

“PRODUCCIÓN DE XILANASAS POR ASPERGILLUS SP. EN FERMENTACIÓN SUMERGIDA Y FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO”

UNIVERSIDAD IBEROAMERICANA

Estudios con Reconocimiento de Validez Oficial por Decreto Presidencial
del 3 de abril de 1981



“PRODUCCIÓN DE XILANASAS POR *ASPERGILLUS SP.* EN FERMENTACIÓN SUMERGIDA Y FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO”

TESIS

Que para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA QUÍMICA

Presenta

ANNY MILENA VÁSQUEZ VANEGAS

Asesores: **Mtra. Lorena Pedraza Segura (UIA)**

Dr. Ernesto Favela Torres (UAM-Iztapalapa)

Lector: **Dr. Rubén Moreno-Terrazas (UIA)**

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	i
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Polisacáridos de la pared celular vegetal	3
2.1.1 <i>Características estructurales de celulosa</i>	3
2.1.2 <i>Características estructurales de la Hemicelulosa</i>	4
2.1.3 <i>Características estructurales de la lignina</i>	5
2.2 Biodegradación enzimática de celulosa y hemicelulosa	6
2.2.1 <i>Degradación de celulosa y xiloglucanas</i>	6
2.3 Las xilanasas y su modo de acción	6
2.3.1 <i>Aplicaciones de las xilanasas</i>	7
2.3.2 <i>Factores que afectan los niveles de producción de xilanasas</i>	9
2.3.3 <i>Propiedades bioquímicas de las xilanasas</i>	9
2.4 Hongos filamentosos	10
2.5 Fermentación líquida	11
2.5.1 <i>Metabolismo aerobio y transferencia de oxígeno</i>	12
2.6 Fermentación sólida	13
2.7 Factores que afectan la producción de enzimas lignocelulolíticas	15
2.7.1 <i>El sustrato</i>	15
2.7.2 <i>El tamaño de la partícula</i>	15
2.7.3 <i>Humedad y actividad de agua</i>	16
2.7.4 <i>El pH y la temperatura</i>	16
2.8 Diferencias entre la fermentación en medio sólido y la fermentación en medio líquido	17
2.9 Diseño experimental	18
2.9.1 <i>Directrices para el diseño de experimentos</i>	19
2.9.2 <i>Selección del diseño experimental</i>	19
3. ANTECEDENTES	21
4. JUSTIFICACIÓN	24
5. OBJETIVOS	25
6. MATERIALES, METODOS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	26

6.1	Microorganismo	26
6.2	Sustratos	26
6.2.1	<i>Olote de maíz</i>	26
6.2.2	<i>Residuos de la central de abastos de México D.F.</i>	26
6.3	Medio de cultivo	27
6.4	Determinación de la velocidad radial de crecimiento y la densidad superficial	28
6.5	Fermentación líquida	29
6.6	Efecto de la temperatura y pH en las xilanasas producidas por <i>Aspergillus sp.</i> en fermentación sumergida	29
6.7	Estudios de producción de xilanasas bajo diferentes condiciones de cultivo	30
6.8	Determinación de la isoterma de desorción de agua, humedad crítica y actividad de agua en el soporte sólido	30
6.9	Fermentación sólida	30
6.10	Determinación de la biomasa en fermentación líquida.	31
6.11	Determinación de la biomasa en fermentación sólida	31
6.12	Obtención de los extractos enzimáticos	31
6.13	Determinación de actividad xilanasas	32
6.14	Análisis de proteínas	32
6.15	Diseño experimental Plackett-Burman	32
6.16	Diseño de cuadrados latinos	33
7.	RESULTADOS	35
7.1	Velocidad radial de crecimiento de <i>Aspergillus sp.</i>	35
7.2	Densidad superficial de <i>Aspergillus sp.</i> en medio YPD	38
7.3	Efecto de la temperatura y pH sobre las xilanasas producidas por <i>Aspergillus sp.</i> en fermentación sumergida.	39
7.3.1	<i>Estudio de la actividad a diferentes temperaturas</i>	39
7.3.2	<i>Estudio de la actividad a diferentes pH</i>	41
7.4	Estudios de producción de xilanasas bajo diferentes condiciones de cultivo	42
7.4.1	<i>Condición 1: variación de la relación C/N, 37 °C, 130 rpm, 72 horas de incubación y ensayo de actividad xilanólítica a 15 minutos.</i>	42
7.4.2	<i>Condición 2: variación de la relación C/N, 37°C, 130 rpm, 72 horas de incubación y experimentación a 30 minutos.</i>	43

7.5	Aplicación del diseño experimental Plackett-Burman	44
7.6	Diseño cuadrados latinos	48
7.6.1	<i>Fenómeno manifestado</i>	49
7.6.2	<i>Gran promedio</i>	50
7.6.3	<i>La influencia del pH</i>	50
7.6.4	<i>La influencia de la relación C/N</i>	50
7.6.5	<i>La influencia de la temperatura</i>	50
7.6.6	<i>Determinación de errores experimentales</i>	51
7.7	Evaluación cinética con las condiciones elegidas de los diseños experimentales en fermentación líquida	52
7.8	Fermentación en el reactor BIOFLO III de 3.3 L para la producción de xilanasas por <i>Aspergillus sp.</i>	53
7.9	Fermentación sólida en columnas utilizando como soporte sólido olote de maíz.	57
7.9.1	<i>Caracterización del olote, determinación de la isoterma de desorción de agua y humedad crítica</i>	57
7.9.2	<i>Fermentación sólida en columnas y matraces usando como soporte olote</i>	61
7.9.3	<i>Resumen de resultados asociados a la respirometría de <i>Aspergillus sp.</i> en cultivo en medio sólido con olote de maíz.</i>	62
7.10	Discusión final	64
8.	CONCLUSIONES	66
9.	RECOMENDACIONES	67
10.	BIBLIOGRAFÍA	68
11.	ANEXOS	76
Anexo1	76
	<i>Medición de actividad de xilanasas por medio de la liberación de azúcares reductores por ácido dinitrosalicílico (DNS; Miller, 1959)</i>	76
Anexo 2	77
	<i>Caracterización del olote de maíz, determinación de la isoterma de desorción de agua y humedad crítica</i>	77
Anexo 3	78
	<i>Tabla de datos para realizar la gráfica de a_w vs %H para la obtención de la isoterma de desorción de agua.</i>	78
Anexo 4	80
	<i>Fermentación sólida</i>	80

<i>I. Cálculos para determinar la cantidad de olote húmedo que se necesita para la fermentación en las columnas y los matraces.....</i>	80
<i>II. Preparación de las columnas y los matraces y puesta en marcha de la fermentación.....</i>	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Valores de K_{La} experimentales reportados para diferentes tipos de reactor (Mavituna y Sinclair, 1985)	13
Tabla 2.- Comparación entre la fermentación sumergida y la fermentación en soporte sólido	18
Tabla 3.- Composición elemental de hongos filamentosos, (Lilly, 1965; Aiba <i>et al</i> , 1973).....	27
Tabla 4.-Composición medio de cultivo	27
Tabla 5.- Composición de los elementos traza.....	28
Tabla 6.-Matriz experimental del diseño	33
Tabla 7.-Diseño experimental Plackett-Burman con N=8.....	33
Tabla 8.- Diseño cuadrado latino 3x3 elegido para el estudio.....	33
Tabla 9.- Ajuste lineal del crecimiento radial a diferentes temperaturas en medio YPD.....	35
Tabla 10.- Ajuste lineal del crecimiento radial a diferentes temperaturas en medio APD	36
Tabla 11.- Ajuste lineal del crecimiento radial a diferentes temperaturas en medio APD	36
Tabla 12.-Resultados para la condición 1	42
Tabla 13.-Resultados para la condición 2.....	43
Tabla 14.-Matriz experimental con los valores cualitativos y cuantitativos para cada factor.....	45
Tabla 15.- Diseño de cuadrados latinos escogido para evaluar la producción de xilanasas.....	48
Tabla 16.- Diseño de cuadrados latinos con el valor de cada uno de los factores: temperatura, C/N y pH.....	49
Tabla 17.- Resultado para cada uno de los experimentos del diseño de cuadrados latinos	49
Tabla 18.- Errores experimentales del diseño de cuadrados latinos.....	51
Tabla 19.- Resumen de valores de las variables escogidas en el diseño de cuadrados latinos y su suma de cuadrados medios (SCM)	51
Tabla 20.-Resultado de la actividad xilanolítica en fermentación sumergida para un matraz de 2.5 L.....	52
Tabla 21.-Resultado de la actividad xilanolítica en fermentación sumergida para el reactor BIOFLO III de 3.2 L	54
Tabla 22.- Parámetros para la obtención de los parámetros de velocidad máxima y constante de Michaelis-Menten	56
Tabla 23.- Valores obtenidos de los parámetros cinéticos: velocidad máxima y constante de Michaelis-Menten.....	57

Tabla 24. Datos estimados para la velocidad de secado decreciente para los dos experimentos realizados.	60
Tabla 25.- Parámetros cinéticos de producción de CO ₂ por <i>Aspergillus sp.</i> en cultivo en medio sólido con olote de maíz.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.-Estructura primaria de la celulosa.....	4
Figura 2.-Monómeros precursores de las hemicelulosas	5
Figura 3.- Sistemas enzimáticos para la degradación de celulosa	6
Figura 4.- Morfología microscópica de <i>Aspergillus sp.</i> mostrando los conidios típicos con fiálides biseriados.	11
Figura 5.-Representación gráfica de la teoría de película estacionaria, modificada de Pirt (1975).....	12
Figura 6.- Tipos de reactores empleados en fermentaciones con sustrato sólido.	15
Figura 7.-Crecimiento radial a diferentes temperaturas en medio YPD	35
Figura 8.-Crecimiento radial a diferentes temperaturas en medio APD	36
Figura 9.-Crecimiento radial a diferentes temperaturas en medio RB. (las líneas continuas corresponden al ajuste lineal).....	36
Figura 10.- Velocidad radial de crecimiento en medio YPD y APD a tres temperaturas 30°C, 37°C y 50°C	37
Figura 11.- Densidad superficial de <i>Aspergillus sp.</i> en medio YPD.....	38
Figura 12.-Efecto de la temperatura sobre la producción de xilanasas en un cultivo en medio líquido con <i>Aspergillus sp.</i> Los valores reportados corresponden a los máximos para cada temperatura.	40
Figura 13.- Representación de Arrhenius. Se muestra la representación de la actividad xilanolítica frente a 1/T para el tramo ascendente de la curva de la actividad xilanolítica frente a la temperatura (las líneas continuas representan el ajuste lineal)	40
Figura 14.- Perfil de actividad a diferentes pH. (a) Actividad xilanolítica a 50°C. (b) Actividad xilanolítica a 60°C.....	41
Figura 15.-Comparación de los matraces con las diferentes relaciones de C/N	44
Figura 16.-Superficie de respuesta: nivel superior para olote, temperatura y nivel inferior para C/N y pH.....	46
Figura 17.-Superficie de respuesta: nivel superior para olote, pH, temperatura y nivel inferior para C/N	47
Figura 18.-Superficie de respuesta: nivel superior para pH, C/N y nivel inferior para fuente de carbono y temperatura.....	47

Figura 19.-Superficie de respuesta: nivel superior para C/N y nivel inferior para fuente de carbono, pH y temperatura	48
Figura 20.-Cinética de producción de xilanasa en fermentación sumergida en matraz de 2.5 L.....	53
Figura 21.-Perfil de la fermentación en reactor BIOFLO III de 3.2 L.....	55
Figura 22.- Perfil para la determinación de la velocidad específica de crecimiento μ , calculadas a partir de los datos experimentales de la biomasa X55	
Figura 23.- Representación gráfica de Lineweaver-Burk para la obtención de los parámetros cinéticos V_{max} y K_m	57
Figura 24.- Gráfica de a_w vs %H para la obtención de la isoterma de desorción de agua, la línea continua corresponde al ajuste del modelo de Henderson a los datos experimentales obtenidos del olote.....	59
Figura 25. -Curva de velocidad de secado.	60
Figura 26.- Perfil de actividad xilanolítica en las columnas de fermentación	61
Figura 27.- Productividad de la fermentación sólida para la obtención de xilanasas	61
Figura 28.- Producción de CO_2 y consumo de O_2 por <i>Aspergillus sp.</i> en cultivo en medio sólido con olote de maíz.	62
Figura 29.- Coeficiente respiratorio durante la fermentación sólida por <i>Aspergillus sp.</i>	63
Fotografía 1.-Fotografía del crecimiento micelial de <i>Aspergillus sp.</i> en medio YPD y APD inoculado por piquete	37

1. INTRODUCCIÓN

Existen numerosas tecnologías que permiten la transformación y aprovechamiento de la biomasa; desde las más simples que no requieren grandes inversiones ni recientes adelantos tecnológicos, hasta sistemas actualizados con tecnologías de punta.

La biomasa residual originada de residuos agrícolas, forestales, urbanos está compuesta principalmente de hidratos de carbono principalmente celulosa, hemicelulosa, almidón, glucosa o fructosa (Carrasco, 1996). Se estima que, aproximadamente 4×10^9 toneladas de celulosa se forman anualmente (Aro *et al.*, 2005). Esta gran cantidad no se acumula sobre la tierra gracias a la acción de bacterias y hongos, capaces de degradar con eficiencia estos materiales reciclando carbono de los ecosistemas.

Los hongos filamentosos secretan un conjunto de enzimas capaces de atacar estos componentes de la pared celular vegetal, las cuales son potentes catalizadores, produciendo una aceleración en las reacciones del orden de 10^{17} veces.

Estas enzimas han recibido una gran atención debido a su potencial de aplicación en la bioclarificación de productos textiles (celulasas), suavizante de tejidos y blanqueamiento del papel (xilanasas), clarificación e incremento de extracción de pulpa (pectinasas), (Bhat 1997; de Vries *et al.*, 2001; Buchert *et al.*, 1998; Penttilä *et al.*, 2003; Galante *et al.*, 1998) y la conversión de biomasa vegetal en azúcares fermentables, que podrían ser empleados en la producción de productos químicos y combustibles.

El mercado mundial de enzimas industriales fue valorado en \$ 3.1 mil millones en 2009 y alcanzó cerca de \$ 3.6 mil millones en 2010, las enzimas alimentarias y de bebidas representan el mayor segmento de la industria de las enzimas industriales con unos ingresos de casi \$ 1,2 mil millones en 2010 (Bharatbook). En México la principal empresa productora es Enmex, S.A de C.V, que produce y distribuye la mayor parte de las enzimas de aplicación masiva. Conforme sucedieron los avances en los métodos de producción y en la modificación genética para la optimización de su obtención, la producción de enzimas en México fue disminuyendo convirtiéndose en mayor parte un mercado de importación, dándose a conocer en el año 2001 un mercado de 46.8 millones de dólares en este sector (Secretaría de Economía con información del Banco de México).

En respuesta a la demanda creciente de estas enzimas, se ha impulsado la investigación, el estudio y uso de diferentes microorganismos lignocelulolíticos entre los cuales se encuentran los hongos filamentosos que son la fuente principal de hidrolasas, incluyendo celulasas y xilanasas, debido a su fácil manejo y costos reducidos. Los principales géneros incluyen a *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Penicillium* (MacCabe *et al.*, 2002), *Aspergillus niger* y *Aspergillus versicolor* son unos de los más utilizados en la producción de enzimas industriales, principalmente por sus altos niveles de secreción de proteína, producción de enzimas extracelulares de fácil recuperación y su estatus GRAS (generally regarded as safe) (Ward *et al.*, 2006; Schuster *et al.*, 2002; De Vries y Visser, 2001).

La mayoría de las enzimas utilizadas en procesos industriales se producen por fermentación en medio líquido (FML) o fermentación sumergida (MacCabe *et al.*, 2002) ya que los costos de la recuperación de las enzimas son inversamente proporcionales a la concentración en el medio de fermentación dada en g/L (K.H. Kroner, *et al.*, 1984). Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado sistemas alternativos para la producción de enzimas por hongos filamentosos, como la fermentación en medio sólido (FMS) citada en un gran número de investigaciones donde se muestra como ventaja una mayor producción enzimática que en FML (G. Viniegra-González, 2002).

En este estudio se producen xilanasas por ambos tipos de fermentación, realizando previamente un estudio del crecimiento de *Aspergillus sp.* y la composición del medio de cultivo. Posteriormente, se realizaron diseños experimentales para evaluar factores como el sustrato a emplear: olote de maíz y los residuos de la central de abastos (CEDA), fuente de nitrógeno, pH, temperatura, entre otros. Y finalmente, se obtuvieron los resultados sobre la actividad y productividad enzimática de cada una de las fermentaciones.

2. MARCO TEÓRICO

En los últimos años el interés hacia la utilización química y energética de los materiales lignocelulósicos (conjunto de materiales de origen forestal, agrícola o urbano y sus residuos) ha ido en constante aumento. Son una fuente renovable de materia orgánica que puede ser transformada por métodos químicos (hidrólisis con ácidos y bases) y biológicos (hidrólisis enzimática, cultivo de microorganismos) en productos de interés industrial, el uso y aplicación de estos materiales ha mantenido la atención en dos áreas importantes (Rodríguez *et al.*, 1990; FAO, 2001):

- La obtención de productos químicos y energéticos que sustituyan parcial o totalmente la utilización de reservas fósiles como el petróleo, gas o el carbón, como los biocombustibles.
- Obtención de fracciones poliméricas y derivados químicos, como las enzimas, azúcares simples, metabolitos secundarios.

Dichos productos son generados a partir de la conversión de los polímeros estructurales de la materia vegetal (Howard *et al.*, 2003; Tengerdy y Szakacs, 2003).

2.1 Polisacáridos de la pared celular vegetal

Los materiales lignocelulósicos están constituidos por celulosa, hemicelulosa y lignina en una relación aproximada de 4:3:3 variando sensiblemente según las diferentes especies (Fengel y Wegener, 1984; Sjöström, 1981, Misra, 1993; Oggiano, 1997) y son llamados polisacáridos de la pared celular vegetal. De éstos, la celulosa es un polisacárido insoluble que representa el componente mayoritario, seguido de la hemicelulosa que es el componente más heterogéneo y que a diferencia de la celulosa está compuesta de diferentes azúcares formando cadenas más cortas, con ramificaciones y formando poros en toda la estructura de la pared celular; y por último el xilano cuya función es asegurar protección contra la humedad y los agentes atmosféricos además de actuar como elemento aglomerante de las fibras.

2.1.1 Características estructurales de celulosa

La celulosa de fórmula $(C_6H_{10}O_5)_n$ es un homopolímero lineal constituido por unidades de β -glucosa unidas entre sí por enlaces 1-4 (Figura 1) con un peso molecular de aproximadamente 500.000. Estas moléculas se pueden hidrolizar con dificultad en medios catalizados por ácido. Entre las principales propiedades fisicoquímicas de la celulosa se encuentran el índice o grado de polimerización

(número de monómeros de azúcares del polímero), la cristalinidad y la porosidad (Sjöström, 1981; Fan *et al.*, 1982; Blanch *et al.*, 1983; Thonart *et al.*, 1983). La cadena de celulosa es alargada y las unidades de glucosa están dispuestas en un solo plano debido a la presencia del anillo glicosídico y a su conformación (Fengel y Wegener, 1984).

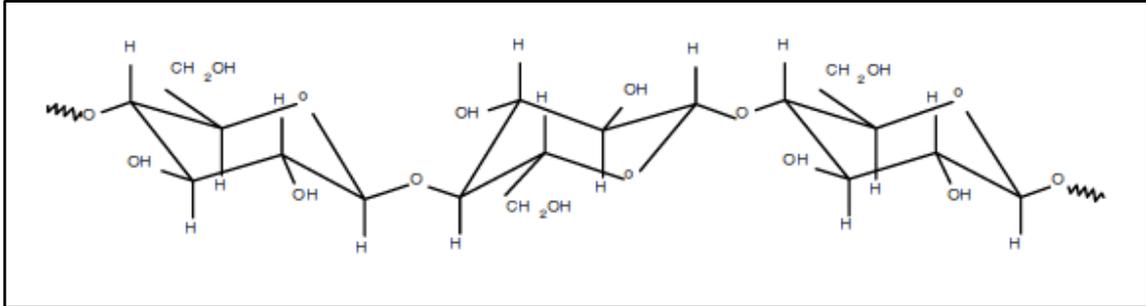


Figura 1.-Estructura primaria de la celulosa

El anillo de piranosa está en conformación 4C_1 , es decir, que los grupos $-CH_2OH$ y $-OH$, así como los enlaces glicosídicos, están en posición ecuatorial con respecto al plano medio del anillo, y los átomos de hidrógeno en posición axial. Las microfibrillas de celulosa establecen interacciones cruzadas con los xiloglucanos para contribuir con su integridad estructural y rígida (McCann y Roberts, 1991).

2.1.2 Características estructurales de la Hemicelulosa

La hemicelulosa es un polímero constituido por unidades de anhidroazúcares unidas por enlaces glicosídicos, y formadas por más de un tipo de azúcar; además presentan ramificaciones y sustituciones. Los azúcares que forman las hemicelulosas se pueden dividir en diferentes grupos como las pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (glucosa, manosa, galactosa), ácidos hexurónicos (ácidos glucorónico, metilglucorónico y galacturónico) y deoxihexosas (ramnosa y fucosa) (figura 2), la cadena principal puede consistir en una sola unidad (homopolímero) como por ejemplo los xilanos o en dos o más unidades (heteropolímero) como por ejemplo los glucomananos. Su papel es contribuir a la unión entre la lignina y la celulosa.

El olote de maíz, uno de los sustratos utilizados en el presente estudio es ampliamente rico en xilano (28-35 % base seca), (Saha 2003; Gupta y Kar, 2008), se desecha de diversas maneras, por esparcimiento sobre la tierra, por incineración al aire libre o mezclado con otros compuestos en la alimentación ganadera como forraje, generando ganancias muy bajas o nulas (SAGARPA 2010). A causa de esta concentración de xilano, el olote de maíz se ha venido

empleando como sustrato en fermentaciones en medio líquido, para la producción dirigida de enzimas degradadoras de hemicelulosa y otros procesos de valor agregado (Gupta y Kar, 2008), pero se requiere de mayor información para el empleo de olote de maíz como sustrato-soporte en fermentación en estado sólido con la finalidad de producir metabolitos de interés.

