

# “UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO”



## DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

## DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Comparación cinética de la producción de xilanasa por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A empleando biorreactores de placa y de columna.

## TESIS

Presentada por:

**ALEJANDRO GUERRERO MATA**

Para obtener el grado de:

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**“UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO”**

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**TESIS**

Comparación cinética de la producción de xilanasa por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A empleando biorreactores de placa y de columna.


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

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Presentada por:

**ALEJANDRO GUERRERO MATA**

El trabajo ha sido evaluado y aprobado por el siguiente consejo.

  
\_\_\_\_\_  
Mc. Armando Robledo Olivo  
Director de la Tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Mario Alberto Cruz Hernández  
Codirector

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez  
Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Ruth Elizabeth Belmares Cerda  
Asesor

Buenvista, Saltillo, Coahuila; México

Abril de 2014

**“UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO”**

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**TESIS**

Comparación cinética de la producción de xilanasa por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A empleando biorreactores de placa y de columna.

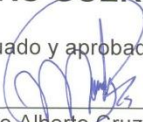
Que se somete a consideración del H. jurado como requisito parcial para obtener el título de


**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Presentada por:


**ALEJANDRO GUERRERO MATA**

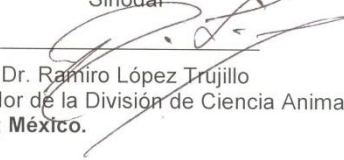
El trabajo ha sido evaluado y aprobado por el siguiente consejo.

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Mario Alberto Cruz Hernández  
Presidente del jurado

  
\_\_\_\_\_  
Mc. Armando Robledo Olivo  
Sinodal

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Dolores Gabriela Martínez Vázquez  
Sinodal

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Ruth Elizabeth Belmares Cerda  
Sinodal

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Ramiro López Trujillo  
Coordinador de la División de Ciencia Animal  
Buenavista, Saltillo, Coahuila; México.



Abril de 2014

## AGRADECIMIENTOS

Muchos iniciamos el mismo camino pero pocos pudimos llegar hasta el final, te doy gracias dios por haberme dado sabiduría y fuerza durante todo este tiempo.

A mi madre que es el ser más maravilloso de todo el mundo, gracias por el apoyo moral, tu cariño y comprensión que desde pequeño me has brindado, por orientar mi camino y estar junto a mí en los momentos más difíciles. Gracias por guiar mi vida con energía, esto es lo que ha hecho que sea quien soy.

A mi alma mater por haberme formado no solo como profesionista si no como persona con valores éticos cívicos y morales, a todos y cada uno de mis profesores que contribuyeron a mi formación.

A mis hermanos Karina y Sergio por su apoyo moral incondicional tan importante a lo largo de mi carrera.

A toda la familia guerrero mata por la motivación el apoyo moral y económico y por todas las vivencias que hemos pasado.

A la familia Jacobo Morales por su apoyo incondicional a lo largo de mi formación como profesionista.

A la familia valencia Resendis por todo el apoyo y los consejos brindados que fueron importantes para mi formación.

A la familia Galván Espino por el apoyo moral y por todos los consejos.

A todos y cada uno de mis maestros y asesores que son la pieza más importante en mi formación y que además de conocimientos me inculcaron valores y experiencias.

A mis compañeros por su apoyo motivación y el compartir sus conocimientos en esas discusiones tan enriquecedoras.

## INDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCION.....	1
3. JUSTIFICACION.....	3
4. HIPOTESIS.....	3
5. OBJETIVOS.....	3
5.1. Objetivo general.....	3
5.2. Objetivos específicos.....	3
6. ANTECEDENTES.....	4
6.1. Reglas de nomenclatura.....	4
6.2. Xilanasa [EC 3.2.1.8].....	5
6.3. Estructura del xilano.....	7
6.4. Factores que afectan la producción de xilanasa.....	8
6.5. <i>Rizomucor pusillus</i> .....	9
6.6. Fermentación en sólido .....	10
6.7. Principios de diseño de un biorreactor.....	11
6.8. Biorreactores en medio sólido .....	11
6.9. Ejemplos de biorreactores en medio sólido .....	12
7. MATERIALES Y METODOS.....	18
7.1. Obtención del olote.....	18
7.2. Microorganismos y medios de cultivo.....	18
7.3. Sistemas de cultivo.....	19
7.3.1. Placa estática .....	19
7.3.2. Placa fluida.....	19
7.3.3. Columna estática.....	19
7.3.4. Columna fluida.....	20
7.4. Ensayo enzimático.....	20
7.5. Contenido de azúcares reductores.....	20
7.6. Biomasa.....	20
7.7. Contenido de azúcares totales.....	20
7.8. Parámetros cinéticos asociados al crecimiento microbiano.....	21

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
8.1. Producción de xilanasa en biorreactor de placa estática.....	23
8.2. Producción de xilanasa en biorreactor de placa fluida.....	29
8.3. Producción de xilanasa en biorreactor de columna estática.....	34
8.4. Producción de xilanasa en biorreactor de columna fluida.....	39
8.5. Comparación.....	44
9. CONCLUSIONES.....	48
10. REFERENCIAS.....	50
11. ANEXOS.....	53
11.1. Recuento de esporas.....	53
11.2. Incubación para el hongo termófilo.....	54
11.3. Preservación del hongo en leche descremada y glicerol.....	55
11.4. Medio de cultivo sales de XZAPEC-DOX.....	56
11.5. Solución amortiguadora acetato de sodio 50 mM (PH6).....	56
11.6. Obtención del extracto a partir de material vegetal.....	57
11.7. Método de aireación para biorreactores de placa y columna.....	58
11.8. Preparación del DNS para cuantificación de azúcares reductores..	59
11.9. Cuantificación de actividad xilanasa a partir del extracto	
enzimático.....	60
11.10. Cuantificación de azúcares reductores a partir del extracto	
enzimático.....	62
11.11. Cuantificación del contenido de biomasa a partir del extracto por el	
método bradford .....	63
11.12. Cuantificación del contenido de azúcares totales a partir del extracto	
por el fenol-sulfúrico.....	65

## ÍNDICE DE GRAFICAS

1. Gráfica 1.- Comportamiento cinético de <i>Rh Pusillus</i> SOC-4A para la producción de xilanasa en placa sin aireación.....	24
2. Gráfica 2.- comparación entre el modelo matemático (-) y el experimental (◊) en la producción de xilanasa.....	24
3. Gráfica 3.- contenido de azúcares reductores en el sustrato obtenido del reactor de placa estática.....	25
4. Gráfica 4.- contenido de biomasa en el extracto obtenido del reactor de placa estática.....	26
5. Gráfica 5.- comparación del comportamiento del modelo matemático (-) y el experimental (◊) en cuanto a biomasa en biorreactor de placa estática.....	27
6. Gráfica 6.- contenido de azúcares totales en el extracto obtenido del biorreactor de placa estática.....	28
7. Gráfica 6.- contenido de azúcares totales en el extracto obtenido del biorreactor de placa estática.....	28
8. Gráfica 8.- producción de xilanasa en medio placa fluida por <i>Rh Pusillus</i> soc 4A.....	29
9. Gráfica 9.- comparación en el comportamiento de la producción de extracto enzimático en el diseño experimental (◊) y el diseño matemático (-) en el biorreactor de placa fluida.....	29
10. Gráfica 10.- contenido de azúcares reductores en el extracto obtenido del biorreactor de placa fluida.....	31
11. Gráfica 11.- contenido de biomasa en el extracto obtenido del biorreactor placa fluida.....	32
12. Gráfica 12.- comparación entre el modelo matemático (-) y el experimental (◊) en cuanto al contenido de biomasa en biorreactor de placa fluida.....	32
13. Gráfica 13.- contenido de azúcares totales en el extracto obtenido del biorreactor placa fluida.....	33

14. Gráfica 14.- comparación entre el modelo matemático (-) y el experimental (◊) en el biorreactor de placa fluida.....	34
15. Gráfica 15.- producción de xilanas en biorreactor de columna estática por <i>Rh Pusillus</i> soc 4A.....	34
16. Gráfica 16.- comparación entre el modelo matemático (-) y el experimental (◊) en el comportamiento de la producción de xilanas en el biorreactor de columna estática.....	35
17. Gráfica 17.- contenido de azúcares reductoras en el extracto obtenido de la fermentación en reactor de columna estática.....	36
18. Gráfica 18.- contenido de biomasa en el extracto obtenido del biorreactor de columna estática.....	37
19. Gráfica 19.- comparación entre el modelo matemático (-) y el experimental (◊) en el comportamiento del contenido de biomasa en el biorreactor de columna estática.....	37
20. Gráfica 20.- contenido de azúcares totales en el extracto obtenido del biorreactor de columna estática.....	38
21. Gráfica 21.- comparación entre el modelo matemático (-) y el experimental (◊) en el contenido de azúcares totales en el biorreactor de columna estática.....	38
22. Gráfica 22.- contenido de xilanas en el extracto obtenido del biorreactor de columna fluida producida por <i>Rh Pusillus</i> soc 4A.....	39
23. Gráfica 23.- comparación entre el modelo matemático (-) y el experimental (◊) en el contenido de xilanas en biorreactor de columna fluida.....	40
24. Gráfica 24.- contenido de azúcares reductores en el extracto obtenido del biorreactor de columna fluida.....	41
25. Gráfica 25.- contenido de biomasa en el extracto obtenido del biorreactor de columna fluida.....	42
26. Gráfica 26.- comparación entre el modelo matemático (-) y el experimental (◊) en el contenido de biomasa en el biorreactor de columna fluida.....	42



27. Gráfica 27.- contenido de azúcares totales en el extracto obtenido del biorreactor de columna fluida.....	43
28. Gráfica 28.- comparación entre el modelo matemático (-) y el experimental (◇) en el contenido de azúcares totales en el biorreactor de columna fluida.....	43
29. Gráfica 29.- comparación de la producción de xilanasa en los distintos biorreactores.....	45
30. Gráfica 30.- comparación de el contenido de azúcares reductores en el extracto obtenido de los distintos biorreactores.....	46
31. Gráfica 31.- comparación del contenido de biomasa en los extractos obtenidos de los distintos biorreactores.....	47
32. Gráfica 32.- comparación del contenido de azúcares totales en los extractos obtenidos de los distintos biorreactores.....	48

## 1. RESUMEN

En la actualidad el uso de enzimas es muy importante para la alta productividad en los procesos industriales, en el presente trabajo se realizó un estudio comparativo de la producción de xilanasa para uso industrial en distintos biorreactores con diferentes tratamientos. En este trabajo también se puede apreciar una parte ecológica por la utilización de residuos agroindustriales como es el olote de maíz, que es clasificado como contaminante en altas cantidades. El material biológico fue tratado para eliminar residuos de pesticidas u otras sustancias químicas que pudieran inhibir el crecimiento del microorganismo. Se inocularon muestras con una cantidad de  $12 \times 10^7$  esporas sobre mililitro del hongo *Rizomucor pusillus* y se pusieron en incubación a 55°C con una cinética de 120 horas.

La mayor producción de xilanasa se registró en el biorreactor de columna estática a las 48 horas con valores de 7252 U/gds.

Palabras clave: *Rizomucor pusillus*, xilanasa, fermentación sólida, enzima.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las enzimas juegan un papel muy importante, tanto en la rama alimentaria como en la industrial de productos de uso cotidiano y son útiles como indicadores, sintetizadoras de otras sustancias así como degradadoras de moléculas mayores. Las enzimas pueden ser producidas por plantas, animales y microorganismos (Ponce y Pérez 2002), siendo estos últimos los más utilizados por su fácil manipulación y acondicionamiento para que se produzcan las enzimas o metabolitos que se desea obtener.

Los principales géneros microbianos productores de enzimas son: bacterias y hongos (Ponce y Pérez 2002). La productividad de ambos géneros están sujetos a las condiciones del medio que este los contenga. Por lo regular, en la ingeniería microbiológica se le proporcionan los nutrimentos adecuados para cada

microorganismo dependiendo de lo que se quieran producir ya sea biomasa u otro metabolito.

Los principales medios de cultivo de microorganismos o hábitats controlados son llamados biorreactores. Estos pueden ser aplicados en dos tipos de fermentaciones: en medio sólido o en medio líquido. Existen distintos tipos de biorreactores diseñados específicamente para los tipos de microorganismos o los metabolitos que se desean generar u obtener de la fermentación. Algunos ejemplos son biorreactor en columna, columna estéril, tambor horizontal, zymotis, growtek, de proceso continuo, columna-charola, entre otros (Ruiz Leza 2007).

Para el diseño de biorreactores se consideran algunas ventajas y desventajas (Doelle y col. 1992).

Ventajas:

1. Los medios de cultivo son simples, generalmente subproductos agrícolas que presentan un alto contenido de los nutrimentos necesarios.
2. La baja actividad del agua es de gran ayuda para evitar las contaminaciones, especialmente de bacterias y levaduras.
3. La aireación forzada se facilita por la porosidad del soporte, lo que permite una alta transferencia de oxígeno al microorganismo.
4. El proceso de recuperación es simplificado. Algunos productos son utilizados integralmente como alimento animal, productos para el control biológico, etc.

Entre las principales desventajas se encuentran:

- Su aplicación se limita a microorganismos que crecen en bajos contenidos de humedad.
- La extracción del calor metabólico puede ser un problema, sobre todo cuando se trabaja a gran escala y no se controla el proceso.
- La naturaleza sólida del sustrato trae problemas al medir los parámetros de la fermentación, tales como el pH, la temperatura, el contenido de humedad y la concentración de sustrato y productos.

- Muchos aspectos ingenieriles como el diseño de reactores y el escalado están muy poco caracterizados.
- El tiempo de fermentación es mayor debido a que generalmente se utilizan microorganismos que presentan bajas velocidades específicas de crecimiento.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Es necesario conocer a fondo el comportamiento de los microorganismos a utilizar para adaptar los biorreactores y que este trabajo según lo que se desee obtener de él, es por esto que es necesario llevar a cabo más estudios para encontrar sus necesidades óptimas de crecimiento y producción de metabolitos.

Es por ello que en el presente trabajo se desarrolló un estudio comparativo de la cinética de fermentación de *Rh pusillus* SOC-4A en dos tipos de biorreactores aplicando a cada uno de ellos 2 tratamientos distintos, con y sin aireación forzada. El cual se realizó en el laboratorio de microbiología y fermentaciones del Departamento de Ciencia y Tecnología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

### **4. HIPÓTESIS**

El tipo de biorreactor y la aireación afectará la producción de la enzima xilanasasa por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A en fermentación en medio sólido.

### **5. OBJETIVOS**

#### **5.1. Objetivo general**

Comparar la producción de xilanasasa por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A en biorreactor de placa y de columna, con y sin aireación forzada.

#### **5.2. Objetivos específicos.**

- Evaluar la producción de xilanasasa en fermentación en medio sólido en biorreactor de columna y biorreactor de placa sin aireación forzada.
- Evaluar la producción de xilanasasa en fermentación en medio sólido en biorreactor de columna y biorreactor de placa con aireación forzada.

- Evaluar los parámetros cinéticos de producción en los distintos biorreactores empleando modelos matemáticos

## **6. ANTECEDENTES**

Las enzimas son proteínas que catalizan todas las reacciones bioquímicas. Además de su importancia como catalizadores biológicos, tienen muchos usos médicos y comerciales.

Un catalizador es una sustancia que disminuye la energía de activación de una reacción química. Al disminuir la energía de activación, se incrementa la velocidad de la reacción (Genesis UAG).

La mayoría de las reacciones de los sistemas vivos son reversibles, es decir, que en ellas se establece el equilibrio químico. Por lo tanto, las enzimas aceleran la formación de equilibrio químico, pero no afectan las concentraciones finales del equilibrio (Genesis UAG).

### **6.1. Reglas de nomenclatura para enzimas**

El criterio seguido por la comisión de enzimas para la clasificación fue dividir a las enzimas de acuerdo con el tipo de reacción catalizada, y esto, junto con el nombre del sustrato, constituye la base para denominar enzimas individuales.

Hay seis tipos de reacciones catalizadas por enzimas: oxidación-reducción, transferencia, hidrólisis, formación de dobles enlaces sin hidrólisis, isomerización y ligación. El nombre de cada tipo de enzima se forma añadiendo el sufijo-asa a la raíz de cada tipo de reacción catalizada. Por lo tanto los seis grupos de enzimas son: oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas.

Las enzimas también utilizan nomenclatura nominal para ser designadas, esta es poco utilizada, porque en ciertos casos se enreda para hacerlo. Esta nomenclatura está compuesta de cuatro números, cada uno de ellos tienen una razón de ser, así:

1º. Indica el grupo (va de 1 a 6)

2º. Indica el subgrupo

3º. Indica el subsubgrupo

4º. Indica la cantidad sustratos sobre los cuales la enzima ha sido efectiva

(Owen R. Fennema 2000).

### **6.2. Xilanasa [EC 3.2.1.8].**

La xilanasa es una enzimas que degrada el polisacárido beta-1,4-xilano a xilosa , que es uno de los principales componentes de la pared celular de las plantas.

Por lo tanto juega un papel importante en los microorganismos que se nutren de las plantas y se encuentran presentes en los hongos que degradan la materia vegetal en nutrimentos utilizables.

Las aplicaciones comerciales de la xilanasa incluyen, el blanqueamiento de la pulpa de la madera en papelería sin usar cloro e incrementar la digestibilidad en los ensilados de las plantas forrajeras como en el compostaje fermentado anaeróbico.

A parte de esto también se utilizan las xilanasas en aditivos alimentarios para la producción avícola, la extracción del café, los aceites de las plantas, en el almidón y el clarificado de jugos, entre otros usos(CNIB 2005)..

