

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA



\* 5 3 0 9 5 8 3 2 7 6 \*  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**PRODUCCION DE BIOMASA  
DE HONGOS CELULOLITICOS  
PARA LA DEGRADACION  
DE RESIDUOS CELULOSICOS**

**DOMINGO MARQUINA DIAZ**

Madrid 1991

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE BIOLOGIA**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

**PRODUCCION DE BIOMASA  
DE HONGOS CELULOLITICOS  
PARA LA DEGRADACION  
DE RESIDUOS CELULOSICOS**

Memoria presentada para optar al grado  
de Doctor por

D. Domingo Marquina Díaz.

Directores de Tesis:

Prof. Dr. D. José Martínez Peinado.



Prof. Dra. D. Margarita Flores Rodriguez.



Madrid, 1991

**A mis padres**

"Alice remained looking thoughtfully at the mushroom for a minute, trying to make out which were the two sides of it; and as it was perfectly round, she found this a very difficult question".

(Alice's Adventures in Wonderland, Lewis Carroll).

"Si algo nos enseña la CIENCIA es a aceptar con dignidad y serenidad los éxitos y los fracasos".

(Frankenstein, Mary Shelley).

#### IV

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas y entidades que, de una u otra forma, han hecho posible la realización de este trabajo, y muy especialmente.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias que, a través del convenio de colaboración con la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, me concedió la beca predoctoral que me ha permitido llevar a cabo los trabajos para realizar esta Tesis Doctoral.

Al Dr. D. José Martínez Peinado, Catedrático del Departamento de Microbiología, por sus consejos, esfuerzos y perseverancia, sin los cuales no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A la Dra. D. Margarita Flores Rodriguez, Directora, Tutora y Amiga, dandome consejos y apoyándome en todo momento.

A la Dra. D. Carmen Tellez Nogués, por su paciencia y el apoyo informático prestado para la elaboración de esta memoria.

A todos mis compañeros del Departamento de Microbiología, por su comprensión y estímulo a lo largo de todo el proceso de elaboración del trabajo.

A mi familia y amigos, que tan estoicamente han soportado la elaboración de cada una de las partes que componen este trabajo.

**INDICE**

<b>1.- INTRODUCCION .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.- Justificación y objetivos del trabajo .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2.- Situación de la producción de patatas de siembra en España.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3.- Producción de jarabes azucarados a partir de hidrolizados de almidón de patata .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3.1.- Las Dextrinas y Gomas británicas .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.1.1.- Clasificación de las Dextrinas ..</b>	<b>7</b>
<b>1.3.1.1.1.- Dextrinas blancas .....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.1.1.2.- Dextrinas amarillas .....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.1.1.3.- Gomas británicas .....</b>	<b>9</b>
<b>1.3.2.- Jarabes de glucosa y derivados .....</b>	<b>9</b>
<b>1.4.- La producción de biomasa de Hongos Filamentosos para la producción de enzimas .....</b>	<b>10</b>
<b>1.5.- Modelos matemáticos de crecimiento de Hongos Filamentosos.....</b>	<b>17</b>
<b>1.5.1.- Modelo Exponencial .....</b>	<b>17</b>
<b>1.5.2.- Modelo en Raíz Cúbica .....</b>	<b>20</b>
<b>1.6.- Energía de mantenimiento microbiana .....</b>	<b>22</b>
<b>1.7.- Composición y estructura de la biomasa lignocelulósica.....</b>	<b>24</b>
<b>1.7.1.- Composición de la Celulosa .....</b>	<b>26</b>
<b>1.7.2.- Composición de la Hemicelulosa .....</b>	<b>30</b>
<b>1.7.3.- Composición de la Lignina .....</b>	<b>32</b>
<b>1.8.- La biomasa lignocelulósica como principal fuente energética y de productos químicos .....</b>	<b>33</b>
<b>1.8.1.- La biomasa lignocelulósica como fuente de energía.....</b>	<b>33</b>
<b>1.8.2.- La biomasa lignocelulósica en procesos fisicoquímicos.....</b>	<b>35</b>
<b>1.8.3.- Utilización de la biomasa lignocelulósica en procesos biológicos .....</b>	<b>36</b>
<b>1.8.4.- La biomasa lignocelulósica como fuente de productos químicos .....</b>	<b>36</b>
<b>1.9.- Procesos hidrolíticos en materiales lignocelulósicos</b>	<b>39</b>

## VII

1.9.1.-	Procesos de hidrólisis química .....	39
1.9.1.1.-	Hidrólisis ácida .....	39
1.9.1.2.-	Hidrólisis alcalina .....	41
1.9.2.-	Procesos de hidrólisis enzimática .....	42
1.9.2.1.-	Descripción del complejo enzimático de <i>T. reesei</i> .....	45
1.9.2.1.1.-	Inducción del complejo enzimático.....	48
1.9.2.1.2.-	Características del complejo celulolítico.....	52
1.9.2.1.3.-	Estabilidad de las celulasas de <i>T. reesei</i> .....	53
1.10.-	Enzimas no hidrolíticas que intervienen en la degradación de celulosa .....	57
2.-	MATERIAL Y METODOS .....	62
2.1.-	Microorganismos empleados .....	63
2.2.-	Mantenimiento de las Cepas .....	63
2.2.1.-	Siembra en bisel en Agar Patata Dextrosa ..	63
2.2.2.-	Liofilización de esporas .....	65
2.2.3.-	Resiembra en medios de cultivo con celulosa.	65
2.3.-	Selección de variedades de patata .....	65
2.3.1.-	Contenido en almidón .....	66
2.3.2.-	Contenido en agua .....	66
2.3.3.-	Contenido en Fibra .....	69
2.3.4.-	Coficiente en Almidón/Agua y Almidón/Fibra	
2.4.-	Preparación del hidrolizado de almidón .....	70
2.4.1.-	Extracción del almidón .....	70
2.4.2.-	Hidrólisis ácida .....	70
2.4.2.1.-	Empleo de Agentes Tensoactivos .	71
2.4.3.-	Efecto de la concentración de los agentes tensoactivos en el crecimiento de los hongos filamentosos.....	72
2.5.-	Determinación de azúcares .....	73
2.5.1.-	Valoración de Azúcares Totales .....	73
2.5.2.-	Determinación de Azúcares Reductores .....	74

## VIII

2.5.3.- Determinación Enzimática de la Glucosa ....	76
2.6.- Determinación de Proteínas .....	77
2.7.- Medios de cultivo con hidrolizado de almidón .....	78
2.8.- Medios de cultivo con celulosa y derivados .....	81
2.9.- Preparación de Inóculos .....	86
2.9.1.- Recuento de Esporas y Rectas de Calibrado .	86
2.9.2.- Preparación de inóculos a partir de suspensiones de esporas .....	88
2.10.- Medidas de crecimiento .....	89
2.10.1.- Cálculo de la tasa específica de crecimiento.....	89
2.10.2.- Determinación de los factores de rendimiento.....	90
2.10.2.1.- Determinación por consumo total de sustrato .....	90
2.10.2.2.- Determinación en intervalos ...	91
2.10.3.- Determinación de tasas específicas de consumo de sustrato .....	92
2.10.3.1.- Determinación de (q) .....	92
2.10.3.2.- Influencia del pH .....	92
2.11.- Tipos de cultivo .....	94
2.11.1.- Crecimiento en cultivo cerrado en agitación orbital.....	94
2.11.2.- Crecimiento en fermentador en cultivo cerrado.....	94
2.12.- Modelos de crecimiento .....	95
2.13.- Determinación de actividades enzimáticas .....	96
2.13.1.- Actividad Endoglucanasa (Endo $\beta$ 1-4 glucan hidrolasa) (Ec. 3.2.1.4.) .....	96
2.13.2.- Actividad Avicelasa (Exo $\beta$ 1-4 glucan hidrolasa) (Ec. 3.2.1.91) .....	96
2.13.3.- Actividad de Papel de Filtro (F.P.A.) (Ec. 3.2.1.).....	97
2.13.4.- Actividad $\beta$ -Glucosidasa (Ec. 3.2.1.21)...	97
2.13.5.- Definición de las unidades de actividad enzimática.....	98

2.13.5.1.- Actividad Endoglucanasa, Exoglucanasa (Avicelasa) y Actividad de Papel de Filtro ..	98
2.13.5.2.- Actividad $\beta$ -Glucosidasa .....	99
2.14.- Inducción Enzimática .....	99
2.14.1.- Pretratamiento físico del Papel de Filtro.	100
2.14.2.- Pretratamiento químico .....	100
2.15.- Condiciones de producción enzimática .....	101
2.15.1.- Ensayos en matraz .....	101
2.15.2.- Ensayos en fermentador .....	102
 3.- RESULTADOS .....	 104
3.1.- Selección de variedades de patata .....	105
3.2.- Composición de las variedades de patata .....	105
3.3.- Hidrólisis del almidón de patata .....	108
3.3.1.- Influencia del ácido en los procesos de hidrólisis .....	108
3.3.2.- Influencia de la relación Sólido/Líquido ..	109
3.3.3.- Efecto de la temperatura y del tiempo en la hidrólisis .....	109
3.3.4.- Influencia de los tensoactivos .....	109
3.4.- Composición cuantitativa de azúcares del hidrolizado	111
3.5.- Preselección de hongos filamentosos .....	116
3.5.1.- Hongos filamentosos capaces de crecer en medios de cultivo con hidrolizado de almidón como fuente de carbono .....	116
3.5.2.- Hongos Filamentosos capaces de crecer en medios de cultivo con celulosa y derivados.	116
3.6.- Efecto de los tensoactivos en el crecimiento de las cepas de Hongos Filamentosos .....	118
3.7.- Estudio de distintos parámetros en la selección de Hongos Filamentosos .....	118
3.7.1.- Calibración de inóculos .....	122
3.7.2.- Estudio del contenido de nitrógeno y carbono orgánico del medio de cultivo .....	124

3.7.2.1.- Contenido en nitrógeno orgánico..	124
3.7.2.2.- Contenido en carbono orgánico ..	124
3.7.3.- Selección de cepas de Hongos Filamentosos en función de la velocidad de asimilación de la fuente de carbono .....	135
<b>3.8.- Factores que influyen en la asimilación de la fuente de carbono por el hongo filamentoso <i>Trichoderma reesei</i> QM 9414 .....</b>	<b>135</b>
3.8.1.- Efecto de la agitación en el consumo de la fuente de carbono .....	180
3.8.2.- Efecto del pH .....	180
3.8.3.- Efecto de la fuente de nitrógeno .....	186
<b>3.9.- Cinética de crecimiento de <i>Trichoderma reesei</i> QM 9414 en las condiciones óptimas .....</b>	<b>186</b>
<b>3.10.- Estudios de consumo de la fuente de carbono por respirometría .....</b>	<b>189</b>
<b>3.11.- Modelos matemáticos que describen el crecimiento de <i>Trichoderma reesei</i> QM 9414 en cultivo sumergido .....</b>	<b>195</b>
<b>3.12.- Producción enzimática .....</b>	<b>201</b>
3.12.1.- Ensayos previos con distintas sustancias (Inductores y Represores) .....	201
3.12.2.- Ensayos con Papel de Filtro y Avicel: Estudio de la inducción del complejo celulolítico.....	204
3.12.2.1.- Pretratamiento físico del inductor .....	205
3.12.2.2.- Pretratamiento químico del inductor .....	208
3.12.2.2.1.- Papel de Filtro .....	210
3.12.2.2.2.- Papel de Filtro Cardado ..	210
3.12.2.2.3.- Avicel .....	211
3.12.2.3.- Adición de nutrientes al medio ..	212
3.12.2.3.1.- Papel de Filtro .....	216
3.12.2.3.2.- Papel de Filtro Cardado ..	217
3.12.2.3.3.- Avicel .....	219

3.12.2.4.- Selección del inductor y de las condiciones óptimas de producción de celulasas en las condiciones ensayadas .....	220
3.12.2.5.- Ensayos con Sales y Peptona ....	223
3.12.3.- Estudio de la inducción del complejo celulolítico en fermentador .....	224
4.- DISCUSION .....	232
4.1.- Hidrólisis del almidón de patata: Influencia del ácido en el proceso de hidrólisis .....	233
4.2.- Efecto de la temperatura y del tiempo en el proceso de hidrólisis .....	234
4.3.- Influencia de la incorporación de agentes tensoactivos en la mejora de las condiciones de hidrólisis.....	235
4.4.- Comentarios sobre la composición cuantitativa del hidrolizado.....	236
4.5.- Selección de las cepas de hongos filamentosos .....	237
4.6.- Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la asimilación de la fuente de carbono y la producción de biomasa .....	239
4.7.- Influencia de la relación Carbono/Nitrógeno en el rendimiento.....	240
4.8.- Selección de Hongos Celulolíticos en función de la velocidad de asimilación de la fuente de carbono ..	241
4.9.- Influencia de la agitación en la asimilación de la fuente de carbono por <i>Trichoderma reesei</i> QM 9414 en cultivo en batch en fermentador .....	242
4.10.- Efecto del valor de pH del medio de cultivo en el consumo de la fuente de carbono por <i>Trichoderma reesei</i> QM 9414 en cultivo en batch .....	244
4.11.- Consideraciones sobre el descenso de los valores de pH del medio de cultivo y la velocidad de agitación del mismo .....	246

4.12.- Efecto de la sustitución de la peptona por nitrato amónico en el medio de cultivo para la rentabilización del proceso de producción de biomasa fúngica .....	247
4.13.- Comentarios sobre las condiciones óptimas de producción de biomasa con <i>Trichoderma reesei</i> QM 9414, sobre hidrolizado de almidón .....	248
4.14.- Estudios del consumo de la fuente de carbono por respirometría .....	249
4.15.- Modelos matemáticos de crecimiento para <i>Trichoderma reesei</i> QM 9414 en cultivo sumergido .	250
4.16.- Ensayos sobre inducción y represión del complejo celulolítico con distintas fuentes de carbono ...	253
4.17.- Ensayos con Papel de Filtro y Avicel: Estudios de la inducción del complejo enzimático .....	255
4.18.- Efecto del pretratamiento químico sobre los distintos inductores .....	256
4.19.- Efecto de la adición de nutrientes al medio de cultivo sobre la actividad del complejo celulolítico .....	258
4.20.- Efectos del salto de escala (matraz a fermentador) en la producción del complejo celulolítico en cultivo en batch .....	259
5.- CONCLUSIONES .....	260
6.- BIBLIOGRAFIA .....	265

**I.- INTRODUCCION**

### 1.1.- JUSTIFICACION Y OBJETIVOS DEL TRABAJO.

Los residuos celulósicos suponen una de las principales reservas energéticas y de productos químicos para la civilización actual, pero su aprovechamiento hoy en día se restringe a las industrias papeleras y a la elaboración de carbón vegetal como fuente de energía calorífica. Esta falta de interés aparente por esta materia prima se debe en su mayor parte a que los procesos de transformación de la biomasa celulósica por procedimientos químicos resultan muy costosos, obteniendo además por las condiciones de los tratamiento un alto nivel de residuos contaminantes.

Otra forma de abordar el problema de la utilización de los residuos celulósicos es mediante tratamientos enzimáticos. Estos procesos resultan mucho más baratos que los anteriores y prácticamente no producen ningún tipo de contaminación. El problema que se plantea al utilizar enzimas, es que son muy escasos y se conoce poco sobre la fisiología los microorganismos capaces de producir celulasas que degraden la celulosa nativa (Entre ellos los hongos filamentosos).

Todo esto unido a que España es uno de los principales países productores de patatas, hacen del almidón de las mismas (previa transformación) un producto idóneo para elaborar medios de cultivo que permitan el crecimiento de microorganismos capaces de producir celulasas.

De esta forma el trabajo que planteamos puede ser dividido en dos fases:

1.- Producción de Biomasa fúngica (Potencialmente celulolítica).

2.- Producción del Complejo celulolítico.

En la primera fase del trabajo, pretendemos determinar las mejores condiciones para la hidrólisis del almidón de patata que servirá como base de distintos medios de cultivo elaborado por nosotros, y que permitirán el crecimiento de hongos celulolíticos (en condiciones de

represión catabólica del complejo celulolítico). Con la cepa de hongo filamentoso que presente mejor crecimiento sobre el medio de cultivo que seleccionemos, plantearemos el estudio de algunas características fisiológicas de la misma, tales como estudiar el efecto de la incorporación de distintas fuentes de nitrógeno a los medios de cultivo, las condiciones más favorables para el consumo de la fuente de carbono logrando la desrepresión del complejo celulolítico, el efecto de la aireación y del pH sobre el crecimiento, así como la determinación de parámetros cinéticos y la modelización de su forma de crecimiento.

En la segunda fase del estudio, con la biomasa (desreprimida) obtenida al final de la primera fase, y utilizando sustratos celulósicos de interés industrial, se estudiarán las condiciones de producción de los distintos componentes del complejo enzimático celulolítico, determinando si es posible el comportamiento de los mismos a lo largo del proceso de producción.

#### **1.2.- SITUACION DE LA PRODUCCION DE PATATA DE SIEMBRA EN ESPAÑA.**

La patata (*Solanum tuberosum*) junto con los cereales es una de las más importantes fuentes alimenticias y de hidratos de carbono desde su descubrimiento en el siglo XV.

En Europa, alrededor del 25% del almidón comercial proviene de la patata, alcanzando rendimientos en su extracción del 90% del almidón presente en el tubérculo.

España, es junto con Alemania, Francia, Holanda y el Reino Unido los principales países productores de este tubérculo en la C.E.E.

La producción de patata en España ha sido tan elevada, que ha sido necesaria la exportación de los excedentes a otros países de la Comunidad, lo que ha supuesto más de 2.000 toneladas/año.

En la Tabla 1.1 aparecen las exportaciones españolas durante el año 1989.

EXPORTACION DE PATATA DE SIEMBRA

CAMPAÑA 1988-89. Kgs.

DISTRIBUCION POR PAISES Y MESES.

MESES	Bel.-Lux.	Francia	Grecia	Portugal	R. Unido	Mauritania	TOTAL
Noviembre	0	0	0	0	79 729	200 000	279 729
Enero	12 000	0	88 000	324 000	0	0	424 000
Febrero	28 000	24 000	612 000	97 000	0	0	761 000
Marzo	0	0	22 000	477 750	0	0	499 750
Abril	0	0	0	49 000	0	0	49 000
Mayo	0	43 620	0	0	0	0	43 620
TOTAL	40 000	67 620	722 000	947 750	79 729	200 000	2 057 099

Tabla (1.1).- Exportaciones de patatas de España a distintos países durante la campaña 1988/89 expresados en kilogramos.

La producción, superficie de siembra, así como la certificación de las variedades destinadas a la siembra, está regulada por el Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero, dependiente del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación.

### 1.3.- PRODUCCION DE JARABES AZUCARADOS A PARTIR DE HIDROLIZADOS DE ALMIDON DE PATATA.

La producción de jarabes azucarados empleando almidón se remonta a principios del siglo pasado; en 1811 Kirchhoff obtuvo una sustancia viscosa calentando almidón en presencia de ácido. Pero la producción propiamente dicha de dextrinas y jarabes glucosados a partir de este producto se debe a Bouillon y Lagrange, quiénes publicaron su método en el mismo año. Estos estudios resultaron de gran interés, pues permitieron encontrar un producto que pudiera sustituir las gomas naturales importadas en Francia y más caras como la goma arábiga.

En 1833 Biot y Persoz investigaron los productos formados por el tratamiento del almidón con ácido sulfúrico y dieron el nombre de dextrina al material gomoso así obtenido debido a la dirección de su rotación óptica. Sin embargo, fue un accidente lo que jugó un importante papel en el desarrollo de la tecnología de la hidrólisis del almidón. En 1821 se produjo un incendio en un molino textil cerca de Dublin, en almidón de patata almacenado en el anexo de la fabrica se destruyó por el fuego.

La sustancia parda que quedó en los sacos resultó ser soluble en agua, dando una solución pegajosa y dulce.

En 1867 Blaede patentó un sistema de producción de dextrinas pulverizando ácido sobre una lámina metálica caliente en la que existía una fina capa de almidón. Desde entonces y de una forma gradual, se han ido introduciendo modificaciones en el proceso, dirigidas a un mejor control de los productos finales formados.

Es en este momento en el que la industria de derivados del almidón empieza a tener una cierta importancia y comienza a realizarse una clasificación de los productos de hidrólisis.

Dentro de estos, son dos los que presentan una mayor importancia.

1.3.1- Las dextrinas y Gomas Británicas.

1.3.2.- Los jarabes de glucosa y derivados.

#### **1.3.1.- Las dextrinas y Gomas Británicas.**

En la actualidad, la producción de dextrinas está siendo reemplazada por nuevos derivados del almidón, sin embargo, debido a su relativo bajo coste de producción y que la materia prima es abundante, ocupan un importante lugar en la industria de conversión del almidón.

El diseño inicial de las plantas de producción se enfocaba hacia la extracción masiva del producto, hasta que en 1934 Katz estudió la estructura químico-física de los productos de transformación del almidón cuando se somete a elevadas temperaturas (200°C). A partir de entonces, Taylor 1935 y Caesar y Cushing en 1939 realizaron trabajos sobre los efectos de los álcali sobre el almidón y la producción de dextrinas .

Fue en 1952 cuando Rugeber determinó la viscosidad y el peso molecular de los ésteres nítricos de las dextrinas. En 1953 Frey y Lotner comienzan los estudios de degradación ácida y enzimática de las pirodextrinas.