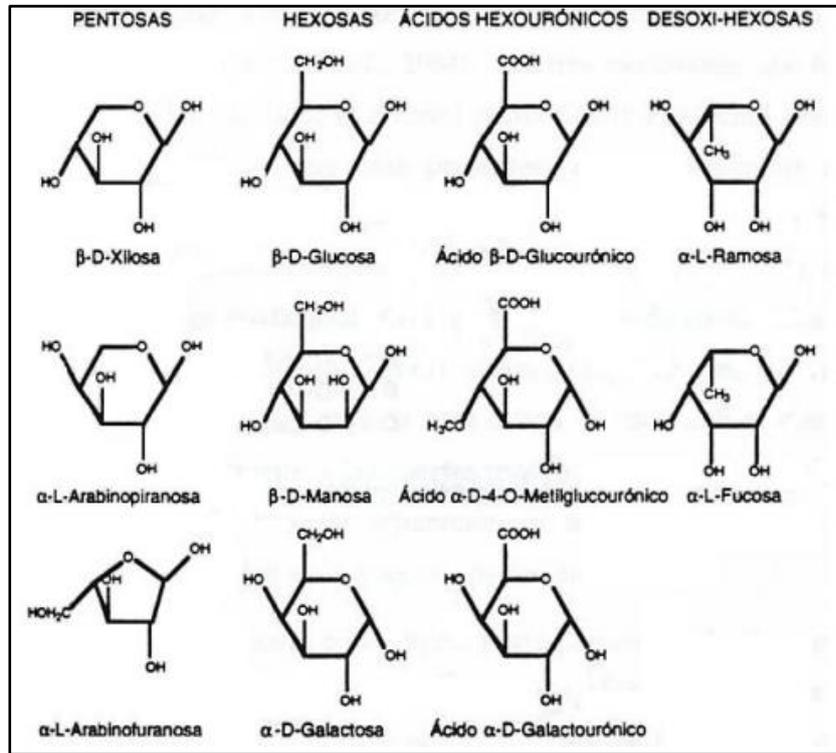


Figura 2.-Monómeros precursores de las hemicelulosas

2.1.3 Características estructurales de la lignina

La lignina es la tercera fracción mayoritaria de la biomasa lignocelulósica. Se trata de un polímero tridimensional amorfo formado por unidades de fenilpropano ligadas por diferentes tipos de enlaces alquil-aril-eter o carbono-carbono (Fiechter, 1983; García, *et al.*, 1984). Los monómeros que forman la lignina son los denominados alcoholes cinamílicos diferenciados entre sí por las sustituciones que presenta el anillo aromático.

El peso molecular de la lignina es más difícil de determinar que el de la celulosa debido principalmente a las fuertes modificaciones que experimenta su estructura en los tratamientos de separación, a su baja solubilidad y a la tendencia a formar agregados en la mayoría de los disolventes (Fengel y Wegener, 1984; Hon y Shiraishi, 1991; Tarchevsky y Marchenko, 1991).

2.2 Biodegradación enzimática de celulosa y hemicelulosa

2.2.1 Degradación de celulosa y xiloglucanas

Los microorganismos capaces de degradar celulosa secretan un sistema complejo de enzimas extracelulares, celulasas y xilanasas, que actúan en forma conjunta en la degradación de celulosa y hemicelulosa. Las fibras de celulosa son degradadas esencialmente por dos tipos de sistemas enzimáticos llamados agregativos y no agregativos, como se muestra en la figura 3.

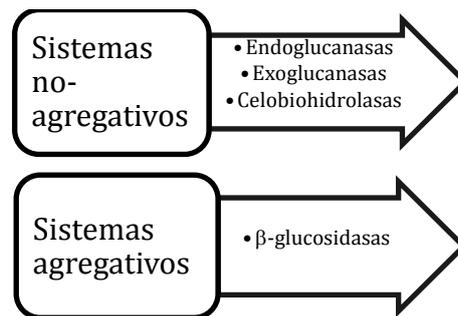


Figura 3.- Sistemas enzimáticos para la degradación de celulosa

Las cuatro clases mayoritarias de actividades enzimáticas intervienen en la biodegradación de la celulosa; endoglucanasas (EC 3.2.1.4), que hidrolizan regiones internas de la cadena celulolítica principalmente en regiones amorfas, generando celooligosacáridos; celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91), que remueve celobiosa de las extremidades del polisacárido, incluyendo la forma cristalina; exoglucanasas (EC 3.2.1.71), que libera glucosa de las extremidades reductoras, tanto de la celulosa como de los celooligosacáridos (de Vries *et al.*, 2001; Aro *et al.*, 2005); y β -glucosidasas (EC 3.2.2.21), las cuales hidrolizan celobiosa y celooligosacáridos a glucosa, removiendo la inhibición por producto de las otras enzimas y generando fuente de carbono de fácil metabolismo.

De esta manera, los microorganismos pueden utilizar los productos generados por la hidrólisis de la celulosa como fuente de carbono para el crecimiento (Cullen y Kersten, 1992; Pérez *et al.*, 2002; Rabinovich *et al.*, 2002).

2.3 Las xilanasas y su modo de acción

La degradación total de la hemicelulosa para producir xilosa y/o arabinosa es llevada a cabo por un grupo de enzimas que participan sinérgicamente, basado en el modo de acción, se puede distinguir dos clases principales de xilanasas: las endo-1,4- β -xilanasas, (EC 3.2.1.8), las cuales rompen al azar los

enlaces glicosídicos de la cadena principal ya que son capaces de atrapar en cualquier parte de la cadena de xilanos y las exoxilanasas que sólo se adhieren al azúcar reductor al final de la cadena.

Son preferidas para la hidrólisis del xilano, debido a su alta especificidad, suaves condiciones de reacción, pérdida insignificante de sustrato y por la poca o nula generación de productos secundarios.

Las xilanasas son producidas por una gran cantidad de organismos como bacterias, algas, hongos, protozoos, gasterópodos y artrópodos. De estos, los microorganismos más utilizados a nivel industrial para producir xilanasas son las bacterias, los hongos mesófilos y termófilos (Beg *et al.*, 2001; Howard *et al.*, 2003; Polizeli *et al.*, 2005). Sin embargo, el costo de la producción enzimática es uno de los factores que limita la viabilidad económica del proceso, lo cual se ha pretendido mejorar mediante la búsqueda de cepas fúngicas o bacterianas más potentes o mediante la inducción de cepas mutantes para excretar cantidades mayores de enzimas.

La producción microbiana de estas enzimas está sujeta a diferentes mecanismos de regulación, a partir de estudios realizados, tanto en hongos como bacterias se ha propuesto un modelo general de regulación controlado por dos mecanismos principalmente. Por un lado, la inducción que se lleva a cabo por su sustrato natural xilano y por otro la represión por fuentes de carbono de bajo peso molecular como xilosa, arabinosa o xilobiosa. Este modelo sugiere, además, la existencia de un nivel basal de enzimas; aquí el microorganismo sintetiza y exporta a la superficie celular pequeñas cantidades de enzimas, que inician la hidrólisis del sustrato y producen pequeños oligosacáridos que entran a la célula siendo los verdaderos inductores que encienden la transcripción de los genes.

2.3.1 Aplicaciones de las xilanasas

La biotecnología de las xilanasas empezó a principios de los años 80, primero en la alimentación animal seguida por aplicaciones en la industria de alimentos. Posteriormente estas enzimas empezaron a usarse en las industrias de lavandería, textil y de la pulpa y papel. En las últimas dos décadas su uso se ha incrementado en forma considerable y actualmente representan cerca del 20% del mercado mundial de las enzimas.

Los productos comerciales preparados a base de celulasas y xilanasas que están disponibles en el mercado han sido obtenidos de hongos y bacterias de los

géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Humicola* y *Bacillus* (Bhat, 2001; Ovando y Waliszewski, 2005; Polizeli *et al.*, 2005).

Una de las aplicaciones más importantes de las xilanasas es en la industria de la pulpa y del papel. El pulpeo kraft involucra el cocimiento alcalino de la pulpa para remover el 95% de la lignina presente en la madera. El 5% remanente le confiere a la pulpa el color café pardo oscuro. Por razones estéticas y para mejorarlas propiedades del papel es necesario un paso de blanqueo, el cual tradicionalmente se hacía por un proceso multietapas, que utiliza cloro o dióxido de cloro. Los productos alternos de estos compuestos químicos son sustancias orgánicas cloradas, algunas de las cuales son tóxicas, mutagénicas, persistentes y bioacumulativas que causan numerosos daños en los sistemas biológicos. En los últimos diez años, la industria de la pulpa y el papel utiliza mezclas de xilanasas en el proceso de bioblanqueo, con esto se ha logrado realzar la brillantez de las pulpas y disminuir la cantidad de cloro utilizado en las etapas de blanqueo, además de resultar muy efectivas con respecto a los costos.

El uso de enzimas como un sustituto hemicelulolítico para los productos químicos de cloro en el blanqueo de la pulpa recientemente ha suscitado un gran interés debido a las preocupaciones ambientales, es por esto que hoy en día, un número significativo de fábricas en todo el mundo utilizan el proceso completo de blanqueo con xilanasas.

Además, diferentes productos, incluyendo papeles para revistas y papeles con determinado tejido que son manufacturados con pulpas tratadas enzimáticamente, han sido introducidos al mercado con éxito. Cabe señalar que es indispensable que la preparación de xilanasas esté completamente libre de celulasas, ya que esto traería serias implicaciones económicas en términos de pérdida de celulosa, calidad de la pulpa degradada y un incremento en los costos del tratamiento de efluentes. Las xilanasas, también se usan en la industria alimentaria en la clarificación de jugos y vinos, licuefacción de mucílago de café; extracción de saborizantes y pigmentos, aceites de plantas y semillas; maceración de materia vegetal; acondicionamiento de piensos para aves y cerdos.

En la industria de la panificación, las xilanasas, se adicionan a la masa para mejorar su calidad, obteniéndose productos de panadería con mejor textura y sabor. El efecto de las xilanasas es incrementar el volumen específico de los panes, sin provocar un efecto colateral negativo en el manejo de la masa y puede atribuirse a la distribución de agua de la fase del pentosano hacia la del gluten,

ocasionando que el pan se vuelva menos seco y permanezca más tiempo fresco (N. Kulkarni, A. Shendye, R. Mala, 1999 y Ponce y Pérez, 2002).

2.3.2 Factores que afectan los niveles de producción de xilanasas

El rendimiento de xilanasas en el proceso de fermentación se rige por una serie de factores clave, además de los parámetros estándar. Cuando la producción de xilanasas se lleva a cabo con sustratos heterogéneos y complejos, diversos factores se combinan modificando el nivel de expresión de estas enzimas. Algunos de estos efectos son la accesibilidad del sustrato, cantidad y velocidad de liberación de los xilooligosacáridos, su naturaleza química, la cantidad de xilosa liberada que actúa como la fuente de carbono y como un inhibidor de la síntesis de xilanasas, en la mayoría de los casos.

Generalmente, la liberación lenta de las moléculas inductoras y la posibilidad del sobrenadante para convertir el inductor a su derivado no metabolizable puede aumentar el nivel de síntesis de xilanasas. Otros parámetros de bioprocesos que pueden afectar la actividad y la productividad de xilanasas en el proceso de fermentación incluyen el pH, la temperatura y la agitación.

2.3.3 Propiedades bioquímicas de las xilanasas

La información disponible sobre las propiedades de las xilanasas proviene en su mayoría de estudios realizados con enzimas producidas por bacterias y hongos. En general, los parámetros tales como la temperatura, el pH y la estabilidad química y enzimática son importantes para determinar la aplicación industrial de cualquier enzima. Recientemente un modelo simple, basado en la termodinámica y los parámetros cinéticos para la inactivación de la enzima, se ha presentado para predecir la termoestabilidad en presencia de sustrato, y la actividad residual de enzimas en entornos de procesamiento difíciles o extremos. El conocimiento del mecanismo de acción de las enzimas degradadoras de xilano se ha obtenido a partir de estudios realizados sobre la especificidad del sustrato, el papel de los sustituyentes de la cadena lateral y los productos finales. Las xilanasas de origen fúngico están bien caracterizadas, son principalmente de dos tipos: no ramificadas, las que no liberan arabinosa, y ramificadas, las que liberan arabinosa a partir de los sustituyentes de la cadena lateral, además de separar enlaces de la cadena principal.

La temperatura óptima de las endoxilanasas producidas por bacterias y hongos varía entre 40°C y 60°C. Las xilanasas fúngicas son, generalmente, menos termoestables que las producidas por bacterias. Sin embargo, algunos hongos

mesofílicos producen xilanasas termoestables como *Ceratocystis paradoxa* que produce una xilanasas estable a 80°C por 1 hora. Las xilanasas fúngicas producidas por *Aspergillus kawachi* y *Penicillium hergue* muestran pH óptimos en la zona ácida (pH 2-6).

2.4 Hongos filamentosos

Los hongos son organismos eucariotas, que se caracterizan por ser inmóviles, presentar talos, que pueden ser estructuras ramificadas llamadas micelios o cuerpos más compactos. No realizan la fotosíntesis pues son heterótrofos que viven a partir de la materia orgánica producida por otros organismos. Pueden reproducirse por esporas o por medio de la ramificación de estructuras tubulares y arborescentes llamadas hifas, además, pueden tener septos que son paredes internas que pueden presentar poros para permitir el paso del citoplasma. Las hifas crecen por extensión apical o de las puntas y se multiplican por ramificación, en los extremos de estas células es donde se lleva a cabo la asimilación de nutrientes del medio y la excreción de las hidrolasas que son enzimas extracelulares necesarias para la degradación de una gran variedad de substratos complejos (Herrera y Ulloa, 1998).

Los hongos filamentosos se reproducen por esporas o conidias y se distinguen por las características de los tallos que soportan las esporas y los conidióforos. En los *Aspergilli* el conidióforo se eleva a partir de una célula del micelio vegetativo, llamada célula pie, que tiene una pared más gruesa que la del micelio vegetativo, y cuando las esporas se esparcen comúnmente se mantiene vacío, es decir no contiene protoplasma. El tallo del conidióforo no está septado y termina en una parte hinchada llamada la vesícula. A partir de esta expansión las conidias se forman en cadenas de esporas cuyo segmento inicial se denomina sterigmata (Herrera y Ulloa, 1998).

Durante años, los hongos han sido uno de los organismos más conocidos y utilizados con diversos propósitos. Desde las fermentaciones biológicas en los pueblos antiguos, hasta aplicaciones biotecnológicas actuales e importantes como en la biorremediación para la detoxificación de metales en la industria, su uso como agentes de control biológico de plagas, en la industria alimentaria para la producción de enzimas, entre otras (Wessels, 1999; Arenas Roberto, 2011).

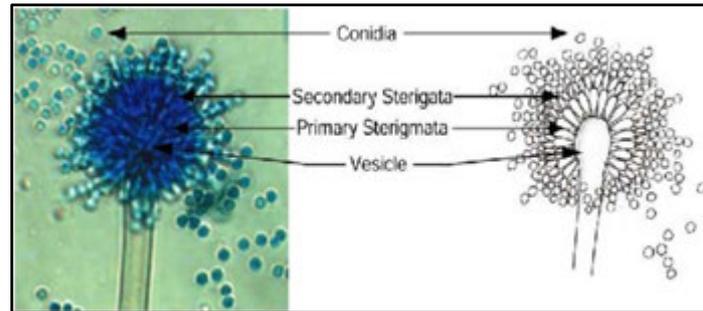


Figura 4.- Morfología microscópica de *Aspergillus sp.* mostrando los conidios típicos con fiálides biseriados.

2.5 Fermentación líquida

Se puede definir a la fermentación en medio líquido (FML) o sumergida (en inglés como SmF) como un cultivo de células microbianas dispersas en forma homogénea en un recipiente agitado que puede ser o no aireado por medios mecánicos. La forma de fermentación líquida más utilizada en los laboratorios es en matraz agitado. El desarrollo de esta técnica ha sido importante porque ha permitido el cultivo de organismos aeróbicos en condiciones homogéneas con una densidad moderada de la biomasa y ha simplificado el estudio de la fisiología de los organismos. A su vez, el cultivo de suspensiones de células en fermentadores agitados ha evolucionado a gran escala, siendo éstos los más utilizados industrialmente, donde se pueden ver fermentadores con volúmenes de 10 litros o más, en los cuales se producen compuestos derivados del metabolismo microbiano. En estos sistemas, la agitación mecánica permite mezclar el cultivo de forma homogénea y aumentar la transferencia del gas a la biomasa de tres formas básicas:

- 1) Dispersa el gas en burbujas muy pequeñas incrementando el área de interfase gas-líquido.
- 2) Incrementa el tiempo de contacto de líquido con las burbujas de gas
- 3) Disminuye el grosor de la capa estacionaria del líquido al aumentar la turbulencia.(Henzler y Schedel, 1991)

La barrera principal de transferencia del O₂ en la fermentación líquida, es su baja solubilidad en el agua y, al hacerse mayor la capa de agua, aumenta la dificultad para que llegue a la célula. Gran parte del gasto energético está relacionado con la necesidad de satisfacer la demanda de oxígeno en el crecimiento de los microorganismos.

2.5.1 Metabolismo aerobio y transferencia de oxígeno

Para los microorganismos aeróbicos, la presencia de oxígeno es un factor muy importante en la regulación de sus actividades metabólicas. Por lo tanto, en el cultivo de este tipo de microorganismos, el aire debe ser distribuido al interior del líquido de fermentación para pasar al interior de las células por difusión simple y cruzar al citoplasma hasta el lumen mitocondrial, donde se usará como aceptor de protones al final de la fosforilación oxidativa. El proceso de transferencia de oxígeno se debe a su gradiente de concentración entre las diferentes fases del cultivo (Henzler y Schedel, 1991).

Existen varios modelos que explican la transferencia de oxígeno del aire a los microorganismos, uno de los más sencillos y completos es la teoría de película estacionaria de líquido (figura 5), según la cual la principal resistencia al transporte del oxígeno entre las fases gas-líquido-biomasa se presenta en la película estacionaria de líquido que se encuentra en el límite entre las diferentes fases. La velocidad de difusión del oxígeno entre las fases es directamente proporcional a la superficie del área de intercambio, del gradiente de concentración del oxígeno y del grosor de la capa estacionaria de líquido que rodea a la biomasa.

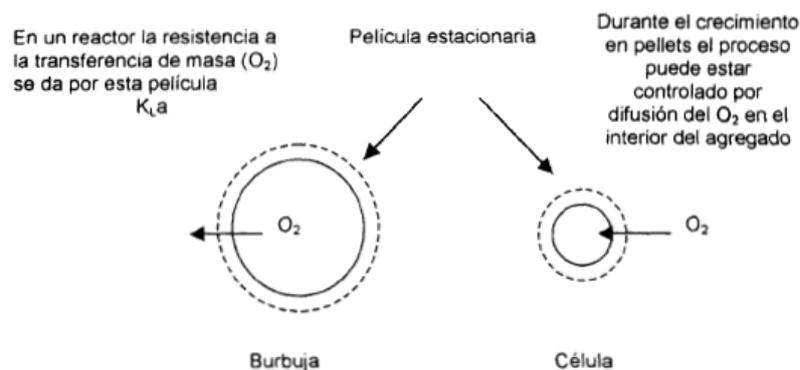


Figura 5.-Representación gráfica de la teoría de película estacionaria, modificada de Pirt (1975).

En un diseño de reactor dado, el grosor de la capa estacionaria de líquido en el cultivo, puede ser disminuido por medio de la agitación, lo cual permite un mejor crecimiento del hongo.

En general, si el volumen del líquido está muy extendido, formando una capa delgada, el gradiente de difusión será más elevado, ya que este proceso está gobernado por la ley de Fick; de esta forma, el flujo de oxígeno será mayor cuando la capa sea muy extensa (área muy grande) y muy delgada (espesor muy pequeño).

En los cultivos de matraz agitado, desarrollados por Kluyer y Perkin (1933), se aumenta el área de la interfase y se promueve el transporte de oxígeno en el seno del líquido, mediante el movimiento del mismo y se sigue dependiendo de la relación $r=A/V$ (cm^2 de superficie/ cm^3 de volumen). Por eso se recomienda usar volúmenes pequeños de líquido dentro de este tipo de matraces, de forma que se extienda en la parte baja y ancha del mismo.

Cuando la concentración del sustrato es alta, la DBO estará gobernada por la densidad de la biomasa X , y esta a su vez estará controlada por el valor de K_{La} . Por lo tanto, el crecimiento de la biomasa dependerá del coeficiente de transferencia de oxígeno al medio del cultivo.

Tabla 1.- Valores de K_{La} experimentales reportados para diferentes tipos de reactor (Mavituna y Sinclair, 1985)

Fermentador	K_{La} (h^{-1})
Matraz agitado	80-200
Fermentador agitado	325-2650
Columna con burbujeo	140
Reactor con ciclo de presión	400
Reactor de plato de corte	<1000
Reactor air lift	350

2.6 Fermentación sólida

El cultivo sólido se define como el proceso donde los microorganismos crecen sobre la superficie de materiales sólidos porosos y humedecidos con niveles de actividad de agua de 0.4 a 0.9, el material sólido puede ser natural o inerte, siendo el primero, el más usado como sustrato para el crecimiento de los microorganismos (Nigam y Robinson, 2004; Krishna, 2005). Los sustratos más utilizados incluyen los subproductos generados por las prácticas agrícolas y forestales como granos de semillas, fibras de rastrojos y residuos de madera (Pandey *et al.*, 1999; Rodríguez-Couto y Sanromán, 2005).

Mientras que las bacterias y levaduras requieren de una alta actividad de agua ($a_w > 0.98$), los hongos filamentosos pueden crecer con valores de a_w de 0.85, (Pandey, 1992) el bajo nivel de actividad de agua favorece la germinación y el crecimiento micelial de los hongos. Esta forma de crecimiento, su tolerancia a bajas actividades de agua y condiciones de alta osmolaridad hacen que estos microorganismos sean la microbiota natural más adecuada para este tipo de fermentación. El modelo básico de crecimiento de los hongos es una combinación de crecimiento apical con la generación de nuevas hifas de

ramificación, mientras que el crecimiento apical se lleva a cabo de manera lineal, la ramificación se lleva a cabo de manera exponencial y como resultado se logra una alta velocidad de crecimiento, una gran capacidad de cubrir eficientemente la superficie de cultivo y penetrar en el interior de la matriz sólida.

Las enzimas hidrolíticas son excretadas por las puntas de las hifas sin que se diluyan como en el caso de la fermentación líquida lo que hace que la acción de estas enzimas sea eficiente y les permita entrar en la mayoría de los sustratos sólidos, lo que aumenta la disponibilidad de los nutrientes del interior de los sustratos (Raimbault, 1998).

A partir del cultivo sólido se han obtenido productos de interés industrial por el cultivo de microorganismos sobre residuos agrícolas, tales como: enzimas, biocombustibles, ácidos orgánicos, metabolitos secundarios, azúcares, proteína (Nigam y Robinson, 2004).

Esta tecnología ofrece algunas ventajas frente al cultivo líquido para la formación del producto destacándose el uso de sustratos baratos como fuentes de carbono, rendimiento del producto más alto, presión por carbono baja, volúmenes de operación pequeños, baja demanda de agua y energía, productividad volumétrica alta, fácil aireación y simulación del medio de crecimiento natural de los microorganismos (Viniegra González *et al.*, 2003; Hölker *et al.*, 2004). A pesar de ello, existen algunas desventajas del cultivo sólido, por ejemplo, puede ser necesario el pretratamiento mecánico y químico del sustrato (molido, hidrólisis con solventes), la determinación de biomasa y la reproducibilidad de los experimentos es difícil por la heterogeneidad de los sustratos empleados, los gradientes de temperatura, oxígeno y pH no pueden ser controlados a gran escala (Hölker *et al.*, 2004; Krishna, 2005).

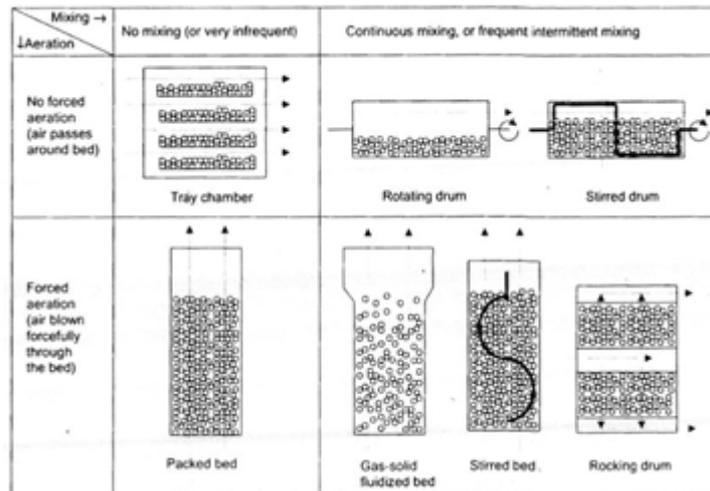


Figura 6.- Tipos de reactores empleados en fermentaciones con sustrato sólido.