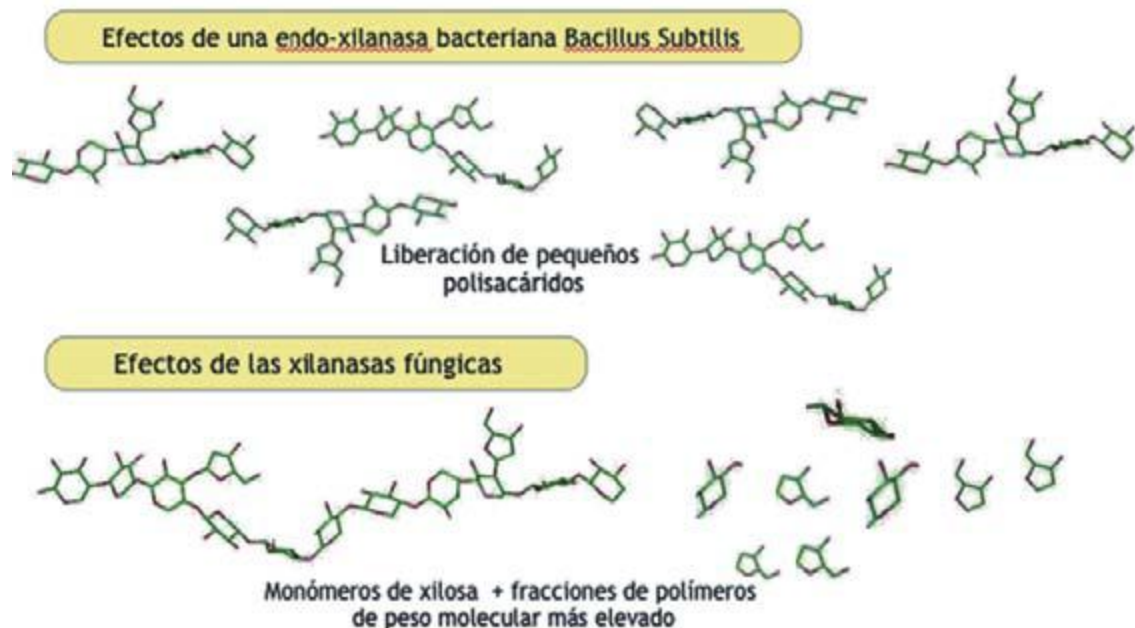
La xilanasa puede ser utilizada para producir biocombustible a partir de materiales no utilizables de las plantas (CNIB 2005).

Además de estos usos, la xilanasa favorece la digestibilidad de los piensos animales al reducir su viscosidad, aumenta el volumen del pan al hacer que la harina sea más ligera y el pan más blando, elimina el aspecto fangoso de la cerveza al disminuir su viscosidad y clarifica los zumos de frutas por el mismo motivo (Díaz, 2009). Finalmente, su utilización en la industria textil para blanquear las fibras permite reducir el tratamiento químico convencional y disminuir los vertidos tóxicos (Universidad Complutense Madrid 2011)

En el congreso de biotecnología y bioingeniería se reportó que es más eficiente la producción de xilanasa en medio líquido que en medio sólido con una cepa silvestre de *Aspergillus niger* en diferentes sustratos (Fuentes Hernández y col, 2009).

Las Xilanasas de origen fúngico poseen mayor actividad en medios de pH ligeramente ácidos. Las de origen bacterianos poseen más afinidad en medios de pH más alcalinos, éstas tendrán menos acción en partes anteriores del aparato digestivo, además el uso frecuente de acidificantes para reducir presencia de patógenos intestinales favorecerá a la Enzimas de origen fúngico (SEIJAS 2012).

Las enzimas bacterianas tienen diferente acción que las de origen fúngico, las endo-xilanasas rompen liberando moléculas mayores de polisacáridos mientras que las exo-xilanasas rompen los enlaces liberando monómeros de azúcares o liberando moléculas más pequeñas de carbohidratos (Vandeplas Bodin 2012).

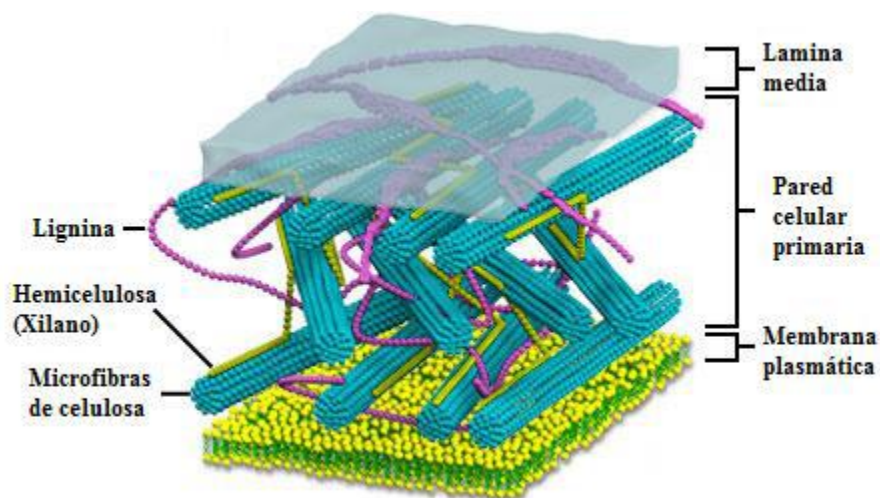


Romero Blancas y col. (2011) revelan que Independientemente de la fuente de carbono utilizada o el tipo de fermentación empleado, la máxima producción de xilanasas se presenta en las primeras 100 horas de fermentación, esto realizado en estudios con 2 cepas de hongos.(*Aspergillus niger* sp y *Phanerochaete chysosporium* H298).

### 6.3. Estructura del xilano

Los  $\beta$ -1,4-xilanos son heteropolisacáridos con una cadena principal de homopolímero de 1,4-enlaces  $\beta$ -d unidades-xilopiranosas. La estructura consta de O-acetil,  $\alpha$ -L-arabinofuranosil,  $\alpha$ -1,2-glucurónico vinculado o 4-O-sustituyentes de ácido methylglucurónico. Sin embargo, los xilanos lineales no sustituidos se han aislado a partir de cáscara de la semilla de guar, esparto y tallos de tabaco (Schipper 1978). Existen xilanos de madera como O-acetil-4-O-methylglucuronoxilanos en maderas duras o como arabino-4-O-methylglucuronoxilanos en maderas blandas. El grado de polimerización de xilanos de madera dura (150-200) es mayor que el de maderas blandas (70-130). Los xilanos cereales se componen de d-ácido glucurónico y / o de su 4-O-éter de metilo y arabinosa. Arabinoxilanos endospermicas de plantas anuales, también llamados pentosanos, son más solubles en agua y álcali diluido de xilanos de materiales lignocelulósicos debido a sus estructuras ramificadas (Schipper 1978).

Estructura de la pared celular de las plantas y presencia del xilano.



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 (Robledo y col 2012).

#### **6.4. Factores que afectan la producción de xilanasa**

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

La producción selectiva de xilanasa es posible en el caso de *Trichoderma* y *Aspergillus* utilizando sólo xilano como fuente de carbono. En un medio rico en celulosa estas cepas producen tanto celulasa como xilanasa que puede ser debido a las trazas de hemicelulosa presentes en los sustratos celulósicos. Los mecanismos que controlan la formación de enzimas extracelulares con referencia a las fuentes presentes en el medio de carbono se ven influenciados por la disponibilidad de precursores para la síntesis de proteínas.

Por lo tanto, el cultivo de algunos hongos en xilano 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 celulasas. Sin embargo, también se encontraron sustratos celulósicos que pueden ser esencial en el medio para la producción máxima de xilanasa por *Clostridium stercorarium*, *Thermomonospora curvata* y *Neurospora crassa*. 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 xilanasas en el caso de ciertos microorganismos tales

como *Aspergillus awamori*, *Penicillium purpurogenum* y alcalifílica termofílica de *Bacillus* sp. NCIM 59.

La actividad de la xilanasa tiende a ser mayor en los hongos que en bacterias. La producción de xilanasa-celulasa libre se ha reportado en algunos *Bacillus* sp. y los hongos. Archana y Satyanarayana (1997) han informado de producción de xilanasa por la cepa bacteriana, *Bacillus licheniformis* A99, en la fermentación en estado sólido (FES).

Sistemas FES se asemejan a los hábitats naturales de los microbios y, por lo tanto, puede resultar eficaz en la producción de ciertas enzimas y metabolitos. Aunque un gran número de cepas productoras de xilanasa se han descrito, su uso para la producción comercial, en la actualidad se limita principalmente a *Trichoderma* sp. y *Aspergillus* sp. Sin embargo, se han encontrado varias cepas promisorias que producen xilanasas en mayores rendimientos, con una mayor estabilidad en condiciones extremas de pH y temperatura (Schipper 1978).

### **6.5. *Rhizomucor pusillus***

#### **Clasificación taxonómica**

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

#### **Descripción y Medio Natural**

*Rhizomucor* es un hongo filamentoso que se encuentra en el suelo y en descomposición de frutas y verduras. Mientras *Rhizomucor* spp. A menudo están aisladas de la fermentación y el compostaje de materia orgánica, también son causas poco frecuentes de infecciones graves (y muchas veces fatales) en los seres humanos.

#### **Características macroscópicas**

Las colonias de *Rhizomucor* crecen muy rápidamente colonizan la caja Petri, y maduran en 4 días. La textura normalmente es de algodón de azúcar. Desde el frente, el color de la colonia es blanco al principio y se vuelve gris a marrón amarillento conforme pasa el tiempo. Los hongos del género *Rhizomucor* son termófilos y crecen a temperaturas de hasta 54 ° C.

### **Hallazgos microscópicos**

La morfología microscópica de *Rhizomucor* parece ser intermedia entre la de *Rhizopus* y *Mucor*. Tiene hifas septadas, no septadas o escasamente septadas, rizoides rudimentarias, esporangióforos, esporangios y esporangiosporas. Rizoides rudimentarios, si existen, son poco numerosos y se encuentran en los estolones entre los esporangióforos. Los esporangióforos están irregularmente ramificados y terminan en esporangios en sus vértices. Los esporangios (40-80 μm de diámetro) son de color marrón y de forma redonda. Apophysis está ausente. Columelas, por otro lado, son prominentes y esféricas a piriforme en forma. Esporangiosporas (3-4 micras de diámetro) son pequeñas, unicelulares, y vueltas a la forma elipsoidal. Zigosporas, si está presente, se forman en las hifas aéreas. Son redondas a ligeramente comprimidas y de color marrón oscuro a marrón negrozco (doctor fungus 2013).

### **6.6. Fermentación en sólido**

Autores como Kondo y Zadrazill (1996). Definen que la Fermentación en Medios Sólidos (FMS) es un proceso natural, mediante el cual se da continuidad a importantes ciclos vitales, dentro de los cuales se destacan los de descomposición de la materia orgánica mediante los hongos y levaduras, los cuales tienen una gran habilidad para asimilar residuos lignocelulósicos.

Moo –Young(1980), dan una definición donde consideran que la humedad presente se encuentra retenida de forma compleja dentro de la matriz sólida, posteriormente incluyeron a todos los procesos que utilizan materiales insolubles en agua para el crecimiento de microorganismos en ausencia de agua libre, al igual que Mitchell.

Según Durand (1996) la FMS es un método de cultivo de microorganismos sobre y/o dentro de partículas sólidas. El líquido ligado a las partículas debe ser en una cantidad que asegure la actividad de agua adecuada para el crecimiento y el metabolismo de los microorganismos, pero sin exceder el máximo poder de retención de agua de la matriz sólida.

Por su parte, Pandey (2000) señala que frecuentemente se han usado los términos fermentación en estado sólido y fermentación en sustrato sólido ambiguamente, y que deben distinguirse, en el caso de la fermentación en sustrato sólido, debe usarse sólo en los procesos donde el sustrato actúe como fuente de carbono y como fuente de energía en ausencia o casi en ausencia de agua libre, y la fermentación en estado sólido debe definir una fermentación que ocurra en ausencia o casi en ausencia de agua libre, empleando un sustrato natural como el caso anterior o usando un material inerte como soporte sólido.

Viniegra-González (1997), "es un proceso microbiológico que ocurre comúnmente en la superficie de materiales sólidos que tienen la propiedad de absorber y contener agua, con o sin nutrientes solubles".

#### **6.7. Principios de diseño de un biorreactor.**

Los Biorreactores son los equipos donde se realiza el proceso de cultivo (también comúnmente denominado "fermentador"), sea en estado sólido o líquido. Su diseño debe ser tal que asegure homogeneidad entre los componentes del sistema y condiciones óptimas para el crecimiento microbiano y la obtención del producto deseado (Ruiz Leza 2007).

#### **6.8. Biorreactores en medio sólido**

Los tipos de biorreactores más estudiados han sido los de bandeja y los de tambor rotatorio y desde hace pocos años se han introducido un nuevo tipo de biorreactores en fermentación en medio sólido denominados de cama empacada o columna de lecho fijo.

Algunos de los biorreactores utilizados a escala laboratorio son cajas petri y matraces Erlenmeyer. Estos son utilizados por su simplicidad, los cuales no

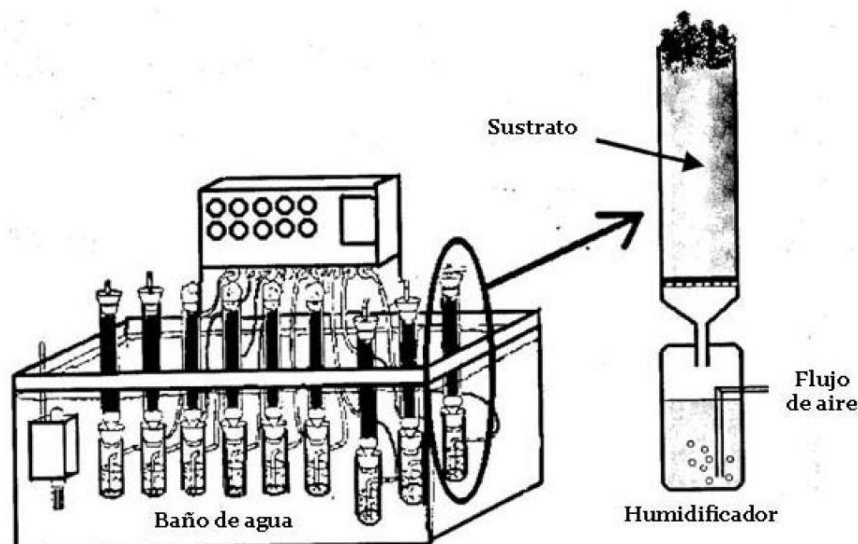
operan con aireación ni agitación forzada, en ellos solamente es controlada la temperatura del cuarto de incubación.

Dentro de los procesos de fermentación en medio sólido existen actualmente dos categorías: a escala laboratorio en las cuales se utilizan pequeñas cantidades de medio sólido hasta pocos kilogramos, y el otro que es a escala piloto y escala industrial en donde se utilizan desde kilogramos hasta toneladas . En la primera categoría existen muchos diseños de biorreactores, los cuales llegan a ser muy sofisticados, mientras que en la segunda categoría es poca la variedad de biorreactores utilizados, solo algunos de los biorreactores a nivel industrial pueden operar en condiciones estériles (Ruiz-Leza 2007).

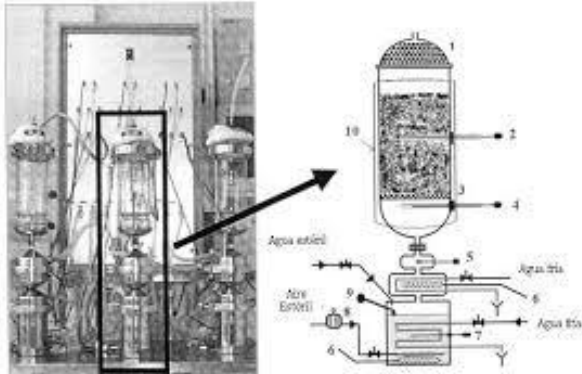
### 6.9. Ejemplos de biorreactores en medio sólido

#### Biorreactor en Columna

Fue diseñado y patentado por el instituto para la investigación y desarrollo en Francia (IDR), compuesto por pequeñas columnas de cuatro centímetros de diámetro y veinte centímetros de altura (Ruiz-Leza 2007). El equipo está conectado a una columna de cromatografía de gases para monitorear la producción de CO<sub>2</sub>, resultado de la respiración del microorganismo y de sus reacciones metabólicas. La demanda de oxígeno se cubre por medio de aeración forzada utilizando compresores con sistemas de regulación de presión para evitar la compactación excesiva del lecho.



## Biorreactor de Columna Estéril



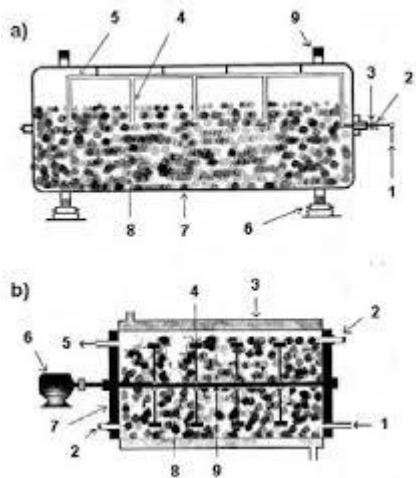
Fue diseñado por el Instituto Nacional de la Investigación Agronómica (INRA) en Francia, tomando como base de diseño al biorreactor en columna. Este reactor tiene un volumen de trabajo de alrededor de 1 L. En comparación con el primer modelo, los cambios principales fueron la introducción de una sonda de humedad

relativa, un serpentín de refrigeración en el circuito de aire y una cubierta de calentamiento para el recipiente (Duran 2003).

