



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

PRODUCCIÓN DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS A PARTIR DE CULTIVOS DE *Trichoderma* sp. CON BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

ADRIANA SUESCA DÍAZ, Ing. Qca.

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá D.C., Colombia

2012



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

PRODUCTION OF CELLULOLITIC ENZYMES USING *Trichoderma* sp. WITH LIGNOCELULOSIC BIOMASS

ADRIANA SUESCA DÍAZ, Ing. Qca.

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá D.C., Colombia

2012

PRODUCCIÓN DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS A PARTIR DE CULTIVOS DE *Trichoderma* sp. CON BIOMASA LIGNOCELULÓSICA

ADRIANA SUESCA DÍAZ, Ing. Qca.

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ingeniería Química

Director:

Ph.D., MARIO ENRIQUE VELÁSQUEZ LOZANO

Codirectora:

Ph.D, BALKYS ESMERALDA QUEVEDO HIDALGO

Línea de Investigación:

Bioprocesos

Grupo de Investigación:

Procesos Químicos y Bioquímicos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental

Bogotá D.C., Colombia

2012

Nota de aceptación

Jurado

Jurado

Director

“Somewhere, something incredible is waiting to be known.”
Carl Sagan

Agradecimientos

A Dios.

Al Profesor Mario E. Velásquez, por su apoyo con la dirección de la tesis y brindarme esta oportunidad.

A Balkys Quevedo, por su gran apoyo material e intelectual, orientación y guía en el desarrollo de esta tesis.

A Camilo Monroy, por su apoyo incondicional.

A la Universidad Nacional de Colombia.

A la DIB, por su apoyo económico para la realización de este proyecto.

A Colciencias, por su apoyo al permitirme ser Joven Investigador.

A Patricia Castillo, por su amistad.

A Helver Lesmes, Jean-Pierre Magnin, Felipe Guio, Alejandro Bourdon, Luis Miguel Serrano, Juan Pablo Ortiz, Sandra Rangel, Luisa Gómez, por el valioso apoyo proporcionado.

A mis compañeros del posgrado y al personal administrativo del Departamento de Ingeniería Química y Ambiental por su apoyo en conocimientos, materiales y espacios de trabajo.

Y un especial agradecimiento a mis padres Marco y Gloria, a mi hermana Cristina y a David, por estar conmigo y darme su apoyo.

Resumen

Celulasas y xilanasas fueron producidas por una cepa nativa de *Trichoderma asperellum* utilizando tallo de clavel molido como fuente de carbono, en escala matraz. Se evaluó la actividad endocelulasa utilizando CMC como sustrato, exocelulasa con Avicel®, y endoxilanasas con xilano. Se encontró que realizar un pre-tratamiento adicional a la biomasa como con agua caliente o ácido sulfúrico, además de la molienda, no mejora la producción de enzimas celulolíticas, demostrando que la utilización de tallo de clavel molido como fuente de carbono fue suficiente para lograr unos niveles aceptables de producción de enzimas, permitiendo superar las actividades obtenidas cuando se utilizó celulosa microcristalina como fuente de carbono. Se estudiaron los efectos del pH, la concentración de la fuente de carbono, las fuentes de nitrógeno, y los macro y microelementos en el medio de cultivo. La adición de 3.64% de tallo de clavel en base seca, junto con 0.5 g/L de sulfato de amonio, a un pH igual a 5, presentó las mejores condiciones de cultivo para la producción de las enzimas. Además, una reducción en la concentración de urea, peptona, Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{2+} y Co^{2+} mejora la producción de las enzimas, debido a que presentan un efecto negativo sobre la producción de las enzimas. Esto pudo ser ocasionado por el suplemento de estos elementos por parte del clavel, en las cantidades requeridas por el microorganismo. Los compuestos facilitadores de la actividad enzimática fueron Tween 80, Mn^{2+} , Zn^{2+} y K^{1+} , los cuales son conocidos por tener un efecto positivo en la producción de enzimas celulolíticas. Las mejores actividades enzimáticas encontradas en este trabajo fueron 413 U/L en CMC, 132 U/L en Avicel® y 921 U/L en xilano.

Palabras clave: Producción de enzimas, *Trichoderma asperellum*, celulasas, tallo de clavel, xilanasas

Abstract

Cellulases and xylanases were produced by a strain of *Trichoderma asperellum* using milled carnation stalks as carbon source in flask. Endoglucanase activity was evaluated on CMC, exocelulase activity on Avicel® and endoxylanase activity on xylan. An improvement of the production of cellulolytic enzymes was not found, when there was an additional pretreatment of biomass as hot water or sulfuric acid, to the milled biomass, showing that the size reduction pretreatment of the stems of carnation, is suitable, allowing overcome the activities obtained on microcrystalline cellulose. The effects of pH, concentration of carbon source, nitrogen source, and the macro and microelements in the culture medium were studied. The best culture conditions for the production of enzymes were the addition of 3.64% of carnation, together with 0.5 g/L of ammonium sulfate at a pH of 5. It was further found that a reduction in the concentration of urea, peptone, Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{2+} and Co^{2+} enhances the production of enzymes, because they exhibit a negative effect on the adjusted model. This could happen due to the addition of these elements from the carnation stalks which can reach the concentration need for the cellulases production. The cellulose inductor compounds were Tween 80, Mn^{2+} , Zn^{2+} and K^{1+} , which are known for their positive effect on cellulolytic enzymes production. The best enzymatic activities found in this study were 413 U/L in CMC, 132 U/L in Avicel® and 921 U/L in xylan.

Keywords: Enzymatic production, *Trichoderma asperellum*, cellulases, carnation stalks, xylanases.

Contenido

	Pág.
RESUMEN	IX
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE TABLAS	XIV
1. MARCO TEÓRICO	5
1.1 Biomasa Lignocelulósica	5
1.1.1 Clasificación	6
1.1.2 Composición	6
1.1.3 Pre-tratamiento de la biomasa	10
1.1.4 Usos de la biomasa residual	13
1.2 Género <i>Trichoderma</i>.....	14
1.2.1 Morfología	15
1.3 Celulasas.....	15
1.3.1 Características	15
1.3.2 Usos.....	17
1.3.3 Medición de actividad enzimática	18
1.3.4 Producción	19
1.4 Planteamiento del problema	22
2. METODOLOGÍA	23
2.1 Estudios preliminares	23
2.1.1 Identificación de los microorganismos de trabajo	23
2.1.2 Caracterización fisicoquímica de la biomasa	24
2.1.3 Metodología para la producción enzimática en medio sumergido.....	26
2.1.4 Preparación de muestras para análisis.....	27

2.1.5	Producción de celulasas con celulosa microcristalina	28
2.2	Diseño del proceso de obtención de celulasas	29
2.2.1	Influencia de la concentración del inóculo	29
2.2.2	Estudio del tiempo de fermentación	29
2.2.3	Efecto de la proporción de carbono y nitrógeno	30
2.2.4	Efecto del pre-tratamiento	32
2.2.5	Efecto de los microelementos y los macroelementos	35
2.3	Métodos analíticos	37
2.3.1	Determinación de azúcares reductores	37
2.3.2	Análisis de azúcares por HPLC	37
2.3.3	Determinación de las actividades celulolíticas	37
2.3.4	Determinación de actividad xilanasa	38
2.3.5	Determinación de proteínas	38
2.3.6	Análisis estadísticos	38
3.	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	41
3.1	Estudios preliminares	41
3.1.1	Descripción de los microorganismos de trabajo	41
3.1.2	Caracterización fisicoquímica de la biomasa	42
3.1.3	Producción de celulasas con celulosa microcristalina	44
3.2	Diseño del proceso de obtención de celulasas	47
3.2.1	Influencia de la concentración del inóculo	47
3.2.2	Estudio del tiempo de fermentación	48
3.2.3	Efecto de la proporción de carbono y nitrógeno	51
3.2.4	Efecto del pre-tratamiento	57
3.2.5	Efecto de los microelementos y macroelementos	61
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	75
4.1	Conclusiones	75
4.2	Recomendaciones	76
	BIBLIOGRAFÍA	77
	ANEXOS	85

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Estructura de la biomasa lignocelulósica. Fuente: Hector, R., <i>et al.</i> (2008). ..	7
Figura 1-2: Estructura química de la celulosa. Adaptado de Jacques K. <i>et al.</i> , (2003).....	8
Figura 1-3: Estructura de la hemicelulosa. Adaptado de Jacques K. <i>et al.</i> , (2003).	9
Figura 2-1: Procedimiento secuencial para la caracterización de la biomasa	25
Figura 2-2: Procedimiento para la preparación del medio de cultivo y su inoculación....	26
Figura 2-3: Procedimiento realizado para obtener la solución de enzimas cruda.....	27
Figura 2-4: Diagrama del equipo utilizado en el pre-tratamiento con agua caliente	34
Figura 3-1: Fotografía de <i>T. asperellum</i> (izquierda) y <i>T. reesei</i> (derecha) en PDA.	41
Figura 3-2: Halo de hidrólisis de CMC por la cepa <i>T. asperellum</i>	42
Figura 3-3: Perfiles de actividad para la cepa de trabajo y el control positivo. a) Actividad en CMC, b) actividad en Avicel®.	45
Figura 3-4: Coloración con azul de lactofenol, vista en microscopio a 40x. <i>T. asperellum</i> (a), <i>T. reesei</i> (b).....	46
Figura 3-5: Perfiles del comportamiento de las variables de respuesta en el tiempo a un pH de 5. a) Actividad Enzimática, b) pH, c) Azúcares.....	50
Figura 3-6: Superficies de respuesta obtenidas a diferentes niveles de urea.	53
Figura 3-7: Interacción AB (Clavel –Sulfato de amonio). Línea roja indica 2.5 g/L de sulfato de amonio, línea negra 1.0 g/L.....	54
Figura 3-8: Interacción AC (Clavel-Urea). Línea roja urea 1.3 g/L, línea negra 0.5 g/L.	54
Figura 3-9: Superficie de respuesta obtenida en superficie 3D.....	56
Figura 3-10: Curvas de operación de los pre-tratamientos realizados	58
Figura 3-11: Actividad enzimática obtenida del crecimiento del hongo en los diferentes sustratos pretratados. PT: Sin pre-tratamiento.	59
Figura 3-12: Diagrama de Pareto obtenido del diseño Packett-Burman realizado. (a) Actividad CMC, (b) Actividad Avicel®.	62
Figura 3-13: Coloración con azul de lactofenol. Izquierda, medio inoculado e incubado, derecha, control abiótico.	72
Figura 3-14: Procedimiento propuesto para la obtención de las enzimas celulolíticas ...	73

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en diferentes biomasas lignocelulósicas en base seca. Adaptado de Sun Y. y Cheng, J. (2002) ¹ , Klass D., (1998) ² y Balat M., (2010) ³ .	7
Tabla 1-2: Métodos de pre-tratamiento de biomasas lignocelulósicas. Adaptado de Sanchez O. y Cardona C., 2005.	11
Tabla 1-3: Características de <i>T. asperellum</i> y <i>T.reesei</i> . Adaptado de (Samuels, G.J <i>et al</i> , 2012).	16
Tabla 1-4: Métodos para la determinación de actividades enzimáticas.	19
Tabla 1-5: Principales microorganismos productores de celulasas.	20
Tabla 1-6: Ejemplos de celulasas comerciales	21
Tabla 2-1: Composición del medio sólido para la producción de celulasas.	24
Tabla 2-2: Medio Mandels para la producción de enzimas celulolíticas	28
Tabla 2-3: Concentración de microelementos en el medio.	28
Tabla 2-4: Estudio del tiempo en la producción de enzimas.	30
Tabla 2-5: Efecto de la proporción de carbono y nitrógeno	31
Tabla 2-6: Efecto de la proporción de fuente de carbono y nitrógeno en la actividad enzimática.	32
Tabla 2-7: Condiciones del pre-tratamiento realizado con agua	33
Tabla 2-8: Variables y sus intervalos de concentración empleados en el diseño	36
Tabla 2-9: Efecto de los microelementos y macroelementos	36
Tabla 3-1: Resultados de la caracterización del tallo de clavel.	42
Tabla 3-2: Resultados generados del reporte de análisis de tejido vegetal.	43
Tabla 3-3: Distribución de tamaño de partícula del tallo de clavel molido.	43
Tabla 3-4: Resultados de porcentaje de lignina y cenizas para la biomasa	43
Tabla 3-5: Resultados de los porcentajes de azúcares analizados para la biomasa por HPLC	44
Tabla 3-6: Resultados de las actividades enzimáticas	45
Tabla 3-7: Resultados encontrados al variar la concentración del inóculo.	47
Tabla 3-8: Análisis estadístico de los datos.	48
Tabla 3-9: Actividades celulolíticas obtenidas con respecto al tiempo con un pH inicial de 5.00.	49
Tabla 3-10: Resultados del efecto de la concentración de urea, tallo de clavel y sulfato de amonio.	51
Tabla 3-11: Resultados del análisis Anova del modelo cuadrático con transformación.	52

Tabla 3-12: Resultados del diseño cambiando la concentración de tallo de clavel y sulfato de amonio	55
Tabla 3-13: Análisis ANOVA de la superficie de respuesta con modelo cuadrático.....	56
Tabla 3-14: Optimización numérica de los parámetros analizados.....	57
Tabla 3-15: Resultados de la caracterización de las fracciones obtenidas de los pre-tratamientos	59
Tabla 3-16: Resultados obtenidos del diseño de efecto de los micro y macro elementos en el medio.....	61
Tabla 3-17: Listado de los micronutrientes aportados por el medio de sales, y el tallo de clavel.....	64
Tabla 3-18: Lista de los efectos obtenidos de las variables sobre las respuestas.	64
Tabla 3-19: ANOVA del diseño factorial con actividad en CMC	65
Tabla 3-20: ANOVA del diseño factorial con actividad en Avicel®	66
Tabla 3-21: Valores experimentales y predichos para las variables de respuesta analizadas en el diseño	67
Tabla 3-22: Composición del medio utilizado para la comprobación del modelo.	68
Tabla 3-23: Respuestas obtenidas del ensayo de comprobación del modelo	69
Tabla 3-24: Valores de actividad celulolítica obtenidas por otras cepas de <i>Trichoderma</i>	70
Tabla 3-25: Caracterización de los azúcares obtenidos por HPLC al registrar los hidrolizados obtenidos en la determinación de actividades enzimáticas.....	71
Tabla 3-26: Caracterización del sustrato final recuperado luego de la producción de las enzimas.....	71
Tabla 3-27: Composición del medio propuesto para la producción de celulasas.....	72

Introducción

Actualmente, cerca el 87% de la energía utilizada en el mundo es derivada de fuentes no renovables tales como el petróleo, el gas natural y el carbón y cerca del 28% del consumo energético se encuentra en forma de combustibles líquidos para el transporte (Merino, S. y Cherry, J., 2007). Debido a la disminución de las reservas de petróleo y a la necesidad de satisfacer los requerimientos energéticos, se ha incentivado el surgimiento de nuevas tecnologías para la producción de energía a partir de fuentes renovables, para la producción de compuestos como el etanol, el biodiesel, el hidrógeno entre otros, los cuales muestran un panorama favorable para reemplazar parcialmente las fuentes de energía convencionales y generar un menor impacto ambiental.

El etanol el cual es obtenido principalmente por los Estados Unidos y Brasil, con una producción de 9000 y 5019.2 millones de galones respectivamente para el año 2007 (RFA, 2007), es sintetizado catalíticamente a partir de etileno y biológicamente por vía fermentativa utilizando diferentes microorganismos como las levaduras, productoras de etanol a nivel industrial a partir del almidón del maíz y la caña de azúcar. Para disminuir significativamente el costo de estos productos de fermentación y volver esta alternativa más viable económicamente, es necesario reducir los costos de los azúcares. De ahí que el futuro e importancia de la industria de fermentaciones dependerá del costo y suministro de las materias primas azucaradas accesibles y de bajo costo.

En miras de encontrar una materia prima alternativa y de desarrollar un proceso más sostenible, se presenta a la biomasa vegetal, uno de los recursos naturales más abundantes en el planeta. Se ha propuesto actualmente un sistema que parte de la biomasa, similar a la refinería de petróleo, llamado "biorefinería" en donde por medio de la integración de procesos y equipos, y utilizando la misma infraestructura que la ya desarrollada por la industria petroquímica, se obtienen químicos, combustibles líquidos y energía (Fernando S. *et al*, 2006).

Compuesta de celulosa, hemicelulosa, lignina, entre otros, la biomasa lignocelulósica fraccionada en sus diversos componentes químicos constituye una ruta promisoría para su utilización industrial (Papatheofanous M. *et al*, 1995). Se ha encontrado que la biomasa lignocelulósica sirve como materia prima para reacciones de hidrólisis y bioquímicas, y en procesos de transformación termoquímica, para producir vapor de proceso, electricidad y compuestos como proteínas, enzimas, saborizantes, colorantes, carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos, combustibles líquidos, solventes, resinas y polímeros, entre otros (Fernando S. *et al*, 2006).

El uso de materiales lignocelulósicos como residuos agroindustriales y forestales, desechos de la industria de la madera y municipales en el campo de los biocombustibles, se caracteriza porque no requiere un uso adicional de tierra y no compite con la utilización de los mismos para la alimentación humana (Turner B, *et al*, 2007). A pesar de que algunos biocombustibles han mostrado ser viables, es necesario sin embargo examinar cuidadosamente los efectos económicos, ecológicos y sociales de los mismos antes de extender su programa hacia una gran escala (Serna F. *et al*, 2011). Las restricciones ecológicas se han asociado a la preservación del medio ambiente y la calidad de vida, las económicas incluyen la exploración energética de la biomasa con el conocimiento de si se tienen otros usos industriales o alimenticios más económicos; y por último, si los costos de explotar esta biomasa son compatibles con los beneficios energéticos y comparables con los demás combustibles o usos potenciales de los productos derivados de la biomasa (Machado C., 2010).

Usando específicamente biomasa residual como fuente de energía se puede crear una solución ambiental de la disposición de los mismos y crear nuevos incentivos para el crecimiento de cultivos que hasta ahora solo son marginalmente rentables. Un ejemplo lo encontramos en la floricultura, una industria que se ha destacado a nivel nacional por su innovación y su importante contribución económica al país, la cual tiene entre sus retos actuales el mantenimiento del bienestar de la población vinculada al proceso productivo y la minimización de los efectos sobre el medio ambiente (Fedecolflorex, 2010). La investigación se ha enfocado principalmente en miras a utilizar los residuos que quedan al finalizar la cadena productiva, de los cuales los del tipo vegetal, corresponden aproximadamente al 85% de los residuos sólidos generados, entre los que se encuentran el tallo de flores, un material lignocelulósico sujeto a ser utilizado como materia prima para el desarrollo de productos con un alto valor agregado.

La hidrólisis enzimática de biomasa con celulasas y otras enzimas para la producción de carbohidratos, es una alternativa viable con la cual se utilizan condiciones de reacción a bajas temperaturas y presiones normales de operación, que pueden no solo economizar energía debido a las condiciones suaves a la que es llevada a cabo, sino que también evita la utilización de químicos tóxicos y corrosivos, comparándola con la hidrólisis ácida tradicional (Xu Q. *et al.*, 2007). Las enzimas utilizadas en este proceso son obtenidas de microorganismos con la habilidad de degradar macromoléculas como la celulosa. Uno de los microorganismos productores es *Trichoderma*, el cual contiene un sistema enzimático con tres clases de enzimas las cuales actúan sinérgicamente para degradar la celulosa a glucosa (Reczey, K. *et al.*, 1996) y actualmente es utilizado en otros países para la producción industrial de enzimas.

En los suelos colombianos existe una amplia variedad de microorganismos susceptibles de ser utilizados en procesos biotecnológicos como es el caso de *T. asperellum*, la cual es la cepa de *Trichoderma* más predominante en la región de Suramérica y Centro América (Hoyos L. *et al.*, 2009), y su utilización en procesos investigativos, realizaría un aporte al conocimiento de nuestra diversidad local.

Los estimados económicos determinaron que el costo de la producción de alcohol celulósico es de U\$1.80/galón o más alto, el cual es casi dos veces el costo de producirlo desde almidón: de este valor U\$0.30/ galón debe ser el precio máximo que debería existir en un futuro para hacer el proceso más atractivo económicamente (Merino, S. y Cherry, J., 2007). De aquí radica la importancia del papel que juegan las enzimas en la conversión de residuos lignocelulósicos en combustibles y químicos, pero el alto costo de ellas presenta una barrera significativa en la comercialización. En términos más simples, el costo es una función de la gran cantidad de proteína enzimática requerida para romper los polímeros de azúcar en la celulosa y la hemicelulosa en monómeros fermentables.

En las últimas dos décadas, se ha realizado un esfuerzo significativo en la reducción de los costos enfocándose en mejorar la eficiencia de las enzimas conocidas, en la identificación de enzimas nuevas y más activas, creando mezclas de enzimas mejoradas y seleccionando sustratos adecuados para su producción (Reczey, K., 1996; Ahmed, S. *et al*, 2009).

Por lo tanto con miras a encontrar soluciones más sostenibles en la producción de las enzimas celulolíticas en este trabajo se presenta una metodología para la producción de celulasas en medio líquido utilizando el hongo *T. asperellum* C1, el cual es un hongo nativo aislado de raquis de palma, el cual presenta un potencial de ser utilizado.

Para llevar a cabo este objetivo, se realizó la determinación de las condiciones de crecimiento adecuadas para el hongo, por medio del cultivo en medio sólido y en fermentación sumergida a escala matraz, con la utilización de tallo de clavel molido como fuente de carbono, las cuales permitieron una mejor producción de las enzimas celulolíticas, con respecto a cuándo se utilizan fuentes de carbono tradicionales como la celulosa microcristalina. El tallo de clavel fue caracterizado en cuanto a su composición estructural, lignina y microelementos utilizando metodologías desarrolladas por la NREL y la ASTM.

Se determinó el efecto de los diferentes compuestos del medio de cultivo, tales como la proporción de tallo y las fuentes de nitrógeno. Además, se estudió el efecto de la proporción de la fuente de calcio, manganeso, cobre, potasio, hierro, entre otras, además de la adición de Tween 80 sobre la actividad enzimática celulolítica producida en la fermentación.

Adicionalmente se investigó el efecto del uso de tallo de clavel molido sometidos a pre-tratamiento con agua caliente o con ácido sulfúrico, como fuente de carbono en el medio de cultivo, evaluando las actividades enzimáticas obtenidas por la cepa estudiada.

Para la evaluación de la actividad enzimática endoglucanasa, exoglucanasa y endoxilanasas, se utilizaron como sustratos CMC de baja densidad, Avivel® y xilano de madera de haya respectivamente.

1. Marco Teórico

1.1 Biomasa Lignocelulósica

Los procesos microbiológicos desde el punto de vista fisiológico, requieren primordialmente una fuente de carbono para poder realizarse adecuadamente, ya que esta le suministra la energía y la masa necesarias para numerosas funciones celulares en relación con su crecimiento y con la producción de metabolitos secundarios.

Si bien hay diversas fuentes de carbono como por ejemplo el dióxido de carbono, los hidrocarburos y los carbohidratos, la industria de las fermentaciones está basada principalmente en la utilización de azúcares. Al realizar el proceso de conversión de sustratos a productos, el valor agregado adquirido por los productos finales permite recuperar la inversión y mantener los costos de operación. Este análisis se aplica tanto a los bienes que se producen en gran volumen o *commodities* (por ejemplo ácido cítrico, ácido láctico, etanol, etc.), como para aquellos productos de alto valor o especialidades químicas.

Las fuentes tradicionales de azúcares provienen de las materias primas como la caña de azúcar, la remolacha, cereales y suero de leche (Cunningham, R. y López, G., 1994). Tanto la sacarosa como los almidones tienen usos alternativos importantes como alimentación humana y animal y su abundancia no es tan elevada. En cuanto a los carbohidratos en corrientes de desecho de procesos industriales, solo son válidos como materia prima para fermentaciones en casos muy particulares en que la localización de las plantas permite un uso económicamente factible.

La biomasa lignocelulósica, es el producto primario de fotosíntesis en la superficie terrestre y la fuente renovable más abundante a escala global en el planeta con producciones que llegan a las $2,2 \times 10^{11}$ toneladas de peso seco de biomasa, lo que supone unas diez veces la demanda energética mundial (Himmel, M. *et al.*, 1994).

Debido a que la biomasa se produce en grandes proporciones, el desarrollo de productos utilizando biomasa como materia prima, es una alternativa atractiva que beneficia la sostenibilidad de los procesos.

1.1.1 Clasificación

Atendiendo a su origen, la biomasa se puede clasificar según Quaak, P. *et al*, 1999 en:

- Biomasa natural, producida en los ecosistemas naturales. Aunque es una de las principales fuentes energéticas en los países en vías de desarrollo, no es la más adecuada para un aprovechamiento energético masivo, ya que podría originar una rápida degradación de los ecosistemas.
- Biomasa residual, generada como residuo en los procesos productivos de los sectores agrícola, forestal e industrial. Los residuos agrícolas proceden de los cultivos leñosos y herbáceos, los cuales se producen de manera importante debido a su alta cosecha. Entre ellos se encuentran la paja de granos, cáscaras de arroz, coco o café; tallo de maíz y algodón y bagazo de la caña de azúcar. Los de origen forestal provienen de los tratamientos silvícolas de mejora y mantenimiento de los montes y masas forestales.

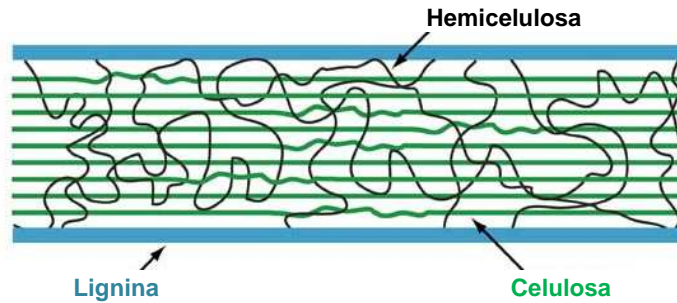
También se pueden considerar incluidos en este grupo los residuos de la industria papelera y la fracción orgánica de los residuos domésticos e industriales, los cuales no sólo no tienen valor económico en el contexto en que se generan, sino que suelen provocar problemas ambientales en su eliminación. Usando estos residuos de biomasa como fuente de energía se puede crear una solución ambiental de la disposición de los mismos y crear nuevos incentivos para el crecimiento de cultivos que hasta ahora solo son marginalmente rentables.

- Cultivos energéticos son aquellos dedicados a la producción de biomasa para su utilización energética con fines no alimentarios. Este tipo de cultivos puede crear nuevos incentivos para la agricultura en países que sufren de sobreproducción. Las prácticas de cultivo están relacionadas con especies de rápido crecimiento tales como poplar, sauce o *Miscanthus*, en climas moderados, y caña de azúcar, sorgo dulce entre otras especies en áreas tropicales. Entre los cultivos energéticos en Colombia se encuentran la producción de caña de azúcar y palma de aceite. Las gramíneas potenciales de la región Orinoquía, para su uso como biomasa lignocelulósica son *Barichiaria brizantha* y *Panicum maximum*, actualmente utilizadas como cultivos forrajeros, para alimento animal (Pérez, O., y Pérez, R., 2006) y para la producción de enzimas lignocelulolíticas (Rangel S., 2012).

1.1.2 Composición

La biomasa lignocelulósica está compuesta principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina, compuestos estructurales claves de la pared celular de las plantas como se muestra en la **Figura 1-1**. La celulosa y la hemicelulosa son carbohidratos complejos formados de cadenas largas moléculas de azúcar de 5 y 6 carbonos. La lignina es un polímero complejo no carbohidrato con estructura aromática, que liga la celulosa y la hemicelulosa y le da a la pared celular de las plantas su rigidez. La biomasa lignocelulósica típica seca, está compuesta de carbohidratos en un 75% y lignina en un 25% (NSF, 2008).

Figura 1-1: Estructura de la biomasa lignocelulósica. Fuente: Hector, R., *et al.* (2008).



Diferentes industrias tienen un requerimiento específico de materia prima. Para evaluar el material y su potencial es importante conocer su composición química, principalmente el contenido de celulosa y hemicelulosa. Sin embargo, el conocimiento de la composición de estos materiales es incompleto y varía mucho dependiendo de las condiciones de cultivo y de la especie. A continuación se presentan las composiciones típicas de diferentes biomásas.

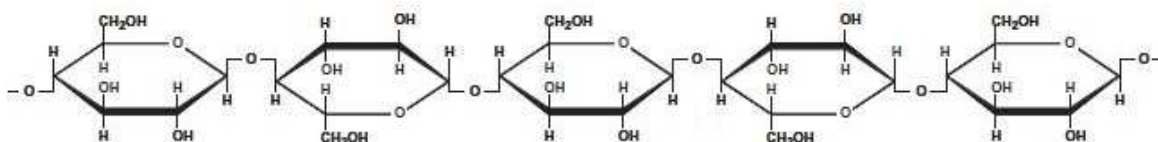
Tabla 1-1: Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina en diferentes biomásas lignocelulósicas en base seca. Adaptado de Sun Y. y Cheng, J. (2002)¹, Klass D., (1998)² y Balat M., (2010)³.

	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)	Extractivos (%)	Referencia
Maderas duras	40-55	24-40	18,25	3-8	1
Maderas blandas	45-50	25-35	25,35	2-5	1
Cáscaras de frutos	25-30	25-30	30-40	-	1
Mazorcas de maíz	45	35	15	-	1
Pastos	25-40	35-50	10-30	-	1
Papel	85-99	0	0-15	-	1
Paja de trigo	30	50	15	-	1
Hojas	15-20	80-95	0	-	1
Semillas de algodón	80-95	5-20	0	-	1
Papel periódico	40-55	25-40	18-30	-	1
Pulpa residuo	60-70	10-20	5-10	-	1
Desechos sólidos primarios	8-15	-	24-29	-	1
<i>Switch grass</i>	45	31,4	12,0	-	1
Bagazo de caña	22	15	11	-	2
Paja de trigo	37-41	27-32	13-15	5-9	2
Tallo de maíz	39-47	26-31	3-5	1-3	3

Celulosa

Es el mayor componente estructural de todas las células de las plantas desde algas hasta arboles, es el compuesto orgánico más abundante de la tierra. Dos ejemplos comunes de estos materiales ricos en celulosa es el algodón y la madera. La molécula de celulosa es una cadena larga de subunidades de D-Glucosa sin ramificaciones con un peso molecular que oscila entre de 50.000 unidades a 1 millón, unidos por enlaces tipo β -1,4 glucosídico, **Figura 1-2**. La resistencia de la celulosa a un proceso de degradación natural es dada mas por la estructura cristalina que presenta y su plegamiento que por los enlaces β -1,4 glucosídico que usa, los cuales son degradados por pocos organismos vivientes.

Figura 1-2: Estructura química de la celulosa. Adaptado de Jacques K. *et al*, (2003).



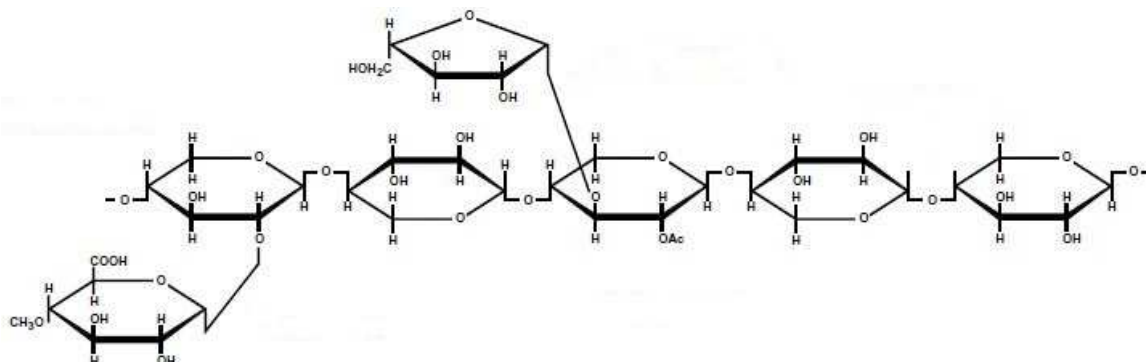
Debido a que, como todo polímero, la cadena de celulosa tiene quiebres, dobleces y extremos libres, la malla cristalina presenta dislocaciones en algunas zonas, llamadas regiones amorfas. Estas regiones constituyen el 15% de la estructura celulósica y al estar más abiertas, son más susceptibles a la hidrólisis que las regiones cristalinas densamente empaquetadas, por lo tanto, la velocidad de hidrólisis es mucho mayor en la celulosa amorfa que en la cristalina (Cunningham, R., y López G., 1994) y fácilmente hidrolizada por los ácidos.

En la estructura de la celulosa ocurren enlaces de puente de hidrógeno entre el hidroxilo C3 y el oxígeno en el anillo piranosico. Estos puentes hacen que la cadena de celulosa se combine dándole cristalinidad y formando largas estructuras las cuales son visibles en microscopio electrónico. La mayor parte de la celulosa está organizada entre una región cristalina altamente organizada, en la cual las fibrillas están estrechamente empaquetadas, tanto así que moléculas de agua apenas si penetran.

Hemicelulosa

La hemicelulosa está constituida por polímeros de unidades de anhidro-azúcares unidas por enlaces glucosídicos, formadas por azúcares de cinco átomos de carbono llamados pentosanos como la D-xilosa y L-arabinosa, y de seis átomos de carbono llamados hexosanos, como D-glucosa, D-manosa y D-galactosa. Además presentan ramificaciones y sustituciones, por lo que no tienen una estructura regular, dándole una conformación amorfa y fácilmente soluble, **Figura 1-3**. A diferencia de la celulosa, la cual siempre tiene la misma estructura y composición, las cadenas de hemicelulosa pueden variar entre especies de plantas. Las cadenas poliméricas individuales contienen de 50 a 100 unidades monoméricas de azúcares (Cunningham, R y López G., 1994).

Figura 1-3: Estructura de la hemicelulosa. Adaptado de Jacques K. *et al*, (2003).



El papel de la hemicelulosa es suministrar la unión entre la lignina y la celulosa. En estado natural existe en forma amorfa con un grado de polimerización que no excede de 200. Esta fracción es fácilmente hidrolizable ya que no presenta estructura cristalina; sin embargo, la xilosa es un azúcar que no pueden consumir muchos tipos de microorganismos (Cunningham, R., y López G., 1994).