##### **1.3.1.1.- Clasificación de las dextrinas.**

Debido a su heterogeneidad existen distintos rasgos químicos para clasificar a las dextrinas, los rasgos generales que las caracterizan son:

Color, % de solubilidad en agua fría, viscosidad, y el aumento de opacidad al macerarse en dispersiones en caliente.

Las dextrinas pueden considerarse como materiales semisintéticos del almidón, existiendo un gran número de variaciones posibles. En la práctica cada sistema de fabricación produce un grupo de tipos standard, como esto depende del diseño de la planta de fabricación, dextrinas de distintos fabricantes pueden tener características afines y otras que las diferencien.

Básicamente se conocen tres tipos de dextrinas:

1.3.1.1.1.- Dextrinas Blancas.

1.3.1.1.2.- Dextrinas Amarillas o Canarias.

1.3.1.1.3.- Gomas Británicas.

1.3.1.1.1.- Dextrinas Blancas.

Se obtienen con un leve calentamiento (70 a 75°C) durante 45 minutos, del almidón en presencia de un catalizador ácido, alcanzando solubilidades que oscilan entre el 1 y el 95%. En cuanto a las propiedades de absorción de agua suponen una parte de dextrina por cada cinco de agua hasta poder alcanzar una relación 1/1.

1.3.1.1.2.- Dextrinas Amarillas o Canarias.

Se obtienen por elevación de la temperatura hasta 80 ó 90°C durante 55 a 60 minutos con las dextrinas blancas, son solubles en agua entre el 95 y el 100%. La absorción de agua es de una parte de dextrina por cada 1.5 de agua, hasta una a 3/4 o menos para obtener soluciones sobre las que trabajar.

Cuando se trabaja con dextrinas hay que emplear la terminología química coloidal, pues una solución de dextrina es un suspensión coloidal de estas sobre una fase continua que generalmente es el agua.

Los grados de solubilidad de las dextrinas blancas las hacen similares al almidón en sus propiedades, pero los productos

solubles de estas muestran algunas propiedades de las dextrinas amarillas.

#### **1.3.1.1.3.- Las Gomas Británicas.**

Se obtienen por calentamiento del almidón sólo o en presencia de un catalizador básico a temperaturas de 200°C, son comparables a las dextrinas blancas, pero a la misma concentración presentan mayor viscosidad requiriendo tiempos de conversión mucho más elevados (unas 20 horas). La mayoría de las Gomas Británicas presentes en el mercado son modificaciones con pequeñas cantidades de ácido fosfórico.

#### **1.3.2.- Jarabes de Glucosa y Derivados.**

La conversión del almidón en glucosa cristalina o jarabes de la misma así como las modificaciones químicas de estas a través de microorganismos para la obtención de fructosa o sacarosa comercial son los más importantes objetivos de la industria de los derivados amiláceos.

La procedencia del almidón base para los procesos varía según los países; en Estados Unidos, básicamente se emplea almidón de maíz, mientras que en Europa debido al clima y a las condiciones agrícolas predomina la patata y la tapioca, y en menor cantidad el trigo y el sorgo de buena calidad.

Teóricamente la transformación del almidón a glucosa, bien por vía química o enzimática es la suma de la hidrólisis de la amilosa y la amilopeptina.

En los procesos de hidrólisis ácida para la obtención de glucosa a partir de almidón, se emplean generalmente temperaturas superiores a las de ebullición, generalmente entre 110 y 130°C en condiciones de sobrepresión entre 0.5 y 2.5 Kg/cm<sup>2</sup>. Los ácidos utilizados son ácidos fuertes como el clorhídrico y el sulfúrico, generalmente su concentración máxima equivale a un 0.12% del peso del

almidón a hidrolizar, aunque según las condiciones puede incrementarse este porcentaje en un 0.2%. Los tiempos empleados también están en función de la temperatura y de la sobrepresión.

En este proceso de hidrólisis, generalmente se produce el ataque preferente a los enlaces de tipo  $\alpha(1-6)$  del almidón (Kerr, 1980). Ello se debe básicamente a la orientación física de las moléculas que forman el gránulo de almidón, tendiendo a la eliminación de los restos a lo largo de las cadenas definidas por el enlace preferencial.

El calentamiento aumenta la actividad de los iones hidroxonio que actúan como tijeras moleculares. Así desciende drásticamente la viscosidad del medio, proporcionando la degradación hidrolítica más cadenas lineales, siendo estadísticamente más posible el ataque a los enlaces  $\alpha(1-4)$  glicosídicos, descendiendo así nuevamente la viscosidad. Así aumenta la linealidad, las moléculas de almidón se hacen menos complejas, lo que cambia la propia estructura del almidón haciéndole más soluble.

Debido a la elevada temperatura y a la gran reactividad de los grupos -OH son frecuentes los procesos de transglicosilación, originando disacáridos como la gentilobiosa (glucosa + glucosa  $\beta(1-6)$ ) o la soforosa (glucosa + glucosa  $\beta(1-2)$ ) (Mandels, 1962). Así la producción de glucosa depende de los equilibrios:



En un 99.9% de los casos los equilibrios de formación/disociación están desplazados hacia la formación de glucosa.

El calor y la calidad de los hidrolizados del almidón, determinan las características de la glucosa obtenida. Así los llamados jarabes de almidón contienen entre un 12 a 20% de mezclas de dextrinas que inhiben la cristalización de la dextrosa presente en el medio. Generalmente estos productos se emplean para la elaboración de alimentos.

Los jarabes de glucosa, son componentes que contienen un bajo contenido en dextrinas (menos del 1%) y un elevado nivel de dextrosa del orden del 42%, siendo estos los más empleados.

Otro tipo de jarabe de glucosa utilizado industrialmente es el producido por ataque mixto químico-enzimático alcanzando niveles de dextrosa del 56%, aunque en este, aparecen dextrinas, maltosa e isomaltosa en función de la mezcla enzimática empleada Tabla 1.2.

A partir de la desecación y posterior cristalización de estas mezclas se obtiene la dextrosa, que contiene entre un 85 a 99.5% de glucosa pura según las condiciones de cristalización.

Cuando este producto se obtiene a partir de almidón de patata recibe el nombre de cerelesa, y contiene una molécula de agua de cristalización, con un contenido en glucosa anhidra del 91.4%.

La glucosa pura anhidra con fines de análisis se obtiene por procesos de purificación química y deshidratación posterior.

Otro uso de los jarabes de glucosa es para su transformación por isomerización en fructosa. En la década de los sesenta, se desarrolló un método de isomerización alcalina en el que empleando concentraciones de glucosa del orden del 50% p/v, obtenía entre un 33 a 35% de producto invertido (fructosa).

(Schnyder, 1974) desarrolló el proceso empleando enzimas inmovilizadas y (Tsumura y Sato, 1965) empleando invertasa de *Streptomyces phacochromogenus* con un 50% p/v de glucosa incubando a pH 6.7 a 60°C durante 48 horas logran obtener un 50% de glucosa y un 50% de fructosa.

A partir de esta idea se han desarrollado distintos procedimientos que han dado lugar a una serie de patentes como la de Kurimoto y Harao en 1970 Ger offen 1958935 o la de Yuen, también en 1970 Food Ind Japón 132273.

Average composition of glucose syrups commercially available

	<i>Acid converted</i> (43 DE)	<i>Acid-enzyme dual</i> (63 DE)	<i>High maltose</i> (43 DE)	<i>High fermentable</i> (70 DE)	<i>Liquid dextrose</i> (95 DE)	<i>High maltose</i> (52 DE)	<i>Confection syrups</i> (55 DE)
Baume	43.1 <sup>2</sup>	43.1 <sup>2</sup>	43.1 <sup>2</sup>	43 <sup>2</sup>	—	—	43.1 <sup>2</sup>
Dextrose equivalent—%	43.0	63.0	43.0	70.0	95.0	52	53–57
Dry substance—%	80.54	82.0	80.5	82.2	71.0	80.7	82.2
pH, 50% solution	5.0	5.0	5.0	5.0	—	5.0	—
Original Lovibond colour							
—5 in. cell (127 mm)	0.5	1.0	0.5	—	—	—	—
Invert power—%	1.5	—	1.5	—	—	—	—
Ash—%	0.25	0.35	0.3	0.3	0.5	0.3	0.3
Carbohydrate composition:							
monosaccharides—%	19.4	37.4	6.0	43.0	85.0	5	30–32
disaccharides—%	14.2	34.2	44.0	30.0	10.0	67	18
trisaccharides—%	11.8	10.1	14.0	6.5	—	17	—
tetrasaccharides—%	9.9	3.1	—	5.0	5.0	11	50
higher saccharides—%	44.7	15.2	36.0	15.5	—	11	—
Fermentables		72.0	—	80.0	95.0	—	—

Tabla (1.2).— Composición de distintos jarabes azucarados obtenidos industrialmente, bien por vía química o enzimática o una mezcla de ambas.

#### 1.4.- LA PRODUCCION DE BIOMASA DE HONGOS FILAMENTOSOS PARA LA PRODUCCION DE ENZIMAS.

La producción de biomasa micelial para la obtención de enzimas es un proceso que se conoce desde la antigüedad, 1.000 años antes de Jesucristo ya se empleaban estos procedimientos para la preparación de alimentos en oriente (Cannel y Moo-Young, 1980).

Básicamente existen dos sistemas de producción de enzimas.

- La Fermentación en Estado Sólido. (Solid Substrate Fermentation S.S.F.).
- Fermentación en Cultivo Sumergido.

En la fermentación en estado sólido se emplean materiales insolubles para el crecimiento de la biomasa fúngica, a diferencia de los sustratos solubles o en suspensión utilizados en los cultivos sumergidos.

En la práctica las fermentaciones en estado sólido se llevan a cabo en un sistema muy denso en ausencia o casi en ausencia de líquido.

No es posible establecer una clara línea de demarcación respecto al líquido libre en las fermentaciones, se ha observado que la actividad biológica cesa cuando la humedad está por debajo del 12% (Golucke, 1977). En cuanto al límite superior de esta humedad depende del sustrato empleado, por ejemplo, cuando se emplea la corteza de arce, el nivel de absorción de agua es del 40%, mientras que si se emplea salvado de trigo, el nivel asciende hasta un 75%.

En las fermentaciones en estado sólido el micelio se desarrolla en la superficie del sustrato, siendo así imposible su extracción para posteriores usos; en cambio, cuando se emplean los métodos de cultivo sumergido este problema no existe, ya que el micelio aparece dispuesto en forma de filamentos aislados o pellets.

Los filamentos aislados (hifas) debido a las condiciones de agitación, pueden enrollarse unos a otros formando aglomeraciones que

no pueden considerarse verdaderos pellets, ya que se disgregan con la simple dilución del medio de cultivo. En general, el aspecto y las condiciones de las hifas dependen de las condiciones del medio de cultivo (pH, temperatura etc...) (Pirt, 1966).

La formación de pellets puede considerarse como un balance entre el tipo de inóculo, su concentración y el propio medio de cultivo (Camici, 1952) (Galbraith y Smith 1969).

Este fenómeno fue observado por Phillips en 1966 con *Penicillium crysogenun*, estimando que cuando el tamaño del pellets es superior a 0.2 mm. de diámetro el centro del mismo se comporta como anaerobio debido a la dificultad en la difusión de oxígeno en el interior; de esta forma se ha comprobado que la difusión de oxígeno es el principal factor limitante del crecimiento de hongos filamentosos en cultivo sumergido.

Cuando se aborda la producción enzimática, a veces se requiere producir una gran cantidad de micelio. Esto ocurre en dos casos, bien porque el enzima esté ligada al crecimiento microbiano (metabolismo primario) o bien porque la cepa sea poco activa. Ello ha llevado al desarrollo de cepas hiperproductoras en las que con poco micelio se obtienen elevados niveles de actividad enzimática, algunos ejemplos son la cepa A.T.C.C. 1011 de *Aspergillus oryzae*, como hiperproductor de amilasas, la cepa A.T.C.C. 9112 de *Penicillium ochrochlorom*, hiperproductora de  $\beta$ -ribonucleasas o la cepa A.T.C.C. 26921 de *Trichoderma reesei* como hiperproductora de celulasas.

Cuando se van a producir enzimas industrialmente, la elección de uno u otro método depende mucho del sustrato que se va a emplear, de la resistencia o no a la sequedad del microorganismo empleado, de las características y formas de extracción del enzima, así como del rendimiento obtenido con cada método.

El sistema más empleado en las fermentaciones en estado sólido es el método Koji considerado como el método tradicional, empleado en el antiguo Japón para la fabricación de salsa de soja.

Con este sistema se han obtenido  $\alpha$ -Galactosidasa (Sitman, 1980), pectinasas y hemicelulasas (Mushikova, 1978) y celulasas (Toyama, 1976) Figuras 1.1 y 1.2.

Desde el punto de vista de la ingeniería, existen una serie de ventajas e inconvenientes que hacen más o menos aconsejable el empleo de cada uno de los métodos de producción.

Al emplear la fermentación en estado sólido:

1.- La aireación es buena debido a los espacios de aire existentes en el medio de cultivo, no precisando por tanto ningún sistema mecánico de aireación (no se necesita agitación continua como en el cultivo sumergido).

2.- La ausencia de líquido libre y el bajo contenido en humedad por unidad de peso de sustrato implica que:

A.- Para una misma productividad, las plantas de producción son mucho más pequeñas que las de cultivo sumergido.

B.- Los efluentes producidos son mucho más pequeños y por tanto más fácilmente tratables.

C.- Los procesos de extracción requieren el empleo de menos cantidades de reactivos.

D.- La baja humedad inhibe el desarrollo de la microflora contaminante (sobre todo las bacterias) lo que hace que no sean tan estrictos los requerimientos de esterilización.

E.- Estos métodos pueden adaptarse tanto a cultivo en batch como en continuo.

La fermentación en estado sólido tiene además una serie de inconvenientes que la desaconsejan para determinados procesos.

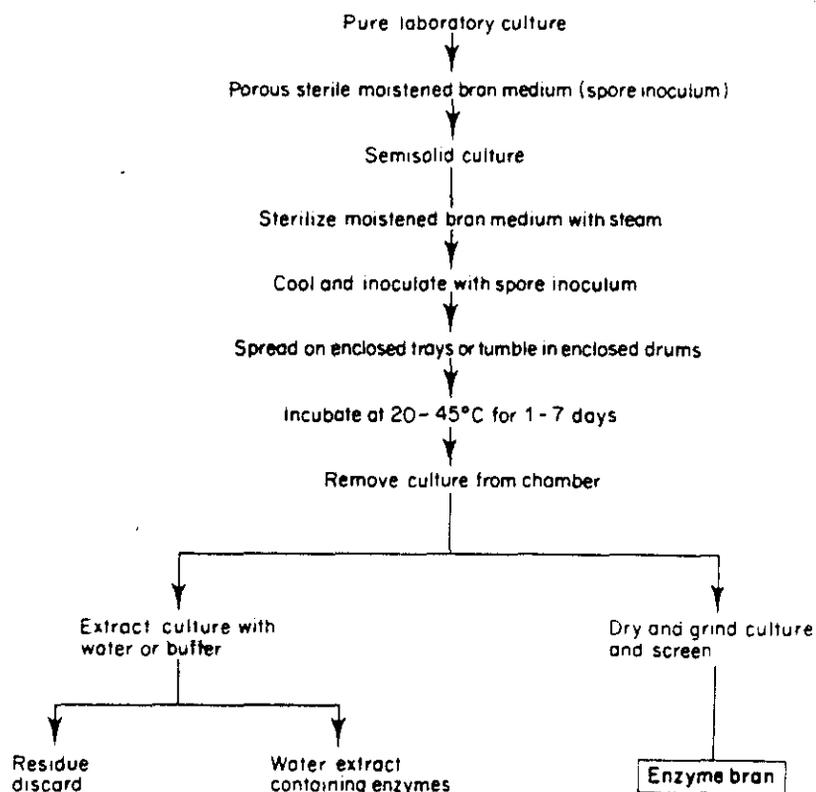


Figura (1.1).- Secuencia de producción enzimática utilizando el método Koji (Bailey y Ollins, 1977).

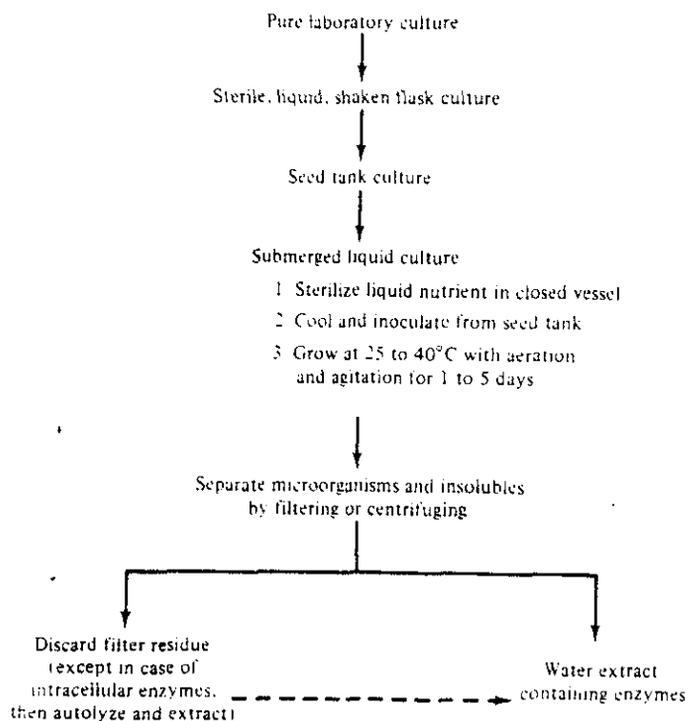


Figura (1.2).- Diagrama de producción de enzimas microbianas en cultivo sumergido (Underkoffer, 1966).

1.- El proceso se limita a hongos filamentosos que puedan tolerar bajas cantidades de humedad sin esporular o morir. Este problema no sucede en el cultivo sumergido, pues mientras exista agitación no se produce esporulación.

2.- Los parámetros de producción, como el nivel de humedad, pH, temperatura, nivel de oxígeno, de anhídrido carbónico, así como la biomasa producida y los rendimientos, son difíciles de determinar debido a que el medio de cultivo no es homogéneo, lo que origina una falta de control en el proceso, transformándolo en irreplicable. Así la mayor parte de estos procesos resultan artesanales.

Estos problemas han sido resueltos con las técnicas de cultivo sumergido con el desarrollo de sondas para el control de parámetros y el tratamiento de los mismos por ordenador. De ahí que la tendencia actual en los procesos de producción enzimática sea el desarrollo de los cultivos sumergidos.

#### 1.5.- MODELOS MATEMATICOS DE CRECIMIENTO DE HONGOS FILAMENTOSOS.

##### 1.5.1.- Modelo Exponencial.

Los modelos matemáticos se utilizan para poder describir en cada momento el comportamiento de los microorganismos frente a distintas condiciones físico-químicas, tales como el pH, la temperatura y la actividad de agua (Zwietering, 1990).

Durante mucho tiempo se asumió que el modelo matemático para poder describir el crecimiento microbiano era el modelo de crecimiento exponencial, ya que el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos (bacterias, algas unicelulares, protozoos y levaduras) puede ser ajustada al mismo (Emerson, 1950), y que cualquier desviación de este modelo era debido a limitaciones de nutrientes del medio en el que crecía el microorganismo.

El ajuste a este modelo matemático de tipo exponencial se debe a la forma característica de crecimiento de estos microorganismos en los que se produce una división binaria (cada individuo da lugar a otro semejante a su progenitor). Esta división se produce al cabo de un tiempo determinado llamado tiempo de generación ( $t_g$ ), que es constante para cada microorganismo en cada una de las condiciones en la que es cultivado.

Los microorganismos que siguen el modelo de crecimiento exponencial se encuentran siempre en contacto con los nutrientes del medio, no presentando por ello ninguna dificultad en el acceso a los mismos.

Al cabo de un tiempo ( $t$ ), una población microbiana con ciertas características alcanza un número de microorganismos igual a:

$$N = N_0 \cdot e^{\mu \cdot t} \quad \text{donde } N: \text{Número de microorganismos en un tiempo } (t).$$

$N_0$ : Número de microorganismos en un tiempo ( $t=t_0$ ).

$t$ : Tiempo en (h).

$\mu$ : Tasa específica de crecimiento para el microorganismo en el medio de crecimiento (Monod, 1942).

Al estudiar el crecimiento de los microorganismos filamentosos (hongos y actinomicetos), se comprobó que la base estructural de este crecimiento divergía mucho de la descrita para los microorganismos con crecimiento de forma dispersa, comprobando que el modelo de crecimiento exponencial no se ajustaba a la nueva forma de crecimiento (Marshall y Alexander, 1960).

Plomley (1959) intenta buscar semejanzas entre el crecimiento de los microorganismos aislados y el crecimiento micelial para poder aplicar sobre ellos el modelo logístico de crecimiento, este mismo autor sugiere que en los microorganismos miceliales existe lo que define como *unidad de crecimiento hifal* ( $G$ ), que es el cociente

obtenido al dividir la longitud total del micelio entre el número de ramificaciones de este. Esto se asemeja de alguna forma a las células individuales de un microorganismo unicelular, pero esto sólo puede considerarse desde el punto de vista fisiológico y no morfológico (Steele y Trici, 1975).

