glucosa.

Se propone evaluar diferentes flujos de aire en combinación con diferentes tasas de agitación para evaluar el crecimiento y producción de enzimas.

---

---

Se propone, el uso de un pretratamiento sobre aserrín, sabiendo que los pretratamientos con ácido diluidos, modifican la estructura de la biomasa lignocelulósica, dejando a la celulosa más disponible para los microorganismos.

También, se podrían evaluar diferentes composiciones de medio, principalmente cuando se haga uso de residuos orgánicos, evaluar el uso de la fuente de carbono (con y sin glucosa).

Finalmente, para corroborar los daños en la integridad del micelio, podrían complementarse los estudios con el uso de microscopía electrónica o confocal.

---

---

## 10. Referencias

Adav S.S. y Sze S. K. 2014. "*Trichoderma* Secretome: An Overview". *Biotechnology and Biology of Trichoderma* 103-112.

Aguilar, C. N., Augur C., Favela-Torres E., y Viniegra-González G. 2001. "Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid-state fermentation: Influence of glucose and tannic acid". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26:296–302.

Ahamed A. y Vermette P. 2010. "Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube airlift bioreactor". *Biochemical Engineering Journal* 49:379–87.

Alam Md Z., Abdullah A. M., Qudsieh I.Y., Muyibi S.A., Salleh H.M., y Nor M.O. 2009. "Solid state bioconversion of oil palm empty fruit bunches for cellulase enzyme production using a rotary drum bioreactor". *Biochemical Engineering Journal* 46(1):61–64.

Anwar Z., Gulfranz M., y Irshad M. 2014. "Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review". *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* 7(2):163–73.

Argumedo-Delira, R., Alarcón A., Ferrera-Cerrato R., y Peña-Cabriales J.J. 2009. "El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos". *Revista Internacional de Contaminación Ambient* 25:257–69.

Arora S., Dubey M., Singh P., Rani R., y Ghosh S. 2017. "Effect of mixing events on the production of a thermo-tolerant and acid-stable phytase in a novel solid-state fermentation bioreactor". *Process Biochemistry* 61:12–23.

---

---

Asgher M., Bashir F, y Nasir Iqbal H.M. 2014. "A comprehensive ligninolytic pre-treatment approach from lignocellulose green biotechnology to produce bio-ethanol". *Chemical Engineering Research and Design* 92:1571–78.

Ashok A., Doriya K., Mohan Rao D.R, y Santhosh Kumar D. 2017. "Design of solid-state bioreactor for industrial applications: An overview to conventional bioreactors". *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 9:11–18.

Auxefans T., Buchoux S., Larcher D., Husson G., Husson E., y Sarazin C. 2014. "Enzymatic saccharification and structural properties of industrial wood sawdust: Recycled ionic liquids pretreatments". *Energy Conversion and Management* 88:1094-1103.

Babbar N., y Oberoi H. S. 2014. "Enzymes in value-addition of agricultural and agro-industrial residues". *Waste and waste management* 29-50.

Bharti A.K., Kumar A., Kumar A., y Dutt D. 2018. "Wheat bran fermentation for the production of cellulase and xylanase by *Aspergillus niger* NFCCI 4113". *Research Journal of Biotechnology* 13:11-18.

Bayrakci AG., y Kocar G. 2014. "Second-generation bioethanol production from water hyacinth and duckweed in Izmir: A case study". *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 30:306-316.

Brijwani K., Vadlani P.V., Hohn K.L., y Maier D.E. 2011. "Experimental and theoretical analysis of a novel deep-bed solid-state bioreactor for cellulolytic enzymes production". *Biochemical Engineering Journal* 58:110–23.

Butt M.S., Thair Nadeem M., Ahmad Z., y Sultan M.T. 2008. "Xylanases and their applications in baking industry". *Food Technology and Biotechnology* 46:22-31.

