

Producción de xilanasa a partir de la cepa *Rh. pusillus* en fermentación en medio sólido aplicando un diseño experimental Taguchi L9.

“UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO”



DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Producción de xilanasa a partir de la cepa *Rh. pusillus* en fermentación en medio sólido aplicando un diseño experimental Taguchi L9.

TESIS

PRESENTA: HERNAN TRUJILLO TRUJILLO

Para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIEMNTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, Mex

Producción de xilanasa a partir de la cepa *Rh. pusillus* en fermentación en medio sólido aplicando un diseño experimental Taguchi L9.

Producción de xilanasa a partir de la cepa *Rh. pusillus* en fermentación en medio sólido aplicando un diseño experimental Taguchi L9.

“UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

TESIS

Producción de xilanasa a partir de la cepa *Rh. pusillus* en fermentación en medio sólido aplicando un diseño experimental Taguchi L9.

Que se somete a consideración del H. jurado como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIEMNTOS

PRESENTADO POR:

HERNAN TRUJILLO TRUJILLO

El trabajo ha sido evaluado y aprobado por el siguiente Comité Evaluador:

Dr. Armando Robledo Olivo

Presidente del Jurado

Dr. Mario Alberto Cruz Hernández

Vocal

Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez

Vocal

Dr. Héctor Arturo Ruíz Leza

Vocal suplente

Dr. José Dueñez Alanís

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL



Buenavista, saltillo, Coahuila; México

febrero de 2016

Producción de xilanasa a partir de la cepa *Rh. pusillus* en fermentación en medio sólido aplicando un diseño experimental Taguchi L9.

“UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO”

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Producción de xilanasa a partir de la cepa *Rh. pusillus* en fermentación en medio sólido aplicando un diseño experimental Taguchi L9.

PRESENTADO POR:

HERNAN TRUJILLO TRUJILLO

TRABAJO DE INVESTIGACION PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIEMNTOS

DIRIGIDO POR EL SIGUIENTE COMITÉ ASESOR:

DIRECTOR: Dr. Armando Robledo Olivo

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro



Co-Director: Dr., Mario Alberto Cruz Hernández

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

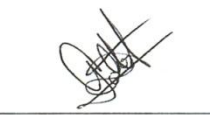
Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro



Asesor: Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

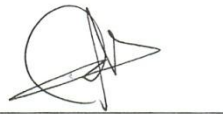
Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro



Asesor: Dr. Héctor Arturo Ruíz Leza

Departamento de Investigación en Alimentos

Universidad Autónoma de Coahuila



Producción de xilanasa a partir de la cepa *Rh. pusillus* en fermentación en medio sólido aplicando un diseño experimental Taguchi L9.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	1
RESUMEN:	3
INTRODUCCIÓN:	4
JUSTIFICACIÓN	5
HIPÓTESIS:	6
OBJETIVOS	6
Objetivo general:	6
Objetivos específicos:	6
ANTECEDENTES	7
Hemicelulosa de los tejidos vegetales	8
Olate de maíz	8
XILANO: PRESENCIA Y ESTRUCTURA	9
Sistema xilanolítico microbiano	11
FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCION DE XILANASA	14
RHIZOMUCOR PUSILLUS	15
Clasificación taxonómica	15
MATERIALES Y METODOS	16
Obtención de olate	16
Microorganismos y medios de cultivo	17
Diseño de experimentos de Taguchi.	18
Recuperación de extracto enzimático	19
Sistema de cultivo en columna fluida	20
Contenido de azúcares reductores en extracto	20
Actividad Xilanasa en extracto enzimático	21
RESULTADOS Y DISCUSION	22
CONCLUSIONES.	28
REFERENCIAS	29

AGRADECIMIENTOS

Infinitas gracias a Dios Todo poderoso por haberme dado la sabiduría y el entendimiento para poder llegar al final de mi carrera, por proveerme de todo lo necesario para salir adelante y por todo lo que me ha dado.

Mil gracias a mis padres, Hernan Trujillo y María Teresa Trujillo Santis por el apoyo incondicional que me brindaron por todos los sacrificios que hicieron a lo largo de mi carrera, así como su comprensión y paciencia en momentos difíciles que tuvimos.

A mis hermanos María del Socorro Trujillo Trujillo, José Trinidad Trujillo Trujillo y Maricruz Trujillo Trujillo, por todo el apoyo brindado, por su comprensión y cariño, y que gracias a sus consejos he llegado a ser una persona con principios

A toda mi familia que estuvieron apoyándome a lo largo de mi carrera y dándome fuerzas para seguir adelante, sobre todo muchos consejos que me forjaron a salir adelante ante todas las adversidades que me encontré a lo largo de mi preparación.

Gracias a los profesores quienes me entregaron a través de su conocimiento y dedicación las herramientas para preparar este camino hacia el mundo profesional y que marcarán un importante precedente en mi formación

Gracias a mi universidad, gracias por haberme permitido formarme en ella, gracias a todas las personas que fueron partícipes de este proceso, ya sea de manera directa o indirecta, gracias a todos ustedes que fueron los responsables de realizar su pequeño aporte, que el día de hoy se vería reflejado en la culminación de mi paso por la universidad. Gracias a mis padres, que fueron mis mayores promotores durante este proceso, gracias a Dios, que fue mi principal apoyo y motivador para cada día continuar sin tirar la toalla.

Producción de xilanasa a partir de la cepa *Rh. pusillus* en fermentación en medio sólido aplicando un diseño experimental Taguchi L9.