Así, el crecimiento de las hifas de los hongos filamentosos se produciría en función de la duplicación de esta unidad de crecimiento hifal (G), y de esta forma sí podría hablarse de un crecimiento exponencial de los hongos filamentosos. Así, la tasa de extensión de una colonia o de una hifa es función de su longitud, de su zona periférica (w) y de su tasa específica de crecimiento ( $\mu$ )

$$K = w \cdot \mu$$

Pero a su vez (K) es función de la unidad de crecimiento hifal (G) y de la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ).

Así:

$$E = G \cdot \mu$$

Donde G y  $\mu$  son constantes excepto en las primeras fases del crecimiento.

Al determinar por este método el crecimiento del micelio de *Neurospora crassa* tanto en medios de cultivo sólidos como líquidos se observaron diferencias entre los valores de  $\mu$  y G en medio sólido y líquido. Así mismo, se comprobaron los distintos valores de  $\mu$  y G entre hifas periféricas y centrales de una misma colonia, estimándose que esto se debía sin lugar a dudas a cambios físicos o químicos en el microentorno de las hifas para cada condición (Park, 1966).

El conocimiento de los distintos parámetros que influyen de una manera directa en el crecimiento microbiano, ha llevado a adaptar la ecuación general del crecimiento exponencial a estos, (Zwietering, 1990).

### 1.5.2.- Modelo en Raíz Cúbica.

La determinación del peso seco del micelio producido en cultivos en medio líquido puede ser una medida válida de su proliferación (Emerson, 1950), pues en estos medios, el crecimiento de las hifas no se ve restringido a ninguna dirección, creciendo estos microorganismos formando "pellets" o madejas más o menos compactas de forma esférica. De esta forma se puede establecer una relación lineal entre la raíz cúbica del peso del micelio formado frente al tiempo, y ello ocurre porque la masa de los pellets es proporcional al cubo de su radio (realmente a la elongación o crecimiento de cada una de las hifas que forman el pellet), es decir:

$$dr/dt = a \quad (\text{Ec. 1.1}) \quad \text{Integrando}$$

$$r = r_0 + a \cdot t \quad (\text{Ec. 1.2})$$

Si se expresa el volumen de la esfera como

$$V = 4/3\pi \cdot r^3 \quad (\text{Ec. 1.3}) \quad \text{y la densidad de la misma como}$$

$$p = m/v \quad (\text{Ec. 1.4}) \Rightarrow v = m/p \quad (\text{Ec. 1.5})$$

Sustituyendo en (Ec. 1.3) el valor del volumen en (Ec. 1.5)

$$m/p = 4/3 \pi \cdot r^3 \quad (\text{Ec. 1.6}) \Rightarrow r = \sqrt[3]{(m/p \cdot 4/3\pi)} \quad (\text{Ec. 1.7})$$

$$r = m^{1/3}/(4/3\pi \cdot p)^{1/3} \quad (\text{Ec. 1.8})$$

Donde  $4/3\pi \cdot p$  es una constante igual a 0.74, asumiendo que para los pellets densos su densidad es de  $0.1 \text{ g/cm}^3$ . (Pirt 1966).

Sustituyendo  $r$  en la ecuación (Ec. 1.2)

$$m^{1/3}/(4/3\pi \cdot p)^{1/3} = [m_0^{1/3}/(4/3\pi \cdot p)^{1/3}] + (a \cdot t) \quad (\text{Ec. 1.9})$$

Hay datos que indican que los pellets no son homogéneos y que el centro es inerte metabólicamente hablando debido a la dificultad de acceso de los nutrientes (Pirt, 1960). No obstante, la superficie del pellet es la metabólicamente activa y la responsable del crecimiento del mismo. Así, surge la hipótesis de la zona W (Omega) o zona metabólicamente activa.

En esta zona es donde se produce la asimilación de los nutrientes por parte de las hifas que forman el pellet, de ahí, la relación entre la tasa específica de asimilación de sustrato ( $q$ ) por hifa y la concentración de sustrato, que siguen una cinética de tipo Micaelis-Menten.

$$q = q_m \cdot S / (K + S) \quad (\text{Ec. 1.10})$$

donde

S: Concentración de sustrato.

$q$ : Tasa específica de utilización de sustrato  
definida por:

$$1/M \cdot dS/dt. \quad (\text{Ec. 1.11})$$

M: Biomasa de la población microbiana

$q_m$ : (tasa máxima específica de consumo de sustrato)

K: Constante de saturación.

El valor de S comparado con el de K se asume que es mucho mayor.

De esta forma, puede suponerse que el radio del pellet crece linealmente.

$$dr/dt = a \cdot w \quad (\text{Ec. 1.12})$$

despejando  $m$  de (Ec. 1.6) y derivando

$$m = d(4/3 \cdot \pi \cdot r^3 \cdot p) \quad (\text{Ec. 1.13}) \implies$$

$$d(4/3 \cdot \pi \cdot r^3 \cdot p)/dt \implies 4 \cdot r^2 \cdot w \cdot p \cdot a = 0 \quad (\text{Ec. 1.14})$$

Sustituyendo el valor de  $r$  (Ec. 1.8) en (Ec. 1.12)

$$m^{1/3} / (4/3 \cdot \pi \cdot p)^{1/3} = m_0^{1/3} / (4/3 \cdot \pi \cdot p)^{1/3} + a \cdot w \cdot t \quad (\text{Ec. 1.15})$$

$$m^{1/3} = m_0^{1/3} + (4/3 \cdot \pi \cdot p)^{1/3} \cdot w \cdot a \cdot t \quad (\text{Ec. 1.16})$$

Pirt en 1966 calcula que el valor de la zona  $W$ (Omega) es de 0.077mm, estableciendo así diferencias significativas entre los aspectos metabólicos de la corteza y del núcleo del pellet.

Así pues, cuando

$r \gg w$ , el pellet sigue un modelo de crecimiento en raíz cúbica.

$r = w$ , el pellet sigue un modelo de crecimiento exponencial.

### 1.6.- ENERGÍA DE MANTENIMIENTO MICROBIANO.

Se define la energía de mantenimiento de sistemas celulares como la energía libre que se utiliza para mantener el sistema en estado funcional (MacGrew y Mallette, 1962). Esto es, la energía necesaria para la síntesis de macromoléculas que sufren una degradación continua por mecanismos de autólisis (Turnover molecular) (Van Uden, 1974).

Marr, Nelson y Clark en 1963, introducen el concepto de tasa específica de mantenimiento ( $m_k$ ).

Partiendo de la ecuación general del crecimiento microbiano  $\mu = Y \cdot q$  (Ec. 1.17), siendo el valor de ( $q$ ) la suma de la energía utilizada para el crecimiento y para el mantenimiento celular. Así,

$$\mu = Y(q_g - q_m) \quad (\text{Ec. 1.18})$$

de esta forma  $\mu = Y_{\max} \cdot q_g$  (Ec. 1.19)

Donde  $Y_{\max}$  es el valor máximo que puede tomar  $Y$  cuando  $q_m$  tiende a cero.

Combinando las ecuaciones 1.18 y 1.19 se obtiene:

$$Y = Y_{\max} (q_g/q_m - q_g) \quad (\text{Ec. 1.20}).$$

Multiplicando el numerador y el denominador de la ecuación 1.20 por  $Y_{\max}$  y sustituyendo en la ecuación 1.19 se obtiene:

$$Y = Y_{\max} (\mu / Y_{\max} \cdot q_m + \mu) \quad (\text{Ec. 1.21})$$

Donde  $Y_{\max} \cdot q_m = a$  (Ec. 1.22), (Tasa de mantenimiento).

Así la ecuación del crecimiento puede ser sustituida por:

$$\mu + a = Y_{\max} (q_g + q_m) \quad (\text{Ec. 1.23})$$

Si toda la fuente de energía que se utiliza para el mantenimiento se empleara para el crecimiento microbiano, la tasa de crecimiento aumentaría a  $(\mu + a)$ , por tanto  $a$  es una medida para determinar la tasa específica de crecimiento, no relacionada con el consumo de la fuente de energía.

$q_m$  fue definida por Pirt en 1965 como el "Coeficiente de mantenimiento".

Sustituyendo la ecuación 1.22 en la ecuación 1.21 se obtiene:

$$Y = Y_{\max} (\mu / a + \mu_g) \quad (\text{Ec. 1.24})$$

Transformando esta ecuación en su inversa.

$$1/Y = 1/Y_{\max} + (a/Y_{\max}) \cdot (1/\mu) \quad (\text{Ec. 1.25})$$

Sustituyendo la ecuación 1.22 en la ecuación 1.25

$$1/Y = (1/Y_{\max}) + (q_m/\mu) \quad (\text{Ec. 1.26})$$

El coeficiente de mantenimiento varía con los microorganismos y con los medios en los que se desarrollan. En microorganismos aerobios, esta tasa es más pequeña que en el caso de los anaerobios, porque para obtener la misma cantidad de energía los microorganismos anaerobios necesitan utilizar menos fuente de carbono (Tabla 1.3)

MICROORGANISMO	CONDICIONES	qm g/g.h
<i>Aerobacter aerógenes</i>	Aerobio	0.076
<i>Aerobacter cloacae</i>	Aerobio	0.094
<i>Aerobacter cloacae</i>	Anaerobio	0.473
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Anaerobio	0.200
<i>Escherichia coli</i>	Aerobio	0.043
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Aerobio	0.022
<i>Aspergillus nidulans</i>	Aerobio	0.014
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mutante respiratorio	0.140

Tabla (1.3) Valores de  $q_m$  para distintos microorganismos según Van Uden, 1974 y Pipyn, 1978.

#### 1.7.- COMPOSICION Y ESTRUCTURA DE LA BIOMASA LIGNOCELULOSICA.

Los materiales lignocelulósicos representan aproximadamente la mitad de la biomasa presente sobre la Tierra, pudiéndose estimar su producción anual en  $5 \times 10^{10}$  toneladas.

La composición química mayoritaria de estos materiales es tres polímeros estructurales, la celulosa, que es la más abundante entre el 35 y el 40%, seguida de la lignina con un 15 a 35% y las hemicelulosas, con un 20 a 40% respectivamente según el vegetal del que se trate (Tabla 1.4).

Las fibras de celulosa se encuentran imbricadas en una matriz amorfa de lignina y hemicelulosas (Figura 1.3). En su estado nativo los materiales lignocelulósicos se encuentran asociados a otros componentes de naturaleza no estructural como fenoles, terpenos o alcaloides, que pueden llegar a suponer un porcentaje considerable en el peso de estos materiales, pudiendo así mismo llegar a tener una influencia significativa en los procesos de degradación (Cowling y Kirt, 1976).

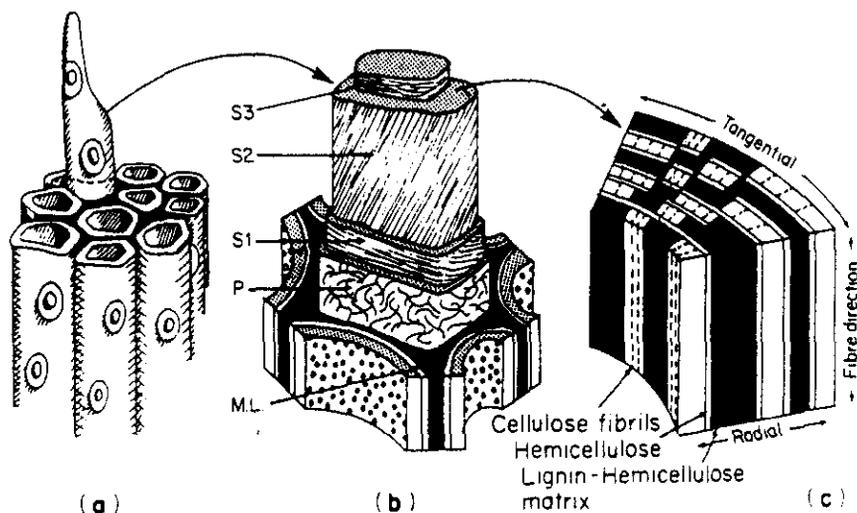


Figura (1.3).- (a) Estructura de los tejidos leñosos, mostrando las relaciones de las células a través de la pared celular.  
 (b) relación entre la lignina, la hemicelulosa y la celulosa en la pared secundaria.  
 (c) El diámetro decada célula es aproximadamente de 25  $\mu\text{m}$  desde S1 a S3 (Paredes secundarias), P (Pared primaria), ML (Lámina media).

MATERIAL	CELULOSA %	HEMICELULOSA %	LIGNINA %
Paja de Arroz	45	26	25
Paja de Trigo	45	26	18
Bagazo de Caña	52	27	19
Caña de Maíz	46	31	13
Madera de Abedúl	42	38	19
Madera de Arce	45	29	24
Abeto del Canada	41	23	33
Bagazo de Remolacha	41	20	20
Tallo de Soja	35	25	20

Tabla (1.4).- Contenido en celulosa, hemicelulosa y lignina de distintos materiales lignocelulósicos (Kent y Kirk, 1983).

### 1.7.1.- Composición de la Celulosa.

La celulosa es el biopolímero más abundante en la naturaleza (Pathak y Ghose, 1973), (Castanon y Wilke, 1981). Es el constituyente principal de la pared celular de los tejidos vegetales, pudiendo ser sintetizada también por algunas bacterias, protozoos y hongos filamentosos (Sleigh, 1973). Es insoluble en agua pero soluble en disoluciones de hidróxido de cobre amoniacal.

La celulosa es un holopolímero lineal, altamente regular, constituido por restos de D-glucosa unidos entre sí por enlaces glicosídicos de tipo  $\beta(1-4)$ . Los restos de glucosa presentan una conformación en silla, que es la más estable en la naturaleza (Figura 1.4.). Su peso molecular es muy elevado, oscilando entre 50.000 y 2.500.000 dalton según su procedencia, ello equivale de 300 a 15.000 restos de glucosa por molécula.

Es esta composición química la que confiere a la fibra de celulosa su resistencia tanto a los ataques físicos, químicos y enzimáticos.

Las moléculas de celulosa se encuentran unidas entre sí a través de puentes de hidrógeno y por fuerzas de Van der Waals (Figura 1.5). Estas zonas de unión se corresponden con las zonas de mayor refringencia a los rayos X, debido a la orientación en paralelo de las cadenas de celulosa (microfibrillas), dando lugar así a la formación de mallas cristalinas denominadas "micelas" (Figura 1.6).

Estas micelas de unos 3.5 nm. de diámetro poseen una gran estabilidad química y están formados por término medio por unos 100 restos de glucosa. Es esta disposición paracristalina la que ofrece un impedimento estérico al ataque enzimático.

Entre las micelas existen espacios relativamente pequeños en los que no existen enlaces entre moléculas, estas zonas vacías a los electrones de los diagramas de difracción de rayos X, suponen alrededor de un 5% del total de la celulosa y constituyen la llamada

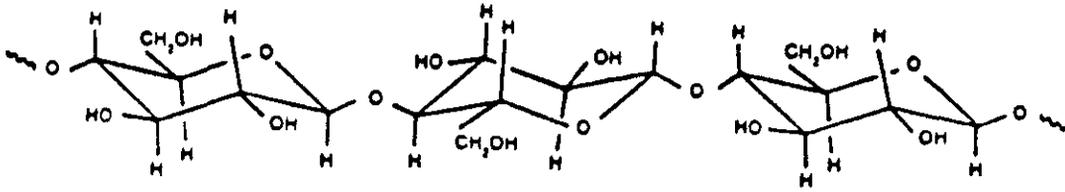


Figura (1.4).- Disposición en "silla" de las moléculas de glucosa que componen la celulosa.

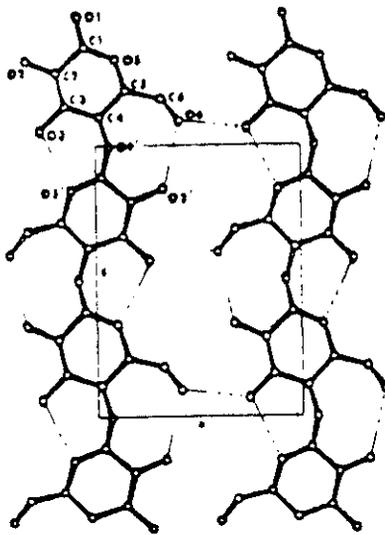


Figura (1.5)

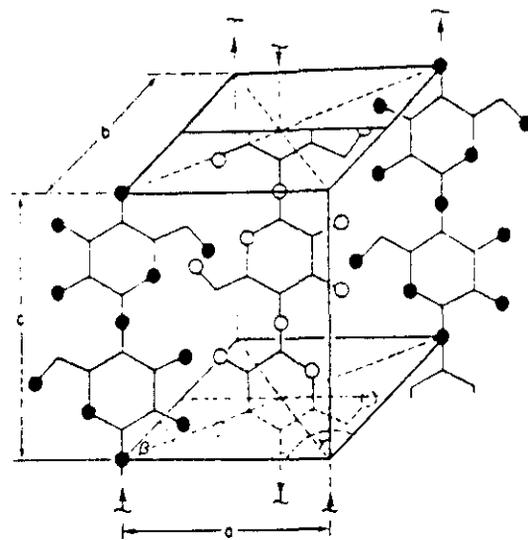


Figura (1.6)

Figura (1.5).- Unión de las moléculas de celulosa a través de puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals.

Figura (1.6).- Malla cristalina "Micela" de la celulosa.

"celulosa amorfa" donde las moléculas están desordenadas, lo que las confiere la propiedad de estructurarse y de ser más elásticas, siendo así más sensibles a los posibles ataques hidrolíticos (Figura 1.7).

La teoría actualmente admitida para explicar la estructura de la celulosa en su estado nativo es la de la "micela flocada".

El análisis del patrón de difracción de rayos X emitido por la celulosa indica que las micelas o fibrillas elementales se agrupan a su vez en paquetes de unas 20 unidades para formar a su vez microfibrillas con un diámetro de unos 10 nm en la celulosa de la madera y la bacteriana (Preston, 1971). Entre estas microfibrillas visibles a microscopia electrónica aparecen huecos donde se depositan sustancias no celulósicas (hemicelulosa, lignina) que se unen íntimamente al polisacárido, siendo responsables de la resistencia de la celulosa de las paredes vegetales (Fan y Lee, 1981), (Neely, 1984), y (Szczodrak, 1986).

Las microfibrillas en determinadas ocasiones pueden asociarse en haces de 250 unidades dando lugar a las fibras celulósicas visibles a microscopia óptica, y la unión de estas fibras en haces de 1.500 fibras forman las macrofibras de celulosa visibles a simple vista (Calvin, 1979), (Figura 1.8).

Los estudios espectrofotométricos han permitido encontrar diferencias significativas entre la celulosa nativa y las celulosas regeneradas por tratamientos alcalinos. En ambos casos, la formación de puentes de hidrógeno intracatenarios es distinto, lo que da lugar a distintos tipos de ordenaciones moleculares y por tanto a distintos tipos de cristalización (Jones, 1971).

Así se puede hablar de complejos celulósicos polimórficos, esto es, celulosas con un estado de cristalinidad muy alto, las llamadas celulosas de tipo I, equiparables a las nativas. Celulosas semicristalinas, en las que sigue existiendo una ordenación periódica o de tipo II, y por último, la celulosa amorfa en la que no existe ningún tipo de ordenación de los materiales, o celulosa de tipo 0.

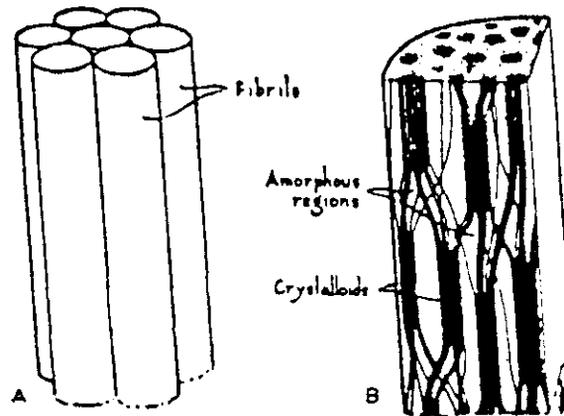


Figura (1.7).- Disposición de la celulosa cristalina y amorfa en una fibra vegetal.

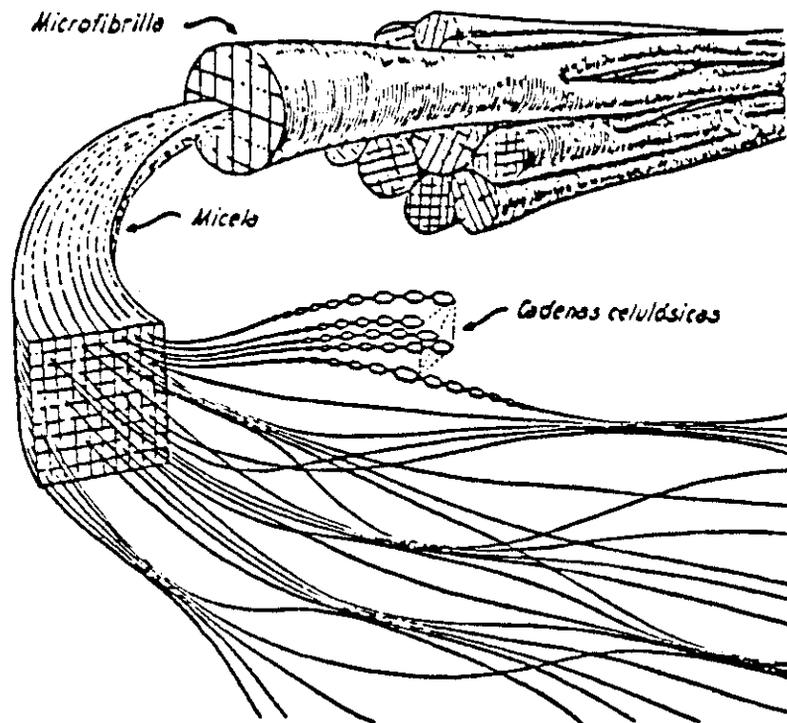


Figura (1.8).- Agrupación de las cadenas de celulosa para dar lugar a micelas, microfibrillas y fibras de celulosa.