Cassaro E.G., Fonseca R.F., y Farinas C.S. 2015. "Assessment of the effects of intermittent mixing on solid-state fermentation for biomass-degrading enzymes production by different fungal strains". *Journal of Bioprocessing and Chemical Engineering* 3:1-7.

---

---

Chen H., Qin L., y Li H. 2014. "Influence of forced internal air circulation on airflow distribution and heat transfer in a gas double-dynamic solid-state fermentation bioreactor". *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172:2218–2226.

Chen H.Z., Xu J, y Li Z.H. 2005. "Temperature control at different bed depths in a novel solid-state fermentation system with two dynamic changes of air". *Biochemical Engineering Journal* 23:117–122.

Chen H.Z., y He Q. 2012. "Value-added bioconversion of biomass by solid-state fermentation". *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 87:1619–25.

Collins T., Gerday C., y Feller G. 2005. "Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases". *FEMS Microbiology Reviews*. 29:3-23.

Couto R.S., y Sanromán M.A. 2006. "Application of solid-state fermentation to food industry-A review". *Journal of Food Engineering* 76:291–302.

Cunha F.M., Esperança M.N., Florencio C., Vasconcellos V.M., Farinas C.S., y Badino A.C. 2015. "Three-phasic fermentation systems for enzyme production with sugarcane bagasse in stirred tank bioreactors: Effects of operational variables and cultivation method". *Biochemical Engineering Journal* 97:32–39.

Daâssi D., Zouari-Mechichi H., Frikha F., Rodríguez-Couto S., Nasri M., y Mechichi T. 2016. "Sawdust waste as a low-cost support-substrate for laccases production and adsorbent for azo dyes decolorization". *Journal of Environmental Health Science and Engineering* 14:1–12.

De Castro Soares R.J., y Sato H.H. 2015. "Enzyme production by solid state fermentation: general aspects and an analysis of the physicochemical characteristics of substrates for agro-industrial wastes valorization". *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3(4):236–45.

De Castro, A. M., Pedro K.C., da Cruz J.C., Ferreira M.C., Leite S.G., y Pereira N.Jr. 2010. "High-yield endoglucanase production by *Trichoderma harzianum* IOC-3844

---

---

cultivated in pretreated sugarcane mill byproduct”. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162(7):2111–22.

Delabona Pda S., Cota J, Hoffmam Z.B., Paixão D.A., Farinas C.S., Cairo J.P., Lima D.J., Squina F.M., Ruller R, y Pradella J.G. 2013. “Understanding the cellulolytic system of *Trichoderma harzianum* P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and  $\alpha$ -l-arabinofuranosidase”. *Bioresource Technology* 131:500–507.

Delabona Pda 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., Roussos S. 1985. “Cellulase production by *Trichoderma harzianum* in static and mixed solid-state fermentation reactors under nonaseptic conditions”. *Biotechnology and Bioengineering*. 27:1385-1388.

Díaz, A.B., de Ory, I., Caro, I., Blandino, A., 2009. “Solid state fermentation in a rotating drum bioreactor for the production of hydrolytic enzymes”. *Chemical Engineering Transaction* 17:1041-1046.

Fanaei M.A., y Vaziri B.M. 2009. “Modeling of temperature gradients in packed-bed solid-state bioreactors”. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 48:446–451.

Farinas S.C. 2015. “Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector”. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 52:179–188.

Felse A.P., y Panda T. 2000. “Submerged culture production of chitinase by *Trichoderma harzianum* in stirred tank bioreactors - the influence of agitator speed”. *Biochemical Engineering Journal* 4:115–120.

---

---

Finkler A.T.J., Biz A., Pitol L.O., Medina B.S., Luithardt H., de Lima Luz L.F.Jr., Krieger N., y Mitchell D.A. 2017. "Intermittent agitation contributes to uniformity across the bed during pectinase production by *Aspergillus niger* grown in solid-state fermentation in a pilot-scale packed-bed bioreactor". *Biochemical Engineering Journal* 121:1-12.