Este es un momento muy especial que espero, perdure en el tiempo, no solo en la mente de las personas a quienes agradecí, sino también a quienes invirtieron su tiempo para echarle una mirada a mi proyecto de tesis; a ellos asimismo les agradezco con todo mi ser

RESUMEN:

En la actualidad el uso de enzimas es muy importante para la alta productividad en los procesos industriales, el cual en este trabajo se puede apreciar la optimización en la producción de xilanasa en un biorreactor de columnas. Se produjo la enzima xilanasa en un medio sólido empleando un bioreactor en columna, empacado con material lignocelulósico como el olote de maíz. El olote de maíz se empleó como soporte-sustrato para el crecimiento de los microorganismos por medio de fermentación en medio sólido (FMS) y al mismo tiempo indujo la síntesis de algunas enzimas como las xilanasas.

En el presente estudio pudimos observar resultados significativos en cuanto los mejores parámetros para la producción de xilanasa, obteniendo datos del análisis estadístico demostrando que el mayor valor fue de (83.69 U/gss) teniendo datos que registró con las condiciones de aire: 0.4 LPM; empaque 60 g/l; carbono-nitrógeno: 8; partícula 0.5 mm siendo estos los parámetros adecuados para desarrollar un método de producción de Xilanasa

Palabras claves: Fermentación solido Taguchi optimización

Correo electronico; Hernan Trujillo Trujillo, hernanuaan@hotmail.es

INTRODUCCIÓN:

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones químicas. Además de su importancia como catalizadores biológicos, tienen muchos usos médicos y comerciales. (Carrasco 1996).

Existen numerosas tecnologías que permiten la transformación y aprovechamiento de la biomasa o materiales lignocelulosos; desde las más simples que no requieren grandes inversiones ni recientes adelantos tecnológicos, hasta sistemas actualizados con tecnologías de punta. (Carrasco 1996).

La producción de xilanasa a partir de la cepa *Rh. Pusillus* está siendo investigada y desarrollando métodos de alternativos que no generen grandes costos de producción por lo que algunos materiales lignocelulosicos son utilizados para el crecimientos de microorganismos productores de xilanasas mediante en estado sólido. La biomasa residual originada de residuos agroindustriales, forestales, urbanos está compuesta principalmente de hidratos de carbono principalmente celulosa, hemicelulosa, almidón, glucosa o fructosa (Carrasco 1996).

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

Los principales géneros microbianos productores de enzimas son: bacterias y hongos (Ponce y Pérez 2002). La productividad de estos genero están sujetos a las condiciones del media que este los contenga.

Producción de xilanasa a partir de la cepa *Rh. pusillus* en fermentación en medio sólido aplicando un diseño experimental Taguchi L9.

Por lo regular en la ingeniería microbiológica se le proporcionan los nutrimentos adecuados para cada microorganismo dependiendo de lo que se requiera producir ya sea biomasa u otro metabolito.

JUSTIFICACIÓN

Es importante conocer y entender los comportamientos de los microorganismos y así poderlos adaptar al biorreactor y que este realice sus funciones metabólica, por ellos nos enfocamos en realizar este estudio para optimizar la producción de Xilanasa.

Por estas observaciones se desarrolló el presente trabajo aplicando un sistema ortogonal Taguchi L9 4 factores, en fermentación sólida para ver la cinética y producción de xilanasa en diferentes tratamientos.

El cual se realizó en el laboratorio de microbiología y fermentaciones del departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Producción de xilanasa a partir de la cepa *Rh. pusillus* en fermentación en medio sólido aplicando un diseño experimental Taguchi L9.

HIPÓTESIS:

"La cepa *Rhizomucor pusillus* producirá enzima xilanasas en fermentación en medio sólido empleando un sistema ortogonal Taguchi L9 para optimizar la producción de la enzima"

Se encontraran las condiciones óptimas para la producción de la xilanasa y optimizar el proceso.

OBJETIVOS

Objetivo general:

"Producir Xilanasa por *Rhizomucor pusillus* en medio sólido empleando un biorreactor en columna con aireación forzada"

Objetivos específicos:

*Establecer las condiciones óptimas de producción de enzimas en biorreactor de columnas.

* Optimizar las condiciones de producción de xilanasa en Biorreactor en columna por la cepa *Rhizomucor pusillus*.

ANTECEDENTES

Las enzimas son proteínas que catalizan todas las reacciones bioquímicas, además de su importancia como catalizadores biológicos, tienen muchos usos médicos así como en la panificación.

Los beneficios de las xilanasas en los procesos de panificación se deben a un aumento de la flexibilidad de la masa, incremento del volumen del pan, aumento en el grado de retención del agua y mejoramiento de la vida útil (rouau y col., 1994; bhat, 2000).

Las xilanasas pueden obtenerse de fuentes microbianas como bacterias y hongos. Los hongos pueden producir una variedad de β -xilanasas por xilanos, los cuales son sustratos caros que hacen poco rentable su producción incrementando los costos del proceso.

Los materiales lignocelulósicos como el bagazo de caña de azúcar, el olote de maíz, granos de cereales, salvado de trigo y salvado de avena se han usado como sustratos para el crecimiento de los microorganismos por medio de cultivos en fase sólida, el cual es un método de cultivo llevado a cabo sobre un material no soluble que actúa como un soporte físico y como una fuente de nutrientes (Betini y col., 2009)

Hemicelulosa de los tejidos vegetales

La hemicelulosa es el segundo polímero más abundante en la biomasa vegetal, representa entre un 20 a un 35% de la biomasa, además se encuentra asociada a polímeros como la celulosa y la lignina que en conjunto contribuyen a la rigidez o flexibilidad de la pared celular.

Olote de maíz.

El residuo del desgranado del maíz (*Zea mays* L.) se conoce como olote de maíz, un tejido esponjoso y blanco que representa la médula donde se almacenan las reservas alimenticias del cereal. 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 le confieren al olote la posibilidad de ser empleado como sustrato en la producción de la enzima xilanasa.