Lignina

Es la tercera fracción mayoritaria de la biomasa lignocelulósica. Se trata de un polímero tridimensional amorfo formado por la polimerización deshidrogenativa de unidades de fenilpropano ligadas por diferentes tipos de enlaces que se alternan de manera desordenada.

La lignina de gimnospermas (maderas blandas), está formada mayoritariamente por unidades de tipo guayacilo, mientras que la lignina de las angiospermas leñosas (maderas duras) está formada por unidades guayacilo y sirigilo. Esta alta proporción de unidades derivadas del alcohol sinapílico en las maderas duras determina la estructura y características de este tipo de lignina, ya que la presencia de los dos grupos metóxilo en posiciones 3 y 5 del anillo aromático reduce la formación de enlaces tipo éter y sobre todo los enlaces C-C, lo que se traduce en una reducción del grado de polimerización y en un menor grado de condensación. De esta forma las maderas duras son más fáciles de deslignificar que las maderas blandas. Entre los usos potenciales, la lignina tiene un alto valor en formulación de adhesivos y lubricantes entre otros, comparado con su valor actual y limitado como combustible (Cunningham, R y López G., 1994).

Otros compuestos

Adicionalmente, la biomasa contiene componentes solubles en solventes neutros que representan entre el 4-10% del peso seco de la madera. Hay una gran variedad de compuestos orgánicos como: grasas, ceras, alcaloides, proteínas, fenoles simples y complejos, azúcares simples, pectinas, mucílagos, gomas, resinas, terpenos, etc. Estos compuestos actúan como intermediarios metabólicos, reserva de energía o forman parte

de los mecanismos de defensa contra los ataques microbianos. Además, contribuyen al color, olor y resistencia al marchitamiento (Cunningham, R., y López G., 1994). Los compuestos inorgánicos son determinados como las cenizas, residuos inorgánicos que permanecen después de quemar la biomasa a altas temperaturas; suelen ser menos del 2% de peso seco de la madera (Cunningham, R., y López G., 1994).

1.1.3 Pre-tratamiento de la biomasa

El pre-tratamiento tiene como objetivo desintegrar la matriz de carbohidratos de tal manera que la celulosa reduzca su grado de cristalinidad y aumentar la celulosa amorfa, que es la más adecuada para el posterior ataque enzimático. Adicionalmente, la mayor parte de la hemicelulosa se hidroliza dentro del pre-tratamiento y la lignina es liberada o hasta incluso puede llegar a descomponerse en unidades más elementales.

El pre-tratamiento permite que los rendimientos en la hidrólisis de celulosa aumenten del 20 al 90%. Se han propuesto y desarrollado diferentes métodos físicos, fisicoquímicos, químicos y biológicos (Sun Y. y Cheng J., 2002), pero estos pre-tratamientos no se pueden aplicar de forma genérica por la diversidad de las diferentes materias primas. Por lo tanto es necesario realizar un análisis más detallado de la tecnología para cada caso en particular. La **Tabla 1-2**, presenta un resumen de los diferentes pre-tratamientos con sus ventajas y desventajas y los materiales que han sido utilizados.

Durante el pre-tratamiento se forman junto con los azúcares fermentables una gran cantidad de compuestos inhibitorios que se originan como resultado de la hidrólisis de los ácidos orgánicos esterificados de la hemicelulosa, y de los derivados fenólicos solubilizados de la lignina, aunque también se pueden formar a partir de productos de degradación de los azúcares solubles.

- Pre-tratamiento mecánico

El objetivo del pre-tratamiento mecánico es la reducción del tamaño de partícula y la cristalinidad. La reducción del tamaño de partícula permite incrementar la superficie disponible y la reducción del grado de polimerización (DP). El incremento del rendimiento de la hidrólisis de la matriz de lignocelulosa puede aumentar en muchos de los casos en valores desde 5 al 25%, dependiendo del tipo de biomasa, tipo de molino y la duración de la molienda (Hendriks A. y Zeeman G., 2009).

- Pre-tratamiento con agua caliente

El objetivo de este pre-tratamiento es solubilizar principalmente la hemicelulosa para hacer que la celulosa sea más accesible y evitar la formación de inhibidores. Para evitar la formación de inhibidores es necesario que el pH sea mantenido entre 1 y 7 durante el pre-tratamiento, lo cual minimiza la formación de monosacáridos además de la formación de productos de degradación que pueden catalizar la hidrólisis del material celulósico durante el pre-tratamiento (Hendriks A. y Zeeman G., 2009).

Tabla 1-2: Métodos de pre-tratamiento de biomásas lignocelulósicas. Adaptado de Sanchez O. y Cardona C., 2005.

Métodos	Procedimientos/ Agentes	Observaciones	Ejemplos de materiales
Pre-tratamientos físicos			
Trituración mecánica	Reducción a astillas Trituración, molienda	Molinos: vibratorio de bolas (tamaño final: 0,2-2mm), cuchillas o martillo (tamaño final: 3-6 mm)	Residuos de madera y forestales (paja, madera dura), desechos de maíz, bagazo de caña, alfalfa.
Pirólisis	T>300°C	Formación de productos volátiles y carbón. Residuos de la pirólisis pueden someterse a hidrólisis ácida suave (1N H ₂ SO ₄ , T=97°C, 2,5 h) para producir 80-85% AR (>50% de glucosa). Puede realizarse al vacío.	Madera, algodón de desecho.
Pre-tratamientos físico-químicos			
Explosión a vapor	Vapor saturado a 160-260°C, P=0,69-4,85 MPa por varios segundos o minutos, luego descompresión hasta presión atmosférica.	Altas concentraciones de sólidos. Hidrólisis del 80-100% de la hemicelulosa, destrucción de parte de la xilosa obtenida, formación de inhibidores, se requiere posterior lavado con agua. Al combinarse con H ₂ SO ₄ , SO ₂ , o CO ₂ mejora la eficiencia de la posterior hidrólisis enzimática, disminuyendo inhibidores. Al combinarse con fuentes de nitrógeno aumenta el porcentaje de azúcares solubles. Reducción de tamaño con menor gasto energético comparado con pulverización. Ocurre cierta despolimerización de la celulosa. La lignina se solubiliza muy poco, se redistribuye.	Bagazo, madera blanda, paja de arroz, madera de aspen, madera de eucalipto, tallo de maíz
Agua líquida caliente (LHW)	Agua caliente presurizada, T=170-230°C, 1-46min.	Concentraciones de sólidos <20%. Ocurre cierta despolimerización de la celulosa. Hidrólisis del 80-100% de la hemicelulosa, >50% oligómeros. Solubilización parcial de la lignina (20-50%). Conversión durante la hidrólisis de celulosa >90%. Baja o nula formación de inhibidores.	Bagazo de caña.
Explosión de fibra con amoníaco	Dosis 1-2kg de amoníaco/kg de biomasa seca, 90°C, 30min.	Se requiere recuperación de amoníaco, no produce inhibidores. Conversión durante la hidrólisis de celulosa >90% (bagazo y hierba de Bermuda). Para biomasa con alto contenido de lignina no es muy eficiente (conversión de celulosa <50%). Ocurre cierta despolimerización de la celulosa. Hidrólisis del 0-60% de la hemicelulosa en dependencia de la humedad, más del 90% oligómeros. Ocurre cierta solubilización de la lignina (~10-20%).	Paja de trigo y cebada, cascarilla de arroz, desechos de maíz, switchgrass, residuos sólidos urbanos, papel periódico, alfalfa, astillas.
(AFEX) Explosión con CO ₂	Dosis de 4 kg CO ₂ /kg de fibra, p=5,62 MPa.	Conversión a glucosa durante la hidrólisis de celulosa >75% (alfalfa). No forma compuestos inhibitorios.	Alfalfa, mezcla de papel reciclado, bagazo de caña.
Pre-tratamientos químicos			
Ozonólisis	Ozono, reacción a temperatura y presión ambientales.	Degradación principalmente de lignina. Conversión durante la hidrólisis de celulosa: 57% (aserrín). No se forman inhibidores.	Paja de trigo, bagazo, heno verde, cacahuete, pino, paja de algodón y aserrín.

Tabla 1-2: Continuación

Métodos	Procedimientos/ Agentes	Observaciones	Ejemplos de materiales
Hidrólisis con ácido diluido	H ₂ SO ₄ , HCl, HNO ₃ al 1-5%. Procesos de flujo continuo para baja carga de sólidos (5-10% peso sustrato/peso mezcla) a T=160-200°C; procesos por lotes a alta carga de sólidos (10-40%) a T=120-160°C. Presiones cercanas a 1 MPa.	Hidrólisis del 80-100% de la hemicelulosa, altas conversiones de xilano a xilosa. La alta temperatura es favorable para la hidrólisis de celulosa. Se requiere neutralizar el pH para la posterior hidrólisis enzimática. Ocurre cierta despolimerización de la celulosa. La lignina no se solubiliza o lo hace muy poco, pero se redistribuye.	Desechos de maíz, bagazo de caña, madera de álamo, switchgrass, paja de trigo, astillas de álamo.
Hidrólisis con ácido concentrado	H ₂ SO ₄ al 10-30%, 170-190°C, relación 1:1,6 sólido-líquido. Ácido peracético 21-60%, sistema tipo silo.	Se requiere la recuperación del ácido. Tiempos de residencia mayores que en la hidrólisis con ácido diluido.	Bagazo de caña, aserrín de madera dura.
Hidrólisis alcalina	NaOH diluido, 24 h, 60°C	Remoción de lignina 24-55% para madera dura con contenido inicial de lignina del 20%, difícil remoción para maderas blandas con contenidos de lignina >26%. Hidrólisis de >50% de la hemicelulosa. Sustancial hinchamiento de la celulosa. Conversión durante la hidrólisis de celulosa: 78,2% (paja de arroz), 67,1% (bagazo). Conversión durante la hidrólisis de celulosa: proceso convencional, aprox. 54%; NaOH+H ₂ O ₂ , aprox. 65% (hojas de caña de azúcar).	Madera dura, pajas con bajo contenido de lignina (10-18%), desechos de maíz, bagazo de caña, hojas de caña de azúcar.
Deslignificación oxidativa	Peroxidasa y H ₂ O ₂ al 2%, 20°C, 8h.	Solubilización del 50% de la lignina y de casi la totalidad de la hemicelulosa. Conversión durante la hidrólisis de celulosa: 95% (aserrín).	Bagazo de caña.
Proceso de solventes orgánicos	Solventes orgánicos (metanol, etanol, acetona, etilenglicol, trietilenglicol, entre otros) o su mezcla con 1% de H ₂ SO ₄ o HCl. 125-185°C sin adición de catalizadores	Ruptura de la lignina interior y de las uniones de hemicelulosa. Solubilización casi total de la lignina. Hidrólisis casi total de la hemicelulosa. Altos rendimientos de xilosa. Recuperación de solventes y su remoción del sistema para no inhibir los procesos biológicos subsiguientes.	Madera de álamo.
Pre-tratamientos biológicos			
Pretratamiento con hongos	Hongos de la pudrición blanca, blanda y parda. Producción de celulasas por fermentación en sustrato sólido.	Los hongos producen celulasas, hemicelulasas y enzimas degradadoras de lignina: ligninasas, lignin-peroxidasas, polifenoloxidasas, lacasas y enzimas reductoras de quinonas. Proceso muy lento: <i>Pleurotus ostreatus</i> convierte el 35% de la paja de trigo en azúcares reductores en cinco semanas. Hongos de la pudrición parda degradan celulosa Hongos de la pudrición blanca y blanda degradan celulosa y lignina.	Paja de trigo, desechos de maíz, tallo de crisantemo y rosa

Si ocurre la degradación catalítica de los azúcares esta produce una serie de reacciones difíciles de controlar las cuales forman productos indeseables. A diferencia del pre-tratamiento de explosión con vapor, la cantidad de productos solubilizados aumenta mientras que la concentración de estos productos es más baja, debido a que se usan mayores cantidades de agua en este proceso.

Este pre-tratamiento tiene la ventaja que los compuestos solubilizados provenientes de la hemicelulosa y la lignina están presentes en bajas concentraciones cuando se compara con el tratamiento con explosión con vapor, debido a que presenta una más alta entrada de agua. Por lo tanto el riesgo de la degradación a productos como el furfural y la concentración y precipitación de compuestos de lignina es reducido.

1.1.4 Usos de la biomasa residual

La refinación de biomasa ha sido propuesta como la etapa más crítica en el proceso de producción de fracciones de alto valor agregado de materias primas biológicas, particularmente de origen agrícola (Papatheofanous, M. *et al*, 1995). Una evaluación del uso de biomasa como materia prima en una biorefinería requiere conocimientos básicos del tipo y las fuentes adecuadas de biomasa además de su composición, características y desarrollo. La aplicación potencial de estos residuos incluye la generación de energía, la producción de carbón activado, la producción de biomasa microbiana y la producción de papel. Sin embargo, excepto por el bagazo, el cual es utilizado como combustible sólido para la generación de energía, en la producción de pulpa y papel y en la manufactura de forrajes, los otros materiales tienen un bajo valor económico y son principalmente abandonados o quemados causando problemas ambientales. Por lo tanto, ellos pueden ser considerados como materias primas potenciales para la producción de químicos de interés económico y social.

Usando específicamente biomasa residual como fuente de energía se puede crear una solución ambiental de la disposición de los mismos y crear nuevos incentivos para el crecimiento de cultivos que hasta ahora solo son marginalmente rentables. Un ejemplo lo encontramos en la floricultura, una industria que se ha destacado a nivel nacional por su innovación y su importante contribución económicas al país, la cual tiene entre sus retos actuales el mantenimiento del bienestar de la población vinculada al proceso productivo y la minimización de los efectos sobre el medio ambiente (Fedecolflorex, 2010). La investigación se ha enfocado principalmente con miras a utilizar los residuos que quedan al finalizar la cadena productiva de los cuales los vegetales corresponden aproximadamente al 85% de los residuos sólidos generados, especialmente los tallos, un material lignocelulósico sujeto a ser utilizado como materia prima para el desarrollo de productos con un alto valor agregado.

Según Pizano M, (1997), en la floricultura se genera una gran cantidad de desechos dada la cantidad de insumos usados, la intensidad y la naturaleza de las labores propias del cultivo. Estos residuos se clasifican en vegetales, líquidos y sólidos. Los vegetales,

producto de las labores diarias del cultivo como lo son la poda, desbotone, despunte y cosecha, pueden ser utilizados en compostaje llegando hasta la producción de humus. Este proceso tiende a ser prolongado en clavel, pero puede acelerarse picando el residuo y añadiendo microorganismos que contribuyan a abreviar la descomposición. El humus obtenido del compostaje del clavel específicamente no debe ser devuelto a los suelos donde se cultive esta flor debido a que se puede infectar con *Fusarium oxisporum*, causante de la marchitez vascular. Otro posible manejo de este residuo es en relleno sanitario, lo cual debe cumplir con determinadas especificaciones para que los efluentes no se viertan o se infiltren en fuentes de agua.

1.2 Género *Trichoderma*

Las especies del género *Trichoderma* son abundantes en la naturaleza y se encuentran frecuentemente en material en descomposición en el suelo, en donde comprenden una porción significativa de la biomasa total de hongos (Osono T., 2005), atacan superficialmente y son los primeros colonizadores de la madera (Carlile M. *et al*, 2001). El género *Trichoderma*, según Samuels G.J, *et al.* (2012), agrupa alrededor de 80 especies, basados en datos moleculares que incluyen hasta 100 especies, en su mayoría asociadas a estados telomórficos en los géneros *Hypocrea* y *Podostroma*. El género *Trichoderma* se clasifica dentro de la división Ascomycota, como hongos generalmente adaptados al medio terrestre, serie Peritecial, orden Hypocreales (Garcés E. *et al*, 2003).

Su principal uso en el comercio mundial se deriva de su alta capacidad celulolítica, la especie *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) es el organismo celulolítico mas extensamente empleado en el mundo (Kovoivula A. *et al.*, 1998). *Trichoderma* es también un eficiente degradador de heteropolisacáridos como el xilano, mediante la producción de diversas hemicelulasas, igualmente de amplio uso industrial (Biely y Tenkanen, 1998) y algunos aislamientos son agentes de bioremediación, ya que degradan algunos pesticidas de alta persistencia en el ambiente (Cross, 1999). Todos los anteriores usos se deben a su capacidad de producción de enzimas y metabolitos.

Kovoivula *et al.*, 1998 reporta algunos de los principales grupos de enzimas de los cuales las celulasas (E.C.3.2.1.4) son el grupo más representativo, ya que su uso industrial es bastante extenso, de las 11 familias conocidas se han encontrado 5 producidas por aislamientos de *Trichoderma*, principalmente *T. reesei*. También se hallan presentes enzimas como las hemicelulasas que hidrolizan polisacáridos de plantas no celulósicos e incluyen las xilanasas y mananasas de importancia en la industria papelera.

En cuanto a metabolitos secundarios se reporta una amplia variedad de sustancias con actividad antifúngica (ácido fenílico, 6 pentil α pirona, viridofunginas y harzianopiridona), antisépticos (ácido fenílico, antraquinona, harzianodiona y gliotoxina), reguladores de crecimiento en plantas (cicloneodiol, harzianopiridona y 6 pentil α pirona), péptidos antimicrobianos e incluso compuestos fitotóxicos como el viridiol, además de otros con potenciales usos en farmacopea por ser antitumorales e inmunomoduladores

(harzianodiona y gliotoxina) y metabolitos no clasificados inhibidores de la síntesis de virus y melanina (Hoyos L, *et al.*, 2009)

El género *Trichoderma* ha sido estudiado para la producción de enzimas y otros metabolitos, así como para su explotación como efectivos agentes de control biológico. Se han realizado estudios de diversidad biológica de 183 aislamientos de México, Guatemala, Panamá, Ecuador, Perú, Brasil y Colombia (Hoyos-Carvajal L., 2009). En este estudio se encontró una alta diversidad de especies que comprende 29 taxones donde *T. asperellum* es la especie predominante, representada por dos genotipos distintos con diferentes perfiles metabólicos y preferencias de hábitat. La segunda especie predominante, *T. harzianum*, estuvo representada por tres genotipos diferentes.

1.2.1 Morfología

Las células de los hongos poseen un núcleo diferenciado y organelos citoplasmáticos rodeados por membranas con una pared celular rígida. La mayoría de los hongos tienen estructuras vegetativas filamentosas llamadas hifas, las cuales crecen en forma de largos brazos en toda dirección, uniformemente, y delgadas con diámetros de 1 a 2 μm . El conjunto de hifas es denominado micelio, su crecimiento es polarizado, ocurre en el ápice de la hifa, proliferando a lo largo y a través del sustrato. En su reproducción asexual, lo típico es que se formen un gran número de células especializadas llamadas esporas (Garcés E. *et al*, 2003).

Dependiendo de la especie, estos hongos presentan diferentes características morfológicas que sirven para la identificación. Un resumen de estas características se encuentra consignado en la **Tabla 1-3** para los géneros *T.reesei* y *T. asperellum*.

Al terminar su desarrollo, *Trichoderma* se caracteriza por estar formado de micelio septado, multiramificado que termina en una esterigma que desprende conidios verde brillantes (Fraizer W.C., 1980).

Algunos géneros de hongos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Fusarium*, tienen una célula especializada llamada fiálide, la cual forma fialoconidias. Cada fiálide produce un número de conidias delimitada cada una por un septo, originando una cadena que facilita la dispersión (Garcés E. *et al*, 2003).

1.3 Celulasas

1.3.1 Características

Las celulasas son glicoproteínas que no requieren cofactor en la actividad enzimática. Ellas pueden ser refrigeradas o congeladas por años sin una pérdida significativa de actividad. Sin embargo, el uso de celulasas mesófilas en condiciones de reacción óptimas (50°C y pH 4.8) resulta en una pérdida significativa de su actividad. En

contraste, las celulasas obtenidas de microorganismos termófilos permanecen estables y activas a temperaturas que exceden los 50°C (Himmel, M., 1994).

Tabla 1-3: Características de *T. asperellum* y *T.reesei* . Adaptado de (Samuels, G.J et al, 2012)

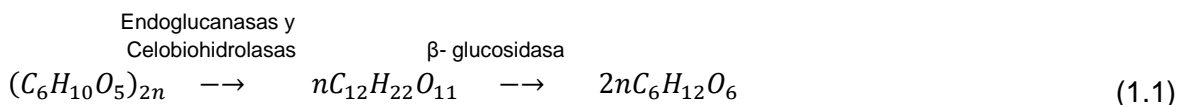
	<i>T. asperellum</i>	<i>T.reesei</i>
Conidias		
Relación Longitud/Ancho	1.2-1.5, <1.2	1.2-1.5, 2.1-2.4
Ornamentación	Finamente rugosa	Lisa
Forma	Elipsoidal	Elipsoidal
Ancho (µm)	2.7-3.2, 3.2-3.6, 3.6-4.0	2.2-2.7, 2.7-3.2
Conidioforo	Con largos ejes centrales; ramificaciones laterales en parejas; con fiálides	Con largos ejes centrales; fiálides derivadas por separado en largas distancias
Clamidosporas		
Forma	--	Solitarias
Presencia	Ausente, presente	Presente
Ancho µm	2.1-5.2, 5.2-8.3, 8.3-11.4	5.2-8.3, 8.3-11.4
Cultivo		
Crecimiento en PDA a 40C	No crecimiento después de 72 h	Radio de la colonia > 5 mm después de 72 h
PDA, radio a 35C después de 72 h en oscuridad	2-19, 20-37	38-55
SNA, radio a 35C después 72 h en oscuridad	18-32, 2-17, <2	44-63

Las celulasas son una entidad multicomponente con una composición variable dependiendo de la fuente de obtención. Está compuesta principalmente de:

- 1,4-β-D-glucano glucanohidrolasas (endoglucanasas, EC 3.2.1.4)
- 1,4-β-D-glucano celobiohidrolasas y 1,4-b-D-glucano glucohidrolasas (exoglucanasas, EC 3.2.1.91 y 3.2.1.74)
- β-D-glucosida glucohidrolasas (b-glucosidasas, EC 3.2.1.21)

En el mecanismo de acción de las celulasas, las endoglucanasas actúan hidrolizando las uniones β-1,4-glicosídico de las moléculas de celulosa; ellas no atacan la celobiosa pero hidrolizan celodextrinas y celulosas sustituidas tales como carboximetil (CM)- e hidroxietil (HE)- celulosa. Las exoglucanasas en general actúan sobre los extremos no reducidos de la cadena de celulosa, liberando moléculas de celobiosa, aunque también pueden liberar glucosa (Kubicek C. 1992). Las β-glucosidasas muestran una gran actividad sobre oligómeros solubles de bajo peso molecular. No hidrolizan celulosas insolubles o

sus derivados solubles (Cunningham, R., y López G., 1994). El esquema general de reacción se presenta a continuación.



El hongo *T. reesei* (*Hypocrea jecorina*) se ha encontrado como un productor eficiente de enzimas xilanólíticas (xilanasas) y celulolíticas (celulasas). Produce al menos cuatro β -1,4-xilanasas (XYNI, XYNII, XYNIII, XYNIV), dos celobiohidrolasas (CBHI, CBHII), cinco endo- β -1,4-D-glucanasas (EGI, EGII, EGIII, EGIV, EGV) y dos β -D-glucosidasas (BGLI, BGLII) (Kubicek, C., 1992).

Se ha encontrado que *Trichoderma* produce una enzima llamada “hinchadora” la cual rompe enlaces de hidrogeno causando la hidratación de la molécula e hinchamiento, ayudando a la degradación (Carlile M., *et al*, 2001). Las celulasas tales como las celobiohidrolasas y las endoglucanasas comparten un mismo patrón estructural, dividido en tres regiones o dominios, un sitio de enlace, un sitio activo separado, y una región de conexión flexible que permite a la enzima actuar a una distancia del punto de contacto de la molécula de celulosa.

Cuando por medio de ingeniería genética se remueve el sitio activo de la celulasa, la enzima permanece activa, presentando el rompimiento de pequeños polímeros de glucosa, pero pierde en gran proporción la habilidad de atacar la celulosa insoluble. Cambios en la estructura terciaria de la enzima, dados por pequeñas diferencias entre los aminoácidos, pueden ocasionar que celulasas homólogas puedan desarrollar diferentes funciones en organismos relacionados. Se ha encontrado que la celobiosa induce la síntesis de celulasas en *Trichoderma reesei*. Usualmente la más alta actividad de las enzimas de *Trichoderma* se presenta a un pH ~ 5 y temperaturas < 55°C (Whitaker J., *et al*, 2003).

En cuanto a la regulación de la formación de las celulasas, debido a que la celulosa es un sustrato insoluble en medio acuoso, la celulosa no puede penetrar la pared celular, así que no puede ser un componente inductor. Sin embargo especies del género *Trichoderma* contienen celulasas localizadas en la superficie de los conidios, lo cual parece estar envuelto en el ataque inicial de la celulosa. Los productos iniciales de la degradación pueden ser tomados por el micelio o ser hidrolizados por β -glucosidasa (Kubicek C. 1992).

1.3.2 Usos

El interés en el uso de celulasas y xilanasas comenzó alrededor de la década de los 50, debido al potencial encontrado en la conversión de biomasa en glucosa y otros azúcares solubles. Esta actividad enzimática tiene aplicaciones en la industria textil (procesos *biostoning* y *biopolishing*) para dar apariencia de desteñido a las prendas, también es un

componente de los detergentes, en la industria papelera se usa en el blanqueamiento de pulpas, en la industria alimenticia se utiliza en la extracción de jugos de frutas y verduras, en la filtración de mostos y en la extracción de aceites comestibles. Además, se usa en la hidrólisis parcial de materiales lignocelulósicos para mejorar la digestión de rumiantes (Ponce T. y Pérez O., 2002).

En una biorefinería con lignocelulosa como materia prima, se busca utilizar las tres fracciones químicas, hemicelulosa, celulosa y lignina de una manera integral, proponiendo que la materia prima sea inicialmente limpiada y desglosada en las tres fracciones vía digestión química o hidrólisis enzimática. Es aquí donde el papel de las celulasas, y demás enzimas producidas por hongos del género *Trichoderma* y otros microorganismos cobran importancia. La glucosa producida a partir de esta hidrólisis de la biomasa puede ser usada para la producción de etanol, ácido acético, acetona, butanol, ácido succínico y otros productos de fermentación; así como hidrógeno, metano y propanol por medio de una conversión vía microbiana de azúcar (Sandun F. *et al*, 2006).

La hidrólisis enzimática de biomasa es típicamente llevada a cabo a pH 5 y 50°C por un periodo de tiempo entre 24-120 h (Merino S. y Cherry J., 2007). La cantidad y los tipos de enzimas requeridas para la sacarificación de la celulosa y la hemicelulosa dependen de la biomasa a ser hidrolizada y del tipo y la severidad del pre-tratamiento que se le haya realizado a la biomasa. La selección de una u otra biomasa, depende de la viabilidad local y la economía del suministro. La variación en la severidad del pre-tratamiento, definida como la combinación entre la temperatura, acidez, y duración del pre-tratamiento, puede llegar a maximizar la compatibilidad en la fermentación.

1.3.3 Medición de actividad enzimática

Un experimento típico para medir la velocidad de una reacción catalizada por una enzima, consiste en mezclar soluciones de sustrato y de enzima pura apropiada, tiempo cero, en condiciones isotérmicas, con una solución amortiguadora (buffer) para controlar el pH. Las concentraciones de sustrato y producto son registradas en diversos momentos, mediante técnicas espectrofotométricas, manométricas, polarimétricas entre otras (Duarte A., 1993).

La actividad enzimática específica se suele expresar de diferentes maneras. En unidades enzimáticas arbitrarias por mg, donde la unidad enzimática está relacionada con la descomposición o formación de cierto sustrato o producto en cierto tiempo, en términos de la velocidad constante de reacción por mg de enzima, o como las μ moles de un sustrato reaccionando por minuto, por mg de enzima. Una unidad (U) de una enzima es definida como la cantidad que catalizara la transformación de 1 μ mol de sustrato por minuto (Dixon M y Webb E., 1979).

Tabla 1-4: Métodos para la determinación de actividades enzimáticas.

Nombre	Cuantificación	Sustrato	Referencia
FPA	Celulasa total	Papel de filtro Wathman No. 1	NREL (2008)
CMCasa	Endoglucanasa	Carboximetil celulasa	Busto M.D. 1996; Zhang Q. <i>et al.</i> , 2007.
Avicelasa	Exoglucanasas	Avicel®	Rocky-Salimi y Hamidi-Esfahani, 2010; Ooshima H. <i>et al.</i> , 2004.
β-glucosidasas	β-glucosidasas	p-nitrofenil-α-D-glucopiranosida	Chandra, M., <i>et al.</i> (2010)
	Endoglucanasa	Azo-CM-celulosa	Olsson, L., T. M. I. E. Christensen, <i>et al.</i> (2003).

En el caso de las celulasas diversos autores han propuesto el análisis de los diferentes componentes del complejo enzimático (Tabla 1-4). Muchas reacciones enzimáticas son seguidas retirando muestras en intervalos y estimando el sustrato o producto por métodos químicos y espectrofotométricos, como es el caso de FPA (Filter paper Activity, por sus siglas en inglés), la cual es cuantificada por medio de la detección espectrofotométrica.

1.3.4 Producción

Los procesos de obtención de celulasas consisten en la utilización de un microorganismo que tenga la habilidad de sintetizar fácilmente las enzimas y un sustrato inductor que promueva la formación del complejo enzimático. Entre los hongos más utilizados en la producción de azúcares fermentables se encuentran las especies *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Schizophyllum* y *Penicillium*, aunque también se pueden utilizar bacterias degradadoras como es el caso de las *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermomonospora* entre otros (Sun, Y. y Cheng, J., 2002). En la **Tabla 1-5** se encuentran consignados algunos de los microorganismos utilizados para la producción de celulasas. De entre todos los géneros de hongos el más estudiado es *Trichoderma*, ya que contiene un sistema enzimático con tres clases de enzimas las cuales actúan sinérgicamente para degradar la celulosa a glucosa (Reczey, K., 1996) y es utilizado actualmente en otros países para la producción industrial de enzimas.

Actualmente se ha propuesto un modelo generalizado de regulación de la producción de celulasas, el cual se propone que es controlado por dos mecanismos (Ponce T. y Pérez O., 2002). Por un lado, se encuentra la inducción por sustratos naturales, como celulosa y por otro lado la represión por fuentes de carbono de bajo peso molecular como glucosa y celobiosa. El modelo además sugiere la existencia de un nivel basal de enzimas. Inicialmente el microorganismo sintetiza y exporta a su superficie celular bajas cantidades de enzimas, las cuales inician la hidrólisis del sustrato y producen

oligosacáridos que entran a la célula, convirtiéndose en los verdaderos inductores que encienden la transcripción de los genes respectivos.

Las tecnologías basadas en celulasas se han centrado en la investigación de su actividad, pero actualmente se encuentra una tendencia a buscar sustratos adecuados y sostenibles para su producción. El sustrato lignocelulósico debe ser económico, fácilmente procesable y viable en grandes cantidades y su composición debe ser adecuada tanto para hidrólisis como para la producción de enzimas celulolíticas. La producción de las enzimas *in situ*, en vez de utilizar enzimas comerciales puede mejorar la economía del proceso global (Juhász T. *et al*, 2005).

Tabla 1-5: Principales microorganismos productores de celulasas

Microorganismo	Sustratos	Escala	Productividad	Referencia
<i>Cellulomonas Biazotea</i>	Bagazo, tallo de algodón, paja de trigo, celobiosa, cmc y papel de filtro	1 L	37.5 IU/L/h en CMC , 17.5 IU/L/h FPAsa	Ibrahim M. y Malik K., 1996
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Paja de trigo, bagazo, paja de arroz	Fermentación en estado sólido	240 U/ g sustrato endoglucanasa, 9.73 FPAsa	Soni R. <i>et al</i> , 2010
<i>Acremonium cellulolyticus</i>	Paja de arroz	Matraz	10.8 U/mL en papel de filtro	Hideno A. <i>et al.</i> , 2011
<i>Penicillium echinulatum</i>	Bagazo de caña, salvado de trigo	Fermentación en estado sólido	32.9 U/dm/g en papel de filtro	Camassola M y Dillon A.J.P., 2007
<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. nidulans</i>	Jacintos de agua	250 mL	0.9 U/mg CMCasa, y 0.8 U/mg proteína en Avicelasa	Usama F. <i>et al.</i> , 2008
<i>Aspergillus niger MS82</i>	CMC de baja densidad	Matraz	0.3 U/mL endoglucanasa	Sohail M. <i>et al.</i> , 2009
<i>Neurospora crassa</i>	Paja de trigo	Matraz	FPase 1.33 U/mL, CMCasa 19.7 U/mL, BGL 0.58 U/mL	Singhania R. <i>et al</i> , 2010
<i>Trichoderma reesei</i>	Sauce pretratado	Fermentador 22 L	FPase 108 U/g celulosa	Reczey, K. <i>et al</i> 1996
<i>Trichoderma reesei RUT C30</i>	Avicel®	Fermentador	FPase 1.8 U/mL	Weber J y Agblevor F.A., 2005

A nivel mundial, la industria está desarrollando cocteles de enzimas cada vez más eficientes, como es el caso de Genencor, que ha lanzado al mercado *Acellerase Trio*, el cual permite que por medio de una baja dosificación, con un coctel de enzimas que realizan el rompimiento de los polímeros de azúcares de 5 y 6 carbonos que contengan la biomasa hacia azúcares fermentables, incrementando el rendimiento de etanol por unidad de materia prima. La industria Fermoc, una compañía dedicada a la fermentación y la síntesis ubicada en Ciudad de México, realizó el escalado exitoso a 20.000 litros de

producción de celulasas basándose en la tecnología *Codexis CodeEnvolver*, tecnología de evolución directa (Biofuels Intenational, 2011). En la **Tabla 1-6** se presentan algunas de las celulasas que existen comercialmente, junto con su actividad en papel de filtro (FPA) y el microorganismo de origen.

Tabla 1-6: Ejemplos de celulasas comerciales

Nombre comercial	FPA/mL	Proveedor	Fuente
Novozymes 188	<5	Novozymes	<i>A. niger</i>
Multifect CL	64	Genencor Intl. (S. San Francisco)	<i>T. reesei</i>
Spezyme CP	49	Genencor	<i>T. longibrachiatum/T. reesei</i>
GC 220	116	Genencor	<i>T. longibrachiatum/T. reesei</i>
Cellulase TAP106	0.42	Amano Enzyme (Troy VA)	<i>T. viride</i>

La alta carga de enzima requerida para la hidrólisis de sustratos, combinados con el bajo valor del producto final, por ejemplo etanol, requiere que la enzima sea lo más eficiente posible, pero con un costo tan bajo como sea permitido. Esfuerzos significativos se han puesto para incrementar la productividad de los hongos usados para la producción de enzimas, reducir el costo de proceso de fermentación de enzimas reduciendo el costo de las fuentes de carbono y nitrógeno y reducir la complejidad de los procesos de recuperación y formulación de la enzima (Merino S. y Cherry J., 2007).