Dentro de la celulosa, pueden diferenciarse tres tipos en función de su peso molecular y de su asociación a compuestos incluso no glucídicos que pueden precipitar junto con ellas:

**$\alpha$ -Celulosa:** es la celulosa descrita como tipo I, insoluble en hidróxido sódico concentrada a temperatura ambiente.

**$\beta$ -Celulosa:** Con cadenas más cortas que la  $\alpha$  y soluble en las condiciones anteriores, precipitando al acidificar la solución.

**$\Gamma$ -Celulosa:** Después de tratarse con álcali y acidular la solución, precipita sobre etanol frío al 95% (Schnabel, 1973).

#### 1.7.2.- Composición de la Hemicelulosa.

Las hemicelulosas son polímeros de composición diversa según los vegetales de los que proceden, presentan propiedades adhesivas, se hinchan y dispersan en el agua. El tamaño de sus cadenas es considerablemente más pequeño que el de la celulosa (Whistler y Richard, 1970).

La hemicelulosa es fácilmente hidrolizable por ácidos diluidos en frío, dando lugar a pentosas (D-xilosa y L-arabinosa), hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) y ácidos urónicos (ac. galacturónico y ac. glucurónico). Estos azúcares se unen entre sí a través de enlaces glicosídicos de tipo  $\beta(1-4)$  y, a veces, forman ramificaciones con enlaces de tipo  $\beta(1-3)$ . Es este grado de sustitución tan irregular lo que hace que las hemicelulosas normalmente no posean estructura cristalina.

En la mayor parte de las angiospermas, los xilanos son sustituidos por restos acetilados o metilados en la posición 4 del ácido glucurónico, mientras que en las gimnospermas, los restos predominantes son de O-acetilgalactoglucomanos (Figura 1.9).

Las hemicelulosas se dividen en dos grupos según la capacidad de ser hidrolizadas, así, como por su composición química.

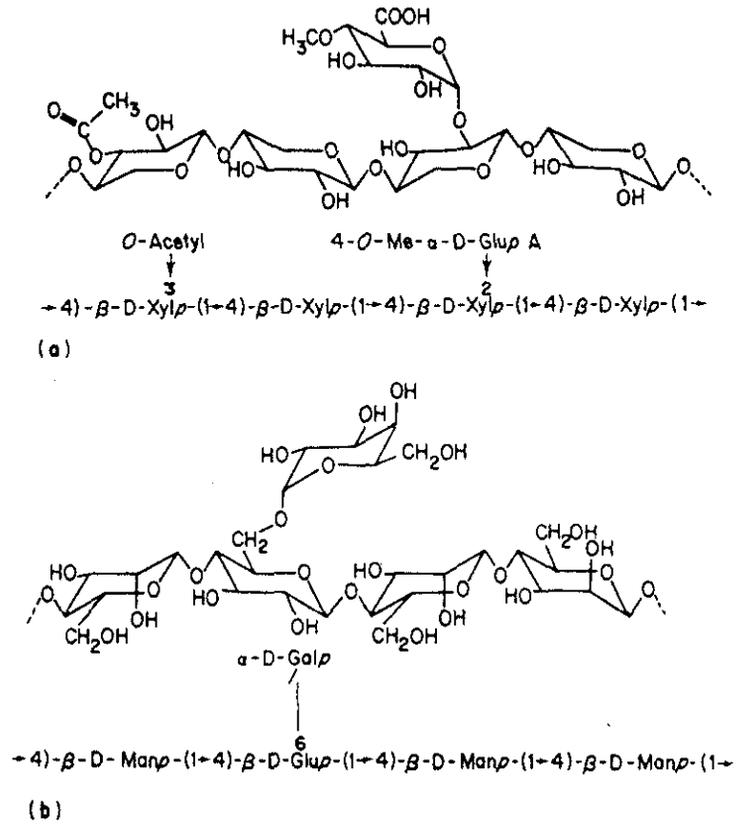


Figura (1.9).- (a) Estructura de O-acetil 4-O-metilglucosilano, la principal hemicelulosa de los tejidos de angiospermas. (b) Estructura de un O-acetil galactoglucomanano, la principal hemicelulosa de las coníferas.

**Celulosanos:**

Están formados por azúcares simples formando cadenas centrales de pentosas o de hexosas con cortas ramificaciones (Fan, 1982). En su composición no entran a formar parte los ácidos urónicos, asociándose fuertemente a la celulosa por enlaces covalentes. Resultan atacables por ácidos diluidos en caliente tras mucho tiempo.

**Poliurónidos:**

Poseen una cadena central de pentosas y de hexosas, con muchos ácidos hexurónicos laterales con grupos metoxilo y acetilo libres. Estos compuestos fácilmente hidrolizables por ácidos en caliente se asocian por enlaces covalentes y puentes de hidrógeno a las ligninas, en cambio, la asociación a la celulosa es muy débil.

**1.7.3.- Composición de la Lignina:**

La lignina es un polímero tridimensional, aromático procedente de la polimerización deshidrogenativa de tres alcoholes fenilpropiónicos (P-cumarílico, coniferílico y sinapílico). La unión entre los distintos monómeros se efectúa mediante enlaces carbono-carbono y de tipo éter de los anillos aromáticos, así como, de los radicales de la misma.

Las ligninas pueden separarse de los polisacáridos por la acción del ácido acético concentrado o bien por el ataque del ácido clorhídrico, también concentrado, seguido de la adición de óxido cúprico amoniacal.

Se han efectuado muchos estudios sobre la estructura y composición química de las ligninas, no pudiendo llegar a establecer modelos estructurales debido a que en cada vegetal la composición de los monómeros varía. Mientras que en las maderas de gimnospermas (maderas blandas) el alcohol más abundante es coniferílico, en las maderas de angiospermas (maderas duras) el alcohol más abundante es sinapílico, mientras que en las plantas herbáceas, el que más abunda es el alcohol p-cumarílico (Kirk, 1987).

En cuanto a su función, la lignina es principal responsable de la rigidez de las paredes de las células vegetales, se acumula en la lámina media donde su concentración puede llegar a ser del 75%, también supone una protección frente al ataque de gérmenes patógenos y agresiones mecánicas (Vance y Kirk, 1980). En la Figura 1.10 se muestra la estructura compleja de la lignina.

### **1.8.- LA BIOMASA LIGNOCELULOSICA COMO PRINCIPAL FUENTE ENERGETICA Y DE PRODUCTOS QUIMICOS.**

Los ecosistemas terrestres forman una serie de ciclos estacionarios, mediante la fotosíntesis las plantas se convierten en las productoras por excelencia, mientras que el resto de los seres vivos son los consumidores. Así, en el curso de los ciclos de vida desencadenados en este proceso se produce y consume energía y biomasa.

El problema que se plantea es como emplear los residuos de estos materiales cada vez por otro lado más abundantes, para producir alimentos, productos químicos y energía por métodos de bioconversión (Schurz, 1984).

El papel más importante en este problema lo ocupa la biomasa, y dentro de ella la celulosa y la hemicelulosa (Esterbauer, 1985).

Se pretenden encontrar métodos en el futuro que sean capaces de rentabilizar la producción de sustancias basadas en la química de la celulosa y que compitan con las petroquímicas (Schurz, 1986).

#### **1.8.1.- La biomasa celulósica como fuente de energía.**

En la última década, y debido a la crisis energética iniciada en 1973, ha crecido enormemente el interés del uso de la biomasa vegetal con fines energéticos, en la actualidad, este interés está centrado además del propio problema energético en la protección medioambiental y la repercusión sociológica que conlleva.

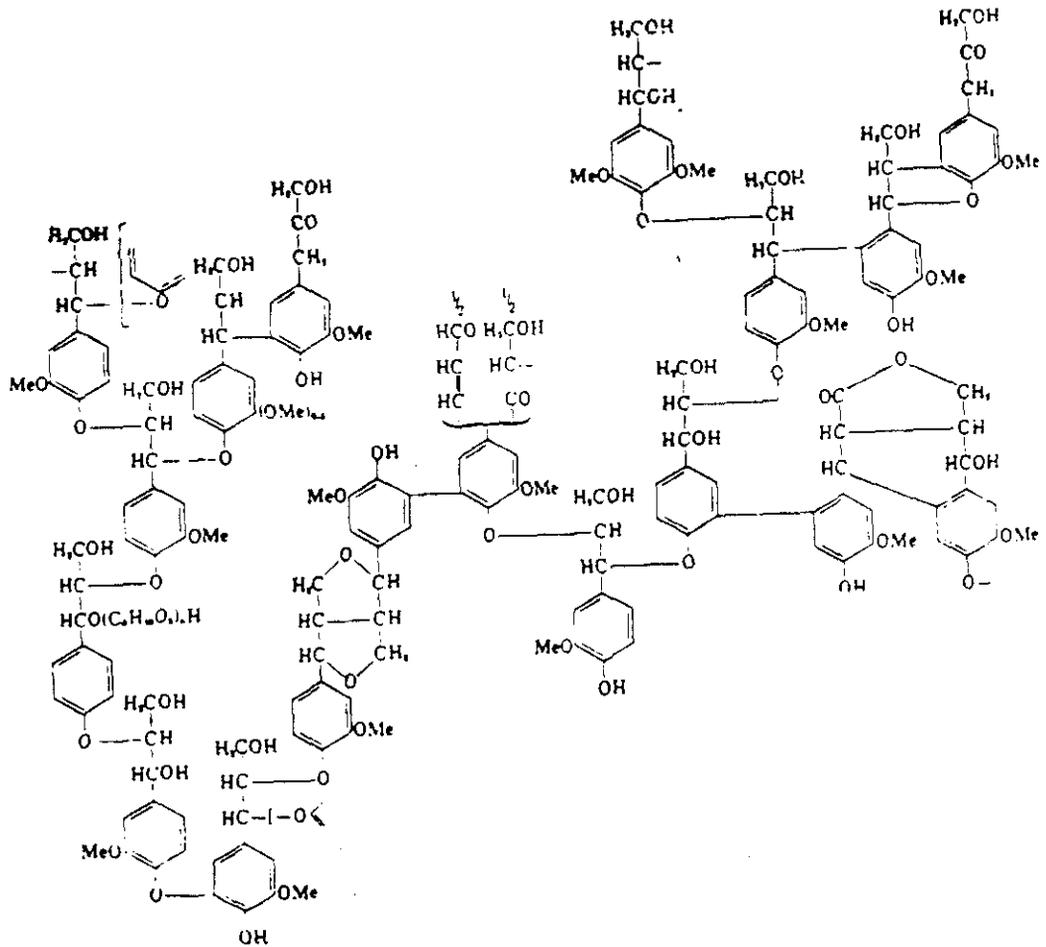


Figura (1.10).- Estructura de la lignina mostrando los enlaces metoxi-entre los distintos alcoholes que la forman.

La celulosa y la hemicelulosa como componentes principales de las plantas verdes, son producidas continuamente por acción directa de la luz solar, empleando  $4 \times 10^{21}$  Julios para la síntesis de  $1.5 \times 10^{11}$  toneladas de carbono anual (Margaritis, 1980). La energía calórica de esta biomasa supone alrededor de  $4 \times 10^{17}$  Kcal, energía que triplica las demandas energéticas estimadas para el año 2000, que suponen al rededor de  $1.34 \times 10^{15}$  Kcal (Fernandez, 1982).

En la actualidad, la biomasa lignocelulósica aporta tan sólo el 15% de la energía consumida en el mundo (Gouvello, 1987), estimando que para el año 2000 los países desarrollados incrementarán en un 10% la energía obtenida a partir de esta materia prima.

#### 1.8.2.- La biomasa lignocelulósica en procesos fisico-químicos.

Tradicionalmente el aporte energético suministrado a la humanidad por parte del material lignocelulósico ha sido en forma de madera para hacer fuego, en la actualidad la producción de carbón vegetal por pirólisis (se somete la biomasa lignocelulósica a temperaturas entre 200 y 1000 °C en ausencia de aire), está alcanzando elevados rendimientos utilizando reactores de lecho fluido, con rendimientos de transformación entre un 70 a 80% según la técnica empleada. En empleo del carbón vegetal así obtenido es doble, por un lado es un buen sustituto del carbón mineral, y por sus características puede ser utilizado en la elaboración de carbón activo con uso industrial.

Otro producto formado en la pirólisis son los ácidos pirolefiosos, con aspecto alquitranoso, compuesto por hidrocarburos cíclicos, alcoholes, aldehídos y cetonas, pudiendo ser empleado como fuente de disolventes orgánicos (Overend y Milne, 1985). Otra utilidad de estos ácidos es su utilización como combustible en calderas para producir electricidad debido a su elevado calor específico (6000 a 7000 Kcal/Kg). También puede sufrir procesos de reducción catalítica para dar lugar a combustibles para motores de explosión (Carrasco, 1988).

### 1.8.3.- Utilización de la biomasa lignocelulósica en procesos biológicos.

La biomasa lignocelulósica puede ser empleada mediante ataques microbianos para la producción de biogas mediante la digestión anaeróbica de la misma.

El proceso consiste en mantener estos materiales en compartimentos estancos en ausencia de aire, y allí, a través de microorganismos metanogénicos se produce la descomposición de la fitomasa transformándola en una mezcla de metano (55 a 60%) y el resto anhídrido carbónico, con un potencial energético muy elevado, de al rededor de 5000 Kcal/m<sup>3</sup>.

En la Tabla 1.5 aparecen los principales productos lignocelulósicos a partir de donde se obtiene biogas.

### 1.8.4.- La biomasa lignocelulósica como fuente de productos químicos.

Los materiales lignocelulósicos (celulosa, hemicelulosa y lignina principalmente), suponen una fuente inagotable de productos con interés industrial. Directamente la fitomasa supone una fuente de papel y alimento para herbívoros, en segundo lugar, la celulosa supone una fuente importante para la elaboración de explosivos (ésteres y nitratos de celulosa). En otro plano, a partir de la celulosa puede obtenerse glucosa, y por utilización de esta por microorganismos etanol, Proteína microbiana y vitaminas. A partir de los furfurales, es posible la obtención de plásticos y fibras sintéticas, por último mediante la fermentación de la glucosa es posible obtener disolventes y ácidos orgánicos. Figura 1.11.

De forma similar es posible la transformación de la hemicelulosa, por un lado en pentosas y hexosas que por acción microbiana den lugar a disolventes orgánicos y Proteína microbiana y por otro lado por transformaciones químicas de sus componentes a fibras sintéticas, resinas y plásticos.

NATURALEZA DEL RESIDUO	RENDIMIENTO DE GAS m <sup>3</sup> /Kg
Fango Residual urbano	0.43
Papel Urbano	0.23
Papel de Periódico	0.98
Estiercol con Paja	0.29
Estiercol de Caballo	0.40
Estiercol de Ganado	0.24
Estiercol de Cerdo	0.26
Hojas de Remolacha	0.46

Tabla (1.5).- Principales residuos lignocelulósicos a partir de los cuales se obtiene biogas (Ronald y Barthón, 1987).

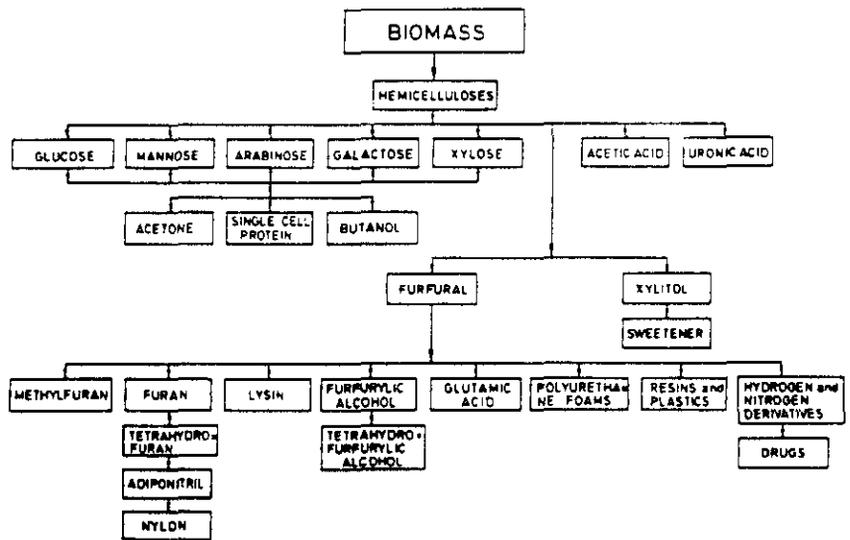
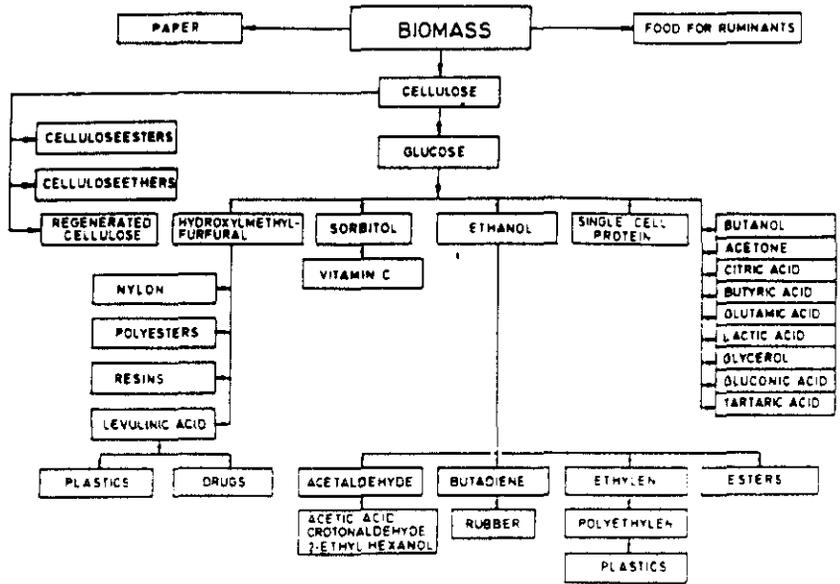


Figura (1.11).- Posibilidades de transformación de las celulosas y las hemicelulosas.

La lignina puede ser empleada por su lado como combustible o sometida a hidrogenación transformándose en derivados fenólicos e hidrocarburos entre los que se encuentran los Catecoles y la Vainillina, así como ser aplicado como polímero formando parte de resinas termoestables, como agentes dispersantes, como antioxidantes o como sustancias absorbentes y estabilizantes de emulsiones. Por último, todos los componentes pueden ser utilizados como sustratos para la producción de enzimas para su biodegradación, cerrando así el ciclo de producción. (Schurz, 1986).

### **1.9.- PROCESOS DE HIDROLISIS DE MATERIALES LIGNOCELULOSICOS.**

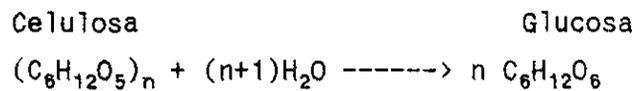
Existen una gran variedad de procesos industriales destinados a la transformación de los materiales lignocelulósicos en productos más sencillos, generalmente azúcares para su posterior transformación en otros productos con interés industrial, bien por vía química o enzimática a través de microorganismos.

#### **1.9.1.- Procesos de hidrólisis química.**

En estos tratamientos se emplean generalmente ácidos o bases fuertes en condiciones así mismo condiciones de presión y temperatura elevados.

##### **1.9.1.1.- Hidrólisis ácida.**

Han sido muy numerosos los ácidos orgánicos e inorgánicos empleados en estos procesos de hidrólisis, pero tan sólo industrialmente resultan aplicables el ácido clorhídrico y el sulfúrico. El proceso de hidrólisis ácida de los materiales lignocelulósicos se basa principalmente en que estos materiales poseen una determinada porción de celulosa y hemicelulosa formada por monómeros unidos por enlaces de tipo glicosídico. Estos enlaces pueden ser rotos por la acción del ácido en caliente siguiendo una cinética de primer orden (Fagan, 1971).



$$-dCa/dt = K_1 \cdot Ca$$

donde

Ca: Concentración de celulosa en el tiempo de reacción.

t: Tiempo de reacción.

$K_1$ : Constante cinética de hidrólisis específica del sustrato, el pH y la temperatura de hidrólisis.

En estas reacciones de hidrólisis de residuos lignocelulósicos se hidrolizan antes las hemicelulosas que la celulosa por no tener la primera estructura cristalina. En el proceso hidrolítico, en el caso de la celulosa, existe un equilibrio de asociación-disociación entre los azúcares hidrolizados, así pues, en una solución de azúcares obtenidos por hidrólisis lo normal es obtener entre un 30 a 35% de disacáridos o trisacáridos en forma de celobiosa, gentobiosa o celotriosas.