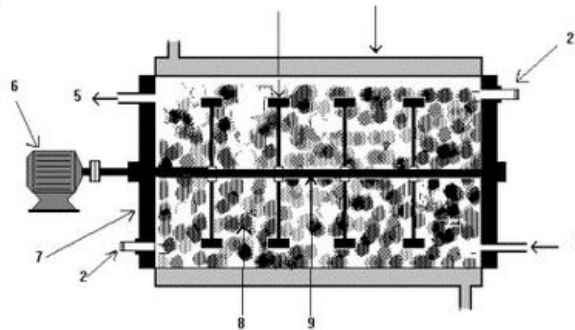
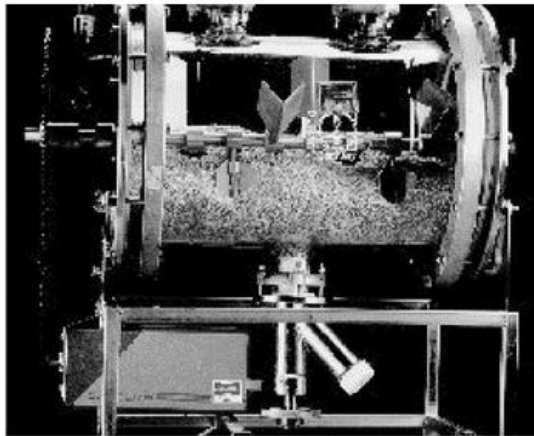
**Biorreactor Estéril.** (1) tapa de calefacción, (2) termómetro, (3) tamiz de acero, (4) medidor de temperatura del aire en la entrada, (5) medidor de humedad relativa, (6) resistencia, (7) medidor de temperatura de agua, (8) medidor de flujo másico, (9) medidor de nivel, (10) chaqueta aislante.

## Tambor horizontal

Basado en agitación continua del medio sólido, fue desarrollado por varios equipos mencionados a continuación. Los biorreactores pueden ser un tambor giratorio, un tambor perforado o un mezclador de paletas horizontal. Con o sin una camisa de agua, se requiere este tipo de reactor que se mezcla continuamente para aumentar el contacto entre la pared del reactor y el medio sólido y también para proporcionar oxígeno para el microorganismo. Para los biorreactores de tambor giratorio, como un cilindro horizontal, la mezcla se proporciona por el movimiento de volteo del medio sólido que puede ser ayudado por deflectores sobre la pared interior del tambor giratorio (Duran 2003).



Biorreactor Tambor horizontal: (a) Rotatorio. (1) Entrada de aire, (2) embalaje rotatorio, (3) conector, (4) boquillas de entrada de aire, (5) línea de aire, (6) rodillos, (7) tambor rotatorio, (8) medio sólido, (9) aro. (Durand, 2003); (b) Con paletas. (1) entrada de aire, (2) medidor de temperatura, (3) chaqueta de agua, (4) paletas, (5) salida de aire, (6) motor para agitación, (7) reactor, (8) medio sólido, (9) árbol de agitación (Durand, 2003).

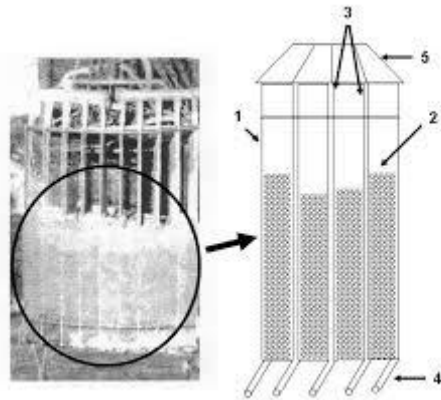


Fotografía de un mezclador de paletas horizontal utilizado en la Universidad de Agricultura de Wageningen. Esquema de un biorreactor agitado horizontal. (1) de entrada de aire, (2) las sondas de temperatura, (3) camisa de agua, (4) paletas, (5), salida de aire (6) motor de agitación, (7) reactor (8) medio sólido, (9) eje de agitación.

### Biorreactor Zymotis

Se compone de placas de transferencia de calor internas verticales en los cuales circula agua fría. Entre cada placa se carga el medio sólido previamente inoculado. El aire atemperado se introduce a través de la parte inferior de cada

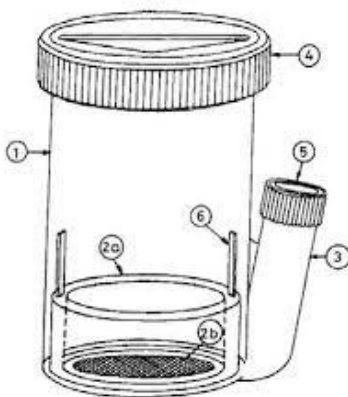
partición. Este reactor, es parecido a un reactor de la bandeja donde se establecen verticalmente las capas de sustrato, es más complicado trabajar en condiciones asépticas (Duran, 2003).



(1) Platos verticales intercambiadores de calor, (2) cama de sustrato, (3) entrada de agua, (4) salida de agua, (5) termostato.

#### Biorreactor Growtek.

Es uno de los últimos fermentadores diseñado por el Departamento de Biotecnología, Agricultura e Ingeniería en Alimentos del Instituto Tecnológico de la India, llamado Growtek. Consiste de un envase de 16 cm de altura y 11.3 cm de diámetro, que tiene un tubo, de 2.6 cm de diámetro y 8.5 cm de altura, pegado a la base con una inclinación de 15° con respecto a la vertical. El cuerpo del recipiente y del tubo externo están hechos de policarbonato, y las tapas de ambos son de polipropileno. Este biorreactor tiene dentro del envase un depósito de polipropileno que contiene una tela de fibra de vidrio en el fondo, donde se sostiene el sustrato. La fermentación ocurre en la vasija cilíndrica y el medio es introducido por el tubo inclinado. Dicho dispositivo también permite la dosificando de agua para mantener la humedad adecuada para el crecimiento microbiano (Ruiz Leza 2007).



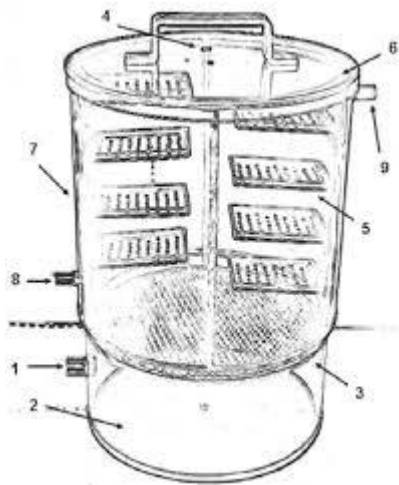
Biorreactor Growtek (1) cuerpo del biorreactor de policarbonato transparente, (2a) depósito, (2b) base del depósito perforada donde se deposita el sustrato sólido y el inóculo, (3) tubo lateral que facilita la entrada del medio, (4) tapa enroscada de aireación estéril, (5) tapa enroscada del tubo exterior, (6)



mangos del depósito (Kar et al., 1999).

### Biorreactor Columna-Charola

Diseño realizado en el Departamento de Investigación en Alimentos de la Universidad Autónoma de Coahuila. El cual consiste de una columna de 13 pulgadas de altura y un diámetro de 10 pulgadas. En su interior se encuentran ocho charolas perforadas, las cuales tiene una capacidad de 140 ml cada una. La transferencia del oxígeno es por burbujeo a través de un distribuidor de aire, permitiendo la transferencia a un flujo de 194 mL/min. La temperatura es regulada por una chaqueta de enfriamiento y/o calentamiento, por lo que es posible controlar y medir los cambios de temperatura. Bajo este sistema se permite una mejor distribución de oxígeno por aireación hacia las charolas.

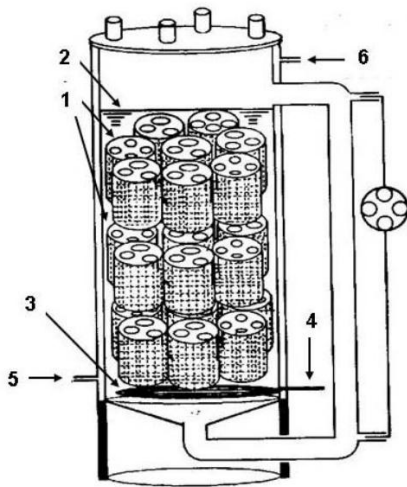


Biorreactor Columna Charola. (1) Entrada de aire estéril, (2) entrada de agua estéril, (3) distribuidor de aire, (4) entrada para el termómetro, (5) charola, (6) chaqueta para el control de temperatura, (7) columna de acrílico, (8) entrada de agua, (9) salida de agua.

Al momento solo se han realizado experimentos cuyos resultados han estimulado la continuación del estudio de caracterización total del biorreactor y la optimización de los procesos para los que se puede aplicar. (Ruiz- Leza, 2004).

Biorreactor de lecho fluidizado.

Sistema de operación en modo continuo el cual puede ser operado por altos periodos de tiempo a un alto valor de productividad. Los primeros biorreactores constaban de un cilindro de vidrio, con o sin chaqueta, llenado por una carga completa de lecho o sustrato, sin embargo causaba problemas de compactación similares a los presentados en los equipos de cama empacada. Las variaciones en el lecho han permitido un mejor funcionamiento de este sistema, ya que se utilizan pedazos de esponjas, troncos naturales (loofa, coyonoxtle), polímeros sintéticos (espumas de poliuretano, poliestireno), así como también canastas o cajas delgadas de acero inoxidable, que cuenten con perforaciones que permiten tener una eficiente inmovilización de las células en el soporte con el medio de cultivo.



Biorreactor de lecho fluidizado utilizando loofa como soporte. (1) Camás de esponja de loofa, (2) medio de cultivo, (3) difusor de aire, (4) entrada de aire, (5) Entrada de agua, (6) salida de agua (Ogbonna, 2001).

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo del experimento consistió en inocular olote molido clasificado como desecho agroindustrial en distintos reactores, Utilizando una cepa silvestre de *Rizomucor pusillus* SOC-4A.

### 7.1. Obtención del olote

El olote fue donado por el departamento del maíz de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Se cortó en pedazos y se redujo a un tamaño de partícula de 1 mm de diámetro en un homogeneizador industrial de 5 L modelo LP12 serie 600-182 marca JR maquinaria para mercado S.A. de C.V. México.

## **7.2. Microorganismos y medios de cultivo**

El microorganismo utilizado en este ensayo fue aislado y purificado de silos de forraje en el municipio de Camargo Chihuahua, este pertenece a la colección DIA-UA de C. Una vez puro se preservó en leche descremada y glicerol almacenándolo a -20°C. Se activó la cepa en agar papa dextrosa con una incubación de 4 días (anexo 10.2).

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 (Anexo 10.1) y se tomó el volumen adecuado para realizar la siembra con una concentración de  $12 \times 10^7$  esporas sobre 3g de materia sólida.

Al medio se le agregó 10 mL de solución de sales de czapec-dox (Anexo 10.4) que contiene las sales necesarias para el crecimiento de este tipo de moho.

## **7.3. Sistemas de cultivo**

### **7.3.1. Placa estática**

Para el crecimiento del hongo se utilizaron cajas petri, cada una con 3 gramos de olote molido y estandarizado, se inocularon con la cantidad requerida de esporas y se les agregó la solución de sales czapec-dox. Se sellaron con parafilm para evitar deshidratación. Estas se llevaron a incubación en una estufa (YAMATO IC403C) a 55°C con una cinética de 120 horas obteniendo muestras cada 24 horas para su posterior análisis. Los extractos se obtuvieron con la técnica reportada por Maciel y col., (2009) con NaCl (0.9 %) y Tween 80 (0.1%) (Anexo 10.6).

### **7.3.2. Placa fluida**

Para el desarrollo de este experimento se adaptaron cajas petri para proporcionarle el flujo requerido de aireación (0.125 Lt/min) (Anexo 10.7), se colocaron 3 gramos por cada caja y se les agregó el inóculo y la solución de sales czapec-dox, se sellaron con parafilm y cinta másking tape para que el flujo fuera adecuado. Se llevó a incubación en estufa a 55°C, con una cinética de 120 horas tomando muestras cada 24 h. el método de extracción se explica en el anexo 10.6.

### **7.3.3. Columna estática**

Para el desarrollo de este estudio se inoculó el hongo en cajas Petri estériles con el volumen adecuado de inóculo y las sales czapec-dox, y se pasó a tubos falcón para el crecimiento del mismo en incubación a 55°C en estufa, con una cinética de 120 horas tomando muestras cada 24h. (Anexo 10.6).

### **7.3.4. Columna fluida**

Para el desarrollo de este estudio se inoculó el hongo en cajas petri estériles con el volumen adecuado de inóculo y las sales czapec-dox, posteriormente se pasó a biorreactores de vidrio con cavidad inferior para flujo de aire y se llevaron a incubación en estufa a 55°C con aireación forzada (0.125 Lt/min) (método de aireación anexo10.7), con una cinética de 120 horas tomando muestras cada 24h (método de extracción anexo 10.6).

## **7.4. Ensayo enzimático**

La actividad xilanasa se determinó midiendo la cantidad de xilosa contenida en el extracto proveniente de la hidrólisis del xilano. La xilosa liberada en la reacción fue determinada por el método descrito por Bailey (1992).

Las técnicas y curva de calibración se muestran en el anexo 10.9.

## **7.5. Contenido de azúcares reductores**

Se determinó la cantidad de azúcares reductores contenidas en los extractos por el método colorimétrico de DNS propuesto por Miller (. Las técnicas y los procedimientos se muestran en el anexo 10.10 así como la curva de calibración.

## **7.6. Biomasa**

El contenido de biomasa fue determinado mediante el método colorimétrico azul brillante o método de Bradford, cuyo procedimiento y curva de calibración se muestran en el anexo 10.11 (Bradford MM (1976).

### **7.7. Contenido de azúcares totales**

El contenido de azúcares totales fue determinado por el método de fenol sulfúrico propuesto por Dubois (1956). Los métodos de análisis y la curva de calibración se muestran en el anexo 10.12.

## 7.8. Parámetros cinéticos asociados al crecimiento microbiano

Dentro de los parámetros cinéticos se encuentran la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) que se obtiene por medio de la linearización de la gráfica de crecimiento y la obtención de la pendiente de la recta resultante por medio de regresión por mínimos cuadrados. La productividad fue estimada en términos de gramos de soporte empleado ( $P = \text{mgAE/gS.día}$ ) en el valor pico de producción del metabolito secundario para las condiciones de cultivo.

Se calculó el rendimiento de biomasa ( $Y_{X/S}$ ) que es la cantidad de biomasa producida por gramo de sustrato utilizado, así como también el rendimiento de producto/biomasa ( $Y_{P/X}$ ) que es la cantidad de metabolito que se forma. El cálculo se determinó con las fórmulas que se muestran a continuación.

$$Y_{X/S} = \frac{X_2 - X_1}{S_2 - S_1} \quad (\text{Eq. 1}). \quad Y_{P/S} = \frac{P_2 - P_1}{X_2 - X_1} \quad (\text{Eq. 2}).$$

Respectivamente. Donde:

$X_1$  = Concentración inicial de biomasa,  $X_2$  = Concentración de biomasa en el valor máximo de producto,  $S_1$  = Concentración inicial de sustrato,  $S_2$  = Concentración de sustrato en el valor máximo de producto,  $P_1$  = Concentración inicial de producto y  $P_2$  = Concentración máxima de producto.

Con estos parámetros, se calculó la tasa específica de absorción de sustrato ( $q_s$ ):

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{X/S}} \quad (\text{Eq. 3}).$$

Así como la tasa específica de formación de producto ( $q_p$ ):

$$q_p = \mu Y_{P/S} \quad (\text{Eq. 4}).$$

La producción de biomasa, fue evaluada mediante la ecuación logística de Velhurst-Pearl [78, 79].

$$\frac{dx}{dt} = \mu M \left[ 1 - \frac{x}{x_{max}} \right] X \quad (\text{Eq. 5}).$$

Donde  $X$  es la biomasa (g por L, por cm<sup>2</sup> ó por kg),  $\mu M$  es la velocidad máxima de crecimiento específico (h<sup>-1</sup>) y  $X_{max}$  es el valor de equilibrio para  $X$  donde  $dX/dt = 0$ , para  $X > 0$ . La solución de la ecuación anterior es la siguiente:

$$X = \frac{X_{max}}{1 + \left(\frac{X_{max} - X_0}{X_0}\right) e^{-\mu M t}} \text{ (Eq. 6)}$$

Donde  $X_0$  es la condición inicial para  $X$ . La ecuación 6 sirve para ajustar los datos experimentales de la ecuación 5, minimizando la suma de errores al cuadrado como función de los parámetros  $X_0$ ,  $X_{max}$  y  $\mu M$ .

El consumo de sustrato fue modelado empleando una expresión de dos términos propuesta por Pirt:

$$-\frac{ds}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dx}{dt} + mX \text{ (Eq. 7)}$$

Donde  $S$  es la concentración de sustrato (g por L, por cm<sup>2</sup> ó por kg),  $Y_{X/S}$  el rendimiento de biomasa y  $m$  el coeficiente de mantenimiento (gS/gXh). La solución de la ecuación 7 puede ser obtenida en función de  $X$  de la siguiente manera:

$$s(t) = S_0 - \left(\frac{X - X_0}{Y_{x/s}}\right) - \left(\frac{X_{max} * M}{\mu}\right) \text{Ln}\left[\frac{X_{max} - X_0}{X_{max} - X}\right] \text{ (Eq. 8)}$$

Donde  $S_0$  es la condición inicial para el nivel de sustrato  $S$ . La ecuación 8 nos ayuda a probar la importancia del coeficiente de mantenimiento  $m$ , debido a que una gráfica de  $S(t)$  vs.  $X(t)$  generaría una línea recta con una pendiente de  $1/Y_{X/S}$ , siempre y cuando  $m$  sea insignificante.