Las fuentes de carbono naturales para la producción de las enzimas, xilano y celulosa, son usualmente reemplazadas por lactosa en el medio de producción industrial. La lactosa promueve un buen crecimiento e induce eficientemente la producción de las enzimas hidrolíticas. La glucosa no es adecuada para la producción de estas enzimas, debido a la fuerte represión del gen que este azúcar produce (Xiong, H. *et al.*, 2004).

El efecto de la composición del medio de cultivo en el crecimiento, la morfología del micelio y la producción de enzimas ha sido estudiado, encontrándose que cuando la morfología del hongo es mejor controlada, la productividad puede incrementarse, al relacionarse que el número de secciones en las hifas son fuertemente influenciadas con los nutrientes viables en el medio de cultivo (Ahamed, A. y Vermette, P., 2009).

En Juhász, T. *et al.*, (2005) analizan la producción de celulasas y hemicelulasas con diferentes fuentes de carbono como celulosa, rastrojo de maíz pretratado, madera dura y blanda pretratada, sauce y abeto. Luego de caracterizar el complejo enzimático obtenido, su potencial es evaluado en una hidrólisis. Los sustratos fueron evaluados por su aplicabilidad en la hidrólisis y en la producción enzimática. Ellos obtuvieron, que el rastrojo de maíz es un sustrato adecuado tanto para la producción enzimática como para la hidrólisis. En fermentación en cultivos sumergidos se ha utilizado como materia prima madera de sauce (Reczey, K., 1996), celulosa (Ahamed, A. y Vermette, P., 2008); glucosa, CMC y tusa de maíz (Ahmed, S. *et al.*, 2009); bagazo de caña y paja de arroz (Sukumaran, R., 2009), pulpa de remolacha (Olsson L. *et al.*, 2003) en diferentes escalas

de producción. En la **Tabla 1-5** se presentan otras opciones de sustratos utilizados para la producción de celulasas. Entre los inductores de la actividad enzimática, se encuentran el Tween 80 (Liu J, *et al.* 2006; Dominges F.C., *et al.*, 2000) y los microelementos (Wen Z. *et al.*, 2005a).

1.4 Planteamiento del problema

Para desarrollar una alternativa sostenible en la utilización de residuos agroindustriales como tallo de clavel, para la producción de diferentes químicos derivados de los azúcares, junto con el desarrollo de un proceso que permita obtener un complejo enzimático con las características necesarias para hidrolizar los mismos, se propuso como objetivo general de esta tesis producir enzimas celulolíticas a partir de *Trichoderma asperellum* utilizando tallo de clavel como principal fuente de carbono.

Para el cumplimiento de este objetivo, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Determinar las características morfológicas de la cepa *T. asperellum* y verificar su actividad celulolítica en medio sólido.
- Caracterizar la biomasa lignocelulósica en cuanto a su contenido de azúcares estructurales, lignina y cenizas.
- Seleccionar las mejores condiciones de cultivo del hongo *T. asperellum* para la producción del complejo enzimático por medio de ensayos a nivel matraz evaluando la concentración de inóculo, proporción de carbono y nitrógeno y el tiempo de incubación.
- Determinar el efecto de la realización del pre-tratamiento con ácido sulfúrico diluido y con agua caliente en la producción de enzimas celulolíticas.
- Determinar el efecto de los macro y micro elementos del medio de cultivo propuesto sobre la actividad celulolítica de *T. asperellum*.

2. Metodología

2.1 Estudios preliminares

2.1.1 Identificación de los microorganismos de trabajo

La cepa a trabajar en el desarrollo de esta tesis fue *Trichoderma asperellum* C1, una de las cepas aisladas del proyecto “Hidrólisis de residuos lignocelulósicos derivados de la explotación de la palma de aceite hasta azúcares fermentables”, realizado por la Universidad Nacional de Colombia en consorcio con la Universidad Jorge Tadeo Lozano.

La cepa utilizada en este trabajo como control positivo de producción de enzimas celulolíticas, *Trichoderma reesei* Simmons NRRL 3652 ATCC 56763, fue obtenida de la colección de cultivos del Servicio de Investigación en Agricultura (ARS por sus siglas en inglés) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Se realizó la activación de la cepa colocando el contenido del tubo en 8 mL de una solución de Tween 80 al 0.1%, y posterior siembra en caldo nutritivo y en medio sólido PDA (Agar Papa Dextrosa), un medio rico en nutrientes favorable para el crecimiento y el desarrollo de hongos que contiene extracto de papa 4.0 g/L, glucosa 20.0 g/L, agar 15.0 g/L, a un valor de pH de 5.6.

Para conocer como es el crecimiento de los microorganismos se comenzó por el cultivo en PDA de una punción de hongo por medio de un asa recta en el centro del agar. Se realizaron observaciones en el tiempo de incubación con el fin de determinar el día de crecimiento de micelio en el medio sólido y el día de esporulación. Se realizó un stock de trabajo de cada una de las cepas utilizando la metodología presentada en el **Anexo A**.

Para verificar la actividad celulolítica en medio sólido se realizó un crecimiento de *T. asperellum* utilizando como fuente de carbono CMC a 10 g/L y un medio de sales presentado en la Tabla 2-1 y el revelado de la actividad con coloración usando rojo congo (Pedroza A. *et al.*, 2007).

Tabla 2-1: Composición del medio sólido para la producción de celulasas

Compuesto	Concentración [g/L]
Extracto de levadura	2.5
Peptona	2.5
Sulfato de calcio	0.5
CaCl ₂ *2H ₂ O	0.5
KH ₂ PO ₄	0.1
K ₂ HPO ₄	0.1
Agar	15.0

2.1.2 Caracterización fisicoquímica de la biomasa

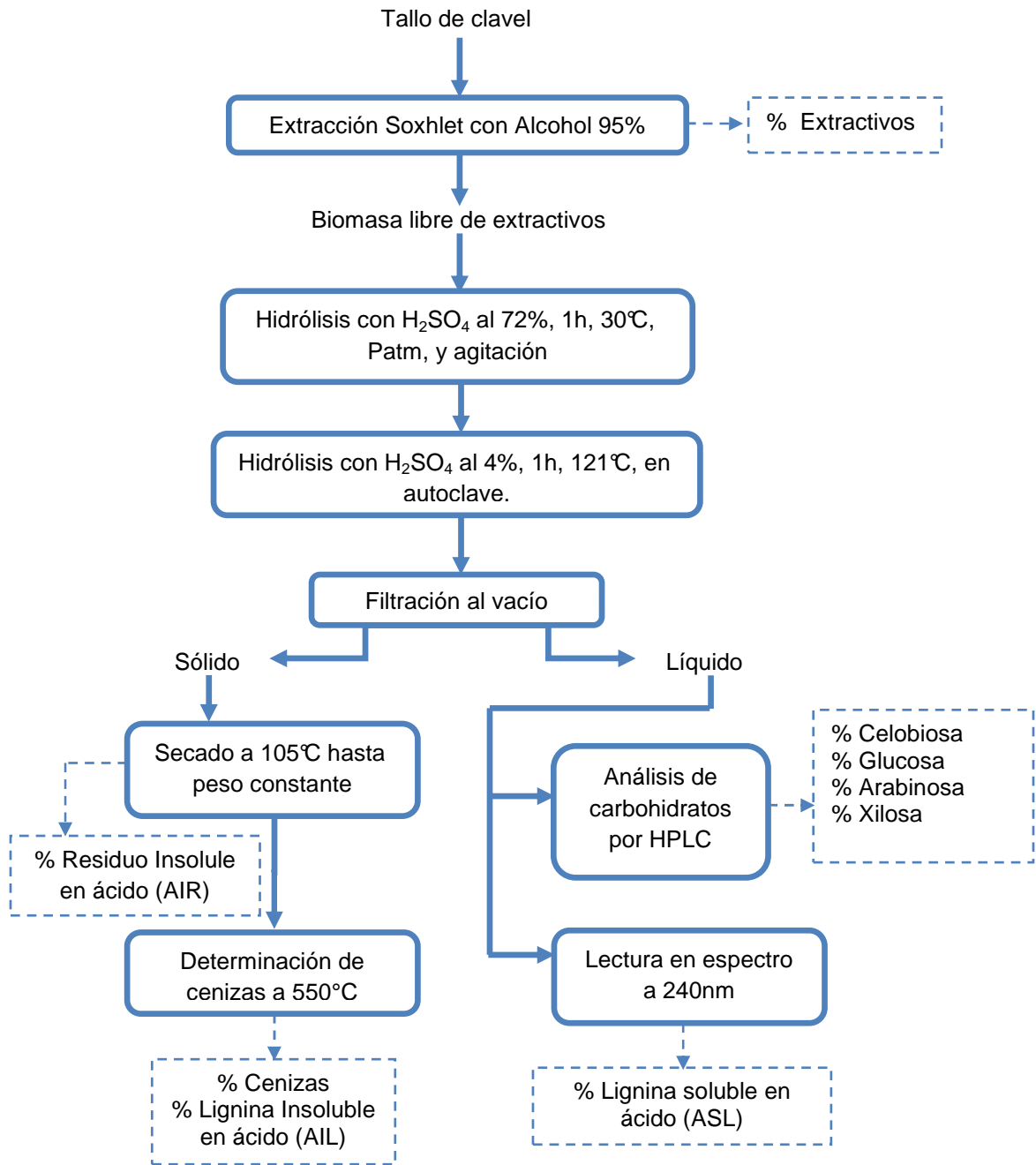
La biomasa lignocelulósica utilizada en el desarrollo experimental de esta tesis fue tallo de clavel molido, obtenido de los residuos de cultivos de flores de la empresa Flor América ubicada en la Sabana de Bogotá, los cuales fueron previamente secados y luego procesados en molino de martillo con una criba de 0.5 mm de diámetro. Actualmente, este tipo de residuo no tiene un uso definido y su acumulación en los campos de producción de flores genera un impacto ambiental negativo. Además estos residuos son conocidos por tener bajos contenidos de lignina, facilitarían su utilización en la cadena productiva, permitiendo mayor accesibilidad a la celulosa y la hemicelulosa.

El tallo de clavel fue analizado por el Laboratorio de Nutrición Animal, de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, con el fin de determinar cuál es el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina. La metodología reportada en el análisis consiste en la determinación de la fibra insoluble ácida e insoluble neutra. Adicionalmente, fue analizado en cuanto a sus componentes elementales por el Laboratorio de suelos de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia. Las metodologías utilizadas para caracterización de la biomasa por estos dos laboratorios se encuentran consignadas en el reporte adjunto en el **Anexo B**.

Se realizó una caracterización fisicoquímica de la biomasa para determinar los carbohidratos estructurales de la biomasa, y así calcular rendimientos de hidrólisis, después de los diferentes tratamientos y procesos, ver **Figura 2-2**. Esta metodología de caracterización ha sido utilizada por diferentes investigadores (Moxley G. *et al*, 2008; Martín C. *et al*, 2006).

Se analizó el porcentaje de humedad, porcentaje de extractivos, contenido de azúcares, cenizas, y tamaño promedio de partícula. La caracterización química de la biomasa a utilizar se realizó siguiendo las normas estandarizadas, sólidos totales ASTM E-1756-08, cenizas ASTM E-1755, extractivos ASTM E1690-08, carbohidratos estructurales y lignina NREL/TP-510-42618. Los experimentos fueron realizados por duplicado.

Figura 2-1: Procedimiento secuencial para la caracterización de la biomasa



La determinación de sólidos totales se llevó a cabo utilizando el procedimiento B de la norma, el cual consiste en la utilización de un analizador de humedad infrarrojo. Para la determinación de cenizas, las muestras fueron incineradas por 4 horas a 550°C. Los extractivos fueron determinados gravimétricamente después de una extracción Soxhlet con etanol al 96% en reflujo durante 24 horas. Para la determinación de los carbohidratos

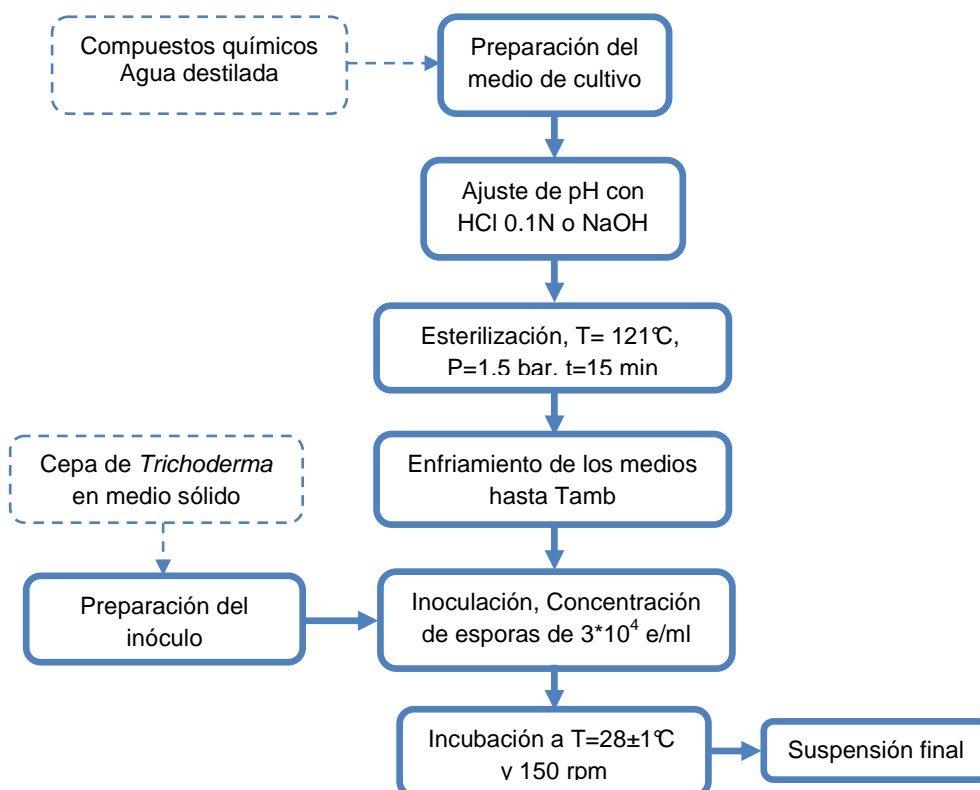
y la fracción de lignina 300 mg de material libre de extractivos fue hidrolizado con H_2SO_4 en un proceso de dos etapas.

La mezcla fue separada a través de filtración al vacío en papel de filtro cuantitativo, con tamaño de $12\ \mu m$ - $15\ \mu m$ previamente pesado y la fracción de lignina fue determinada gravimétricamente. Se cuantificó adicionalmente la lignina soluble en ácido por medio de una determinación espectrofotométrica a 240 nm, longitud de onda sugerida por la norma para materiales como el bagazo de caña entre otros. La caracterización de los azúcares estructurales se realizó utilizando una columna Biorad Aminex HPX-87H, el procedimiento detallado utilizado se encuentra consignado en el **Anexo E**. Para la verificación de la técnica de caracterización de azúcares estructurales y lignina, se analizó cuesco de palma como control positivo, encontrándose resultados de porcentajes de lignina mayores al 50%, en concordancia con lo reportado para este tipo de materiales (Datos no mostrados).

2.1.3 Metodología para la producción enzimática en medio sumergido

Para la realización de los ensayos de fermentación se utilizaron matraces de 250 mL, con 50 mL de volumen de trabajo. Los ensayos se llevaron a cabo en agitación orbital con una velocidad de 150 rpm, a $28\pm 1\ ^\circ C$ y en oscuridad.

Figura 2-2: Procedimiento para la preparación del medio de cultivo y su inoculación



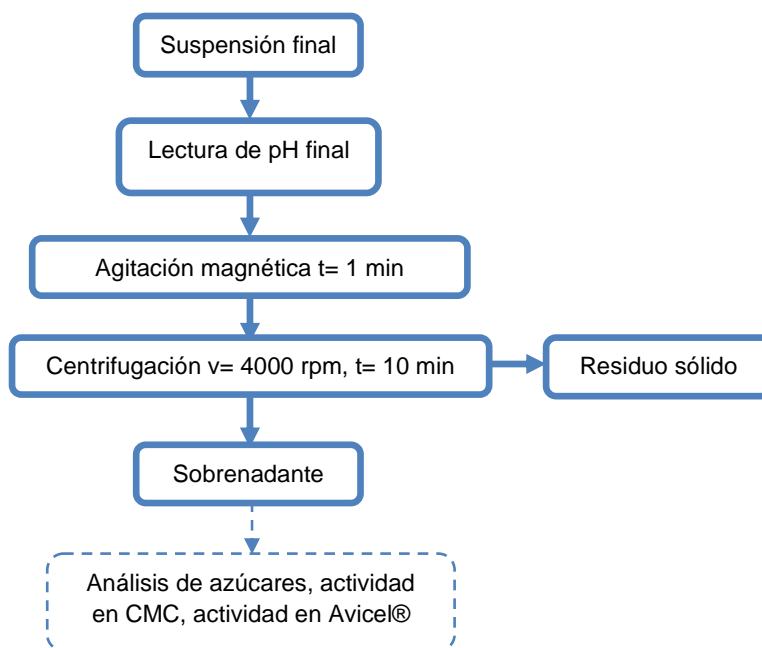
En la **Figura 2-4** se presenta el procedimiento para la preparación del medio de cultivo y su inoculación. Se realizó una unidad experimental por cada uno de los experimentos planteados.

Como control positivo se utilizó una unidad experimental, pero inoculada con una solución esporas de *T. reesei* a la misma concentración de trabajo. Como control abiótico y control de contaminación se utilizó en cada montaje de experimentos una unidad experimental, la cual recibió todos los pasos descritos en la **Figura 2-4** y en el proceso de inoculación se le adicionó solución de Tween 80 al 0.1% en la misma proporción que en los demás ensayos. No se encontró crecimiento de microorganismos en ningún control abiótico luego de la incubación.

2.1.4 Preparación de muestras para análisis

El objetivo es determinar la concentración de azúcares y actividad celulolítica del medio líquido. Para ello al finalizar el tiempo de fermentación determinado para cada ensayo, se realiza la lectura del pH del medio de cultivo, luego una agitación magnética por un minuto. Para la lectura del pH se realizó la calibración con estándares de pH 4, 7 y 10.

Figura 2-3: Procedimiento realizado para obtener la solución de enzimas cruda



Luego se centrifuga el medio de cultivo para separar la biomasa y el micelio del líquido sobrenadante. Este proceso se llevó a cabo en una centrifuga a 4000 rpm (2500 g) por 10 min. El sobrenadante resultante se recogió en tubos falcon de 50 mL de PET y se utilizó inmediatamente para el análisis de contenido de azúcares o actividad celulolítica según corresponda. Muestras de respaldo fueron guardadas en frascos de 2 mL a 0°C.

Las muestras que serán llevadas a determinaciones en HPLC, son filtradas a 0.45 μm en viales para cromatografía y guardadas a 0°C. El procedimiento llevado a cabo a las muestras se registra en la **Figura 2-5**.

2.1.5 Producción de celulasas con celulosa microcristalina

Medios suplementados con celulosa microcristalina como fuente de carbono han sido utilizados con hongos del género *Trichoderma*, con adición de extracto de levadura, glucosa, peptona y CMC (Ahamed A. y Vermette P., 2009). Para investigar como es la producción de las enzimas con celulosa purificada, se realizó un crecimiento de la cepa *T. asperellum* en medio líquido con celulosa microcristalina (Merck®) a una concentración de 10 g/L como fuente de carbono y se comparó con el crecimiento de *T. reesei* en el mismo medio.

Para el crecimiento de las dos cepas se utilizó el medio Mandels, el cual contiene dos fuentes de nitrógeno inorgánicas (urea y sulfato de amonio) y una orgánica (peptona), KH_2PO_4 para la acción buffer, fuente de calcio, magnesio, microelementos, y un surfactante. El medio se presenta en la **Tabla 2-2**. Los microelementos, fueron preparados en una solución de ácido clorhídrico 0.9 M como base para su solubilidad. La concentración de sales se presenta en la **Tabla 2-3**.

Tabla 2-2: Medio Mandels para la producción de enzimas celulolíticas

Compuesto	Concentración [g/L]
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.40
KH_2PO_4	1.50
Urea	0.30
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.40
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.30
Peptona	0.75
Tween 80 [mL]	1.00
Microelementos [mL]	1.00

Tabla 2-3: Concentración de microelementos en el medio.

Microelementos	[mg/L]
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	9.3
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.9
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.5
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3.6

El medio Mandels ha sido desarrollado y es utilizado para el crecimiento de *T. reesei* en medio sólido y sumergido (Reczey, K. *et al*, 1996; Xia L, y Cen P., 1999; Juhász T. *et al*, 2005; Rodríguez I. y Piñeros Y., 2007; Zhang Q., *et al*, 2007, Ahamed, A. y Vermette, P., 2008; Lo Ch. *et al*, 2010; Rocky K. y Hamidi Z., 2010).

El crecimiento fue realizado en oscuridad, a 150 rpm y $28 \pm 1^\circ\text{C}$ y con una concentración inicial de $3 \cdot 10^4$ esporas/mL. Los experimentos se realizaron mínimo por duplicado. Las variables de respuesta analizadas fueron Actividad en CMC, Actividad en Avicel®, día de crecimiento y pH. Algunos investigadores analizan la actividad únicamente al día 7 de cultivo (Juhász T. *et al*, 2005), otros al día 5 (Dominges F.C., *et al*, 2000), por lo tanto se decidió analizar la producción de las enzimas en un instante de tiempo menor a 7, para intentar elucidar el comportamiento de la producción de las enzimas.

La observación del crecimiento de la cepa en medio líquido se realizó por medio de la tinción con azul de lactofenol, observando la morfología de las hifas y las esporas en un microscopio utilizando el aumento 40x.

2.2 Diseño del proceso de obtención de celulasas

2.2.1 Influencia de la concentración del inóculo

Al realizar la solución de esporas para inocular los matraces, generalmente se obtiene una concentración de esporas entre $2 \cdot 10^7$ y $3 \cdot 10^7$ esporas /mL. Con esta concentración de esporas se puede realizar la inoculación, de modo que el medio de cultivo quede entre $3 \cdot 10^4$ y $3 \cdot 10^5$ esporas/mL, por lo cual se analizaron estas dos concentraciones de inóculo para encontrar la más adecuada. No se estudió la posibilidad de alcanzar concentraciones superiores a 10^5 , debido a concentraciones superiores, se necesita demasiado volumen de inóculo, lo cual no lo hace atractivo.

Se realizó el crecimiento en medio sumergido utilizando una concentración de tallo de clavel molido de 5g/100 mL de medio (4.5% en bs), siguiendo el procedimiento descrito en el Numeral 2.1.3, utilizando el medio registrado en la **Tabla 2-2**. Como variables de respuesta se registraron los valores de pH, concentración de azúcares reductores en el sobrenadante, actividad en CMC, y actividad en Avicel®.

2.2.2 Estudio del tiempo de fermentación

Se estudió el tiempo de incubación, para determinar el tiempo en que ocurre la máxima actividad enzimática, variable estudiada por diferentes autores (Velkovska S. *et al*. 1997; Wen Z. *et al*, 2005a; Weber J. y Agblevor F.A., 2005; Chandra, M., *et al*. 2010) con el fin de decidir un tiempo fijo para la realización de los ensayos posteriores. El estudio de los azúcares reductores obtenidos en el transcurso del tiempo de fermentación, también ha

sido realizado (Szijártó N., *et al.* 2004), determinando si se presenta una acumulación de azúcares que inhiba la producción de celulasas.

Para realizar un perfil completo del tiempo y analizar más profundamente lo que está sucediendo en los primeros días de incubación se planteó un complemento al experimento presentado variando el tiempo a los días 1, 2, 3, 4, 6, 7 y 11 (**Tabla 2-4**), para verificar si hay mayor producción de enzimas a mayores tiempos de incubación, realizando los experimentos al un pH de 5.

La concentración de los compuestos del medio de cultivo fue la registrada en la tabla **Tabla 2-2**. Se utilizó una concentración de 5g de clavel por 100 mL de medio, el pH se ajustó antes de realizar la esterilización y se realizó un control abiótico. Las variables de respuesta en los dos casos fueron la actividad en CMC, la actividad Avicel®, el pH y la concentración de azúcares en el medio. El crecimiento fue realizado en oscuridad, a 150 rpm y $28 \pm 1^\circ\text{C}$ y una concentración inicial de 3×10^4 esporas/mL.

Tabla 2-4: Estudio del tiempo en la producción de enzimas.

Corrida	Tiempo [días]
1	1
2	2
3	3
4	4
5	6
6	7
7	11

2.2.3 Efecto de la proporción de carbono y nitrógeno

Algunos investigadores han realizado estudios de la proporción de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo, determinando el efecto de la proporción de carbono adicionada al medio (Wen Z. *et al.*, 2005b; Chandra M. *et al.*, 2010); también se ha estudiado la proporción de nitrógeno, indagando lo que ocurriría en su ausencia total y a diferentes relaciones respecto al carbono presente en el medio (Ju L. y Afolabi O., 1999).

La evaluación y optimización de las condiciones de cultivo se pueden llevar a cabo utilizando la metodología de superficie de respuesta. Se utilizó esta metodología para la determinación del efecto del tallo de clavel como fuente de carbono, y las fuentes inorgánicas de nitrógeno sobre la producción de enzimas celulolíticas.

- **Evaluación del efecto del clavel, el sulfato de amonio y la urea**

Se realizó un diseño experimental de superficie de respuesta utilizando Design Expert®, con 6 puntos centrales, cambiando el porcentaje de clavel entre 4.00-6.00 g/100 mL de solución (3.64 – 5.45 g/100 mL en base seca), el sulfato de amonio entre 1.00-2.50 g/L,

considerando que la concentración en el medio de cultivo es de 1.40 g/L; y la concentración de urea entre 0.50-1.30 g/L buscando aumentar su concentración ya que en el medio de cultivo original es de 0.30 g/L. Como respuesta se evaluó el pH final, actividad en Avicel® y actividad en CMC.

En el caso del clavel, al trabajar a concentraciones superiores a 6.00 g/100mL, en ensayos preliminares, se observó que al desarrollarse micelio en el cultivo, se produce una baja movilidad del medio, alejándolo de la condición de fermentación en medio sumergido, por lo que no se trabajó con concentraciones superiores de clavel.

La relación carbono nitrógeno se calculó determinando los gramos de carbono y nitrógeno aportados por cada especie. Para el carbono, se utilizó el contenido celulosa en el tallo de clavel, con su fórmula condensada equivalente ($C_{1.2}H_2O$). Para el nitrógeno, se calculó el contenido del mismo en el sulfato de amonio, la urea, la peptona y el contenido en el tallo de clavel. Para el caso de la peptona se utilizó la composición registrada por el proveedor de 12.3% de contenido de nitrógeno orgánico. Para este diseño de experimentos (**Tabla 2-5**) se evaluaron concentraciones de C en el intervalo de 6.17-9.25 g y el N entre 0.67-1.43 g.

Tabla 2-5: Efecto de la proporción de carbono y nitrógeno

Corrida	Clavel [%]	Sulfato de amonio [g/L]	Urea [g/L]	Relación C/N
1	4.00	1.00	0.50	10.7
2	5.00	3.01	0.90	6.8
3	5.00	1.75	0.90	8.5
4	5.00	1.75	0.90	8.5
5	3.32	1.75	0.90	6.0
6	6.00	2.50	1.30	7.5
7	5.00	1.75	0.90	8.5
8	6.00	1.00	1.30	9.7
9	6.00	1.00	0.50	14.6
10	5.00	0.49	0.90	11.5
11	6.00	2.50	0.50	10.2
12	5.00	1.75	0.90	8.5
13	4.00	1.00	1.30	6.9
14	4.00	2.50	0.50	7.3
15	5.00	1.75	0.90	8.5
16	4.00	2.50	1.30	5.3
17	5.00	1.75	1.57	6.6
18	6.68	1.75	0.90	10.8
19	5.00	1.75	0.90	8.5
20	5.00	1.75	0.23	12.2

En los resultados de este diseño de experimentos (Ver numeral **3.2.3**, **Tabla 3-10**) se encontró que una alta concentración de fuente de nitrógeno, asociada a una alta concentración de urea, afecta negativamente la producción de las enzimas. Por lo tanto se propuso realizar nuevamente un diseño experimental, pero esta vez dejando la concentración de urea en el valor propuesto en el medio Mandels (0.3 g/L) y evaluando concentraciones menores de sulfato de amonio.

- **Evaluación del efecto del clavel y del sulfato de amonio**

Se realizó un diseño experimental de superficie de respuesta con dos factores, porcentaje de clavel y concentración de sulfato de amonio, con 5 puntos centrales utilizando Design Expert®, como se presenta en la **Tabla 2-6**. El porcentaje de clavel se cambió entre 4 - 6 g/100 mL de medio (3.64 – 5.45 g/100 mL en base seca) y el sulfato de amonio entre 0.5 y 2.5 g/L. La composición restante del medio se dejó igual a la presentada en la **Tabla 2-2** y **Tabla 2-3**. El crecimiento fue realizado en oscuridad, a 150 rpm y $28 \pm 1^\circ\text{C}$ y una concentración inicial de 3×10^4 esporas/mL.

Tabla 2-6: Efecto de la proporción de fuente de carbono y nitrógeno en la actividad enzimática

Corrida	Clavel [g/100mL]	Sulfato de amonio [g/L]	Relación C/N molar
1	3.6	1.5	9.6
2	5.0	1.5	12.5
3	6.0	2.5	11.2
4	6.0	0.5	19.9
5	6.4	1.5	15.0
6	5.0	1.5	12.5
7	5.0	1.5	12.5
8	4.0	2.5	8.0
9	5.0	0.1	21.4
10	4.0	0.5	15.2
11	5.0	1.5	12.5
12	5.0	1.5	12.5
13	5.0	2.9	8.8

2.2.4 Efecto del pre-tratamiento

Con miras a producir un complejo celulolítico para la degradación de biomasa, se realiza la exploración de pre-tratamientos adecuados que permitan un mayor acceso a la matriz de celulosa por parte de las enzimas. Como la biomasa presenta una baja concentración de lignina se utilizaron pre-tratamientos que se especialicen en el fraccionamiento de las fibras sin la utilización de químicos que puedan aumentar las posibilidades de formación de compuestos no deseados.

El tallo de clavel utilizado proporciona una buena superficie disponible y una probable reducción del grado de polimerización de la celulosa debido al pretratamiento de molienda realizado. Como pre-tratamientos adicionales se propuso la realización de pre-tratamiento con agua caliente y con ácido sulfúrico diluido.

El pre-tratamiento con agua caliente, se realiza usualmente a una concentración de sólidos <20%, debido a que se requiere que haya un contacto de la biomasa con el agua en estado líquido. Como resultados se obtiene que ocurre una hidrólisis de la hemicelulosa, despolimeración de la celulosa y una solubilización parcial de la lignina, con una formación baja o nula de inhibidores en el proceso y es un procedimiento que ha sido utilizado para materiales como el bagazo de la caña (Sánchez O. y Cardona C., 2005).

Los intervalos de operación utilizados dependen de la densidad de la biomasa y su composición, la temperatura está entre el intervalo de 170-230°C, el tiempo entre 1-46 min y la concentración de sólidos entre 10-20%. Para el pre-tratamiento se utilizó una concentración de biomasa del 10%, a las siguientes condiciones presentadas en la **Tabla 2-7**.

Tabla 2-7: Condiciones del pre-tratamiento realizado con agua

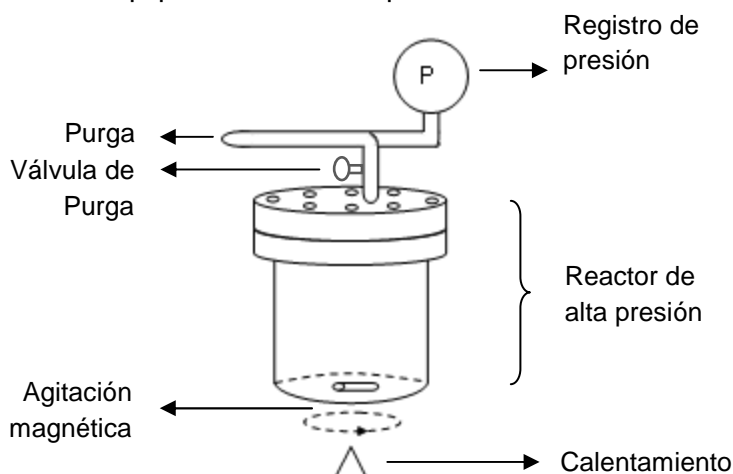
Corrida	Presión [bar]	Temperatura [°C]	Tiempo [min]
1	4.1	145	15
2	5.4	155	15
3	6.7	163	20
4	7.0	165	15
5	10.9	183	20

El equipo utilizado fue un reactor de alta presión en acero inoxidable con una válvula de purga y con conexión separada hacia un manómetro para el registro de presión (intervalo de 0-40 bar) (**Figura 2-4**). La adición de calor al sistema se realizó utilizando una plancha de calentamiento con agitación magnética. Para lograr un buen contacto entre las fases, se utilizó un agitador magnético de 2.5" de largo. El volumen del reactor es de 500 cm³ con un volumen de trabajo de 250 cm³ para dar espacio al equilibrio líquido vapor. El procedimiento utilizado fue el siguiente:

- Adición de la biomasa y el agua al reactor.
- Cerrado hermético del reactor.
- Inicio del calentamiento y agitación magnética con la válvula de purga abierta y registro del tiempo.
- Cuando se observa salida de vapor por la purga durante 1 min, se cierra la válvula y comienza el inicio de aumento de presión.

- Cuando se llega a la presión esperada, se mantiene por el tiempo requerido variando el flujo de calor de la plancha de calentamiento.
- Al terminar el tiempo de reacción, se suspende el calentamiento y se pone el sistema en un baño de agua fría.
- Cuando la presión del sistema sea cero, y la temperatura del sistema cercana al ambiente se destapa y se recupera la biomasa y el líquido.
- La biomasa fue filtrada al vacío a través de membranas de papel con retención de partículas de 12-15 μm . Se lavó con agua destilada y secó hasta peso constante a 70°C.