2.7 Factores que afectan la producción de enzimas lignocelulolíticas

2.7.1 El sustrato

El cultivo sólido se caracteriza por el uso de soportes orgánicos que sirven como fuente de nutrientes e inductores para el crecimiento de los microorganismos y para la producción de enzimas. Es por ello, que la selección del sustrato debe realizarse de acuerdo al tipo de microorganismo y tipo de enzima que se requiera, por ejemplo, para producir celulasas y xilanasas se pueden seleccionar sustratos que contengan porcentajes elevados de celulosa y hemicelulosa (Rodríguez-Couto y Sanromán, 2005; Rosales *et al.*, 2002). Este aspecto se debe evaluar para obtener los mayores rendimientos de enzimas por unidad de sustrato, porque se ha determinado que en cultivo sólido el tipo de sustrato es uno de los factores más importantes que influyen en la producción de enzimas lignocelulolíticas (Rosales *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2005; Shah y Madamwar, 2005; Battan *et al.*, 2006).

2.7.2 El tamaño de la partícula

El tamaño de partícula es una de las variables que está relacionada con la transferencia de masa entre los microorganismos y sus sustratos. Con tamaños de partículas pequeños el área de contacto entre el micelio de los microorganismos y los sustratos se incrementa, pero a su vez, se limita el intercambio de gases al reducirse el espacio entre las partículas. Por el contrario, con tamaños de partícula grandes el área de contacto entre el micelio de los microorganismos y los sustratos se reduce, pero el intercambio gaseoso mejora al incrementarse el espacio entre las partículas de los sustratos (Barrios-González *et al.*, 1993; Muniswaran y Charyulu, 1994; Mazutti *et al.*, 2007). Estos

dos efectos opuestos pueden influir en los niveles de producción de enzimas, por lo que es necesario seleccionar un tamaño de partícula adecuado para la producción de enzimas lignocelulolíticas (Muniswaran y Charyulu, 1994; Krishna, 1999; Hu y Duvnjak, 2004; Botella *et al.*, 2007).

2.7.3 Humedad y actividad de agua

Los niveles de humedad mayores al 90% y menores al 50 % pueden reducir considerablemente la producción de las enzimas (Azin *et al.*, 2007). Se ha observado que los requerimientos de humedad dependen del tipo de sustrato, microorganismo y del tipo de enzima (De Souza *et al.*, 2002; Rosales *et al.*, 2002; Panagiotou *et al.*, 2003; Asgher *et al.*, 2006; Azin *et al.*, 2007). A pesar de que la humedad del sustrato es una de las variables que comúnmente se optimiza en los sistemas de cultivo sólido para la producción de enzimas lignocelulolíticas (Jecu, 2000; Shah y Madamwar, 2005; Azin *et al.*, 2007; Jing *et al.*, 2007); se reconoce que la eficiencia del proceso depende del tipo de interacciones que existen entre el agua y los sustratos, es decir la actividad del agua (a_w). Por este motivo, durante el cultivo sólido es frecuente relacionar la actividad del agua (a_w) y humedad del sustrato con el crecimiento de los microorganismos y con la producción de enzimas (Oriol *et al.*, 1988; Wenqing *et al.*, 2003)

2.7.4 El pH y la temperatura

Dependiendo del microorganismo utilizado y del tipo de enzima que se produzca, el pH puede afectar de manera variable los niveles de producción de enzimas lignocelulolíticas, de manera que en la mayoría de los estudios de optimización, el pH se ha tomado en cuenta como una de las variables más relevantes del proceso (Jecu, 2000; Panagiotou *et al.*, 2003; Shah y Madamwar, 2005; Jing *et al.*, 2007). Con lo que se ha observado que, la producción de enzimas lignocelulolíticas se ve afectada drásticamente cuando el pH del cultivo sólido está por abajo de 5 o por arriba de 7.

Por otro lado, conforme la temperatura aumenta, las velocidades de las reacciones químicas y enzimáticas, que ocurren en el interior de las células de los microorganismos, se vuelven cada vez más rápidas, al igual que la velocidad de crecimiento. Sin embargo, hay un límite de temperatura dentro del cual las funciones metabólicas pueden ocurrir y, cuando este se sobrepasa, las funciones celulares empiezan a decaer drásticamente.

2.8 Diferencias entre la fermentación en medio sólido y la fermentación en medio líquido

A partir del conocimiento de las diferencias físicas existentes entre ambos sistemas de fermentación, es posible definir algunas diferencias entre ambos tipos de cultivo (tabla 2) y su papel sobre la fisiología de crecimiento de un hongo filamentoso.

- a) Los coeficientes de difusión efectivos pueden ser diferentes, ya que la relación área/volumen del medio líquido generalmente es varios órdenes de magnitud menor que en la delgada capa de agua extendida sobre un soporte poroso de la fermentación sólida. Debido a que el transporte de oxígeno depende de este cociente, se puede inferir que será más rápido en la fermentación sólida que para la fermentación líquida.
- b) Los tiempos de mezclado serán mucho menores en el medio líquido, de forma típica en un matraz Erlenmeyer agitado a 200 rpm tendrá un tiempo de mezclado de unos pocos segundos, mientras que en una capa de líquido en la fermentación sólida, el tiempo de mezclado depende de la difusión de los solutos y típicamente está dada por el cociente L^2/D_{H_2O} , siendo L la distancia promedio entre los cúmulos de esporas sembradas, que en un medio de cultivo podrían estar separadas aproximadamente de 100 a 1000 micras y el coeficiente de difusión de la glucosa en el agua es de $D= 6 \times 10^{-6}$ cm²/seg; el tiempo de mezclado resultante estaría en el intervalo de 10^2 a 10^3 segundos. Esta diferencia indica que sería más fácil formar microgradientes de solutos en la fermentación sólida que en la fermentación líquida.
- c) La forma de crecimiento típica para cada sistema es diferente. En forma típica *Aspergillus sp.* produce "pellets" cuando se cultiva en fermentación líquida con sustratos de fácil asimilación, mientras que en la fermentación sólida crece como micelio disperso con una proporción considerable de biomasa de tipo aéreo.

Estas diferencias, conocidas desde hace mucho, sugieren que la fisiología de crecimiento y metabolismo en cada sistema de fermentación pueden ser muy grandes.

Tabla 2.- Comparación entre la fermentación sumergida y la fermentación en soporte sólido

Fermentación sumergida	Fermentación sólida
Los medios tienen mayor cantidad de compuestos. Existe una buena reproducibilidad en medios definidos	Medios simples, requieren una solución de agua o mineral y sustratos variables.
Mayor riesgo de contaminación	Bajas a_w reduce los riesgos de contaminación
Medios diluidos. Volúmenes de fermentadores grandes.	Medios concentrados. Menor volumen de reactor
Transferencia G-L es generalmente limitante	Menor consumo de energía para la aireación
Mezclado homogéneo, la difusión de los nutrientes no es limitante	Mezclado imperfecto. Difusión puede limitar el proceso.
Alto contenido de agua facilita el control de la temperatura	Remoción de calor es crítica y la transferencia de calor por evaporación puede ser importante.
Amplio desarrollo de sistemas de medición y control	Control del proceso es difícil y la estimación de biomasa no es directa
Cinética y modelos difusionales conocidos	Cinética y fenómenos de transporte poco conocidos

2.9 Diseño experimental

Los métodos de diseño de experimentos han encontrado una amplia aplicación en muchas disciplinas. Así, se puede observar la experimentación como parte de los procesos científicos o como una de las formas en que se puede aprender sobre cómo trabajan los sistemas o procesos. Generalmente, se aprende a través de una serie de actividades en las cuales se pueden hacer conjeturas sobre un proceso, realizar experimentos para generar datos del proceso y entonces usar la información proveniente del experimento para establecer nuevas conjeturas, las cuales recaerán en nuevos experimentos y así sucesivamente (Montgomery, 2005).

Los diseños experimentales son una herramienta importante en el mundo científico para mejorar un producto o en la realización de los procesos. La aplicación temprana de técnicas de diseños experimentales en el desarrollo de procesos puede resultar en: 1) mejoramiento de los procesos de producción, 2) reducción de la variabilidad de los procesos de producción, 3) disminución del tiempo de desarrollo y 4) reducción de costos (Montgomery, 2005)

2.9.1 Directrices para el diseño de experimentos

Para usar la aproximación estadística en diseño y análisis de experimentos es necesario involucrarse en el experimento para así tener una idea clara de los que será exactamente estudiado, como los datos a ser colectados y al menos un entendimiento cualitativo de cómo estos se analizarán. En general, las directrices para diseñar un experimento son las siguientes: 1) reconocimiento del problema, 2) selección de la variable de respuesta, 3) selección de los factores, niveles y rangos, 4) selección de diseño de experimentos, 5) realización de experimentos, 6) análisis estadístico de los datos y 7) conclusiones y recomendaciones. Las primeras tres etapas corresponden a la planeación pre-experimental (Montgomery, 2005)

2.9.2 Selección del diseño experimental

La selección de un diseño envuelve consideraciones como el tamaño de la muestra (número de réplicas), la selección de un orden adecuado para la ejecución de los ensayos, y la determinación de otras restricciones de aleatorización están implicadas. En la selección del diseño es importante tener los objetivos experimentales en mente. En muchos experimentos, se conocen ya de antemano algunos de los niveles de los factores que provocan diferentes valores para la respuesta. En consecuencia, el interés es identificar cuales factores causarán esta diferencia y estimar la magnitud en la que la respuesta cambia. En otras situaciones, se podría estar interesado en verificar uniformidad. Por ejemplo, dos condiciones de producción son comparadas: A y B, donde A es el estándar y B es la alternativa. El experimentador estará interesado en demostrar si hay o no diferencia en la producción dada alguna de las dos condiciones (Montgomery, 2005).

El diseño experimental Plackett-Burman consiste en un diseño factorial fraccionado de dos niveles estudia $k = N - 1$ variables en N corridas, donde N es un múltiplo de 4.

El diseño experimental Plackett-Burman, se utiliza cuando se tiene la necesidad de estudiar conjuntamente varios factores, obedece a la posibilidad de que el efecto de un factor cambie según los niveles de otros factores, esto es, que los factores interactúen, o exista interacción.

También se utilizan los arreglos factoriales cuando se quiere optimizar la respuesta o variable dependiente, esto es, se quiere encontrar la combinación

de niveles de los factores que producen un valor óptimo de la variable dependiente. (superficie de respuesta).

Si se investiga un factor por separado, el resultado puede ser diferente al estudio conjunto y es mucho más difícil describir el comportamiento general del proceso o encontrar el óptimo.

El diseño de cuadrados latinos es un diseño en bloques incompletos aleatorizados, es decir que requiere el mismo número de niveles para los factores. Son apropiados cuando es necesario controlar dos fuentes de variabilidad. En dichos diseños el número de niveles del factor principal tiene que coincidir con el número de niveles de las dos variables de bloque o factores secundarios y además hay que suponer que no existe interacción entre ninguna pareja de factores. Recibe el nombre de cuadrado latino de orden K a una disposición en filas y columnas de K letras latinas, de tal forma que cada letra aparece una sola vez en cada fila y en cada columna (Leal y Porras, 1998).

3. ANTECEDENTES

A continuación, se presentan resúmenes de trabajos publicados que comparan la producción de metabolitos en fermentación sólida y líquida.

- Solís-Pereira y col. (1993) compararon la producción de pectinasas por *Aspergillus niger* en fermentación sólida y líquida. Añadieron concentraciones de 5.3 a 10% de sacarosa, glucosa y ácido galacturónico al medio de carbono. Con la adición de 3.5% de monosacáridos se inhibió la producción de endopectinasa, pero en fermentación sólida la adición de hasta un 10% de monosacáridos resultó en el incremento de la producción de pectinasas: 19 veces más endopectinasas y 4.9 veces más exopectinasas que en la fermentación sólida control sin monosacáridos. Se acumularon azúcares reductores en FML, pero no se acumularon en FMS, encontraron que la producción de pectinasas está relacionada con la concentración de azúcares reductores en el medio de cultivo. Atribuyeron estas diferencias a la falta de mezclado en FS y a problemas de difusión de los nutrientes en FML, un papel importante a la presencia de altos niveles de azúcares reductores que producen represión catabólica en FML y que no están presentes en FMS.
- En los estudios presentados por Villegas Villareal (1991) se obtienen proteasas ácidas a partir de un cultivo con soya como fuente de carbono en fermentación en estado sólido. Con esta fuente de carbono se observa una mayor cantidad de colorante después del proceso de precipitación y se separa completamente la enzima usando volúmenes altos de solventes y sales, o con un proceso de cromatografía en gel. También se estudió el efecto de emplear diferentes mezclas de gases en la atmósfera de fermentación permitiendo conocer el efecto de la presión de CO₂ y O₂ en la producción enzimática en relación con el uso de aire, observándose una mejor productividad y al mismo tiempo una aceleración en el proceso de producción.
- Carmona Cano y col. (1998), purificaron una endoxilanasas (β -1,4-xilano xilano hidrolasa, EC 3.2.1.8) de *Aspergillus versicolor* en avena de trigo como sustrato. La enzima fue purificada por cromatografía en DEAE-celulosa y Sephadex G-75 y fue específica para hidrólisis de xilano. La endoxilanasas tuvo una actividad de 22 U/ml, K_m de 6.5 mg/ml y una V_{max} de 1440 U/mg de proteína.

- M. Jeya Thiagarajan y P. Gunasekaran (2005) estudiaron la producción de xilanasas por *Aspergillus versicolor* MKU3 en fermentación en medio sólido. Encontraron que la capacidad de FS para reducir al mínimo la represión catabólica se ha descrito para diferentes enzimas hidrolíticas, incluyendo sistemas enzimáticos xilanolíticos producidos por algunos microorganismos (Solis-Pereyra *et al.* 1996).

Además, observaron que *Aspergillus versicolor* MKU3 creció bien en sustratos de bajo costo, tales como el salvado de trigo y produjo xilanasas bajo condiciones alcalinas, en un medio optimizado produjo 3249 U/g. Una baja concentración de peptona exhibió un efecto significativo sobre la producción de xilanasas, mientras que el extracto de levadura tiene un efecto negativo en su producción. Como *A. versicolor* MKU3 produce el máximo xilanasas en condiciones alcalinas de crecimiento, podría tener una aplicación potencial en la pulpa de bioblanqueo.

- Pang Pei Kheng y Ibrahim Che Omar (2005), aislaron *USM A1 I*, que se identificó como *Aspergillus niger* y fue seleccionado como un productor potencial de xilanasas a través de un sistema de fermentación en estado sólido usando como sustrato torta de palmiste. La modificación de las condiciones físicas del sistema FS indicó que la actividad de xilanasas fue 23.97 U/g de sustrato, con un tamaño de inóculo de 1×10^4 esporas/ml y a una temperatura de cultivo de $(28 \pm 3^\circ\text{C})$. Los suplementos de carbono y fuentes de nitrógeno adicionales en el medio de la torta de palmiste pudieron mejorar la productividad enzimática obteniéndose una producción de xilanasas de 25.40 U/g. Por otra parte, la presencia de NaNO_3 al 0,075% (w/w) como fuente de nitrógeno adicional dio una producción de xilanasas de 33.99 U/g de sustrato.
- Suprabha G. Nair y col. (2008) aislaron 70 cepas de hongos de suelos recogidos en diferentes partes del sur de Kerala en India. El mejor productor de xilanasas fue *Aspergillus* y representó un 55% de las cepas seleccionadas. Se identificaron las cepas que podrían producir una máxima cantidad de xilanasas libre de celulasa en fermentación líquida y fermentación sólida; todas las cepas produjeron xilanasas junto con la celulasa durante la fermentación sólida, esto pudo haber sido por la presencia de celulasa en el salvado de trigo que se utilizó como sustrato en la fermentación sólida. Previamente se había reportado que la xilanasas tanto como la celulasa se producían cuando la celulosa y la hemicelulosa se usaban juntas como fuente de carbono (Kulkarni *et al.*, 1999). *Penicillium sp.* SBS2 secretó la máxima cantidad de xilanasas (751 IU/ml) en fermentación

sólida. Entre las 10 cepas de *Aspergillus niger* aisladas, seis de ellas pudieron producir celulasas libres de xilanasa en fermentación sumergida y la máxima cantidad de xilanasa producida en este sistema de fermentación fue de *Aspergillus sydowii* SBS 45 (40 IU/ml). También se observó que la producción de xilanasa ausente de celulasas estaba en el 70% de las cepas escogidas en condiciones de fermentación sumergida. En la fermentación sumergida, la única fuente de carbono disponible era xilano. Haltrich *et al* (1996) reportaron que los xilanos puros pueden ser excelentes sustratos para la producción de xilanasa y se utilizan con frecuencia para los experimentos a pequeña escala. En una serie de organismos, este sustrato puro y definido, aumentó el rendimiento de xilanasa y causó una inducción selectiva de xilanasa, ya sea con ausencia completa o con actividades bajas de celulasas (Biswas *et al*, 1990; Gilbert *et al*, 1992).

4. JUSTIFICACIÓN

El uso de microorganismos en los diversos procesos industriales se ha incrementado progresivamente, ya que éstos, pueden complementar y en algunas ocasiones reemplazar procesos que utilizan tecnologías obsoletas, causando impactos positivos en el medio ambiente, una disminución en los costos de producción y un mayor rendimiento de los procesos.

Se han presentado propuestas por parte de la industria y de la investigación para la utilización de las enzimas, principalmente las obtenidas a partir de microorganismos; además, estas presentan una serie de ventajas de índole económico o tecnológico; entre las cuales se encuentran: permiten incrementos muy grandes en las velocidades de reacción, aun a temperatura ambiente, poseen una gran especificidad de acción que hace que no se produzcan reacciones laterales imprevistas. Así mismo, se puede trabajar en condiciones moderadas, especialmente de temperatura, lo que evita alteraciones de algunos componentes frágiles. Además las enzimas pueden inactivarse fácilmente cuando se considere que ya han realizado su misión, quedando asimilados al resto de las proteínas presentes en el proceso.

Por otro lado, las fermentaciones que se llevaran a cabo presentan grandes diferencias que pueden ser favorables para la producción enzimática. Por un lado, la FMS utiliza medios más simples, la maquinaria es poco compleja, se obtienen mayores rendimientos de producto, la demanda de energía es reducida (Gupta y Kar, 2008), tiene un bajo empleo de agua y una baja posibilidad de contaminación. Y en la FML el mezclado es homogéneo lo cual la difusión de los nutrientes no es limitante, el contenido de agua facilita el control de la temperatura y los modelos cinéticos son conocidos.

El presente proyecto está encaminado a la producción de xilanasas con *Aspergillus sp.* en dos tipos de fermentación: fermentación sumergida y fermentación en medio sólido, con lo cual se espera mejorar el rendimiento de la hidrólisis enzimática que puede utilizarse para mejorar o acelerar la degradación de los residuos de la central de abastos de la ciudad de México (CEDA) que se pretende puedan ser utilizados para la producción de bioetanol, tema que actualmente se investiga en el laboratorio de bioingeniería de la universidad iberoamericana.

La producción de las enzimas promueve el aprovechamiento de los residuos orgánicos: de olote de maíz y de la CEDA, como contribución al desarrollo sostenible de la ciudad de México así como en la disminución de los costos del proyecto por la compra de enzimas.

5. OBJETIVOS

Objetivo General

- Producir xilanasas por *Aspergillus sp.* en fermentación sumergida y medio sólido, determinando las mejores condiciones de cultivo para cada caso.

Objetivos Específicos

- Diseñar diferentes medios de cultivo, por medio de la formulación de su composición.
- Determinar las condiciones de cultivo para la elección de la mejor producción de xilanasas.
- Establecer el efecto de las variables de cultivo relevantes sobre la producción de xilanasas en ambos tipos de cultivos a través de un diseño de experimentos.
- Realizar la fermentación sumergida en el reactor BIOFLO III y la fermentación sólida en columnas para determinar la cinética de crecimiento de la biomasa y producción de enzima. Utilizando las mejores condiciones del diseño de experimentos

6. MATERIALES, METODOS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

6.1 Microorganismo

Para este trabajo se utilizó una cepa silvestre de *Aspergillus sp.*, aislada a partir de residuos de la central de Abastos de la Ciudad de México (CEDA). La cepa se propagó en cajas de Petri con medio de cultivo de agar papa y dextrosa (BD Bioxon, cat 211900 México, D. F.) y medio agar rosa de bengala (BD Difco™, catálogo No 218312 México, D. F.) mediante resiembras periódicas. Para su conservación se guardaron en refrigeración.

Para la producción del inóculo para la fermentación en medio sólido se realizó la siembra de la cepa en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de PDA estéril, los matraces fueron incubados a 37°C por cuatro días.

Transcurrido el tiempo de incubación se cosecharon las esporas agregando 20 ml de una solución estéril de tween 80 al 0.05% (v/v) a cada matraz, posteriormente, se homogeneizó la suspensión mediante un agitador magnético, se tomó 1 ml de la suspensión y se realizó una dilución 1:10 con agua destilada para realizar la cuenta de esporas. Las esporas se cuantificaron mediante una cámara de Neubauer.

6.2 Sustratos

6.2.1 Olote de maíz

El olote de maíz seco se obtuvo de San Andrés Cholula, Puebla en México (latitud, 19°03'00" Norte y longitud 98°18'00" Oeste). Se utilizó un molino de martillos hasta alcanzar un tamaño de 1cm de espesor y después por malla 12-16 para obtener el tamaño adecuado. El olote fue usado para hacer los estudios preliminares del efecto del pH y la temperatura sobre las xilanasas, producción bajo diferentes condiciones de cultivo, en los diseños experimentales y finalmente en las dos fermentaciones.

6.2.2 Residuos de la central de abastos de México D.F

Los residuos orgánicos se obtuvieron de la central de abastos de México D.F (CEDA), estaban compuestos principalmente de residuos de frutas, verduras, hortalizas y flores. Se secaron a temperatura ambiente por 7 días y al igual que el olote de maíz se pasó por un molino de martillos para alcanzar un tamaño de aproximadamente 1cm finalmente se utiliza otro molino para llegar a 2mm de

tamaño. Los residuos de la CEDA se utilizaron sólo en el diseño experimental como una de las dos fuentes de carbono para la producción de xilanasas.

6.3 Medio de cultivo

Se formuló el medio de cultivo con base en la composición elemental de hongos filamentosos (tabla 3) tomando el promedio para cada elemento. A partir de esta composición se realizaron los cálculos para la obtención de 5 g/L de biomasa y se propusieron compuestos reportados en trabajos anteriores (Salama y col., 2008; medio Pontecorvo, ATCC 687) junto con el olote como fuente de carbono para la formulación del medio de cultivo requerido en las fermentaciones (tabla 4).

Tabla 3.- Composición elemental de hongos filamentosos, (Lilly, 1965; Aiba *et al*, 1973).