Los métodos de hidrólisis ácida de residuos lignocelulósicos son de dos tipos:

A.- aquellos que utilizan ácidos diluidos a temperaturas elevadas.

Fue Schöller entre las dos guerras mundiales quien desarrolló los métodos de hidrólisis, utilizando ácido sulfúrico diluido al 0.5% p/v a 180°C. En la actualidad, este método tan sólo se emplea en la Unión Soviética con el fin de producir biomasa microbiana a partir de estos hidrolizados.

B.- Aquellos que emplean ácidos concentrados a baja temperatura (50°C).

Estos métodos son los más usados, algunos de estos métodos consiguen elevados rendimientos en la sacarificación como el de Nuguchi-Chisso, ideado en los años 50, consistente en hacer pasar una corriente de cloruro de hidrógeno a 180°C a través del material a

hidrolizar, obteniendo así rendimientos en la hidrólisis entre el 75 y 80% del valor teórico.

En la actualidad, se están desechando los procesos de hidrólisis ácida de residuos celulósicos por varias razones. En primer lugar por su elevado coste económico así como por la toxicidad de los residuos producidos. (Rao, 1983).

#### **1.9.1.2.- Hidrólisis Alcalina.**

Los procesos de hidrólisis alcalina de materiales lignocelulósicos son conocidos desde hace mucho tiempo (Archibaud, 1942), la finalidad de estos procesos no es tanto la completa degradación del material lignocelulósico como su transformación y modificación de su estructura física, haciéndolo más accesible a la acción de otros agentes hidrolíticos.

Generalmente, en estos tratamientos se emplean álcalis fuertes como el hidróxido amónico o el hidróxido sódico en condiciones de presión y temperatura elevadas (100 a 120°C) con una atmósfera de sobrepresión (Gallo, 1978), (Chang, 1981).

Algunos de estos procesos han sido patentados y utilizados industrialmente como el método BRAM. (Doppelbauer, 1987).

Empleando estas condiciones, se produce un esponjamiento e hidrolizado de la celulosa debido a la pérdida parcial de su fracción cristalina, transformándose esta en celulosa amorfa, mucho más fácilmente atacable, así mismo, se produce un efecto de saponificación de ésteres formados entre ácidos y urónidos de las hemicelulosas, las cuales están asociadas a las cadenas de xilanos, así como la pérdida de los grupos acetilo de los mismos (Tarkow, 1969), (Fan, 1980). Debido a sus características, la hidrólisis alcalina de residuos lignocelulósicos se ha empleado como pretratamiento en procesos de sacarificación, tanto si la hidrólisis sensu estricto se efectúa por vía química como enzimática, mejorando

notablemente su rendimiento. (Rao, 1983), (Acebal, 1986), (Doppelbauer, 1987).

### 1.9.2.- Procesos de hidrólisis enzimática.

Los procesos enzimáticos de degradación de materias vegetales y de deshechos industriales afines (papel y maderas) están tomando cada día más importancia debido a su gran especificidad, bajo coste energético y porque los productos tóxicos de su descomposición son mínimos (Acebal, 1986), así mismo, la tecnología necesaria para llevar a cabo estos procesos está ya desarrollada (Gallo, 1978).

El proceso de conversión (hidrólisis enzimática) requiere distintas etapas entre las que se pueden distinguir:

- La producción enzimática.
- El pretratamiento de los materiales en bruto.
- La hidrólisis propiamente dicha.

En la Figura 1.12 se muestra un esquema general del proceso.

Esto ha llevado a buscar microorganismos con un potencial celulolítico elevado.

La celulosa por sus características fisico-químicas es un polímero difícil de atacar por acción enzimática; a pesar de ello, se han podido encontrar un pequeño número de microorganismos (hongos filamentosos, bacterias y protozoos) capaces de llevar a cabo esta degradación. Entre los hongos filamentosos se encuentran *Aspergillus niger*, con un alto nivel de endoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasa, pero con un bajo nivel de exoglucanasas, lo que limita su capacidad para degradar la celulosa cristalina.

Entre las bacterias existen especies como el *Ruminococcus albus* capaces de sintetizar celulasas pero con una actividad muy baja.

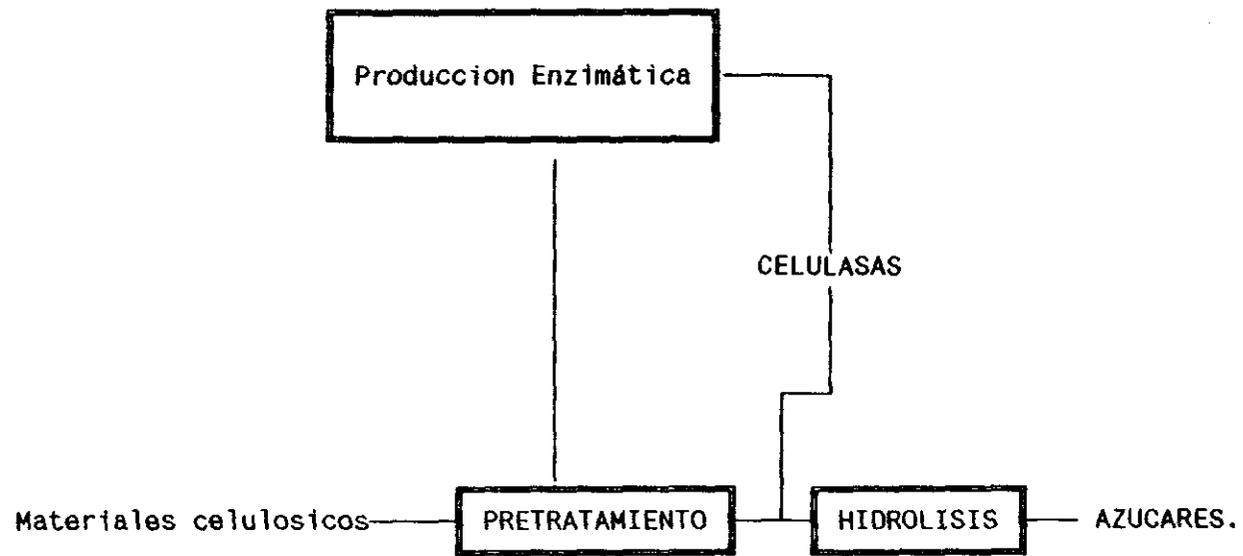


Figura (1.12).- Esquema general de la transformación enzimática de residuos lignocelulósicos.

Otra bacteria importante en estos procesos es el género *Cellulomonas*, que ha sido empleada para la sacarificación de bagazo, pero el estudio más importante con bacterias se ha efectuado con bacterias termófilas celulolíticas anaeróbicas como el *Clostridium thermoceillum* (Highley, 1980) o *Thermoanaerobium brockii* (Lamed, 1980), ambas han sido utilizadas para la conversión directa de la celulosa a etanol y otros disolventes.

La acetona y el butanol son producidos por *Clostridium acetobutíricum* que no es celulolítico propiamente dicho, pero produce una endoglucanasa extracelular (Allcock, 1981).

De todos los microorganismos conocidos, las celulasas más activas derivan de los hongos filamentosos del género *Trichoderma*.

*T. reesei*, *T. viride*, *T. lignorum*, *T. koningii*,  
*T. pseudokoningii* y *T. longibrachiatum* (Webstert, 1985).

El sistema enzimático celulolítico más ampliamente estudiado es el de *Trichoderma reesei*. ya que posee la capacidad de degradar la celulosa nativa hasta D-glucosa como producto principal de la hidrólisis (Mandels, 1975), debido a que produce el complejo celulolítico completo, con todos los componentes requeridos para la hidrólisis total (Montenecourt, 1983).

*Trichoderma reesei* es un hongo filamentoso, anamorfo de *Hipocrea rufa*, su enclave taxonómico es el siguiente:

División: EUMYCOTINA  
Clase: DEUTEROMYCOTINA  
Orden: MONILIALES  
Familia: MONILIACEAE

Existe una cierta confusión en la literatura sobre la nomenclatura de *Trichoderma reesei*, suponiéndose en muchos casos que las cepas de *Trichoderma viride* han pasado a denominarse *Trichoderma reesei*. Esto no es cierto, y en la actualidad tan sólo se reconoce

como *Trichoderma reesei* a la cepa QM 6a (A.T.C.C. 1316) y a los mutantes obtenidos a partir de la misma.

Esta cepa se aisló por primera vez en maderas de Nueva Guinea durante la segunda guerra mundial, identificándose como *Trichoderma viride*.

En 1977 Simmons renombró a esta cepa de *Trichoderma viride* QM 6a como *Trichoderma reesei* en honor del investigador Elwyn T. Reese (Simmons, 1977).

Existen tres variantes espontaneas de esta cepa, la QM6c, QM6d y la QM6e. También se han conseguido numerosos mutantes hiperproductores de celulasas a partir de la cepa QM6a, todos ellos producen niveles de celulasas superiores a los obtenidos con la cepa salvaje, pero la composición y propiedades del complejo celulolítico son similares en todas (Mandels, 1982). Una de estas cepas es el mutante T. reesei QM 9414 (A.T.C.C. 26921).

Existen además mutantes puntuales y delectivos para estudios genéticos, como las cepas NG14, C30, I10 e I14. Hay además cepas patentadas como las producidas por la Cetus Corporation en 1981, así como las cepas desarrolladas por Mary Mandels para la Armada Norteamericana.

#### **1.9.2.1.- DESCRIPCION DEL COMPLEJO ENZIMATICO DE T. REESEI.**

El sistema enzimático celulolítico de *T. reesei* está compuesto por tres fracciones claramente diferenciadas, y su síntesis se encuentra sujeta a dos controles metabólicos, uno por inducción por niveles adecuados de celulosa, lactosa o soforosa (Mandels, 1960), (Mandels, 1962), (Reese, 1971), y otro de inhibición y represión catabólica por fuentes de carbono fácilmente metabolizables (Mandels, 1969), (Mandels, 1975), (Nisizawa, 1972). El grado de represión catabólica se reduce en algunos mutantes (Montenecourt, 1979), existiendo mutantes capaces de producir niveles elevados de celulasas de forma constitutiva (Shoemaker, 1981).

La mayor parte de los mutantes producen enzimas capaces de romper la celobiosa de forma constitutiva, lo que demuestra que el efecto de estas enzimas no está sujeto al mismo control genético que el resto de las celulasas. Así mismo, en mutantes defectivos en estas enzimas, son capaces de degradar la celulosa de forma normal (Mishra, 1989), (Strauss, 1990).

Los componentes del complejo celulolítico de *T. reesei* son tres básicamente.

#### 1.- Exo $\beta(1-4)$ glucanasa (CBH) (E.C. 3.2.1.9.1.):

Hidroliza los enlaces glicosídicos  $\beta(1-4)$ , liberando celobiosa a partir de los extremos no reductores de la cadena, por ello también se la denomina celobiohidrolasa o más correctamente  $\beta(1-4)$ -glucan-celobiohidrolasa. Esta enzima es excretada al medio de cultivo cuando el microorganismo crece sobre celulosa, apareciendo bajo varias formas (Isoenzimas).

En *T. reesei* se distinguen un mínimo de dos celobiohidrolasas; la CBH1 y la CBH2. Estas enzimas forman lo que Reese en 1950 se denominó "Sistema C1". Los sustratos empleados para valorar esta actividad son insolubles, recurriendo a medir la actividad exoglucanasa como actividad "Avicelasa"<sup>1</sup>. Así pues, hablar de actividad "avicelasa" es sinónimo de actividad exoglucanasa (Guillen, 1986).

#### 2.- Endo $\beta(1-4)$ -glucanasa (EG) (E.C. 3.2.1.4.):

Rompe las cadenas de celulosa al azar, hidrolizando los enlaces  $\beta(1-4)$  glicosídicos, por ello recibe también el nombre de  $\beta(1-4)$ -glucan-glucanohidrolasa, de ella se conocen como mínimo tres formas EG1, EG2 y EG3, sufriendo cada una de ellas procesos de restricción por acción de proteasas (Bhumibhamon, 1982), (Illanes, 1988). La endoglucanasa corresponde a la fracción Cx descrita por Reese en 1950,

---

<sup>1</sup>El avicel es un producto comercial constituido por celulosa microparticulada (50  $\mu$ m) químicamente pura

también es llamada carboximetilcelulasa por ser este el sustrato empleado para su determinación.

### 3.- $\beta$ -Glucosidasa (E.C. 3.2.1.21.):

También es llamada celobiasa, rompe cadenas de celobiosa liberando dos moléculas de glucosa, como se ha mencionado antes, este enzima no parece tener un efecto decisivo en la actividad del complejo celulolítico.

Existen otros sustratos sobre los que puede actuar como la soforosa, pues esta enzima sólo es específica de disacáridos con enlaces  $\beta$ .

Mientras que las dos primeras enzimas son extracelulares, la  $\beta$ -glucosidasa presenta actividad tanto intra como extracelular, debido a que existe una  $\beta$ -glucosidasa intracelular (Sunstrom, 1981) cuyo nivel constitutivo es aproximadamente de 0.2 U.A.E./mg de micelio. Después del crecimiento, la  $\beta$ -glucosidasa es en su mayor parte extracelular, siendo las propiedades del enzima intracelular distintas de las del extracelular (Gong, 1977).

La  $\beta$ -glucosidasa no es una celulasa como tal, ya que es incapaz de atacar directamente a la celulosa, pudiendo ser producida por microorganismos no celulolíticos. Ahora bien, este enzima actúa sinérgicamente con los otros dos componentes del complejo celulolítico (Endoglucanasa y Exoglucanasa), incrementando la acción de las mismas, pues elimina la celobiosa que actúa como inhibidor del medio (Sundstron, 1981).

La  $\beta$ -glucosidasa supone un 1% de toda la Proteína enzimática del complejo celulolítico excretada por *T. reesei*, mientras que la endoglucanasa supone un 30% y la exoglucanasa un 69%.

En muchas ocasiones cuando se trabaja con materiales lignocelulósicos resulta conveniente conocer como actúan las tres enzimas del complejo juntas. Para poder estandarizar las

determinaciones se utiliza como sustrato del complejo celulolítico el papel de filtro.

Se han desarrollado modelos mecanísticos para describir la acción del complejo celulolítico de *T. reesei*, uno de ellos es el de Okazaki y Moo-Young desarrollado en 1978.

En este modelo la acción de la endoglucanasa y la exoglucanasa tienen efectos sinérgicos, y el grado de polimerización y cristalización de la celulosa es uno de los factores limitantes de la hidrólisis. (Fig 1.13).

Se han desarrollado así mismo modelos matemáticos para describir la acción de las enzimas basados en el concepto de partículas aisladas de celulosa con lugares de ruptura donde comenzaría el efecto sinérgico enzimático. Así mismo, este modelo tiene en cuenta los fenómenos de adsorción (Moreira, 1981). (Figura 1.14).

#### 1.9.2.1.1.- INDUCCION DEL COMPLEJO ENZIMATICO.

El inductor natural de las celulasas no se conoce y se piensa que existen bajos niveles constitutivos de celulasas, y que la acción de estas sobre la celulosa produce la liberación de algún producto soluble que entra en la célula y realiza algún efecto inductor.

De todos los hidratos de carbono estudiados, tan sólo la celulosa y la sofrosa parecen ejercer niveles aceptables de inducción en las celulasas.

La lactosa ha sido utilizada también como inductor de las celulasas comprobándose que es un inductor débil.

La inducción por celulosa es lenta, ocurre general Después de 2 días de cultivo, incrementándose a los 4 días, siendo preciso la existencia de un contacto directo entre el micelio y la celulosa para que se produzca la inducción (Mandels, 1962).

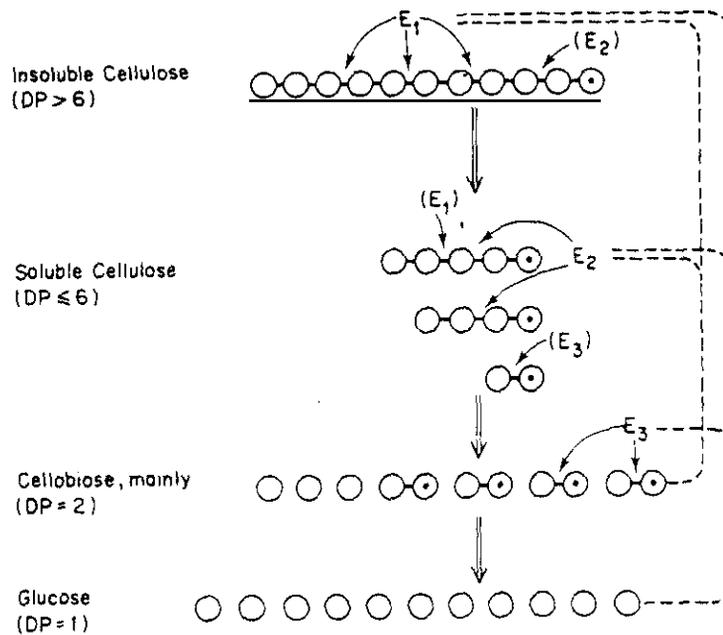
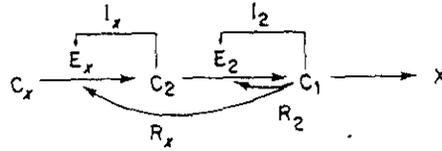


Figura (1.13).- Esquema para explicar el modelo de hidrólisis enzimático sinérgico de la celulosa.  
 $E_1$ : Endoglucanasa, ataca al azar moléculas de celulosa  $DP \geq 6$ .  
 $E_2$ : Exoglucanasa, rompe los extremos no reductores de la celulosa.  
 $E_3$ :  $\beta$ -Glucosidasa, rompe la celobiosa para dar glucosa.  
 (---): Inhibición por producto final.



$$\text{Cellulose} \quad \frac{dC_x}{dt} = -K\eta S \left[ \frac{K'SE_x}{\alpha + E_x} \right] \frac{I_x}{I_x + C_2}$$

$$\text{Cellobiose} \quad \frac{dC_2}{dt} = K\eta S \left[ \frac{K'SE_x}{\alpha + E_x} \right] \frac{I_x}{I_x + C_2} - \frac{K_2 E_2 C_2}{K_m + C_2} + \frac{K_m}{I_2} C_1$$

$$\text{Glucose} \quad \frac{dC_1}{dt} = + \frac{K_2 E_2 C_2}{K_m + C_2} - \left( \frac{1}{Y_{X/C_1}} \frac{dX}{dt} + m_{C_1} X \right)$$

$$\text{Cells} \quad \frac{dX}{dt} = + \frac{\mu_{max} C_1 X}{K_s + C_1}$$

$$\text{Enzyme}_x \quad \frac{dE_x}{dt} = Y_{E_x/X} \left( 1 - \frac{C_1}{R_x + C_1} \right) \frac{dX}{dt}$$

$$\text{Enzyme}_2 \quad \frac{dE_2}{dt} = Y_{E_2/X} \left( 1 - \frac{C_1}{R_2 + C_1} \right) \frac{dX}{dt}$$

Figura (1.14).- Modelo de fermentación de la celulosa.

C1: Concentración de glucosa. C2: Concentración de celobiosa. Cx: Concentración de celulosa. E2: Concentración de β-Glucosidasa. Ex: Complejo Endoglucanasa/Exoglucanasa. I2: Constante de inhibición de la β-glucosidasa. Ix: Constante de inhibición del complejo Ex. K: Gramos de celulosa /adsorción. K': Constante de difusión enzimática. K2: constante para la β-Glucosidasa. Km: Constante de Michaelis. Ks: Constante de Monod.  $m_{C_1}$ : constante de mantenimiento de la glucosa. R2: Constante de represión de la β-glucosidasa. Rx: Constante de represión del complejo Ex. S: Unidad de área de celulosa/unidad de volumen de medio. t: tiempo. X: concentración de masa celular.  $Y_{X/C_1}$ : Rendimiento celular.  $\alpha$ : Coeficiente de adsorción de Langmuir. (Eta) numero de lugares de adsorción/Unidad de superficie de la celulosa.  $\mu$ : tasa máxima de crecimiento. (Moreira, 1981).

Para la inducción es indispensable la presencia de tensiones elevadas de oxígeno, comprobándose la ausencia de esta en ambientes saturados de nitrógeno (Sternberg y Mandels, 1979).

La soforosa en cambio se ha decantado como uno de los mejores inductores de las celulasas en *T. reesei*, cuando la celulosa es hidrolizada por acción de las celulasas, aparecen en la mezcla diversos disacáridos de reversión, uno de ellos ha sido identificado como la soforosa.

La soforosa es activa a concentraciones de  $10^{-5}$  M con micelio lavado de *T. reesei* (Gritzali, 1979), aunque no actúa como inductor con otros hongos y bacterias. A una concentración de 160  $\mu$ M se logra su máximo efecto inductor. Se ha podido comprobar que el efecto inductor de la soforosa va acompañado de una síntesis de novo de proteínas (Sternberg y Mandels, 1979).

La soforosa es un inductor de gran afinidad, pues a concentraciones iguales con lactosa, esta tiene un efecto inductor mucho más pequeño. Con una concentración de 1  $\mu$ g/ml, la lactosa induce 10 veces menos que la soforosa.