XILANO: PRESENCIA Y ESTRUCTURA

El xilano (Figura 1) representa la hemicelulosa más abundante de la pared vegetal, siendo un heteropolisacárido con cadenas homopoliméricas centrales β -1,4-ligadas a residuos de D-xilopiranososa, que dependiendo de su origen, también puede presentar residuos de arabinosa, ácido glucurónico y ácido arabino-glucurónico (Saha, 2003; Assamoi y col., 2008; Gupta y Kar, 2008).

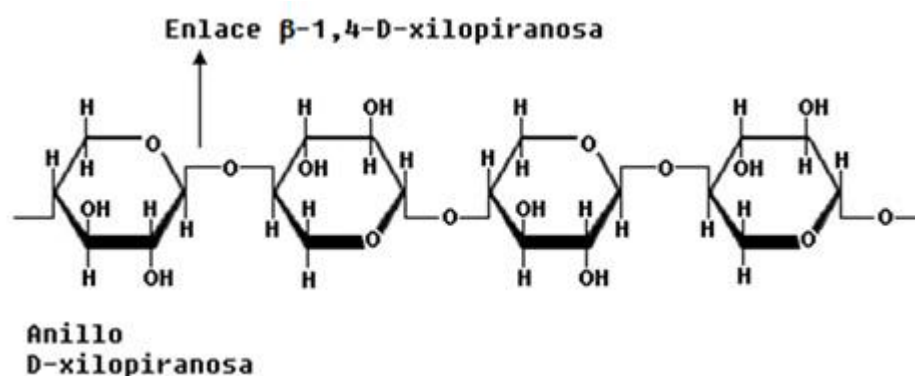


Figura 1. Estructura de xilano. Robledo Olivo Armando (2012).

En las plantas, el xilano o las hemicelulosas, están situados entre la lignina y debajo de la colección de fibras de celulosa (Figura 1). Congruente a su estructura química y las sustituciones de grupos laterales, el xilano se encuentra entrelazado, intercalado y enlazado covalentemente a varios puntos de vainas de lignina, mientras producen una capa alrededor de los hilos de celulosa mediante puentes de hidrógeno (Biely, 1985; Joseleau y col., 1992; Beg y col., 2001).

Producción de xilanasa a partir de la cepa *Rh. pusillus* en fermentación en medio sólido aplicando un diseño experimental Taguchi L9.

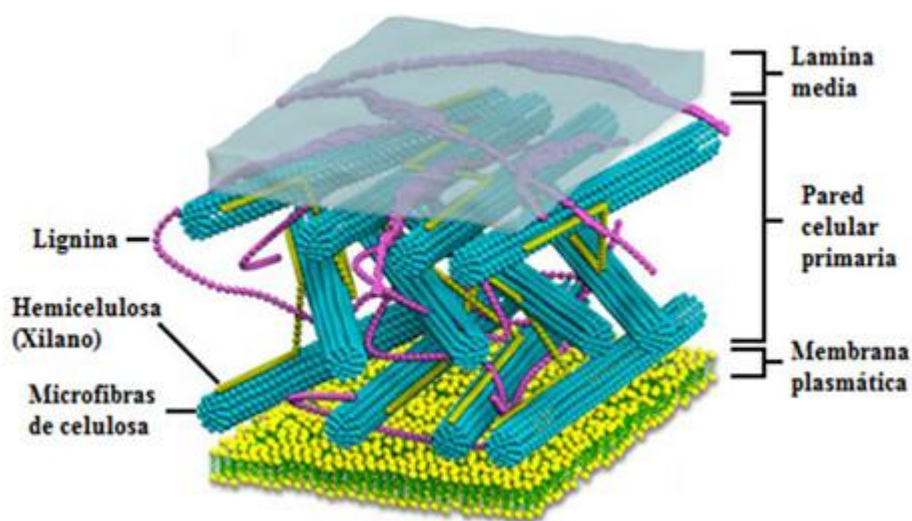


Figura 2. Imagen representativa de la pared celular de una planta. Robledo Olivo Armando (2012).

La mayoría de los xilanos se encuentran en forma de heteropolisacáridos, conteniendo diferentes grupos sustituyentes en la cadena principal y la cadena lateral dentro de los cuales se encuentran de manera más común los residuos de acetil, arabinosil y glucuronisil.

Los homoxilanos, por otra parte, consisten exclusivamente en residuos de xilosil y debido a que no está distribuido en la naturaleza ha sido aislado de diferentes materiales.

Sistema xilanolítico microbiano

Debido a su complejidad estructural, se requiere de varias hidrolasas para degradar xilano completamente. La enzima clave para este proceso, es la endo- β -(1,4)-xilanasas [EC 3.2.1.8], la cual fracciona los enlaces internos β -(1,4) en la cadena principal a residuos no modificados, generando diferentes xilooligosacáridos que se sustituyen en la longitud de cadena (Assamoi y col., 2008; Gupta y Kar, 2008; Gogou y col., 2010; Knob y col., 2010).

Los sistemas de enzimas xilanolíticas que realizan la hidrólisis de xilano están compuestos usualmente por un repertorio de enzimas hidrolíticas: β -1,4-endoxilanasas, β -xilosidasas, α -L-arabinofuranosidasas, α -glucuronidasas, acetil xilano-esterasa y ácido fenólico-esterasa.

Todas estas enzimas actúan cooperativamente para convertir al xilano en sus azúcares constituyentes, principalmente la pentacarbono D-xilosa. La presencia de dichos sistemas de enzimas xilanolíticas multifuncionales está totalmente distribuida entre los hongos, actinomicetos y bacterias (Beg y col., 2001). El figura 1 resume las propiedades bioquímicas de algunas xilanasas termoestables reportadas en la literatura.