Elemento	g
C	40-63
N	7-10
P	0.4-4.5
S	0.1-0.5
K	0.2-2.5
Na	0.02-0.5
Ca	0.1-1.4
Mg	0.1-0.5
Fe	0.1-0.2

Tabla 4.-Composición medio de cultivo

Compuesto	g/L
Extracto de levadura	0.5
Olote	31.15
NH₄Cl	1.61
KH₂PO₄	0.77
Na₂SO₄	0.11
MgSO₄	0.08
Elementos traza	1ml

Tabla 5.- Composición de los elementos traza

Compuesto	g/100mL agua
CaCl ₂ ·H ₂ O	1
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
ácido etilendiaminotetraacético	0.2

Para preparar el medio de cultivo se disolvieron los compuestos (uno por uno) en 0.8 litros de agua destilada, posteriormente se adicionaron el extracto de levadura y el olote, finalmente se adicionó 1ml de solución de elementos traza (tabla 5) y se aforó a 1 litro. El medio se esterilizó a 121°C y 1Kg/cm² durante 15 minutos. El pH inicial del medio se ajustó con una solución de H₃PO₄ al 5%.

La inoculación se realizó con 1x10⁷ esporas por ml en la fermentación sumergida o 1x10⁷ esporas por gramo de materia húmeda en la fermentación sólida. El mismo medio inoculado se utilizó en los dos tipos de fermentación.

6.4 Determinación de la velocidad radial de crecimiento y la densidad superficial

Para el crecimiento radial de la colonia de *Aspergillus sp.* se llevó a cabo el seguimiento del cambio de diámetro en función del tiempo haciendo una inoculación por piquete en el centro de una caja Petri de 4.3 cm de radio, hasta el momento en que la cepa invadió toda la caja. Las cajas Petri contenían medios de agar papa y dextrosa (BD Bioxon, catálogo No 211900), medio Yeast-Peptone-Dextrose (siglas en inglés YPD, de las marcas BD Bioxon y BD Difco™) y medio agar rosa de bengala (BD Difco™, catálogo No 218312) y se hizo el análisis a diferentes temperaturas.

La densidad superficial fue estimada al tiempo final de los experimentos y el procedimiento se llevó a cabo fundiendo el medio agar con el hongo (biomasa) en agua destilada y filtrando el residuo sólido sobre papel Whatman 41, (previamente seco y pesado), con posterior secado a estufa a 60°C durante 24 horas. La diferencia entre el peso final y el inicial, dividido por el área de la colonia corresponde a la densidad de crecimiento (ρ_x) expresada en mg/cm².

La determinación de la velocidad radial de crecimiento se realizó para conocer en qué medio de cultivo y a que temperatura se obtenía un mejor crecimiento de *Aspergillus sp.*

6.5 Fermentación líquida

La fermentación líquida se realizó en tres niveles:

- a. A nivel matraz: con matraces Erlenmeyer de 500 ml para seleccionar un intervalo de temperatura, pH, relaciones de C/N, tiempo de experimentación sobre la producción de xilanasas para utilizarlos en los diseños experimentales. Las condiciones de temperatura variaron según el experimento a realizar y se mantuvo la agitación en una incubadora a 130 r.p.m (Gyrotory®water bath shaker, New Brunswick scientific CO. INC. Edison, NJ, U.S.A)
- b. A nivel matraz: con un matraz de 2700 ml para realizar la fermentación bajo las condiciones más favorables de producción de xilanasas obtenidas del nivel anterior, la agitación se mantuvo en una incubadora a 130 r.p.m (Gyrotory®water bath shaker, New Brunswick scientific CO. INC. Edison, NJ, U.S.A)
- c. Finalmente se realizó la fermentación en un reactor BIOFLO III de 3.3L escala laboratorio (New Brunswick scientific CO. INC. Edison, NJ, U.S.A), el cual tiene un microprocesador para controlar el pH, DO, agitación, y temperatura, el recipiente es de vidrio con una base superior e inferior de acero inoxidable e impulsores Rushtons de 6 paletas de 1.3 cm.

6.6 Efecto de la temperatura y pH en las xilanasas producidas por *Aspergillus sp.* en fermentación sumergida

En una primera etapa se evaluó el efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad enzimática; esto permitió establecer las condiciones de reacción para los estudios realizados en esta tesis y finalmente se realizó un ajuste con la ecuación de Arrhenius en la fase de incremento de la velocidad.

Para ello, se utilizaron matraces de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo presentado en la tabla 4 y se produjeron los extractos enzimáticos. Las temperaturas utilizadas para realizar los perfiles fueron 30°C, 40°C, 50°C, 60°C y 70°C realizando la medición de la actividad xilanolítica en cada una de estas temperaturas.

Para la variación de pH desde 3 hasta 11 se utilizaron dos tipos de amortiguador: fosfato-citrato (de pH 3 a 7) y carbonato-bicarbonato (de pH 9 a 11).

6.7 Estudios de producción de xilanasas bajo diferentes condiciones de cultivo

Se realizaron experimentos con diferentes concentraciones de carbono la cual se fue variando adicionando la cantidad necesaria de olote de maíz para obtener relaciones de C/N de 17, 25 y 35. Por otro lado, para cada relación de C/N se utilizaron tamaños de matraces Erlenmeyer de 500 ml y 250 ml y la cantidad de medio de cultivo fueron de proporción 1:5 y 1:10.

Por otro lado, se midió la actividad xilanolítica en los 12 matraces en tiempos de experimentación de 15 minutos y 30 minutos para determinar cuál de estos dos tiempos de incubación de las muestras resultaba favorable para su uso en los ensayos de actividad xilanasa que se realizaran posteriormente.

6.8 Determinación de la isoterma de desorción de agua, humedad crítica y actividad de agua en el soporte sólido

Se pesaron 10 g de olote seco y se mezclaron con 35 ml de agua. Después la mezcla se distribuyó en pequeñas capsulas y se secaron en hornos a diferentes temperaturas. En la balanza para medición de humedad se determinó el peso inicial y el peso final de la muestra seca y se midió la actividad de agua en un equipo AquaLab. Se determinó la humedad por la diferencia de pesos, se ajustaron estos datos experimentales al modelo de Henderson y la humedad crítica se determinó por la curva de velocidad de secado, esto con el fin de ajustar un valor de humedad para la fermentación sólida en los matraces y columnas.

Por otro lado, al terminar el tiempo de fermentación sólida de las columnas, el material se homogeneiza y se realizan pruebas de humedad, pH y actividad de agua en los equipos mencionados anteriormente.

6.9 Fermentación sólida

Primero se realizó la fermentación sólida en matraces de 225 ml los cuales se llenaron con aproximadamente 15 gramos de olote impregnado del medio de cultivo a una humedad del 70 % e incubados a 37°C por 72 horas.

Finalmente, se realizó en 10 columnas de vidrio de 2 cm de diámetro interno y 20 cm de longitud. Se llenaron aproximadamente con 21 g de soporte húmedo; el cual, fue olote impregnado con el medio de cultivo a una humedad del 70%. Se colocaron en un baño de agua a temperatura controlada de 37°C y un flujo de

aire de 20ml/min por 72 horas. Todas las columnas están conectadas a un metabolómetro para realizar un análisis de respirometría.

6.10 Determinación de la biomasa en fermentación líquida.

Como una manera indirecta de ver el desarrollo microbiano se realizó una determinación de biomasa. Los cultivos de fermentación líquida se retiraron en los tiempos adecuados y se filtraron con papel de filtro Whatman N° 1; la biomasa retenida se lavó con agua destilada y se secó en el horno a 70°C. Transcurridas 24 horas se retiró y se pesaron 50mg de micelio seco homogeneizado para hidrolizarlo con 1ml de una solución de NaOH 1N. Después, se ponen en un baño hirviendo por 30 minutos, se centrifuga y al sobrenadante se le cuantifican las proteínas del micelio mediante la técnica de Bradford (1976) usando albúmina bovina como estándar.

6.11 Determinación de la biomasa en fermentación sólida

Debido a que la presencia del olote en este tipo de fermentación dificulta la estimación de la biomasa, el crecimiento se determinó indirectamente a través de la producción de CO₂.

La evaluación de consumo de O₂ y la producción de CO₂ sirvió como parámetro para monitorear la degradación del olote por parte de los microorganismos. Como lo menciona Critter y col (2004), la medición de la respiración permite estudiar la actividad microbiana, donde el consumo de O₂ y la producción de CO₂ dependen de factores como biomasa microbiana, temperatura, pH, entre otros.

6.12 Obtención de los extractos enzimáticos

Transcurrido el tiempo de fermentación los extractos de la fermentación líquida se filtraron a través de papel filtro Whatman N° 1. El filtrado se diluyó con agua destilada y se usó inmediatamente para los análisis de la actividad xilanólica.

En la fermentación sólida se vaciaron las columnas pasado el tiempo de fermentación y se homogeneizó el material. Se pesaron 2 g de muestra y se lavaron con 10 ml de agua destilada, se agitó en vortex y se tomaron muestras que se centrifugaron a 8000 rpm por 2 minutos.

6.13 Determinación de actividad xilanasa

La actividad xilanasa se determinó por medio de la liberación de azúcares reductores, por el método de DNS (Miller, 1960). El DNS tiene la capacidad de oxidar los azúcares reductores dando resultados colorimétricos que se pueden medir con una longitud de onda de 640 nm.

Las condiciones del ensayo fueron 30 minutos a 50°C y 130 r.p.m, utilizando como sustrato xilano de madera de haya al 1% en buffer de citrato-fosfato a pH 7 (Rajendran, 2008). Se definió una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de sustrato por minuto. La técnica detallada se muestra en el Anexo 1

6.14 Análisis de proteínas

Este análisis se tomó en cuenta para determinar las U/mg proteína que contenía cada extracto, esta medida me da una referencia de la facilidad de una purificación de una enzima.

Se realizó este análisis para todos los extractos enzimáticos obtenidos de la fermentación sumergida. La proteína fue medida por el método de Bradford (1976) usando albumina bovina como estándar y se lee a 595 nm frente al blanco. El método consiste en la formación de un compuesto de adsorción de coloración azul entre los residuos de aminoácidos básicos de las proteínas y el colorante azul de Coomassie.

6.15 Diseño experimental Plackett-Burman

Una vez que se seleccionaron los intervalos de las variables de experimentación probadas previamente, se aplicó un diseño Plackett-Burman con 6 factores: fuente de carbono, temperatura, pH, relación C/N, fuente de nitrógeno y tween, para conocer la influencia en la variable de respuesta, que en este caso fue la actividad de xilanasa. Cada factor fue evaluado a dos niveles (+1) o (-1) del nivel base, el cual fue escogido por los estudios realizados previamente en nivel matraz.

El diseño experimental fue de 6 factores y 8 experimentos (N=8) (tabla 6 y tabla 7) donde se describen los factores junto con el nivel base, las unidades de cambio y los niveles superior e inferior para cada uno de los parámetros. Se debe tomar en cuenta que el máximo número de factores que se pueden utilizar con N=8 es de 7 factores, en este trabajo se utilizaron 6 factores.

Tabla 6.-Matriz experimental del diseño

Experimento	A	B	C	D	E	F
1	1	-1	-1	1	-1	1
2	1	1	-1	-1	1	-1
3	1	1	1	-1	-1	1
4	-1	1	1	1	-1	-1
5	1	-1	1	1	1	-1
6	-1	1	-1	1	1	1
7	-1	-1	1	-1	1	1
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Tabla 7.-Diseño experimental Plackett-Burman con N=8

FACTORES	Nombre de los factores	Factores	Nivel Base	Unidades de cambio	Nivel superior	Nivel inferior
	Fuente de carbono	A	olote	1.00	olote	CEDA
	Temperatura	B	37.00	11.00	48.00	26.00
	pH	C	7.00	2.00	9.00	5.00
	Relación C/N	D	17.50	3.50	21.00	14.00
	Fuente de nitrógeno	E	NH ₄ Cl	1.00	NH ₄ Cl	Suero de leche
	Tween 80	F	No adicionar	1.00	Si adicionar	No adicionar
	-----	G	0.00	0.00	0.00	0.00

6.16 Diseño de cuadrados latinos

Se utilizó inicialmente el diseño Plackett-Burman para conocer cuáles era las variables más importantes en la actividad xilanólica. Posteriormente, se eligieron 3 factores con 3 niveles cada uno para realizar el diseño de bloques de cuadrados latinos.

Tabla 8.- Diseño cuadrado latino 3x3 elegido para el estudio

		Columnas		
		1	2	3
Filas	I	A	B	C
	II	B	C	A
	III	C	A	B

El diseño propuesto permitió conocer el efecto que tendrían la interacción de los factores en la actividad de xilanasas. En la tabla 8 se muestra el diseño cuadrado latino 3x3 para el estudio de la actividad xilanasas.

7. RESULTADOS

7.1 Velocidad radial de crecimiento de *Aspergillus sp.*

Para el crecimiento radial de la colonia de *Aspergillus sp.* se llevó a cabo el seguimiento del cambio de diámetro en función del tiempo en tres temperaturas diferentes: 30°C, 37°C y 50°C. En la figura 7, 8 y 9 se presentan los perfiles de la evolución de este parámetro para diferentes medios de cultivo y en las temperaturas antes mencionadas y en las tablas 9, 10 y 11 los valores correspondientes al ajuste.

La velocidad radial de crecimiento se describe por la ecuación enunciada por Trinci y Pirt en la cual el radio de la colonia es función lineal del tiempo y la pendiente se define como la velocidad radial de crecimiento [mm/día]

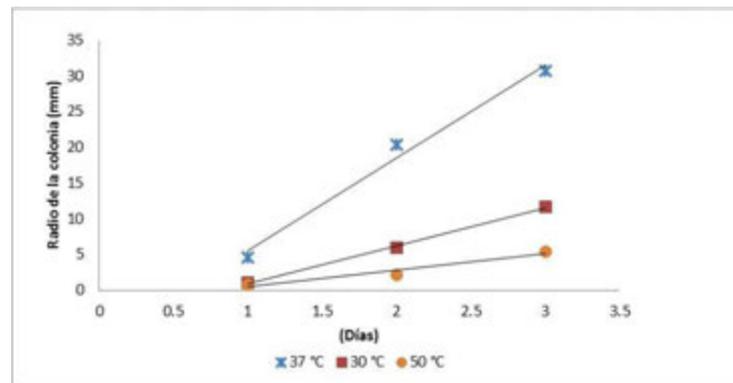


Figura 7.-Crecimiento radial a diferentes temperaturas en medio YPD (las líneas continuas corresponden al ajuste lineal)

Tabla 9.- Ajuste lineal del crecimiento radial a diferentes temperaturas en medio YPD

Temperatura (°C)	Ecuación lineal	Coefficiente de determinación (r^2)
30	$y=5.35x-4.4167$	0.9986
37	$y=13.075x-7.55$	0.9852
50	$y=2.3375x-1.8583$	0.9384

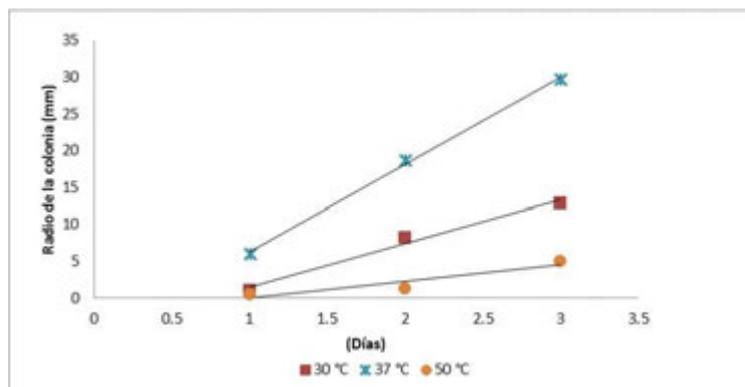


Figura 8.-Crecimiento radial a diferentes temperaturas en medio APD (las líneas continuas corresponden al ajuste lineal)

Tabla 10.- Ajuste lineal del crecimiento radial a diferentes temperaturas en medio APD

Temperatura (°C)	Ecuación lineal	Coefficiente de determinación (r^2)
30	$y=5.95x-4.45$	0.9866
37	$y=11.838x-5.5083$	0.9986
50	$y=2.2875x-2.225$	0.8801

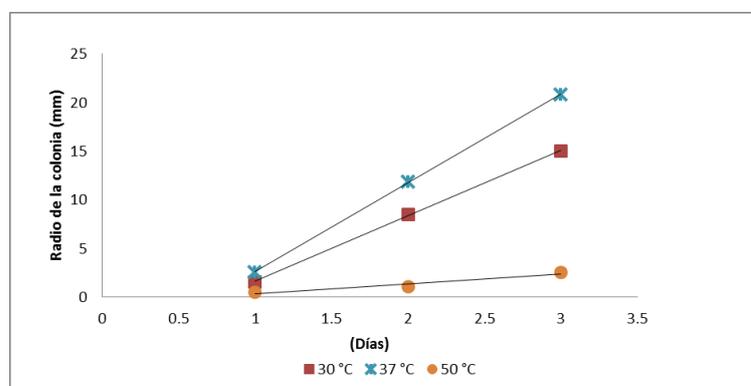


Figura 9.-Crecimiento radial a diferentes temperaturas en medio RB. (las líneas continuas corresponden al ajuste lineal)

Tabla 11.- Ajuste lineal del crecimiento radial a diferentes temperaturas en medio APD

Temperatura (°C)	Ecuación lineal	Coefficiente de determinación (r^2)
30	$y=6.75x-5.166$	0.9995
37	$y=9.15x-6.6$	0.9999
50	$y=x-0.6667$	0.9231

Como fue establecido por Trinci (1969) para *Aspergillus nidulans* y para otros microorganismos fúngicos, en este estudio la evolución de la longitud radial del micelio presenta una alta circularidad en las colonias del hongo y un incremento lineal para todas las concentraciones iniciales de sustrato, este comportamiento lineal corresponde a la fase exponencial de producción de biomasa.

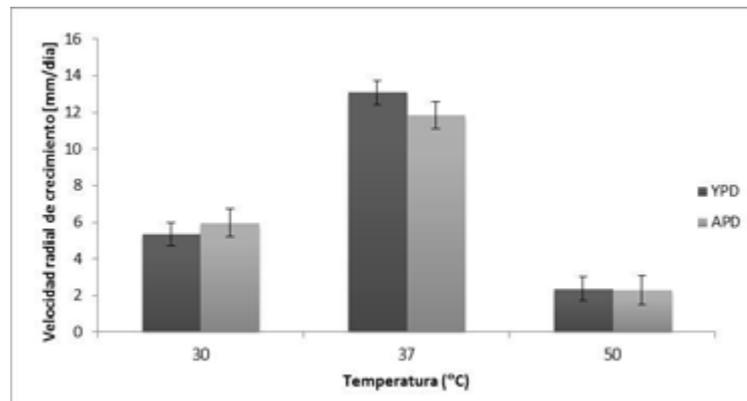
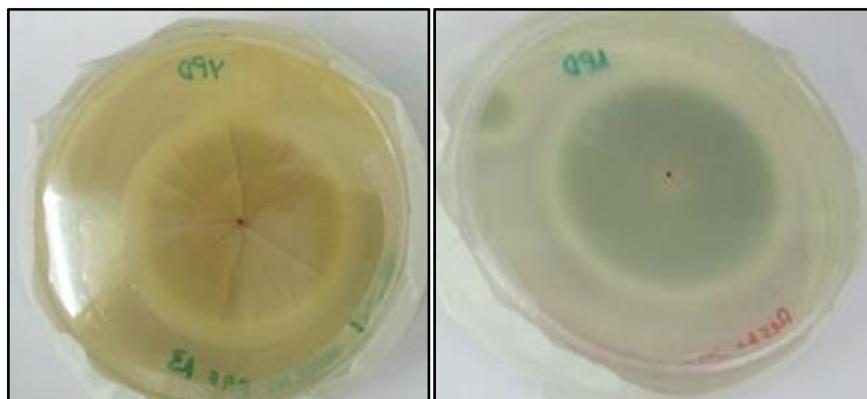


Figura 10.- Velocidad radial de crecimiento en medio YPD y APD a tres temperaturas 30°C, 37°C y 50°C

Podemos observar (Figura 10) la velocidad de crecimiento radial para los tres medios y las tres temperaturas, en donde se muestra un mayor crecimiento es a 37°C y en medio YPD. Para los tres tipos de medio de cultivo *Aspergillus sp.* muestra un comportamiento de crecimiento similar pero se evidencia diferencias en los intervalos de temperatura estudiados, siendo la velocidad de crecimiento más baja para la temperatura de 50°C donde se comienza a limitar el desarrollo del micelio y la deshidratación del medio de cultivo, a 37°C se alcanzan valores de 13 mm/día, por tanto se puede afirmar que la temperatura provoca cambios morfológicos en el desarrollo radial del hongo.



Fotografía 1.-Fotografía del crecimiento micelial de *Aspergillus sp.* en medio YPD y APD inoculado por piquete

7.2 Densidad superficial de *Aspergillus sp.* en medio YPD

La diferencia entre el peso final y el inicial, dividido por el área de la colonia corresponde a la densidad de crecimiento (ρ_x) expresada en mg/cm^2 .

Se puede observar (Figura 11) una mayor densidad superficial a la temperatura de 37°C llegando a un valor de $8,4 \text{ mg}/\text{cm}^2$, la cual coincide con la temperatura donde se obtiene una mayor velocidad radial de crecimiento. Se puede explicar que a dicha temperatura existe una mayor ramificación de las hifas, permitiendo de esta forma la producción de una mayor cantidad de biomasa en la misma área de medio.

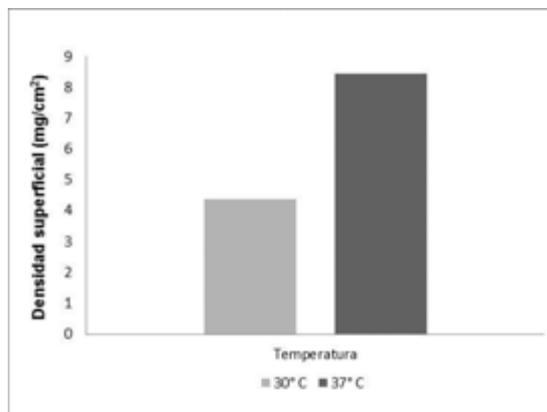


Figura 11.- Densidad superficial de *Aspergillus sp.* en medio YPD

En un estudio semejante presentado por Ortega-Sánchez; Viniestra González (2011) se muestra el cultivo de *Aspergillus niger* sobre placas de agar para determinar la densidad superficial del micelio a distintos tiempos con disponibilidades iniciales de glucosa, $6 \text{ mg S}/\text{cm}^2 < \sigma_0 < 60 \text{ mg S}/\text{cm}^2$ mostrando una densidad superficial máxima de aproximadamente $10 \text{ mg}/\text{cm}^2$ cuando se utiliza la disponibilidad inicial de glucosa máxima. Este valor es semejante al obtenido pero se debe tener en cuenta que en el presente estudio no se variaron las cantidades del sustrato.

Por lo tanto, a partir de este momento se eligió una temperatura de 37°C para el crecimiento del hongo y en cajas Petri con medio YPD.

7.3 Efecto de la temperatura y pH sobre las xilanasas producidas por *Aspergillus sp.* en fermentación sumergida.

7.3.1 Estudio de la actividad a diferentes temperaturas

La elevación de la temperatura incrementa la velocidad de reacción catalizada por enzimas. Al principio la velocidad de reacción aumenta cuando la temperatura se eleva, este efecto podemos observarlo en la figura 12 y se debe al incremento de la energía cinética de las moléculas reactantes. Se llega al punto máximo de actividad xilanolítica a una temperatura de 60°C, siendo esta, la temperatura óptima.