Flodman H. R., y Nouredini H. 2013. "Effects of intermittent mechanical mixing on solid-state fermentation of wet corn distillers grain with *Trichoderma reesei*". *Biochemical Engineering Journal* 81:24–28.

Fregoso-Madueño J.N., Goche-Télles J.R., Rutiaga-Quiñones J.G., González-Laredo R.F., Bocanegra-Salazar M., y Chávez-Simental J.A. 2017. "Alternative uses of sawmill industry waste". *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 23:243–260.

Gabelle J.C., Jourdir E., Licht R.B., Chaabane F.B., Henaut I., Morchain J., y Augier F. 2012. "Impact of rheology on the mass transfer coefficient during the growth phase of *Trichoderma reesei* in stirred bioreactors". *Chemical Engineering Science* 75:408–417.

Gamarra N.N., Gretty K.V., y Gutiérrez-Correa M. 2010. "Cellulase production by *Aspergillus niger* in biofilm, solid-state, and submerged fermentations". *Applied Microbiology and Biotechnology* 87:545–551.

Ganguly A., Chatterjee P.K., y Dey A. 2012. "Studies on ethanol production from water hyacinth-A review" *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16:966-972.

Ghildyal N.P., Gowthaman M.K., Raghava Rao K.S.M.S., y Karanth N.G., 1994. "Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed-bed solid-state fermentors: Effect of temperature gradients". *Enzyme and Microbial Technology* 16:253–257.



---

---

Goyal M., Kalra K.L., Sareen V.K., y Soni G. 2008. "Xylanase production with xylan rich lignocellulosic wastes by a local soil isolate of *Trichoderma viride*". Brazilian Journal of Microbiology 39:535–541.

Gunjekar T.P., Sawant S.B., y Joshi J.B. 2001. "Shear deactivation of cellulase, exoglucanase, endoglucanase, and  $\beta$ -glucosidase in a mechanically agitated reactor". Biotechnology Progress 17:1166–1168.

Gupta V.K. 2016. "New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering". Aspergillus System Properties and Applications First Edition.155-190.

Gutiérrez-Rojas M., Hosn S.A., Auria R., Revah S., y Favela-Torres E. 1995. "Heat transfer in citric acid production by solid state fermentation". Process Biochemistry 31:363-369.

Hamidi-Esfahani Z., Shojaosadati S.A., y Rinzema A. 2004. "Modelling of simultaneous effect of moisture and temperature on *A. niger* growth in solid-state fermentation". Biochemical Engineering Journal 21:265–272.

Haq, I., Shahzadi, K., Hameed, U., Javed, M.M., Qadeer, M.A. 2006. "Solid-state fermentation of cellulases by locally isolated *Trichoderma harzianum* for the exploitation of agricultural byproducts". Pakistan Journal of Biological sciences 9:1779-1782.

Harun M.Y., Dayang Radiah A.B., Zainal Abidin Z., y Yunus R. 2011. "Effect of physical pretreatment on dilute acid hydrolysis of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*)". Bioresource Technology 102:5193-5199.

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.

Jecu L. 2000. "Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production" Industrial Crops and products 11:1-5.

---

---

Jorgensen H., y Olsson L. 2006. "Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888-Effect of substrate on hydrolytic performance". *Enzyme and Microbial Technology* 38:381-390.

Juárez-Luna N.G. 2014. "Efecto de la agitación sobre la producción de CO<sub>2</sub> por hongos septados (*Aspergillus versicolor*) y no septados (*Rhizopus microsporus*) en cultivo en medio sólido". Tesis de maestría. Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa.

Juturu V., y Wu J.C. 2012. "Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications". *Biotechnology Advances* 30:1219–1227.

Juturu V., y Wu J.C. 2014. "Microbial cellulases: Engineering, production and applications". *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 33:188–203.

Kalogeris E., Iniotaki F., Topakas E., Christakopoulos P., Kekos D., y Macris B.J. 2003. "Performance of an intermittent agitation rotating drum type bioreactor for solid-state fermentation of wheat straw". *Bioresource Technology* 86:207–213.