Las xilanasas fúngicas son las más importantes desde el punto de vista industrial, debido a que sus actividades extracelulares son mucho mayores que aquellas provenientes de levaduras y bacterias. Especies de *Aspergilli*, *Penicillia* y *Trichoderma* son ejemplos de microorganismos que pueden producir isoenzimas xilanolíticas.

Producción de xilanasa a partir de la cepa *Rh. pusillus* en fermentación en medio sólido aplicando un diseño experimental Taguchi L9.

El *Penicillia* es el mayor saprófito en la naturaleza y numerosas especies son de particular valor para la humanidad, muchos de ellos constituyen una rica fuente de enzimas para la biodegradación del xilano (Knob y col., 2010).

La síntesis de xilanasas por los diferentes microorganismos, puede ser regulada mediante su inducción por sustratos naturales y por represión por fuentes de carbono de bajo peso molecular, tanto en medios de fermentación líquidos, como sólidos. Varios investigadores han reportado la inducción de la xilanasa por lignocelulosas, en salvado de trigo, paja de arroz, olote de maíz y bagazo de caña. (Beg y col., 2001).

En algunos casos azúcares rápidamente metabolizables, como glucosa y/o xilosa, son supresores de la síntesis de xilanasa (Beg y col., 2001). Por el contrario, se ha reportado que algunos compuestos pueden incrementar la producción de xilanasa por algunos microorganismos, como lo son los aminoácidos, calcio sintético adicionado con zeolita al 0.5 %, medios bifásicos sólido-líquido y algunos isómeros posicionales (Beg y col., 2001).

Producción de xilanasa a partir de la cepa *Rh. pusillus* en fermentación en medio sólido aplicando un diseño experimental Taguchi L9.

Tabla 1. Características de la xilanasa de diferentes microorganismos (kDa kilodaltons)

Microorganismo	Peso Molecular (kDa)	Óptimo		Estabilidad		pI	K _m (mg/mL)	Vmax (μM/min)
		pH	Temperatura (°C)	pH	Temperatura (°C)			
Bacterias								
<i>Bacillus</i> sp. W-1	21.5	6	65	4 - 10	40	8.5	4.5	-
<i>Bacillus</i> sp. strain K-1	23	5.5	60	5 - 12	50 - 60	-	-	-
<i>Staphylococcus</i> sp. SG-13	60	7.5, 9.2	50	7.5 - 9.5	50	-	4	90
<i>Thermotoga maritima</i> MSB8	40, 120	5.4, 6.2	92 - 105	-	-	5.6	1.1, 0.29	374, 476
Hongos								
<i>Aspergillus niger</i>	13.5 - 14.0	5.5	45	5 - 6	60	9	-	-
<i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308	26 - 35	2 - 5.5	50 - 60	1 - 10	30 - 60	3.5 - 6.7	-	-
<i>Penicillium purpurogenum</i>	33, 23	7, 3.5	60, 50	6 - 7.5, 4.5 - 7.5	40	8.6, 5.9	-	-
<i>Trichoderma harzianum</i>	20	5	50	-	40	-	0.58	0.106
Levaduras								
<i>Trichosporon cutaneum</i> SL409	-	6.5	50	4.5 - 8.5	50	-	-	-
Actinomicetos								
<i>Streptomyces</i> sp. QG-11-3	-	8.6	60	5.4 - 9.2	50 - 75	-	1.2	158.85

En la actualidad, el empleo de técnicas amigables con el medio ambiente en los procesos de manufactura ha requerido del uso de enzimas que degraden o ayuden a degradar la hemicelulosa presente en material vegetal. Tal es el caso de la industria de la pulpa y el papel, que con el empleo de xilanasas reducen el uso de sustancias cloradas, debido a las propiedades blanqueadoras de éstas enzimas (Saha, 2003).

Su efectividad empleando bajos volúmenes y su medición de actividad enzimática mediante un método preciso y de bajo costo, le ha conferido a la xilanasa el uso en los procesos de clarificación de jugos y vinos, licuefacción de mucílago de café; extracción de saborizantes, pigmentos, aceites de plantas y

Producción de xilanasa a partir de la cepa *Rh. pusillus* en fermentación en medio sólido aplicando un diseño experimental Taguchi L9.

semillas; maceración de materia vegetal; acondicionamiento de piensos para aves y cerdos, en la industria de la panificación (Ponce y Pérez, 2002), producción de bioetanol, xilitol (García y col., 2009; Knob y col., 2010) y recientemente como integradores tiempo-temperatura (Gogou y col., 2010).

FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCION DE XILANASA

Los factores básicos para la producción de enzimas xilanolíticas son, la elección de un sustrato inductor apropiado y una composición optima del medio. Los hongos filamentosos son productores particularmente interesante de xilanasas ya que excretan las enzimas en el medio y sus niveles de producción son muchos más altos que los de la levadura y bacterias. Sin embargo, las xilanasas fúngicas están generalmente asociadas con celulosas.

Por lo tanto, el cultivo de algunos hongos en xilanos sin presencia de celulosa y con una relación baja de nitrógeno-carbono puede ser una de las estrategias para la producción de enzimas xilanolíticas libres de celulosa. Sin embargo, también se encontraron sustratos celulósicos que pueden ser esenciales en el medio para la producción máxima de xilanasa por *Clostridium stercorarium*, *Thermomonospora curvate* y *Neurospora crassa*.

Producción de xilanasa a partir de la cepa *Rh. pusillus* en fermentación en medio sólido aplicando un diseño experimental Taguchi L9.

Sustratos más baratos de hemicelulosa como la mazorca de maíz, salvado de trigo, salvado de arroz, paja de arroz, bagazo de caña de maíz y también se han caracterizado para ser más adecuado para la producción de xilanasa en el caso de ciertos microorganismos tales como *Aspergillus awamori*, *Pinicillium purpurogenum* y alcalifílica tremofilica de *Basillus sp.* NCIM 59.