Sin embargo, al seguir incrementando la temperatura la energía cinética de la enzima excede la barrera energética para romper los enlaces débiles de hidrogeno y empieza a predominar la desnaturalización térmica con pérdida de la actividad catalítica (Aldave y Jorrín, 2010). Se puede deducir (Figura 12) que la etapa de desnaturalización empieza a partir de los 60°C con un leve decaimiento de la actividad, lo cual nos muestra una buena termoestabilidad.

Durante la fase de incremento de la velocidad, la relación entre ésta y la temperatura viene determinada por la ecuación de Arrhenius:

$$v = ke^{-E_a/RT} \text{ o en su forma lineal } \ln v = \ln k - \frac{E_a}{RT}$$

Donde, E_a es la energía de activación, R la constante de los gases (1.9872 cal K⁻¹ mol⁻¹; 8.3145 J K⁻¹ mol⁻¹) y T la temperatura absoluta (K).

El valor de E_a se puede calcular a partir de la representación de Arrhenius lineal, donde Y es $\ln v$, x es $1/T$, la ordenada en el origen es $\ln k$ y la pendiente es $-E_a/RT$. La representación lineal de Arrhenius se presenta en la figura 13.

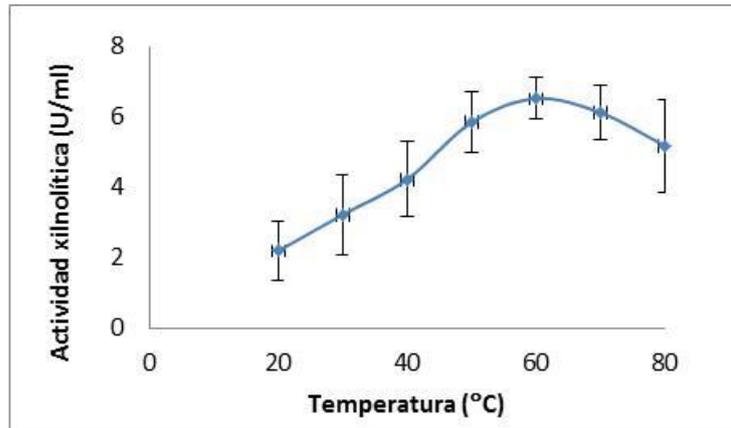


Figura 12.-Efecto de la temperatura sobre la producción de xilanasas en un cultivo en medio líquido con *Aspergillus sp.* Los valores reportados corresponden a los máximos para cada temperatura.

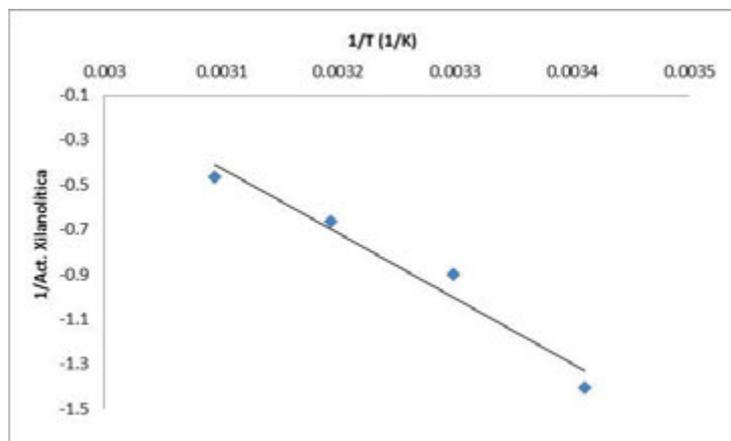


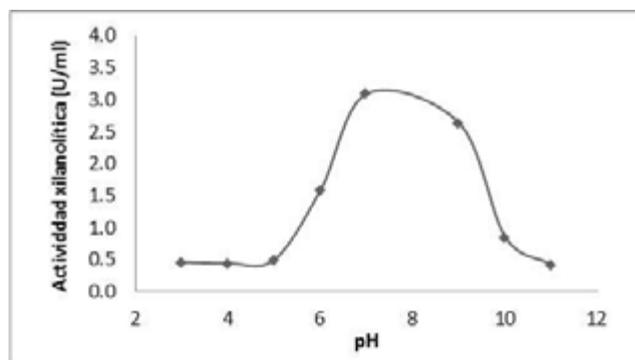
Figura 13.- Representación de Arrhenius. Se muestra la representación de la actividad xilanolítica frente a $1/T$ para el tramo ascendente de la curva de la actividad xilanolítica frente a la temperatura (las líneas continuas representan el ajuste lineal)

El ajuste lineal se presenta por $y = -2910.5x + 8.5985$ ($r^2 = 0.9572$), la pendiente permite determinar un valor de energía de activación de la reacción de la xilanasas de 24.19 kJ/mol.

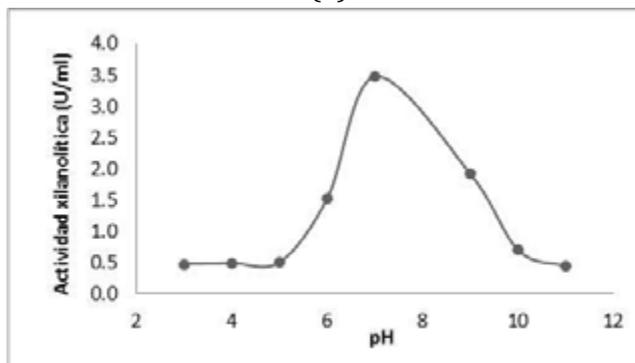
El valor obtenido es muy bajo respecto a los presentados por Garsoux *et al.* (2004); Sonan *et al.* (2007) para dos celulasas las cuales presentan energías de activación de 68.1 (kJ/mol) y 48.5 (kJ/mol); lo cual podría sugerir que la xilanasas es estable a la temperatura y que la reacción enzimática ocurre de forma más rápida. No se encontraron referencias de energía de activación para xilanasas.

7.3.2 Estudio de la actividad a diferentes pH

Como la conformación de las proteínas depende, en parte, de sus cargas eléctricas, habrá un pH en el cual la conformación será la más adecuada para la actividad catalítica, este es el llamado pH óptimo. Podemos ver (Figura 14 (a) y (b)) que el pH óptimo es 7 donde la actividad xilanolítica es máxima y a la temperatura de 60°C es ligeramente mayor que para la de 50°C, lo cual es coherente con la temperatura óptima obtenida anteriormente. Por otro lado, se observa que la enzima es muy sensible a este parámetro por los fuertes cambios en la actividad al modificar el rango de pH, lo cual podría ser porque poseen grupos químicos ionizables (carboxilos -COOH; amino NH₂) en las cadenas laterales de sus aminoácidos, cambiando en cargas eléctricas positivas, negativas o neutras según el pH del medio, (Stryer y col, 2013)



(a)



(b)

Figura 14.- Perfil de actividad a diferentes pH. (a) Actividad xilanolítica a 50°C. (b) Actividad xilanolítica a 60°C

Con base en lo anterior, las xilanasas producidas en el presente estudio muestran mayor actividad en el intervalo de 7 a 9 de pH y altas temperaturas pudiendo sugerir su uso en procesos de blanqueo de pulpa, donde las xilanasas ideales para este tipo de procesos deben funcionar en condiciones básicas (Nissen *et al.*, 1992). En el trabajo presentado por Costa y col. (2012) se describe la caracterización respecto al pH y temperatura de extractos de

xilanasas y otras enzimas de *Aspergillus ficuum*, obteniendo un pH óptimo de 5.4 y una temperatura óptima de 45°C. Zhaoxin *et al.* (2008) determinaron un pH óptimo de 5.0 y una temperatura óptima de 45°C en una de las enzimas del complejo xilanasas de *Aspergillus ficuum* AF-98. La caracterización realizada para tres extractos xilanolíticos llamados XYI, XYII y XYIII de *Aspergillus versicolor* por Salama M.A. *et al.* (2008) obteniendo una temperatura óptima para XYI y XYIII de 70°C y de 50°C para XYII. Y se obtiene un pH óptimo de 10 para XYII y XYIII y para el extracto XYI de 7.

7.4 Estudios de producción de xilanasas bajo diferentes condiciones de cultivo

El presente estudio se realizó para conocer la relación C/N y la relación entre el tamaño del matraz y la cantidad de medio que favorece la producción de xilanasas. Las condiciones uno y dos que se presentan más adelante muestra la variación de la actividad enzimática al cambiar el tiempo de incubación de los extractos enzimáticos en el ensayo de actividad xilanolítica.

7.4.1 Condición 1: variación de la relación C/N, 37°C, 130 rpm, 72 horas de incubación y ensayo de actividad xilanolítica a 15 minutos.

Podemos observar en la tabla 12 que bajo estas condiciones se consigue una mayor actividad xilanolítica en los matraces que contienen una relación C/N de 25 y con un tamaño de 500 mL con 100 mL de medio. También se obtienen buenos resultados para los matraces que tienen un tamaño de 250 mL con 50 mL de medio, podemos deducir que la cantidad que debe ocupar el medio es de aproximadamente un 20% del tamaño del matraz para que la agitación pueda mejorar la transferencia del gas a la biomasa producida en forma de “pellets”, ya que la barrera principal de transferencia del O₂ en la fermentación sumergida, es su baja solubilidad en el agua y, al hacerse mayor la capa de agua que debe cruzar, aumenta la dificultad para que llegue a la célula (Raimbault, 1998).

Tabla 12.-Resultados para la condición 1 (la desviación estándar se calculó para tres muestras)

Muestra	Promedio Actividad U/ml	Desviación estándar
E1 a-b-c	1.944	0.234
E2 a-b-c	1.965	0.063
E3 a-b-c	2.110	0.046

E4 a-b-c	2.434	0.165
E5 a-b-c	2.778	0.076
E6 a-b-c	2.401	0.016
E7 a-b-c	2.516	0.047
E8 a-b-c	1.546	0.091
E9 a-b-c	2.380	0.114
E10 a-b-c	1.816	0.079
E11 a-b-c	1.636	0.064
E12 a-b-c	1.750	0.096

7.4.2 Condición 2: variación de la relación C/N, 37°C, 130 rpm, 72 horas de incubación y experimentación a 30 minutos.

Al aumentar a 30 min el tiempo de experimentación (tabla 13) podemos ver que existe un incremento en las actividades xilanolíticas para todos los matraces, es por esto, que todos los ensayos de actividad xilanolítica posteriores se realizaron con este tiempo de experimentación. También, se siguen manteniendo las mejores condiciones para la relación de C/N de 25 y el matraz que tiene un tamaño de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo.

Tabla 13.-Resultados para la condición 2 (la desviación estándar se calculó para tres muestras)

Muestra	Promedio de actividad xilanolítica [U/ml]	Desviación estándar [σ]
E1 a-b-c	2.054	0.085
E2 a-b-c	2.761	0.126
E3 a-b-c	2.619	0.025
E4 a-b-c	3.433	0.047
E5 a-b-c	3.693	0.121
E6 a-b-c	3.636	0.052
E7 a-b-c	3.329	0.169
E8 a-b-c	2.759	0.075
E9 a-b-c	3.409	0.066
E10 a-b-c	3.024	0.050
E11 a-b-c	2.730	0.065
E12 a-b-c	2.520	0.022

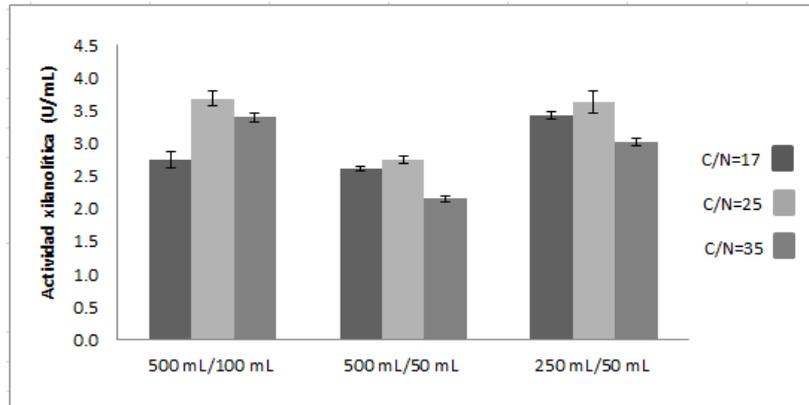


Figura 15.-Comparación de los matraces con las diferentes relaciones de C/N

En el diagrama de barras (Figura 15) se comparan los diferentes matraces con las diferentes relaciones C/N, para los 3 casos mostrados la actividad xilanólítica es mayor en la relación C/N de 25, obteniéndose un incremento de aproximadamente 1U/mL cuando se usa la proporción 1:5 y la relación de C/N de 35 baja la actividad xilanólítica pudiendo ocurrir porque al aumentar la cantidad de olote de maíz es más difícil el crecimiento del microorganismo, la homogenización del medio de cultivo y por ende la baja la producción enzimática.

A partir de este estudio los matraces utilizados para la fermentación sumergida son los de 500 mL con 100 mL de medio de cultivo, el tiempo del ensayo de actividad xilanasa de 30 min y la relación C/N fue estudiada más a fondo en los diseños experimentales.

7.5 Aplicación del diseño experimental Plackett-Burman

En la tabla 14 podemos apreciar los valores cualitativos y cuantitativos de los factores utilizados cuando se reemplazan en la matriz experimental del diseño (tabla 7). Las fuentes de carbono se escogieron en base a su disponibilidad en el laboratorio y por su gran contenido de material lignocelulósico (inciso 6.2). El suero de leche escogido como fuente de nitrógeno alterna al cloruro de amonio (NH_4Cl), se utilizó porque no contiene nitrógeno inorgánico y la cantidad de proteínas es relativamente alta; debido a ello es un excelente medio para microorganismos que requieren aminoácidos y son capaces de hidrolizar las proteínas, la cantidad de suero de leche (g/L) utilizada en los medios de cultivo fue la misma que para el NH_4Cl .

Tabla 14.-Matriz experimental con los valores cualitativos y cuantitativos para cada factor

Exp.	A	B	C	D	E	F	Respuesta
	Fuente de carbono	Temperatura [°C]	pH	C/N	Fuente de nitrógeno	Tween 80 [2mL/L]	Actividad xilanolítica [U/mL]
1	Olote	26	5	21	Suero de leche	Si	1.286
2	Olote	48	5	14	NH ₄ Cl	No	5.029
3	Olote	48	9	14	Suero de leche	Si	3.725
4	CEDA	48	9	21	Suero de leche	No	0.665
5	Olote	26	9	21	NH ₄ Cl	No	0.289
6	CEDA	48	5	21	NH ₄ Cl	Si	0.000
7	CEDA	26	9	14	NH ₄ Cl	Si	0.415
8	CEDA	26	5	14	Suero de leche	No	0.153

Los efectos agrupados en el error experimental fueron los siguientes:

$$P(E) = -0.012$$

$$P(F) = -0.089$$

El valor del error experimental es $\sigma = 0.239$

Por consiguiente los parámetros que se tuvieron en cuenta para la obtención del modelo fueron:

$$P(A) = 1.137$$

$$P(C) = -0.172$$

$$P(B) = 0.910$$

$$P(D) = -0.885$$

Y el modelo obtenido es:

$$Y_{\text{calc.}} = 1.445 + 1.137*A + 0.910*B - 0.172*C - 0.885*D$$

Por medio de este modelo se pueden obtener las superficies de respuesta las cuales nos permiten analizar la influencia de los factores en la actividad xilanolítica, ya que el diseño PB sólo utiliza dos niveles, superior e inferior, la superficie de respuesta corresponde a un polinomio lineal (Figuras 16 a 19), la respuesta de la variable dependiente se incrementa cuando se utiliza olote como fuente de carbono, el pH y la relación C/N en nivel inferior y la temperatura en nivel superior, (Figura 16). Por el contrario la actividad enzimática disminuye cuando se usa residuos de CEDA como fuente de carbono, el pH y la relación C/N en el nivel superior y la temperatura en el nivel inferior, (Figura 19).

Al usar olote de maíz, derivado agrícola como un sustrato-soporte para el crecimiento fúngico en un proceso fermentativo es de amplio interés industrial y acapara la atención de los investigadores así como los industriales, pudiendo generar nuevas tecnologías para la obtención de la xilanasa y una posible aplicación futura del olote de maíz. Está compuesto en base seca por celulosa (45 %), hemicelulosa (35 %) y lignina (15 %), de los cuales la hemicelulosa se compone mayoritariamente por xilano de olote (28-35 % base seca) uno de los heteroxilanos complejos que contiene residuos de xilosa con enlaces β -1,4 (Saha y Bothast, 1999). El xilano de olote de maíz se compone principalmente de xilosa (48-54 %), arabinosa (33-35 %), galactosa (5-11 %) y ácido glucurónico (3-6 %) (Doner y Hicks, 1997; Saha y col., 2003). Estas características y primordialmente la cantidad de xilosa, le confieren al olote la posibilidad de ser empleado como sustrato en la producción de la xilanasa.

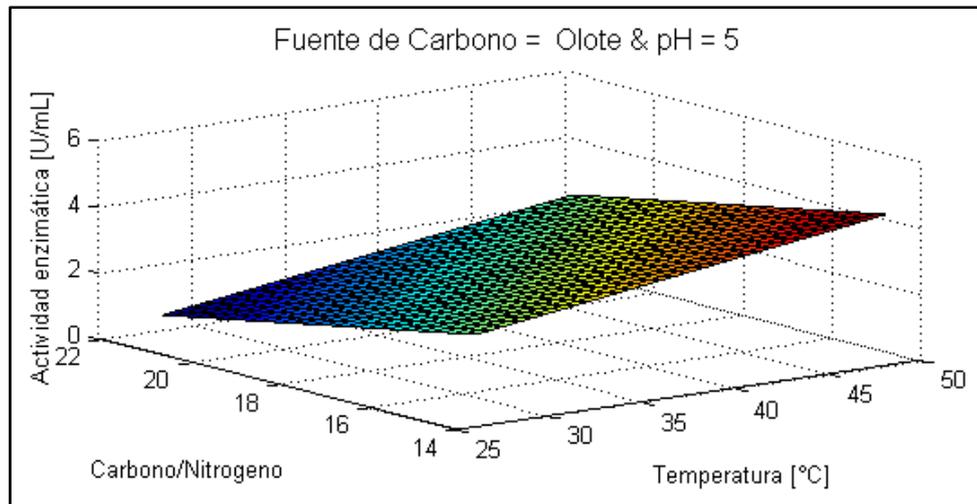


Figura 16.-Superficie de respuesta: nivel superior para olote, temperatura y nivel inferior para C/N y pH

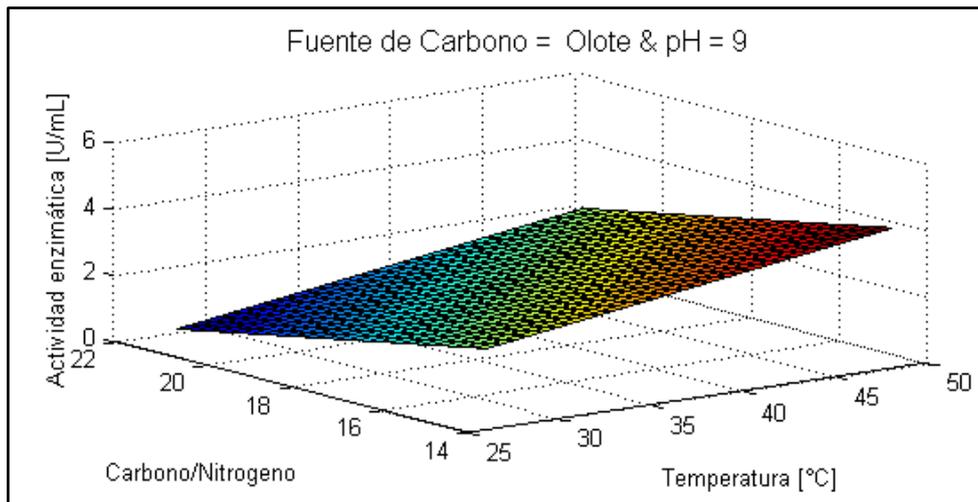


Figura 17.-Superficie de respuesta: nivel superior para olote, pH, temperatura y nivel inferior para C/N

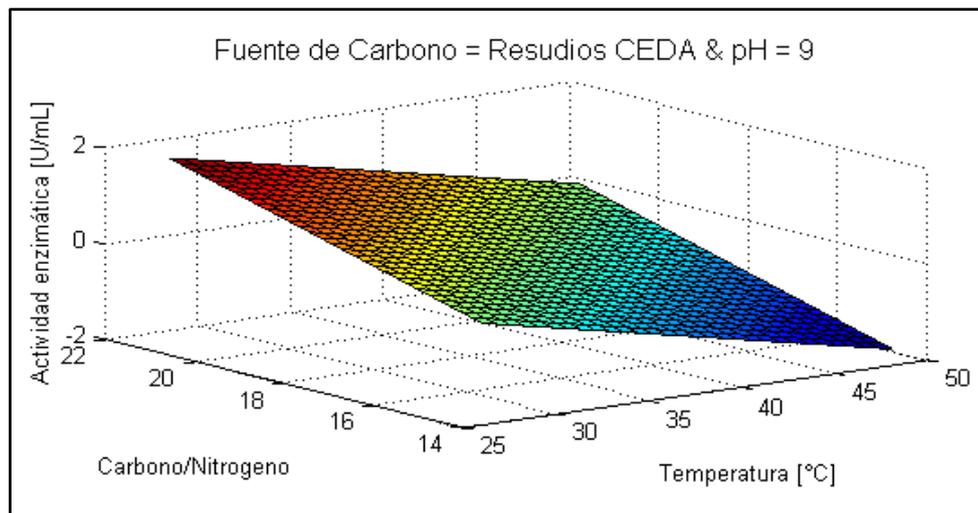


Figura 18.-Superficie de respuesta: nivel superior para pH, C/N y nivel inferior para fuente de carbono y temperatura

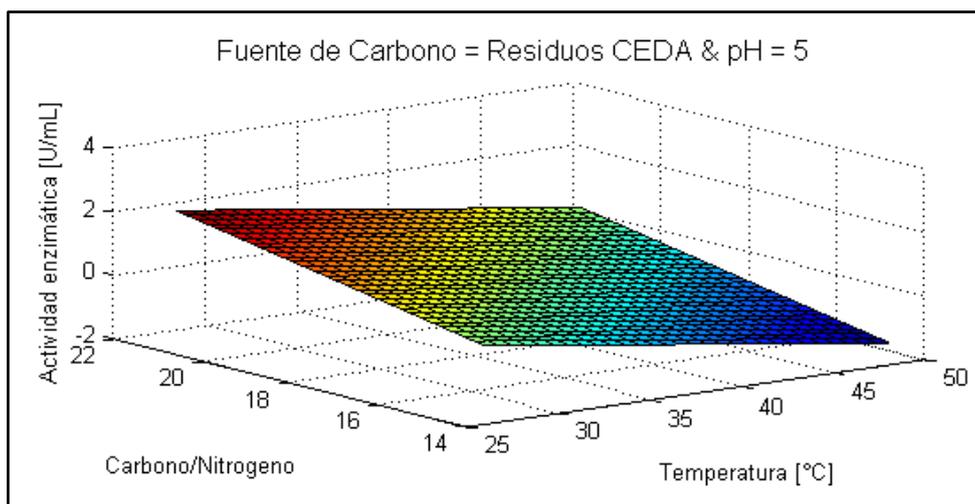


Figura 19.-Superficie de respuesta: nivel superior para C/N y nivel inferior para fuente de carbono, pH y temperatura

7.6 Diseño cuadrados latinos

De los resultados obtenidos en el diseño Plackett-Burman se eligieron tres factores para la evaluación de su influencia sobre la producción de xilanasas: pH, relación C/N y temperatura, esto para determinar un valor fijo para las variables en las siguientes fermentaciones. El olote de maíz fue escogido como el sustrato para realizar el diseño de cuadrados latinos y para las fermentaciones en los matraces y en el reactor.