Figura 2-4: Diagrama del equipo utilizado en el pre-tratamiento con agua caliente



El pre-tratamiento con ácido sulfúrico diluido se ha utilizado para aumentar la digestibilidad enzimática en madera de eucalipto y pastos como *A. elongatum* y *L. triticoides* en tamaños de partícula entre 0.23 – 0.38 mm con ácido sulfúrico al 0.9 – 1.4% p/p en tiempos de residencia entre 8-20 min (Zheng Y. *et al*, 2009) generando una alta digestibilidad del sustrato a la mayor concentración de ácido sulfúrico.

De acuerdo con estas características del proceso se escogió realizar un pre-tratamiento con ácido sulfúrico diluido al 2% por 15 min a 121°C en autoclave. La carga de biomasa fue del 10% en peso en frascos de vidrio esterilizables con un volumen de 100 mL, con 4 g de tallo de clavel y 40 mL de solución de ácido sulfúrico. Luego del ciclo de calentamiento, los recipientes se enfriaron en un baño de agua y cuando se llegó a la temperatura ambiente, se filtró la solución, lavando con agua destilada para retirar el ácido y los azúcares solubilizados.

A cada pre-tratamiento se le registró la masa de sólidos recuperados y su contenido de sólidos totales. El sólido fue caracterizado en su contenido de azúcares estructurales utilizando hidrólisis con ácido sulfúrico y registrando la concentración de azúcares por HPLC. Adicionalmente se recuperó el volumen del líquido y su concentración de azúcares se determinó por HPLC.

Luego del pre-tratamiento se realizaron experimentos para la producción de enzimas celulolíticas, utilizando la biomasa resultante a una concentración en base seca de 3.64 g/100mL de medio. Se utilizó la misma concentración de sales que las del medio registrado en la **Tabla 2-2**, pero adicionando el sulfato de amonio a una concentración de 0.5 g/L de acuerdo a los resultados obtenidos en el numeral anterior y antes de esterilizar se ajustó el pH inicial a un valor de 5.0. El crecimiento fue realizado en oscuridad, a 150 rpm y $28 \pm 1^\circ\text{C}$ y una concentración inicial de $3 \cdot 10^4$ esporas/mL. Como control se utilizó un experimento a las mismas condiciones y composición del medio, pero con clavel molido sin ningún otro pre-tratamiento como sustrato. Como variables de respuesta se midió el pH final y la actividad en CMC y Avicel®.

2.2.5 Efecto de los microelementos y los macroelementos

La utilización de los microelementos contenidos en residuos se ha estudiado, determinando si la adición suplementaria de sales de diferentes elementos es necesaria para el crecimiento de los hongos y la producción de las enzimas celulolíticas, cuando se utilizan sustratos ricos en elementos (Wen Z. *et al.*, 2005a; Chandra M., *et al.* 2010).

Para evaluar los requerimientos nutricionales de *T. asperellum* en su crecimiento y la producción de enzimas celulolíticas, se plantea un diseño de experimentos de efectos factorial Packet-Bruman con el programa Design Expert®, con cuatro puntos centrales. Las variables se evaluaron en un intervalo de concentración de cero a una máxima, como se presenta en la **Tabla 2-8**, dependiendo de cada especie, definidos según la revisión bibliográfica realizada.

Se decidió mantener como la máxima concentración en el diseño, la concentración dada en el medio Mandels, para la urea, por su efecto negativo a altas concentraciones observado en los experimentos anteriores, para la fuente de Mg^{2+} , debido a que no se ha encontrado un registro de que mayores concentraciones de este factor mejoren la producción de las enzimas y para la concentración de Fe^{2+} por su alta concentración en el medio, tanto del medio de sales 1.87 ppm Fe^{2+} como en el aporte de 3.34 ppm por parte del clavel. Los demás elementos del medio de cultivo, fueron aumentados en su proporción en el diseño, dependiendo del aporte proporcionado por el clavel, duplicando la concentración de la fuente de calcio, la cual es un estimulante de la esporulación, tween 80 (Liu J. *et al.*, 2006), manganeso, cobalto y potasio.

Adicionalmente, se evaluó la adición de extracto de levadura al medio y un aumento en la concentración de peptona, ya que son dos fuentes de nitrógeno orgánico utilizadas para la producción de celulasas (Ahamed, A. y Vermette, P., 2009)

El medio se preparó utilizando una concentración de clavel de 4.00% (3.64% en bs) y una concentración de sulfato de amonio de 0.5 g/L como base junto con la adición de los demás compuestos a la concentración definida para cada ensayo; se ajustó el pH en cada medio antes de esterilizar a un valor de 5.0. Se utilizó un control

abiótico y se incubaron todos los tratamientos a 150 rpm y $28 \pm 1^\circ\text{C}$ y una concentración inicial de 3×10^4 esporas/mL. Las variables de respuesta fueron la actividad en CMC, actividad en Avicel®, pH final y concentración de proteína. En la

Tabla 2-9, se presentan los experimentos resultantes del diseño. Para el análisis de la significancia de los resultados se utilizó un análisis ANOVA.

Tabla 2-8: Variables y sus intervalos de concentración empleados en el diseño

Especie	Variable	Límite inferior	Límite superior
Urea [g/L]	A	0	0.3
CaCl ₂ *2H ₂ O [g/L]	B	0	0.8
MgSO ₄ *7H ₂ O [g/L]	C	0	0.3
Peptona [g/L]	D	0	1.5
Tween 80 [mL/L]	E	0	2.0
Extracto de levadura [g/L]	F	0	1.0
FeSO ₄ *7H ₂ O [mg/L]	G	0	10.0
MnSO ₄ *H ₂ O [mg/L]	H	0	4.0
ZnSO ₄ *7H ₂ O [mg/L]	J	0	4.0
CoCl ₂ *6H ₂ O [mg/L]	K	0	8.0
KH ₂ PO ₄ [g/L]	L	0	2.0

Tabla 2-9: Efecto de los microelementos y macroelementos

Corrida	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L
1	0.30	0.80	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	4.00	4.00	0.00	2.00
2	0.00	0.00	0.30	0.00	2.00	1.00	0.00	4.00	4.00	8.00	0.00
3	0.15	0.40	0.15	0.75	1.00	0.50	5.00	2.00	2.00	4.00	1.00
4	0.00	0.80	0.30	0.00	2.00	1.00	10.00	0.00	0.00	0.00	2.00
5	0.15	0.40	0.15	0.75	1.00	0.50	5.00	2.00	2.00	4.00	1.00
6	0.30	0.80	0.30	0.00	0.00	0.00	10.00	0.00	4.00	8.00	0.00
7	0.15	0.40	0.15	0.75	1.00	0.50	5.00	2.00	2.00	4.00	1.00
8	0.15	0.40	0.15	0.75	1.00	0.50	5.00	2.00	2.00	4.00	1.00
9	0.30	0.00	0.30	1.50	0.00	1.00	10.00	4.00	0.00	0.00	0.00
10	0.30	0.80	0.00	1.50	2.00	1.00	0.00	0.00	0.00	8.00	0.00
11	0.00	0.80	0.30	1.50	0.00	0.00	0.00	4.00	0.00	8.00	2.00
12	0.00	0.00	0.00	1.50	0.00	1.00	10.00	0.00	4.00	8.00	2.00
13	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
14	0.00	0.80	0.00	1.50	2.00	0.00	10.00	4.00	4.00	0.00	0.00
15	0.30	0.00	0.00	0.00	2.00	0.00	10.00	4.00	0.00	8.00	2.00
16	0.30	0.00	0.30	1.50	2.00	0.00	0.00	0.00	4.00	0.00	2.00

Con los resultados obtenidos se realizó un análisis de interacción de las variables y una optimización de las mismas buscando como objetivo la maximización de la respuesta.

Comprobación del modelo

Como comprobación del modelo obtenido se realizó un experimento para determinar el error del mismo por medio del montaje experimental de un punto de operación sobre la región de estudio. A este experimento se le realizó el análisis de los azúcares reductores obtenidos de la actividad enzimática por DNS y se determinó el perfil de azúcares por cromatografía de gases como se describe en el numeral 2.3.2. Se hizo un análisis de la composición de la biomasa lignocelulósica final, y un análisis adicional del extracto líquido determinando la actividad xilanasa. Para tener referencia del control positivo, se realizó el crecimiento de *T. reesei*, utilizando el mismo medio de cultivo.

Propuesta final para la producción de enzimas celulolíticas

Finalmente se presenta la propuesta del medio de cultivo y el procedimiento adecuado para la obtención del complejo de enzimas que degradan tallo de clavel molido.

2.3 Métodos analíticos

2.3.1 Determinación de azúcares reductores

La determinación de azúcares reductores totales se realizó por medio del análisis con la técnica DNS, por medio de la reacción del grupo hidroxilo libre característico de este tipo de azúcares realizando la lectura en un espectrofotómetro a una longitud de 540 nm característica para identificar colores entre el intervalo amarillo-naranja. La curva de calibración se realizó con glucosa. Los datos obtenidos para las absorbancias de cada una de las muestras trabajadas se consignaron en el **Anexo C**.

2.3.2 Análisis de azúcares por HPLC

Las condiciones a las cuales se realizó la detección de los azúcares por HPLC fueron: columna Aminex HPX-87H, a una temperatura de 65°C, con ácido sulfúrico 0.005 M como fase móvil, a un flujo de 0.6 mL/min y con 20 µL de volumen de inyección. Los azúcares utilizados como patrones fueron: celobiosa, glucosa, xilosa, arabinosa y galactosa. Las curvas patrón, junto con las áreas y el tiempo de retención se consignaron en el **Anexo E**.

2.3.3 Determinación de las actividades celulolíticas

Con el fin de determinar la actividad celulolítica, se analizaron las muestras para identificar la actividad en CMC y en Avicel®. La determinación de estas dos actividades

enzimáticas ha sido utilizada por diferentes autores para analizar el comportamiento y la producción de enzimas (Ahamed y Vermet, 2010; Busto, 1996; Rocky K. y Hamidi Z., 2010). Se realizó cada determinación por duplicado. La determinación de la actividad en CMC y en Avicel® fue determinada usando una solución al 2% de CMC de baja densidad y 2% de Avicel® en buffer citrato-fosfato 50mM con pH de 5.0. Después de una incubación de 60 min a 50°C, los azúcares liberados por la mezcla reactiva fueron determinados usando ácido dinitrosalicílico (Miller G., 1959).

Se define como 1 unidad de actividad celulasa (U) como 1 μ mol de azúcares reductores equivalentes a glucosa obtenidos por minuto. Para el cálculo de la actividad enzimática se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{UA}{L} = \frac{(C_{am} - C_{ab}) * 10^6}{MMa} * D \quad (2.2)$$

Donde,

Cgm: es la concentración de azúcar en la muestra en g/L

Cgb: es la concentración de azúcar en el blanco en g/L

MMa: es la masa molecular del azúcar patrón en g/mol, y

t_R: es el tiempo de reacción en minutos

2.3.4 Determinación de actividad xilanasa

La actividad endo- β -xilanasa se determinó utilizando una solución de xilano al 1% en bufer citrato-fosfato 50 mM con pH 5.0, con una reacción a 50°C por 30 minutos (Fortes L., *et al.*, 2010). Los azúcares liberados por la mezcla reactiva fueron determinados usando ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller G., 1959). La curva de calibración del DNS utilizada en este procedimiento, se llevó a cabo con xilosa como azúcar patrón. Se define como 1 unidad de actividad xilanasa (U) como 1 μ mol de azúcares reductores equivalentes a xilosa obtenidos por minuto. El cálculo de la actividad enzimática se realiza utilizando la ecuación (2.2).

2.3.5 Determinación de proteínas

La determinación de proteínas solubles se realizó utilizando la prueba de proteínas Bradford, por medio del Kit para pruebas Bradford Biorad®. El reactivo utilizado fue *Quick Start Bradford Dye Reagent* 1x 1L. Para la curva de calibración se utilizó albúmina de suero bovino (BSA). La curva de calibración se encuentra consignada en el **Anexo D**.

2.3.6 Análisis estadísticos

Los análisis de los intervalos de confianza fueron realizados con un alfa de 0.05 (confianza del 95%). Los experimentos fueron analizados de acuerdo a los resultados

arrojados en la ANOVA. Los diseños experimentales fueron analizados utilizando Design Expert® 7.0.0.

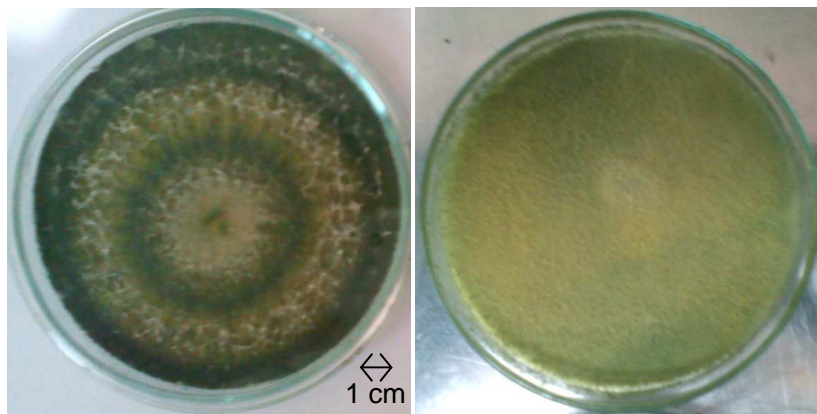
3. Resultados y Análisis de Resultados

3.1 Estudios preliminares

3.1.1 Descripción de los microorganismos de trabajo

Se realizó el reconocimiento de los microorganismos a utilizar en el desarrollo de esta tesis en medio PDA. En la **Figura 3-1** se muestra la fotografía del hongo luego de 7 días de cultivo a 28°C. Los dos cultivos presentaron esporas y desarrollo de micelio. Se observó el crecimiento radicular característico de *T. asperellum* y la coloración de sus esporas de un verde intenso.

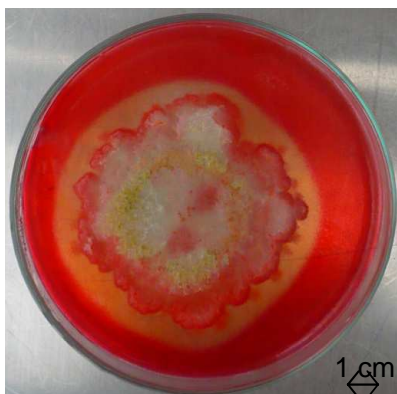
Figura 3-1: Fotografía de *T.asperellum* (izquierda) y *T. reesei* (derecha) en PDA.



En la etapa temprana de crecimiento de *T. asperellum*, se describe una formación de micelio blanco que crece de forma radicular hasta poblar toda la superficie del agar (Día 3-4). Luego comienza la etapa reproductiva, por medio de la formación de esporas hasta que la superficie del medio se consolida de un color verde oscuro (7-8 días). En el caso de *T. reesei*, se evidenció la segregación de pigmento amarillo en el agar, y la esporulación se completó entre los 10 y 14 días de incubación. La esporulación es afectada por factores ambientales tales como la nutrición, la luz y la temperatura, y se ha demostrado que este fenómeno se presenta en cajas de Petri y es estimulado por el contacto del micelio con el vidrio de la caja. Todas las observaciones concuerdan con la

información reportada por Samuels G.J. *et al*, 2012, para las cepas del género *Trichoderma*. Al realizar la coloración con rojo Congo se evidenció que la cepa presenta actividad celulolítica (Ver **Figura 3-2**).

Figura 3-2: Halo de hidrólisis de CMC por la cepa *T. asperellum*.



3.1.2 Caracterización fisicoquímica de la biomasa

El tallo de clavel fue analizado por el Laboratorio de Nutrición Animal, con el fin de determinar cuál es el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina. La metodología consiste en la determinación de la fibra insoluble acida e insoluble neutra. Los resultados se presentan en la **Tabla 3-1**. El formato presentado por el laboratorio se presenta en el **Anexo B**.

Tabla 3-1: Resultados de la caracterización del tallo de clavel.

Análisis	Reporte Base húmeda	Reporte Base seca
Materia seca (%)		89.7
Fibra en detergente neutro (%)	46.7	52.1
Fibra en detergente ácido (%)	35.8	39.9
Lignina (%)	4.7	5.3
Celulosa (%)	31.1	34.7
Hemicelulosa (%)	10.9	12.2

Comparando los resultados con los porcentajes reportados en la literatura (**Tabla 1-1**), en cuanto a su contenido de celulosa, el tallo de clavel presenta un contenido de 34.7% en base seca, el cual se encuentra dentro del intervalo de contenido en los pastos. En cuanto a la hemicelulosa, su contenido es bajo respecto al contenido en pastos y paja y se asemeja al del bagazo de caña con 3% de diferencia. El contenido de lignina está dentro del intervalo para tallo de maíz y esta característica hace que este sustrato sea menos resistente a la degradación química y biológica (Balat M., 2010). El porcentaje de humedad para esta biomasa es de 10.3%.

Se encontró que el tallo de clavel contiene una proporción de todos los micronutrientes analizados por el Laboratorio de Suelos como nitrógeno, fósforo, calcio, potasio, magnesio, cobre, hierro, manganeso, zinc, boro y azufre (ver **Tabla 3-2**) siendo el nitrógeno el compuesto mayoritario con un 0.34% y el cobre el minoritario con una concentración de 9.22 mg/kg.

Tabla 3-2: Resultados generados del reporte de análisis de tejido vegetal.

N	P	Ca	K	Mg	Cu	Fe	Mn	Zn	B	S
%					mg/kg					
0.34	0.08	0.11	1.31	0.06	9.22	83.5	125	54.3	18.5	385

Con el fin de conocer la distribución de tamaños de partícula de la biomasa se realizó una clasificación utilizando tamices certificados con la NTC 32 (**Tabla 3-3**). Se encontró que el 57.6% de la biomasa se encuentra en un tamaño entre $150 \mu\text{m} < D_p < 500 \mu\text{m}$ y que el restante 42.4% es un tamaño $D_p < 150 \mu\text{m}$, donde D_{p_n} corresponde al diámetro de abertura de la malla n. El mayor porcentaje de la biomasa se encuentra entre el tamaño de $75 \mu\text{m} < D_p < 150 \mu\text{m}$. El tamaño de partícula tan fino permitirá más adelante en el proceso la accesibilidad de la celulosa al ataque enzimático.

Tabla 3-3: Distribución de tamaño de partícula del tallo de clavel molido.

Tamiz	$D_{p_n} [\mu\text{m}]$	% Retenidos	% Acumulado
18	1000	0	0
18/35	500	0.6	0.6
35/50	300	14.4	15.0
50/80	180	17.1	32.1
80/100	150	25.5	57.6
100/200	75	33.1	90.7
Finos		9.3	100.0

Tabla 3-4: Resultados de porcentaje de lignina y cenizas para la biomasa

#	%Lignina libre de extractivos	% Lignina total bs	% Cenizas
1	6.5	3.5	1.1
2	8.0	4.2	0.7
\bar{x}	7.3	3.8	0.9
S	1.0	0.5	0.3
CV	14.1	14.1	28.3
Valor	7.3 ± 0.5	3.8 ± 0.3	0.9 ± 0.4

Al realizar el análisis de la biomasa en cuanto a su contenido de sólidos totales se encontró que la biomasa presenta un contenido de 90.9%. Este porcentaje presenta una

diferencia del 1.8% con respecto al reportado en la **Tabla 3-1**, el cual está dentro del intervalo de error aceptado. El porcentaje de extractivos en etanol obtenido luego de la extracción Soxhlet fue de 47.2%. De los resultados se encontró que por medio de esta técnica se reporta un valor de concentración de lignina de 3.8 ± 0.3 %, valor más bajo que el reportado en la **Tabla 3-1**. Estas diferencias pueden ser atribuidas a las técnicas utilizadas para su determinación ya que fueron diferentes. En la **Tabla 3-5**, se encuentran consignados los valores de azúcares estructurales que contiene el tallo de clavel. Se verificó que hubo una hidrólisis completa de la biomasa al no encontrarse registro de celobiosa en el análisis.

Tabla 3-5: Resultados de los porcentajes de azúcares analizados para la biomasa por HPLC

#	% Glucano	% Xilano	% Arabinano
1	32.7	14.7	4.4
2	34.4	14.0	4.1
\bar{x}	33.6	14.4	4.3
S	1.2	0.5	0.2
CV	3.6	3.4	4.7
Valor	33.6 ± 1.7	14.4 ± 0.7	4.0 ± 0.3

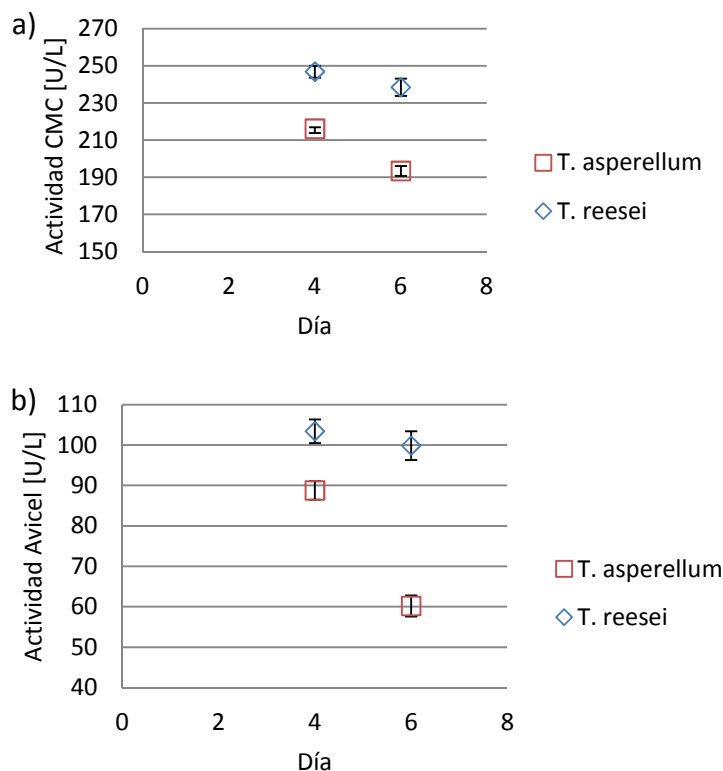
3.1.3 Producción de celulasas con celulosa microcristalina

Los resultados obtenidos al realizar en crecimiento de *T. asperellum* y *T. reesei* en medio líquido con celulosa microcristalina se presentan en la **Tabla 3-6**. En las condiciones especificadas a las que se realizó el experimento se encontró que la cepa de *T. reesei* presenta una mayor actividad enzimática con CMC en este medio de cultivo, con un valor promedio de 246 U/L al día 4. Las actividades en CMC y Avicel® para la cepa de *T. asperellum*, presentan diferencias significativas de acuerdo con el análisis de datos realizado en Excel®.

Se encontró que existe una diferencia significativa entre la actividad celulolítica por *T. asperellum* entre el día 4 y el 6, siendo mayor la actividad para el día 4. Para la cepa *T. reesei*, se encontró que no hay una diferencia significativa entre la actividad presentada entre el día 4 y el 6, manteniendo la actividad en el tiempo. (**Figura 3-3**). Se puede inferir que la estabilidad de las enzimas de *T. reesei* fue mayor, debido a que el medio utilizado es el que ha sido diseñado para esta cepa por lo cual contiene los requerimientos necesarios a nivel nutricional. Se encuentra que la actividad en CMC es más alta que en Avicel® para las dos cepas. La relación entre las endoglucanasas y las exoglucanasas depende de la cepa de microorganismo que se esté usando, por ejemplo se ha encontrado que la actividad exoglucanasa es más alta que la endoglucanasa para la cepa *T. reesei* RUT C-30 (Zhang Q. *et al.*, 2007), pero para la cepa *T. viride* AF93252, la actividad CMCasa es mayor en un 78% que la actividad Avicelasa (Liu J., *et al.*, 2006).

Tabla 3-6: Resultados de las actividades enzimáticas

Cepa	Día	Actividad CMC [U/mL]	Actividad Avicel® [U/mL]	pH final
<i>T. asperellum</i>	4	215	92	2.64
	4	217	86	2.62
	6	200	66	2.66
	6	191	58	2.63
	6	190	57	2.69
<i>T. reesei</i>	4	251	108	2.78
	4	242	99	2.82
	6	243	108	2.71
	6	228	97	2.78
	6	245	94	2.77

Figura 3-3: Perfiles de actividad para la cepa de trabajo y el control positivo. a) Actividad en CMC, b) actividad en Avicel®.

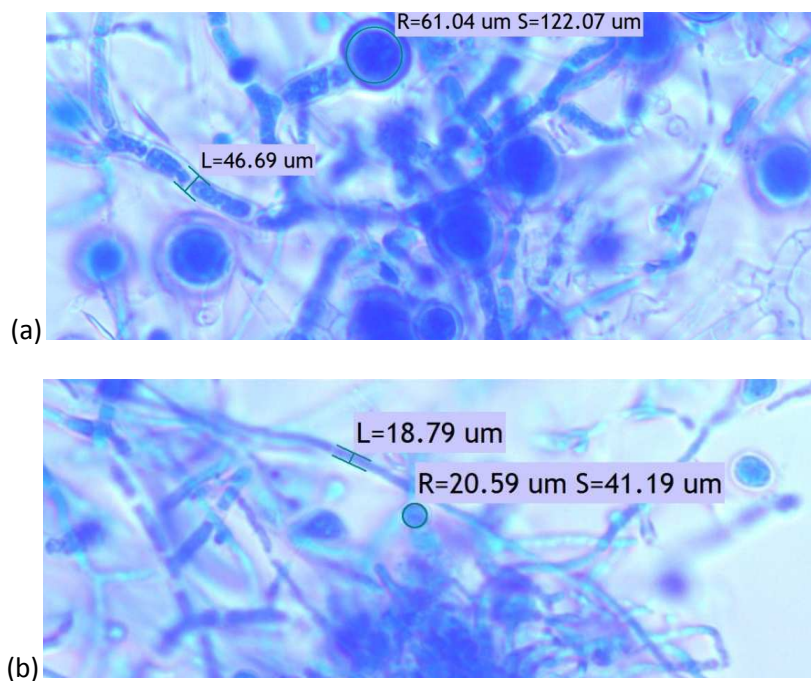
En la observación al microscopio de las dos cepas con coloración de lactofenol (**Figura 3-4**), se encontró que las estructuras morfológicas como las clamidosporas y las hifas de *T. asperellum*, son de tamaño más grande que las de *T. reesei*.

Para el desarrollo de modelos de producción de celulasas y consumo de sustratos se han realizado estudios de la morfología de los microorganismos. Para *T. reesei*, se ha desarrollado el concepto de formación de dos micelios (Velkovska S. *et al.*, 1997).

Observaciones al microscopio mostraron un primer periodo de formación de células “jóvenes” muy largas y ligeramente ramificadas, llamado micelio primario. Después de este desarrollo rápido de micelio, análisis microscópicos mostraron que la estructura del micelio comienza a cambiar a los 2-3 días, por la formación de mayores ramificaciones y una eventual aparición de clamidosporas.

Estas clamidosporas son realmente segmentos terminales o intercalares del micelio, los cuales han desarrollado una reserva sustancial de alimento y paredes celulares gruesas. Las clamidosporas son órganos para la supervivencia asexuales, y su aparición se asocia con el agotamiento del sustrato, en este caso el agotamiento se asocia con la desaparición de los compuestos fácilmente consumibles que viene con el medio de cultivo y con el inóculo, tales como azúcares reductores y peptonas, lo cual dispara una transformación fisiológica en las células para sobrevivir en una única fuente de carbono, celulosa microcristalina. Este fenómeno se presenta en la **Figura 3-4**, tanto para *T. reesei*, como para *T. asperellum*.

Figura 3-4: Coloración con azul de lactofenol, vista en microscopio a 40x. *T. asperellum* (a), *T. reesei* (b).



Teniendo como base que existe una producción de enzimas celulolíticas por *T. asperellum* utilizando como fuente de carbono una fuente purificada, se espera que por medio de un diseño de experimentos, se logre encontrar los requerimientos nutricionales necesarios para la cepa *T. asperellum*, partiendo de la composición en el medio Mandels, para la producción de enzimas celulolíticas por *T. reesei* y reemplazando la fuente de carbono por biomasa lignocelulolítica (tallo de clavel).

3.2 Diseño del proceso de obtención de celulasas

3.2.1 Influencia de la concentración del inóculo

Los resultados obtenidos en los ensayos se presentan en la **Tabla 3-7**. Realizando el análisis estadístico de los datos, se comprobó que hay diferencias significativas entre las dos concentraciones de esporas, para las dos actividades enzimáticas analizadas. Se concluye que la actividad más alta se presenta con una concentración de inóculo de $3 \cdot 10^4$ esporas/mL, con un valor promedio de 225 U/L en CMC y 67 U/L en Avicel®, como se observa en la **Tabla 3-8**.

Se encontró también que no hay diferencias significativas en el pH final a las dos concentraciones de esporas estudiadas, pero si hay diferencias significativas entre los valores de azúcares reductores en solución. La actividad en Avicel® sigue conservando la misma tendencia anterior, siendo más baja que la actividad en CMC.

Por lo tanto se puede concluir que el cambio de los valores de actividad se debe a que se aumenta la concentración del inóculo, obteniéndose una concentración más alta de enzimas a más baja concentración de inóculo, por lo que se usarán concentraciones del orden de 10^4 para la realización de la experimentación.

Tabla 3-7: Resultados encontrados al variar la concentración del inóculo.

Concentración [Esporas/mL]	Actividad CMC [U/L]	Actividad Avicel® [U/L]	pH final	Azúcares [g/L]
3.00E+04	215	61	7.21	1.38
3.00E+04	230	68	7.21	1.38
3.00E+04	230	72	7.48	1.45
3.00E+05	210	52	7.39	1.21
3.00E+05	196	52	7.36	1.22
3.00E+05	204	47	7.48	1.32

Dominges F.C., *et al.* (2000), estudió el efecto de la concentración del inóculo, entre 10^7 y 10^5 esporas/mL, encontrando que bajas concentraciones de inóculo, permiten la formación de pellets del hongo, mientras que altas concentraciones inhiben este proceso, formando un micelio pulposo.

En los resultados obtenidos en este trabajo, no se vio una formación de pellets a ninguna de las dos concentraciones usadas. Esto pudo deberse a que la concentración de inóculo no fue tan baja como para promoverlos, además de que la adición de Tween 80 en el medio de cultivo inhibe la formación de pellets, condición deseada debido a que la formación de conglomerados de biomasa disminuye la concentración de proteínas y la actividad celulolítica producida (Dominges F.C., *et al.*, 2000).

Tabla 3-8: Análisis estadístico de los datos.

RESUMEN	Actividad CMC [U/L]	Actividad Avicel® [U/L]	pH	Azúcares [g/L]
<i>e4</i>				
Cuenta	3	3	3	3
Suma	675	201	21.90	4.21
Promedio	225	67	7.30	1.40
S	9	6	0.16	0.04
<i>e5</i>				
Cuenta	3	3	3	3
Suma	610	150	22.23	3.75
Promedio	203	50	7.41	1.25
S	7	3	0.06	0.06

3.2.2 Estudio del tiempo de fermentación

Los resultados obtenidos de los perfiles de la actividad, pH final y azúcares con respecto al tiempo entre los días de estudio (1-11) se presentan en la **Tabla 3-9** y en la **Figura 3-5**. Al inicio del cultivo no hay una alta presencia de enzimas, respecto a la encontrada en días posteriores. Se presenta entonces un aumento de la concentración de las enzimas, hasta el día 3-4 donde se estabiliza y luego empieza a disminuir. La baja producción de enzimas en el día 1 concuerda con el modelo propuesto por Velkovska S. *et al.* (1997), el cual indica que durante esta etapa del proceso se está formando únicamente un micelio primario, no muy ramificado. Entre el día 2 y 4 hay nuevas estructuras con más micelio, y más hifas activas las cuales tienen una mayor capacidad para segregar proteínas celulolíticas.

Se concluye entonces que para el caso del cultivo realizado con *T. asperellum*, el tiempo de formación del micelio secundario ocurre en una etapa más temprana, ya que al día dos, se obtienen cantidades significativas de enzimas en el medio de cultivo y al día 4, al realizar observación al microscopio con coloración con azul de lactofenol, se observó presencia de clamidosporas.

El pH del medio aumenta desde 5, el valor inicial, llegando hasta valores de 8. El aumento del pH en el medio a un valor superior a 7.5 coincide con la disminución de la actividad enzimática presentada en el día 6. Por lo tanto se encuentra que a pH básicos la actividad enzimática decae, encontrándose que un pH > 7.5 es desfavorable para las enzimas producidas por la cepa.