La soforosa induce tanto a la endoglucanasa, exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa, resultando a la vez sustrato de ésta última. La  $K_m$  de la  $\beta$ -glucosidasa por la soforosa es de 1.4 mM, mientras que para la celobiosa es de 1.2 mM, y las constantes de inhibición son de 9.5 mM para la soforosa y de 6.0 mM para la celobiosa.

La soforosa es metabolizada por el micelio, y la mayor parte de las celulasas (80%) sólo aparecen Después de que la mayor parte de la soforosa ha desaparecido del medio, pero la producción enzimática desaparece Después del agotamiento de la soforosa o de la separación del micelio del inductor (Sternberg y Mandels, 1979). Se ha observado además que la adición del inductor en pulsos es más efectiva que la adición en una única dosis. Otro factor importante en la inducción es el pH y la temperatura, estimando las condiciones óptimas de inducción

de las celulasas de *T. reesei* a valores de pH comprendidos entre 2.8 a 3.0 y una temperatura de 28°C (Mandels, 1960).

#### 1.9.2.1.2.- CARACTERISTICAS DEL COMPLEJO CELULOLITICO.

Básicamente la estructura de estas proteínas consiste en una cadena polipeptídica que oscila entre 37 a 76 Kd de peso molecular, en cuyo extremo N-terminal se encuentra un péptido señal que la reconoce como Proteína extracelular. Cada polipéptido es modificado por acción de proteasas ácidas durante el proceso de secreción.

Todas las celulasas producidas por *T. reesei* son sometidas a dos mecanismos de glicosilación; la O-glicosilación y la N-glicosilación.

Se han podido observar distintos patrones de glicosilación observando diferentes subformas de la misma enzima con distinto punto isoeléctrico (Gum y Brown, 1977). Esto parece ser algo relativamente común en los hongos superiores en los que también aparecen celobio-oxidasas como en el caso del basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* (Morpeth y Jones, 1986).

En la CBH1 existe una secuencia particular de aminoácidos Asn-X-Ser/Thr a través de la cual se efectúa el reconocimiento del lugar de glicosilación del enzima (Fagerstom, 1984). Esto también se ha observado con la EG1.

Los lugares de reconocimiento de la O-glicosilación son distintos, parece ser una secuencia que en la CBH1 aparece precedida de la repetición de la secuencia (Gly-Asn-Pro-Ser-Gly) tres veces.

A estos dos mecanismos de glicosilación en el sistema de exportación de enzimas se les conoce con el nombre de glicosilación postraduccional, fenómeno muy estudiado en levaduras.

Los mecanismos de glicosilación en la célula de *T. reesei* consisten básicamente en la adición de cadenas de manosa. En las

levaduras esta adición puede llegar a suponer hasta el 50% del peso de la Proteína.

Para cada cadena de proteínas (Endoglucanasas) se adicionan 9 cadenas de hidratos de carbono, cada una constituida a su vez por 9 restos de manosa que se unen a su vez con 3 moléculas de glucosa. (Fig 1.15).

Este mecanismo ocurre de una forma general en todos los eucariotas, donde los hidratos de carbono son transferidos por un transportador lipídico (dolicol-fosfato) a los residuos de Asparagina de las moléculas proteicas. Así pues, la forma de transporte es:



Tras esta primera glicosilación se produce la adición de otros residuos de manosa sobre los 9 primeros y las 3 moléculas de glucosa a través de enlaces de tipo  $\alpha(1-6)$  glicosídicos, de esta forma se origina el CORE de hidratos de carbono de las celulasas (Tabla 1.6).

Las actividades enzimáticas necesarias para que se produzca la glicosilación y modificación de las cadenas iniciales de oligosacáridos se localizan en el retículo endoplásmico. Las enzimas necesarias para una posterior adición de manosas-fosfato se localizan en las membranas del aparato de Golgi. (Berry, 1988).

#### 1.9.2.1.3.- ESTABILIDAD DE LAS CELULASAS DE *T. REESEI*.

El complejo celulolítico producido por *T. reesei* es estable al calor (60°C), a los cambios bruscos de temperatura y a la acción de inhibidores químicos (Reese, 1980). Han podido observarse fenómenos de inactivación del complejo enzimático debidas al exceso de agitación originando la consiguiente rotura del micelio (Reese, 1980). También se ha observado que la superficie de contacto de la celulosa con el micelio influye decisivamente en la hidrólisis (Ghapuray, 1983), (Puri, 1984), generalmente cuanto más pequeña sea la superficie de

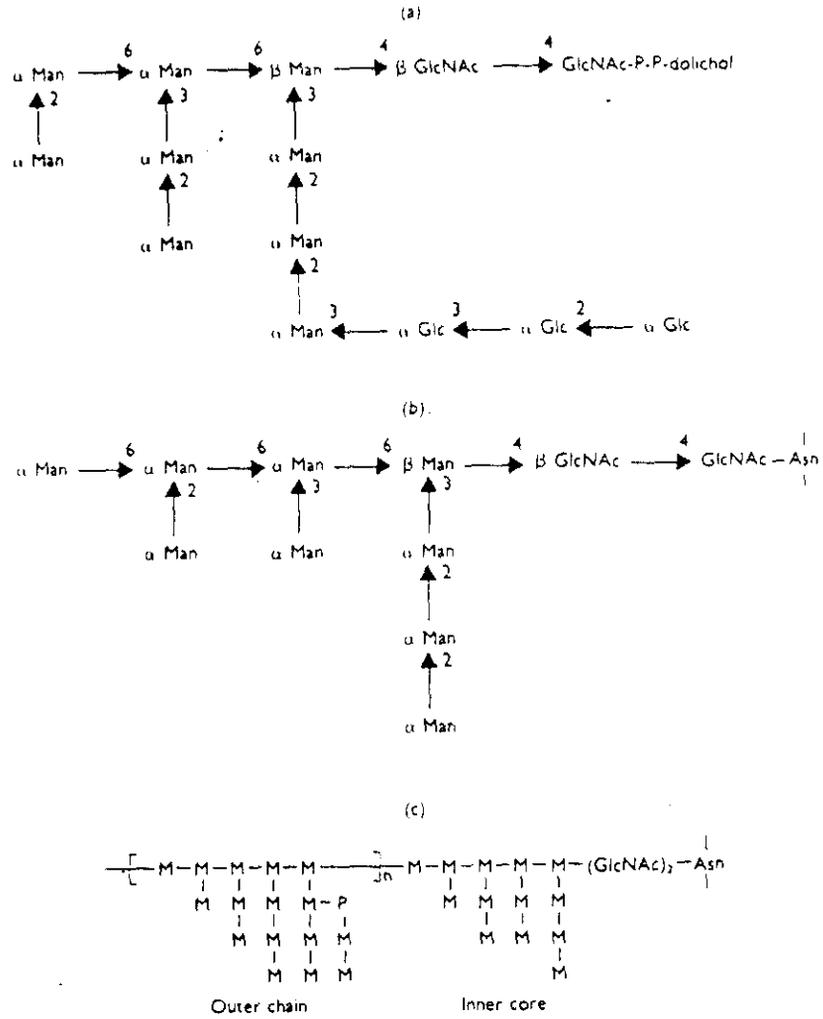


Figura (1.15).- (a) Estructura del lipo-oligosacárido dador de moléculas.  
 (b) Proteína receptora, núcleo de oligosacáridos y  
 (c) Cadena de oligosacáridos (Manoproteína). GlNAc, N-Acetilglucosamina, Man: Manosa Asn: Asparagina.

	Molecular weight (kilodaltons)	Turnover no. (s <sup>-1</sup> )*†	Carbohydrate content (%)
<i>Cellobiohydrolases</i>			
<i>T. viride</i>	53	0.89	2.2
(Gritzali & Brown, 1978;	53	0.59	6.6
Gum & Brown, 1977)	53	0.49	10.9
	53	0.47	7.2
<i>P. chrysosporium</i>	48.6	0.51	0
(Eriksson & Peterson, 1975)			
<i>Endoglucanases</i>			
<i>T. viride</i>	37	17	4.5
(Gritzali & Brown, 1978)	52	24	15
	49.5	7.4	15
<i>P. chrysosporium</i>	32	60	10.5
(Almin <i>et al.</i> , 1975)	36.7	120	0
	28.3	50	7.8
	37.5	710	4.7
	37	260	2.2

\* Turnover number indicates bonds cleaved per mole of enzyme per second.

† Substrate for endoglucanases—carboxymethylcellulose.

Tabla (1.6).— Peso molecular y contenido en hidratos de carbono de celulasas de distintos organismos.

contacto mayor es la hidrólisis (Dong-Won-Kim, 1988), ello es debido a que entre la celulosa y las celulasas se producen fenómenos de adsorción. La investigación de estos fenómenos ha sido muy importante, pues paradójicamente la adsorción es tan fuerte que conduce a la progresiva inactivación de las celulasas, quedando estas ligadas bien al sustrato o al producto de hidrólisis.

- 1.- Mecanismo de hidrólisis normal  $E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow P$
- 2.- Unión irreversible al sustrato  $E + S \rightarrow ES$
- 3.- Unión irreversible al producto  $E + S \rightleftharpoons ES \rightarrow EP$

Se han estudiado los efectos del pH y la temperatura sobre los procesos de adsorción, observándose que el pH al cual se produce una mayor adsorción es 4.8, pH en el cual se consiguen los mayores niveles de actividad enzimática, por el contrario parece que el aumento de la temperatura disminuye la tasa de adsorción entre la celulosa y las celulasas, haciendo reversible por tanto los complejos Enzima-Sustrato y Enzima-Producto.

A 50°C es la temperatura donde se produce una mínima adsorción, temperatura que coincide con el máximo de actividad enzimática para *T. reesei* (Kim, 1988).

A pesar de que a 50°C los fenómenos de adsorción son mínimos, a largo plazo siguen suponiendo la desactivación de las enzimas del complejo celulolítico, por ello se han estudiado con más profundidad. (Doppelbauer y Esterbauer, 1987).

La incorporación de sustancias tensoactivas no iónicas como el Tween 80 en una proporción del 0.1% v/v ha permitido poner una solución parcial a este problema, al añadir estas sustancias en el medio de cultivo, se consigue incrementar el proceso de sacarificación en un 14%, consiguiendo un rendimiento enzimático del 33% más que sin la adición de Tween 80 (Castanon, 1981).

El Tween 80 hace que la fuerza de unión del sustrato y el enzima se reduzca, logrando la liberación del enzima Después de la catálisis (Ooshima, 1986).

Otro problema en la estabilidad de las celulasas es que el propio micelio libera proteasas (un 70% de las proteasas producidas por *T. reesei* son liberadas al medio) observándose una pérdida progresiva de la actividad en extractos crudos.

La acción de estas proteasas parece ser selectiva, afectando más a la actividad exoglucanasa que a la endoglucanasa que a la  $\beta$ -glucosidasa (Illanes, 1988).

Así mismo, se ha observado que la adición al medio de cultivo de inhibidores de proteasas como el PMSF (fenil metil sulfonyl fluoruro) contribuye a estabilizar el complejo enzimático a lo largo del tiempo.

#### 1.10.- ENZIMAS NO HIDROLITICAS QUE INTERVIENEN EN LA DEGRADACION DE LA CELULOSA.

Existen toda una serie de enzimas de naturaleza no hidrolítica que intervienen en los procesos de degradación de la celulosa, la mayoría han sido encontradas en los hongos responsables de la pudrición blanca de la madera. Se ha aislado una homoproteína, la celobiosa oxidasa que oxida la celobiosa a celobio  $\delta$  lactona, actuando el oxígeno como aceptor de electrones. Esta enzima es la responsable de que la hidrólisis de la celulosa sea mucho más rápida en presencia de oxígeno que de nitrógeno, seguramente porque elimina la celobiosa, de esta forma se previenen reacciones de transglicosilación y se evita la inhibición de la actividad endoglucanasa que tiene lugar cuando aumentan los niveles de celobiosa (Eriksson, 1981). La celobiosa también es oxidada a celobio  $\delta$  lactona por la celobiosa quinona oxido reductasa (las quinonas sirven como aceptores de electrones) (Westermarck, 1974).

La glucosa oxidasa está implicada en oxidar la glucosa a gluconolactona con el oxígeno como aceptor de electrones (Eriksson, 1976).

Las distintas actividades oxidativas regulan los niveles de glucosa y celobiosa, y coordinan los rangos de hidrólisis de la celulosa y del metabolismo de los productos finales, (Figura 1.16).

En los hongos responsables de la pudrición blanda se ha visto la existencia de un agente despolimerizante que no sólo alcanza la celulosa de las paredes celulares, sino que penetra totalmente en la celulosa cristalina, esto sólo puede ser producido por moléculas pequeñas (Cowling, 1969). Sobre estudios de Halliwell de 1965 se comprobaron los efectos del peróxido de hidrógeno y las sales ferrosas, posteriormente Koenigs en 1974 demostró que los hongos responsables de la pudrición blanda excretaban peróxido de hidrógeno y que la madera contiene el hierro suficiente como para formar el sistema  $Fe^{2+}/H_2O_2$  en la degradación de la celulosa.

Highley en 1977 demostró que la celulosa es oxidada cuando es atacada por el hongo *Poria placenta*. Schmidt y Whitten en 1981 descubrieron que el ácido oxálico secretado por los hongos de la pudrición marrón reducen el ion férrico presente en la madera normalmente a ferroso, proponiendo el siguiente mecanismo de ataque (Takao, 1965). (Figura 1.17).

Anteriormente Cobb y Whitten en 1982 demostraron la degradación de la celulosa marcada con carbono catorce por el hongo *Geophyllum trabeum* a través de una membrana de límite de exclusión molecular igual a 1000.

Esta despolimerización oxidativa de la celulosa, abre la estructura de la pared celular de la madera de forma que las enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas pueden alcanzar los sustratos a pesar de la lignina.

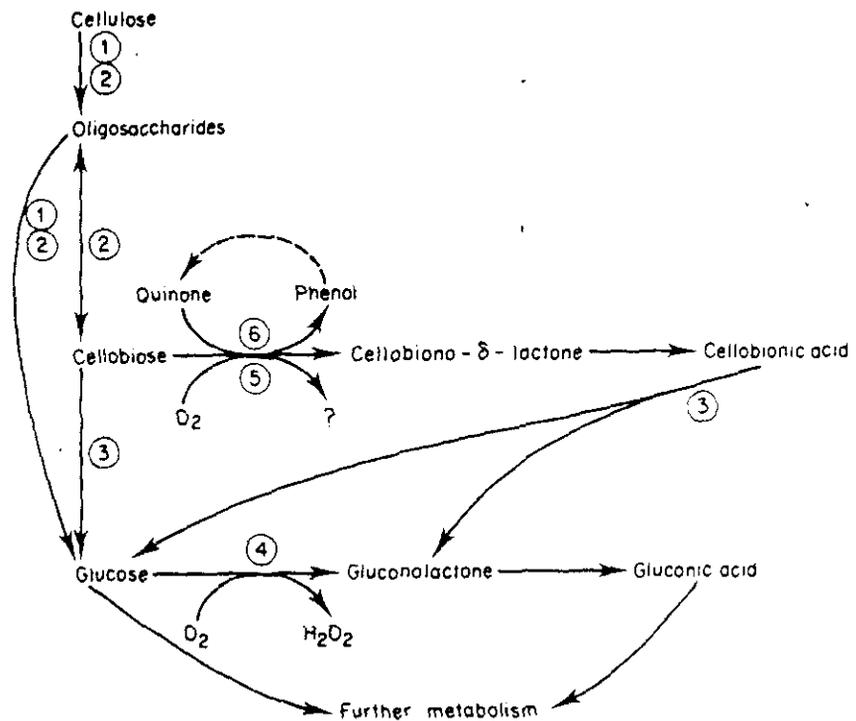


Figura (1.16).- Enzimas relacionadas con la degradación y regulación de la celulosa en *Sporotrichum pulverulentum*.

1. Endoglucanasa.
2. Exoglucanasa.
3.  $\beta$ -Glucosidasa.
4. Glucosa oxidasa.
5. Celobio-oxidasa.
6. Celobiosa-quinona oxidoreductasa. (Eriksson, 1978).

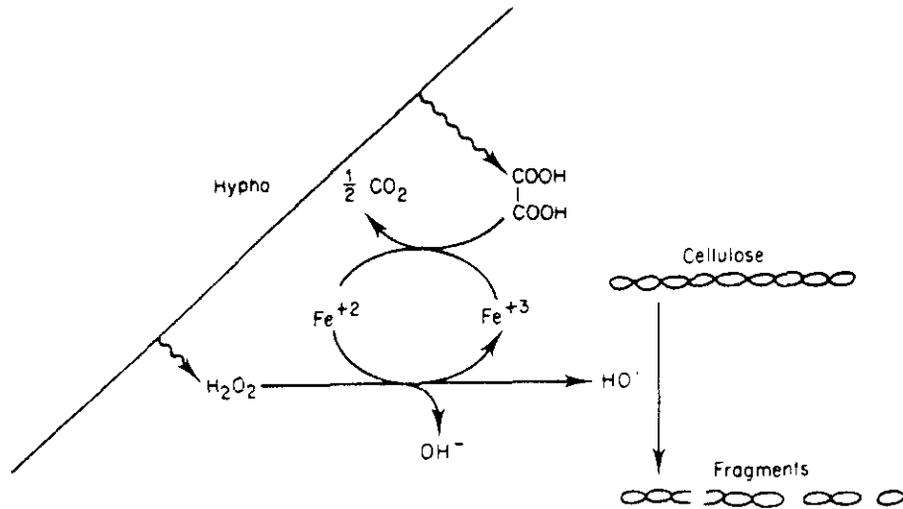


Figura (1.17).- Esquema de la degradación oxidativa de la celulosa en los hongos de la pudrición marrón. (Schmidt, 1982).

Los hongos de la pudrición blanca también secretan peróxido de hidrógeno (Koenigs, 1972) pero sin embargo, no realizan la despolimerización oxidativa de la celulosa. Una razón para ello puede ser que poseen oxalato descarboxilasa que descompone el ácido oxálico, mientras que los hongos responsables de la pudrición marrón no la poseen (Shimazono, 1955).

## **II.- MATERIAL Y METODOS**

## 2.1.- MICROORGANISMOS EMPLEADOS

Las cepas utilizadas en este estudio han sido descritas como potencialmente celulolíticas, (Domsch K.H. 1980) y proceden de :

- La Colección Española de Cultivos Tipo. (C.E.C.T.).
- La Colección de Hongos Filamentosos del Consejo superior de Investigaciones Científicas. (C.S.I.C.).
- La Colección de Microorganismos del Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid.
- La American Type Culture Collection. (A.T.C.C.).

Todas ellas son cepas de hongos filamentosos encuadrados en la División Eumycota (Hongos verdaderos), en la Clase Deuteromycotina (Hongos sin esporas sexuales, también llamados Imperfectos), en el Orden Moniliales, y en la Familia Moniliaceas (Hifas incoloras y pálidas). En la tabla 2.1 aparece una reseña de las citadas cepas.

## 2.2.- MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS.

Para el mantenimiento de las cepas de hongos filamentosos se utilizaron tres métodos distintos:

### 2.2.1.- Siembra en bisel en Agar Patata Dextrosa. (P.D.A.)

A partir de las cepas de hongos filamentosos liofilizadas, se extrajeron inóculos que fueron regenerados en Caldo de Saboureau. Tras una incubación de 72 horas a 28°C, el micelio así obtenido fue resembrado en tubos conteniendo Agar Patata Dextrosa en bisel por serie doble e incubados a 28°C durante 7 días en una estufa de cultivo (Mod. Selecta).

Tras este periodo de tiempo una de las series de tubos fue mantenida en frigorífico a 4°C y la otra fue destinada a colección de trabajo.

**HONGOS FILAMENTOSOS EMPLEADOS.**

- *Alternaria tenuissima*. 9005 (C.E.C.T.).
- *Aspergillus alliaceus*. (C.Dept.).
- *Aspergillus awamorii*. (C.Dept.).
- *Aspergillus cremeus*. (C.Dept.).
- *Aspergillus fumigatus*. A-2. (C.Dept.).
- *Aspergillus fumigatus*. A-3.(C.Dept.).
- *Aspergillus sulfureus*. (C.Dept).
- *Aspergillus sydowi*. (C.Dept).
- *Aspergillus wenti*. A-1. (C.Dept).
- *Aspergillus wenti*. A-4. (C.Dept).
- *Chaetomium globosum*. 2103 (C.E.C.T.).
- *Chaetomium virescens*. 256 (C.S.I.C.).
- *Talaromyces emersoni*. 7117 (C.E.C.T.).
- *Trichoderma harzianum*. 2413 (C.E.C.T.).
- *Trichoderma reesei*. 218 (C.S.I.C.).
- *Trichoderma reesei*. 2415 (C.E.C.T.).
- *Trichoderma reesei*. 2416 (C.E.C.T.).
- *Trichoderma reesei*. 26921 (A.T.C.C.). <sup>1</sup>
- *Ulocladium atrum*. (C.Dept).

Tabla (2.1).- Cepas de hongos filamentosos utilizados en la experiencia.

---

<sup>1</sup>La cepa A.T.C.C. 26921. Es conocida generalmente como QM 9414, por ello, en el trabajo se hará referencia a la misma con el nombre más extendido

### **2.2.2.- Liofilización de esporas.**

Para liofilizar las esporas de los hongos filamentosos con los que se trabajó, se partió de tubos sembrados en bisel que presentaran una abundante esporulación. (Mantenidos en tubo alrededor de un mes).