La cinética de formación de producto fue modelada empleando la ecuación de Luedeking y Piret [79, 81] que se muestra a continuación:

$$\frac{dp}{dt} = Y_{p/x} \frac{dx}{dt} + kx \text{ (Eq. 9)}$$

Donde  $P$  es la concentración de producto,  $Y_{P/X}$  el rendimiento de producto en términos de biomasa (unidades de producto por unidades de biomasa) y  $k$  el coeficiente secundario de formación o destrucción de producto. La ecuación 9 es

similar a la ecuación 7, pero en ésta, el coeficiente  $k$  puede ser negativo, cero o positivo, debido a que la formación o destrucción no está necesariamente relacionada al crecimiento. La solución de la ecuación 15 en función de la biomasa es:

$$P(t) = P_0 + Y_{\frac{p}{x}}(X - X_0) + \frac{kxM}{\mu M} \ln\left[\frac{X_M - X_0}{X_M - x}\right] \quad (\text{Eq. 10})$$

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1. Producción de xilanasa en biorreactor de placa estática

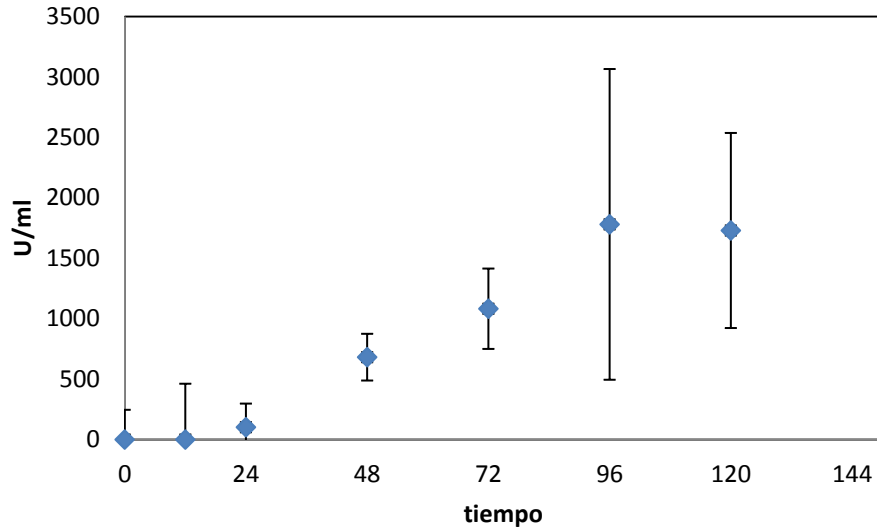
#### Xilanasa

En este tipo de reactor se logró una producción de xilanasa con un máxima al tiempo 96 horas (Gráfica 1), Se observa un comportamiento exponencial a partir de las 24 hasta las 96 horas y posterior mente se observa un ligero descenso lo cual nos indica que la producción de xilanasa se ha detenido parcialmente, esto podría deberse a que la humedad comienza a descender por la evaporación del agua a causa de la temperatura del medio.

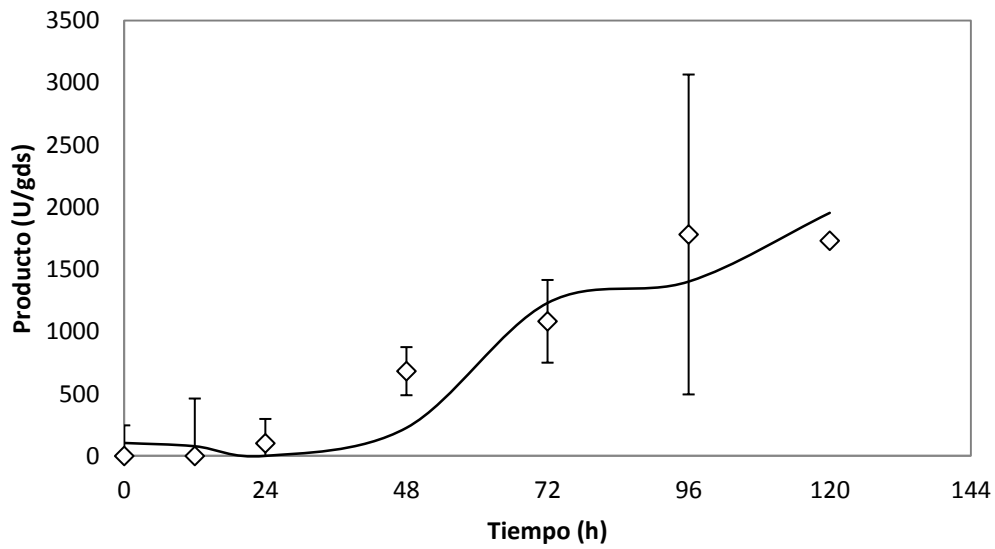
En esta etapa el hongo deja de producir las enzimas y comienza a producir esporas para entrar en su fase vegetativa y reactivarse cuando encuentre las condiciones de humedad y temperatura a adecuadas para completar su ciclo de vida.

La desviación estándar a las 96 horas nos indica que hay una repetitividad del experimento con un rango de error muy amplio, esto puede deberse al acomodo de las cajas en la estufa de fermentación, se apilaron de tres en tres y las cajas de las orillas presentaron una mayor pérdida de humedad que la caja del centro. Por ser el punto con mayor producción de enzima la variación se observa con un rango muy amplio.





Gráfica 1.- Comportamiento cinético de *Rh Pusillus* SOC-4A para la producción de xilanasa en placa sin aireación.

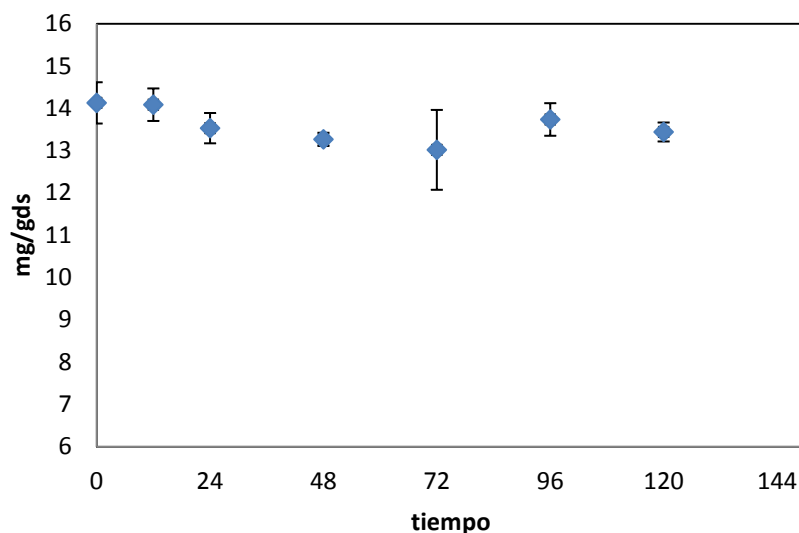


Gráfica 2.- comparación entre el modelo matemático (-) y el experimental (◊) en la producción de xilanasa.

### Az. Reductores

En la gráfica 3 se puede observar el descenso en el contenido de azúcares reductores debido a que como son los azúcares más simples estos son los que comienza a consumir el microorganismo para su crecimiento y nutrición, esto se observa desde el tiempo 0 hasta las 72 horas, esto en comparación con lo reportado por Fernández Islas (2012) en la producción de xilanasa por *Aspergillus niger* que señala que la máxima producción es al tercer y cuarto día del tratamiento en biorreactores de placa estática, nos indica una diferencia debido a que en este ensayo la producción comienza al tercer día teniendo el máximo de producción a las 96 horas.

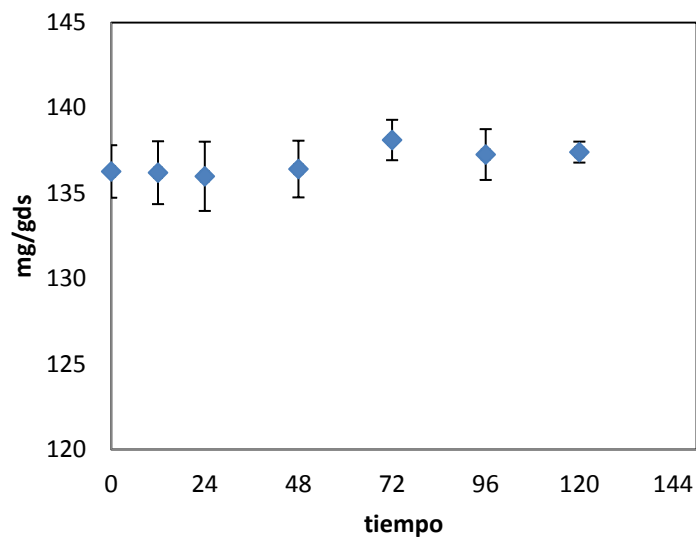
Fernández también señala que la disminución de la producción puede deberse a la acumulación de desechos y a que los nutrientes del medio se agotan, en este estudio se observó también que puede deberse a la pérdida de la humedad en el medio de cultivo.



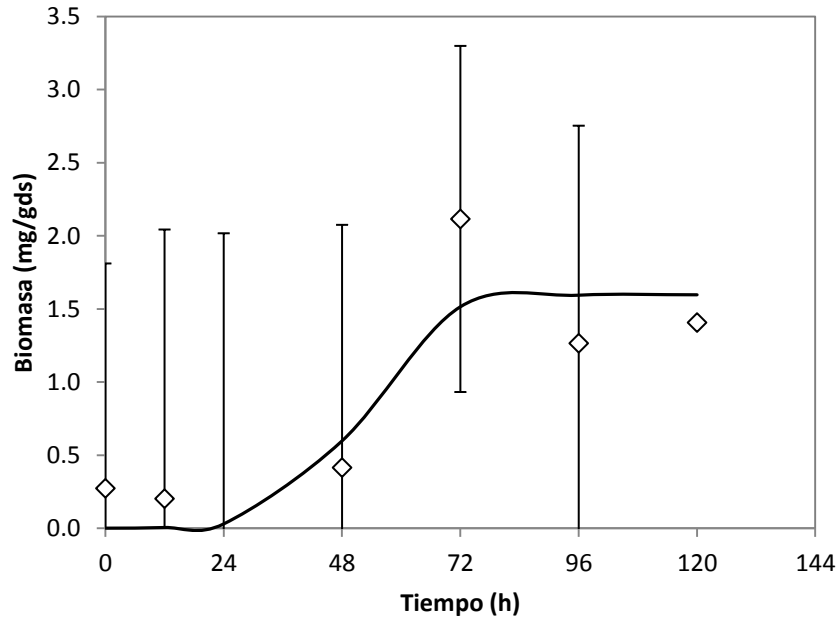
Gráfica 3.- contenido de azúcares reductores en el sustrato obtenido del reactor de placa estática.

## Biomasa

En el contenido de biomasa en este biorreactor no se ve mucha variación lo cual indica que el microorganismo no tiene ni aumento ni disminución significativas en cuanto a su desarrollo, los picos y altibajos reportados en la gráfica pueden indicarnos la presencia de proteasas que degradan proteína soluble, lo cual puede ser la causa de la variación debido a que el método utilizado para la cuantificación de biomasa es un método indirecto que mide el contenido de proteína soluble.



Gráfica 4.- contenido de biomasa en el extracto obtenido del reactor de placa estática.

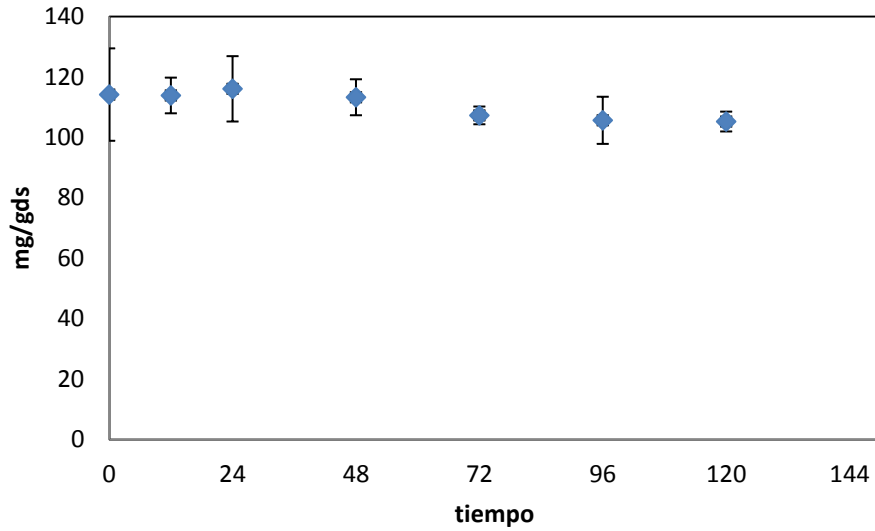


Gráfica 5.- comparación del comportamiento del modelo matemático (-) y el experimental (◇) en cuanto a biomasa en biorreactor de placa estática.

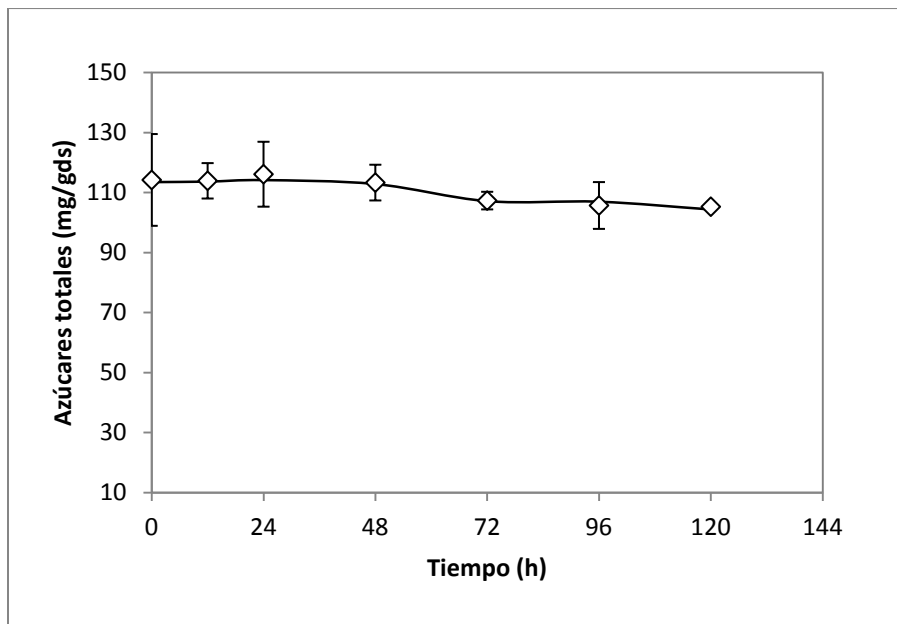
### **Az. Totales**

En la gráfica 6 se puede observar que el contenido de azúcares totales se ve disminuido esto significa que los azúcares están siendo consumidos por el microorganismo, en el tiempo 24 horas se puede notar un ligero aumento en el contenido de azúcares esto puede deberse a que las muestras no fueron tomadas del mismo biorreactor aunque el soporte fue estandarizado también pudo haber afectado las ligeras variaciones en el peso del soporte a inocular.

El método utilizado detecta las glucosas contenidas en los extremos de las moléculas lo cual puede provocar los aumentos en el contenido de azúcares totales.



Gráfica 6.- contenido de azúcares totales en el extracto obtenido del biorreactor de placa estática.



Gráfica 7.- comparación entre el modelo matemático (-) y el experimental (◇) en cuanto al contenido de azúcares totales en el biorreactor de placa estática.

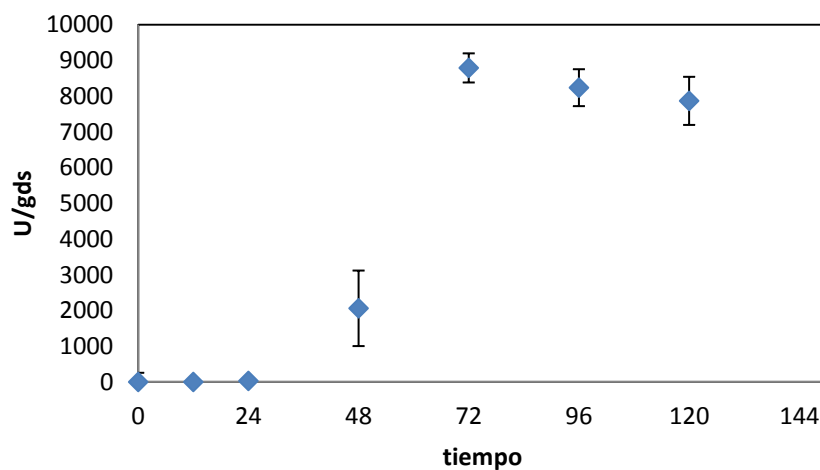
## 8.2. Producción de xilanasa en biorreactor de placa fluida.

### Xilanasa

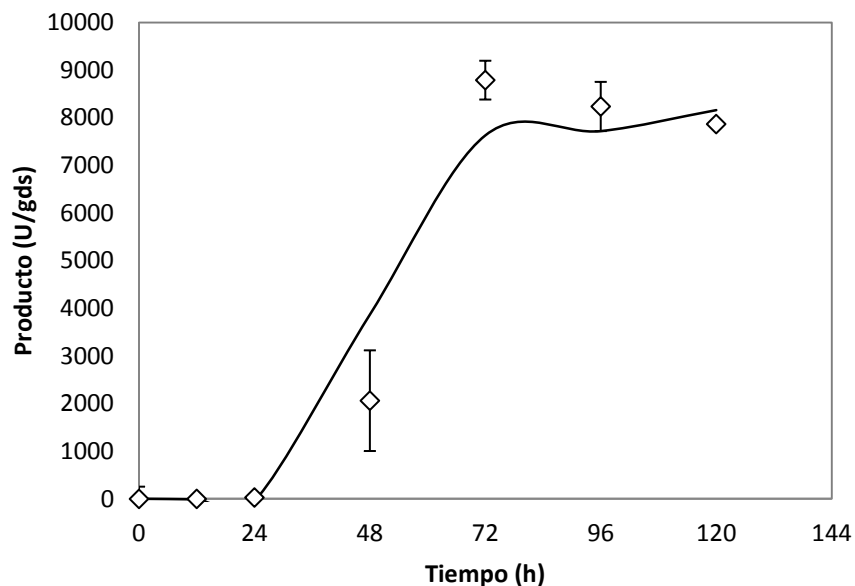
En la gráfica 8 se observa que desde el tiempo 0 hasta las 24 horas no hay producción de xilanasa, este es un comportamiento similar al del reactor de placa estática, a diferencia de que en el medio estático la producción de xilanasa inicia un poco antes de las 24 horas y en el medio fluido comienza un poco después, y este se ve elevado considerablemente a las 72 horas y a partir de eso comienza a decrecer la producción de la enzima. Esto podría indicarnos que el microorganismo tiene los nutrientes necesarios y no tiene necesidad de producir compuestos simples.