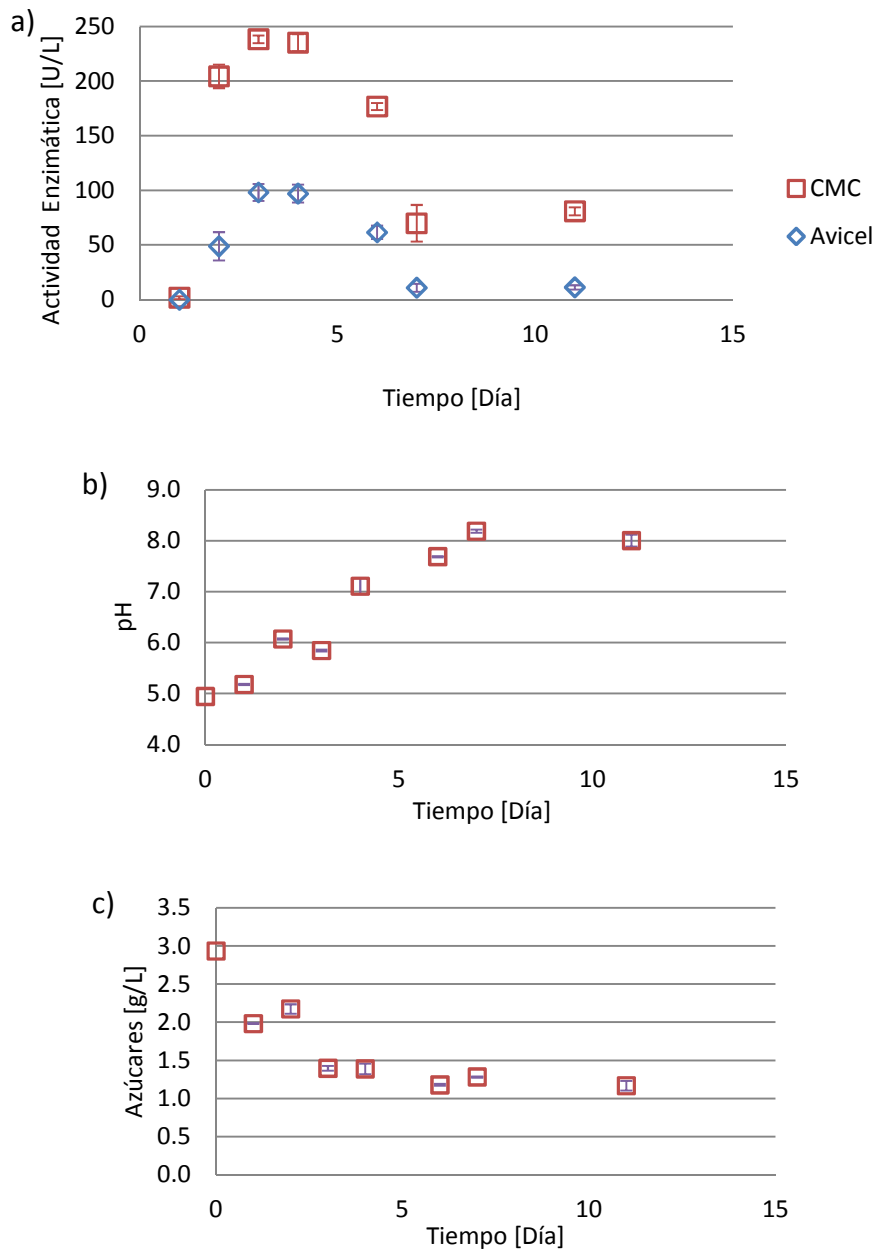
Tabla 3-9: Actividades celulolíticas obtenidas con respecto al tiempo con un pH inicial de 5.00

Corrida	Día	Actividad CMC [U/L]	Actividad Avicel® [U/L]	pH final	Azúcares [g/L]
1	1	0	0	5.16	1.99
2	1	4	0	5.20	1.98
3	2	220	31	6.09	2.26
4	2	189	67	6.05	2.09
5	3	243	87	5.82	1.44
6	3	233	109	5.87	1.35
7	4	225	104	6.96	1.39
8	4	232	78	6.85	1.34
9	4	259	116	7.06	1.26
10	4	226	90	7.57	1.58
11	6	179	73	7.70	1.16
12	6	189	55	7.67	1.20
13	7	46	6	8.23	1.30
14	7	94	16	8.15	1.27
15	11	86	9	7.84	1.26
16	11	76	14	8.17	1.08
17	6	0	0	4.94	2.94

El medio de cultivo comienza con un valor de azúcares solubles de 2.94 g/L, el cual disminuye en el tiempo, quedando un residual en el medio de cultivo en el intervalo de 1.16 g/L -1.44 g/L. Los azúcares consumidos por el hongo provienen de los iniciales en el medio de cultivo y los hidrolizados por las enzimas. Se observa que no hay un aumento de la concentración de estos azúcares en la fermentación, conllevando a la disminución progresiva de estos, resultados que concuerdan con los realizados por Szijártó N., *et al.* (2004) en escala matraz utilizando *T. reesei* RUT C30 con cartón corrugado como fuente de carbono, donde la mayor concentración de azúcares en el medio registrada fue de 2.5 g/L al día 1 de fermentación, llegando a valores de 0.4 g/L al día 9.

En Velkovska S. *et al.* (1997) también se observa que el micelio secundario comienza a disminuir en proporción luego de los cuatro días de crecimiento, llegando hasta un 50% menos luego de 10 días de crecimiento para *T. reesei*, aunque con mantenimiento de la tasa de producción de enzimas. Esto puede explicar el cese o la disminución de la tasa de producción de las enzimas luego del día 4, el cual se presume que se dio más rápido con *T. asperellum* debido a la observación de lisis de las hifas, haciendo que el medio de cultivo perdiera densidad, indicando muerte celular del hongo al día 7 de cultivo, debido que no hubo un control del pH del medio de cultivo.

Figura 3-5: Perfiles del comportamiento de las variables de respuesta en el tiempo a un pH de 5. a) Actividad Enzimática, b) pH, c) Azúcares



Se encontró que el valor máximo de actividad es de 238 U/L en un tiempo de 3.6 días, razón por la cual se decidió escoger como día de experimentación el Día 4, para fines prácticos, ya que no hay una diferencia significativa en los valores entre día 3 y 4.

3.2.3 Efecto de la proporción de carbono y nitrógeno

- **Primera evaluación del efecto del clavel, el sulfato de amonio y la urea**

A continuación se presentan los resultados del diseño de experimentos donde se variaron las concentraciones de tallo de clavel, sulfato de amonio y urea. Como se muestra en la **Tabla 3-10** la mayoría de los valores de la actividad son menores que los valores registrados cuando se utiliza el medio Mandels con tallo de clavel (**Tabla 3-6**).

Se encuentra que generalmente altas concentraciones de nitrógeno, reducen la producción de las enzimas tanto en la actividad en CMC con la actividad en Avicel®. Se obtuvieron respuestas de valor no detectado en la actividad enzimática, como por ejemplo en las corridas 4,7 y 19.

Tabla 3-10: Resultados del efecto de la concentración de urea, tallo de clavel y sulfato de amonio

Corrida	Clavel [g/100mL]	Sulfato de amonio [g/L]	Urea [g/L]	Actividad CMC [U/L]	Actividad Avicel® [U/L]
20	5.00	1.75	0.23	92	12
1	4.00	1.00	0.50	66	8
9	6.00	1.00	0.50	215	92
11	6.00	2.50	0.50	48	10
14	4.00	2.50	0.50	64	19
2	5.00	3.01	0.90	51	28
3	5.00	1.75	0.90	21	4
4	5.00	1.75	0.90	33	ND
5	3.32	1.75	0.90	52	8
7	5.00	1.75	0.90	14	ND
10	5.00	0.49	0.90	103	16
12	5.00	1.75	0.90	28	8
15	5.00	1.75	0.90	35	6
18	6.68	1.75	0.90	53	6
19	5.00	1.75	0.90	21	ND
6	6.00	2.50	1.30	107	29
8	6.00	1.00	1.30	99	14
13	4.00	1.00	1.30	52	11
16	4.00	2.50	1.30	72	19
17	5.00	1.75	1.57	46	16

Los datos se ajustaron adecuadamente a un modelo de orden dos. El diagrama de Box-Cox obtenido (Ver **Anexo G**), sugiere que se realice una transformación de la respuesta del tipo $\text{Log}_{10}(\text{Actividad en CMC})$. Con esta transformación, se obtuvo un buen ajuste de

los datos como se muestra en la **Tabla 3-11**, permitiendo un mejor análisis de la interacción de las variables con la respuesta.

El modelo cuadrático con transformación de la respuesta es significativo ya que presenta un valor $P < 0.05$. Así mismo el valor F de 6.30 reafirma la significancia del modelo con una probabilidad del 0.41% de que sea debido a ruido. En este caso los términos A^2 , B^2 y C^2 son significativos en el modelo. El valor de R^2 de 0.85 indica que el modelo ajusta. Los análisis de normalidad indican que los residuales tienen un comportamiento aleatorio, dentro del intervalo de incertidumbre y con comportamiento lineal (**Anexo G**), lo cual indica que el modelo ajusta bien en el espacio evaluado.

En la **Figura 3-7** se observa que existe una interacción significativa entre el clavel y el sulfato de amonio, donde a altas concentraciones de sulfato de amonio, la variación de la concentración de clavel no tiene un efecto sobre la respuesta, en cambio a bajas concentraciones de sulfato de amonio, la concentración de clavel si presenta una influencia sobre la actividad en CMC. A menor concentración de amonio y mayor concentración de clavel se tiene la mayor producción de enzima.

Tabla 3-11: Resultados del análisis Anova del modelo cuadrático con transformación

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor P
Modelo	1.277	9	0.142	6.30	0.0041
A-Clavel	0.054	1	0.054	2.41	0.1513
B-Sulfato de amonio	0.072	1	0.072	3.18	0.1050
C-Urea	0.023	1	0.023	1.00	0.3402
AB	0.070	1	0.070	3.13	0.1073
AC	0.000	1	0.000	0.02	0.8970
BC	0.088	1	0.088	3.91	0.0762
A^2	0.262	1	0.262	11.66	0.0066
B^2	0.491	1	0.491	21.81	0.0009
C^2	0.402	1	0.402	17.87	0.0018
Residual	0.225	10	0.023		
Falta de ajuste	0.119	5	0.024	1.11	0.4551
Error puro	0.107	5	0.021		
Total	1.502	19			
R^2	0.8127				

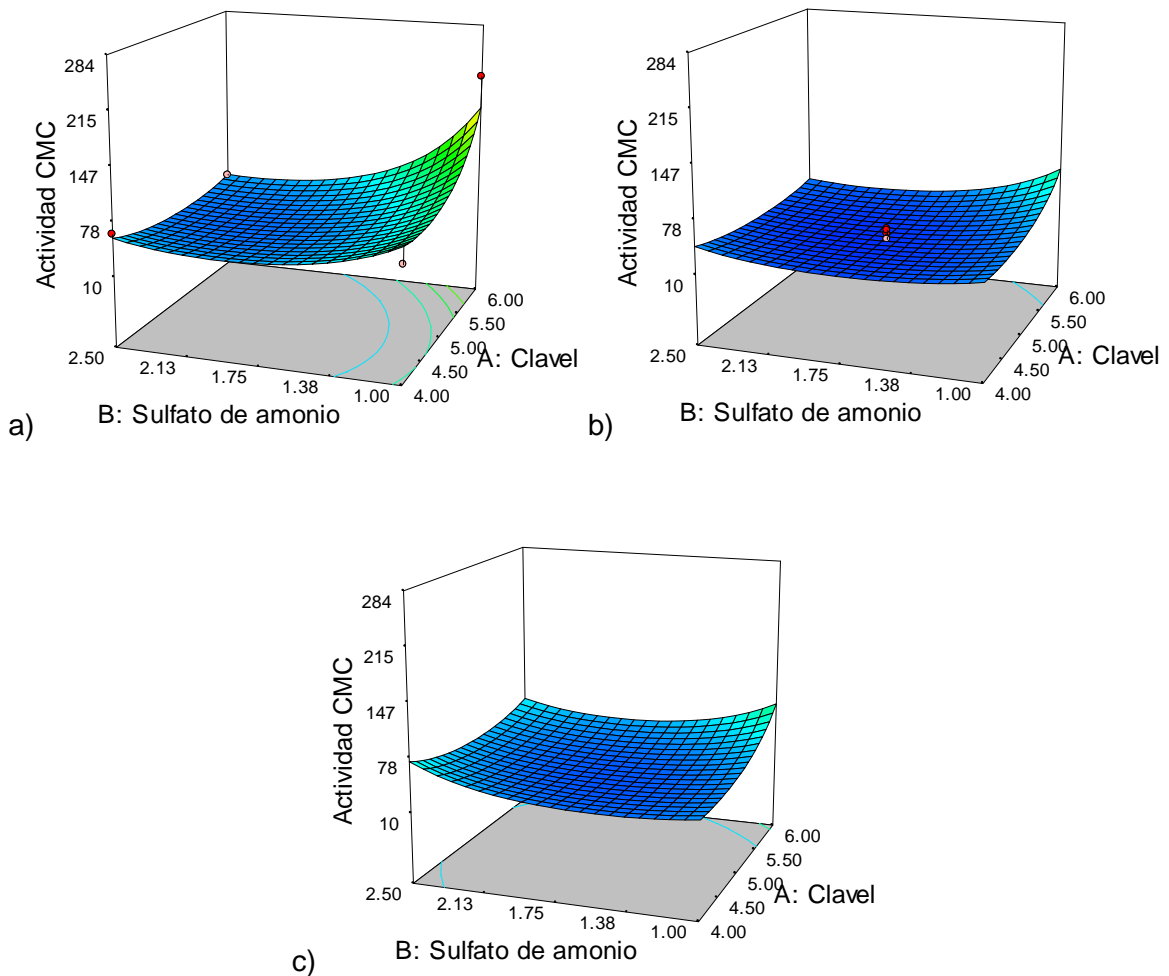
En la **Figura 3-8** se presenta la interacción de la urea con el clavel. En esta no hay una interacción, los cambios de concentración de urea, no generan un cambio en el comportamiento en el intervalo de la concentración de clavel estudiada. La ecuación que representa los datos se presenta a continuación, donde A es la concentración de tallo de clavel, B es de sulfato de amonio y C es de urea. En la ecuación 3.1, se observa que el

mayor coeficiente de la ecuación que afecta negativamente el valor de la actividad en CMC es el de la variable C, urea, indicando que ésta variable es la que más afecta la respuesta.

$$\begin{aligned} \log_{10}(\text{Actividad CMC [U/L]}) &= 6.09 - 1.08A - 0.93B - 2.68C - 0.13AB + 0.02AC \\ &+ 0.35BC + 0.13A^2 + 0.33B^2 + 1.04C^2 \end{aligned} \tag{3.1}$$

Para la actividad en CMC se presenta como máximo punto de respuesta la utilización de clavel 6.00 g/100mL, sulfato de amonio 1.00 g/L y urea 0.5 g/L, el cual equivale a una relación carbono/nitrógeno de 14.6 molar.

Figura 3-6: Superficies de respuesta obtenidas a diferentes niveles de urea.



*(a) Urea 0.5 g/L (b) Urea 0.9 g/L (c) Urea 1.3 g/L

De los resultados obtenidos se obtuvo que un aumento en la concentración de urea y de sulfato de amonio, produce un decaimiento de la producción enzimática. No se hallaron respuestas de actividad más altas a las encontradas en los experimentos presentados anteriormente, por lo tanto se propuso examinar la relación entre la concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno, dejando fijo uno de los parámetros. Como se evidenció que la urea afecta la respuesta en altas concentraciones, se busca ver la interacción del sulfato de amonio con el clavel, en un intervalo amplio de estudio manteniendo fija la concentración de urea (0,3 g/L). Los valores de la actividad en Avicel® no lograron ser coorelacionados a ningún tipo de modelo estadístico satisfactoriamente.

Figura 3-7: Interacción AB (Clavel –Sulfato de amonio). Línea roja indica 2.5 g/L de sulfato de amonio, línea negra 1.0 g/L.

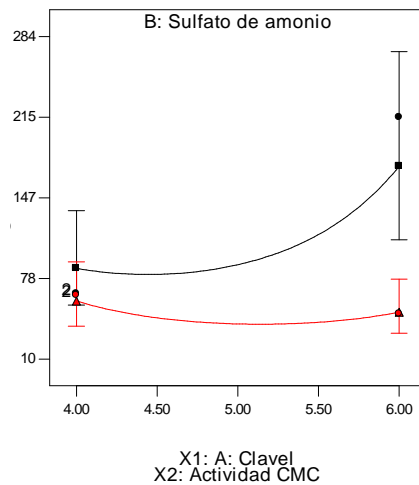
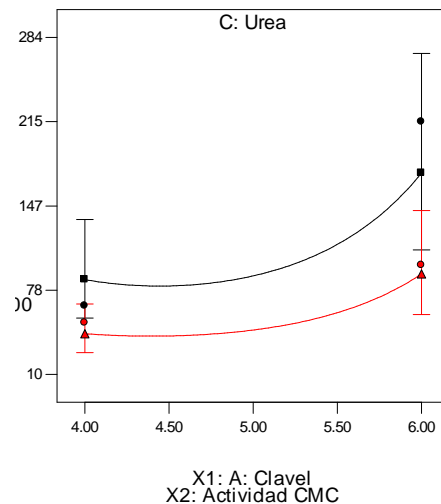


Figura 3-8: Interacción AC (Clavel-Urea). Línea roja urea 1.3 g/L, línea negra 0.5 g/L



▪ **Segunda evaluación del efecto del clavel y el sulfato de amonio**

Los resultados de la experimentación variando únicamente la concentración de clavel y sulfato de amonio se muestran a continuación. Para el análisis se tomó como variable de respuesta la actividad en CMC (**Tabla 3-12**). Utilizando las herramientas de análisis del programa Design Expert®, se seleccionó el modelo adecuado para la representación de los datos.

El modelo sugerido es el modelo cuadrático (**Tabla 3-13**), ya que presenta un valor $P < 0.05$ indicando que los términos son significativos con una probabilidad del 0.82% de que el modelo sea debido a ruido. En este caso las interacciones AB y B^2 tienen términos significativos en el modelo. El valor de R^2 de 0.85 indica que el modelo ajusta. Los análisis de normalidad se encuentran se presentan en el **Anexo G**.

Tabla 3-12: Resultados del diseño cambiando la concentración de tallo de clavel y sulfato de amonio

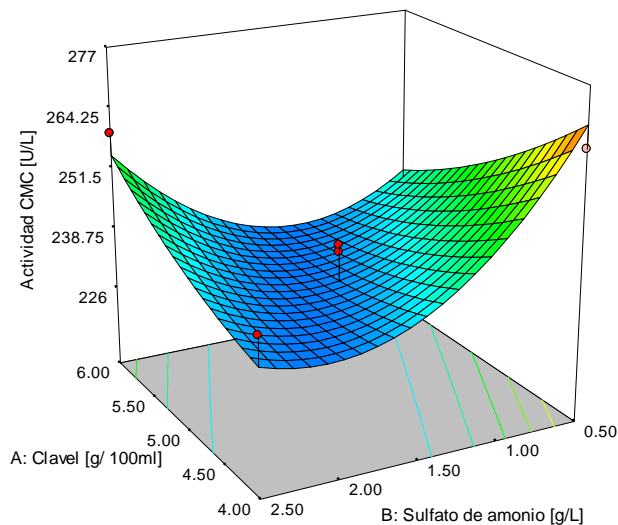
Corrida	Clavel [g/100mL]	Sulfato de amonio [g/L]	Relación C/N molar	Actividad en CMC [U/L]	Actividad en Avicel® [U/L]	pH
1	3.6	1.5	9.6	240	95	7.06
2	5.0	1.5	12.5	228	77	6.41
3	6.0	2.5	11.2	259	77	6.63
4	6.0	0.5	19.9	235	74	6.53
5	6.4	1.5	15.0	236	60	6.46
6	5.0	1.5	12.5	227	77	6.76
7	5.0	1.5	12.5	239	64	6.74
8	4.0	2.5	8.0	241	84	6.91
9	5.0	0.1	21.4	277	82	7.02
10	4.0	0.5	15.2	265	92	7.00
11	5.0	1.5	12.5	231	74	6.78
12	5.0	1.5	12.5	240	71	6.74
13	5.0	2.9	8.8	247	52	6.78

La ecuación de correlación obtenida es de forma cuadrática, teniendo en cuenta que A es la concentración de clavel en g/100 mL y B es la concentración de sulfato de amonio en g/L en el medio de cultivo. La superficie de respuesta obtenida se encuentra en la **Figura 3-9**.

$$Actividad\ CMC = 441 - 46.9A - 108.3B + 12.0AB + 2.7A^2 + 14.3B^2 \tag{3.2}$$

Tabla 3-13: Análisis ANOVA de la superficie de respuesta con modelo cuadrático

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor P
Modelo	2267.4	5	453.5	8.00	0.0082
A-Clavel	36.4	1	36.4	0.64	0.4491
B-Sulfato de amonio	222.0	1	222.0	3.92	0.0883
AB	576.6	1	576.6	10.17	0.0153
A ²	50.2	1	50.2	0.89	0.3781
B ²	1427.6	1	1427.6	25.19	0.0015
Residual	396.7	7	56.7		
Falta de ajuste	233.9	3	78.0	1.92	0.2685
Error puro	162.8	4	40.7		
Total	2664.1	12			
R ²	0.851				

Figura 3-9: Superficie de respuesta obtenida en superficie 3D

De igual forma se realizó el análisis de la Actividad en Avicel®, que no fue posible ajustar la respuesta a un modelo.

Se realizó una optimización numérica, con el fin de encontrar las condiciones en las cuales se puede encontrar la máxima respuesta dentro del campo de estudio. En la **Tabla 3-14** se muestran los límites para cada una de las variables. Se obtuvieron dos soluciones utilizando 30 diferentes puntos de partida. La solución con mayor

conveniencia, con un valor de 0.853, es la solución 1 que sugiere la utilización de 4 g de clavel/100 mL de medio con 0.5 g/L de sulfato de amonio, con una relación C/N de 15.2 molar, la cual es una relación intermedia entre el intervalo estudiado (8.0 – 21.4), con una respuesta proporcionada por el modelo de 269 U/L de actividad en CMC, la cual obtuvo un error respecto al valor experimental de 1.8%. Se analiza entonces que la mejor proporción de carbono nitrógeno para la producción de las enzimas está entre 15 y 21. El resultado óptimo obtenido es el que se utilizó para los experimentos en adelante.

Tabla 3-14: Optimización numérica de los parámetros analizados

Límites						
Nombre	Objetivo	Límite bajo	Límite alto	Peso bajo	Peso alto	Importancia
Clavel	En este intervalo	4	6	1	1	3
Sulfato de amonio	En este intervalo	0.5	2.5	1	1	3
Actividad CMC	Maximizar	226	276	1	1	3
Soluciones						
Número	Clavel	Sulfato de amonio	Actividad CMC	Conveniencia		
1	4	0.5	269	0.853		
2	4.02	0.5	269	0.847		

Para realizar un estudio del efecto del cambio de concentración del nitrógeno se debe tener en cuenta que se deben analizar los valores a la misma proporción de carbono, debido a que esta, tiene una relación directa con la proporción de biomasa en el medio de cultivo, y no se podría responder si el efecto de la disminución o aumento de la actividad enzimática fue debido a la proporción de nitrógeno.

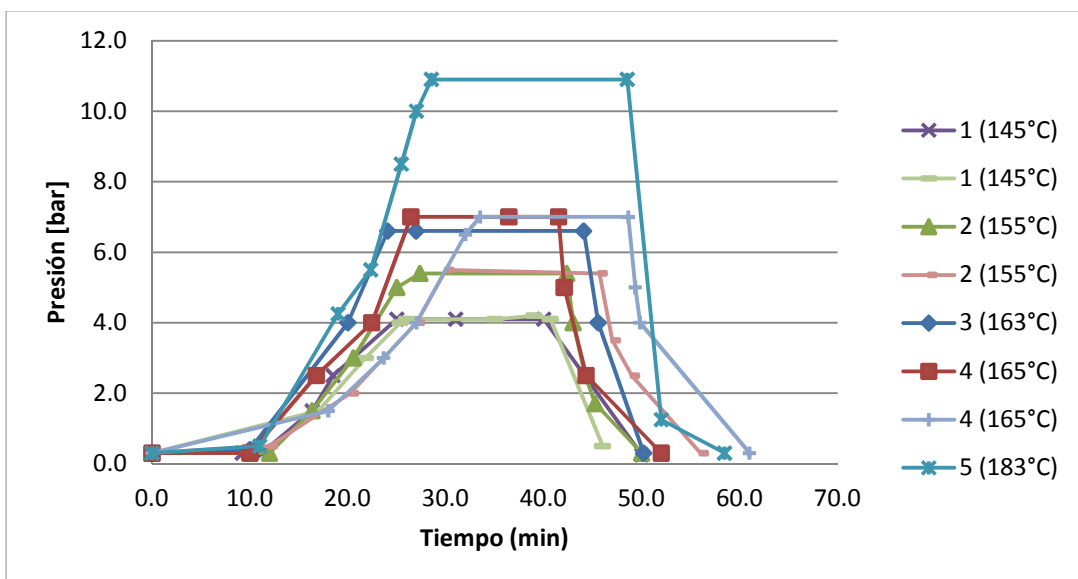
En Wen Z. *et al.* 2005b, se analizó el efecto de la concentración de fuente de carbono en el estudio del medio de cultivo encontrándose que no hay un efecto significativo de la adición de la fuente cuando se trabaja con *T. reesei* en un intervalo de 10 g/L a 30 g/L.

3.2.4 Efecto del pre-tratamiento

Se realizaron los pre-tratamientos al tallo de clavel molido, usando agua en equilibrio líquido vapor a alta presión y con ácido sulfúrico diluido. En el experimento 5, con agua caliente (183°C), la biomasa presentó una labilidad con la temperatura. Esto pudo deberse al alto contenido de extractivos que presenta el material, los cuales se pueden producir reacciones de Mallard por las altas temperaturas utilizadas. Por tal razón no se realizaron experimentos a una temperatura más alta.

En la **Figura 3-10** se presentan las curvas de presión de operación del pre-tratamiento con agua caliente. Luego de realizar el pre-tratamiento, se realizó una bajada súbita de presión, lo que permitió un rápido establecimiento de las condiciones de temperatura y presión atmosféricas. La etapa de purga duró entre 10 a 12 min, luego se registró un tiempo de calentamiento entre 9 a 18 min y el enfriamiento estuvo entre 6 a 12 min. La variación entre el tiempo de cada etapa fue dada por la presión a la que se deseaba llegar y por la dificultad de controlar el sistema regulando únicamente el flujo de calor de la plancha de calentamiento. El tiempo total de pre-tratamiento estuvo entre 46 y 60 minutos por una corrida.

Figura 3-10: Curvas de operación de los pre-tratamientos realizados



En la **Tabla 3-15** se presenta la caracterización de las fracciones obtenidas luego de los pre-tratamientos. Los pre-tratamientos del 1 al 5 son los que se realizaron con agua caliente, el experimento 6, fue el realizado con ácido sulfúrico. Hay una concentración de los azúcares estructurales en la biomasa para todos los pre-tratamientos, en comparación con la biomasa inicial, pero no existe una diferencia significativa entre el contenido de glucosa en el sólido entre cada uno de los pretratamientos.

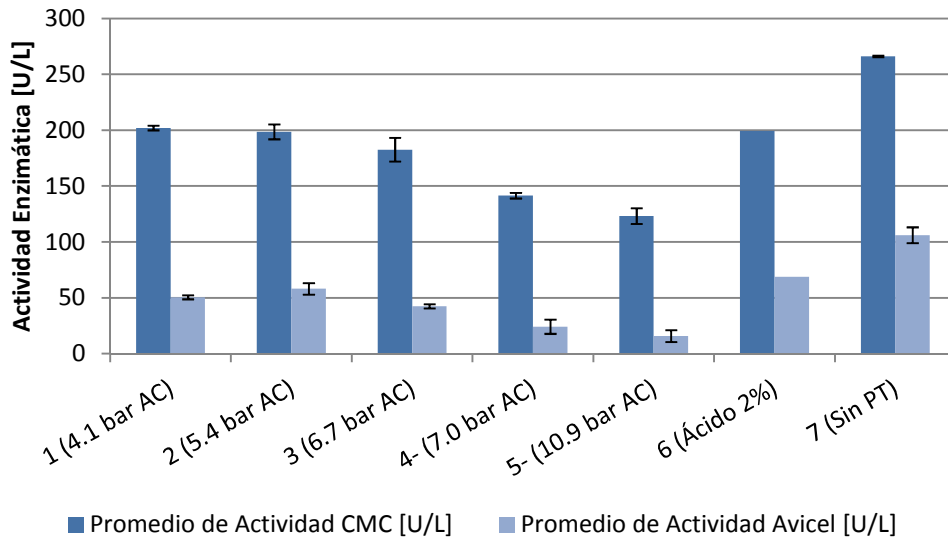
Se presenta una concentración de azúcares solubles en la fracción líquida del pre-tratamiento compuesto por celobiosa, glucosa, equivalente de xilosa y arabinosa. El azúcar en mayor proporción en la fracción líquida fue la glucosa, la cual puede ser proveniente tanto del contenido de celulosa, como del de hemicelulosa en la biomasa. La biomasa además se concentra en lignina, excepto para el experimento 1 donde la lignina se redistribuye y probablemente se solubiliza. En todos los casos hay una pérdida de glucosa en el tratamiento, que puede estar asociada a una degradación de la misma hacia inhibidores como furfural y HMF.

Tabla 3-15: Resultados de la caracterización de las fracciones obtenidas de los pre-tratamientos

	1	2	3	4	5	6
% Recuperación de sólidos	42.6	46.7	43.5	45.0	41.4	36.3
% Glucosa en el sólido	56.4	51.2	55.3	54.0	54.0	59.1
% Xilosa en el sólido	23.3	23.0	26.9	24.0	26.8	19.0
% Arabinosa en el sólido	1.1	2.1	1.7	1.6	1.3	0.0
g celobiosa en líquido/100g	0.2	0.3	0.5	0.4	0.6	0.7
g glucosa en líquido/100g	5.6	4.6	4.5	4.7	5.1	7.4
g xilosa en líquido/100 g	2.9	2.5	2.5	2.6	2.0	4.9
g arabinosa en líquido/100 g	0.2	0.4	0.7	0.7	2.2	5.4
g azúcar de la hemicelulosa/100g	3.1	2.9	3.2	3.3	4.2	10.4
% Humedad	8.88	8.95	10.06	9.03	8.3	9.31
% Lignina	4.6	5.7	8.3	7.4	7.6	6.5
% ceniza	1.5	1.0	1.0	1.4	1.2	1.0

Las condiciones de operación de los pre-tratamientos, junto con los resultados de la actividad en CMC y en Avicel se presentan en la **Figura 3-11**. Realizar un pre-tratamiento adicional a la biomasa, reduce significativamente la producción de enzimas, observando los valores obtenidos de actividad enzimática en CMC y Avicel®. Se considera entonces que al ser el tipo de sustrato la única variable que cambio en los tratamientos, para el día cuatro de incubación, el pre-tratamiento no mejora la producción de las enzimas celulolíticas.

Figura 3-11: Actividad enzimática obtenida del crecimiento del hongo en los diferentes sustratos pretratados. PT: Sin pre-tratamiento.



Es importante resaltar que al realizar el pre-tratamiento la biomasa pierde nutrientes esenciales que puede utilizar el microorganismo para su crecimiento, y se concentra en cuanto al contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina, por lo que la proporción de tallo de clavel utilizada pudo haber afectado la producción de las enzimas y probablemente también ha cambiado el día de expresión de mayor actividad celulolítica.

El pre-tratamiento realizado con ácido sulfúrico diluido en autoclave presentó un comportamiento similar al realizado con agua caliente a una presión de 4.1 bares, lo cual nos lleva a la conclusión que a las condiciones evaluadas el aumento de presión en el pre-tratamiento disminuye la posibilidad de que la biomasa sea adecuada para la producción de las enzimas en las condiciones estudiadas.

La posibilidad de la utilización de un pre-tratamiento aparte de la molienda, a pesar de no haber mostrado resultados satisfactorios de actividad enzimática como los presentados cuando no se realizó un pre-tratamiento, presenta una alternativa atractiva la cual debe ser evaluada a diferentes proporciones en el medio de cultivo. Se ha demostrado que hongos del género *Trichoderma* son utilizados para la detoxificación de los hidrolizados obtenidos luego del pre-tratamiento por explosión con vapor (Sánchez O. y Cardona C., 2005), por su capacidad para la degradación de inhibidores como el ácido acético, el furfural y derivados del ácido benzoico, dando la oportunidad de que el hongo actúe en una etapa de detoxificación y sea igualmente utilizado para la producción de las enzimas en un proceso de dos etapas, o de etapa única con la utilización de la fracción líquida y sólida luego de la realización del pre-tratamiento.

Se han desarrollado estudios para la utilización de residuos vegetales de crisantemo, los cuales fueron sometidos a un pre-tratamiento mecánico que incluyó cortado, molienda y pulverización. Con un tamaño de partícula de 850 μm , lograron la obtención de actividades enzimáticas de degradación, utilizando cepas de *Bacillus* sp en consorcio con *Streptomyces* sp (Gaitan D y Perez L., 2007), demostrando que el solo pretratamiento con molienda es adecuado para la producción de las enzimas.

Analizando la utilización de tallo de clavel molido con tamaño de partícula promedio de 500 μm , se encontró que la utilización de este tipo de sustrato con estas características reemplazó satisfactoriamente la celulosa microcristalina como fuente de carbono, alcanzando y superando las actividades enzimáticas en ese sustrato. Rocky K. y Hamidi Z. (2010), realizaron análisis utilizando un diseño de superficie de respuesta para encontrar la interacción entre la actividad CMCasa y Avicelasa con respecto al tamaño de partícula del salvado de arroz utilizando *T. reesei* QM9414. Ellos encontraron que el menor tamaño de partícula utilizado (1 mm) proporcionó una mejor actividad enzimática, resaltando que no le realizaron ningún pre-tratamiento adicional a la biomasa aparte de la molienda.

Chandra M. *et al*, (2010) encontraron que la producción de endoglucanasas es mayor cuando se realiza un pretratamiento a la biomasa utilizada. Usando un tratamiento alcalino sobre *A. annua* en autoclave, encontraron una actividad CMCasa de 0.164 U/mL

con respecto a la obtenida con sustrato sin tratar que fue de 1.85 U/mL. Además, encontraron que un tamaño de partícula de 200 μm permitió obtener un proceso en el cual aumentó la actividad enzimática. El tamaño de partícula usado en una fermentación, es muy importante ya que afecta la relación superficie/volumen, lo cual determina la fracción de sustrato el cual es inicialmente accesible al microorganismo.