A continuación se mostrará el arreglo utilizado y el análisis para determinar la influencia de los factores, el experimento 1 estaría conformado por (pH 4, C/N 14 y T 37°C), el experimento 2 (pH 4, C/N 19 y T 44°C), el experimento 3 (pH 4, C/N 25 y T 50°C) y así sucesivamente.

Tabla 15.- Diseño de cuadrados latinos escogido para evaluar la producción de xilanasas.

	Relación C/N		
pH	C/N-1	C/N-2	C/N-3
pH-1	T-1	T-2	T-3
pH-2	T-2	T-3	T-1
pH-3	T-3	T-1	T-2

Tabla 16.- Diseño de cuadrados latinos con el valor de cada uno de los factores: temperatura, C/N y pH

		Relación C/N		
		C/N=14	C/N=19	C/N=25
pH	4	37°C (1a)	44°C (1b)	50°C (1c)
	6	44°C (2a)	50°C (2b)	37°C (2c)
	8	50°C (3a)	37°C (3b)	44°C (3c)

Los resultados para cada uno de los experimentos se muestran en la tabla 17, cada uno de los experimentos se hizo por duplicado y el valor mostrado es el promedio de los valores obtenidos de actividad xilanasa en U/ml.

Tabla 17.- Resultado para cada uno de los experimentos del diseño de cuadrados latinos

Matraz	U/mL	U/mg prot
1a	14.65	682.35
1b	16.40	60.41
1c	12.32	282.50
2a	12.16	292.11
2b	17.76	379.41
2c	18.66	51.57
3a	0.056	0.50
3b	8,509	169.20
3c	4,135	308.64

Formalmente el modelo aditivo es

$$Y_{ijt} = \eta + \beta_i + \gamma_j + \tau_t + \varepsilon_{ijt}$$

donde η es el gran promedio, que no tiene que ver con las variables en consideración.

β_i son los $i=1,2\dots k$ efectos por fila (pH)

γ_j son los $j=1,2\dots k$ efectos por columna (relación C/N)

τ_t son los $t=1,2\dots k$ efectos por tratamiento (temperatura)

ε_{ijt} es el error de observación

7.6.1 Fenómeno manifestado

El fenómeno manifestado es la suma de cuadrados de los 9 resultados experimentales de la tabla 17, esto es, son los resultados observados (arriba o debajo del cero) elevados al cuadrado, se calcula así:

$$14.648^2 + 16.397^2 + \dots + 8.509^2 + 4.135^2 = 1535.85$$

Y como ha sido derivado de 9 resultados experimentales cuenta con 9 grados de libertad.

7.6.2 Gran promedio

El gran promedio se calcula simplemente:

$$14.648+16.397+\dots+8.509+4.135/9=11.626$$

Y representa el valor que asumirían las 9 pruebas si ninguna de las variables en estudio, tuviera influencia en el fenómeno.

Representa en su suma de cuadrados $(11.626)^2 \cdot 9 = 1216.45$ con 1 solo grado de libertad.

Luego de 1535.83 de fenómeno manifestado, 1216.45 son debidos a influencias ajenas a las variables de estudio, y estas responder por

$$1535.83-1216.45=319.38$$

7.6.3 La influencia del pH

Se estima como sigue:

El pH 1 tiene un valor promedio de $14.648+16.397+12.317/3 = 14.45$, luego respecto del gran promedio su influencia es de $14.454-11.626=2.828$.

Del mismo modo se determina para el resto de pH y demás variables de estudio.

El pH 2 tiene una influencia de 4.564 y el pH3 de -7.393.

El pH representa en suma de cuadrados un valor de:

$$3 \cdot (2.828)^2 + 3 \cdot (4.564)^2 + 3 \cdot (-7.393)^2 = 64.32 \text{ con 2 grados de libertad.}$$

7.6.4 La influencia de la relación C/N

Se estima como se hizo para el caso del pH:

La relación C/N 1 tiene una influencia de -2.673, la relación C/N 2 de 2.596 y la relación C/N 3 de 0.077.

Y representa en suma de cuadrados un valor de 41.872 con 2 grados de libertad.

7.6.5 La influencia de la temperatura

Para la temperatura T1 es de 2.312, de la temperatura T2 de 1.793 y de la temperatura T3 de -1.582.

Y representa en suma de cuadrados un valor de 20.928 con dos grados de libertad.

7.6.6 Determinación de errores experimentales

Para determinar los errores se tiene en cuenta los resultados de los experimentos, el gran promedio y la influencia de las variables.

Por ejemplo para determinar el ε_{111} según el modelo

$$14.648 = 11.626 + 2.828 + (-2.673) + 2.312 + \varepsilon_{111}$$

Por lo tanto $\varepsilon_{111} = 0.555$. Para el resto de los errores se calcula de la misma forma obteniéndose:

Tabla 18.- Errores experimentales del diseño de cuadrados latinos

Error experimental	valor
ε_{111}	0.555
ε_{122}	-2.445
ε_{133}	-0.632
ε_{212}	-3.154
ε_{223}	0.555
ε_{231}	0.077
ε_{313}	0.077
ε_{321}	-0.632
ε_{332}	-1.968

Que representa en suma de cuadrados un valor de 21.229.

El resumen de todos los valores obtenidos se muestra a continuación:

Tabla 19-. Resumen de valores de las variables escogidas en el diseño de cuadrados latinos y su suma de cuadrados medios (SCM)

Fenómeno manifestado	Suma cuadrados	Grado de Libertad	Suma de cuadrados medio (SCM)	relación de SCM
Gran promedio	1216.4516	1	1216.452	
pH	64.319	2	32.160	3.029
Relación C/N	41.872	2	20.936	1.972
Temperatura	20.928	2	10.464	0.985
Errores de observación	21.229	2	10.614	

Indicando que el pH contribuye significativamente a la producción de la xilanas es por esto que en la mayoría de los estudios de optimización, el pH se ha

tomado en cuenta como una de las variables más relevantes del proceso (Jecu, 2000; Panagiotou *et al.*, 2003; Shah y Madamwar, 2005; Jing *et al.*, 2007). En los resultados presentados en la tabla 17 podemos observar que los experimentos 2a, 2b y 2c que corresponden al pH 6 (influencia de 4.564) son donde se tienen mejores resultados de actividad xilanólítica, seguidos por el pH 4.

Haciendo un análisis de los resultados de la tabla 19 y los presentados en los incisos anteriores las condiciones elegidas para continuar con las fermentaciones a nivel matraz de 2.5 L, en el reactor BIOFLO III y la fermentación sólida fueron las siguientes: una temperatura de 37°C, pH de 4 y una relación C/N de 14, específicamente para el pH se eligió pH 4 ya que los resultados de la actividad específica (U/mg proteína) fueron más altos y su influencia de 2.828.

7.7 Evaluación cinética con las condiciones elegidas de los diseños experimentales en fermentación líquida

Las condiciones experimentales que se utilizaron después de los estudios mostrados anteriormente fueron las siguientes: matraz de 2.5 L, a 130 rpm, 37°C, pH 4, inoculado con 1×10^8 esporas/mL y con 560 mL de medio de cultivo usando olote como fuente de carbono y NH_4Cl como fuente de nitrógeno. En la tabla 20 se muestra la actividad enzimática obtenida y podemos observar la tendencia cinética que se obtuvo en la producción de la xilanasa en un tiempo de fermentación de 90 horas (Figura 20).

Tabla 20.-Resultado de la actividad xilanólítica en fermentación sumergida para un matraz de 2.5 L

Horas	Matraz	mg/mL de xilanasa	U/mL promedio de xilanasa	U/mg proteína promedio	desviación estándar (U/mL)	desviación estándar (U/mg)
12	12-a	0.030	0.107	-0.481	0.057	0.255
	12-b	0.066				
24	24-a	0.246	0.540	1.728	0.009	0.030
	24-b	0.240				
36	36-a	0.276	0.726	13.370	0.160	2.949
	36-b	0.378				
48	48-a	0.276	0.593	14.014	0.028	0.668
	48-b	0.258				
60	60-a	0.798	1.832	50.459	0.085	2.335
	60-b	0.852				
72	72-a	3.996	9.085	125.661	0.301	4.169
	72-b	4.188				
90	90-a	3.216	6.891	40.947	2.788	16.567
	90-b	4.992				

Por otro lado, debido a que el tamaño del matraz y la cantidad de medio han aumentado se muestra un periodo de adaptabilidad del microorganismo y producción de la enzima mayor que en los casos anteriores debido a las dificultades existentes en la transferencia de oxígeno al interior del medio de cultivo.

El perfil de producción nos muestra que a las 24 horas se empieza a obtener xilanasa, hasta las 48 horas se mantiene la actividad enzimática estable y a partir de este momento se muestra un incremento acelerado en la actividad de la xilanasa hasta alcanzar la actividad máxima (9.08 U/mL) a las 72 horas de fermentación.

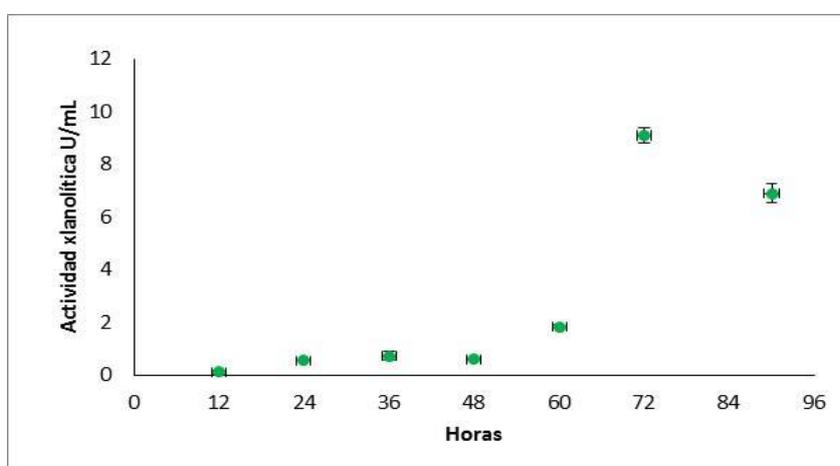


Figura 20.-Cinética de producción de xilanasa en fermentación sumergida en matraz de 2.5 L

7.8 Fermentación en el reactor BIOFLO III de 3.3 L para la producción de xilanasas por *Aspergillus sp.*

Después de haber realizado las fermentaciones a nivel matraz para la aplicación de los diseños experimentales y posterior selección de las mejores condiciones de cultivo se llevó a cabo la fermentación en el reactor BIOFLO III de 3.3 L bajo las siguientes condiciones: una temperatura de 37°C, pH del medio de 4, la relación C/N de 14, volumen de trabajo de 2.5 L (el cual corresponde a un volumen de 70% de la capacidad del reactor), el inóculo de 1×10^8 esporas/mL y la aireación se ajustó a 1 SLPM.

Se observó un aumento en la viscosidad del medio a medida que transcurría el tiempo de la fermentación ya que existe mayor cantidad de micelio fragmentado. Se agregó antiespumante durante la fermentación para que se mantuviera un nivel adecuado en el reactor, se disminuyeran problemas de la circulación de gases y se mantuvieran las condiciones de mezclado.

El resultado de la fermentación (tabla 21) muestra un incremento de la actividad xilanolítica en el transcurso de las horas. Entre las 0 y las 20 horas se observa el periodo de adaptabilidad y a partir de este momento se tiene un aumento considerable en la actividad encontrando el punto máximo a las 63 horas, aunque la productividad máxima se obtiene a las 44 horas.

En comparación con la cinética obtenida en el matraz de 2.5L podemos observar que se empieza a obtener la enzima en un periodo menor, que el punto máximo de actividad se alcanza aproximadamente 10 horas antes y que la cantidad de enzima obtenida se duplica.

Estas diferencias en el comportamiento cinético se pueden presentar puesto que en los matraces en agitación no se permite una buena transferencia de masa cuando la demanda de oxígeno es alta (Büchs, 2001; Henzler y Schedel, 1991).de acuerdo a la literatura esto podría causar una menor conversión del carbono del sustrato en biomasa(Undurraga *et al.*,2001); estas limitaciones pudieron mejorarse al utilizar el reactor BIOFLO III con agitación continua por turbinas y el efecto del uso de los baffles los cuales disminuyen la formación de zonas estancadas.

Tabla 21.-Resultado de la actividad xilanolítica en fermentación sumergida para el reactor BIOFLO III de 3.2 L

Tiempo [h]	Concentración [mg/ml]	Actividad xilanolítica [U/ml]	Actividad xilanolítica específica [U/mg de proteína]	Productividad [U/L*h]
0	0.107	0.237	0.929	0.000
18	0.966	2.145	6.354	119.177
24	2.926	6.496	33.658	270.667
28	3.548	7.877	22.966	281.329
38	5.200	11.546	32.708	303.844
44	8.736	19.397	24.007	440.850
48	9.117	20.243	43.255	421.737
52	9.720	21.581	40.490	415.028
63	10.167	22.574	35.662	358.320

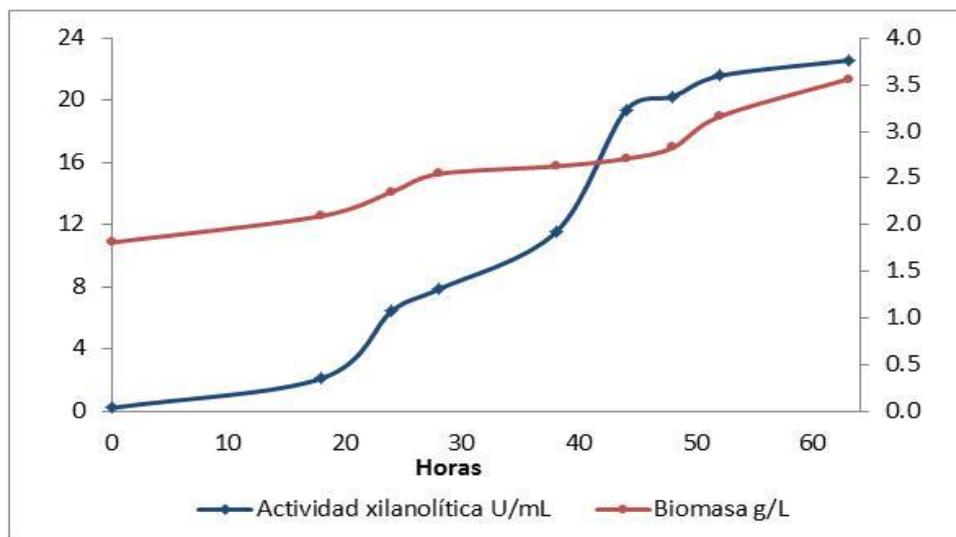


Figura 21.-Perfil de la fermentación en reactor BIOFLO III de 3.2 L

En el perfil mostrado (Figura 21.) podemos observar que la relación del crecimiento de la biomasa con la formación del producto, en este caso la enzima, podría considerarse como asociada al crecimiento, la cual, es característica de la producción de metabolitos primarios.

Para encontrar la tasa de crecimiento (μ) constante en la fase exponencial se realizó la gráfica de $\ln X$ vs t (Figura 22), la cual nos ayuda a determinar un valor de $\mu=0.01 \text{ h}^{-1}$.

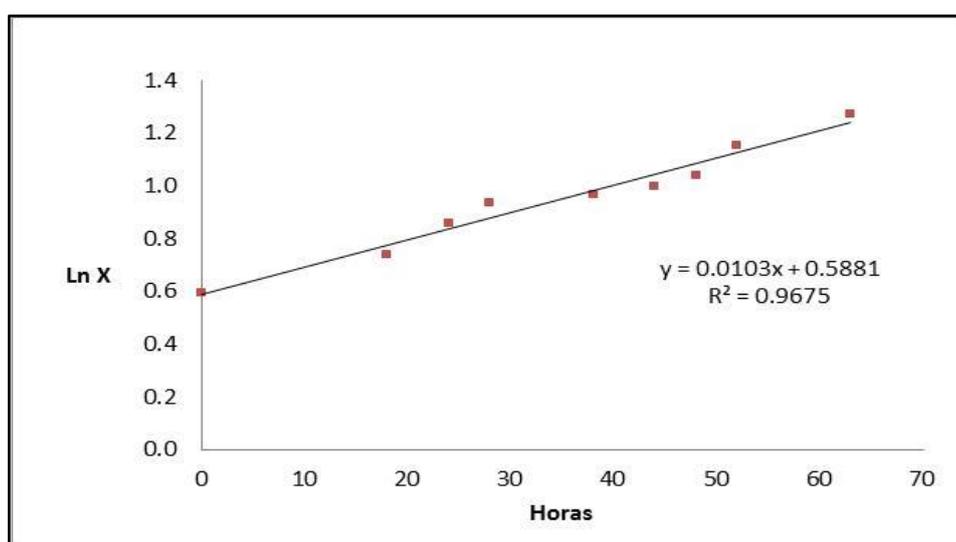


Figura 22.- Perfil para la determinación de la velocidad específica de crecimiento μ , calculadas a partir de los datos experimentales de la biomasa X

Por otro lado, se estudia la velocidad de la reacción enzimática la cual nos proporciona información directa acerca del mecanismo de la reacción catalítica y de la especificidad de la enzima. La medida se realiza siempre en las condiciones óptimas de pH y temperatura y se utilizan concentraciones saturantes de sustrato. En estas condiciones, la velocidad de reacción observada es la velocidad máxima (V_{max}).

Se realiza la representación gráfica de Lineweaver-Burk, donde la pendiente es K_m/V_{max} , la abscisa en el origen ($1/v=0$) es $-1/K_m$ y la ordenada en el origen ($1/[S]=0$) es $1/V_{max}$.

La tabla 22 nos muestra los datos utilizados para realizar la Figura 23 y los resultados de la velocidad máxima y la constante de Michaelis-Menten se resumen en la tabla 23. El valor obtenido de K_m es de 8.60 mg/ml para xilano de abedul como sustrato a 50°C y pH 7, algunos valores de K_m reportados en la literatura para enzimas extracelulares purificadas de hongos termófilos son de 8.3 mg/ml para xilano de abedul y de 20mg/ml para xilano de avena (Ishihara *et al.*, 1997). Okeke y Obi(1993) reportaron un valor de K_m para xilano de avena fue de 7.7 mg/ml para xilanasas purificadas de *Arthrographis spy*. Carmona *et al* (1998) reportó un valor de K_m de 6.5 mg/mL para una endoxilanasas purificada de *Aspergillus versicolor*.

Por lo tanto podemos ver que el valor obtenido se encuentra cercano a estos valores y nos puede dar una idea de que el olote de maíz induce la producción de la xilanasas (buena afinidad de esta enzima por el sustrato). La velocidad de reacción máxima es 17.82 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína, la cual es menor a la obtenida por Chidi *et al.* (2008) para una xilanasas extracelular purificada de *Aspergillus terreus* UL 4209 para la cual se obtiene una V_{max} de 55 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína y que la obtenida por Carmona *et al.* (1998) para una endoxilanasas purificada de *Aspergillus versicolor* la cual fue de 1440 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$ proteína.

Tabla 22.- Parámetros para la obtención de los parámetros de velocidad máxima y constante de Michaelis-Menten

U/ml xilanasas	1/U	%p/v	mmol	1/mmol
5.933	0.169	2	0.506	1.975
4.254	0.235	1	0.253	3.950
3.004	0.333	0.5	0.127	7.900
1.655	0.604	0.25	0.063	15.800
1.021	0.980	0.125	0.032	31.600
0.535	1.868	0.0625	0.016	63.200

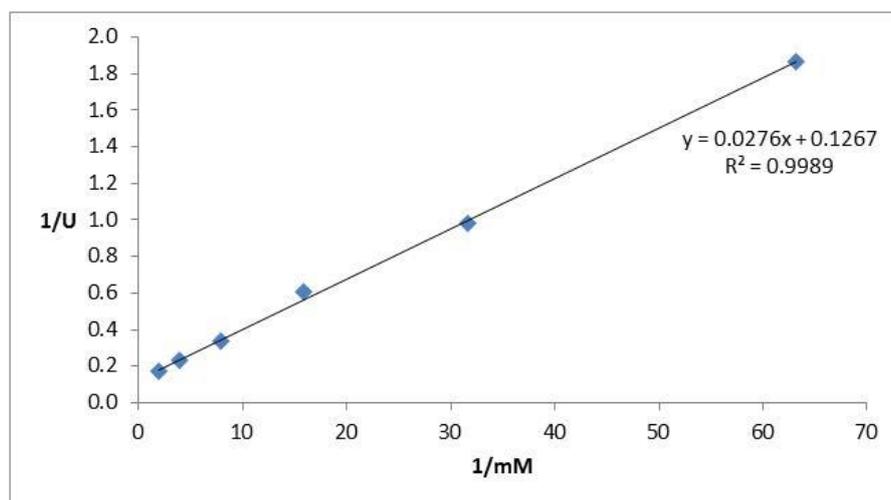


Figura 23.- Representación gráfica de Lineweaver-Burk para la obtención de los parámetros cinéticos V_{max} y K_m

Tabla 23.- Valores obtenidos de los parámetros cinéticos: velocidad máxima y constante de Michaelis-Menten

1/ V_{max}	V_{max} [U/mL]	V_{max} [U/mg]	K_m/V_{max}	K_m [mmol]	K_m [mg/ml]
0.1267	7.893	17.82	0.028	0.218	8.604

7.9 Fermentación sólida en columnas utilizando como soporte sólido olote de maíz.

7.9.1 Caracterización del olote, determinación de la isoterma de desorción de agua y humedad crítica

El papel del agua es clave ya que es un componente dominante en la composición de la biomasa, además facilita los intercambios gaseosos y sirve de vehículo para las enzimas y los nutrientes. Una humedad elevada en el sustrato causa una disminución de la porosidad del sustrato, una baja difusión de oxígeno y una alta contaminación. Al contrario, una baja humedad conduce a un crecimiento limitado y disminuye la disponibilidad del sustrato (Roussos y Gaime, 1996)

En las fermentaciones en estado sólido el agua tiene un efecto directo en la morfología de los hongos filamentosos; recientemente Gervais y Molin (2003) llevaron a cabo una revisión bibliográfica de este efecto a niveles macro y

microscópico sobre el crecimiento de hongos filamentosos. A nivel macroscópico el efecto de la actividad del agua se observa en que un crecimiento radial y una producción de biomasa adecuados se obtienen únicamente con un valor óptimo en la actividad de agua para cada especie fúngica; este valor es un poco menor a 1 para todos los hongos estudiados. Microscópicamente los cambios en la actividad del agua del medio implican modificaciones en la tasa de crecimiento de las hifas, en la orientación y en el crecimiento de las ramificaciones.

Para la caracterización del sustrato se realizaron pruebas para la obtención de la actividad de agua y porcentaje de humedad de una muestra de olote saturada con agua destilada (Anexo 2).

La figura 24 nos muestra la isoterma de desorción de agua ajustada al modelo de saturación de Henderson, el cual tiene dos parámetros C y n , específicos de cada sustancia, el modelo se describe a continuación:

$$M_w = \left[\frac{-Ln(1 - a_w)}{C} \right]$$

Dónde:

M_w : Contenido de humedad

a_w : Actividad de agua del sistema

C : Constante del modelo

n : Constante del modelo que describe el grado de interacción del agua con el soporte durante el secado. Entre menor sea n el grado de interacción agua-soporte es menor y viceversa.