Se puede observar un máximo de producción de xilanasa de 8790 U/gds a diferencia de placa estática que su máximo fue mucho menor (1780 U/gds), esto puede reflejarnos un rendimiento muy significativo con la aireación del medio.

Las características macroscópicas del crecimiento del hongo nos reflejan que a partir de las 72 horas comienza a producir esporas lo cual nos indica que tiene condiciones adversas para su crecimiento, puede ser que se hayan agotado los nutrientes en el medio el hongo, pasa su desarrollo a su forma vegetativa para reactivar su crecimiento cuando existan condiciones favorables.



Gráfica 8.- producción de xilanasa en medio placa fluida por *Rh Pusillus soc 4A*.

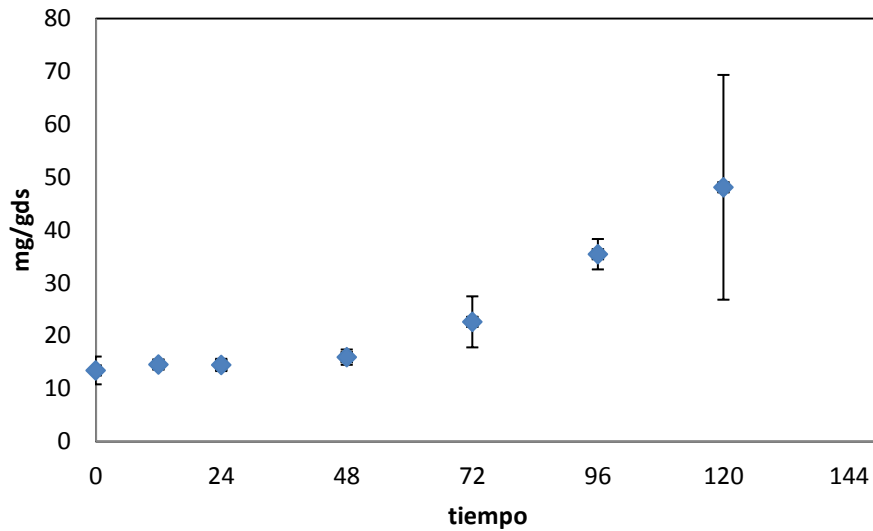


Gráfica 9.- comparación en el comportamiento de la producción de extracto enzimático en el diseño experimental (◇) y el diseño matemático (-) en el biorreactor de placa fluida.

### Az. Reductores

El contenido de azúcares reductores tiene un comportamiento exponencial desde el inicio del ensayo enzimático (Gráfica 10), la diferencia del comportamiento con la producción de enzima puede deberse a que se segregan otras enzimas específicas para degradar la pared celular del material vegetal lo que provoca que no sea el comportamiento similar en las dos gráficas, sin embargo se siguen produciendo azúcares simples a partir de azúcares de moléculas más complejas.

La cinética nos muestra una producción de azúcares simples, sin embargo solo se realizaron estudios para cuantificar enzima xilanasas.



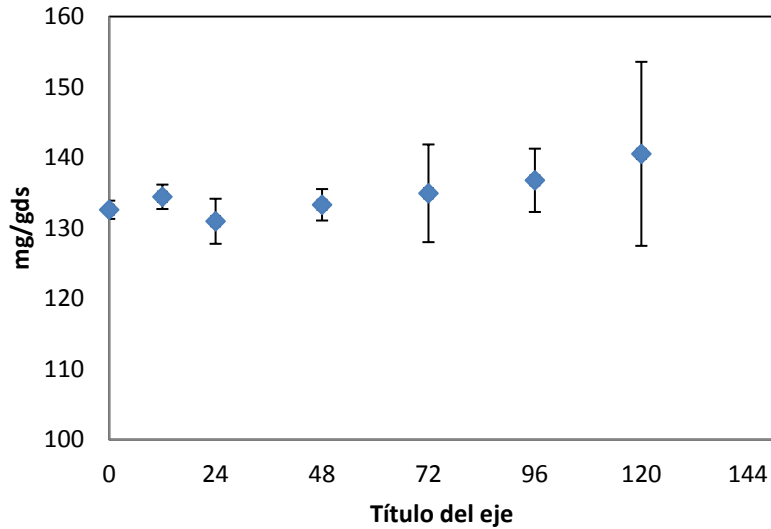
Gráfica 10.- contenido de azúcares reductores en el extracto obtenido del biorreactor de placa fluida.

### **Biomasa**

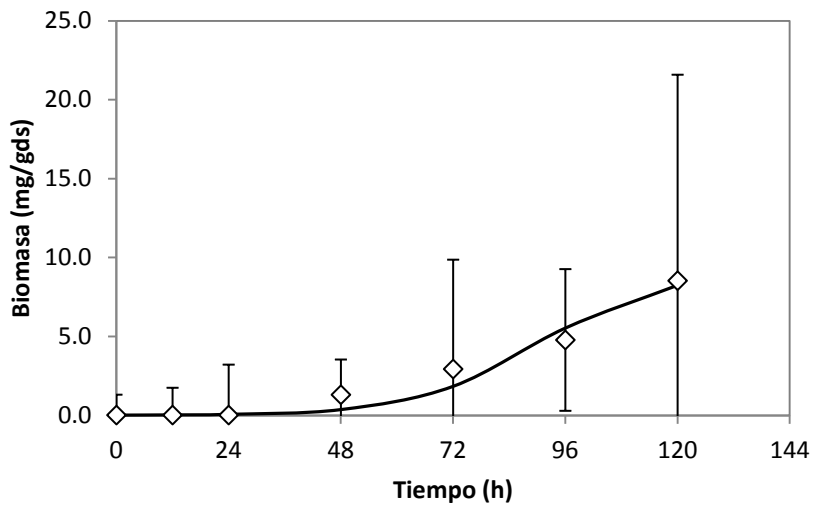
El comportamiento del hongo en la cinética de fermentación indica un crecimiento del mismo en las primeras 12 horas, después de esto viene un ligero descenso, esto puede deberse a que se segregan enzimas proteasas que pueden causar el descenso en el contenido de biomasa. El método utilizado para la medición de biomasa no es un método directo, lo cual nos indica que no estamos midiendo solo el contenido de biomasa si no también el contenido de otro tipo de proteínas solubles, el método fue utilizado solo para dar una idea del comportamiento en el crecimiento del microorganismo.

Después de las 24 horas se reporta un crecimiento exponencial en el contenido de biomasa en el extracto lo cual nos indica que el hongo encontró condiciones favorables para su desarrollo.





Gráfica 11.- contenido de biomasa en el extracto obtenido del biorreactor placa fluida.

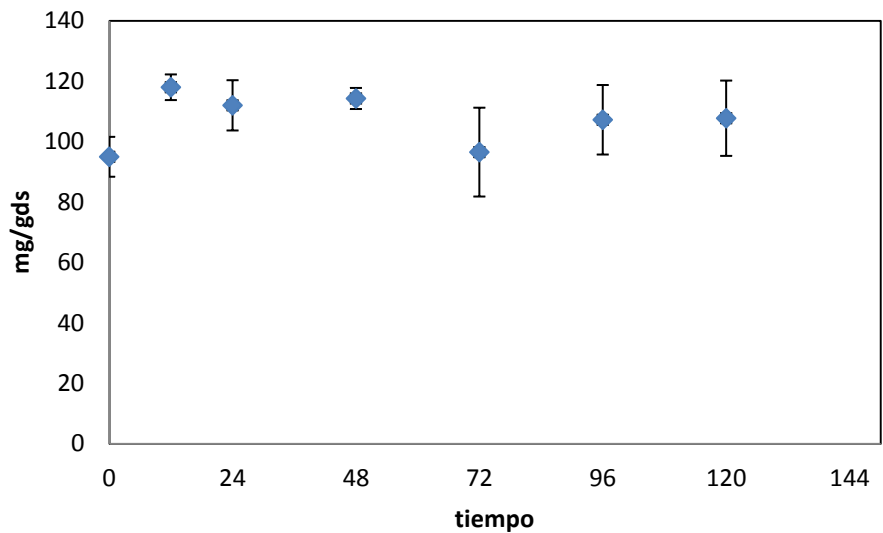


Gráfica 12.- comparación entre el modelo matemático (-) y el experimental (◇) en cuanto al contenido de biomasa en biorreactor de placa fluida.

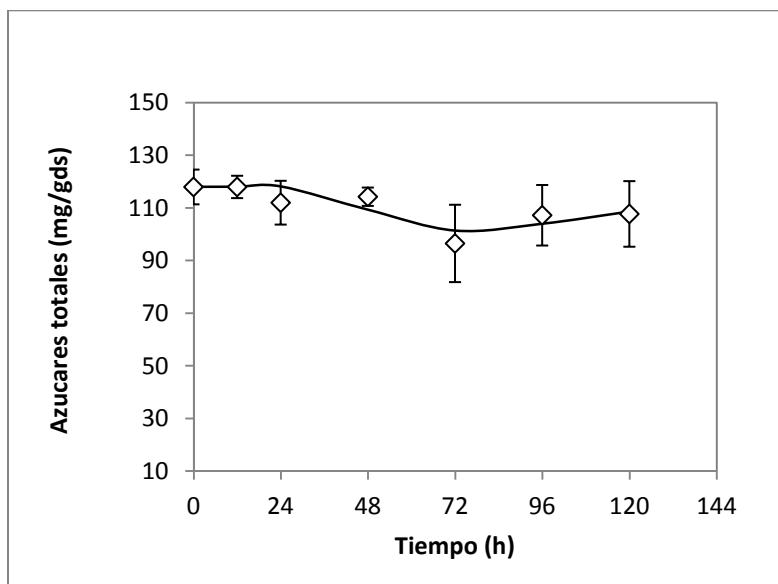
### Az. Totales

La gráfica 13 tiene un comportamiento de altas y bajas en el contenido de azúcares totales esto puede deberse principal mente a que se segregan enzimas que degradan moléculas grandes y la técnica detecta mayor cantidad de

moléculas, después estas son consumidas por el microorganismo y se detecta una menor cantidad, cuando el microorganismo detecta un menor contenido de moléculas fácilmente asimilables vuelve a segregar enzimas.



Gráfica 13.- contenido de azúcares totales en el extracto obtenido del biorreactor placa fluida.

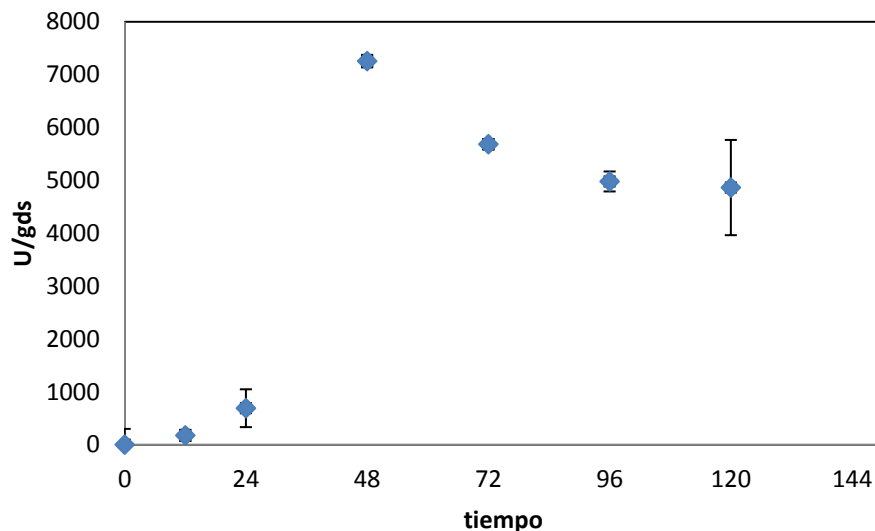


Gráfica 14.- comparación entre el modelo matemático (-) y el experimental (◇) en el biorreactor de placa fluida.

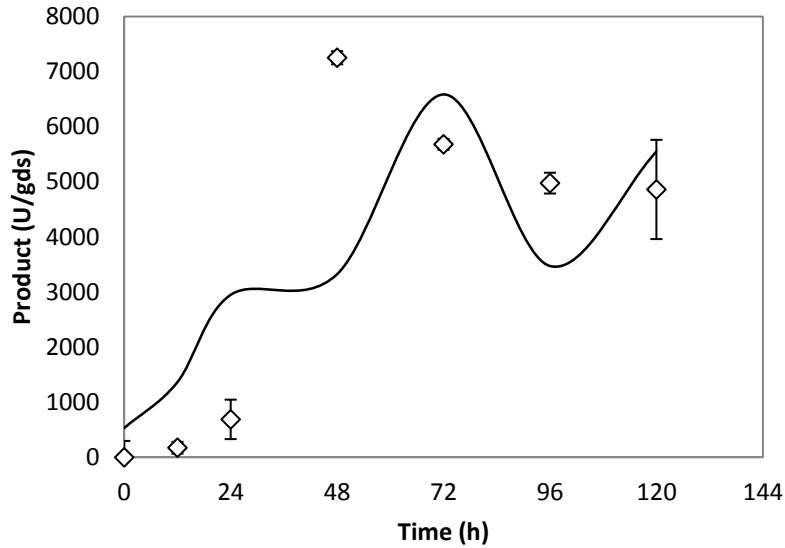
### 8.3. Producción de xilanasa en biorreactor de columna estática.

#### Xilanasa

En este tipo de biorreactor podemos observar un aumento exponencial desde antes de las 24 horas y con una producción muy elevada entre las 24 y las 48 horas (gráfica 15) a diferencia del biorreactor de placa estática que su producción fue exponencial pero no disparada, y también diferenciando del biorreactor placa fluida que ésta tuvo su fase de mayor producción entre las 48 y las 72 horas. Después de las 48 horas comienza el descenso de la producción enzimática diferenciando también de los otros tipos de biorreactor, el de placa estática tiene crecimiento exponencial hasta las 90 horas, mientras que en placa fluida comienza el descenso a las 72 hrs de la producción esto puede deberse a que se terminan los nutrientes del medio o ya no está presente el sustrato para que actúe la enzima, otra posible causa es porque el hongo encuentra condiciones adversas y centra su desarrollo en la producción de esporas.



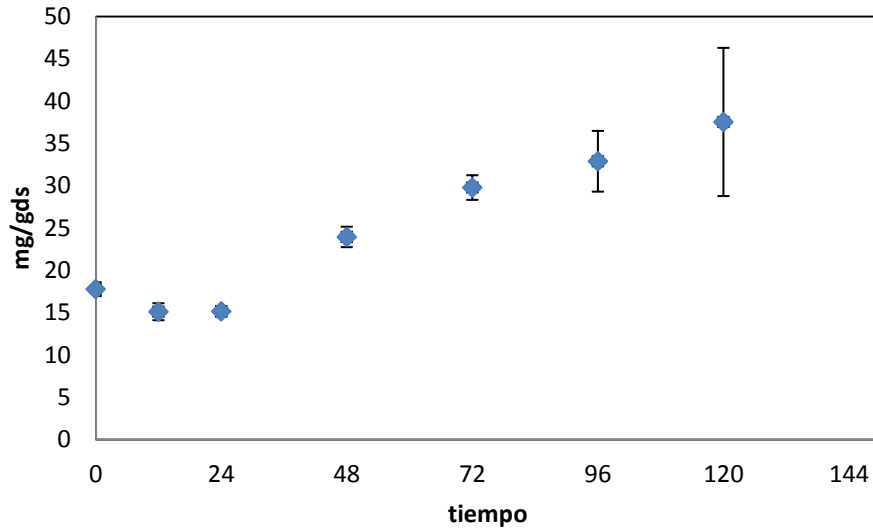
Gráfica 15.- producción de xilanasa en biorreactor de columna estática por *Rh Puzillus soc 4A*.



Gráfica 16.- comparación entre el modelo matemático (-) y el experimental ( $\diamond$ ) en el comportamiento de la producción de xilanasa en el biorreactor de columna estática.

### **Az. Reductores**

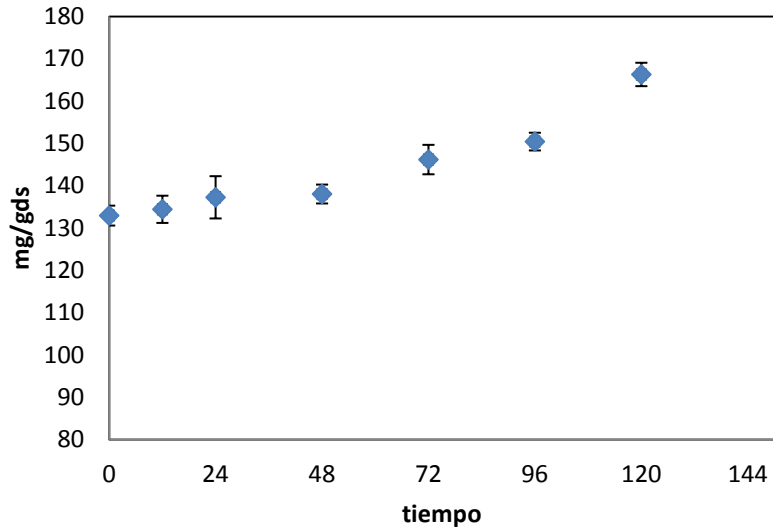
En la gráfica 17 puede observarse un descenso en el contenido de azúcares reductores en las primeras 24 horas esto nos indica que el microorganismo está consumiendo los nutrientes que asimila con mayor facilidad. Después de las 24 horas el contenido de azúcares reductores vuelve a elevarse lo cual indica que se están segregando enzimas que rompen moléculas de mayor tamaño y producen los azúcares más simples.