3.2.5 Efecto de los microelementos y macroelementos

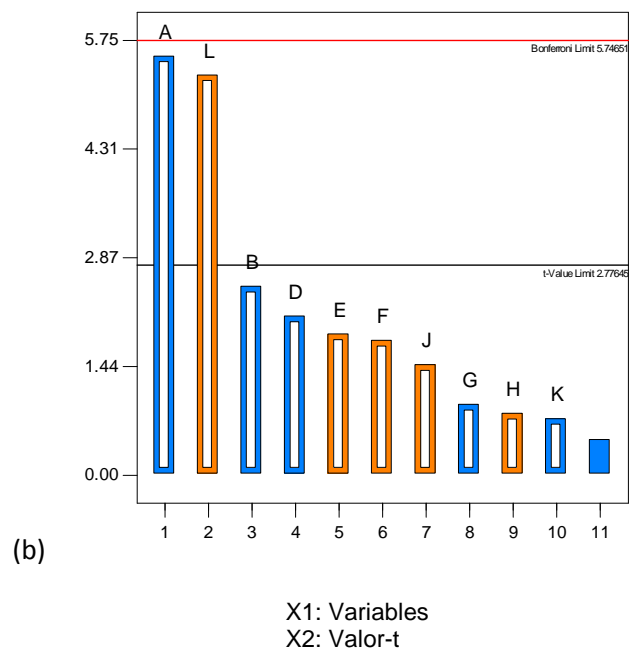
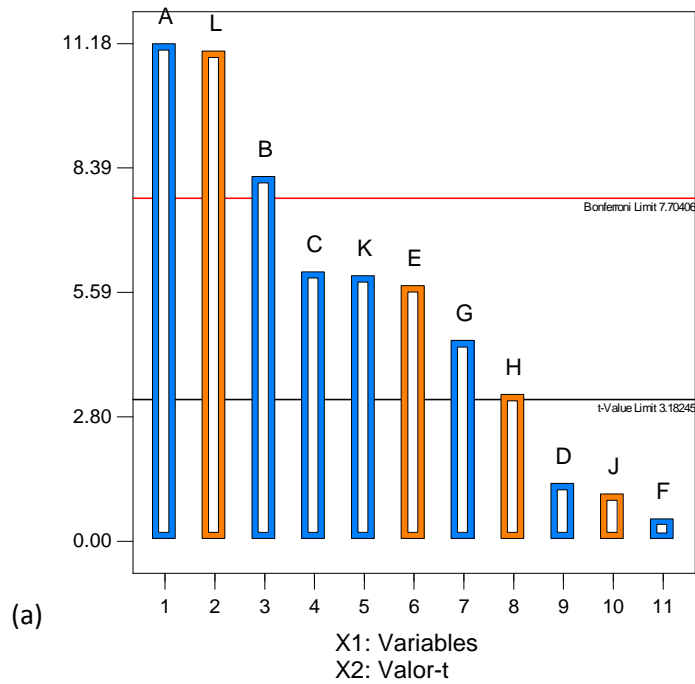
Los resultados obtenidos del diseño se presentan en la **Tabla 3-16**. Los puntos centrales del diseño, los cuales presentan todos los compuestos a una composición intermedia de los dos niveles estudiados, presentaron la actividad enzimática más alta. El experimento 3 presenta la más alta actividad enzimática en CMC, con 424 U/L. El experimento que presentó la más alta actividad en Avicel® fue el 7, con 157 U/L. El experimento 6, presentó actividades enzimáticas con un valor de cero, y la más baja concentración de proteína con un valor de 151 $\mu\text{g/mL}$. Este experimento no tuvo adición de los siguientes componentes: peptona, Tween 80, extracto de levadura y KH_2PO_4 , lo cual representa que alguno de estos compuestos incide directamente y de manera esencial en el crecimiento del hongo, y/o en la producción de las enzimas por parte del mismo.

Tabla 3-16: Resultados obtenidos del diseño de efecto de los micro y macro elementos en el medio

Corrida	Actividad CMC [U/L]	Actividad Avicel® [U/L]	pH	Proteína [$\mu\text{g/mL}$]
1	367	103	6.71	298
2	393	138	7.24	334
3	424	143	7.05	387
4	392	142	6.34	369
5	404	118	6.95	327
6	0	0	7.94	151
7	406	157	6.91	358
8	374	115	7.06	411
9	177	23	8.01	280
10	163	15	7.87	207
11	335	93	6.68	209
12	419	139	7.12	457
13	422	90	7.57	351
14	375	76	7.08	345
15	403	98	6.68	384
16	413	95	7.15	411

Para elucidar cuales con los compuestos que tienen la mayor incidencia en la producción de estas enzimas y si estos efectos son positivos o negativos, se realizaron los análisis estadísticos pertinentes que se muestran a continuación.

Figura 3-12: Diagrama de Pareto obtenido del diseño Packett-Burman realizado. (a) Actividad CMC, (b) Actividad Avicel®.



En la **Figura 3-12** se encuentra el diagrama de Pareto, donde se encuentran las variables que tienen un efecto significativo sobre la respuesta de actividad CMC y Avicel®, con el modelo propuesto, las cuales son las que superan el valor-t límite de 3.18. Se encuentra entonces que las variables A, L, B, C, K, E, G y H presentan un efecto significativo sobre la actividad en CMC, las cuales corresponden a la concentración de urea, KH_2PO_4 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Tween 80, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ respectivamente. Entre las que no proporcionan un efecto significativo en la respuesta están las variables D, J y F, las cuales corresponden a la concentración de peptona, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y extracto de levadura.

En cuanto al efecto de las variables en la actividad en Avicel® se encuentra que A y L, presentan un efecto significativo sobre la actividad, las cuales corresponden a la concentración de urea y KH_2PO_4 respectivamente. Entre las que no proporcionan un efecto significativo en la respuesta están las variables B, D, E, F, J, G, H, K y C las cuales corresponden a la concentración de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, peptona, Tween 80, extracto de levadura, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ respectivamente.

Determinando si el efecto de las variables de estudio es positivo o negativo sobre la respuesta, tanto para la actividad en Avicel® y CMC, se encontró que los compuestos urea, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, peptona, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ presentan un efecto negativo en el intervalo de concentración estudiado. Los compuestos que presentan un efecto positivo sobre la respuesta fueron Tween 80, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y KH_2PO_4 . El extracto de levadura, presenta un efecto positivo sobre la actividad en Avicel®, pero negativo sobre la actividad en CMC (**Tabla 3-18**).

De acuerdo con la proporción de los elementos desde la cantidad de tallo de clavel utilizados y lo que se encuentra de ellos en el medio líquido, puede concluirse que la fuente de potasio suministrada por el tallo de clavel, a pesar de estar en mayor proporción que la que se encuentra en el medio de sales, no sustituye la del medio de sales, probablemente porque no se encuentre biodisponible para el consumo por parte del hongo. Es interesante resaltar que el hierro es aportado en mayor proporción por el tallo de clavel (**Tabla 3-17**), y se encontró que tiene un efecto significativamente negativo sobre la actividad enzimática de lo cual se puede inferir que la cantidad de hierro necesaria para el desarrollo del hongo probablemente está de forma accesible por parte del clavel o sea suficiente la suministrada en el medio de sales, de forma que la adición de mayores concentraciones perjudica la actividad celulolítica.

El manganeso y el zinc se encuentran en mayores proporciones en el clavel que el aporte por el medio de sales. No se puede concluir con los datos que el hongo este tomando las dos fuentes de microelementos para su desarrollo, pero se puede concluir que una mayor adición de estos elementos tiene un efecto positivo directamente sobre la actividad enzimática obtenida, así que no se puede prescindir de su presencia en el medio de sales.

Tabla 3-17: Listado de los micronutrientes aportados por el medio de sales, y el tallo de clavel.

Composición	Tallo de clavel	Medio de sales
Ca [g/L]	0.04	0.11
K [g/L]	0.52	0.43
Mg [g/L]	0.02	0.04
Fe [mg/L]	3.34	1.87
Mn [mg/L]	5.00	0.83
Zn [mg/L]	2.17	0.80

Tabla 3-18: Lista de los efectos obtenidos de las variables sobre las respuestas.

Variables	Actividad en CMC			Actividad en Avicel®		
	Efecto	Suma de cuadrados	% Contribución	Efecto	Suma de cuadrados	% Contribución
A-Urea	-135.4	55000	25.0	-56.9	9729	28.6
B-CaCl ₂ *2H ₂ O	-99.2	29539	13.4	-25.7	1976	5.8
C-MgSO ₄ *7H ₂ O	-73.3	16128	7.3	-4.9	72	0.2
D-Peptona	-15.8	746	0.3	-21.6	1404	4.1
E-Tween 80	69.5	14505	6.6	19.2	1104	3.2
F-Ext. levadura	-6.1	112	0.1	18.3	1008	3.0
G-FeSO ₄ *7H ₂ O	-54.6	8951	4.1	-9.7	280	0.8
H-MnSO ₄ *H ₂ O	40.0	4790	2.2	8.4	213	0.6
J-ZnSO ₄ *7H ₂ O	12.8	494	0.2	15.0	678	2.0
K-CoCl ₂ *6H ₂ O	-72.2	15648	7.1	-7.7	178	0.5
L-KH ₂ PO ₄	133.3	53325	24.2	54.4	8872	26.1

En la **Tabla 3-19** se presenta el análisis ANOVA realizado para la respuesta actividad en CMC. El modelo factorial propuesto se encuentra significativo, con una probabilidad del 0.54% de que el modelo ocurra únicamente debido a ruido. Los términos significativos en el modelo fueron A, B, C, E, G, H, K y L.

El modelo tiene una curvatura significativa, medida como la diferencia entre el promedio de los puntos centrales y el promedio de los puntos factoriales, en el espacio del diseño, con una probabilidad del 0.70% de que sea debida a ruido. El modelo presenta un precisión de 22.320, la cual es una relación señal-ruido. Valores mayores de 4 son deseables, presentando que este modelo es adecuado para navegar en el espacio del diseño.

Tabla 3-19: ANOVA del diseño factorial con actividad en CMC

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor P
Modelo	199237.4	11	18112.5	41.18	0.0054
A-Urea	54999.7	1	54999.7	125.03	0.0015
B-CaCl ₂ *2H ₂ O	29538.8	1	29538.8	67.15	0.0038
C-MgSO ₄ *7H ₂ O	16128.1	1	16128.1	36.66	0.0090
D-Peptona	745.5	1	745.5	1.69	0.2839
E-Tween 80	14504.6	1	14504.6	32.97	0.0105
F-Ext. levadura	112.0	1	112.0	0.25	0.6486
G-FeSO ₄ *7H ₂ O	8951.5	1	8951.5	20.35	0.0204
H-MnSO ₄ *H ₂ O	4790.4	1	4790.4	10.89	0.0457
J-ZnSO ₄ *7H ₂ O	493.9	1	493.9	1.12	0.3671
K-CoCl ₂ *6H ₂ O	15647.9	1	15647.9	35.57	0.0094
L-KH ₂ PO ₄	53324.9	1	53324.9	121.23	0.0016
Curvatura	19411.6	1	19411.6	44.13	0.0070
Error puro	1319.6	3	439.9		
Total	219968.7	15			
R ²	0.9934				
Precisión	22.32				

La ecuación de correlación obtenida del modelo se presenta a continuación.

$$\begin{aligned}
 \text{Actividad CMC}[U/L] &= 422.0 - 451.3A - 124.0B - 244.4C - 10.5D + 34.8E \\
 &- 6.1F - 5.5G + 10.0H + 3.2J - 9.0K + 66.7L
 \end{aligned}
 \tag{3.3}$$

En la **Tabla 3-20** se presenta el análisis ANOVA realizado para la respuesta actividad en Avicel®. El análisis Anova del modelo factorial se encuentra significativo, con una probabilidad del 2.98% de que el modelo ocurra únicamente debido a ruido.

En este caso A, y L son términos significativos del modelo. Para mejorar el ajuste del modelo no se tomó la variable C, MgSO₄*7H₂O como parte del modelo ya que presentaba un valor P que superaba por mucho el valor de 0.10. Un valor F en curvatura de 22.97 implica que hay una curvatura significativa, medida como la diferencia entre el promedio de los puntos centrales y el promedio de los puntos factoriales, en el espacio del diseño. Hay una probabilidad del 0.87% de que el valor F de la curvatura sea debida a ruido. El modelo presenta un precisión adecuada que sirve para navegar en el espacio del diseño.

Tabla 3-20: ANOVA del diseño factorial con actividad en Avicel®

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor P
Modelo	25440.2	10	2544.0	8.02	0.0298
A-Urea	9728.6	1	9728.6	30.67	0.0052
B-CaCl ₂ *2H ₂ O	1975.7	1	1975.7	6.23	0.0671
D-Peptona	1403.5	1	1403.5	4.42	0.1032
E-Tween 80	1104.3	1	1104.3	3.48	0.1355
F-Ext. levadura	1008.0	1	1008.0	3.18	0.1492
G-FeSO ₄ *7H ₂ O	279.6	1	279.6	0.88	0.4010
H-MnSO ₄ *H ₂ O	213.3	1	213.3	0.67	0.4583
J-ZnSO ₄ *7H ₂ O	677.8	1	677.8	2.14	0.2176
K-CoCl ₂ *6H ₂ O	177.8	1	177.8	0.56	0.4956
L-KH ₂ PO ₄	8871.6	1	8871.6	27.97	0.0061
Curvatura	7285.0	1	7285.0	22.97	0.0087
Residual	1268.8	4	317.2		
Falta de ajuste	71.7	1	71.7	0.18	0.7002
Error puro	1197.1	3	399.0		
Total	33994.0	15			
R ²	0.9525				
Precisión	9.175				

La ecuación de correlación obtenida del modelo se presenta a continuación.

$$\begin{aligned}
 \text{Actividad avicel}[U/L] &= 87.37 - 189.8A - 32.1B - 14.4D + 9.6E + 18.3F - 1.0G \\
 &+ 2.1H + 3.8J - 1.0K + 27.2L
 \end{aligned}
 \tag{3.4}$$

En la **Tabla 3-21**, se encuentran registrados los valores predichos por el modelo y los resultados experimentales. Los valores fueron predichos satisfactoriamente para los experimentos que trabajaron las variables en los límites -1 y 1 del diseño, como se esperaba.

Como se vio anteriormente la urea presenta un efecto negativo en la actividad enzimática, probablemente debido a una represión del crecimiento del microorganismo por la gran cantidad de nitrógeno que el medio de cultivo ya contiene, como el nitrógeno derivado de la biomasa, del sulfato de amonio, de la peptona, y del extracto de levadura. Estudios de la actividad biológica de *T. asperellum* frente a entomopatógenos, proponen concentraciones de urea de 0.3g/L y 1.4 g/L en el medio de cultivo, como las requeridas

para el crecimiento del hongo (Soller M. *et al.*, 2010), las cuales fueron las mismas a las usadas inicialmente en este estudio.

Se encontró que una mayor concentración de Tween 80 proporcionada al medio de cultivo, presenta un efecto positivo incrementando la producción de la enzima (Liu J, *et al.* 2006). Se ha encontrado que el Tween 80 tiene un efecto sobre la morfología del hongo en ensayos realizados con *T. reesei* (Dominges F.C., *et al.*, 2000). El uso de Tween 80 en el medio de fermentación inhibe la formación de pellets, condición que favorece la producción de enzimas, resultados que concuerdan con los obtenidos en este trabajo.

Tabla 3-21: Valores experimentales y predichos para las variables de respuesta analizadas en el diseño

Corrida	Experimental		Predicción	
	Actividad CMC [U/L]	Actividad Avicel® [U/L]	Actividad CMC [U/L]	Actividad Avicel® [U/L]
1	367	103	367	101
2	393	138	393	141
3	424	143	321	84
4	392	142	392	144
5	404	118	321	84
6	0	0	0	2
7	406	157	321	84
8	374	115	321	84
9	177	23	177	26
10	163	15	163	13
11	335	93	335	95
12	419	139	419	136
13	422	90	422	87
14	375	76	375	73
15	403	98	403	95
16	413	95	413	97

Los microelementos como el manganeso y el zinc aportan significativamente en la actividad celulasa, encontrándose que la suplementación adicional a la aportada por el tallo de clavel, de estos dos elementos en el medio de cultivo incrementa la producción de las enzimas, sin llegar a un nivel inhibitorio (ver **Tabla 3-17**). En Chandra M. *et al.*, (2010), se encontró que una disminución de los componentes del medio de sales hasta en un 50%, no afectó la producción de endoglucanasas, para estudios realizados con *A. annua* con *T. citrinoviride*, probablemente porque el sustrato utilizado no tiene una alta

biodisponibilidad de los elementos, o por que los requerimientos nutricionales de esta cepa son mayores.

Se presenta entonces la oportunidad de disminuir las concentraciones o eliminar los compuestos que no tienen un efecto adecuado sobre la actividad enzimática, ya sea porque son suplementados por la fuente de carbono utilizada, o debido a un efecto negativo presentado sobre la producción de las enzimas.

La importancia la fuente de fosfato sobre la producción de las enzimas se vio evidenciada. Wen Z. *et al.* (2005a) encontraron que la eliminación de KH_2PO_4 produce una baja actividad celulolítica, pero no encontraron un efecto significativo al realizar una no adición de elementos traza, fuentes de nitrógeno y magnesio, pero si un mejoramiento en la actividad al no adicionar fuente de calcio, resultados similares a los obtenidos en este trabajo.

Comprobación del modelo

Se realizó una optimización numérica la cual incluyó todas las variables estudiadas, utilizando como restricción los límites estudiados de las variables (cero y máximo) y buscando maximizar las respuestas analizadas en el diseño (Actividad en CMC y en Avicel®), las dos respuestas fueron combinadas en una función global, la cual fue maximizada desde 30 puntos aleatorios de inicio. El algoritmo utilizado por el programa es un algoritmo general no lineal con restricciones. De las soluciones encontradas, se escogió una solución con alta deseabilidad y se realizó el montaje experimental. La concentración del medio realizado se encuentra en la **Tabla 3-22**.

Tabla 3-22: Composición del medio utilizado para la comprobación del modelo.

Compuesto	Concentración
Urea [g/L]	0.02
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [g/L]	0.12
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [g/L]	0.04
Peptona [g/L]	1.31
Tween 80 [mL/L]	1.99
Ext. levadura [g/L]	0.27
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [mg/L]	9.63
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [mg/L]	1.50
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [mg/L]	2.17
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [mg/L]	0.51
KH_2PO_4 [g/L]	0.24

Se obtuvieron valores experimentales muy cercanos de la actividad en CMC, con respecto al modelo ajustado (**Tabla 3-23**). Los valores sombreados representan los valores promedio de actividad, obtenidos analizando los azúcares por DNS. La actividad

enzimática en Avicel® se predijo por el modelo con un error del 2% y la actividad Avicel® con un error del 30% con respecto a los valores experimentales. La Actividad en CMC no presentó una diferencia significativa entre si es determinada por HPLC, con DNS, con respecto al valor que predijo el modelo.

Tabla 3-23: Respuestas obtenidas del ensayo de comprobación del modelo

Cepa	Actividad CMC [U/L]	Actividad Avicel® [U/L]	Actividad Xilanasa [U/L]	Proteína [ug/mL]	pH final
<i>T. asperellum</i>	414a	134a	943a	484.1	7.30
	412a	130a	849a	443.7	7.35
	413b	132b	921b		
	401c	180c	931c		
	423d	93d			
<i>T. reesei</i>	27	13		262.5	7.99
	16	8		254.4	7.96
Control	0	0		323.9	4.91
Rendimientos y productividades promedio					
	P [U/(L*h)]	Y [U/g clavel]	Y [U/mg proteína]		
CMCasa	4.3	11.3	0.89		
Avicelasa	1.4	3.6	0.28		
Xilanasa	9.6	25.3	1.98		

a) Determinación de los azúcares hidrolizados con DNS. b) promedio de los valores obtenidos con DNS. c) Determinación de los azúcares hidrolizados con HPLC. d) Valores aproximados por el modelo.

Como se ha observado en ensayos anteriores, el ensayo para la determinación de la actividad en Avicel®, siempre está sujeto a mayores variaciones que el de actividad en CMC, debido a que el Avicel® es un sustrato insoluble, el cual se precipita evitando un contacto adecuado con las enzimas solubles en el medio líquido y su comportamiento puede ser mas variable dentro del tiempo de reacción.

Se encontró además un valor importante de actividad endo-xilanasa en el líquido analizado el cual indica que el microorganismo es productor de estas enzimas en una buena proporción, y de esta forma se está obteniendo un complejo enzimático en solución líquida, el cual contiene los requerimientos en enzimas adecuadas para el tratamiento del tallo de clavel y biomásas con composición química similar. No se encontraron diferencias significativas entre la actividad xilanasa determinada por DNS y por HPLC.

El experimento de control positivo con *T. reesei* produjo actividades promedio de 22 U/L en CMC y 11 U/L en Avicel, presentando una diferencia del 95% y 88% con respecto a los valores obtenidos por *T. asperellum*. Se observa que el medio propuesto es muy diferente en su composición con respecto al medio Mandels, razón por la cual se disminuyó la actividad enzimática producida por esta cepa utilizando el medio mejorado obtenido para *T. asperellum*.

Al comparar los resultados obtenidos con otros investigadores, se tomó en cuenta que no se encontraron registros de la actividad enzimática utilizando la cepa *T. asperellum*, por lo que se comparó la producción, con los realizados con otras cepas del género *Trichoderma* (**Tabla 3-24**). Olsson L. *et al.* (2003), utilizó la cepa *T. reesei* RUT C-30 para el crecimiento en fermentador por lotes de 3 L utilizando celulosa microcristalina y pulpa de remolacha y encontró actividades endoglucanasa (450 U/L) y exoglucanasa (1200 U/L) similares a las obtenidas en este trabajo en un 91% y 76 % respectivamente, utilizando un medio con relación 1:1 de celulosa y pulpa de remolacha. Se encuentra entonces que para esta cepa de *Trichoderma* se determinan mayores unidades de actividad xilanasas al igual que con *T. asperellum*.

En general, al comparar la producción de las enzimas obtenidas por *T. asperellum*, con las reportadas por otros investigadores (Zhang Q., *et al.*, 2007; Chandra, M., *et al.*, 2010 y Juhász T. *et al.*, 2005), se presenta que *T. asperellum* produjo actividades menores. La utilización de un pretratamiento adecuado y una mayor escala de producción proporcionan mayores actividades. Se espera que realizando la producción a una escala mayor, y utilizando un inóculo líquido en el mismo medio que el de producción, se alcancen mayores actividades enzimáticas.

Tabla 3-24: Valores de actividad celulolítica obtenidas por otras cepas de *Trichoderma*.

Sustrato	AEN [U/mL]	AEX [U/mL]	AEN [U/ mg proteína]	AEX [U/mg proteína]	Referencia
Celulosa	0.19	0.12	0.63	0.53	Olsson L. <i>et al.</i> (2003)
Pulpa de remolacha	0.09	0.07	0.17	0.53	
Celulosa /Pulpa de remolacha	0.45	1.2	0.39	0.98	Zhang Q., <i>et al.</i> (2007)
Glucosa - Avicel	2.4	2.9			
A. annua	0.164		0.18		Chandra, M., <i>et al.</i> (2010)
A. annua con tratamiento alcalino	1.85		5.59		
Solka Flock ®	9	119.1	4.8	63.0	
Abeto pretratado con vapor	16	64.62	7.2	34.2	
Sauce pretratado con vapor	8	12.18	9.6	6.4	Juhász T. <i>et al.</i> (2005)
Rastrojo de maíz pretratado con vapor	6	52.08	5.7	27.5	

AEN: Actividad endoglucanasa, AEX: Actividad exoglucanasa

Los azúcares contenidos al realizar las pruebas de actividad enzimática se presentan en la **Tabla 3-25**. Hay una proporción de celobiosa más alta en la actividad con Avicel®, mostrando que las enzimas exoglucanasas producen más unidades de celobiosa que las endoglucanasas. En el hidrolizado obtenido del xilano, se encontró que inicialmente no

había concentración de xilosa en la muestra, y solo al adicionar el sustrato y llevar a cabo la reacción se encontró xilosa en solución. La productividad promedio obtenida fue de 4.6 y 1.4 U/L/h en Avicel® y CMC respectivamente. El rendimiento obtenido fue de 10.3 y 3.3 U/g clavel en CMC y Avicel® respectivamente.

En la **Tabla 3-26** se presenta la composición del residuo sólido luego de la producción de enzimas. Se obtuvo una buena reducción de los residuos de clavel, teniendo en cuenta que la recuperación de sólidos fue del 33%, contando el peso del residuo y la biomasa del hongo ya que el micelio no se separó. El sustrato aún contiene importantes contenidos de glucosa, xilosa y arabinosa, lo cual lo hace atractivo para otros procesos de hidrólisis. El consumo de azúcares durante el proceso fue del 39%, que representan los azúcares solubilizados que permanecieron en el líquido y los que fueron consumidos por el hongo dentro de sus procesos metabólicos.

Tabla 3-25: Caracterización de los azúcares obtenidos por HPLC al registrar los hidrolizados obtenidos en la determinación de actividades enzimáticas

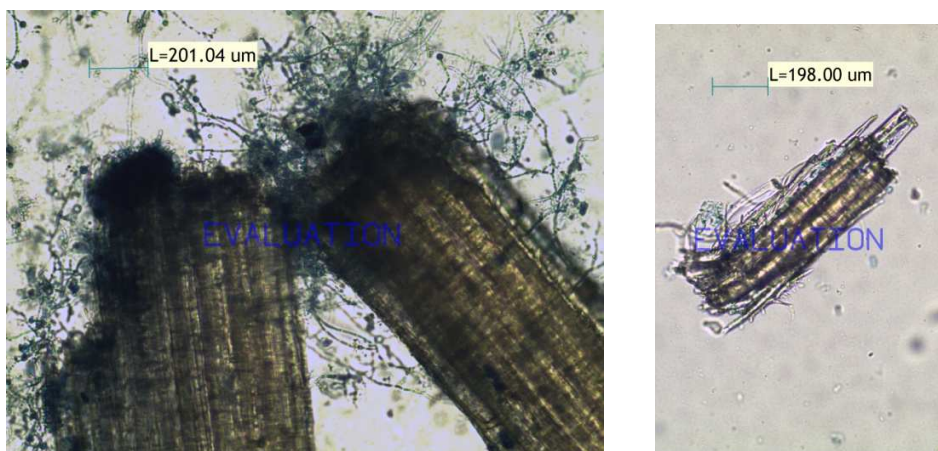
Azúcar\Sustrato	Actividad celulasa				Actividad xilanasas		
	Avicel®	Avicel®	CMC	Buffer	Xilano	Xilano	Buffer
Celobiosa [mg/mL]	0.61	0.72	0.32	-	-	-	-
Glucosa [mg/mL]	4.05	4.68	6.75	2.42	2.09	2.16	2.13
Xilosa [mg/mL]	-	-	-	-	4.19	4.32	-
Arabinosa [mg/mL]	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3-26: Caracterización del sustrato final recuperado luego de la producción de las enzimas

	Ensayo 1	Ensayo 2
% de recuperación de sólidos	32.5	33.5
% Glucosa	56.6	55.4
% Xilosa	34.8	35.1
% Arabinosa	5.4	5.3

En la **Figura 3-13** se observa como la adhesión del hongo sobre el tallo de clavel se hace visible, donde se detalla que ocurren mayores adhesiones sobre las puntas de las fibras. Es de resaltar que la utilización de sustratos insolubles, pueden representar un problema en la recuperación de las enzimas, debido a que parte de la enzima producida se pierde permanentemente por el fenómeno de absorción sobre la superficie sólida (Dominges F.C., *et al.*, 2000). Se cree además que la expresión consecutiva de celulasas, puede solo ocurrir durante la esporulación, razón por la cual es tan importante observar la morfología y relacionarla con la producción de las enzimas, en este caso la formación de clamidosporas.

Figura 3-13: Coloración con azul de lactofenol. Izquierda, medio inoculado e incubado, derecha, control abiótico.



Adicionalmente se observa la formación de micelio secundario por la cepa *T. asperellum* en el día 4 de incubación. Para todos los experimentos realizados, se observó este comportamiento de formación de clamidosporas y micelio ramificado similar al encontrado en Velkovska S. *et al.* (1997).

PROCESO PROPUESTO

Con la composición del medio propuesto (**Tabla 3-27**) se esperan tener actividades enzimáticas de 401 U/L en CMC. Se propone recuperar las enzimas en el medio líquido, hacer un paso de purificación del líquido por filtración y almacenar verificando su actividad enzimática. El procedimiento propuesto se encuentra en la **Figura 3-14**.

Tabla 3-27: Composición del medio propuesto para la producción de celulasas

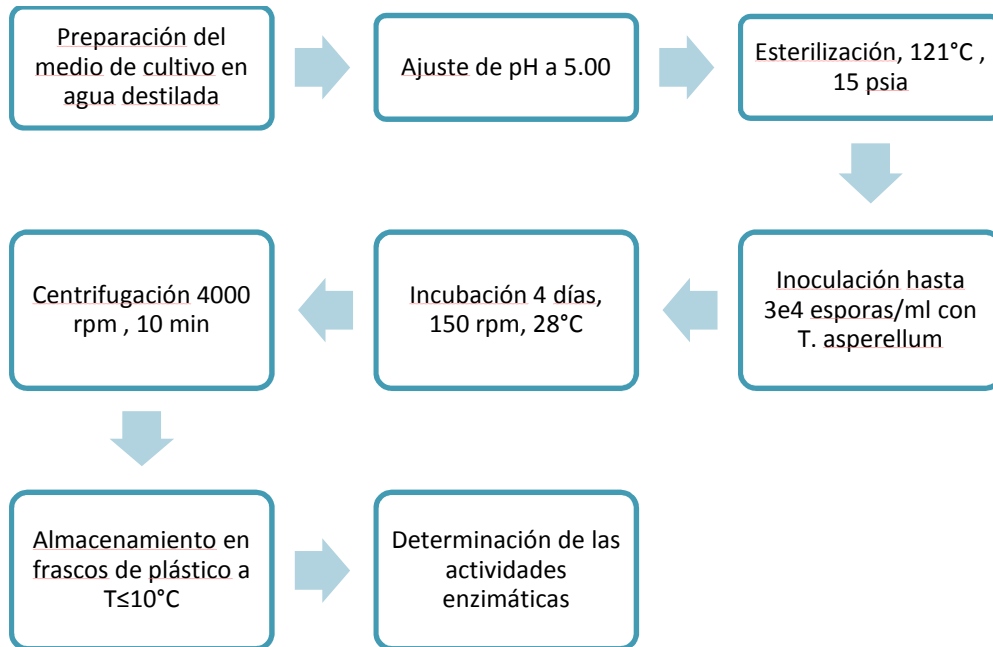
Compuesto	Valor
Clavel [g/100 mL]	4.00
(NH ₄) ₂ SO ₄ [g/L]	0.05
Urea [g/L]	0.02
CaCl ₂ *2H ₂ O [g/L]	0.12
MgSO ₄ *7H ₂ O [g/L]	0.04
Peptona [g/L]	1.31
Tween 80 [mL/L]	1.99
Ext. levadura [g/L]	0.27
FeSO ₄ *7H ₂ O [mg/L]	9.63
MnSO ₄ *H ₂ O [mg/L]	1.50
ZnSO ₄ *7H ₂ O [mg/L]	2.17
CoCl ₂ *6H ₂ O [mg/L]	0.51
KH ₂ PO ₄ [g/L]	0.24

El sólido resultante, luego de la centrifugación, se propone que sea secado hasta peso constante a 60°C y sea utilizado para restructuración de suelos, ya que tiene un buen contenido de fuente de carbono y al no poder retirársele la biomasa del hongo, esta provee igualmente nutrientes al suelo.

En el caso de sobrevivencia de las esporas y posible germinación en el suelo, se espera que la cepa de *T. asperellum* no represente un efecto negativo en el suelo, debido a que es un microorganismo nativo de suelos colombianos, el cual se ha conocido por su efecto antagónico hacia hongos fitopatógenos (Soller M. *et al.*, 2010).

La etapa de centrifugación del medio de cultivo para la obtención de las enzimas crudas, pueden ser cambiada a una filtración al vacío, dependiendo de un análisis económico y disponibilidad de equipos local. Los costos de la enzima, pueden ser reducidos evitando los pasos de transporte y formulación. Para ello es fundamental que la producción de las enzimas se haga *in situ*, con una aplicación local, de forma que sea transportado solo en cortas distancias, y las enzimas no sean almacenadas por un largo periodo de tiempo, de modo que se pierda su actividad. En el caso de la industria de la floricultura, la utilización en el sitio mismo de producción de los residuos producidos, presenta una alternativa llamativa, debido a la cantidad producida, aproximadamente 4 toneladas de residuo mensualmente.

Figura 3-14: Procedimiento propuesto para la obtención de las enzimas celulolíticas



A pesar de que se desarrolló un crudo de enzimas sobre un sustrato en específico, la utilización de las mismas se ve afectada por la variabilidad de la composición de la biomasa obtenida de los cultivos. Esta variabilidad puede ocasionar una reducción de la actividad enzimática obtenida, en un proceso de producción de las enzimas, y el efecto

que tendrían las enzimas en el proceso de sacarificación de biomasa. Una alternativa que ha sido estudiada, es la utilización del caldo de fermentación entero, incluyendo la masa celular del hongo, para evitar la costosa remoción de las células y los pasos de formulación de enzimas (Merino S. y Cherry J., 2007).

En el caso del proceso propuesto, se realizaría únicamente el proceso de remoción de la biomasa residual, por centrifugación o filtración, y la utilización del crudo obtenido sin remoción de hifas ni esporas del hongo, para la sacarificación de los demás residuos vegetales obtenidos en los invernaderos de producción de flores. Los azúcares producidos, tienen el potencial de ser utilizados específicamente como fuente de carbono para la producción de bioinsumos con microorganismos antagónicos para el tratamiento de hongos fitopatógenos que atacan los cultivos de flores.

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

- La verificación de la actividad enzimática de *T. asperellum* se realizó utilizando CMC y celulosa cristalina como fuente de carbono, logrando crecimiento del hongo en medio sólido y en medio líquido, y una actividad enzimática en medio líquido con celulosa de 216 U/L en CMC y 89 U/L en Avicel®.
- En el día 4 de incubación se logra la mayor concentración de enzimas sobre el intervalo estudiado (día 1- 11).
- El suplemento en exceso de fuente de nitrógeno produce un decrecimiento en la actividad enzimática. A valores bajos de urea en el medio de cultivo (0.50 g/L), altas concentraciones de sulfato de amonio producen una baja actividad enzimática, con valores máximos de 69 U/L en CMC y 19 U/L en Avicel®. Similarmente, a mayores concentraciones de urea (0.90 – 1.30 g/L) se produce una baja concentración de enzimas teniendo como máxima 107 U/L en CMC y 29 U/L en Avicel®.
- Las mejores condiciones de relación carbono/nitrógeno para la producción de celulasas son 3.64% en bs de tallo de clavel y 0.5 g/L de sulfato de amonio, produciendo, 269 U/L en CMC y superando en un 19.7% la actividad obtenida con celulosa microcristalina como fuente de carbono.
- Tanto el clavel, como la fuente de sulfato de amonio, presentaron efectos significativos sobre la actividad en CMC y se ajustaron satisfactoriamente a un modelo cuadrático.
- Se concluye que la realización de un pre-tratamiento posterior a la molienda ya sea con agua a alta presión o con ácido sulfúrico diluido no mejora la producción de las enzimas celulolíticas.
- Con el diseño Plackett-Burman realizado se determinó que la urea, el $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, el $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, el $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y el $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ presentan un efecto negativo significativo sobre la producción de las enzimas celulolíticas y el Tween 80, el $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, y el KH_2PO_4 un efecto positivo significativo, lo cual permitió desarrollar un medio de cultivo más acorde a los requerimientos nutricionales de *T. asperellum* para la producción de celulasas.