Kar S., Gauri S.S., Das A., Jana A., Maity C., Mandal A., Das Mohapatra p.K., Pati B.R., y Mondal K.C. 2013. "Process optimization of xylanase production using cheap solid substrate by *Trichoderma reesei* SAF3 and study on the alteration of behavioral properties of enzyme obtained from SSF and SmF". *Bioprocess and Biosystems Engineering* 36:57–68.

Kaushal R., Sharma N., y Tandon D. 2012. "Cellulase and xylanase production by co-culture of *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum* utilizing forest waste". *Turkish Journal of Biochemistry* 37:35-41.

Kilikian B.V., Afonso L.C., Souza T.F.C., Ferreira R.G., y Pinheiro I.R. 2014. "Filamentous fungi and media for cellulase production in solid state cultures". *Brazilian Journal of Microbiology* 45(1):279–286.

Krishna C. 2005. "Solid-state fermentation systems - An overview". *Critical Reviews in Biotechnology* 25:1–30.

---

---

Kuhad R.C., Deswal D., Sharma S., Bhattacharya A., Kumar K.J., Kaur A., Pletschke B.I., Singh A., y Karp M. 2016. "Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges". *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 55:249–272.

Kumar B.A., Amit K., Alok K., y Dharm D. 2018. "Wheat bran fermentation for the production of cellulase and xylanase by *Aspergillus niger* NFCCI 4113". *Research Journal of Biotechnology* 13:11–18.

Lee C.K., Darah I., y Ibrahim C.O. 2017. "Efficiency of developed solid state bioreactor 'FERMSOSTAT' on cellulolytic and xylanase enzymes production". *Sains Malaysiana* 46:1249-1257.

Lee S. K., Lee H. J., Min H. Y., Park E. J., Lee K. M., Ahn Y. H., Cho Y. J. and Pyee J. H. 2005. "Antibacterial and antifungal activity of pinosylvin, a constituent of pine". *Fitoterapia* 76:258-260.

Liu Q., Luo L., y Zheng L. 2018. "Lignins: Biosynthesis and Biological Functions in Plants". *International Journal of Molecular Sciences* 19:(2).

Luedeking R., y Piret E.L. 1959. "A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controllet pH". *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering* 1:393–412.

Malik A. 2007. "Environmental challenge vis a vis opportunity: The case of water hyacinth". *Environment International* 33:122–138.

Manan M.A. y Webb C. 2017. "Desing aspects of solid-state fermentation as applied to microbial bioprocessing". *Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering* 4.

Mansour A.A., Arnaud T., Lu-Chau T.A., Fdz-Polanco M., Moreira M.T., y Cacho Rivero J.A. 2016. "Review of solid-state fermentation for lignocellulolytic enzyme production: challenges for environmental applications". *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 15:31–46.

---

---

Martínez B., Infante D., y Reyes Y. 2013. “*Trichoderma spp.* y su función en el control de plagas en los cultivos”. *Revista Protección Vegetal* 28:1-11.

Martínez-López Y., Fernandez-Concepción R.R., Álvarez-Lazo D., García-Gonzalez M., y Rodríguez Álvarez R. 2012. “Perspectivas para la utilización de aserrín en la producción de tableros madera plástico con propiedades ignífugos”. *Revista Avances* 14:120-129.

Marx I.J., Wyk N.V., Smit S., Jacobson D., Viljoen-Bloom M, y Volschenk H. 2013. “Comparative secretome analysis of *Trichoderma asperellum* S4F8 and *Trichoderma reesei* Rut C30 during solid-state fermentation on sugarcane bagasse”. *Biotechnology for Biofuels* 6:1–13.

Mateo-Sánchez J.M., Cobos-Peralta M.A., Trinidad-Santos A., Cetina-Alcalá V., y Vargas-Hernández J. 2002. “Aislamiento de bacterias rumiales degradadoras del aserrín” *Agrociencia* 36: 523-530.