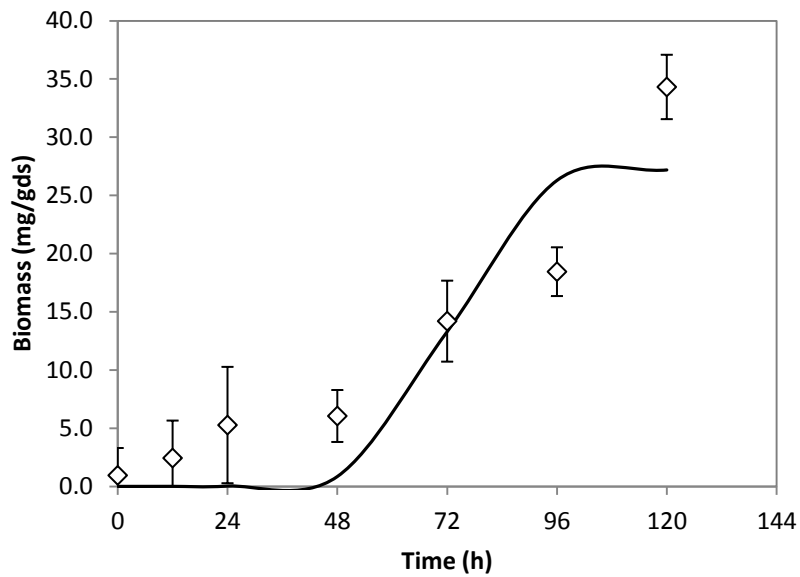
Gráfica 17.- contenido de azúcares reductoras en el extracto obtenido de la fermentación en reactor de columna estática.

### **Biomasa**

A diferencia de los otros biorreactores en este se puede observar un crecimiento exponencial y la cinética no presenta altibajos lo cual indica que este tipo de biorreactor con este tratamiento es el más indicado para el crecimiento de este hongo, se tuvo un aumento de alrededor de 24 mg/gds desde el tiempo 0 hasta las 120 horas. Las características macroscópicas revelan que el hongo comenzó a esporular de manera significativa a las 96 horas, a diferencia de los otros tratamientos que a las 72 horas ya presentaban un visible aumento en el contenido de esporas en el medio.



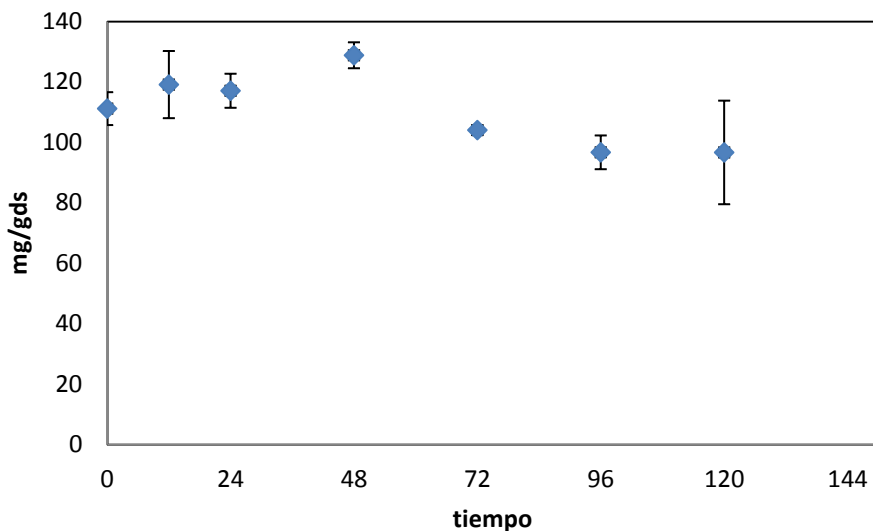
Gráfica 18.- contenido de biomasa en el extracto obtenido del biorreactor de columna estática.



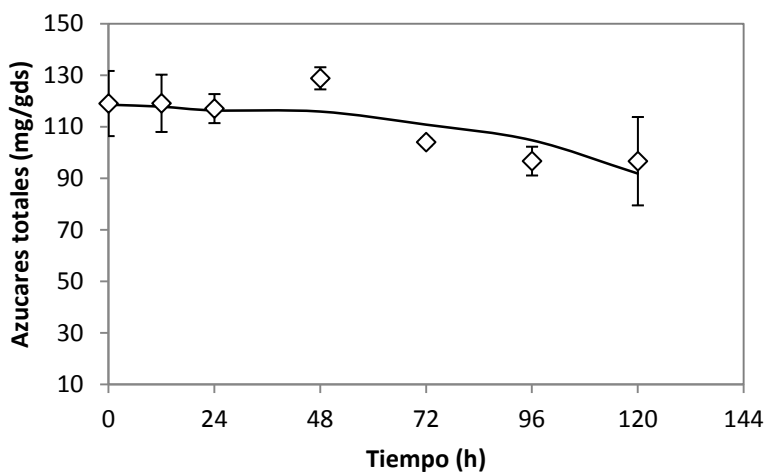
Gráfica 19.- comparación entre el modelo matemático (-) y el experimental (◇) en el comportamiento del contenido de biomasa en el biorreactor de columna estática.

### Az. Totales

En cuanto al contenido de azúcares totales en el biorreactor de columna estática se puede observar un ligero aumento hasta las 48 horas, aquí diferencia en todos los tratamientos, no se tiene un comportamiento similar en ninguno de los reactores los máximos se observan a diferentes tiempos. En este tratamiento se observa a las 48 horas y a partir de este tiempo comienza a descender.



Gráfica 20.- contenido de azúcares totales en el extracto obtenido del biorreactor de columna estática.



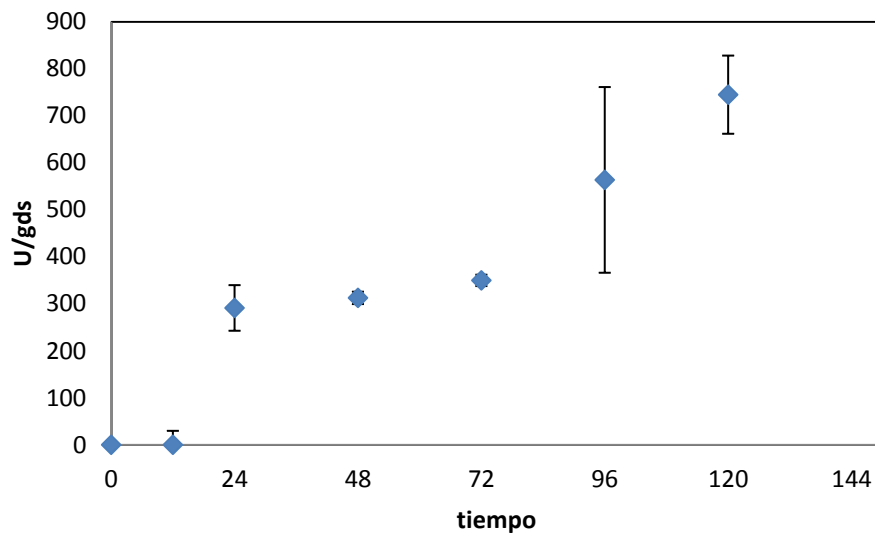
Gráfica 21.- comparación entre el modelo matemático (-) y el experimental (◇) en el contenido de azúcares totales en el biorreactor de columna estática.

#### 8.4. Producción de xilanasa en biorreactor de columna fluida.

##### Xilanasa

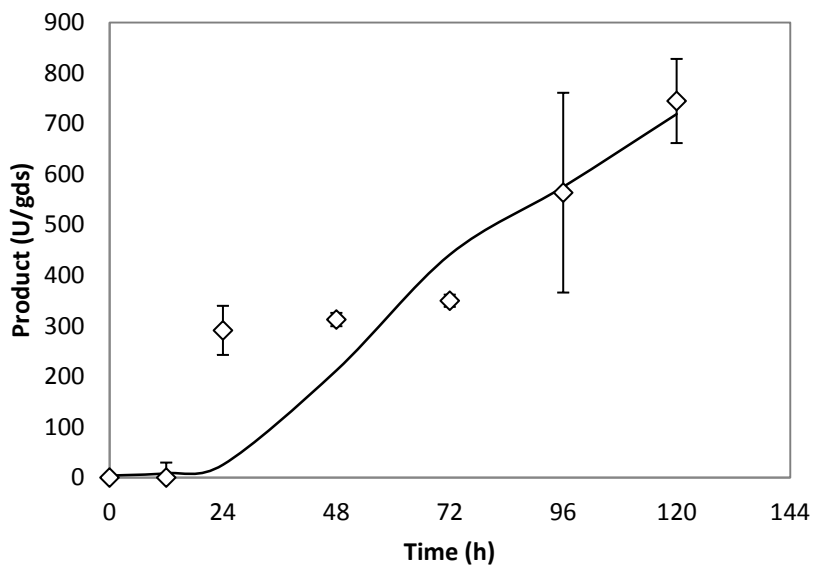
En la columna fluida la producción de xilanasa comienza a las 24 horas (gráfica 22) teniendo un aumento muy mínimo hasta las 72 horas, después de esto tiene un aumento exponencial hasta el término del ensayo a las 120. En este ensayo la producción no fue tan eficiente como en los otros reactores que llegaron a miles de unidades sobre gramos de soporte sólido en la producción máxima, en este solo llegó a algunos cientos.

En este ensayo podría extenderse el tiempo de fermentación para verificar el comportamiento del microorganismo y ver el tiempo y cantidad máximos de producción de la enzima.



Gráfica 22.- contenido de xilanasa en el extracto obtenido del biorreactor de columna fluida producida por *Rh Pusillus* soc 4A.





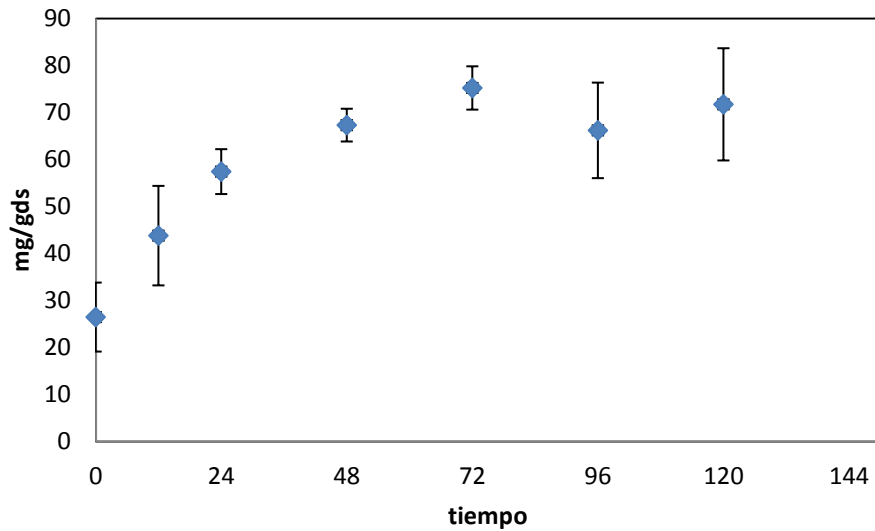
Gráfica 23.- comparación entre el modelo matemático (-) y el experimental (◇) en el contenido de xilanasa en biorreactor de columna fluida.

### Az. Reductores

A diferencia de los otros biorreactores en este el contenido de azúcares reductores comienza a aumentar desde el tiempo cero con un crecimiento exponencial hasta las 72 horas, después de este tiempo el contenido de los azúcares comienza a descender a las 96 horas y a las 120 de nuevo se nota un ligero aumento.

Fuentes Hernández y col (2009). Reportan que la producción de xilanasa va fuertemente ligada con el contenido de azúcares reductores presente en el medio de cultivo. Esto puede explicar el comportamiento de la producción conforme el contenido de azúcares simples en este tipo de biorreactor.

Las diferencias en el comportamiento de las gráficas de contenido de xilanasa y contenido de azúcares totales pueden deberse como en las otras ocasiones a que la xilanasa no es la única enzima que se segrega al medio y no es la única que actúa generando carbohidratos simples.

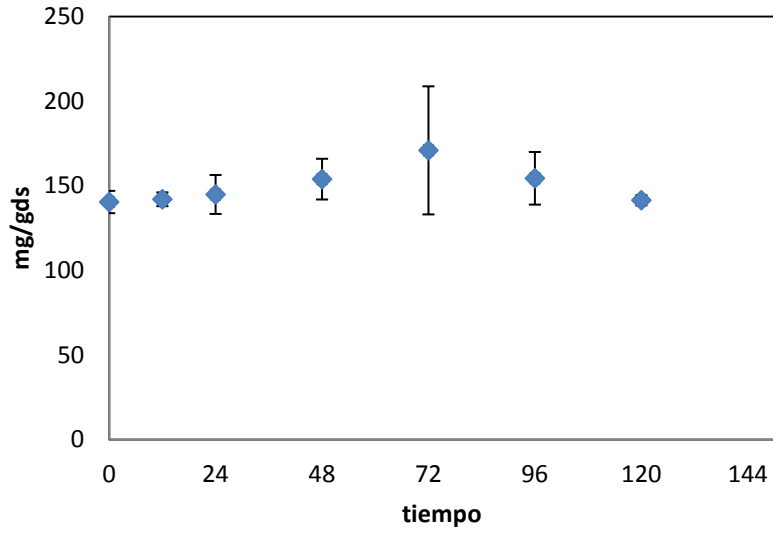


Gráfica 24.- contenido de azúcares reductores en el extracto obtenido del biorreactor de columna fluida.

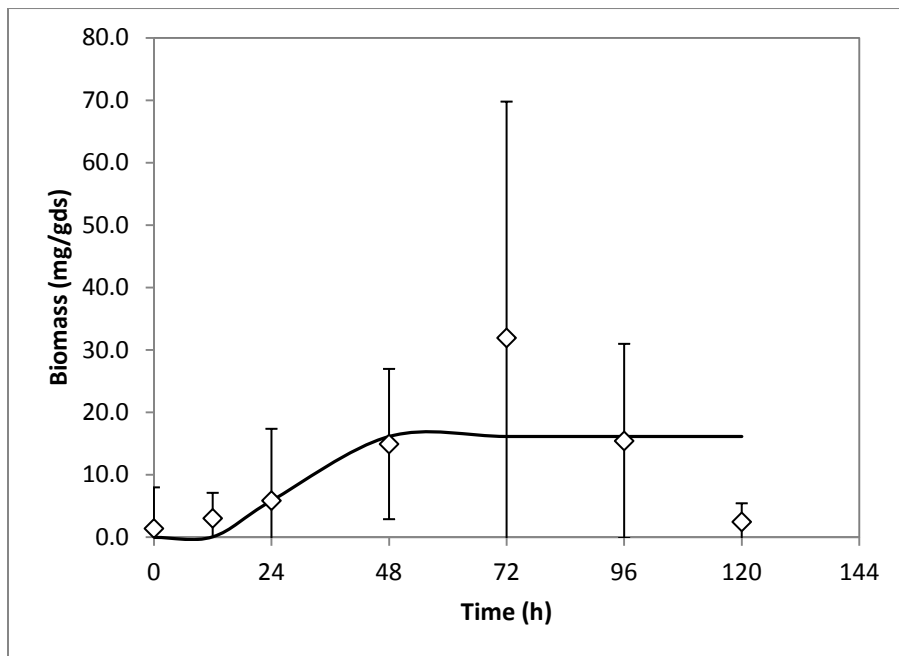
### **Biomasa**

En este biorreactor puede observarse un crecimiento del hongo hasta las 72 horas en comparación con la gráfica de producción de xilanasas esto nos indica que el hongo comienza a producir enzima en mayor cantidad para tener disponibles nutrientes y detiene parcialmente su crecimiento, posiblemente en este tiempo las proteasas presentes en el medio actúen degradando proteína soluble y por esta razón se detecta un descenso en el contenido de biomasa presente en el medio.

Acosta Aranda (2013) reporta presencia de proteasas en fermentación en medio olote de maíz con *Rh Pusillus* teniendo el máximo de producción al tiempo de 72 horas lo cual puede explicar el descenso del contenido de biomasa.



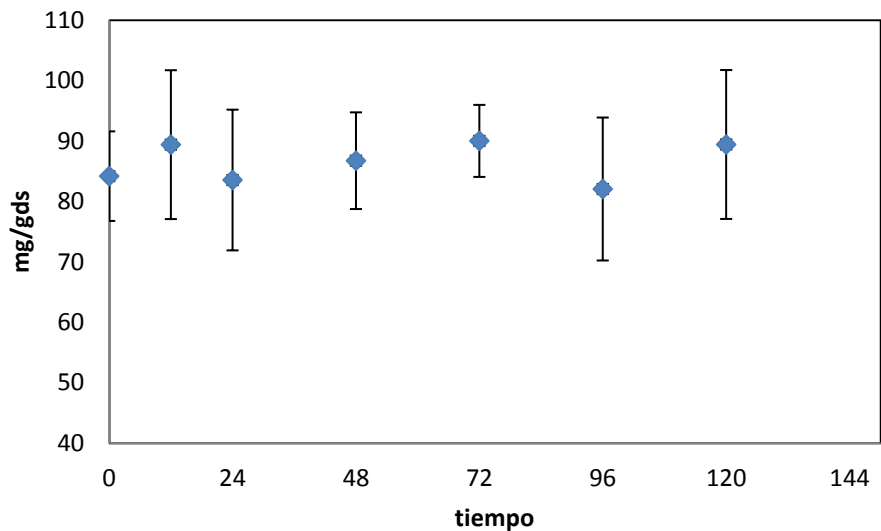
Gráfica 25.- contenido de biomasa en el extracto obtenido del biorreactor de columna fluida.