- El medio mejorado propuesto, con bajas concentraciones de urea y fuente de magnesio y con una alta concentración de Tween, proporciona una actividad de 413 U/L en CMC, de 132 U/L en Avicel® y 920 U/L en xilano, superior a los valores obtenidos en la etapa anterior en un 35% y 30% respectivamente para las actividades celulolíticas.
- La cepa *T. asperellum* se presenta como un microorganismo promisorio para la producción de las enzimas hidrolíticas a una escala mayor a matraz por las actividades celulasas y endoxilanasas logradas con ella.

4.2 Recomendaciones

- Se recomienda evaluar la efectividad del complejo celulolítico obtenido, sobre tallo de clavel y otros sustratos que tengan una composición similar, junto con la estabilidad en el tiempo del crudo obtenido, para determinar su vida útil.
- De acuerdo con los resultados obtenidos en la realización de esta tesis, se recomienda como siguiente paso, la realización un estudio económico a nivel piloto, utilizando los parámetros aquí encontrados, para evaluar la factibilidad económica del mismo y su viabilidad en la economía local.
- Debido al potencial de producción de enzimas no solo en celulasas sino también en xilanasas, se propone que la investigación de producción de la actividad α -arabinosidasa, manasa, α -galactosidasa, PFasa, β -glucosidasa y poligalacturonasa entre otras con la cepa *T. asperellum*.
- Para ampliar el conocimiento sobre el fenómeno ocurrido entre la producción de biomasa y la producción de las enzimas, se recomienda realizar un estudio de la evaluación de la biomasa del hongo, utilizando la caracterización de compuestos típicos de las células como la glucosamina.
- Se recomienda evaluar el efecto de los pre-tratamientos sobre la biomasa en diferentes proporciones y realizando un perfil en el tiempo de la producción de las enzimas obtenidas.
- Se recomienda examinar la producción de las enzimas en otras fuentes importantes de carbono, como residuos del bagazo de la caña y de otras industrias agrícolas, así como evaluar su producción utilizando cultivos energéticos.

Bibliografía

- [1] Ahamed, A. y Vermette, P. (2008). Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 40, 399–407.
- [2] Ahamed, A. y Vermette, P. (2009). Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production. *Bioresource Technology*, 100, 5979–5987.
- [3] Ahamed y Vermet, (2010). Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube airlift bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 49(3), 379–387.
- [4] Ahmed, S. *et al.* (2009). Production and purification of cellulose degrading enzymes from a filamentous fungus *Trichoderma harzianum*. *Pakistan Journal of Botany*, 41(3), 1411-1419.
- [5] Aiello C. *et al.* (1996). Effect of alkaline treatments at various temperatures on cellulose and biomass production using submerged sugarcane bagasse fermentation with *Trichoderma reesei* QM 9414. *Bioresource technology*, 57, 13-18.
- [6] Balat, M. (2010). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy Convers Manage*, 52(2), 858–875.
- [7] Biely, P. & Tenkanen, M. (1998). Enzymology of hemicellulose degradation, *Trichoderma and Gliocladium*, 25–47.
- [8] Biofuels International. (2011). Technology News Biofuels. Edición 6, volumen 5, Agosto de 2011.
- [9] Busto M.D. *et al.* (1996). Location, kinetics and stability of cellulases induced in *Trichoderma reesei* cultures. *Bioresource Technology*, 57, 187-192.
- [10] Camassola M y Dillon A.J.P. (2007). Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2196–2204.

- [11] Carlile M, *et al.* (2001). *The Fungi*. Second Edition. Academic Press.
- [12] Chandra, M., *et al.* (2010). Optimization of cellulases production by *Trichoderma citrinoviride* on marc of *Artemisia annua* and its application for bioconversion process. *Biomass and Bioenergy*, 34(5), 805-811.
- [13] Cunningham, R y López G. (1994). Etanol de lignocelulósicos: tecnología y perspectivas. Programa CYTED.
- [14] Dixon M. y Webb E. (1979), *Enzymes*. Academic Press, Third edition.
- [15] Dominges F.C., *et al.* (2000). The influence of culture conditions on mycelia structure and cellulose production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial technology*, 26, 394-401.
- [16] Duarte A. (1993). Introducción a la ingeniería bioquímica. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- [17] Fedecolflores (2010). Cadena productiva de flores. Disponible en: <http://www.fedecolflores.org.co/infocadena.html>. Consultado en Marzo de 2010.
- [18] Fernando, S. *et al.* (2006). Biorefineries: Current Status, Challenges, and Future Direction. *Energy Fuels*, 20 (4), 1727-1737.
- [19] Fraizer W.C. (1980) *Microbiología de los alimentos*. 2da edición. Editorial Acribia. España.
- [20] Fortes L, *et al.* (2010). Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biochemical Engineering Journal*, 15, 72–78.
- [21] Gaitan D. y Perez L. (2007). Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- [22] Garcés E. *et al.* (2003). Morfología y clasificación de hongos. Facultad de ciencias, Universidad Nacional de Colombia.
- [23] Hector R., Hughes S. and Liang-Li H. (2008). Developing Yeast Strains for Biomass-to-Ethanol Production. *Biomass Magazine*. Disponible en: www.biomassmagazine.com
- [24] Hendriks A. y Zeeman G. (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100(1), 10–18.
- [25] Hiden A. *et al.* (2011). Production and characterization of cellulases and hemicellulases by *Acremonium cellulolyticus* using rice straw subjected to various

- pretreatments as the carbon source. *Enzyme and Microbial Technology*, 48, 162–168.
- [26] Himmel M. *et al.* (1994). Enzymatic conversion of biomass for fuels production: Cellulase Production Technology. 188 – 217, ISBN/ISSN: 0841229562.
- [27] Hoyos L, *et al.* (2009). Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 615–631.
- [28] Ibrahim M. y Malik K. (1996). Cellulase production by *Cellulomonas biazotea* cultured in media containing different cellulosic substrates. *Bioresource technology*, 59, 21-27.
- [29] Jacques K. *et al.* (2003). The Alcohol Textbook, Cuarta Edición. Alltech Inc
- [30] Ju L. y Afolabi O. (1999). Wastepaper Hydrolysate as Soluble Inducing Substrate for Cellulase Production in Continuous Culture of *Trichoderma reesei*. *Biotechnology Progress*, 15, 91-97.
- [31] Juhász T. *et al.* (2005). Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry*, 40, 3519–3525.
- [32] Klass D. (1998). Biomass for renewable energy, fuels and chemicals, Ed. Academic press, 656 pp.
- [33] Koivula, A., Linder, M. y Teeri, T. T. (1998). Structure-function relationships in *Trichoderma* cellulolytic enzymes. *Trichoderma and Gliocladium*, 3-24.
- [34] Kubicek C. (1992). The cellulase proteins of *Trichoderma reesei*: Structure, Multiplicity, Mode of Action and Regulation of Formation. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 45, The British Library.
- [35] Lo Ch. *et al* (2010). Cellulase production by continuous culture of *Trichoderma reesei* Rut C30 using acid hydrolysate prepared to retain more oligosaccharides for induction. *Bioresource Technology*, 101, 717–723.
- [36] Liu J. *et al.* (2006). Effect of biosurfactant on cellulase and xylanase production by *Trichoderma viride* in solid substrate fermentation. *Process Biochemistry*, 41, 2347-2351.
- [37] Machado C., (2010). Situación de los Biocombustibles de 2da y 3era Generación en América Latina y Caribe. Organización Latinoamericana de Energía y el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.

- [38] Martín C. *et al.* (2006). Characterization of Agricultural and Agro-Industrial Residues as Raw Materials for Ethanol Production. *Chemical and Biochemical Engineer Q.*, 20 (4), 443-447.
- [39] Merino S. y Cherry J. (2007). Progress and Challenges in Enzyme Development for Biomass Utilization. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 108, 95-120.
- [40] Miller G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- [41] Moxley G. *et al.* (2008). Efficient Sugar release by the cellulose solvent-based lignocelluloses fractionation technology and enzymatic cellulose hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7885-7890.
- [42] NSF. (2008). Breaking the Chemical and Engineering Barriers to Lignocellulosic Biofuels: Next Generation Hydrocarbon Biorefineries. Editado por George W. Huber, en Washington D.C., 180 p.
- [43] NREL (2008). Measurement of Cellulase Activities, Laboratory Analytical Procedure (LAP) NREL/TP -510- 42628. Consultado en: Marzo 2010. Disponible en: www.nrel.gov/biomass/pdfs/42628.pdf
- [44] Olsson L. *et al.* (2003). Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial Technology*, 33 (5), 612-619.
- [45] Ooshima H. *et al.* (2004). Adsorption of cellulase from *Trichoderma viride* on cellulose. *Biotechnology and Bioengineering*, 25(12), 3103–3114.
- [46] Osono T. (2005). Colonization and succession of fungi during decomposition of *Swida controversa* leaf litter. *Mycologia*, 97, 589– 597.
- [47] Papatheofanous M. *et al.* (1995). Biorefining of agricultural crops and residues: effect of pilot-plant fractionation on properties of fibrous fractions. *Biomass and Bioenergy*, 8 (6), 419-426.
- [48] Pedroza A. (2007). Manual de Introducción a la biotecnología. Pontificia Universidad Javeriana. 116 p.
- [49] Pérez O. y Pérez R. (2006). Gramíneas Forrajeras con potencial para sistemas de producción ganadera y bovina. Publicación de CORPOICA, 44 p.
- [50] Pizano M. (1997). Floricultura y medio ambiente: la experiencia colombiana, Ediciones HortiTecnia, Colombia.

-
- [51] Ponce T. y Pérez O. (2002). Celulasas y xilanasas en la industria. *Avance y perspectiva*, 21.
- [52] Quaak P., Knoef H. y Stassen H. (1999). Energy from biomass: a review of combustion and gasification technologies. *World Bank technical paper*, 422. Energy series.
- [53] Rangel S. (2012). Estudio del efecto de enzimas ligninolíticas y celulolíticas obtenidas del hongo *Pleurotus ostretatus* sobre una gramínea forrajera tropical. Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia.
- [54] Reczey, K. *et al* (1996). Cellulase production by *T. reesei*, *Bioresource Technology*, 57, 25-30.
- [55] RFA (2007). Renewable Fuels Association Statistics. Disponible en: www.ethanolrfa.org/industry/statistics/. Consultado en: Septiembre 2009
- [56] Rocky K. y Hamidi Z. (2010). Evaluation of the effect of particle size, aeration rate and harvest time on the production of cellulase by *Trichoderma reesei* QM9414 using response surface methodology. *Food and bioproducts processing*, 88, 61-66.
- [57] Rodríguez I. y Piñeros Y. (2007). Producción de complejos enzimáticos mediante el cultivo en fase sólida de *Trichoderma* sp. sobre los rácimos vacíos de palma de aceite como sustrato. *Vitae*, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica, 14 (2), 35-42.
- [58] Rocky-Salimi K. y Hamidi-Esfahani Z. (2010). Evaluation of the effect of particle size, aeration rate and harvest time on the production of cellulase by *Trichoderma reesei* QM9414 using response surface methodology. *Food and Bioproducts Processing*, 88(1), 61–66.
- [59] Samuels, G.J., Chaverri, P., Farr, D.F., & McCray, E.B. (2012). *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Última consulta en Enero 23, 2012. Disponible en: [/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm](http://taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm)
- [60] Sandun F. *et al.* (2006). Biorefineries; Current Status, Challenges, and Future Direction. *Energy Fuels*, 20 (4), 1727-1737.
- [61] Sanchez O. y Cardona C., (2005). Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia*, 30 (11), 671-677.
- [62] Serna F. *et al.* (2011). Impacto social y económico en el uso de biocombustibles. *Journal of Technology Management & Innovation*, 6 (1), 100-114.

- [63] Singhania R. *et al.* (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, 46, 541–549.
- [64] Sohail M. *et al.* (2009). Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82: effect of temperature and pH. *New Biotechnology*, Article in Press.
- [65] Soller M. *et al.* (2010). Optimized microplate β -1,3-glucanase assay system for *Trichoderma* spp. screening. *Journal of Microbiological Methods*, 81, 6-10.
- [66] Soni R., *et al.* (2010). Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus fumigatus* Fresenius strain (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of Solka floc and bagasse. *Industrial Crops and Products*, 31, 277–283.
- [67] Sukumaran, R. K. *et al.* (2009). Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renewable Energy*, 34, 421–424.
- [68] Sun, Y. y Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83, 1–11.
- [69] Szijártó N., *et al.* (2004). Cellulase fermentation on a novel substrate (waste cardboard) and subsequent utilization of home-produced cellulase and commercial amylase in a rabbit feeding trial. *Industrial Crops and Products*, 20, 49–57.
- [70] Turner B. *et al.* (2007). Creating Markets for Green Biofuels. National Science Foundation's Climate Decision Making Center.
- [71] Usama F. *et al.* (2008). Production and Partial Purification of Cellulase Complex by *Aspergillus niger* and *A. nidulans* Grown on Water Hyacinth Blend. *Journal of Applied Sciences Research*, 4(7), 875-891.
- [72] Velkovska S. *et al.* (1997). Kinetic model for batch cellulose production by *Trichoderma reesei* RUT C30. *Journal of Biotechnology*, 54, 83-94.
- [73] Weber J. y Agblevor F.A. (2005). Microbubble fermentation of *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Process Biochemistry*, 40, 669-676.
- [74] Wen Z. *et al.* (2005a). Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure. *Bioresource technology*, vol. 96, pp. 491-499.
- [75] Wen Z. *et al.* (2005b). Production of cellulase/ β -glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. *Process Biochemistry*, 40(9), 3087–3094.

-
- [76] Whitaker J., *et al.* (2003). Handbook of food enzymology. Marcel Dekker Inc.
- [77] Xia L, y Cen P. (1999). Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. *Process Biochemistry*, 34, 909–912.
- [78] Xiong H. *et al.* (2004). Improved xylanase production by *Trichoderma reesei* grown on L-arabinose and lactose or D-glucose mixtures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 353–358.
- [79] Xu Q. *et al.* (2007), Cellulases for biomass conversión. *Industrial enzymes*, Section A, 35-50.
- [80] Zhang Q., *et al* (2007). Factors affecting foaming behavior in cellulase fermentation by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Bioresource Technology*, 98, 753–760.
- [81] Zheng Y. *et al.* (2009). Enzymatic saccharification of dilute acid pretreated saline crops for fermentable sugar production. *Applied Energy*, 86(11), 2459–2465.

Anexos

Anexo A: Preparación del stock de trabajo

Para la preparación del preinóculo se realizó el siguiente protocolo para la elaboración de un stock de trabajo de la cepa.

Reactivos

- Solución de glicerol al 40% v/v
- Materiales y equipos
- 50 Crioviales con capacidad de 2mL.
- Micropipeta de capacidad de 1000 μ L.
- Puntas para micropipeta de 1000 μ L, estériles.
- PDA inoculado con la cepa, 7 días a 28°C
- Cabina de flujo laminar
- Autoclave

Procedimiento

- Preparar crioviales con 0.5 mL con una solución de glicerol al 40%, esterilizarlos y enfriar a temperatura ambiente.
- Adicionar un círculo invertido de 0.5 cm de diámetro de hongo tomado de la caja de PDA al criovial asépticamente, en cabina de flujo laminar.
- Cerrar el criovial.
- Mantener en refrigeración a 4°C.

Anexo B: Reportes de la caracterización fisicoquímica de la biomasa

REPORTE DE ANÁLISIS DE TEJIDO VEGETAL No. 1074-2010

Página 1 de 1



LABORATORIO DE SUELOS FACULTAD DE AGRONOMÍA

Remite: Balkis Quebedo	Lote: No 5	Cultivo: Clavel
E-mail: bquebedo@javeriana.edu.co	Finca: Cultivos del Norte	Órgano: Palos y hojas
Dirección: Cr 7 42-68	Propietario: Cristian Fog	Recibido: 01/07/2010
Teléfono: 3208320 Ext: 4030	Municipio: Tocancipá	Reportado: 25/07/2010
Ciudad: Bogotá D.C.	Dpto.: Cundinamarca	Recibo No.: pendiente

RESULTADOS

N	P	Ca	K	Mg	cenizas	Cu	Fe	Mn	Zn	B	S
%						mg/kg					
0,34	0,08	0,11	1,31	0,06	ns	9,22	83,5	125	54,3	18,5	385

ns: no solicitado

Los resultados corresponden únicamente a las muestras suministradas por el usuario y analizadas en el laboratorio

PARÁMETRO

N: Nitrógeno total
P: Fósforo total
Ca, K, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn totales:
B: Boro total
S: Azufre total
ms: Materia seca
cenizas:

MÉTODOS DE ANÁLISIS

micro-Kjeldahl, valoración volumétrica
 Calcinción a 475°C, valoración colorimétrica con molibdato y vanadato de amonio
 Calcinción a 475°C, valoración por Espectrofotometría de Absorción Atómica
 Calcinción a 475°C, valoración colorimétrica con azometina-H
 Incineración con Nitrato de Magnesio - Turbidimétrico
 Secado hasta peso constante a 60°C
 Calcinción a 475°C

Analista: *Edgar A. Acandio*

Directora: *Marta Oteiza*

RECUERDE: El plan de fertilización es más eficiente si Ud consulta con el profesional de Asistencia Técnica de su localidad

Laboratorio de Aguas y Suelos. Facultad de Agronomía. Edificio 500 Cuarto Piso
 Conmutador 316 5000 Extensiones 19088 ó 19049; Telefax 316 5498
 Correo electrónico: mchenapoto@unal.edu.co
 Bogotá, Colombia

INFORME DE ANALISIS No 108
FECHA DE EXPEDICION Junio 16 de 2008
ANALISIS REPORTADOS



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA FACULTAD DE MEDICINA
PRODUCCIÓN ANIMAL VETERINARIA Y DE
LABORATORIO DE NUTRICIÓN ZOOTECNIA

INFORMACION DEL USUARIO
NOMBRE Balkys Quevedo
TELEFONO
FAX - CELULAR

INFORMACION DE LA MUESTRA
TIPO R. Clavel sin tamizar
IDENTIFICACION 80,240
FECHA DE RECEPCION Mayo 12 de 2008

ANALISIS	REPORTE	REPORTE	ANALISIS	REPORTE	REPORTE
	(Base húmeda)	(Base seca)		(Base húmeda)	(Base cenizas)
MATERIA SECA (%) ¹		89,7	DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE LA MS (%) ¹		
PROTEINA CRUDA (Nx6.25) (%) ¹			DIGESTIBILIDAD <i>IN SITU</i> DE LA MS (%)		
NITROGENO NO PROTEICO (%) ²			DIGESTIBILIDAD EN PEPSINA 0,02 (%)		
NITROGENO SOLUBLE (%) ²			CALCIO (%)		
NITROGENO LIGADO A FDA (%) ²			FOSFORO (%) ¹		
NITROGENO LIGADO A FDN (%) ²			POTASIO (%) ¹		
NITROGENO UREICO EN LECHE (mg/dl)			MAGNESIO (%) ¹		
FIBRA CRUDA (%) ¹			SODIO (%) ¹		
FIBRA EN DETERGENTE NEUTRO (%) ³	46,7	52,1	AZUFRE (%)		
FIBRA EN DETERGENTE ACIDO (%) ³	35,8	39,9	MANGANESO (mg/Kg) ¹		
LIGNINA (%) ³	4,7	5,3	ZINC (mg/Kg) ¹		
EXTRACTO ETereo (%) ¹			COBRE (mg/Kg) ¹		
CENIZAS (%) ¹			COBALTO (mg/Kg) ¹ LD = 0,01ppm		
CELULOSA (%) ³	31,1	34,7	HIERRO (mg/Kg) ¹		

REFERENCIAS

- 1 AOAC 1996. Official Methods of analysis of the Association of Analytical Chemists, (14 th ed)
- 2 Animal Feed Science and Technology (1996) 57:347-348
- 3 Journal of Dairy Science (1991) 74:3583-3597
- 4 Tilley and Terry, 1963. Modificado por la Universidad de Nebraska, Manual de Laboratorio Universidad de Nebraska
- 5 Manual de métodos fisicoquímicos para el control de calidad de la leche y sus derivados. ICONTEC

APROBADO POR

JUAN E. GARULLA FORNAGUERA
Director de Laboratorio

ELABORADO POR

LUZ NANCY SANCHEZ PATIÑO
Coordinadora de Laboratorio

Este informe expresa fielmente el resultado de los análisis realizados sobre la muestra recibida. No podrá ser reproducido parcial ni totalmente, excepto cuando se haya obtenido previamente permiso escrito por parte del laboratorio que lo emite. Los resultados contenidos en el presente informe, se refieren al momento y condiciones en que se realizaron los análisis. El laboratorio que lo emite no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado de los resultados entregados.

Anexo C: Determinación química de azúcares reductores

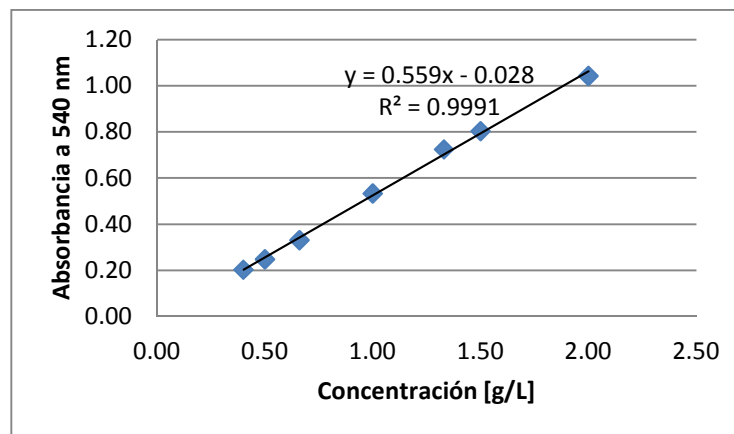
Para la determinación de los azúcares reductores se utilizó una técnica analítica desarrollada por Miller en 1959 el cual se basa en la reducción del reactivo ácido 3,5 dinitrosalicílico en presencia de azúcares reductores, hacia ácido 3 amino 5 dinitrosalicílico, producto coloreado que absorbe a 540 nm. El procedimiento reportado fue adaptado de Ghose T., 1987 y del reporte técnico NREL/TP-510-42628.

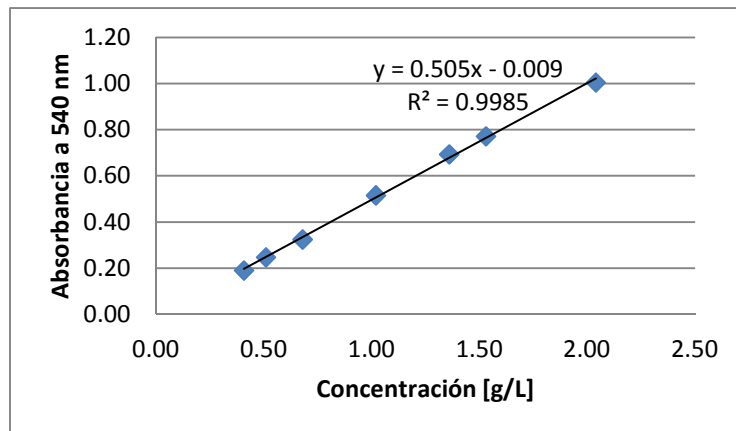
Curva de calibración

Para la elaboración de la curva de calibración se prepara una solución de glucosa de 2 g/L a partir de la cual se preparan en tubos de ensayo diluciones como 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3 con agua destilada. Se ajusta la tendencia lineal según la ley Beer-Lambert, para obtener una ecuación que relacione la absorbancia con la concentración de azúcares. Las curvas utilizadas se presentan a continuación.

El ajuste de las curvas se realizó mediante la herramienta de Análisis de datos en Excel®. Para cada uno de los azúcares se realizaron las estadísticas de la regresión, encontrando que la regresión es lineal, con un coeficiente de correlación cercano a 1, con una regresión significativa de acuerdo al estadístico F y verificando el coeficiente de intercepción contiene el cero entre sus límites. A continuación se presentan las principales curvas de calibración de los reactivos DNS preparados y utilizados durante el desarrollo de esta tesis.

Figura C-1: Curvas de calibración de la concentración de glucosa utilizadas



**Tabla C-1:** Resultados del análisis estadístico para las curvas ajustadas

<i>Estadísticas de la regresión 1</i>						
Coeficiente de correlación múltiple	0.998966213					
Coeficiente de determinación R ²	0.997933495					
R ² ajustado	0.997520194					
Error típico	0.015695438					
Observaciones	7					
ANÁLISIS DE VARIANZA						
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	
Regresión	1	0.594815123	0.594815123	2414.544053	6.59615E-08	
Residuos	5	0.001231734	0.000246347			
Total	6	0.596046857				
	Coeficientes	Error típico	Inferior 95%	Superior 95%	Inferior 95.0%	Superior 95.0%
Intercepción	-0.012049	0.012972	-0.045397	0.021297	-0.045397	0.021297
g/L	0.536989	0.010928	0.508897	0.565080	0.508897	0.565080

<i>Estadísticas de la regresión 2</i>						
Coeficiente de correlación múltiple	0.999253627					
Coeficiente de determinación R ²	0.998507812					
R ² ajustado	0.998209374					
Error típico	0.012782718					
Observaciones	7					
ANÁLISIS DE VARIANZA						
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	
Regresión	1	0.546693868	0.546693868	3345.783264	2.92193E-08	
Residuos	5	0.000816989	0.000163398			

Total	6	0.547510857				
	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Intercepción	-0.008819	0.010583	-0.036026	0.01838	-0.036026	0.01838
g/L	0.505132	0.008732	0.482683	0.52758	0.482683	0.527580

Para la determinación de la concentración de xilosa, se realiza el mismo procedimiento, pero la reacción con el reactivo DNS se realiza por 10 min en lugar de 5. A continuación se presenta la curva ajustada de los datos.

Figura C-2: Curva de calibración de xilosa

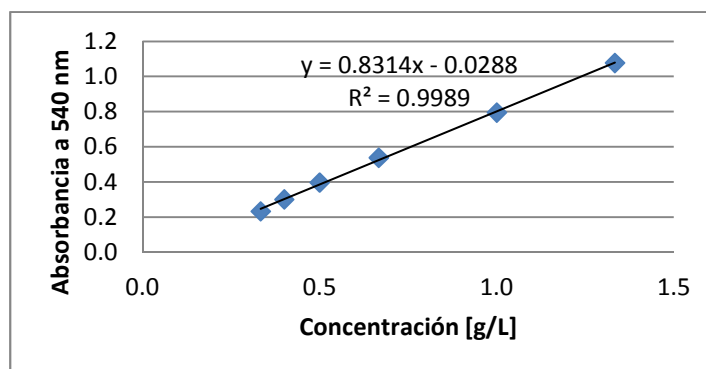


Tabla C-2: Resultados del análisis estadístico para la curva ajustada

<i>Estadísticas de la regresión</i>						
Coefficiente de correlación múltiple	0.999463618					
Coefficiente de determinación R ²	0.998927524					
R ² ajustado	0.998659406					
Error típico	0.011847563					
Observaciones	6					
ANÁLISIS DE VARIANZA						
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>	
Regresión	1	0.522955374	0.52295537	3725.688805	4.31481E-07	
Residuos	4	0.000561459	0.00014036			
Total	5	0.523516833	5			
	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Intercepción	-0.028796	0.010759	0.058669	0.001076	-0.058669	0.001076
g/L	0.831444	0.01362	0.793625	0.869264	0.793625	0.869264

Anexo D: Determinación de proteínas

Para la determinación de proteínas se utilizó la metodología Bradford utilizado para medir proteínas en solución. Este método consisten en la utilización del colorante azul brillante G-250 Comassie, el cual se adhiere a la proteína, tornando la solución de rojizo a azulado, presentando una absorción máxima a una longitud de onda de 595 nm. El cambio en la absorbancia a 595 nm es proporcional a la concentración de la proteína en la muestra. En la realización de la curva de calibración se utilizó Albumina de suero bovino.

Curva de calibración

Para la elaboración de la curva de calibración se prepara utilizaron las concentraciones del estándar reportadas en la tabla. El ajuste de las curvas se realizó mediante el análisis de datos en Excel ®. Se realizaron las estadísticas de la regresión, encontrando que la regresión encontrada es lineal, con un coeficiente de correlación cercano a 1, con una regresión significativa de acuerdo al estadístico F y verificando el coeficiente de intercepción contiene el cero entre sus límites.

Figura D-1: Curva de calibración obtenida

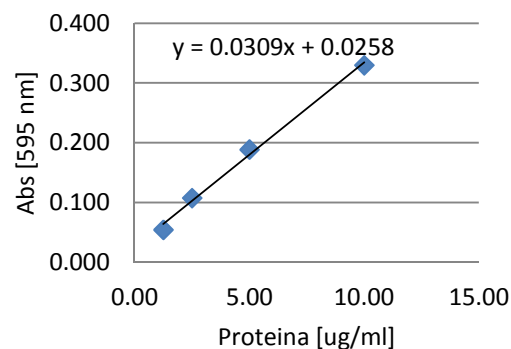


Tabla D-1: Resultados del análisis estadístico para la curva ajustada

<i>Estadísticas de la regresión</i>						
Coeficiente de correlación múltiple						0.997534111
Coeficiente de determinación R ²						0.995074303
R ² ajustado						0.992611454
Error típico						0.010294363
Observaciones						4
ANÁLISIS DE VARIANZA						
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>	
Regresión	1	0.042817052	0.042817	404.0338886	0.002465889	
Residuos	2	0.000211948	0.000105			
Total	3	0.043029				
	<i>Coeficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Intercepción	0.0257826	0.0088503	-0.01229	0.063862	-0.012297	0.063862
g/L	0.0308730	0.0015359	0.02426	0.037481	0.024264	0.037481

Anexo E: Determinación de azúcares por medio de HPLC

Se utilizó una columna Aminex HPX-87H de intercambio iónico. Esta columna es usada para el análisis de carbohidratos en solución con ácidos carboxílicos, ácidos grasos volátiles, ácidos grasos de cadena corta, alcoholes, cetonas y muchos subproductos metabólicos neutrales (Información detallada por el fabricante, Bio-rad). Para el desarrollo de esta tesis fue utilizada esta columna por su disponibilidad de uso en el laboratorio. Otros investigadores han utilizado esta misma columna ya sea para la detección de azúcares en la caracterización de biomasa (Reczey K. *et al*, 1996; Martín C. *et al*, 2006) o para la detección de los azúcares producidos luego de hidrólisis enzimáticas (Juász T. *et al*, 2005). Teniendo en cuenta las especificaciones proporcionadas por el fabricante, se utilizaron las siguientes condiciones de operación:

- Fase móvil = 0.005 M H₂SO₄
- Flujo = 0.6 mL/min
- Temperatura del horno = 65°C
- Volumen de inyección = 20 µL
- Detector de índice de refracción (IR)

Inicialmente se realizaron unas soluciones de los azúcares Con la siguiente concentración y tiempos de retención de los picos detectados.

Tabla E-1: Pruebas iniciales de HPLC para la detección de azúcares.

Muestra	Azúcar	Concentración [g/L]	Tiempo de retención [min]
1	Xilosa	5.67	9.7 y 10.3
	Galactosa	5.78	
	Glucosa	5.33	
2	Celobiosa	5.82	8.05 y 10.3
	Xilosa	5.89	
3	Glucosa	5.43	9.7 y 10.3
	Galactosa	5.23	

Con este análisis cromatografico, se encuentra que el tiempo de retención de la glucosa es de 9.7 min, de la celobiosa es de 8.05 y que la xilosa y galactosa presentan el mismo tiempo de retención por lo cual no pueden ser diferenciadas. Por lo tanto el pico se

reconocerá como xilosa equivalente, ya que la curva de calibración se realizará con este azúcar, pero corresponderá para efectos de esta tesis como los azúcares de la hemicelulosa que cuentan a la xilosa y galactosa.

Curva de calibración: Se realizaron soluciones de 16.1442 g/L de glucosa, 14.8483 g/L de celobiosa, 18.0261 g/L de xilosa y 14.2950 g/L arabinosa en agua desionizada. Luego se realizaron mezclas de diferentes diluciones y se pasaron por HPLC siguiendo las mismas condiciones mencionadas anteriormente, obteniéndose las siguientes áreas.

Tabla E-2: Curva de calibración realizada para la cuantificación de azúcares por HPLC.

Azúcar	Celobiosa	Glucosa	Xilosa	Arabinosa
Tr (min)	8.01	9.72	10.37	11.16
Mezcla	Concentración [g/L]			
A	3.712	4.036	4.507	3.574
A	3.712	4.036	4.507	3.574
A	3.712	4.036	4.507	3.574
B	1.856	2.018	2.253	1.787
B	1.856	2.018	2.253	1.787
B	1.856	2.018	2.253	1.787
C	1.237	1.345	1.502	1.191
C	1.237	1.345	1.502	1.191
C	1.237	1.345	1.502	1.191
D	0.928	1.009	1.127	0.893
D	0.928	1.009	1.127	0.893
D	0.928	1.009	1.127	0.893
E	0.742	0.807	0.901	0.715
E	0.742	0.807	0.901	0.715
E	0.742	0.807	0.901	0.715
F	0.619	0.673	0.751	0.596
F	0.619	0.673	0.751	0.596
F	0.619	0.673	0.751	0.596
G	0.464	0.505	0.563	0.447
G	0.464	0.505	0.563	0.447
G	0.464	0.505	0.563	0.447
H	0.371	0.404	0.451	0.357
H	0.371	0.404	0.451	0.357
H	0.371	0.404	0.451	0.357
I	0.309	0.336	0.376	0.298
I	0.309	0.336	0.376	0.298
I	0.309	0.336	0.376	0.298
J	0.247	0.269	0.300	0.238
J	0.247	0.269	0.300	0.238
J	0.247	0.269	0.300	0.238
K	0.186	0.202	0.225	0.179
K	0.186	0.202	0.225	0.179
K	0.186	0.202	0.225	0.179

Continuación, **Tabla E-2,**

Azúcar	Celobiosa	Glucosa	Xilosa	Arabinosa
Tr (min)	8.01	9.72	10.37	11.16
Mezcla	Área			
A	4271930	4630300	5000421	4005596
A	4213978	4576171	4939250	3955545
A	4285231	4638154	5011813	4018958
B	2157000	2412016	2554341	2037764
B	2160397	2413802	2552740	2039492
B	2144404	2396505	2537596	2030260
C	1434349	1603287	1698502	1361997
C	1427818	1593795	1690192	1349863
C	1427339	1597943	1689517	1349248
D	1073753	1197563	1270683	1012941
D	1073419	1200362	1273265	1030929
D	1071176	1193655	1265890	1012855
E	867437	939657	1015905	819234
E	856904	929717	1003653	806829
E	869220	943153	1018815	818183
F	704210	784944	831770	663794
F	710904	790519	838053	670220
F	706067	785647	832307	665674
G	527317	589913	625340	497638
G	526999	589678	626112	500020
G	527075	584927	620876	497466
H	448187	483727	533206	419711
H	450254	485304	526082	420725
H	447106	484830	525296	423447
I	340388	377112	398476	315254
I	333611	371978	393681	312216
I	332817	369925	389916	313896
J	283666	303398	326815	261802
J	282778	301739	325139	258281
J	284564	305184	327830	264402
K	222166	242289	260652	207871
K	227301	245404	265964	214169
K	222986	242707	262401	210403

El ajuste de las curvas se realizó mediante el análisis de datos en Excel®. Para cada uno de los azúcares se realizaron las estadísticas de la regresión, encontrando que la regresión encontrada es lineal, con un coeficiente de correlación cercano a 1, con una regresión significativa de acuerdo al estadístico F y verificando el coeficiente de intercepción contiene el cero entre sus límites.