Mekala N.K., Singhanía R.R., Sukumaran R.K., y Pandey A. 2008. “Cellulase production under solid-State fermentation by *Trichoderma reesei* RUT C30: Statistical optimization of process parameters”. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 15:122–131.

Miller L.G., Blum R., Glennon W.E., y Burton A.L. 1960. “Measurement of carboxymethylcellulase activity”. *Analytical Biochemistry* 1:127–132.

Mishima D., Tateda M., Ike M., y Fujita M. 2006. “Comparative study on chemical pretreatments to accelerate enzymatic hydrolysis of aquatic macrophyte biomass used in water purification processes”. *Bioresource Technology* 97:2166-2172.

Mitchell D. A., Von Meien O.F, Luiz F. L., y Berovič M. 2006. "Substrate, air, and thermodynamic parameters for SSF bioreactor models" *Solid-State Fermentation Bioreactors* 265-278.

Mitchell D.A., de Lima Luz L.F., Krieger N., y Berovič M. 2011. “Bioreactors for solid-state fermentation”. *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* 2:347–360.

---

---

Mohamed S.A., Al-Malki A.L., Khan J.A., Kabli S.A., y Al-Garni S.M. 2013. "Solid state production of polygalacturonase and xylanase by *Trichoderma species* using cantaloupe and watermelon rinds". *Journal of Microbiology* 51:605–611.

Nagel F.J.J.I., Tramper J., Bakker M.S.N., y Rinzema A. 2001. "Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation". *Biotechnology and Bioengineering* 72:219-230.

Nagel, F.J.J.I., Tramper, J., Bakker, M.S.N., Rinzema, A., 2000. "Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation". *Biotechnology and Bioengineering* 72:219-230.

Narra M., Divecha J., Shah D., Balasubramanian V., Vyas B., Harijan M., y MacWan K. 2017. "Cellulase production, simultaneous saccharification and fermentation in a single vessel: A new approach for production of bio-ethanol from mild alkali pre-treated water hyacinth". *Journal of Environmental Chemical Engineering* 5:2176–2181.

Narra M., Dixit G., Divecha J., Madamwar D., y Shah A.R. 2012. "Production of cellulases by solid state fermentation with *Aspergillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild alkali-treated rice straw". *Bioresource Technology* 121:355–361.

Oostra J., Tramper J., y Rinzema A. 2000. "Model-based bioreactor selection for large-scale solid-state cultivation of *Coniothyrium minitans* spores on oats". *Enzyme and Microbial Technology* 27:652–663.

Ortega-Martínez L.D., Sánchez-Olarte J., Díaz-Ruiz R., y Ocampo-Mendoza J. 2010. "Efecto de diferentes sustratos en el crecimiento de plántulas de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill)". *Ra Ximhai* 6:365–372.

Ortiz G.E., Guitart M.E., Cavalitto S.F., Alberto E.O., Fernández-Lahore M., y Blasco M. 2015. "Characterization, optimization, and scale-up of cellulases production by *Trichoderma reesei* cbs 836.91 in solid-state fermentation using agro-industrial products". *Bioprocess and Biosystems Engineering* 38:2117–2128.

---

---

Palonen H., Tjerneld F., Zacchi G., y Tenkanen M. 2004. "Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin". *Journal of Biotechnology* 107:65–72.

Pandey A., Selvakumar P., Soccol R. C., y Nigam P. 1999. "Solid state fermentation for the production of industrial enzymes". *Science and Technology* 77: 149-162

Pathak P., Bhardwaj N.K., y Singh A.K. 2014. "Production of crude cellulase and xylanase from *Trichoderma harzianum* PPDDN10 NFCCI-2925 and its application in photocopier waste paper recycling". *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172:3776–3797.

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 bioreactor". *Journal of Biotechnology*. 131S:133-187.

Piña-Guzmán A. B., Nieto Monteros D.A., y Robles-Martínez F. 2016. "Utilización de residuos agrícolas y agroindustriales en el cultivo y producción del hongo comestible seta (*Pleurotus spp.*)". *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 32:141–51.