RHIZOMUCOR PUSILLUS

Clasificación taxonómica

Pertenece a reino fungí, la filo zigomicota, al orden de los mucorales, a la familia mucoraceae y su género es *Rhizomucor*.

Rhizomucor pusillus se ha informado a ser incapaces de degradar papel de filtro o carboximetilcelulosa o lignocelulósico en forma de papel de periódico. Sin embargo, se detectaron actividades de las enzimas celulolíticas en sobrenadantes de células cultivadas en el salvado de trigo: las actividades de endoglucanasa y beta-glucosidasa fueron inducidos por CMC 8. Tomado en conjunto, estos resultados indican que este organismo es débilmente celulolítica.

Cuando se cultiva en pulpa de remolacha azucarera, en condiciones en las otras especies de hongos termófilos producen xilanasas, *Rh. pusillus* producidos sólo niveles muy bajos de actividad de xilanasa.

Rhizomucor pusillus se ha informado a ser incapaces de degradar papel de filtro o carboximetilcelulosa o lignocelulósico en forma de papel de periódico. Sin embargo, se detectaron actividades de las enzimas celulolíticas en

Producción de xilanasa a partir de la cepa *Rh. pusillus* en fermentación en medio sólido aplicando un diseño experimental Taguchi L9.

sobrenadantes de células cultivadas en el salvado de trigo: las actividades de endoglucanasa y beta-glucosidasa fueron inducidos por CMC.

Tomado en conjunto, estos resultados indican que este organismo es débilmente celulolítica. Cuando se cultiva en pulpa de remolacha azucarera, en condiciones en las otras especies de hongos termófilos producen xilanasas, *Rh. pusillus* producidos sólo niveles muy bajos de actividad de xilanasa.

MATERIALES Y METODOS

En el presente trabajo consistió en inocular olote molido de maíz clasificado como desecho agroindustrial en distintos tamaños dándoles ciertos procesos para poder estar listo y montar fermentación, esto se les hizo un molienda, en seguida se tamizo y clasifico en tamaños diferentes, para luego pasara a esterilizar y así no introducir contaminantes, utilizando una cepa *Rhizomucor pusillus* SOC-4A

Obtención de olote

El olote fue donado por el departamento del maíz de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, se le dio el proceso de molienda y se redujo el tamaño de partícula realizando una clasificación de 0.5, 1 y 1.5 mm de diámetro en tamices con marco de acero de 8 pulgadas de diámetro y 2 pulgadas de altura con malla certificada ASTM E11 de acero inoxidable.

Microorganismos y medios de cultivo

El microorganismo utilizado en este trabajo fue aislado y purificado (Robledo y col 2015) Una vez puro se preservó en leche descremada (Leche svelty) y glicerol almacenado a -20 °C (PANASONIC, REFRIGERADOR MPR-414). Se activó la cepa con agar papa dextrosa (BDBioxon), con una incubación de 4 días.

Las esporas fueron cosechadas con una solución de Tween 80 (0.1%) en agua destilada, se realizó el recuento de esporas en una cámara de Neubauer y se tomó el volumen adecuado para realizar la siembra, siendo que la muestra sólida se le dio un proceso de esterilización antes de inocular, teniendo las medidas adecuadas y dando un proceso de higiene a todos los materiales a usar para no generar contaminantes, después de este proceso se realizó la inoculación del medio con una concentración de 3×10^7 esporas que se le inoculó a cada cantidad de muestra sólida.

Al medio se le agregó medio czapec-dox, que funciona como un medio para el cultivo de hongos saprófitos, bacterias del suelo y otros microorganismos a partir de diversos materiales. (NaNO₃: 7.65 g/L, KH₂PO₄: 3.04 g/L, MgSO₄: 1.55 g/L, KCl: g/L), por volumen específico por datos proporcionado en relación de método Taguchi, este medio contiene las sales necesarias para el crecimiento de este tipo de moho.

Producción de xilanasa a partir de la cepa *Rh. pusillus* en fermentación en medio sólido aplicando un diseño experimental Taguchi L9.

Diseño de experimentos de Taguchi.

La fermentación se enfocó al diseño ortogonal L9 de Taguchi, con 4 factores en 3 niveles. Empleando aireación (0.4, 0.8 y 1.2 LPM), empaque (60, 80 y 100 g/l), relación carbono-nitrógeno (8, 16 y 24) y el tamaño de partícula (Diámetro 0.5, 1.0 y 1.5 mm). Se inoculo en cada columna (3×10^7 esporas/gramo de soporte seco: gss) y se incubaron (Yamato IC403C) a 55 °C durante 96 horas monitoreando cada 24 h (0, 24, 48, 72, 96 horas)

Se utilizó un diseño experimental Taguchi, con una matriz ortogonal estándar L9, para examinar 4 factores en 3 niveles (Tabla2). La L y el subíndice (9) representan el cuadrado latino y el número de corridas experimentales, respectivamente.

Los resultados obtenidos de las extracciones de sustrato se determinaron por un análisis estadístico; entonces el análisis de la varianza se aplicó para determinar qué factores fueron estadísticamente significativos. Se identificaron los factores de control, con la magnitud de los efectos calificados y los efectos estadísticamente significativos determinados. En consecuencia, las condiciones óptimas se determinaron mediante la combinación de los niveles de factores que tenían el más alto valor.

Producción de xilanas a partir de la cepa *Rh. pusillus* en fermentación en medio sólido aplicando un diseño experimental Taguchi L9.