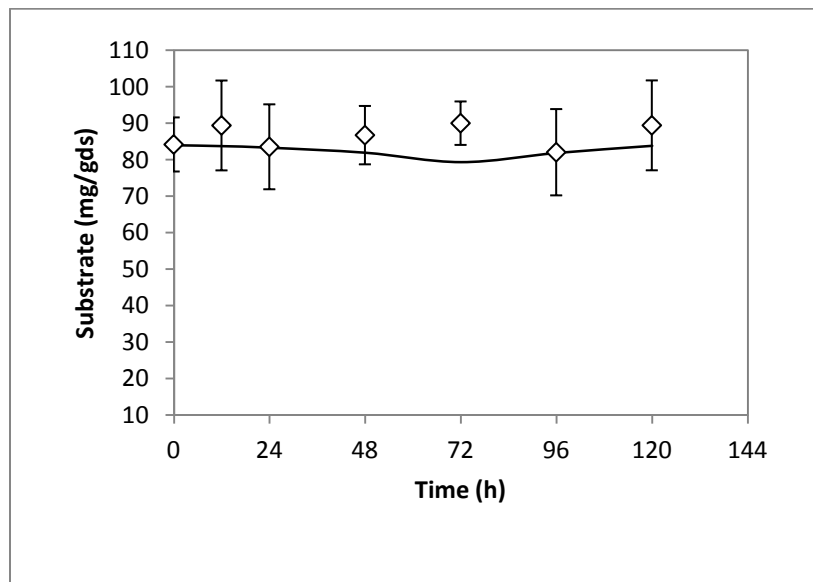
Gráfica 26.- comparación entre el modelo matemático (-) y el experimental (◊) en el contenido de biomasa en el biorreactor de columna fluida.

## Az. Totales

En el contenido de azúcares totales del biorreactor de placa fluida se observan muchos altibajos (Gráfica 27) esto puede deberse principalmente al consumo de los mismos así como a la degradación de las moléculas más complejas y la producción de una mayor cantidad de moléculas simples.



Gráfica 27.- contenido de azúcares totales en el extracto obtenido del biorreactor de columna fluida.



Gráfica 28.- comparación entre el modelo matemático (-) y el experimental (◇) en el contenido de azúcares totales en el biorreactor de columna fluida.

## 8.5. COMPARACIÓN

### Comparación en la producción de xilanas

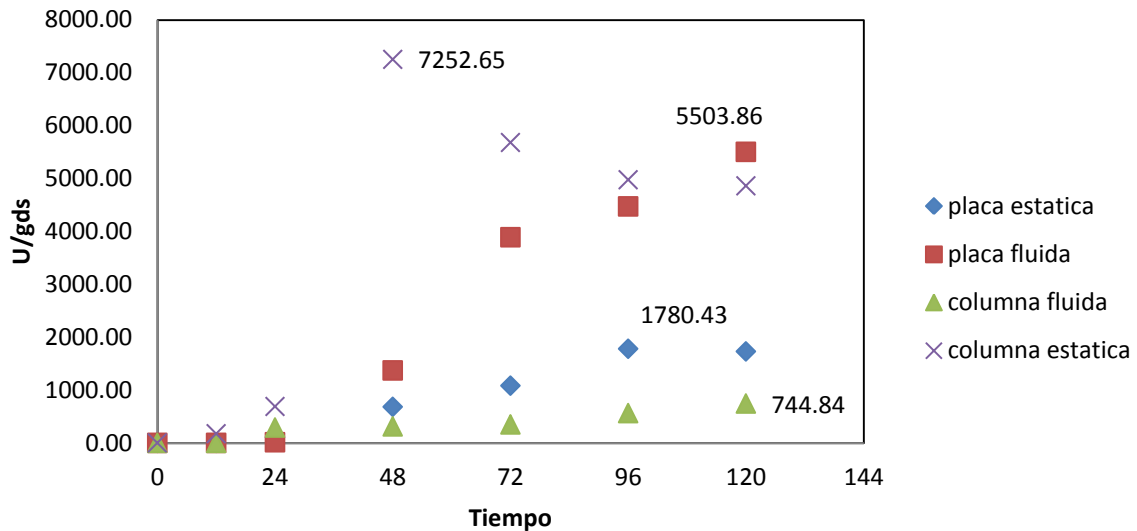
En la gráfica 29 se puede observar el comportamiento en la producción de xilanas y sus valores máximos, se puede observar que el biorreactor de mayor producción fue el de columna estática con una máxima de producción de 7253U/gds a el tiempo 48 horas, seguida del biorreactor de placa fluida con una máxima de 5504 U/gds, a el tiempo 120 horas, de los biorreactores de menor producción el de placa estática obtuvo una producción de 1780 U/gds a el tiempo 96 horas, y el biorreactor de menor producción es el de columna fluida con una producción máxima de 745 U/gds a el tiempo 120 horas.

Ibarra, García y col reportan un aumento de 3.15 y 6.44 unidades porcentuales para 20 y 30 L/min de aire, respectivamente en la fermentación de bagazo de caña utilizando un volumen de 1500g esto fue inoculado con una cantidad de  $15 \times 10^7$  esporas sobre ml del hongo *trichoderma viride*, esto nos corrobora que el flujo de aire influye en la producción de proteínas por los microorganismos.

En esta comparación se puede observar que los reactores de placa fluida tienen sus producciones máximas a las 120 horas lo cual nos podría indicar que dándole seguimiento a el ensayo podrían obtenerse rendimientos iguales o mayores que los obtenidos en el máximo de columna estática.

Romero blancas y col reportan que la producción de xilanas en biorreactores estáticos tienen sus máximos de producción a las primeras 100 horas de inoculado el medio independiente mente de la fuente de carbono que se aplique. En comparación con los resultados obtenidos de este estudio se puede corroborar observando que el reactor de columna tuvo su mayor producción a las 48 horas mientras que el de placa fue a las 96 horas.

Casas Gonzales y col. Reportan una producción de xilanasa en medio sólido por *aspergillus kawachii* con una producción máxima entre las 36 y las 48 horas coincidiendo con la producción obtenida en este estudio por *Rh pusillus* en medio columna estática cuya producción máxima se presentó a las 48 horas.



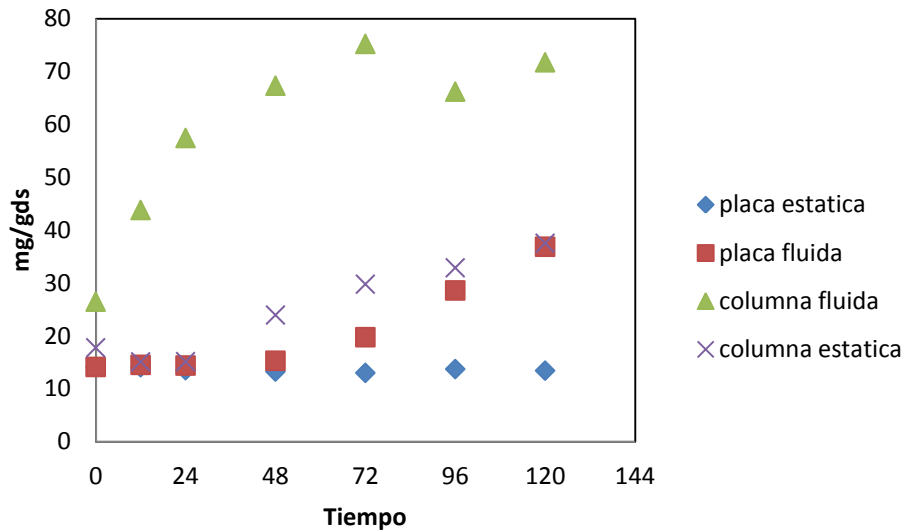
Gráfica 29.- comparación de la producción de xilanasa en los distintos biorreactores.

### Comparación en la producción de Az reductores

En la gráfica 30 se puede observar la comparación de la generación de azúcares reductores siendo el biorreactor de columna fluida el que más producción y el de placa estática el de la producción más baja.

Fernández islas (2012) reportó un incremento constante en el contenido de azúcares reductores en fermentación de salvado de avena desde las primeras 24 horas hasta las 96 del tratamiento en fermentación de salvado de avena y trigo con cepas de *Aspergillus niger*. En comparación con los resultados obtenidos en este ensayo se observa que en el biorreactor de columna fluida hay un aumento exponencial hasta las 72 horas mientras que en los biorreactores de placa fluida y

columna estática aun a las 120 horas hay producción exponencial lo cual nos indica que a un tiempo más prolongado de el ensayo podrían generarse más azúcares simples.



Gráfica 30.- comparación del contenido de azúcares reductores en el extracto obtenido de los distintos biorreactores.

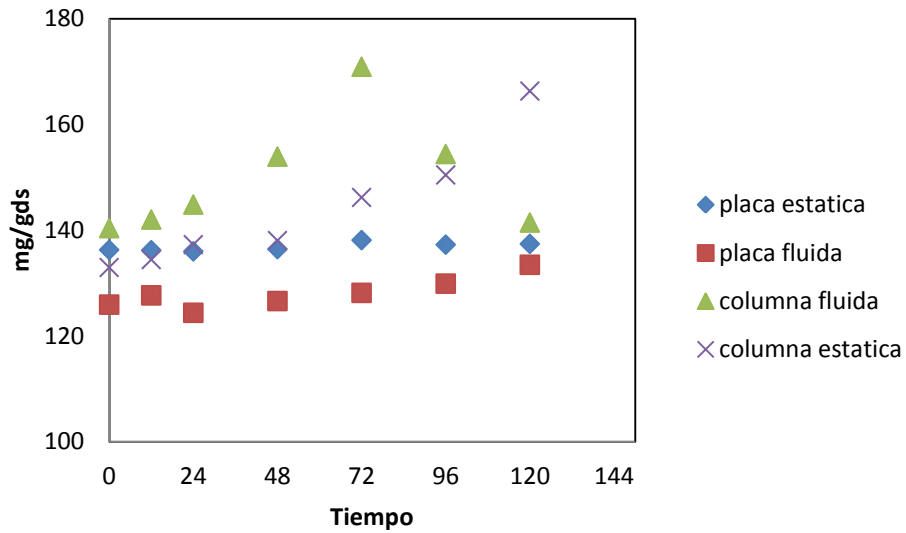
### Comparación en la producción de biomasa

La gráfica 31 muestra la comparación en la producción de biomasa siendo el biorreactor de columna fluida el que presenta un incremento mayor en el contenido y el de placa estática el que presenta menor incremento.

Izarra y col. (2010). Reportan crecimiento más elevados con inoculo que tienen mayor cantidad de esporas, esto puede influenciar en el desarrollo del microorganismo. En la gráfica se puede observar que el inoculo que tienen una mayor cantidad inicial es el que más crece a diferencia del biorreactor de placa estática que tiene un comportamiento lineal con ligeros altibajos.

Manpret y col (2005) reportan que actividades de agua elevadas (alrededor de 0.8) en hongos promueven la esporulación mientras que a menor humedad (cercanas a 0.4) el hongo produce micelio y esporas al mismo tiempo. En este estudio se

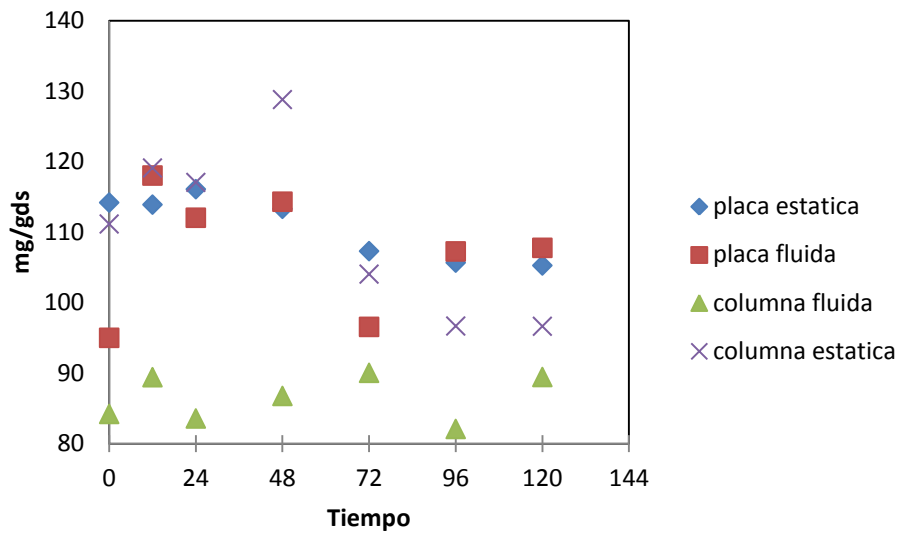
observó que mientras el medio perdía humedad alrededor del tiempo 72 horas este generaba una cantidad significativa de esporas, independientemente del biorreactor en el que se encontrara.



Gráfica 31.- comparación del contenido de biomasa en los extractos obtenidos de los distintos biorreactores.



## Comparación en el contenido de azúcares totales



Gráfica 32.- comparación del contenido de azúcares totales en los extractos obtenidos de los distintos biorreactores.

## 9. CONCLUSIONES

La producción de xilanasa por *Rhizomucor pusillus* SOC-4A se ve diferenciada tanto por el biorreactor que se esté utilizando como por el tratamiento es decir si es con aireación forzada o no, se puede observar que el biorreactor más eficiente en la producción de la enzima es el de columna estática por haber alcanzado los valores máximos de producción y además fue en un tiempo relativamente corto en comparación con los otros biorreactores. En un escalamiento a planta piloto y conforme a costos este sería el mejor tratamiento debido a que no es necesario implementar un flujo de aire para que el experimento sea repetido con satisfacción.

Los biorreactores de placa y columna diferencian en la producción de xilanasa, el tipo de biorreactor hace que el microorganismo produzca diferentes metabolitos esto debido a la disponibilidad de los mismos así como la humedad y la temperatura, el biorreactor más efectivo es el de columna para este tipo de metabolito.

La aireación en los dos tipos de biorreactores tiene una influencia muy notoria, la mayor producción en la comparación de biorreactores ahora es por parte del biorreactor en placa fluida colocándose muy por encima del biorreactor de placa fluida.

El microorganismo tiene distintos comportamientos conforme a los biorreactores y a los tratamientos que se apliquen.

## 10. REFERENCIAS

Genesis UAG. Material didáctico en línea  
(<http://genesis.uag.mx/edmedia/material/quimicall/enzimas.cfm>29-10-13)

Owen R. fennema (2000) QUÍMICA DE LOS ALIMENTOS

Schipper (1978) MOLECULAR AND BIOTECHNOLOGICAL ASPECTS OF XYLANASES

Bailey (1992) MEASUREMENT OF LACCASE, PEROXIDASE AND XYLANASE ACTIVITY

CNIB Centro Nacional de Información Sobre Biotecnología (junio 2005). XYLANASES FROM FUNGI: PROPERTIES AND INDUSTRIAL APPLICATIONS.

Viniegra-González G. (1997). SOLID STATE FERMENTATION: DEFINITION, CHARACTERISTICS, LIMITATIONS AND MONITORING.

H. A. Ruíz-Leza, R. M. Rodríguez-Jasso, R. Rodríguez-Herrera, J. C. Contreras-Esquivel y C. N. Aguilar (2007) DISEÑO DE BIORREACTORES PARA FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

Duran (2003) DISEÑOS BIORREACTOR DE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO PLATAFORMA PARA EL DESARROLLO DE LA BIOTECNOLOGÍA, UMR INRA-1082 (IBQ), 17 Rue Sully, 21065 Dijon, Francia

Janeth Fuentes Hernández, Mayola García Rivero, Josefina Pérez Vargas, Isabel Membrillo Venegas y Aurora Martínez Trujillo. PRODUCCIÓN DE XILANASAS POR *Aspergillus niger*: CULTIVOS SUMERGIDO Y SÓLIDO CON RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

M.V. Edgardo Seijas (2012). ENZIMA XILANASA COMO ADITIVO FUNCIONAL DEPARTAMENTO TÉCNICO DE AVES VETIFARMA.

Romero blancas y col.(2011) PRODUCCIÓN FUNGICA DE LACASAS Y XILANASAS EN FERMENTACIÓN SÓLIDA Y FERMENTACIÓN EN CULTIVO SUMERGIDO SOBRE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES, UN ESTUDIO COMPARATIVO.

Díaz Canales Paulo (2009). Universidad Complutense Madrid DESARROLLO DE UN AGENTE BIOLÓGICO PARA SU APLICACIÓN INDUSTRIAL EN EL PROCESO DE BLANQUEAMIENTO DE PULPA DE CELULOSA

Doctor fungus <http://www.doctorfungus.org/thefungi/Rhizomucor.php> Accesado el 09-diciembre-2013

Bradford MM (1976): A RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR THE QUANTITATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING THE PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING.

MICHEL DUBOIS, K. A. GILLES, J. K. HAMILTON, P. A. REBERS, and FRED SMITH (1956) COLORIMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF SUGARS AND RELATED SUBSTANCES

Vandeplas Sabrina y Bodin Jean-Christophe(2012). ACCIÓN DE UNA XILANASA PRODUCIDA POR BACILLUS SUBTILIS. EFECTOS SOBRE LA FLORA INTESTINAL Y EL ESTADO SANITARIO EN LAS AVES

Robledo Olivo Armando, Aguilar Cristóbal Noé, Montañez Sáenz Julio Cesar (2012). USO DEL OLOTE DE MAÍZ COMO SUSTRATO MICROBIANO PARA LA OBTENCIÓN DE XILANASAS.

. Haapala, R, Linko, S, Parkkinen, E, Suominen, P (1994) PRODUCTION OF ENDO-1,4-B-GLUCANASE AND XYLANASE BY TRICHODERMA REESEI IMMOBILIZED ON POLYURETHANE FOAM. BIOTECHNOL. TECH.