Se preparó una suspensión de leche descremada estéril, añadiéndose un mililitro de esta suspensión a viales de liofilización estériles. En condiciones asépticas, y con un asa de siembra se tomó una buena carga de esporas de la superficie del cultivo y se dispersó sobre la leche descremada.

Los viales de liofilización fueron congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se liofilizó su contenido en un liofilizador (Mod B-65 de New Brunswik) bajo una presión de  $10\ \mu\text{m}$  de mercurio durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, los viales fueron cerrados a vacío y almacenados a temperatura ambiente.

El objeto de mantener la colección liofilizada radica en poder mantener durante un tiempo mayor las características metabólicas y genéticas de cada una de las cepas, pudiendo ser empleadas como stock en caso de pérdida o deterioro de las colecciones de trabajo.

### **2.2.3.- Resiembra en Medios de Cultivo con Celulosa.**

Muchos hongos filamentosos con actividad celulolítica, pierden dicha actividad tras ser sometidos a sucesivos pases a través de los medios de mantenimiento convencionales (Agar de Czapek-Dox, Agar Patata Dextrosa), por ello, y para recuperar las actividades, en algunas ocasiones se efectuó una resiembra previa en un medio de cultivo que contenía celulosa.

### **2.3.- SELECCION DE VARIEDADES DE PATATA.**

En España existen 80 variedades de patatas calificadas por el Ministerio de Agricultura (Instituto Nacional de Semillas y Plantas de

Vivero) como variedades de siembra certificada. Tabla 2.2. De todas ellas se seleccionaron 11 variedades siguiendo tres criterios preferentes.

- Accesibilidad en el Mercado.
- Bajo coste de Producción.
- Elevada producción de almidón.

En la Tabla 2.3, aparecen indicadas las variedades de patata seleccionadas para el trabajo.

Con estas 11 variedades de patata se realizaron distintos estudios destinados a calcular:

- 2.3.1.- Contenido en Almidón.
- 2.3.2.- Contenido en Agua.
- 2.3.3.- Contenido en Fibra.
- 2.3.4.- Coeficiente Almidón/Agua y Almidón/Fibra.

#### 2.3.1.- Contenido en Almidón.

Para calcular el rendimiento en la producción de almidón se partió de 4 muestras de patata peladas de 100 gramos cada una. El almidón contenido en cada una de estas muestras se extrajo según el método que se describe en el apartado 2.4.1.

Una vez seco y tamizado, se determinó el porcentaje de almidón presente en cada variedad de patata.

#### 2.3.2.- Contenido en agua.

Tal y como se describe en el apartado anterior se partió de 4 muestras de 100 gramos de peso cada una que fueron divididas en láminas finas para facilitar su desecación. Estas láminas fueron depositadas en placas de Petri previamente taradas con una balanza de precisión (Mod Sartorius) con una exactitud de 0.01 gramo. Las

VARIEDADES DE PATATA INCLUIDAS ACTUALMENTE EN LA LISTA DE VARIEDADES COMERCIALES.<sup>1</sup>

- |                      |                             |
|----------------------|-----------------------------|
| - ALAVA.             | - KENNEBEC.                 |
| - ALPHA.             | - KERR'S PINK.              |
| - APOLLO. (D.O.)     | - KING EDWARD.              |
| - ARKA.              | - KINGSTON. (D.O.)(I.P.)    |
| - ARKULA.            | - KONDOR. (D.O.)            |
| - ARRAN BANNER.      | - LAMIA. (D.O.)             |
| - ATICA.             | - LOLA. (D.O.)              |
| - AVENIR.            | - LORA. (D.O.)(I.P.)        |
| - BAILLIE.           | - MANSOUR. (D.O.)           |
| - BARAKA. (D.O.)     | - MARFONA.                  |
| - BELDA. (D.O.)      | - MARIANA.                  |
| - BINTJE.            | - MARIJKE.                  |
| - BLANKA. (D.O.)     | - MARIS BARD.               |
| - BUESA (D.O.)       | - MARIS PIPER.              |
| - CARA.              | - MONALISA. (D.O.)          |
| - CARDINAL.          | - MORENE. (D.O.)            |
| - CASPARO.           | - NETTED GEM.               |
| - CLADA.             | - OLALLA.                   |
| - CLAUDIA.           | - OLINDA. (ISABEL)          |
| - CLAUSTAR.          | - OSTARA.                   |
| - CLEOPATRA.         | - PALOGAN.                  |
| - COLMO.             | - PENTLAND DELL.            |
| - CHRISTA.           | - PENTLAND SQUIRE.          |
| - DANI. (D.O.)       | - RADOSA.                   |
| - DESIREE.           | - RED CARA.                 |
| - DIAMANT.           | - RED CRAIG'S ROYAL.        |
| - DIANA. (D.O.)      | - RED PONTIAC.              |
| - DRAGA.             | - RENOVA.                   |
| - DUQUESA.           | - ROSALIE.                  |
| - EDZINA. (D.O.)     | - ROYAL KIDNEY.             |
| - ETOILE DU LION.    | - SAHEL (D.O.)              |
| - EUREKA.            | - SCALA.                    |
| - FLAMENCO. (D.O.)   | - SOWA.                     |
| - GIGANT.            | - SPUNTA.                   |
| - GRACIA. (D.O.)     | - TURIA.                    |
| - INSTITUT BEAUVAIS. | - UKAMA.                    |
| - IRISH PEACE.       | - ULSTER SCEPTRE.           |
| - ITURRIETA. (D.O.)  | - UP TO DATE.               |
| - JAERLA.            | - VICTOR.                   |
| - KATAHDIN.          | - VULKANO. (D.O.)           |
|                      | - ZUBELDIA. (ALBERTA)(D.O.) |

D.O.= Variedades protegidas con derecho de Obstantor.

I.P.= Inscripción Provisional

Tabla (2.2).- Variedades de patata de siembra existentes en España.

<sup>1</sup>Esta lista, ha sido cedida por el Instituto Nacional de Semillas y Plantas de vivero. (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación).

VARIEDADES DE PATATA SELECCIONADAS.

- ARRAN BANNER
- BINTJE
- CLAUSTAR
- DESIREE
- EDZINA
- JAERLA
- KENNEBEC
- MONALISA
- PALOGAN
- RED PONTIAC

Tabla (2.3).- Variedades de patata de siembra seleccionadas para el trabajo.

muestras se desecaron en estufa a 90°C hasta la sequedad total de las mismas.

Por diferencias de peso respecto a las muestras iniciales se determinó el porcentaje de agua contenido en cada muestra.

### **2.3.3.- Contenido en Fibra.**

Para calcular el contenido en fibra de las muestras, se extrajo de cada una el almidón que contenían, y el residuo obtenido fue lavado extrayendo así posibles restos amiláceos, a continuación se desecó el residuo por el procedimiento descrito en el apartado anterior. Por último se determinó el peso del residuo seco, determinándose así el contenido de fibra presente en el mismo, considerando como tal restos de pared celular del parénquima de la patata.

### **2.3.4.- Coefficiente Almidón/Agua y Almidón/Fibra.**

El cálculo de estos coeficientes tiene una gran importancia a la hora de seleccionar entre una u otra variedad de patata. Un elevado coeficiente almidón/agua permite obtener un mayor rendimiento en almidón, de igual forma un elevado valor en el coeficiente almidón/fibra presenta notables ventajas a la hora de reducir considerablemente los residuos sólidos del proceso de extracción del almidón.

Estos han sido entre otros los factores clave a la hora de seleccionar entre una u otra de las variedades de patata ensayadas en este estudio.

## **2.4.- PREPARACION DEL HIDROLIZADO DE ALMIDON.**

### **2.4.1.- Extracción del Almidón.**

La metodología que se empleó para la extracción del almidón fue la empleada en la industria durante los últimos años. Básicamente el método para la extracción del almidón utilizando como sustrato la patata es el siguiente:

#### **METODO DE EXTRACCION**

La materia prima se peló y fue introducida en agua fría para evitar su ennegrecimiento (oxidación), las patatas así mantenidas se rallaron hasta conseguir un tamaño de partícula de unos 2 mm, lográndose así la ruptura de la mayor parte del parénquima tisular de la patata, facilitando así la liberación del almidón. La pasta obtenida se frotó sobre una malla muy fina sobre la que se hizo pasar una corriente de agua fría. Con ello se arrastra el almidón que se deposita por gravedad en el fondo de una cubeta situada debajo del tamiz.

De esta forma se obtiene por un lado el almidon y la fibra aparece retenida en el tamiz.

El almidón así obtenido se lava varias veces para eliminar las posibles impurezas producidas en el proceso de extracción. Finalmente se decanta el almidón y se seca a temperatura ambiente; una vez seco, el producto se muele y queda listo para ser utilizado. En la figura 1 se muestra con detalle el esquema del proceso de extracción del almidón.

### **2.4.2.- Hidrólisis ácida.**

La mayor parte de las cepas de hongos filamentosos seleccionados carecen de amilasas y en el caso de poseerlas su actividad es minoritaria, reduciendo así la posibilidad de utilizar el almidón como fuente de carbono.

De esta forma se planteó la hidrólisis previa del almidón para facilitar así la asimilación de la fuente de carbono. Con tal fin se emplearon el ácido clorhídrico y el sulfúrico como agentes hidrolizantes.

#### METODO DE HIDROLISIS

En matraces de 250 ml. de capacidad, con 1 gramo de almidón se añadieron volúmenes de 5,6,7,8,9 y 10 ml respectivamente de soluciones de ácido clorhídrico o sulfúrico a unas concentraciones finales de 0.5,1.0 ó 1.5 % v/v.

Tras homogeneizar el almidón con el ácido diluido, se taparon los matraces y se llevaron al autoclave donde fueron sometidos a un proceso de hidrólisis en caliente, empleando temperaturas de 115 ó 120°C durante intervalos de tiempo de 15 ó 20 minutos.

Al concluir este tiempo, el contenido de los matraces se dejó enfriar y su contenido fue neutralizado empleando una solución de hidróxido sódico 1N.

Posteriormente se determinaron los azúcares reductores liberados en la hidrólisis.

##### 2.4.2.1.- Empleo de Agentes Tensoactivos.

En los trabajos de Cazorla M. y Lopez Garcés J.J. (1984), se introdujo el empleo de agentes tensoactivos en procesos de hidrólisis ácida de derivados celulósicos, observándose que al incorporar estos agentes en concentraciones muy pequeñas (0.001 a 0.0001 g/l.) se logra intensificar notablemente la acción de los ácidos en la hidrólisis de estos compuestos.

El empleo de un agente tensoactivo en procesos de hidrólisis se basa en la propiedad de facilitar la impregnación de los agentes hidrolizantes (ácidos o bases) sobre el sustrato que va a ser atacado.

Launoit en 1964 definió esta propiedad impregnante como la capacidad de aumentar la tensión superficial de un líquido sobre un sustrato o de su poder de penetración en los poros de dicho sustrato.

En este estudio se emplearon dos sustancias con características de tensoactivo:

- Glicerina.
- Tween 80.

Estas sustancias fueron añadidas a las soluciones de ácido a una concentración final de 0.001 g/l.

El proceso seguido en la hidrólisis con tensoactivos fue idéntico que el descrito en el apartado 2.4.2. Salvo en un punto. Cuando se añadieron a los matraces conteniendo el almidón los distintos volúmenes de ácido diluido, para facilitar la impregnación, y tras efectuar la previa homogeneización del almidón y el ácido, la suspensión se dejó reposar durante 10 minutos, efectuándose a continuación de forma análoga el proceso de hidrólisis y de valoración de los azúcares reductores presentes en el hidrolizado. En la figura 2 se muestra el proceso de hidrólisis con la adición de agentes tensoactivos.

#### 2.4.3.- Efecto de la concentración de los agentes tensoactivos en el crecimiento de los hongos filamentosos.

Resultó interesante conocer el efecto de los agentes tensoactivos sobre el crecimiento de los hongos filamentosos, pues el empleo de estos agentes se encuentra muy extendido en la producción de celulasas ( referencia) y podrían resultar tóxicos sobre las cepas ensayadas.

A los medios de cultivo números 2,3 y 4 se les incorporaron concentraciones crecientes de Glicerina y de Tween 80 (de 0.0001 a 0.1 g/l.). Los medios de cultivo así obtenidos se dispensarán en placas de Petri estériles y posteriormente se inocularon con esporas

procedentes de las cepas de hongos filamentosos a testar. Como control de crecimiento fueron empleados los mismos medios de cultivo pero sin adicionarlos tensoactivos.

Tras 48 horas de incubación en estufa a 28°C se determinó el crecimiento de los hongos filamentosos sobre los distintos medios de cultivo.

## 2.5.- DETERMINACION DE AZUCARES.

Para determinar el contenido de azúcares presentes en el hidrolizado de almidón se emplearon tres métodos de valoración.

2.5.1.- Valoración de Azúcares Totales.

2.5.2.- Valoración de Azúcares Reductores.

2.5.3.- Valoración Enzimática de Glucosa.

### 2.5.1.- Valoración de Azúcares Totales.

Para determinar la composición cuantitativa y cualitativa de los azúcares presentes en el hidrolizado de almidón se empleó la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (H.P.L.C.).

Para dicho análisis se empleó un cromatógrafo (Sugart Analyzer I de Waters Associated Inc.) compuesto por una bomba (Mod M-45), un refractómetro diferencial (Mod R-401), y un procesador de datos (Mod DATO-MODULE).

La columna utilizada fue de tipo TRACER-AZUCARES de intercambio iónico (300 x 7 mm) empleando agua bidestilada (Milli Q) como eluyente.

CONDICIONES DE CROMATOGRAFIA.	
VOLUMEN DE MUESTRA	100 $\mu$ l.
TIPO DE COLUMNA	TRACER AZUCARES.
TEMPERATURA DE LA COLUMNA	90 $^{\circ}$ C
FASE MOVIL	AGUA (MILLI Q).
VELOCIDAD DE FLUJO.	0.5 ml/min.
SENSIBILIDAD DEL DETECTOR	8 x

Tabla(2.4)- Condiciones de la cromatografía (H.P.L.C.).

### 2.5.2.- Determinación de azúcares reductores.

Para la determinación de azúcares reductores se empleó el método descrito por Nelson y Somogy en 1944.

#### FUNDAMENTO:

La determinación de azúcares reductores por este método se basa en la capacidad reductora que posee el grupo aldehído (hemiacetal) presente en algunos azúcares.

La determinación requiere el uso de dos reactivos. El reactivo 1 o reactivo cúprico y el reactivo 2 o reactivo arsenomolibdico.

El reactivo cúprico en caliente es capaz de ser reducido por el grupo aldehído del azúcar reductor, transformando el ion cúprico del mismo en ion cuproso, insoluble y de color pardo. Este precipitado se resuspende por acción del segundo reactivo (Arsenomolibdico).

Como la reacción de reducción es equimolecular, la cantidad de ion cuproso presente en el medio es la misma que la de azúcar reductor.

**Reactivo 1 (Reactivo Cúprico).**

Fosfato Bisódico Anhidro..... 28 g.  
Hidróxido Sódico (1 N)..... 100 ml.  
Tartrato Sódico Potásico..... 40 g.  
Sulfato de Cobre..... 8 g.  
Sulfato Bisódico Anhidro..... 180 g.  
Completar con Agua Destilada Hasta... 1.000 ml.

**Reactivo 2 (Reactivo Arsenomolibdico).**

Molibdato Amónico Tetrahidratado..... 25 g.  
Acido Sulfúrico Concentrado..... 21 ml.  
Completar con Agua Destilada Hasta.... 1.000 ml.  
Arseniato Bisódico Heptahidratado ..... 3 g.  
Completar con Agua Destilada Hasta ... 1.000 ml.

**PROCEDIMIENTO.**

Se preparó una solución patrón de glucosa de 0.1 mg/ml. que se dispuso en una serie de tubos en concentración decreciente hasta 0.01 mg/ml en un volumen final de 1 ml.

A cada tubo se le añadió 1 ml del reactivo 1 (Reactivo Cúprico), agitando en un vortex.

Los tubos se taponaron y se introdujeron en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos, después se enfriaron, y a cada tubo se le añadió 1 ml del reactivo 2 (Reactivo Arsenomolibdico), se agitó el contenido de los tubos y se completo su volumen hasta 25 ml con agua destilada.

La lectura de las muestras se efectuó con un espectrofotómetro (Mod Spectronic-20) a 520 nm. de longitud de onda, utilizando como blanco agua destilada con reactivos.

### 2.5.3.- Determinación Enzimática de la Glucosa.

Para la determinación del contenido en glucosa de las muestras, se empleó el test enzimático de la Glucosa Oxidasa.(G.O.D.), (Boehringer Mannheim G.m.b.h. cat. n° 15755).

#### FUNDAMENTO.

La base de este método consiste en la oxidación enzimática de la glucosa por acción del oxígeno molecular en presencia de agua, con producción de ácido glucónico y agua oxigenada.

#### G.O.D.

Glucosa + Oxígeno -----> Ac. Glucónico + Agua Oxigenada.

El agua oxigenada oxida a su vez enzimáticamente una sal de amonio del ácido 2,2'azino di 3-etil benzotiazolidin sulfónico (A.B.T.S.), que se transforma en un complejo coloreado verde azulado.

#### P.O.D.

Agua Oxigenada + A.B.T.S. -----> Colorante + Agua.

Este complejo coloreado se puede medir espectrofotométricamente a 560 nm de longitud de onda frente a blanco con agua destilada y reactivos.

#### Reactivo G.O.D.

Tampón Fosfato..... 100 m mol/ml pH 7.0  
 P.O.D.\*..... ≥ 0.8 u/ml.  
 G.O.D.\*\*..... ≥ 10 u/ml.  
 A.B.T.S.\*\*\*..... 10 mg/ml.

\* Peroxido Dismutasa.

\*\* Glucosa Oxidasa.

\*\*\* 2,2'-Diazino di 3-etil benzodiazolidin sulfato.

**PROCEDIMIENTO.**

Se preparó una solución patrón de glucosa de 0.1 mg/ml que se dispuso en una serie de tubos en concentración decreciente hasta 0.01 mg/ml. en un volumen final de 200 µl. A cada uno de ellos se les añadieron 5 ml del reactivo G.O.D., se agitaron en un vortex, y se incubaron a 37°C durante 10 minutos con la precaución de que no incidiera sobre ellos la luz directamente.

Tras este tiempo, se determinó la densidad óptica del contenido de cada tubo a 560 nm de longitud de onda frente a un blanco de agua destilada con reactivos.

**2.6.- DETERMINACION DE PROTEINAS.**

Para determinar la cantidad de proteínas presentes en los medios de cultivo se utilizó la técnica descrita por Lowry en 1951.

**Reactivo 1**

Carbonato Sódico anhidro ..... 2 g  
Hidróxido Sódico 0.1 M ..... 100 ml

**Reactivo 2**

Sulfato de Cobre pentahidratado ..... 2 g  
Agua Destilada ..... 100 ml.

**Reactivo 3**

Tartrato Sódico-Potásico ..... 2 g  
Agua Destilada ..... 100 ml

**Reactivo 4**

50 ml de reactivo 1 + 1 ml de la mezcla (Reactivo 2 + Reactivo 3) en una relación 1:1.

**Reactivo 5**

Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:2

**PROCEDIMIENTO.**

Se prepara una solución de seroalbúmina a una concentración final de 1 mg/ml en agua destilada hasta un volumen final de 1 ml, de ella se realiza un banco de diluciones hasta una concentración de 0.1 mg/ml en un volumen final de 1 ml. A cada tubo se le añaden 5 ml del reactivo 4 y se incuba a 30°C durante 15 minutos.

Transcurrido este tiempo se añade a cada tubo 0.5 del reactivo 5 (Reactivo de Folin-Ciocalteu), se agitan los tubos y se dejan reposar durante 30 minutos. Tras este tiempo se determina el contenido en proteínas de cada tubo midiendo su absorbancia a 500 nm de longitud de onda frente a un blanco que contiene agua destilada y los reactivos.

**2.7.- MEDIOS DE CULTIVO CON HIDROLIZADO DE ALMIDÓN.**

Como compuesto base para las experiencias se utilizó hidrolizado de almidón de patata como fuente de carbono de los medios de cultivo. A continuación se describe la composición de los distintos medios de cultivo empleados en el trabajo.