Pirt, S.J., 1975. *Principles of microbe and cell cultivation*, Blackwell, Oxford

Raghavarao K.S.M.S., Ranganathan T.V., y Karanth N.G. 2003. "Some engineering aspects of solid-state fermentation". *Biochemical Engineering Journal* 13:127–135.

Raimbault M. 1998. "General and microbiological aspects of solid substrate fermentation". *Electronic Journal of Biotechnology* 1:114–140.

Reetha S., Bhuvaneshwari G., Selvakumar G., y Thamizhiniyan P. 2014. "Effect of temperature and pH on growth of fungi *Trichoderma harzianum*". *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences* 4:3287–3292.

Rodríguez Couto S., y Sanromán M.A. 2005. "Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production". *Biochemical Engineering Journal* 22:211–219.

---

---

Rodríguez-León J.A., Domenech F., León M., Méndez T., Rodríguez D.E., y Pandey A. 1999. "Production of spores of *Trichoderma harzianum* on sugar cane molasses and bagasse pith in solid state fermentation for biocontrol". *Brazilian Archives of Biology and Technology* 42:0.

Rubeena M., Neethu K., Sajith S., Sreedevi S., Priji P., Unni K.N., Sarath Josh M.K., Jisha V.N., Pradeep S., y Benjamin S. 2013. "Lignocellulolytic activities of a novel strain of *Trichoderma harzianum*". *Advances in Bioscience and Biotechnology* 4:214–21.

Saini A., Aggarwal N.K., y Yadav A. 2017. "Cost-effective cellulase production using *Parthenium hysterophorus* biomass as an unconventional lignocellulosic substrate". *Biotechnology*. 10.1007/s13205-017-0604-1.

Sánchez L.B.R., Khanahmadi M., y Mitchell D.A. 2006. "Continuous solid-state fermentation bioreactors". *Solid-state fermentation bioreactors: fundamentals of design and operation* 141-158.

Saucedo-Castañeda G., Trejo-Hernández M.R., Lonsane B.K., Navarro 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.

Schutyser, M.A.I., Weber F.J., Briels W.J., Rinzema A., y Boom R.M. 2003a. "Heat and water transfer in a rotating drum containing solid substrate particles". *Biotechnology and Bioengineering* 82:552–563.

Schutyser M.A.I., de Pagter P., Weber F.J., Briels W.J., Boom R.M., y Rinzema A. 2003b. "Substrate aggregation due to aerial hyphae during discontinuously mixed solid-state fermentation with *Aspergillus oryzae*: Experiments and modeling". *Biotechnology and Bioengineering* 83:503–513.

---

---

Shah A., Patel H., y Narra M. 2015. "Bioproduction of fungal cellulases and Hemicellulases Through Solid State Fermentation". In: Merillon JM., Ramawat K. (eds) Fungal Metabolites. Reference Series in Phytochemistry. Springer, Cham

Sindhu R., Binod P., Pandey A., Madhavan A., Alphonsa J.A., Vivek N., Gnansounou E., Castro E., y Faraco V. 2017. "Water hyacinth a potential source for value addition: An overview". *Bioresource Technology* 230:152–162.

Singh A., Shahid M., Srivastava M., Pandey S., Sharma A., y Kumar V. 2014. "Optimal physical parameters for growth of *Trichoderma species* at varying pH, temperature and agitation". *Virology and Mycology* 3:127

Soccol C.R., Ferreira da Costa E.S., Junior Letti L.A., Karp S.G., Woiciechowski A.L., y de Souza Vandenberghe L.P. 2017. "Recent developments and innovations in solid state fermentation". *Biotechnology Research and Innovation* 1:52–71.

Sun H, Ge X., Hao Z., y Peng M. 2010. "Cellulase production by *Trichoderma sp.* on apple pomace under solid state fermentation". *African Journal Biotechnology* 9:163–166.