Tabla 2: Factores del sistema ortogonal Taguchi

Factores	Niveles			
	0.4	0.8	1.2	
Aire				LPM
Empaque	60	80	100	g/L
CN	8	16	24	
Partícula	0.5	1	1.5	mm

Recuperación de extracto enzimático

El material fermentado se lavó con una solución de NaCl 9 % y Tween 80 al 1 % y se recuperaron por filtración. Los filtrados se almacenaron en congelación hasta su análisis manteniéndolo en proceso de conservación controlada. La actividad xilanas se determinó según Bailey (1). El análisis de datos se realizó en minitab 16.

Diseño experimental Taguchi, una matriz ortogonal estándar L9 se utilizó 15 grado de libertad para examinar 4 factores en 3 niveles. La L y el subíndice (9) representan el cuadrado latino y el número de corridas experimentales, respectivamente.

Los resultados obtenidos de las extracciones de sustrato se determinaron por un análisis estadístico; entonces el análisis de técnica de la varianza se aplicó para determinar qué factores fueron estadísticamente significativas. Se identificaron los factores de control, con la magnitud de los efectos cualificados y los efectos estadísticamente significativos determinados. En consecuencia,

Producción de xilanasa a partir de la cepa *Rh. pusillus* en fermentación en medio sólido aplicando un diseño experimental Taguchi L9.

las condiciones óptimas se determinaron mediante la combinación de los niveles de factores que tenían el más alto valor.

Sistema de cultivo en columna fluida

En la realización del estudio cinético se enfocó en el sistema ortogonal Taguchi L9 inoculado el hongo en vasos de precipitado estériles con el volumen adecuado de inóculo y las sales czapec-dox y se pasó a las columnas de vidrio (2cm de diámetro y 20 cm altura) hasta completar el 80% del volumen, manteniendo en un modo estéril los materiales para evitar cualquier riesgo de contaminación, mostrando las características adecuadas para que tenga un flujo de aire del cual se llevó incubación en una estufa a 55 °C (Incubadora IC403C), dando una distribución de aire por mangueras para cada columna, con una aeración forzada que en este caso se manejó de 0.4 lt/min siendo retirada las muestras después de 120 horas, posteriormente obteniendo los resultados del sistema ortogonal se sometió al estudio cinético enfocándonos en los factores adecuados para la producción de la enzima llevándolo a una cinética de 120 horas monitoreando cada 24 h (0, 24, 48, 72, 96 y 120 h)

Contenido de azúcares reductores en extracto

El contenido de azúcares reductores contenidas en los extractos por el método colorimétrico de DNS propuesto por Miller, se basa en la reducción del ácido 3, 5-dinitrosalicílico (DNS) (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor, al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo) (Chaplin, 1986), cuya presencia puede detectarse por lectura de la Absorbancia en la zona de 540-

Producción de xilanasa a partir de la cepa *Rh. pusillus* en fermentación en medio sólido aplicando un diseño experimental Taguchi L9.

570 nm, esto se llevó a cabo mediante mezclas de reacción teniendo en cuenta las cantidades adecuadas por tubos de ensaye que siendo después de las mezclas de reacción se le añade las cantidades de DNS y se somete a un punto de ebullición luego a un sistema de baño de hielo los intervalos de tiempo son de 5 minutos luego se leyó a 540 nm en el espectrofotómetro (UV/VIS Velab).

Actividad Xilanasa en extracto enzimático.

La actividad xilanasa es la responsable de la degradación de los xilanos contenidos en la molécula de hemicelulosa (Ghose and Bisaria 1987). En un tubo de ensaye colocar 700 μ L de sustrato más 300 μ L de extracto enzimático.

Cada tubo se coloca en baño maría a 50 °C durante 5 minutos y se detiene la reacción mediante baño de hielo durante 5 minutos.

A cada tubo se le miden azúcares reductores. Cada una de las determinaciones debe realizarse por triplicado o de acuerdo a las muestras que se tengan. Los tubos pueden ser incubados simultáneamente.

RESULTADOS Y DISCUSION

Mediante la implementación de método Taguchi pudimos definir los parámetros correspondientes para minimizar tiempos y costos de producción de nuestra producción de Xilanasa, obteniendo datos significativos se procede a realizar la cinética para ver la velocidad de producción, realizando en un columnas con aire forzado y con hasta un 80% de su volumen de material lignocelulosico con inoculo y sales que trabajan como estabilizador para el crecimiento de los mohos.

Tabla 3: Arreglo ortogonal con media de resultados

Experimento	Aire	Empaque	CN	Particula	Xilanasa (U/gss)
1	0.4	60	8	0.5	78.50
2	0.4	80	16	1	37.35
3	0.4	100	24	1.5	0.63
4	0.8	60	16	1.5	7.58
5	0.8	80	24	0.5	16.49
6	0.8	100	8	1	14.18
7	1.2	60	24	1	14.18
8	1.2	80	8	1.5	0.95
9	1.2	100	16	0.5	18.80

Tabla 4. Factores responsables de producción de xilanasa

Response Table for Means

Level	Aire	Empaque	CN	Particula
1	38.828	33.420	31.209	37.931
2	12.751	18.264	21.245	21.905
3	11.309	11.204	10.435	3.053
Delta	27.519	22.216	20.775	34.877
Rank	2	3	4	1

El Rank nos indica el grado de cómo afecta a la actividad xilanasa, siendo el tamaño de partícula en 1er lugar, luego el aire, el empaque y la relación carbono nitrógeno, no muestra que la partícula es uno de los factores que afecto la producción de esta enzima, siendo que el tamaño de la partícula requiere humedad y un tratamiento antes de ser sometida a fermentación, estos parámetros son considerados factores de ruido que no pudimos controlar y fue causante de este nivel de producción.

Producción de xilanasa a partir de la cepa Rh. pusillus en fermentación en medio sólido aplicando un diseño experimental Taguchi L9.