Para nuestro caso, el olote presenta un valor de $n= 0.367$, el cual es un poco mayor al encontrado para la agrolita ($n=0.317$) y menor que el encontrado para el aserrín ($n=0.916$). Se presenta la tabla de datos utilizada para realizar la figura 24 (Anexo 3). Como podemos observar los datos experimentales se ajustan al modelo de forma significativa obteniéndose un error promedio $r^2=0.193$, los puntos donde se encuentra una mayor diferencia entre los datos experimentales y el modelo son donde las actividades de agua son mayores y que podría presentarse por la inexactitud propia de las mediciones experimentales y del instrumento de medida.

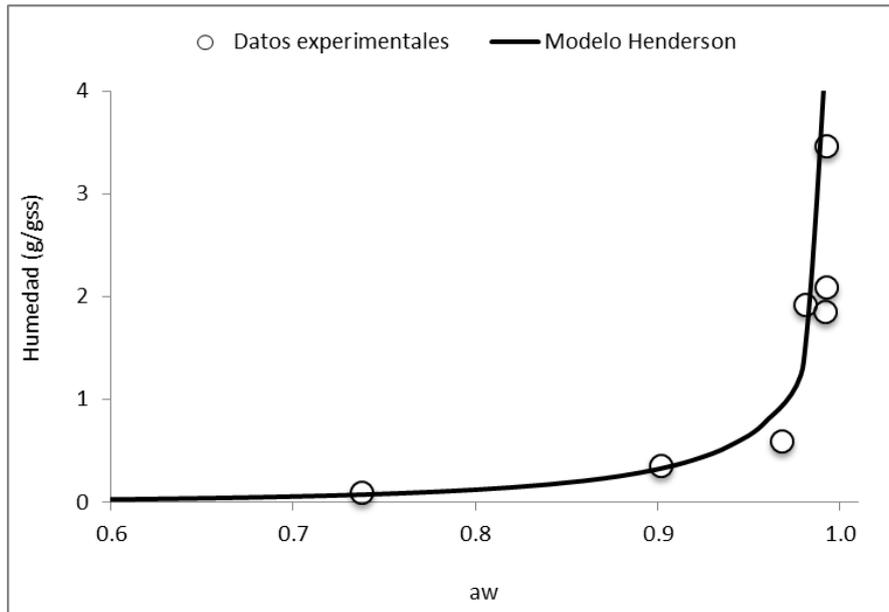


Figura 24.- Gráfica de a_w vs %H para la obtención de la isoterma de desorción de agua, la línea continua (—) corresponde al ajuste del modelo de Henderson a los datos experimentales obtenidos del olote.

En este análisis también se realizó la curva de velocidad de secado, la cual nos muestra un periodo de régimen constante y uno de velocidad de secado decreciente; un parámetro muy importante a determinar es la humedad a la cual se cambia del primero al segundo período se llama humedad crítica, esta depende del tipo del material y de la relación de secado en el primer período.

Para estimar la zona de velocidad de secado decreciente se tomaron datos con dos criterios:

- 1) A partir del dato de velocidad correspondiente al 25% de la velocidad a secado constante
- 2) Los pares de datos necesarios para tener un coeficiente de regresión (r^2) similar a 0.98

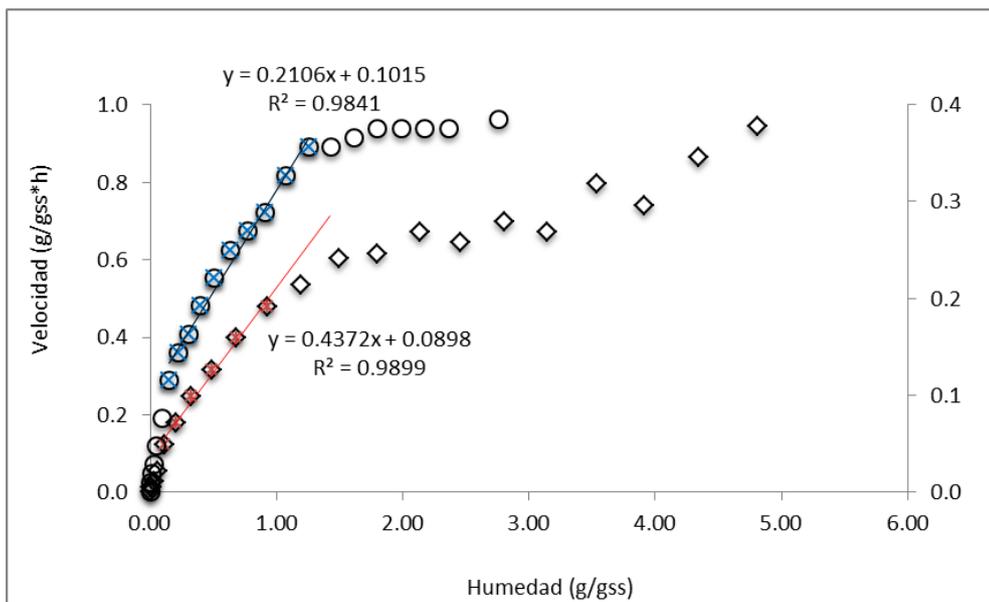


Figura 25. -Curva de velocidad de secado. La curva (◇) corresponde al primer experimento y la curva (O) al duplicado.

Tabla 24. Datos estimados para la velocidad de secado decreciente para los dos experimentos realizados.

velocidad Constante 1	y =	0.80
velocidad Decreciente 1	Y =	0.4372 x + 0.0898
HC	Humedad Crit=	1.62 g/gss
	Humedad Crit=	61.87 %
velocidad Constante 2	y =	0.388
velocidad Decreciente 2	Y =	0.2106 x + 0.1015
HC	Humedad Crit=	1.36 g/gss
	Humedad Crit=	57.62 %

Podemos observar en la figura 25 y los datos obtenidos en la tabla 24 que para los dos experimentos realizados con el fin de obtener la humedad crítica se consigue un valor similar de este parámetro aun cuando la velocidad de secado constante es diferente; esto puede presentarse porque en esta etapa es donde se evapora la humedad libre o no ligada del material y predominan las condiciones externas. La humedad crítica promedio obtenida es de 59.74% a partir de este punto empieza la etapa de secado decreciente.

Para desarrollar la fermentación sólida se elige una humedad del 70% para saturar el olote de maíz con el medio de cultivo.

7.9.2 Fermentación sólida en columnas y matraces usando como soporte olote

Después de la caracterización del olote se prosiguió a la puesta en marcha de la fermentación sólida en 10 columnas y 10 matraces, los cálculos realizados para esta etapa se muestran más adelante (Anexo 4).

En el perfil de actividad xilanolítica (Figura 26) se muestra un periodo de adaptación entre las 20 y 30 horas, a partir de este punto la actividad aumenta alcanzando su punto máximo a las 54 horas en donde se obtiene una actividad de 3.7 U/mL y la productividad para el sistema de fermentación sólida (Figura 27) muestra su punto máximo al cumplir 24 horas.

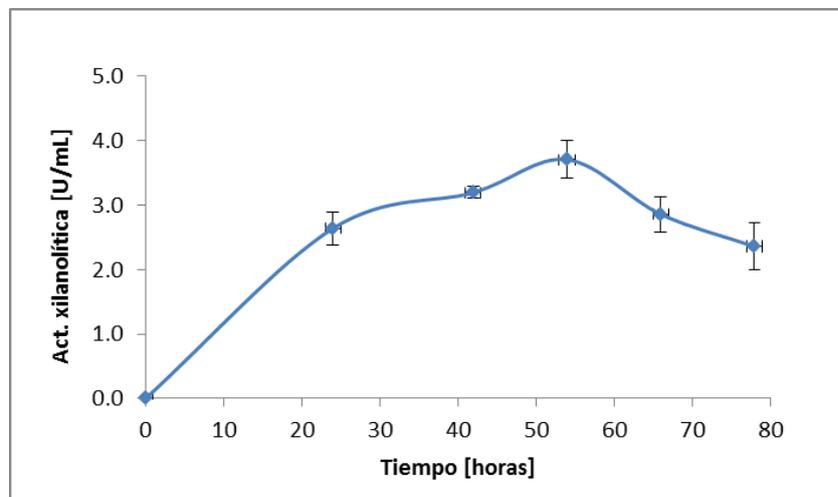


Figura 26.- Perfil de actividad xilanolítica en las columnas de fermentación

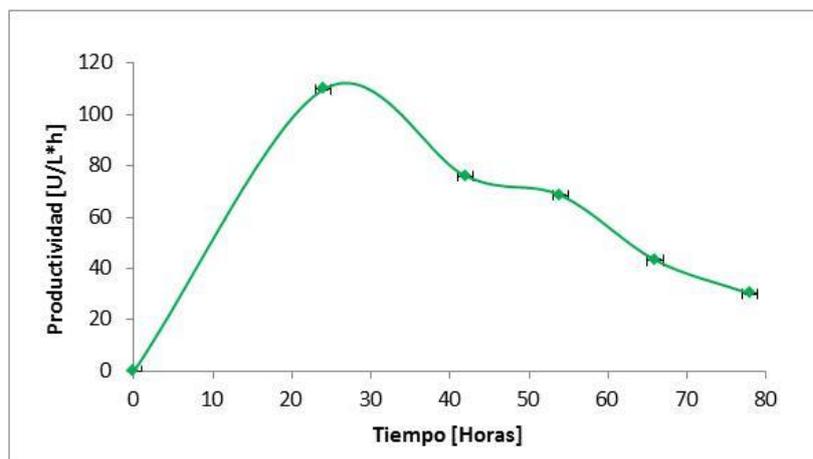


Figura 27.- Productividad de la fermentación sólida para la obtención de xilanasas

7.9.3 Resumen de resultados asociados a la respirometría de *Aspergillus sp.* en cultivo en medio sólido con olote de maíz.

Durante la experimentación se observaron diferentes fases, que hacen referencia a los procesos de asimilación y degradación de los compuestos (Figura 28). La primera fase entre las 0 y 10 horas hace referencia a la adaptación, en donde el consumo de O₂ y la actividad metabólica es baja; una fase exponencial entre las 10 y 50 horas, donde se incrementa el consumo de O₂ y la producción de CO₂ que puede ser atribuida a la degradación de los sustratos; y una fase estacionaria entre las 50 y 70 horas, donde el consumo de O₂ cesa, el compuesto es transformado lentamente a CO₂, el sustrato es escaso y la biomasa se mantiene constante.

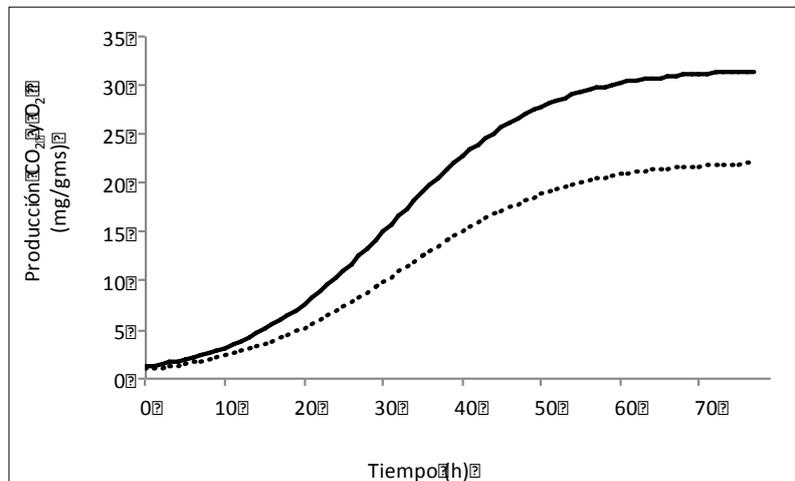


Figura 28.- Producción de CO₂ y consumo de O₂ por *Aspergillus sp.* en cultivo en medio sólido con olote de maíz.

El cociente respiratorio durante el cultivo estará dado por la relación C.R. = $\frac{r_{CO_2}}{r_{O_2}}$

Este parámetro indica qué tipo de metabolismo está realizando el microorganismo. Por ejemplo, si la fuente de carbono y energía del medio de cultivo es un hidrato de carbono, valores de C.R. cercanos a 1 indicarán un metabolismo aeróbico, mientras que valores mayores que 1 indicarán un metabolismo parcialmente anaeróbico. El valor más alto (Figura 29) se obtiene aproximadamente a las 24 horas de fermentación probablemente cuando los azúcares simples se consumieron. Después de este tiempo se empezaron a consumir otras fuentes de carbono como la hemicelulosa. Aproximadamente hasta las 40 horas se obtuvo un C.R. mayor a 1 pudiendo ocurrir que el O₂ suministrado haya sido insuficiente y los hidratos de carbono se derivaron a

rutas anaeróbicas. Las siguientes horas de fermentación mostraron un C.R menor a 1 llegando a un mínimo de 0.6 a las 70 horas.

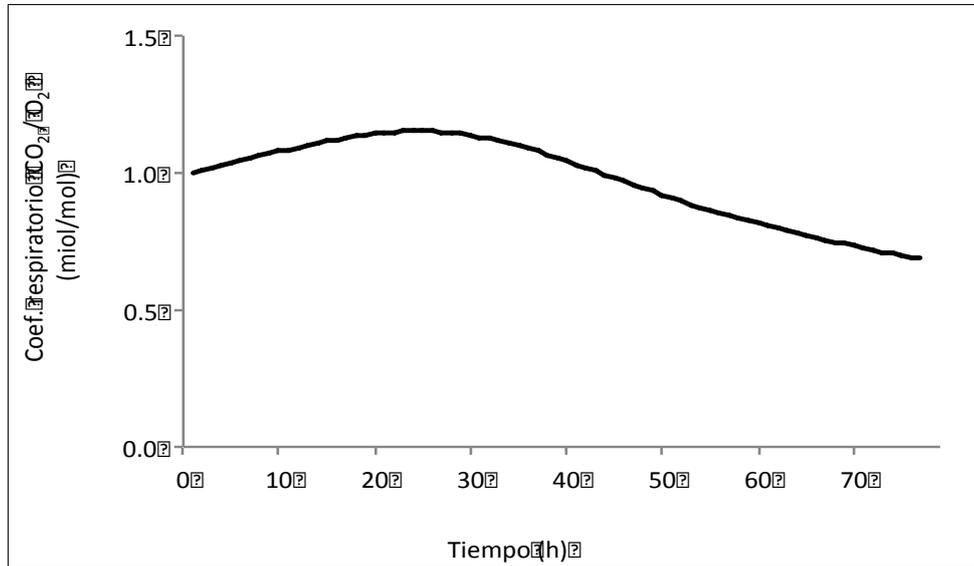


Figura 29.- Coeficiente respiratorio durante la fermentación sólida por *Aspergillus sp.*

Los parámetros cinéticos encontrados para esta fermentación (tabla 19.) nos da a conocer un valor de $\mu = 0.104$ [1/h] el cuál es 10 veces mayor al encontrado para la fermentación líquida. Cerda y col.(2003) proponen la hipótesis de que para modificar la producción de la enzima tanasa por *Aspergillus niger* era necesario alterar la disponibilidad de los nutrientes; por lo que llevaron a cabo un estudio del efecto de la reducción y aumento de glucosa en el medio, teniendo como resultado que bajas concentraciones de glucosa incrementan la producción de la enzima intra y extracelular; a altas concentraciones de glucosa no se ve afectada la producción de tanasa intracelular, en cambio la producción extracelular decrece notoriamente y bajo estas condiciones concluyen que la difusión del sustrato en el medio sólido puede ser uno de los factores responsables de la disminución de la producción enzimática. Este estudio nos puede dar un indicio de lo ocurrido en el presente trabajo, donde la actividad enzimática en la fermentación sólida es 7 veces menor a la fermentación realizada en el reactor BIOFLO III.

Por otro lado, de la tabla 25 podemos observar que el tiempo lag se encuentra dentro de los límites establecidos y estudiados para hongos donde la fase lag termina entre las primeras 15 y 20 horas de cultivo. (Cox P.W. y Thomas C.R., 1992).

Tabla 25.- Parámetros cinéticos de producción de CO₂ por *Aspergillus sp.* en cultivo en medio sólido con olote de maíz.

			D.E.
CO ₂ max	(mg/gms)	31.7	1.6
O ₂ max	(mg/gms)	22.4	1.3
μ	(1/h)	0.104	0.0
dCO ₂ /dtmax	(mg/gms ² h)	0.53	0.0
d/O ₂ /dtmax	(mg/gms ² h)	0.82	0.0
C.R.max	(mol/mol)	1.15	
tlag ² (h)	h	11.6	0.6

7.10 Discusión final

La fermentación sumergida realizada en matraces Erlenmeyer sin deflectores (baffles) son los más utilizados para experimentos de laboratorio, tiene valores de *K_{la}* más bajos normalmente inferiores a 200, esto producirá que la concentración de biomasa en cultivos dentro de este tipo de matraces esté limitada. Este antecedente técnico es de gran importancia para comparar los datos de cultivos de *Aspergillus sp.* en matraces agitados y en un medio sólido poroso (Henzler y Schedel, 1991), donde la pared celular juega un papel importante en la secreción de las enzimas al medio de cultivo. De acuerdo con los modelos conocidos las enzimas se secretan hacia la punta de las hifas que es el mismo lugar donde se sintetiza la pared celular, de tal manera que las enzimas se mezclan con los componentes de la pared celular y difunden a través de la pared inmadura que presenta poros muy grandes, lo que permite la secreción de enzimas (Sorensen y col., 1996).

Por otro lado, al realizar la fermentación sumergida en un biorreactor la agitación mecánica, el sistema de bafleado y la dispersión del oxígeno en el medio permite aumentar la transferencia del gas a la biomasa, permitiendo que no se creen zonas anaerobias en el centro del pellet y que el cultivo esté siempre homogéneo.

Las velocidades específicas de crecimiento para cada caso fueron de $\mu=0.01 \text{ h}^{-1}$ para FML y $\mu=0.104 \text{ h}^{-1}$ para FMS lo cual nos indica que el tiempo de generación para la fermentación sumergida es 10 veces mayor pudiéndose afirmar que el crecimiento es mucho menor aun cuando la productividad enzimática es mayor. La productividad presentada en la FML es aproximadamente 3 veces mayor en el punto más alto de productividad de FMS

(100 U/L*h) obtenida a las 28 horas de fermentación (tabla 21, figura 27). Contrario a lo reportado por Acuña-Argüelles y col (1995) donde la FMS resultó ser entre 6 y 51 veces más productiva que la FML dependiendo del tipo de enzima medida.

Se debe tener en cuenta que la transferencia de oxígeno en FMS sólo es efectiva en cultivos con grandes espacios aéreos, ya que los cultivos que utilizan desechos agroindustriales como la pulpa de café, el bagazo de caña o el salvado de trigo están obligados a ser aireados de manera forzosa para permitir el crecimiento de organismos aeróbicos (Ikasari y Mitchell, 1998). Por tal motivo, en el presente estudio es factible que al utilizar olote de maíz como soporte se invadió el espacio aéreo y se dificultó la secreción de la xilanasa. El uso de soportes biodegradables ha dificultado también el estudio de la represión catabólica en fermentación sólida, debido a que los soportes sólidos de origen vegetal inducen la síntesis de enzimas no deseadas interfiriendo con la determinación de las actividades enzimáticas de interés, lo anterior nos da una indicación de que la búsqueda de un sustrato adecuado para la fermentación sólida que se requiere es otra área de estudio que merece ser tomada en cuenta (Raimbault. 1998; Pandey y col., 1999).

8. CONCLUSIONES

La producción de xilanasa por *Aspergillus sp.* se puede llevar a cabo de forma factible en los dos tipos de fermentación, siendo mayor la actividad xilanasa y la productividad para la fermentación sumergida.

Al utilizar olote de maíz como fuente de carbono en la FML se favorece la producción de la enzima xilanasa ya que este residuo está compuesto principalmente de xilano de olote. En la FMS su utilización como soporte sólido en las columnas de fermentación presentó saturación del espacio aéreo por el crecimiento característico en forma de micelio limitando tal vez la transferencia de masa y por consiguiente la producción de xilanasa

La fermentación en el biorreactor BIOFLO III mejora considerablemente la producción de xilanasa resaltando la importancia de la agitación mecánica presente en este tipo de equipos la cual aumenta el área de interfase gas-líquido y permite la transferencia de oxígeno a la biomasa en forma de “pellets” característica de la FML.

La producción de xilanasa no es proporcional a la producción de biomasa en ambos tipos de cultivo. Por lo tanto, la mayor productividad de los cultivos en fermentación sumergida pudo deberse al tipo de sustrato utilizado y al uso del biorreactor.

La estrategia de usar diseños estadísticos de manera secuencial permitió estandarizar las mejores condiciones de las fermentaciones y del medio de cultivo para la producción de la xilanasa, estableciendo que el pH fue el que tuvo un mayor efecto.

9. RECOMENDACIONES

La actividad xilanolítica obtenida en fermentación sumergida es aproximadamente 3 veces mayor que en la fermentación en medio sólido, esto puede ocurrir porque el medio de cultivo usado en la fermentación en medio líquido fue estudiado a través de los diseños experimentales y otras pruebas que permitieron encontrar las condiciones más favorables para este tipo de cultivo. Es por esto que se recomienda realizar la fermentación sólida con un medio de cultivo más concentrado o conformado por otros compuestos y un diseño experimental para encontrar las condiciones más favorables.

Con objeto de optimizar la fermentación sumergida, es recomendable realizar análisis respecto a cambios en la cantidad de aire suministrado y agitación (rpm) del biorreactor y tomar en cuenta realizar un ajuste a pH 6 del medio de cultivo, ya que este pH se asemeja al valor óptimo obtenido para la xilanasas.

10. BIBLIOGRAFÍA

Abou Ward, G.A., Salama, R., Attalla, M.A., (2008). Effect of fat source on performance of fattening lambs. *World J. Agric. Sci.* **4**, 224–229.

Acuña-Argüelles, M. Gutiérrez-Rojas, M. IViniegra-González, G., Favela-Torres, E., (1995). Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **43**: 808-814.

Aiba, S., A.E. Humphrey, and N.F. Millis. (1973). *Biochemical Engineering*, 2nd ed. New York: Academic Press.

Arenas Guzmán Roberto., (2011) *Micología Médica Ilustrada*. México, D.F. Mc Graw Hill. Cuarta Edición 2011. ISBN: 978-607-15-0510-1

Aro N., T. Pakula & M. Penttilä, (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**: 719–739.

Asgher M., Asad M.J., Legge R.L., 2006. Enhanced lignin peroxidase synthesis by *Phanerochaete Chrysosporium* in solid state bioprocessing of a lignocellulosic substrate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **22** (5): 449-453.

Azin M., Moravej R., Zareh D., (2007). Production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on a mixture of wheat bran and wheat straw: Optimization of culture condition by Taguchi method. *Enzyme and Microbial Technology* **40**: 801–805.

Barrios-González, J., González, H., Mejía, A., (1993). Effect of particle size, packing density and agitation on penicillin production in solid state fermentation. In *Biotechnol. Adv.*, vol. 11, 1993, no. 3, p. 539-47.

Battan B, Sharma J, Kuhad RC., (2006) High-level xylanase production by alkaliphilic *Bacillus pumilus* ASH under solid state fermentation. *World J Microbiol Biotechnol* **22**:1281–1287

Beg Q.K., Kapoor M., Mahajan L., Hoondal G. S., (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: review in *Appl. Microbiol Biotechnol* **56**:326–338

Bhat M. K., (2000). Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* **18**: 355-383.