Thomas L., Larroche C., y Pandey A. 2013. "Current developments in solid-state fermentation". *Biochemical Engineering Journal* 81:146-161.

Toquero C. y Bolado S. 2014. "Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing". *Bioresource Technology* 157:68–76.

Torres-Mancera M.T., Figueroa-Montero A., Favela-Torres E., Rosales-Zamora G., Madhavan Nampoothiri K., y Saucedo-Castañeda G. 2018. "Online monitoring of solid-state fermentation using respirometry" *Current developments in Biotechnology and Bioengineering* 97-108.

Toscano L., Montero G., Cervantes L., Stoytcheva M., Gochev V., y Beltrán M. 2013. "Production and partial characterization of extracellular lipase from *Trichoderma*



---

---

*harzianum* by solid-state fermentation". *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 27:3776–3781.

Uday U.S.P., Choudhury P., Bandyopadhyay T.K., y Bhunia B. 2016. "Classification, mode of action and production strategy of xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth". *International Journal of Biological Macromolecules* 82:1041–1054.

Vyas A., Vyas D., y Vyas K.M. 2005. "Production and optimization of cellulases on pretreated groundnut shell by *Aspergillus terreus* AV49". *Journal of Scientific and Industrial Research* 64:281-286.

Wittmann C., y Liao J.C. 2016. "Industrial-scale fermentation" *Biotechnology: Products and Processes* 3-47.

Wong K.H., Hynes M.J., Davis M.A. 2008. "Recent advances in nitrogen regulation: a comparison between *saccharomyces cerevisiae* and filamentous fungi" *American Society for Microbiology* 7:917-925.

Xia L., y Cen P. 1999. "Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry". *Process Biochemistry* 34:909–912.

Yazid N. A., Barrena R., Komilis D., y Sánchez A. 2017. "Solid-state fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: A review". *Sustainability* 9:1–28.

Yoon L. W., Ang T.N., Ngoh G.C., y May Chua A.S. 2014. "Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production". *Biomass and Bioenergy* 67:319–338.

Zhang J.D., y Yang Q. 2015. "Optimization of solid-state fermentation conditions for *Trichoderma harzianum* using an orthogonal test". *Genetics and Molecular Research* 14:1771–1781.

Zhao X., Huang X., Yao J., Zhou Y., y Jia R. 2014. "Fungal growth and manganese peroxidase production in a deep tray solid-state bioreactor, and in vitro

---

---

decolorization of poly R-478 by MnP”. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 25:803–813.

Zimbardi, A.L.R.L., Sehn C., Meleiro L.P., Souza F.H.M., Masui D.C., Nozawa M.S.F., Guimarães L.H.S, Jorge J.A., y Furriel R.P.M. 2013. “Optimization of  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -xylosidase and xylanase production by *Colletotrichum graminicola* under solid-state fermentation and application in raw sugarcane trash saccharification”. *International Journal of Molecular Sciences* 14:2875–2902.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00213

Matrícula: 2143808497

PRODUCCIÓN DE CELULASAS Y XILANASAS POR FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO EN BIORREACTORES DE ESCALA SEMIPILOTO.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 4 del mes de junio del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. TANIA LORENA VOLKE SEPULVEDA
- DR. QUENTIN CARBOUE
- DRA. ISABELLE PERRAUD-GAIME
- DR. JOSE ANTONIO MARTINEZ RUIZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

DE: NOHEMI LOPEZ RAMIREZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



*Noemi*  
NOHEMI LOPEZ RAMIREZ  
ALUMNA

REVISÓ

*[Signature]*  
MTRA. ROSALBA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

*[Signature]*  
DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

*[Signature]*  
DRA. TANIA LORENA VOLKE SEPULVEDA

VOCAL

*[Signature]*  
DR. QUENTIN CARBOUE

VOCAL

*[Signature]*  
DRA. ISABELLE PERRAUD-GAIME

SECRETARIO

*[Signature]*  
DR. JOSE ANTONIO MARTINEZ RUIZ