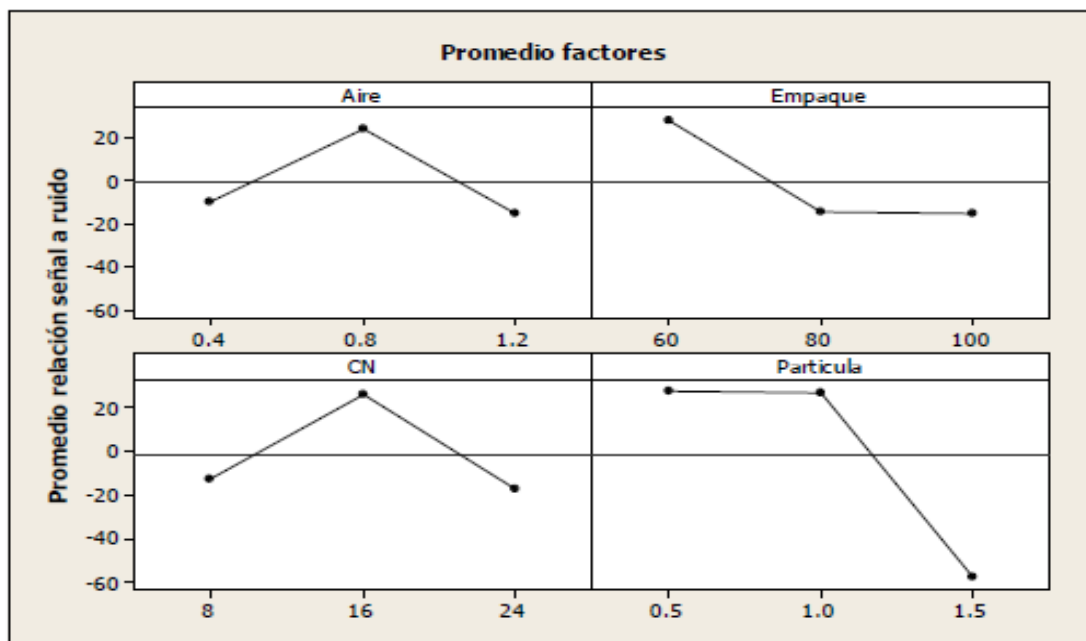


Tabla 5: Valor estimado de optimización

Los datos obtenidos se analizaron mediante un programa estadístico que nos arroja gráficos representando cuáles eran los factores más representativos en cuanto a las condiciones proporcionadas, mostrándonos en algunos factores resultados significativos.

El comportamiento de algunos resultados muy bajos en la producción de Xilanasa se le puede llamar factores de ruido que afecten a este proceso, siendo consecuencia de efectos que no son controlados por el sistema sino que se pueden originar por situaciones ambientales o comportamiento del microorganismo dentro del medio.

Tabla 6. Valores estimados de producción de xilanasa

Producción de xilanasa a partir de la cepa Rh. pusillus en fermentación en medio sólido aplicando un diseño experimental Taguchi L9.

Valores estimados				
Promedio				
131.56 U/gss				
Niveles de factores para la predicción				
Aire	Empaque	CN	Partícula	
	0.8	60	16	0.5

Los resultados obtenidos, todos los factores en estudio influyeron en la producción de xilanasa (Tabla 6). El tamaño de partícula fue el principal parámetro influyente en la producción de xilanasa a nivel individual. Seguido de la relación carbono-nitrógeno, el empaque del material y en último la aireación.

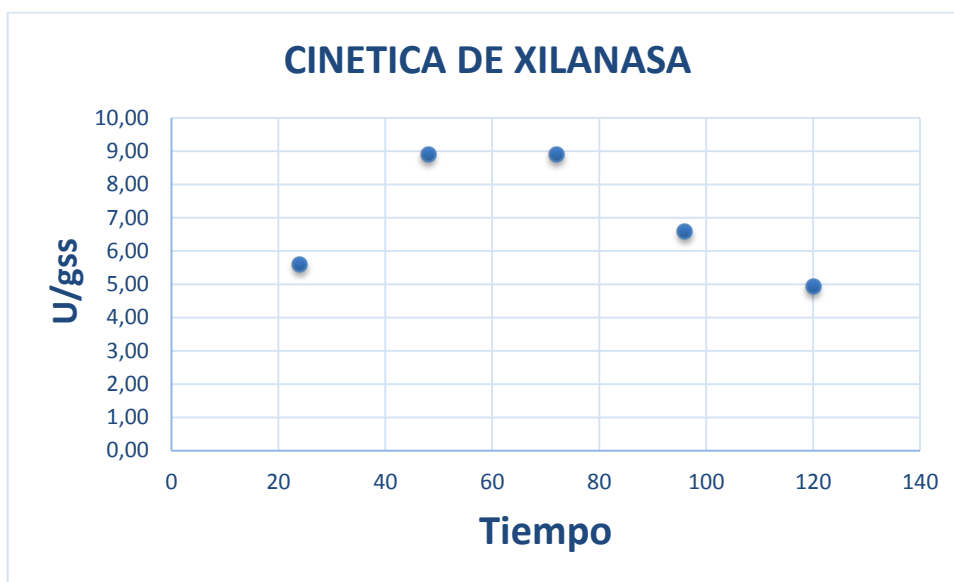
La producción xilanasa registró el menor valor (1.12 U/gramo de soporte seco: gss), con las condiciones de aire: 0.4 LPM; empaque: 100 g/l; carbono-nitrógeno: 24; partícula: 1.5 mm. Mientras que el mayor valor (83.69 U/gss) se registró con las condiciones de aire: 0.4 LPM; empaque 60 g/l; carbono-nitrógeno: 8; partícula 0.5 mm.

La predicción de la optimización por medio del programa (Tabla 2), mostró que las condiciones ideales para maximizar la producción de xilanasa con un valor estimado de 131.56 U/gss fueron: aire a (0.8 LPM), empaque (60 g/l), CN (16) y partícula (0.5 mm).