- Blanch, H.W y Wilke, C.R.** (1983). Sugars and chemicals from cellulose., Review. Chemical Engineering., **1**, 71-118.
- Botella C., Diaz A., Ory I., Webb C., Blandino A.,** (2007). Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid state fermentation. Process Biochemistry **42**: 98-101.
- Bradford, M.M.,** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., **72**: 248-254.
- Büchs, J.,** (2001) Introduction to advantages and problems of shaken cultures. Biochem. Eng. J. **7**, 91-98.
- Cano Carmona E., Brochetto-Braga M., Pizzirani-Kleiner A., Jorge J.,** (1998). Purification and biochemical characterization of an endoxylanase from *Aspergillus versicolor*. FEMS Microbiology letters **166**: 311-315.
- Chidi S., Godana B., Ncube I., JansenVan Rensburg E., Cronshaw A. and Abotsi E.,** (2008). Production, purification and characterization of cellulase-free xylanase from *Aspergillus terreus* UL 4209. African journal of biotechnology Vol. **7**(21), pp. 3939-3948.
- Costa M., Torres M., Reyes A.,** (2012). Caracterización de enzimas hidrolíticas de *Aspergillus ficuum* producidas en fermentación sólida sobre una torta de canola. Revista Colombiana de biotecnología. Vol. XIV, núm. **1**, pp. 208-215.
- Critter, S., Freitas, S. y Airoidi, C.** (2004). Comparison of microbial activity in some Brazilian soils by microcalorimetric and respirometric methods. Thermochimica Acta (410): 35-46.
- Cullen D. and Kersten P.,** (1992). Fungal enzymes for lignocellulose degradation. In Kinghorn J.R, Turner G., eds. Applied molecular genetics of filamentous fungi. New York: Chapman and Hall. Chapter **4**: 100-131.
- D. C. Montgomery,** (2005). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons, Inc. 7th Edition. ISBN 978-0-470-45687-3
- De Souza M., Giatti C., Zilly A., Rosane p.M.,** (2002). Production of laccase as the sole phenoloxidase by a Brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. Journal Basic of Microbiology **42** (2): 83-90.
- de Vries R.P. & J. Visser.** (2001). Aspergillus Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **65**: 497-522.

- Doner L.W. y Hicks K.B.**, (1997). Isolation of hemicellulose from corn fiber by alkaline hydrogen peroxide extraction. *Cereal Chem* **74**:176-181.
- E. Rosales, S. Rodríguez Couto and A. Sanromán**, (2002). *Biotechnology Letters* **24**, 701
- Fan, L.T., Lee, Y.H y Gharpuray, M.M.** (1982). The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Advanced Biochemistry Engineering*. **23** 157-187.
- FAO.** (2001) Situación actual de los bosques del mundo. Reporte década 1990-2000.
- Fengel, D y Wegener, G.**, (1984) *Wood. Chemistry, ultraestructure and reactions.* Walter de Gruyter. Berlin/NewYork
- Fiechter A.**, (1983). Pentosan and lignin. *Advanced Biochemistry, Engineering and Biotechnology*. **27**, 1-186.
- G. Viniegra-González, E. Favela-Torres, C. Noe Aguilar, J. de Jesús Romero-Gómez, G. Díaz-Godínez and C. Augur**, (2003). *Biochemical Engineering Journal* **13**, 157
- García F., Martín F y Rodríguez J.J.**, (1984) Posibilidades de aprovechamiento de la lignina en la industria química. *Ingeniería Química*. **10**, 249-254.
- García Leal, J. & Lara Porras, A.M.**, (1998). "Diseño Estadístico de Experimentos. Análisis de la Varianza." Grupo Editorial Universitario.
- Garsoux, G., Lamotte, J., Gerday, C. & Feller, G.**, (2004). Kinetic and structural optimization to catalysis at low temperatures in a psychrophilic cellulase from the antarctic bacterium *Pseudomonas haloplanktis*. *Biochem. J.* **384**: 247-253.
- Gervais, P. and P. Molin**, (2003). The role of water in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, **13**: 85-101.
- Gilbert, R.B. and Byrne, R.J.**, (1996). Strain-Softening Behavior of Waste Containment Interfaces. *Geosynthetics International*, Vol. **3**, No. 2, pp.181-203.
- Gupta U., Kar R.**, (2008). Optimization and Scale up of Cellulase free Endoxylanase Production by Solid State Fermentation on Corn cob and by Immobilized Cells of a Thermotolerant Bacterial Isolate. (2008) **1** (3), 129-134.

- Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K.D., Steiner, W., Zupancic, S.,** (1996). Production of fungal xylanases. *Bioresour. Technol.* **58**, 137–161.
- Henzler, H. J. and Schedel, M.,** (1991). Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbiological cultures. *Bioproc. Eng.*, **7**, 123–131.
- Herrera T, Ulloa M.,** (1998). *El Reino de los Hongos*. México: UNAM, Fondo de Cultura Económica.; p426-430.
- Hon D.N.S. y Shiraishi N.,** (1991) *Wood and Cellulose Chemistry*. Marcel Dekker Inc. New York.
- Howard R.L., Abotsi E., Jansen van Rensburg E.L., and Howard S.,** (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal Biotechnology* **2** (12):602-619.
- Hu J., Duvnjak Z.,** (2004). Production of a laccase and decrease of the phenolic content in canola meal during the growth of the fungus *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation. *Processes Engineering in Life Sciences* **4** (1): 50-55.
- Ikasari, L. and Mitchell, D. A.,** (1998), Mimicking gas and temperature changes during enzyme production by *Rhizopus oligosporus* in solid-state fermentation. *Biotechnol. Lett.*, **20**, 349-353
- Ishihara. M., Matsunaga. M., Hayashi, N. and Tisler, V.,** (2002). Utilization of D-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose. *Enzyme and Microbial Technology* **31**: 986-991.
- Jecu, L.,** (2000). Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. *Industrial Crops and Products*. **11**: 1 – 5
- Kluyer A. J., Perkin, L. H. C.,** (1977) Methods to study the metabolism of molds. In *Genetics and physiology of Aspergillus*. Smith, J. E., Pateman, J. A. (Eds) Academic Press, pp 361-390.
- Krishna C.,** (1999). Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes. *Bioresource technology* **69** (3): 231-239.
- Krishna C.,** (2005). Solid state fermentation systems: an overview *Critical Reviews in Biotechnology* **25** (1/2):1–30.
- Kulkarni, Neeta; Shendye, Abhay; Rao, Mala.,** (1999). "Molecular and biotechnological aspects of xylanases". *FEMS Microbiology Reviews* **23** (4): 411–56.

- Li, X. T., Jiang, Z.Q., Li, L.T., Yang, S.Q., Feng, W.Y., Fan, J.Y., Kusakabe, I.,** (2005). Characterization of a cellulase-free, neutral xylanase from *Thermonyces lanuginosus* CBS 288.54 and its biobleaching effect on wheat Straw pulp. *Bioresour. Technol.* **96**, 1370-1379.
- M. Jeya, S. Thiagarajan and P. Gunasekaran.,** (2005). Improvement of xylanase production in solid-state fermentation by alkali tolerant *Aspergillus versicolor* MKU3. *Letters in applied microbiology.* **41**, 175-178.
- MacCabe, A.P., M.T. Fernandez-Espinar, L.H. de Graaff, J. Visser and D. Ramon,** (1996). Identification, isolation and sequence of the *Aspergillus nidulans* xln C gene encoding the 34 kDa xylanase. *Gene.*, **175**: 29-33.
- Mavituna, F., Sinclair, C. G.,**(1985) A graphical method for the determination of critical biomass concentration for non-oxygen-limited growth. *Biotechnology Letters.* **7**(2):69-74
- Mazutti M., Ceni G., Di Luccio M., Treichel H.,**(2007). Production of inulinase by solid-state fermentation: effect of process parameters on production and preliminary characterization of enzyme preparations. *Bioprocess of Biosystems Engineering* **30**:297-304.
- Miller G. L., Blum R., Glannon W. E., Burton A.L.,** (1960). Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Analytical Biochemistry* **2**: 127-132.
- Misra D.K.,** (1993). Cereal Straw. Pulp and paper manufacture. Vol 3. Secondary Fibers and Non Wood Pulping. Joint Text book Committee of the paper Industry, Atlanta. 82-98
- Muniswaran P.K.A., Charyulu N.C.L.N.,** (1994). Solid state fermentation of coconut coir pith for cellulase production. *Enzyme Microb. Technol.;* **16** (5):436-446.
- Nigam P, Robinson T, Singh D.,** (2004) Solid.state fermentation: An overview. In: Arora D (ed) *Handbook of Fungal Biotechnology, Mycology 20*, CRC Press, London
- Nigam P. and Robinson T.,** (2005). Solid state fermentation: an overview. En: *Handbook of Fungal Biotechnology. Mycology V. 20*, Second Edition. Editores: Arora.K.D., Bridge D.P., Bhatnagar D., Editorial marcel dekker, inc., New York pp: 267-274.
- Nissen-Meyer, J., Holo, H., Ha°varstein, L. S., Sletten, K. & Nes, I. F.,** (1992). A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. *J Bacteriol* **174**, 5686-5692.

- Oggiano, N., Angelini, L.G. y Cappeletto, P.,** (1997). Pulping and paper properties of some fiber crops. *Industrial Crops and Products*. **7**, 59-67
- Okeke, B.C. and S.K.C. Obi,** (1993). Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by an *Arthrographis* species. *World. J. Microbio. Biotechnol.*, **9**: 345-349
- Oriol E., Raimbault M., Rousous S. and Viniegra-Gonzales G.,** (1988). Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **27**: 498-503
- Ovando-Chacon S.L. y Waliszewski K.N.,** (2005). Preparaciones de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia* **21**(42):111-120.
- Panagiotou G., Kekos D., Macris B.J., Christakopoulos P.,** (2003). Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. *Industrial Crops and Products* **18** (1): 37-45.
- Pandey A, Selvakumar P, Soccol CR, Nigam P.,** (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Sciences* **77**: 149-162.
- Pandey A.,** (1991). Effect of particle size of substrate on enzyme production in solid-state fermentation. *Bioresource Technology* **37** (2): 169-172.
- Pang Pei Kheng, Lee Chee Keong, Darah Ibrabimand Ibrahim Che Omar.,** (2005). Production of cellulase and xylanase via solid state fermentation and its application in the enzymatic deinking of laser printed waste papers.
- Pérez J., Muñoz-Dorado J., Rubia de la T. y Martínez J.,** (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: overview *International Microbiology* **5**: 53–63.
- Pirt S. J.,** (1975). Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell, Oxford.
- Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS.,** (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **67**(5): 577-591.
- Rabinovich M. L., Melnick M. S and Bolobova A.V.,** (2002). The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. *Biochemistry (Moscow)*, **67** (8): 850-871.

Raimbault, M., Soccol, C.R. and Chuzel, G. (1998). International training course on solid state fermentation. Document ORSTOM, Montpellier France, n°1; pp. 204.

Rajedran A., Selvaraj V. y Thangavelu V., (2008). Statistical optimization and kinetic modeling of xylanase production by *Arthrobacter* sp. Asia-Pacific journal of chemical engineering. **3**: 347-353.

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

Rodríguez J.J., García F., Cordero T. (1990). Posibilidades de aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos. *Ing. Quím.* **22** (254), 191-197.

Roussos S. and Gaime P., (1996) Fisiología y Bioquímica de microorganismos utilizados en procesos de fermentación en medio sólido. Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería. Pp 341-328.

SAGARPA, (2010). Consultado en 2011. <http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/fichasaapt/Aprovechamiento%20de%20esquilmos.pdf>

Saha B.C. y Bothast R.J., (1999). Pretreatment and enzymatic saccharification of corn fiber. *Appl Biochem Biotechnol* **76**:65-77.

Saha B.C., (2003). Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol* (2003) **30**: 279-291.

Salama M.A., Ismail K.M., Amany H.A., El-Lill A., Geweely N.S. (2008). Biochemical studies of purified extracelular xylanases from *Aspergillus versicolor*. *International Journal of botany* **4**(1): 41-48.

Sánchez E., Loera O., Viniegra-González G. (2011). Restricciones microscópicas para el escalamiento de cultivos de *Aspergillus niger* sobre superficies sólidas. XIV congreso nacional de biotecnología y bioingeniería.

Shah, A.R. and D. Madamwar, (2005). Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. *Process Biochem.*, **40**: 1763-1771.

Sjöström, E., (1981). Wood Chemistry. Fundamentals and applications. Academic Press. London 15-50.

Solis-Pereira S., Favela-Torres E, Viniegra-González G. y Guliérrez-Rojas M., (1993). Effect of different carbon sources on the synthesis of pectinases by

Aspergillus niger in submerged and solid state fermentations. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39, 36-41,

Sonan, G. K., Receveur-Brechot, V., Duez, C., Aghajari, N., Czjzek, M., Haser, R. & Gerday, C., (2007). The linker region plays a key role in the adaptation to cold of the cellulase from an Antarctic bacterium. Biochem. J. **407**: 293-302.

Sorensen, B.B. and Samuelsen, H., 1996. The combined effects of environmental conditions on lipolysis of pork fat lipases of the meat starter culture organisms *Staphylococcus xylosus* and *Debaryomyces hansenii*. Intern. J. of food Microb. **31**: 59-71.

Stryer L., Berg J., Tymoczko J. (2013). Bioquímica con aplicaciones clínicas. Editorial Reverté, S.A., ISBN: 978-84-291-7602-5.

Suprabha G. Nair, Sindhu. R, Shankar Shashidhar., (2008). Fungal xylanase production under solid state and submerged fermentation conditions. African Journal of Microbiology Research Vol. 2 (4), pp. 82-86

Tarchevsky, I.A y Marchenko, G.N., (1991) Cellulose: Biosynthesis and structure. Springer-Verlag, Berlin.

Tengerdy R.P., Szakacs G., (2003). Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. Biochemical Engineering Journal **13**: 169–179.

Thonart, P.H., Marcoen, J.M. Desmons, P., Foucart, M y Paquot, M. (1983). Etude comparative de l'hydrolyse enzymatique et de l'hydrolyse par voie acide de la cellulose. Holzforschung, **37**, 173-178.

U. Hölker, M. Hofer and J. Lenz, (2004). Applied Microbiology and Biotechnology 64, 175.

Undurraga D, Markovits A, Erazo S., (2001). Cocoa butter equivalent through enzymic interesterification of palm oil midfraction. Process Biochem; **36**:933

Wenqing Lu., Defa L., Wu Y., (2003). Influence of water activity and temperature on xylanase biosynthesis in pilot-scale solid-state fermentation by *Aspergillus sulphureus*. Enzyme and Microbial Technology **32**: 305–311.

Wessels J.G.H., (1999) Fungi in their own right. Fungal Genet. Biol. **27**: 134-145.

Zhaoxin L., Fengxia L., Mei L., Xiaomei B., Haizhen Z., Yi W., (2008). Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF - 98. Bioresource Technology. **99**: 5938 - 5941.

Anexo1.

Medición de actividad de xilanasas por medio de la liberación de azúcares reductores por ácido dinitrosalicílico (DNS; Miller, 1959)

- Primero se realizó una curva estándar por medio de diluciones seriadas, conociendo la concentración inicial de una muestra de xilosa. Se etiquetaron tubos del 1 al 6 y se les agregaron 1ml de agua destilada, al tubo 1 se le agregó 1ml de la solución estándar, se agitó en vortex, de este tubo se tomó 1 ml y se adicionó al tubo 2 y así sucesivamente, hasta llegar al tubo 5, al cual después de la agitación se le extrajo 1 ml. El tubo número 6 que contenía solo agua se utilizó como blanco. Finalmente a todos los tubos se les agregó 1.5 ml de reactivo DNS y se midió la absorbancia a 640nm, después se realizó la curva estándar.
- Para cuantificar la actividad enzimática del extracto se utilizaron tubos rotulados como A y B, los tubos A se utilizaron para la reacción enzimática y los tubos B como testigos (ambos por duplicado). Primero se preparó el sustrato que consistió en una solución de xilano de madera de haya al 1% en buffer de citrato-fosfato a pH 7. En ambos tubos se agregaron 0.9 ml de del sustrato y se incubaron en un baño a temperatura controlada a 50°C. A los tubos B se les adicionaron 1.5 ml de reactivo DNS seguido de 0.1 ml de la muestra de extracto enzimático y se agitaron en vortex. A los tubos A se les agrega 0.1 ml de la muestra de extracto y se incuba por 30 minutos a 50°C y 130 r.p.m, pasado este tiempo se agrega 1.5 ml de reactivo DNS y se agita en vortex.

Todos los tubos, tanto los de la curva estándar como los del ensayo enzimático se colocaron en un baño de agua a ebullición por 10 minutos, una vez transcurrido el tiempo se dejaron enfriar en agua corriente. Finalmente, se leyó absorbancia en un espectrofotómetro Genesys 10s UV-Vis a una longitud de onda de 640 nm. Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de azúcares reductores por minuto.

Anexo 2.

Caracterización del olote de maíz, determinación de la isoterma de desorción de agua y humedad crítica

- a. Saturar 10 g de olote previamente tamizado en malla 10-16 con 35 g de agua destilada
- b. Distribuir el olote húmedo en 13 capsulas, aproximadamente con 5 g cada una.
 - Se dejan secando en el horno 10 capsulas y se van retirando aproximadamente cada 15 minutos.
 - A una de las capsulas se le determina actividad de agua y porcentaje de humedad al tiempo cero (sin secar)
 - A las dos capsulas restantes se les determina porcentaje de humedad cada 30 segundos
- c. Medir actividad de agua(a_w) en el AquaLab
- d. Pasar la muestra a la balanza para determinar el porcentaje de humedad
- e. Graficar a_w vs %H para obtener la isoterma de desorción de agua
- f. Ajustar a modelo de saturación de Henderson
- g. Con los valores de porcentajes de humedad tomados cada 30 segundos se realiza la gráfica de velocidad de secado vs humedad libre y se determina la humedad crítica.
- h. En una probeta se agrega olote con 70% de humedad hasta completar 20 ml esto corresponde a aproximadamente 18 g de olote húmedo. El valor de la densidad de empaque es $0,9 \text{ g/cm}^3$.

Anexo 3.

Tabla de datos para realizar la gráfica de a_w vs %H para la obtención de la isoterma de desorción de agua.

aw* Henderson	aw	Peso inicial	Peso final	Humedad	Humedad*	error^2	Humedad modelo Henderson
		g	g	g/gss	g/gss		g/gss
0	0.000	0.594	0.587	0.012	0.000	0.000	0.00
0.02	0.153	0.617	0.597	0.034	0.000	0.001	0.00
0.04	0.738	0.665	0.609	0.092	0.073	0.000	0.00
0.06	0.902	0.585	0.434	0.348	0.328	0.000	0.00
0.08	0.968	0.656	0.412	0.592	0.958	0.134	0.00
0.1	0.981	0.663	0.227	1.921	1.406	0.265	0.00
0.12	0.992	0.826	0.290	1.848	2.405	0.310	0.00
0.14	0.993	0.612	0.137	3.467	2.591	0.768	0.00
0.16	0.993	0.929	0.301	2.086	2.591	0.255	0.00
0.18						0.000	0.00
0.2							0.00
0.22							0.00
0.24							0.00
0.26							0.00
0.28							0.00
0.3							0.00
0.32							0.00
0.34							0.00
0.36							0.00
0.38							0.00
0.4							0.01
0.42							0.01
0.44							0.01
0.46							0.01
0.48							0.01
0.5							0.01
0.52							0.01
0.54							0.02
0.56							0.02
0.58							0.02
0.6							0.03
0.62							0.03

0.64							0.04
0.66							0.04
0.68							0.05
0.7							0.05
0.72							0.06
0.74							0.07
0.76							0.09
0.78							0.10
0.8							0.12
0.82							0.14
0.84							0.17
0.86							0.21
0.88							0.26
0.9							0.32
0.92							0.41
0.94							0.55
0.96							0.80
0.98							1.36
0.999							6.37

Anexo 4.

Fermentación sólida

I. Cálculos para determinar la cantidad de olote húmedo que se necesita para la fermentación en las columnas y los matraces

- a. Volumen de las columnas

$$V_c = \pi r^2 h = \pi(1)^2(10) = 31,416 \text{ cm}^3$$

- b. Cantidad de olote húmedo

$$31,416 \text{ cm}^3 \times 0,9 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} = 28,27 \text{ gmh}$$

- c. Cantidad de olote húmedo en 11 columnas

$$11 \times 28,27 = 311,02 \text{ gmh}$$

- d. Cantidad de olote húmedo en matraces Erlenmeyer de 250 ml

$$15 \frac{\text{gmh}}{\text{matraz}} \times 11 \text{ matraces} = 165 \text{ gmh}$$

- e. Total de olote húmedo

$$311,02 + 165 = 476,02 \text{ gmh}$$

- f. Para preparar 476,02 g de materia húmeda se debe mezclar 142,81 g olote seco con 333,21 ml de medio.

II. Preparación de las columnas y los matraces y puesta en marcha de la fermentación

- a. Preparar el medio para impregnar el olote que se ha tamizado previamente en malla 10-16

Compuesto	g/328ml
Extracto de levadura	0.164
NH ₄ Cl	0.53
Na ₂ SO ₄	0.036
KH ₂ PO ₄	0.253
MgSO ₄	0.026
Trazas	0.328ml

- b. Pesar 142.81 g de olote y mezclarlo con 328 ml del medio preparado anteriormente y que se ha inoculado con 5,49ml de la solución de esporas (solución 4), homogenizar en una bolsa mezclando bien y deshaciendo los grumos.

- c. Pesar aproximadamente 12.5 g de olote húmedo en matraces de 250 ml, se llevan a incubación a 37°C.
- d. Se preparan las columnas con algodón y un círculo de papel filtro en el fondo.
- e. Se agrega el olote húmedo en 10 columnas hasta llenarlas 10cm de altura aproximadamente. Cada una de las columnas se pesaron antes y después de agregarles el olote húmedo.
- f. Por otro lado, se llena con agua la pecera en donde se va a llevar a cabo la fermentación.
- g. Se instala un recirculador y se ajusta la temperatura a 37°C
- h. Se verifica que todas las mangueras tengan en el extremo un sujetador de caucho.
- i. Se va midiendo el flujo de aire con un rotámetro y se ajusta a 20ml/min aproximadamente.
- j. Se llenan otras columnas con sílica seca, estas columnas deben tener en el fondo y en la parte superior algodón con un círculo de papel filtro.
- k. Llenar los burbujeadores con 20ml de agua destilada aproximadamente, los burbujeadores cortos se utilizan con las columnas que están llenas con sílica.
- l. Conectar los cables del metabolímetro a las columnas que se van a medir.

III. Toma de muestras y análisis

- a. Transcurrido el tiempo de fermentación se van retirando las columnas y los matraces, se vacía el contenido en una bolsa plástica y se mezcla hasta deshacer los grumos.
- b. Se toma muestra de cada columna y matraz para realizar actividad de agua y porcentaje de humedad.
- c. Se toman 2 g de muestra y se le agregan 10 ml de agua, se agita en vortex y se mide el pH en un potenciómetro. Por otro lado, se toman 4.5 ml de muestra y se almacenan en tres tubos eppendorf, dejando cada uno con 1.5 ml de muestra.
- d. Se centrifugan los tres tubos a 8000 rpm por 2 minutos.
- e. Con ayuda de una pipeta se toma de cada tubo 1 ml del sobrenadante y se deposita cada sobrenadante en tubos eppendorf para su almacenamiento a baja temperatura.
- f. Realizar a cada muestra análisis de actividad xilanolítica por método DNS y proteína por método de Bradford.