Tabla E-3: Regresión lineal obtenida para la celobiosa

<i>Estadísticas de la regresión</i>						
Coefficiente de correlación múltiple		0.999904				
Coefficiente de determinación R ²		0.999808				
R ² ajustado		0.999802				
Error típico		16210.21				
Observaciones		33				
ANÁLISIS DE VARIANZA						
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>	
Regresión	1	4.25E+13	4.25E+13	161685.6	3.41E-59	
Residuos	31	8.15E+09	2.63E+08			
Total	32	4.25E+13				
	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Intercepción	4515.8174	3954.597	-3549.6	12581.27	-3549.6	12581.3
Concentración [g/L]	1192713.9	2966.201	1186664	1198764	1186664	1198764

Tabla E-4: Regresión lineal obtenida para la glucosa

<i>Estadísticas de la regresión</i>						
Coefficiente de correlación múltiple		0.999731				
Coefficiente de determinación R ²		0.999462				
R ² ajustado		0.999443				
Error típico		30224.37				
Observaciones		30				
ANÁLISIS DE VARIANZA						
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>	
Regresión	1	4.75E+13	4.75E+13	52030.63	2.53E-47	
Residuos	28	2.56E+10	9.14E+08			
Total	29	4.76E+13				
	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Intercepción	15322.45	7982.758	1029.49	31674.39	-1029.49	31674.39
Concentración [g/L]	1154003	5059.149	1143640	1164367	1143640	1164367

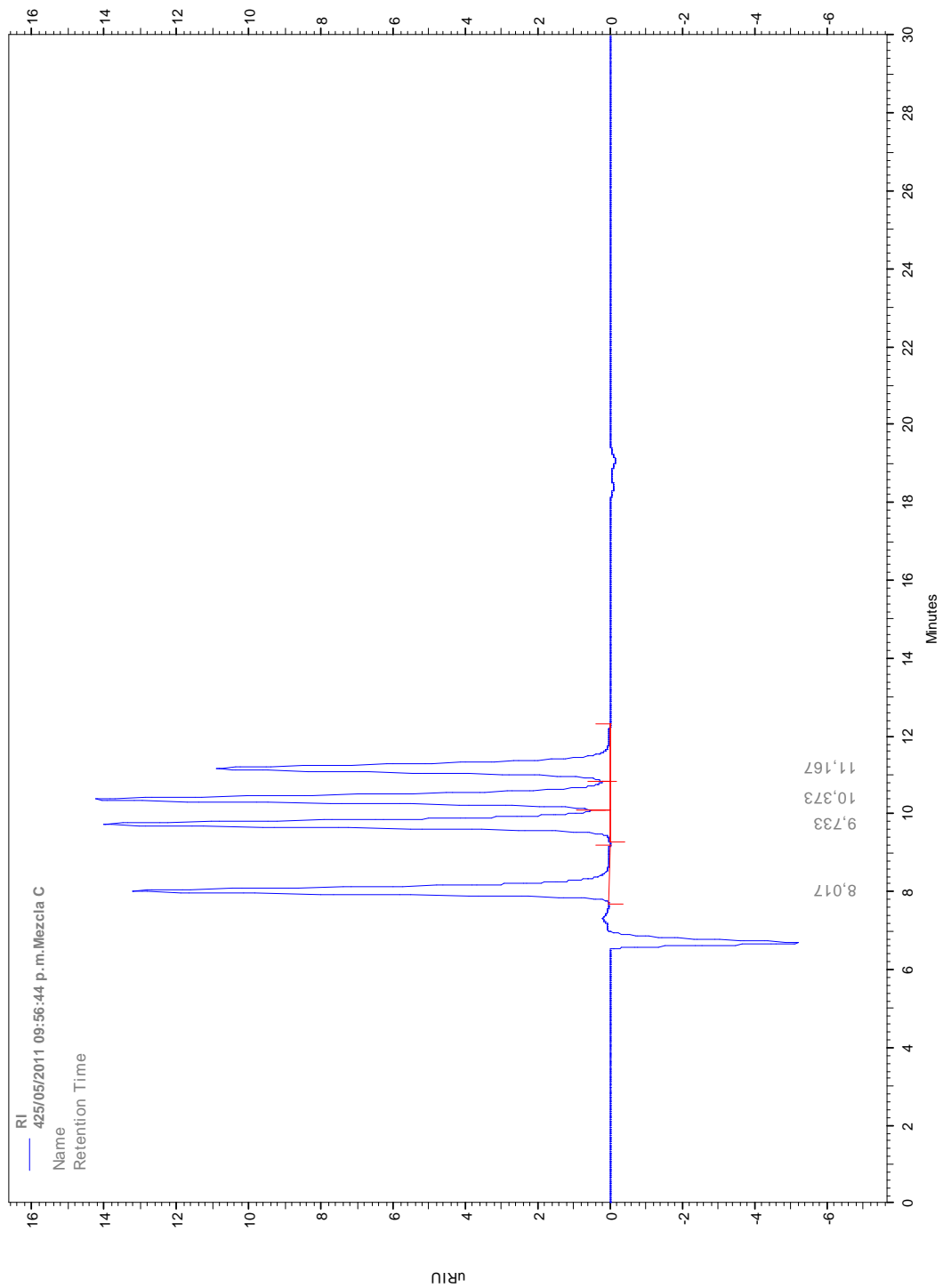
Tabla E-5: Regresión lineal obtenida para la xilosa equivalente

<i>Estadísticas de la regresión</i>						
Coefficiente de correlación múltiple						0.999857
Coefficiente de determinación R ²						0.999714
R ² ajustado						0.999704
Error típico						23237.37
Observaciones						33
ANÁLISIS DE VARIANZA						
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>		<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	5.84E+13	5.84E+13		108184.5	1.73E-56
Residuos	31	1.67E+10	5.4E+08			
Total	32	5.84E+13				
	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Intercepción	9812.188	5668.924	-1749.66	21374.03	-1749.66	21374.03
Concentración [g/L]	1398562	4252.056	1389890	1407234	1389890	1407234

Tabla E-6: Regresión lineal obtenida para la arabinosa

<i>Estadísticas de la regresión</i>						
Coefficiente de correlación múltiple						0.99986
Coefficiente de determinación R ²						0.99972
R ² ajustado						0.999711
Error típico						18391.52
Observaciones						33
ANÁLISIS DE VARIANZA						
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>		<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	3.75E+13	3.75E+13		110827.1	1.19E-56
Residuos	31	1.05E+10	3.38E+08			
Total	32	3.75E+13				
	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 95.0%</i>	<i>Superior 95.0%</i>
Intercepción	7077.18	4486.745	-2073.6	16227.96	-2073.6	16227.96
Concentración [g/L]	1120347	3365.346	1113484	1127211	1113484	1127211

Adicionalmente se presenta uno de los cromatogramas obtenidos de la muestra C realizada para la curva de calibración en la **Figura G-1**, con los cuatro picos detectados, y sus respectivos tiempos de retención.

Figura E-1: Imagen del cromatograma obtenido para la mezcla C, repetición 1.

Anexo F: Resultados de DNS

Tabla H-1: Resultados de absorbancia a 540 nm de las muestras analizadas

Producción de celulasas con celulosa microcristalina					
CMC	Muestras		Blancos		U/L
a1	0.283	0.3	0.002	0.002	200
a2	0.294	0.277	0.004	0.014	191
a3	0.283	0.28	0.002	0.01	190
r1	0.364	0.354	0.006	0.007	243
r2	0.337	0.335	0.007	0.004	228
r3	0.355	0.369	0.006	0.009	245
Avicel					0
a1	0.096	0.1	0.002	0.002	66
a2	0.092	0.094	0.004	0.014	58
a3	0.086	0.09	0.002	0.01	57
r1	0.167	0.159	0.006	0.007	108
r2	0.147	0.146	0.007	0.004	97
r3	0.146	0.143	0.006	0.009	94
CMC	Muestras		Blancos		U/L
a1	0.332	0.293	0	0.001	215
a2	0.323	0.323	0.009	0.007	217
r1	0.36	0.383	0.012	0.002	251
r2	0.361	0.351	0.002	0.007	242
Avicel					0
a1	0.132	0.136	0	0.001	92
a2	0.132		0.009	0.007	86
r1	0.167	0.159	0.012	0.002	108
r2	0.14	0.157	0.002	0.007	99
Estudio del pH y del tiempo de fermentación					
CMC	Muestras		Blancos		U/L
1	0.507	0.539	0.153	0.143	259
2	0.527	0.514	0.209	0.177	226
3	0.349	0.44	0.133	0.136	179
4	0.383	0.443	0.14	0.139	189
5	0.466	0.419	0.167	0.18	186
6	0.187	0.2	0.12	0.141	43
7	0.346	0.286	0.13	0.149	122
8	0.484	0.461	0.133	0.159	225
9	0.223	0.217	0.153		46
10	0.28	0.292	0.151	0.149	94
11	0.268	0.278	0.151	0.145	86
12	0.232	0.234	0.128	0.118	76
Estudio del pH y del tiempo de fermentación					
CMC	Muestras		Blancos		U/L
1	0.235	0.24	0.248	0.251	0
2	0.24	0.268	0.255	0.242	4
3	0.618	0.595	0.282	0.294	220
4	0.543	0.533	0.268	0.259	189
5	0.534	0.519	0.176	0.171	243
6	0.517	0.482	0.158	0.164	233
7	0.486	0.498	0.166	0.165	225
8	0.533	0.456	0.15	0.167	232

Avicel	Muestras		Blancos		U/L
1	0.25	0.243	0.248	0.251	0
2	0.237	0.248	0.255	0.242	0
3	0.347	0.318	0.282	0.294	31
4	0.355	0.367	0.268	0.259	67
5	0.279	0.321	0.176	0.171	87
6	0.301	0.338	0.158	0.164	109
7	0.303	0.33	0.166	0.165	104
8	0.278	0.266	0.15	0.167	78
Influencia de la concentración del inóculo					
CMC	Muestras		Blancos		U/L
1	0.477		0.165		215
2	0.499		0.165		230
3	0.507		0.174		230
1	0.445		0.141		210
2	0.427		0.143		196
3	0.452		0.156		204
Avicel	Muestras		Blancos		U/L
1	0.253		0.165		61
2	0.264		0.165		68
3	0.279		0.174		72
1	0.216		0.141		52
2	0.218		0.143		52
3	0.224		0.156		47
Efecto de la proporción carbono y nitrógeno					
CMC	Muestras		Blancos		U/L
1	0.212		0.117		66
2	0.218		0.144		51
3	0.179		0.148		21
4	0.21		0.162		33
5	0.167		0.092		52
6	0.314		0.159		107
7	0.172		0.151		14
8	0.316		0.173		99
9	0.491		0.179		215
10	0.288		0.139		103
11	0.231		0.161		48
12	0.18		0.139		28
13	0.19		0.115		52
14	0.201		0.108		64
15	0.202		0.151		35
16	0.228		0.123		72
17	0.218		0.152		46
18	0.274		0.197		53
19	0.23		0.2		21
20	0.279		0.146		92
21	0.422		0.155		184
22	0.21		0.13		55
Avicel	Muestras		Blancos		U/L
1	0.129		0.117		8
2	0.185		0.144		28
3	0.154		0.148		4
4	0.145		0.162		0
5	0.103		0.092		8
6	0.201		0.159		29
7	0.15		0.151		0
8	0.194		0.173		14
9	0.313		0.179		92
10	0.162		0.139		16
11	0.176		0.161		10
12	0.15		0.139		8

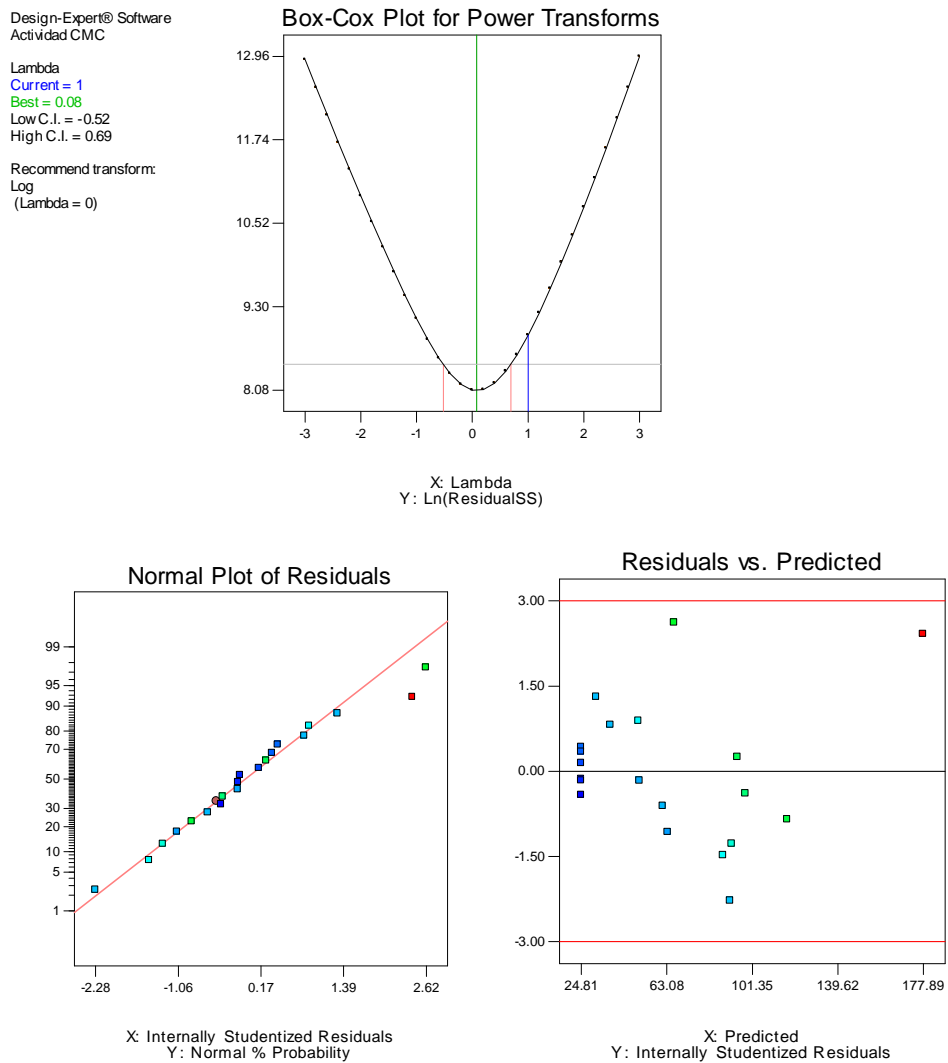
13	0.131		0.115		11
14	0.136		0.108		19
15	0.159		0.151		6
16	0.151		0.123		19
17	0.175		0.152		16
18	0.206		0.197		6
19	0.174		0.2		0
20	0.164		0.146		12
21	0.234		0.155		54
22	0.144		0.13		10
Efecto de la proporción carbono y nitrógeno					
CMC	Muestras		Blancos		U/L
1	0.466	0.444	0.144	0.11	240
3	0.539	0.538	0.188	0.182	259
4	0.513	0.515	0.189	0.198	235
5	0.483	0.477	0.157	0.158	236
8	0.416	0.399	0.087	0.071	241
9	0.572	0.588	0.196	0.209	277
10	0.491	0.491	0.128	0.132	265
12	0.467		0.152	0.126	240
13	0.493	0.464	0.141	0.143	247
2	0.463	0.471	0.152	0.16	228
6	0.431	0.497	0.153	0.157	227
7	0.494	0.486	0.165	0.163	239
11	0.514	0.457	0.159	0.182	231
Avicel	Muestras		Blancos		U/L
1	0.267	0.247	0.144	0.11	95
3	0.3	0.281	0.188	0.182	77
4	0.303	0.286	0.189	0.198	74
5	0.244	0.236	0.157	0.158	60
6	0.207	0.21	0.091	0.115	77
7	0.185	0.186	0.111	0.086	64
8	0.198	0.188	0.087	0.071	84
9	0.317	0.311	0.196	0.209	82
10	0.228	0.283	0.128	0.132	92
11	0.244	0.223	0.123	0.143	74
12	0.237	0.236	0.152	0.126	71
13	0.212	0.213	0.141	0.143	52
6	0.26	0.26	0.153	0.157	77
Efecto del pretratamiento					
CMC	Muestras		Blancos		U/L
1	0.318		0.098		161
2	0.383		0.105		204
3	0.263		0.076		137
4	0.26		0.111		109
5	0.325		0.053		199
7	0.278		0.086		141
8	0.328		0.143		136
9	0.343		0.081		192
10	0.371		0.075		217
11	0.379		0.096		207
12	0.375		0.101		201
13	0.319		0.047		199
15	0.303		0.052		187
16	0.541		0.176		268
17	0.487		0.293		148
Avicel	Muestras		Blancos		U/L
1	0.151		0.098		39
2	0.168		0.105		46
3	0.112		0.076		26
4	0.118		0.111		5
5	0.18		0.053		93

6	0.135			0.086			36
7	0.152			0.143			7
8	0.178			0.081			71
9	0.153			0.075			57
10	0.169			0.096			54
11	0.173			0.101			53
12	0.141			0.047			69
13	0.34			0.176			120
14	0.251	0.247		0.208	0.208		30
15	0.274	0.277		0.218	0.209		45
Efecto de los micro y macroelementos							
CMC	Muestras			Blancos			U/L
1	0.654			0.158	0.148		367
2	0.659			0.126	0.121		393
3	0.698			0.125	0.114		424
4	0.651			0.13	0.104		392
5	0.681			0.12	0.141		404
6	0.122			0.148	0.157		0
7	0.682			0.137	0.119		406
8	0.669			0.127	0.192		374
9	0.348			0.103	0.111		177
10	0.341			0.135	0.103		163
11	0.588			0.12	0.143		335
12	0.676			0.097	0.111		419
13	0.736			0.138	0.183		422
14	0.61			0.082	0.116		375
15	0.695			0.135	0.157		403
16	0.673			0.086	0.133		413
Avicel	Muestras			Blancos			U/L
1	0.294			0.148	0.158		103
2	0.312			0.121	0.126		138
3	0.315			0.114	0.125		143
4	0.31			0.104	0.13		142
5	0.292			0.141	0.12		118
6	0.123			0.157	0.148		0
7	0.342			0.119	0.137		157
8	0.317			0.192	0.127		115
9	0.139			0.111	0.103		23
10	0.14			0.103	0.135		15
11	0.258			0.143	0.12		93
12	0.293			0.111	0.097		139
13	0.283			0.183	0.138		90
14	0.202			0.116	0.082		76
15	0.279			0.157	0.135		98
16	0.239			0.133	0.086		95
Comprobación del modelo							
CMC	Muestras			Blancos			U/L
1	0.663	0.673	0.675	0.101	0.112	0.105	414
2	0.681	0.664	0.664	0.105	0.109	0.111	412
5	0.145	0.16		0.111	0.119		27
6	0.114	0.124		0.097	0.098		16
Avicel	Muestras			Blancos			U/L
1	0.283	0.292	0.292	0.101	0.112	0.105	134
2	0.279	0.291		0.105	0.109	0.111	130
5	0.148	0.118		0.111	0.119		13
6	0.108	0.109		0.097	0.098		8
Xilano	Muestras			Blancos			U/L
x1	0.685	0.63		0.069			943
x2	0.598	0.584		0.061			849

Anexo G: Análisis estadísticos

A continuación se presentan las gráficas de probabilidad normal y los residuales para cada uno de los diseños estadísticos.

Figura G-1: Gráficos para los experimentos de la **Tabla 3-10**. Diseño clavel-sulfato de amonio urea.



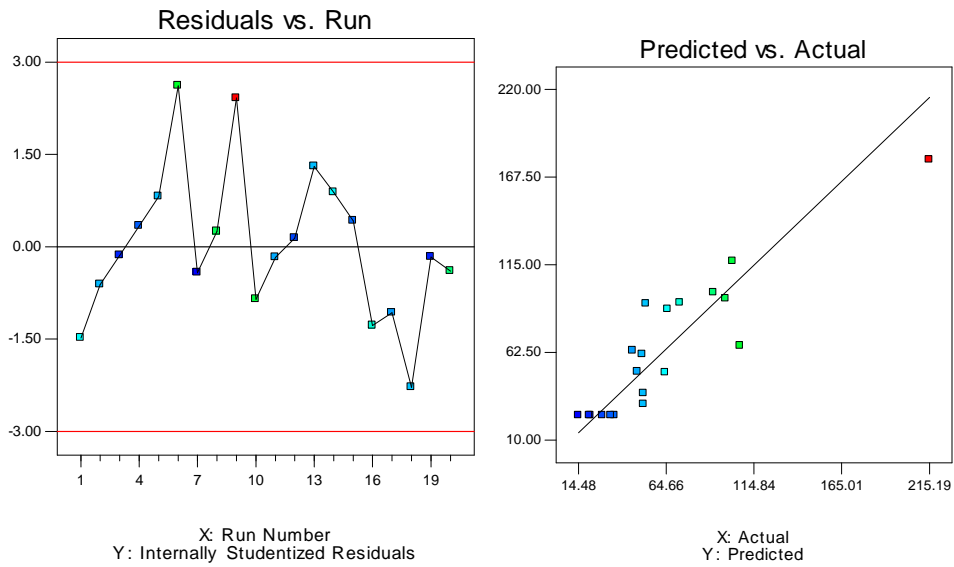
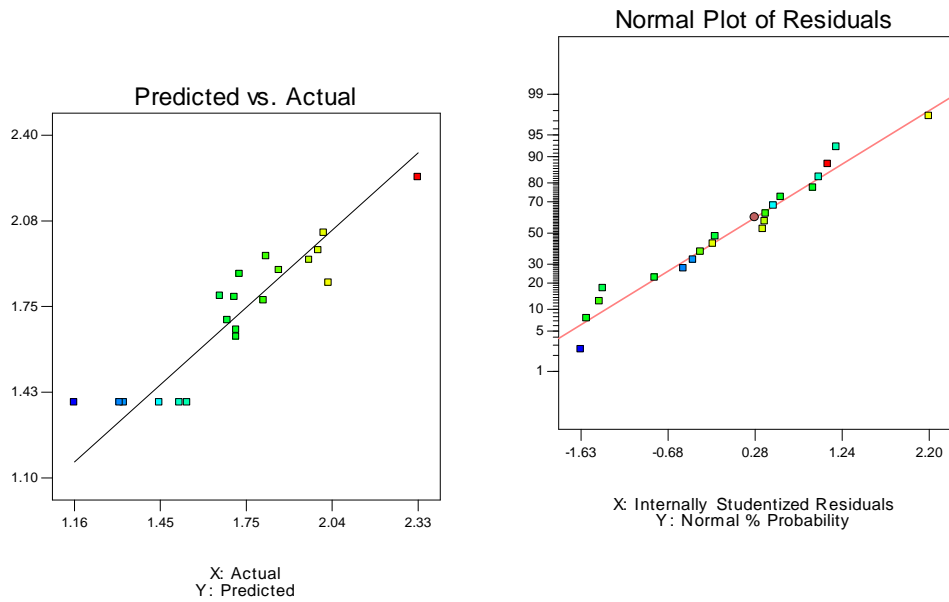


Figura G-2: Gráficos experimento clavel urea sulfato de amonio con transformación



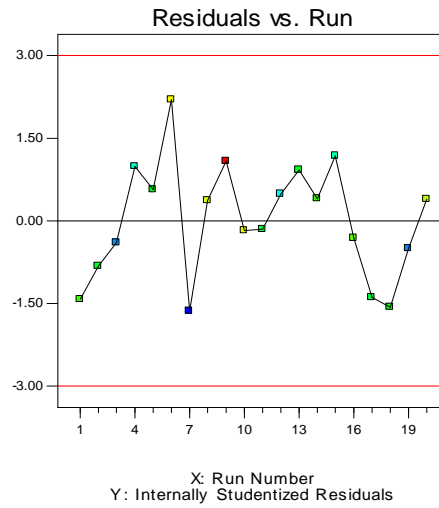
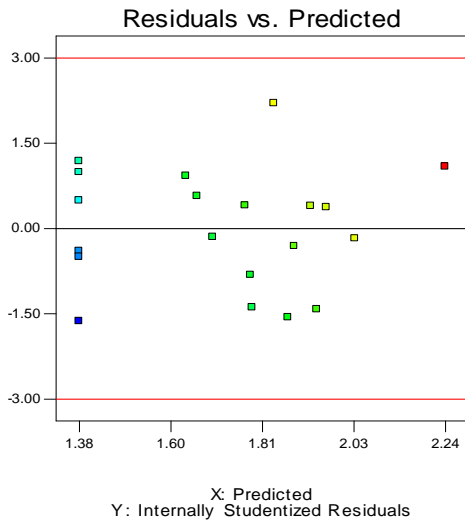


Tabla G-1: Análisis Anova del diseño clavel – sulfato de amonio, actividad Avicel®

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	Valor F	Valor P
Modelo	3.26	6	0.54	3.86	0.0196
A-Clavel	0.06	1	0.06	0.42	0.5263
B-Sulfato de amonio	0.01	1	0.01	0.06	0.8075
C-Urea	0.00	1	0.00	0.00	0.9566
A^2	0.58	1	0.58	4.12	0.0634
B^2	1.88	1	1.88	13.34	0.0029
C^2	1.30	1	1.30	9.26	0.0094
Residual	1.83	13	0.14		
Falta de ajuste	0.72	8	0.09	0.41	0.8751
Error puro	1.11	5	0.22		
Total	5.09	19			

Figura G-3: Gráficos para los experimentos de la **Tabla 3-12** Actividad CMC

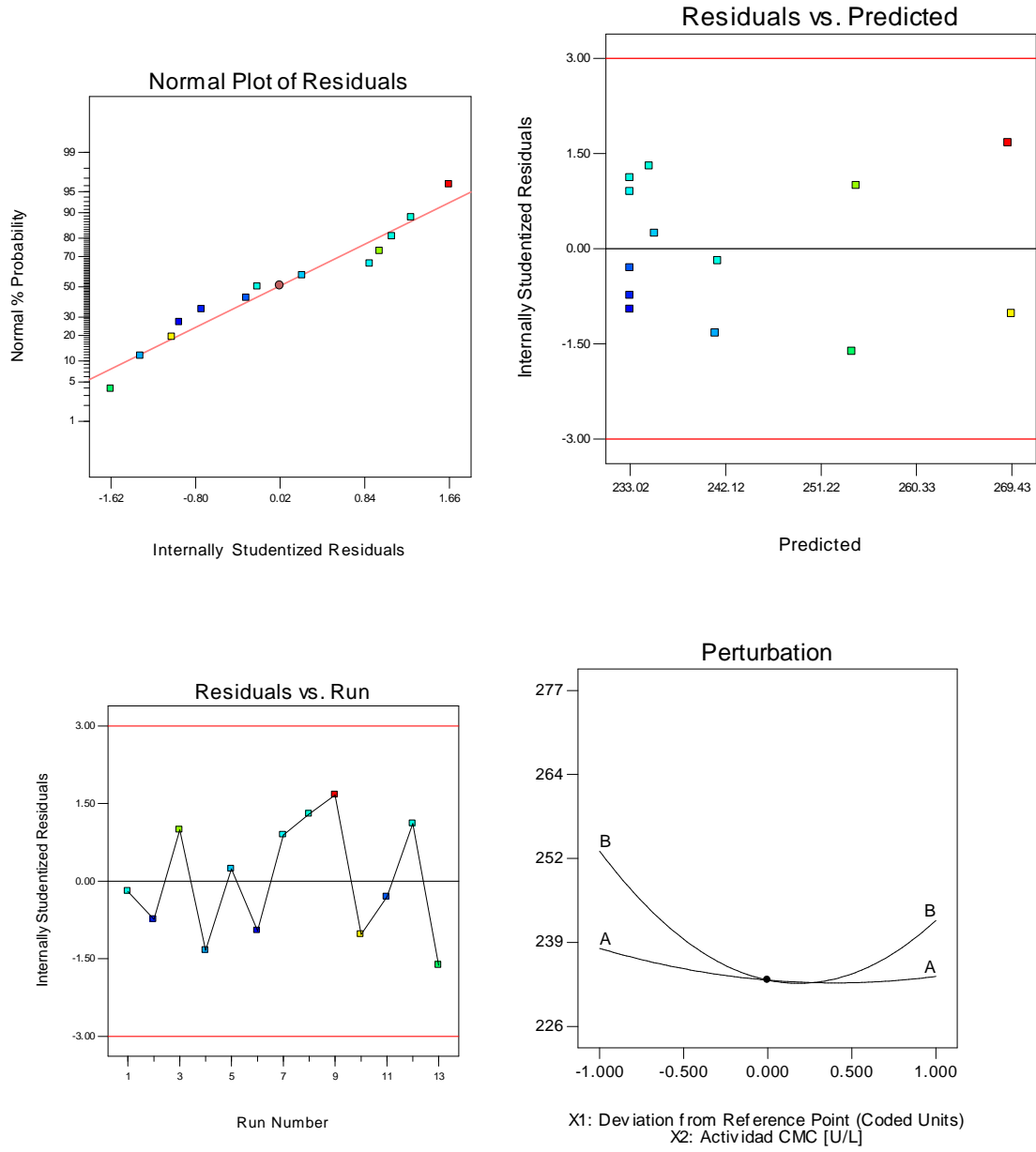


Figura G-4: Gráficos para los experimentos de la **Tabla 3-12** para actividad Avicel®

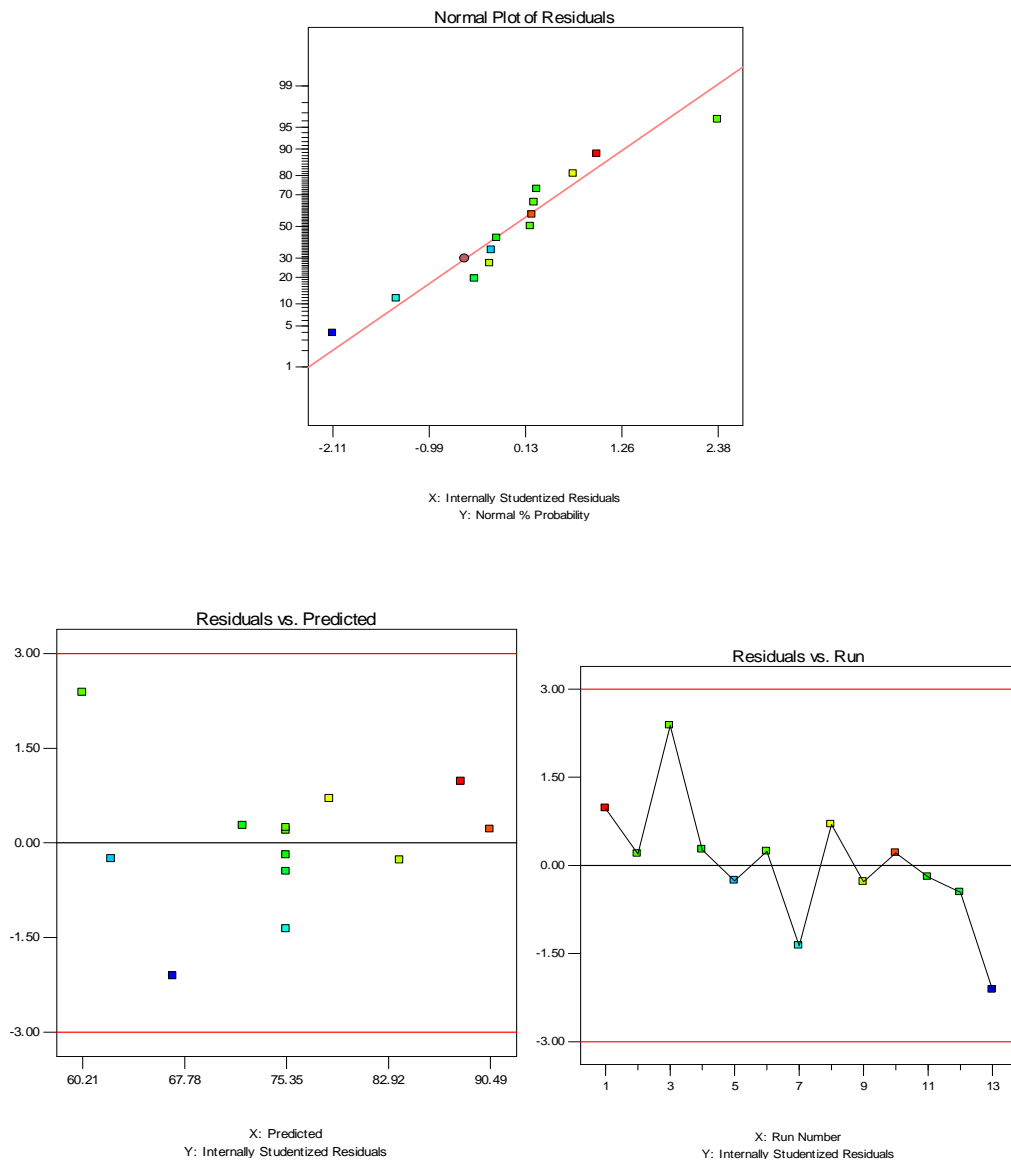


Figura G-5: Gráficos del diseño Plackett Burman