Dentro de nuestros resultados podemos ver las diferencias en cuanto lo estimado y lo que se obtuvo, esto se puede reflejar por factores de ruido que no se manipulan por el sistema o por el hombre, comparando nuestros resultados en una investigación que se enfocó a determinar los parámetros significativos en la producción de proteasa de *Bacillus subtilis* por HB04 en fermentación sumergida teniendo a cinco factores carbono, nitrógeno, iones metálicos, la temperatura y la agitación, cada uno a cuatro niveles y un diseño de matriz ortogonal de L16 (45) llevan a cabo. El resultado experimento indicó que la dextrosa (1%), (NH₄)₂PO₄ (0,5%), temperatura (30 ° C) y agitación (100 rpm) fueron los factores importantes para la producción de la proteasa de *Bacillus subtilis* HB04 en fermentación sumergida en los niveles óptimos. Venil, C. K., & Lakshmanaperumalsamy, P. (2015)

Producción de xilanasa a partir de la cepa *Rh. pusillus* en fermentación en medio sólido aplicando un diseño experimental Taguchi L9.

Tabla 7: Grafica de contribución de factores (%)



De los valores optimizados se puede observar las diferentes velocidades de producción de xilanasa, se realizó la verificación de las condiciones óptimas y se obtuvo los mejores valores a las 48 h (Tabla 7) en esto, dándonos a conocer las diferentes velocidades de producción, lo que puede influenciar o aturdir la rapidez de desarrollo de esta enzima son cuestiones ambientales que no las podemos controlar, también tenemos que ver el comportamiento de microorganismo en el medio que se inoculó que probablemente son los que afectaron que se originara una velocidad adecuada o que se generara resultados similares entre los tiempos.

Producción de xilanasa a partir de la cepa *Rh. pusillus* en fermentación en medio sólido aplicando un diseño experimental Taguchi L9.

Así como podemos ver los resultados significativos de esta investigación, podemos comparar el método Taguchi que facilita muchos procesos en cuanto a la siguiente investigación, se aplicó el diseño experimental para optimizar las condiciones para la producción de proteasa por *Bacillus subtilis* HB04. Este enfoque facilitó el estudio de la interacción de un gran número de variables abarcado por factores y su configuración con un pequeño número de ensayos experimentales que conducen a la economía considerable en tiempo y costo para la optimización de procesos. Venil, C. K., & Lakshmanaperumalsamy, P. (2015)

CONCLUSIONES.

Para concluir, el método ortogonal Taguchi se puede utilizar para optimizar los factores del proceso de FMS y así incrementar volúmenes de producción sin tener altos costos y tiempos de procesos.

La técnica de optimización estadística fue empleada con éxito en la mejora de la producción de xilanasa siendo que las respuestas de los tratamientos se analizaron por el método gráfico.

El diseño experimental determinó la influencia de factores individuales, así como los niveles óptimos para el mejor funcionamiento. Los mejores factores para la producción de xilanasa son los óptimos para FMS empleando olote de maíz, aplicada en un biorreactor en columnas, por la cepa *Rh pusillus*, implementado el método Taguchi.

REFERENCIAS

- Robledo Olivo Armando, Aguilar Cristóbal Noé, Montañez Sáenz Julio Cesar, USO DEL OLOTE DE MAIZ COMO SUSTRATO MICROBIANO PARA OBTENCION DE XILANASAS (2012).
- Acosta A., Cinetica de producción de celulasa y proteasa termoestable sobre olate de maíz por *Rh. pusillus* SOC 4^a, pp.58,62. disponible en: <http://uaaan.dspace.escire.net/bitstream/handle/123456789/530/62677s.pdf?sequence=1>
- Owen R. fennema (2000) QUIMICA DE LOS ALIMENTOS
- Saha B.C., 2003. Hemicellulose bioconversion. J Ind Microbiol Biotechnol (2003) 30: 279-291.
- CNIB Centro Nacional de Información Sobre Biotecnología (junio 2005) XYLANASES FROM FUNGI: PROPERTIES AND INDUSTRIAL APLICATIONS.
- Biely P., 1985. Microbial xylanolytic systems. Trends Biotechnol (1985) 3:286-290.
- Pal, A., & Khanum, F. (2010). Production and extraction optimization of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5 through solid-state-fermentation. Bioresource technology, 101(19), 7563-7569.
- García-Simões M.L., Tauk-Tornisielo S.M., Tapia-Tapia D.M., 2009. Screening of culture condition for xylanase production by filamentous fungi. Afr. J. Biotechnol. vol. 8 (22), pp 6317-6326.
- Gogou E., Katapodis P., Christakopoulos P., Taoukis P. S., 2010. Effect of water activity on the thermal stability of *Thermomyces lanuginosus* xylanases for process time-temperature integration. J. Food Eng. (2010) 100: 649-655.
- Senthilkumar, S. R., Ashokkumar, B., Raj, K. C., & Gunasekaran, P. (2005). Optimization of medium composition for alkali-stable xylanase production by *Aspergillus fischeri* Fxn 1 in solid-state fermentation using central composite rotary design. Bioresource Technology, 96(12), 1380-1386.
- Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. Biotechnology advances, 27(2), 185-194.

Producción de xilanasa a partir de la cepa *Rh. pusillus* en fermentación en medio sólido aplicando un diseño experimental Taguchi L9.

- Venil, C. K., & Lakshmanaperumalsamy, P. (2015). Taguchi experimental design for medium optimization for enhanced protease production by *Bacillus subtilis* HB04.
- Saha B.C. y Bothast R.J. 1999. Pretreatment and enzymatic saccharification of corn fiber. *Appl Biochem Biotechnol* 76:65-77.