Izarra Myriam L., Santayana Mónica L., Villena Gretty K., Marcel Gutiérrez-Correa (2010) THE INFLUENCE OF INOCULUM CONCENTRATION ON CELLULOSE AND XYLANASE PRODUCTION BY ASPERGILLUS NIGER

Haltrich, D., Prenner, E., Prieb, M. and Steiner, W. (1992) PRODUCTION OF EXTREMELY HIGH VALUES OF XYLANASE ACTIVITY BY SCHIZOPHYLLUM COMMUNE. IN: BIOTECHNOLOGY IN THE PULP AND PAPER INDUSTRY.

PROC. 5TH INT. CONF. BIOTECHNOL. PULP PAPER IND. (KUWAHARA, M. AND SHIMADA, M., EDS.), PP.

. Grajek, W (1987) PRODUCTION OF D-XYLANASES BY THERMOPHILIC FUNGI USING DIFFERENT METHODS OF CULTURE. BIOTECHNOL.

Dey, D, Hinge, J, Shendye, A, Rao, M (1992). PURIFICATION AND PROPERTIES OF EXTRACELLULAR ENDOXYLANASES FROM AN ALKALOPHILIC THERMOPHILIC BACILLUS SP.

Viniegra-González Gustavo, Ernesto Favela-Torres, Cristobal Noe Aguilar, Sergio de Jesus Romero-Gomez, Gerardo Díaz-Godínez, Christopher Augur. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*. 13:157-167.

Pirt S.J., Principles of Microbe and Cell Cultivation, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1975.

Luedeking R., Piret E.L. A kinetics study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH, *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng. I* (4) (1959) 393–412

## **11. ANEXOS**

### **11.1. RECUENTO DE ESPORAS**

Se basa en el recuento directo del número de células en un volumen determinado prefijado en la cámara de recuento mediante la observación al microscopio. El método no permite distinguir entre células viables y no viables.

#### **Material**

- Cámara de Neubauer 1
- Microscopio
- 250 ml de agua destilada
- Cubreobjetos
- Tween 80 0.1% 20 ml
- Pipeta 20-200 microlitros
- Pipeta 10 1000 microlitros

#### **Procedimiento**

1. Agregar 20 ml de Tween 80 y un agitador magnético estéril al medio con el microorganismo.
2. Tomar .1 ml de la suspensión de esporas y colocarlo en 20 ml de agua destilada.
3. Observar al microscopio utilizando el aumento conveniente de acuerdo al tamaño de la estructura (40 x es un tamaño adecuado).
4. Contar las esporas presentes en los cuadros elegidos (generalmente se cuentan los cuadros de la línea superior e inferior y en diagonal formando una Z) también se deben contar las conidias que están tocando la primera de las 3 líneas que se encuentran circundando el cuadrado, las que se encuentran en la parte superior y la derecha del cuadro, se cuenta en total 13 cuadros cinco en cada línea (cinco arriba y cinco abajo) y tres de la

diagonal cruzada y el centro uniendo las líneas, sacar el promedio( media aritmética)

■	■	■	■	■
□	□	□	■	□
□	□	■	□	□
□	■	□	□	□
■	■	■	■	■

5. Determinar el número de conidias por mililitro y el número total de conidias utilizando la siguiente formula.

Numero de esporas/ml= (promedio)(250000)(factor de dilucion200)

## 11.2. INCUBACION PARA EL HONGO TERMOFILO

### Material

- Cajas petri
- Medio sólido para hongos (PDA)
- Plástico de fleje para alimentos
- Asa metálica para hongos

### Procedimiento

1. Propagar la cepa mediante un asa metálica para hongos
2. Sellar la tapa de la caja con plástico de fleje abarcando la tapa y la base de la caja petri para evitar deshidratación del medio.
3. Colocar las cajas en incubación 45-55°C con la tapa hacia abajo, para evitar la deshidratación.

## 11.3. PRESERVACION DEL HONGO EN LECHE DESCREMADA Y GLICEROL

### Fundamento

Se basa en colocar las células para su almacenaje en congelación con el mínimo daño posible por cristalización del agua, ya que la formación de los cristales

algunas veces causa ruptura de la célula. El glicerol y la leche descremada forman un entramado con los cristales de agua que protegen a las células sin alterar su estructura. Este método logra preservar microorganismos hasta por 6 meses.

### **Material**

- Matraz 1
- Leche descremada en polvo 1
- Glicerol (glicerina)
- Pipeta
- Puntillas
- Microtubos cónicos
- Asa metálica para hongos
- Probeta 25 ml

### **Procedimiento**

Preparar una solución con 10% glicerol y 5% leche descremada en un matraz.

1. Se coloca en 100 ml de agua destilada 10 ml de glicerol y se homogeniza.
2. Posterior mente se añade a a mezcla 5 g de leche descremada en polvo (svelty) y se homogeniza.
3. Se esteriliza a 125 PSI por 10 minutos.
4. Se deja enfriar y luego y luego se añaden 10 ml de la mezcla leche glicerina al medio que contiene el microorganismo.
5. Se distribuye la mezcla con una asa metálica para barrer esporas y micelio.
6. Se toman 0.5 ml de la solución con esporas y se colocan en tubos eppendorf estériles de .6 ml de capacidad.
7. Se identifican y se congelan a  $-20^{\circ}\text{C}$

NOTA: este método de almacenaje permite células viables en congelación por hasta 6 meces. El proceso de congelación descongelación puede ocurrir lisis celular por lo que no se recomienda descongelar por más de 2 ocasiones.



#### 11.4. MEDIO DE CULTIVO EN SALES CZAPEK-DOX

##### Material

- Matraz
- Agitador magnético
- $\text{NaNO}_3$ .....7.65 g/L
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....3.04 g/L
- $\text{MgSO}_4$ .....1.52 g/L
- $\text{KCl}$ .....1.52 g/L

##### Procedimiento

1. Pesar cada una de las sales y adicionar al matraz
2. Agregar agua al matraz (1 Lt)
3. Agitar durante 30 min

#### 11.5. SOLUCION AMORTIGUADORA ACETATO DE SODIO 50 mM (PH6)

##### Material

- Vaso de precipitados
- Probeta
- Acido acético .1 m solución A (disolver 57.2microlitros en 10 ml de aguad)
- Acetato de sodio 0.1 molar solución B (disolver 0.41g en 50 ml de agua D)

##### Procedimiento

1. Preparar la solución A disolviendo 57.2 microlitros de ácido acético en 10 ml de agua destilada.
2. Preparar la solución B disolviendo 0.41g de acetato de sodio en 50 ml de agua destilada.
3. En un vaso de precipitado mezclar 4.8 ml de la solución A y 45.2 de la solución B.
4. Adicionar 50 ml de agua destilada para completar 100 ml de la solución.
5. Mezclar durante 10 minutos.

## **11.6. OBTENCION DEL EXTRACTO APARTIR DE MATERIA VEGETAL.**

### **Fundamento**

Se basa en la extracción de proteínas usando un surfactante y un solvente iónico. El surfactante (en este caso es el tween 80) sirve para incrementar la permeabilidad de la célula facilitando la extracción de varias moléculas a través de la membrana celular (Silvia y col, 2005) mientras que el solvente iónico (en este caso NaCl) logra liberar la enzima unida a la superficie mediante enlaces iónicos (fadel, 2001).

### **Material**

Solución NaCl 0.9% y tween-80 0.1% 0.9 g de cloruro de sodio y 0.1 ml de tween80

- Probeta 50 ml
- Shaker
- Matraz kitasato
- Embudo bushner
- Bomba de vacio
- Papel filtro watman 1

### **Procedimiento**

1. Mezclar fermento de cultivo con 40 ml de solvente de extracción por cada 3 gramos de material
2. Agitar a 133 rpm en shaker por 5 minutos
3. Filtrar por watman 1
4. Almacenar en tubos conicos 50 ml

Referencia (Maciel y col, 2009)

## 11.7. MÉTODO DE AIREACIÓN PARA BIORREACTORES DE PLACA Y COLUMNA

### Objetivo

Proporcionar la cantidad de aire necesaria a los biorreactores para el crecimiento del hongo termófilo.

### Materiales

- Compresor
- Manguera de uso en laboratorio
- Frasco de un galón de volumen con entrada y salidas de aire
- Flujómetro
- Agua destilada

### Estructura

El mecanismo de aireación consta de un compresor que alimenta el aire por medio de mangueras a un frasco de vidrio que contiene agua destilada, esto con el fin de que el aire que entre a los reactores no promueva la deshidratación del medio.

La cantidad de aire que entra al humidificador es de 1 L/min. (Se realizó de esta manera por la falta de un flujómetro más pequeño para medir la entrada de aire a cada reactor)

Antes de la entrada al frasco humidificador se instalaron 2 flujómetros uno para regular la entrada de aire y el otro para medirla que fuera la que marca el primero.

También se instaló un filtro para evitar que se generara contaminación del medio con el aire inducido.

NOTA 1: estudios preliminares revelan que un flujo mayor a 1 L/min seca el medio aun con la previa humidificación del aire.

NOTA 2: el frasco debe estar dentro de la estufa y ser atemperado para evitar variaciones en la temperatura de los reactores por el flujo de aire.

## 11.8. PREPARACION DE DNS PARA CUANTIFICACION DE AZÚCARES REDUCTORES

### Fundamento

Se basa en la reducción de ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS) (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor, al ácido-3-amino-5-nitrosalisílico (de color rojo ladrillo) (Chalpin 1986) cuya presencia puede detectarse por la lectura de la absorbancia en la zona de 540-570 nm.

### Material

- DNS 10g/L
- Fenol 2g/L
- Sulfito de sodio 0.5 g hidróxido de sodio 10 g/L
- Tartrato de sodio y potasio

### Procedimiento

1. Precalentar agua destilada (100ml) en vaso de precipitado a 50°C con agitación
2. Adicionar el DNS, el hidróxido de sodio, el tartrato de sodio y potasio, el fenol y el sulfito de sodio (en ese orden)
3. Aforar con agua destilada a volumen deseado
4. Forrar el contenedor con aluminio y refrigerar

NOTA: la solución puede usarse hasta por 2 meses si se guarda en la obscuridad y en refrigeración.

Referencia miller,1959

## 11.9. CUANTIFICACION DE ACTIVIDAD XILANASA A PARTIR DEL EXTRACTO ENZIMATICO

### Fundamento

Se basa en la cuantificación de azúcares reductores (xilosa) mediante el método del DNS, empleando como sustrato enzimático al xilano de abedul al 1% se define una unidad de actividad enzimática xilanasa, como la actividad de enzima que produce un micromol de xilosa por minuto.

### Material

- Tubos de ensaye 43 piezas
- Extracto enzimático 40 ml
- Reactivo DNS 1250ml
- Xilano al 1% (P/V) en buffer de acetatos 50mM PH 6 100 ml
- buffer de acetatos 50mM PH 6 150 ml
- baño maría a ebullición
- baño maría a 55°C
- baño de hielo

### Procedimiento

1. se colocaron tres tubos de muestra y tres de testigo para cada tiempo de extracción. Se colocó a cada uno de los tubos 700 micro litros de xilano al 1%
2. a los tubos testigo se les agregó 250 micro litros de buffer de acetatos 50 mM Ph 6.
3. A los tubos testigo se les agregaron 1250 micro litros de reactivo DNS seguidos de 300 micro litros del extracto enzimático.
4. A la muestra se le agrego 300 micro litros de extracto enzimático previamente se había agregado el xilano (700 micro litros)
5. Se colocaron todos los tubos a incubación en baño a 55°C.
6. Se sacaron a baño de hielo para detener la reacción.
7. Se le colocó a la muestra 250 micro litros de buffer de acetatos 50 mM Ph6.

8. Posteriormente se le agrego a la muestra 1250 micro litros del reactivo DNS.
9. Se incubo en baño maría a ebullición por 5 minutos.
10. Se colocó en baño de hielo 5 minutos para detener la reacción.
11. Se dejó reposar a temperatura ambiente por otros 5 minutos.
12. Se tomó la lectura en espectro a 540 nm.

NOTA: para el testigo se omite la adición del extracto enzimático en el paso 1, y se adiciona en el paso 7, antes de incubar en baño a ebullición.

### Calculo de la actividad enzimática

Se obtuvo la curva patrón para actividad xilanasas.

Se colocaron 24 tubos de ensaye en una gradilla a los cuales se les agregaron distintas concentraciones de xilosa al 0.1%.

Microlitros de xilosa 0.1%	Buffer acetatos	Buffer de acetatos	Reactivo DNS
0	1000	250	1250
100	900	250	1250
200	800	250	1250
300	700	250	1250
400	600	250	1250
500	500	250	1250
600	400	250	1250
700	300	250	1250
800	200	250	1250
900	100	250	1250
1000	0	250	1250

Nota: las lecturas se realizaron hasta el tubo 6 después las lecturas son imperceptibles por el espectro a 540 nm.

## **11.10. CUANTIFICACION DE EL CONTENIDO DE AZÚCARES REDUCTORES APARTIR DEL EXTRACTO ENZIMATICO**

### **Fundamento**

Se basa en la cuantificación de azúcares reductores mediante el método del DNS, por medio de un método colorimétrico con base en la reducción del ácido 3,5 dinitroacil salicílico.

### **Material**

- Tubos de ensaye 21 piezas
- Extracto enzimático 40 ml
- Reactivo DNS 1250ml
- Xilano al 1% (P/V) en buffer de acetatos 50mM PH 6 100 ml
- buffer de acetatos 50mM PH 6 150 ml
- baño maría a ebullición
- baño maría a 55°C
- baño de hielo

### **PROCEDIMIENTO**

1. se colocaron 100 micro litros de la muestra en cada tubo correspondiente conforme al tiempo.
2. Se le agrego 300 micro litros de buffer de acetatos 50 mM Ph 6.
3. Se le agrego a cada tubo 600 micro litros del reactivo DNS.
4. Se colocó en baño a ebullición por 5 minutos.
5. Se sacaron las muestras y se colocaron en baño de hielo por 5 minutos.
6. Se dejaron reposar a temperatura ambiente 5 minutos.
7. Se leyó en espectro con una absorbancia de 540 nm.

Para cuantificar el contenido de azúcares reductores se realizó la calibración con una curva patrón utilizando solución de glucosa al .1%.

de glucosa 0.1%	Buffer de acetatos 50 mM Ph 6	Buffer de acetatos 50 mM Ph 6	Reactivo DNS
0	100	300	600
20	80	300	600
30	70	300	600
40	60	300	600
50	50	300	600
60	40	300	600
80	20	300	600
100	0	300	600

### 11.11. CUANTIFICACION DEL CONTENIDO DE BIOMASA A PARTIR DEL EXTRACTO POR EL METODO BRADFORD

#### Fundamento

Se basa en la unión de un colorante, Comássie Blue G-250 (también Serva Blue) a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formás una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Este método es sensible (1-15 µg), simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación. Entre las sustancias que interfieren están los detergentes y las soluciones básicas.

#### Método de elaboración de Bradford

1. Se pesan 100 mg de azul de comiassie (0.1g)
2. Se coloca en un matraz de adoración de 1000 ml
3. Se le agrega 50 ml de etanol al 96 %.
4. Se agregan 100 ml de ácido fosfórico.



5. Se afora con agua destilada.

### **Metodología de análisis**

1. se colocaron 100 micro litros de muestra en cada tubo respectivamente al tiempo que se analizará.
2. Se colocaron 5 ml de reactivo Bradford para cuantificación de proteína soluble.
3. Se agitaron los tubos y se dejaron reposar por 5 minutos.
4. Se lee a una absorbancia de 595 nm.

Para cuantificar el contenido de proteína soluble se realizó la calibración con una curva patrón utilizando solución de ABS (albumina serica bobina) al .1%.

Microlitros de Solución de ABS 0.1%	Microlitros de Buffer de acetatos	Ml de reactivo Bradford
0	100	5
20	80	5
30	70	5
40	60	5
50	50	5
60	40	5
80	20	5
100	0	5

### **11.12. CUANTIFICACION DE EL CONTENIDO DE AZÚCARES TOTALES A PARTIR DEL EXTRACTO POR EL FENOLSULFURICO.**

#### **Fundamento**

Este método propuesto por Dubois et al en 1956 se fundamenta en que los carbohidratos son particularmente sensible a ácidos fuertes y altas temperaturas. Bajo estas condiciones una serie de reacciones complejas toman lugar empezando con una deshidratación simple, si se continúa el calentamiento y la

catálisis ácida se producen varios derivados del furano que condensan consigo mismos y con otros subproductos para producir compuestos coloridos producto de la condensación de compuestos fenólicos y con heterociclos con el nitrógeno como heteroátomo. La condensación más común es con fenol. Este método es fácil, eficaz y rápido.

Todos los azúcares como oligosacáridos y polisacáridos pueden ser determinados, recordando que éstos bajo hidrólisis ácida producen mono sacáridos.

La forma en que procede la reacción no es estequiométrica y depende de la estructura del azúcar, por lo tanto se realiza una curva patrón. (Nielsen, 1998)

### Metodología

1. Se colocan 500 microlitros de muestra en los tubos.
2. Se agregó 1 ml de buffer de acetatos 50 mM Ph 6.
3. Se puso en baño de hielo.
4. En el baño de hielo se le agrego 2.5 ml de acido sulfúrico concentrado.
5. Se sacó del baño de hielo y se le agrego 500 micro litros de fenol al 5%.
6. Se deja reposar 5 minutos.
7. Se colocó en baño a ebullición 5 minutos.
8. Se saca a baño de hielo por 5 minutos.
9. Se dejó atemperar al medio ambiente por 5 minutos.
10. Se lee a una absorbancia de 480 nm.

Para cuantificar el contenido de azúcares totales se realizó la calibración con una curva patrón utilizando solución de xilosa al 0.1%

Microlitros de Solución de xilosa 0.1%	Microlitros de Buffer de acetatos	Ml de buffer de acetatos	Ml de ácido sulfúrico	Ml de fenol al 5%
0	100	1	2.5	0.5
100	400	1	2.5	0.5

150	350	1	2.5	0.5
200	300	1	2.5	0.5
250	250	1	2.5	0.5
300	200	1	2.5	0.5
400	100	1	2.5	0.5
500	0	1	2.5	0.5