**Medio 1.- Hidrolizado de almidón.**

Hidrolizado de almidón .....	6 g/l.
Agua Destilada (c.s.p.) .....	1.000 ml
	pH final 5.5

**Medio 2.- Hidrolizado/Sales.**

Hidrolizado de Almidón ..... 6 g/l.  
 Nitrato Amónico ..... 1 g.  
 Fosfato Bipotásico ..... 1 g.  
 Sulfato Magnésico Heptahidratado ..... 0.5 g.  
 Agua Destilada (c.s.p.) ..... 1.000 ml.  
 pH final 5.5

**Medio 3.- Hidrolizado/Sales/Peptona.**

Hidrolizado de Almidón ..... 6 g/l.  
 Nitrato Amónico ..... 1 g.  
 Fosfato Bipotásico ..... 1 g.  
 Sulfato Magnésico Heptahidratado ..... 0.5 g.  
 Neopeptona Difco ..... 2.5 g.  
 Agua Destilada (c.s.p.) ..... 1.000 ml  
 pH final 5.5

**Medio 4.- Hidrolizado/Peptona.**

Hidrolizado de almidón ..... 6 g/l.  
 Neopeptona Difco ..... 2.5 g.  
 Agua Destilada (c.s.p.) ..... 1.000 ml.  
 pH final 5.5

**Medio 5.- Hidrolizado/Sales/Aminoácidos.**

Hidrolizado de Almidón ..... 6 g/l.  
 Nitrato Amónico ..... 1 g.  
 Fosfato Bipotásico ..... 1 g.  
 Sulfato Magnésico Heptahidratado ..... 0.5 g.  
 Complejo de Aminoácidos ..... 2.5 g.  
 Agua destilada (c.s.p.) ..... 1.000 ml.  
 pH final 5.5

**Medio 6.- Hidrolizado/Aminoácidos.**

Hidrolizado de Almidón ..... 6 g/l.  
 Complejo de Aminoácidos ..... 2.5 g.  
 Agua Destilada (c.s.p.) ..... 1.000 ml.  
 pH final 5.5

**Medio 7.- 2 x Hidrolizado/Sales.**

Hidrolizado de Almidón ..... 12 g/l.  
 Nitrato Amónico ..... 1 g.  
 Fosfato Bipotásico ..... 1 g.  
 Sulfato Magnésico Heptahidratado ..... 0.5 g.  
 Agua Destilada (c.s.p.) ..... 1.000 ml.  
 pH final 5.5

**Medio 8.- 2 x Hidrolizado/Sales/Peptona.**

Hidrolizado de Almidón ..... 12 g/l.  
 Nitrato Amónico ..... 1 g.  
 Fosfato Bipotásico ..... 1 g.  
 Sulfato Magnésico Heptahidratado ..... 0.5 g.  
 Neopeptona Difco ..... 2.5 g.  
 Agua Destilada (c.s.p.) ..... 1.000 ml.  
 pH final 5.5

**Medio 9.- 2 x Hidrolizado/Peptona.**

Hidrolizado de Almidón ..... 12 g/l.  
 Neopeptona Difco ..... 2.5 g.  
 Agua Destilada (c.s.p.) ..... 1.000 ml.  
 pH final 5.5

**Medio 10.- Hidrolizado/5 x Fosfato.**

Hidrolizado de Almidón ..... 6 g/l.  
 Nitrato Amónico ..... 1 g.  
 Fosfato Bipotásico ..... 5 g.  
 Sulfato Magnésico Heptahidratado ..... 0.5 g.  
 Neopeptona Difco ..... 2.5 g.  
 Agua Destilada (c.s.p.) ..... 1.000 ml.  
 pH final 5.5

**Medio 11.- Hidrolizado/2.5 x Nitrato Amónico.**

Hidrolizado de Almidón ..... 6 g/l.  
 Nitrato Amónico ..... 2.5 g.  
 Fosfato Bipotásico ..... 1 g.  
 Sulfato Magnésico Heptahidratado ..... 0.5 g.  
 Agua Destilada (c.s.p.) ..... 1.000 ml.  
 pH final 5.5

En la Tabla 2.5, se indica la composición del complejo de aminoácidos utilizado.

**2.8.- MEDIOS DE CULTIVO CON CELULOSA Y DERIVADOS.****Medio 12.- Avicel/Sales.**

Avicel ..... 2.5 g.  
 Nitrato Amónico ..... 1 g.  
 Fosfato Bipotásico ..... 1 g.  
 Sulfato Magnésico Heptahidratado ..... 0.5 g.  
 Agua Destilada (c.s.p.) ..... 1.000 ml.  
 pH final 5.5

COMPOSICION DE LA MEZCLA DE AMINOACIDOS			
AMINOACIDO	%	AMINOACIDO	%
L-ALANINA	8.12	L-ISOLEUCINA	1.32
L-ARGININA	3.96	L-LEUCINA	3.02
L-ASPARAGINA	6.23	L-LISINA	3.87
L-CISTEINA	0.09	L-METIONINA	0.94
L-FENILALANINA	2.07	L-PROLINA	16.99
L-GLICOCOLA	23.60	L-SERINA	0.37
L-GLUTAMICO	10.76	L-TRIPTOFANO	0.47
L-HIDROXIPROLINA	13.31	L-TIROSINA	1.79
L-HISTIDINA	0.75	L-VALINA	2.26

Tabla (2.5).- Composición cuantitativa del complejo de aminoácidos libres.

**Medio 13.- Avicel/Sales/Peptona.**

Avicel ..... 2.5 g.  
Nitrato Amónico ..... 1 g.  
Fosfato Bipotásico ..... 2.5 g.  
Sulfato Magnésico Heptahidratado ..... 0.5 g.  
Neopeptona Difco ..... 2.5 g.  
Agua Destilada (c.s.p.) ..... 1.000 ml.  
pH final 5.5

**Medio 14.- Avicel/Peptona.**

Avicel ..... 2.5 g.  
Neopeptona Difco ..... 2.5 g.  
Agua Destilada (c.s.p.) ..... 1.000 ml.  
pH final 5.5

**Medio 15.- Papel/Sales.**

Papel de Filtro (Disco) ..... 0.5 g.  
Nitrato Amónico ..... 1 g.  
Fosfato Bipotásico ..... 1 g.  
Sulfato Magnésico Heptahidratado ..... 0.5 g.  
Agua Destilada (c.s.p.) ..... 1.000 ml.  
pH final 5.5

**Medio 16.- Papel/Sales/Peptona.**

Papel de Filtro (Disco) ..... 0.5 g.  
Nitrato Amónico ..... 1 g.  
Fosfato Bipotásico ..... 1 g.  
Sulfato Magnésico Heptahidratado ..... 0.5 g.  
Neopeptona Difco ..... 2.5 g.  
Agua Destilada (c.s.p.) ..... 1.000 ml.  
pH final 5.5

**Medio 17.- Papel/Peptona.**

Papel de Filtro (Disco) ..... 0.5 g.  
 Neopeptona Difco ..... 2.5 g.  
 Agua Destilada (c.s.p.) ..... 1.000 ml.  
 pH final 5.5

**Medio 18.- Carboximetilcelulosa/Sales.**

Carboximetilcelulosa (C.M.C.) ..... 2.5 g.  
 Nitrato Amónico ..... 1 g.  
 Fosfato Bipotásico ..... 1 g.  
 Sulfato Magnésico Heptahidratado ..... 0.5 g.  
 Agua Destilada (c.s.p.) ..... 1.000 ml.  
 pH final 5.5

**Medio 19.- Carboximetilcelulosa/Sales/Peptona.**

Carboximetilcelulosa (C.M.C.) ..... 2.5 g.  
 Nitrato Amónico ..... 1 g.  
 Fosfato Bipotásico ..... 1 g.  
 Sulfato Magnésico Heptahidratado ..... 0.5 g.  
 Neopeptona Difco ..... 2.5 g.  
 Agua Destilada (c.s.p.) ..... 1.000 ml.  
 pH final 5.5

**Medio 20.- Carboximetilcelulosa/Peptona.**

Carboximetilcelulosa (C.M.C.) ..... 2.5 g.  
 Neopeptona Difco ..... 2.5 g.  
 Agua Destilada (c.s.p.) ..... 1.000 ml.  
 pH final 5.5

**Medio 21.- Celobiosa/Sales/Peptona.**

Celobiosa .....	2.5 g.
Nitrato Amónico .....	1 g.
Fosfato Bipotásico .....	1 g.
Sulfato Magnésico Heptahidratado .....	0.5 g.
Neopeptona Difco .....	2.5 g.
Agua Destilada (c.s.p.) .....	1.000 ml.
	pH final 4.0

**Medio 22.- Glucosa/Sales/Peptona.**

Glucosa .....	2.5 g.
Nitrato Amónico .....	1 g.
Fosfato Bipotásico .....	1 g.
Sulfato Magnésico Heptahidratado .....	0.5 g.
Neopeptona Difco .....	2.5 g.
Agua Destilada (c.s.p.) .....	1.000 ml.
	pH final 4.0

**Medio 23.- Paja/Sales/Peptona.**

Paja de Cebada .....	2.5 g.
Nitrato Amónico .....	1 g.
Fosfato Bipotásico .....	1 g.
Sulfato Magnésico Heptahidratado .....	0.5 g.
Neopeptona Difco .....	2.5 g.
Agua Destilada (c.s.p.) .....	1.000 ml.
	pH final 4.0

**Medio 24.- Papel Cardado/Sales.**

Papel de Filtro Cardado ..... 2.5 g.  
 Nitrato Amónico ..... 1 g.  
 Fosfato Bipotásico ..... 1 g.  
 Sulfato Magnésico Heptahidratado ..... 0.5 g.  
 Agua Destilada (c.s.p.) ..... 1.000 ml.  
 pH final 4.0

**Medio 25.- Papel Cardado/Peptona.**

Papel de Filtro Cardado ..... 2.5 g.  
 Neopeptona Difco ..... 2.5 g.  
 Agua Destilada (c.s.p.) ..... 1.000 ml.  
 pH final 4.0

**2.9.- PREPARACION DE INOCULOS.**

Uno de los principales problemas que plantea la experimentación con hongos filamentosos es el manejo de sus formas vegetativas (hifas).

Estas son susceptibles de fragmentarse, resultando de cada fragmento una unidad formadora de colonias. Así mismo, las hifas pueden asociarse entre sí formando estructuras macroscópicas denominadas Micelio. La cuantificación de hifas y micelio resulta compleja, sobre todo a la hora de la elaboración de inóculos. Por esta razón, y para facilitar el manejo y cuantificación, la mayor parte de los inóculos desarrollados en este trabajo fueron elaborados a partir de suspensiones de esporas.

**2.9.1.- Recuento de Esporas y Rectas de Calibrado.**

Para efectuar el recuento de las esporas de los hongos filamentosos se partió de placas de Petri conteniendo Agar Patata Dextrosa, sobre las que se inocularon los distintos hongos filamentosos a ensayar.

Tras siete días de incubación en estufa de cultivo a 28°C, se obtuvo un césped de esporas homogéneo. Estas esporas fueron resuspendidas en 50 ml de suero salino estéril (Cloruro Sódico en agua destilada al 0.9%). A partir de estas suspensiones madre, se efectuaron sucesivas diluciones, con una micropipeta se tomaron 100 µl. de estas suspensiones de esporas y se depositaron para su recuento en una Cámara Cuenta Glóbulos de Thoma, de 0.100 mm de altura, con un área de cuadrícula de 1/400 mm<sup>2</sup>.

Por otro lado se determinaron las densidades ópticas de las diluciones por turbidimetría.

Este método se basa en que una suspensión de microorganismos al ser atravesada por un rayo de luz, provoca una cierta dispersión, de la misma forma que la intensidad lumínica recibida por el fotoreceptor después de atravesar la suspensión es inferior a la del foco emisor.

Cuando las suspensiones están tan diluidas que los centros de dispersión son básicamente independientes, la intensidad inicial y la recibida están relacionadas por la ecuación de Lambert Beer.

$$I = I_0 \cdot e^{-k \cdot l} \quad (\text{Ec. 2.1})$$

Siendo I: La intensidad recibida.

$I_0$ : La intensidad inicial.

k: La turbidez del medio.

l: El paso óptico de la cubeta.

En suspensiones diluidas la turbidez es proporcional al número de partículas C.

$$K = K' \cdot C \quad (\text{Ec. 2.2})$$

Siendo K' un coeficiente de turbidez. Así en el caso de la Ec. 2.1 esta se transforma en:

$$I = I_0 \cdot e^{-k' \cdot C \cdot l} \quad (\text{Ec. 2.3})$$

$$\log I_0/I = -K' \cdot C \cdot 1/2.303 \quad (\text{Ec. 2.4})$$

$$\log I_0/I = (-K' \cdot 1/2.303) \cdot C \quad (\text{Ec. 2.5}) \quad a = (-K' \cdot 1/2.303) \cdot C$$

$$\log I_0/I = a \cdot C \quad (\text{Ec. 2.7}) \quad (\text{Ec. 2.6})$$

$$\log I_0/I = \text{D.O.} \quad (\text{Ec. 2.8})$$

$$\text{D.O.} = a \cdot C$$

Las distintas densidades ópticas de las suspensiones de esporas fueron medidas con respecto a un blanco de suero salino estéril a una longitud de onda de 500 nm.

Los datos obtenidos fueron ajustados a través del método de los Mínimos Cuadrados, obteniendo así una recta de regresión para determinar el número de esporas de cada cepa de hongo filamentoso.

#### 2.9.2.- Preparación de Inóculos a partir de suspensiones de de Esporas.

Partiendo de un cultivo de siete días de una cepa de hongo filamentoso, crecido en Agar Patata Dextrosa, se obtuvo una suspensión concentrada de esporas añadiendo 50 ml. de suero salino sobre cada placa.

La suspensión madre así obtenida, se diluyó hasta alcanzar una densidad óptica de 0.522 a 500 nm, equivalente a una concentración de  $7 \times 10^5$  esporas por mililitro. Obteniéndose así la suspensión de esporas empleada para la inoculación de los medios de cultivo.

Tanto para la elaboración de preinóculos para fermentador como para las experiencias de cultivo en batch en matraz.

Se empleó un volumen de inóculo del 10% respecto al volumen final del medio de cultivo.

## 2.10.- MEDIDAS DE CRECIMIENTO.

### 2.10.1.- Cálculo de la Tasa Específica de Crecimiento ( $\mu$ ).

Cuando se inocula una suspensión de microorganismos en un medio de cultivo, tras una fase de adaptación del microorganismo al nuevo medio, de duración variable (Fase de Latencia), el microorganismo comienza a crecer, este crecimiento puede describirse a través de una ecuación.

$$dx/dt = \mu \cdot X ; \quad \mu = (dx/dt) \cdot (1/X). \quad (\text{Ec. 2.9})$$

Donde  $dx/dt$ : Es la tasa de crecimiento expresada en unidades de biomasa por unidad de tiempo.

$X$ : Es la densidad poblacional instantánea expresada en unidades de biomasa.

$\mu$ : Es una constante de proporcionalidad expresada en  $h^{-1}$ .

Al principio del crecimiento  $\mu$  no es constante y aumenta progresivamente (Fase de Aceleración). Cuando el valor de  $\mu$  permanece constante a lo largo del tiempo, se dice que el crecimiento está en fase exponencial. Ello se debe a que si se integra la Ecuación 2.9, se obtiene:

$$X = X_0 \cdot e^{\mu \cdot t} \quad (\text{Ec. 2.10})$$

Donde  $X$ : Es la cantidad de biomasa en un momento dado, expresada en unidades de biomasa.

$X_0$ : Es la cantidad de biomasa inicial, expresada en unidades de biomasa.

$t$ : El tiempo transcurrido, expresado en horas.

Tomando logaritmos en la Ecuación 2.10

$$\ln X = \ln X_0 + \mu \cdot t \quad (\text{Ec. 2.11})$$

$$\mu = (\ln X - \ln X_0)/t \quad (\text{Ec. 2.12})$$

$\mu$ : es la Tasa Específica de crecimiento, y puede calcularse experimentalmente a partir de la Ecuación 2.10

De esta forma, si se determinada los valores de X y de t, durante un cierto intervalo de tiempo, y se representa X (en g/l) frente a t (en horas) en unos ejes de coordenadas, es posible ajustar por un análisis de regresión exponencial los puntos resultantes a una recta, cuya pendiente es el valor de  $\mu$  expresado en  $h^{-1}$ .

### 2.10.2.- Determinacion de los Factores de Rendimiento.

En un cultivo microbiano, la tasa de crecimiento es función de la tasa de consumo del sustrato limitante.  $dS/dt$ , y se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$dx/dt = -Y_{x/s} \cdot dS/dt \quad (\text{Ec. 2.13})$$

En la que  $Y_{x/s}$ , es el factor de rendimiento con respecto al sustrato limitante, expresado en unidades de biomasa producidas por unidad de sustrato consumido. En algunos casos las unidades de sustrato se expresan en moles, en cuyo caso se obtiene el rendimiento molar. El cálculo de este factor puede ser obtenido de dos formas.

#### 2.10.2.1.- Determinación por Consumo Total de Sustrato.

Una de las formas de determinar el factor de rendimiento  $Y_{x/s}$ , consiste en dejar que sea consumido todo el sustrato limitante y determinar entonces la biomasa producida. Este procedimiento presenta el inconveniente de no distinguir entre los distintos factores de crecimiento.

Si se tiene en cuenta que la fase de mayor producción de biomasa es la exponencial, es por tanto la fase de mayor consumo de sustrato. Así pues, tanto en la fase de desaceleración como en la de latencia, los valores de  $Y_{x/s}$ , obtenidos hacen descender el valor de  $Y_{x/s}$ , de la fase exponencial.

Con este procedimiento para el cálculo del factor de rendimiento, se tiene la ventaja de no tener que determinar experimentalmente el consumo de sustrato más que al final del proceso para asegurarse de que no queda nada de sustrato.

Para determinar experimentalmente el valor de  $Y_{x/s}$ , se partió de matraces de 250 ml; conteniendo 135 ml. del medio de cultivo n<sup>o</sup> 3, ajustando el valor del pH a 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 y 4.5.

Los matraces fueron inoculados con una suspensión de esporas y mantenidos en agitación orbital como se describe en el apartado (2.11.1.) durante 48 horas. Al final de este periodo, se extrajeron 5 ml. de muestra de cada matraz, determinándose a continuación el contenido en azúcares reductores por el método de Nelson y Somogy. (Apartado 2.5.2.), comprobándose la ausencia de los mismos.

Se extrajo el contenido de los matraces, y se efectuó la determinación de la biomasa presente en cada uno de ellos.

#### 2.10.2.2.- Determinación en Intervalos.

Cuando se emplea este método para determinar  $Y_{x/s}$ , hay que valorar el consumo de sustrato, así como la producción de biomasa durante cierto intervalo de tiempo. Así pues:

$$Y = (X_s - X_a)/(S_s - S_a) \quad (\text{Ec. 2.14})$$

Para un intervalo  $\delta t = t_s - t_a$ .

Para determinar experimentalmente estos valores, se empleó un fermentador New Brunswick, Bioflo. (Mod C-30), de 1.500 ml. de capacidad útil, en el que se cultivó a *T. reesei* QM 9414. En las condiciones en las que se describen en el apartado (2.11.2.). Cada dos horas se extrajeron muestras de 20 ml. Determinándose en las mismas, Biomasa (Por peso seco), Azúcares reductores y la evolución de los valores de pH a lo largo del proceso.

El uso de este método para determinar  $Y_{x/s}$ , se debe a que la formación de pellets por parte del micelio no es homogénea, y por tanto si la toma de muestras no se efectúa con una agitación homogénea, los resultados obtenidos no son reproducibles.

### 2.10.3.- Determinación de Tasas Específicas de Consumo de Sustrato.

#### 2.10.3.1.- Determinación de (q).

La Ecuación 2.15, determina la velocidad de crecimiento de una población en función de la velocidad de consumo de un sustrato que actúa como factor limitante. Si se dividen los dos miembros de esta ecuación por X:(La Densidad de Población Instantánea), se obtiene:

$$(dx/dt) \cdot (1/X) = -Y_s \cdot (dS/dt) \cdot (1/X) \quad (\text{Ec. 2.15})$$

Donde el primer miembro es por definición (Ecuación 2.15) la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ); y  $-dS/dt \cdot 1/X$  se define como la Tasa Específica de Consumo de Sustrato (q), así la ecuación 2.15 queda transformada en :

$$\mu = Y_{x/s} \cdot q \quad (\text{Ec. 2.16})$$

q: La tasa específica de consumo de sustrato se expresa en unidades de biomasa producida por unidad de sustrato consumido por hora.

Experimentalmente q se calculó a partir del cociente  $\mu/Y_{x/s}$ , para cada intervalo de tiempo  $\delta t = t_b - t_a$ .

#### 2.10.3.2.- INFLUENCIA DEL pH.

El consumo de oxígeno en la fase exponencial de crecimiento de *T. reesei* QM 9414, fue determinado con un Aparato de Warburg (B. Braun Melsugen A.G.).

Para ello, se extrajeron una serie de 5 muestras de 10 ml. cada una de un cultivo de fermentador de 10 horas. Las muestras

fueron centrifugadas a 3.000 r.p.m., durante 5 minutos, y posteriormente lavadas, con suero salino, dos veces.

El micelio fue resuspendido en 5 ml. de Tampón acetato a pH 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 y 4.5 respectivamente, de ahí se extrajeron 2 ml. de la suspensión de micelio, que fue depositada por serie doble en los matraces del Respirómetro de Warburg con una capacidad de 13.00 ml cada uno. A una serie no se le añadió Hidróxido Potásico y a otra si, para absorber el  $\text{CO}_2$  liberado en cada matraz producido por la respiración del hongo filamentoso.

Análogamente, se preparó un matraz con 2.5 ml. de agua destilada para comprobar las variaciones de presión de la columna manométrica debidas a las variaciones de temperatura y a la agitación (Termobarómetro).

Tras atemperar los matraces a 28°C durante 10 minutos, a cada matraz se le añadieron 0.5 ml. de una solución de glucosa a una concentración de 6 g/l. En este punto, y tras ajustar los manómetros a 150 mm. Se procedió a medir cada 30 minutos la variación de la presión producida por el consumo de oxígeno. Finalizado el proceso, se calculó la biomasa contenida en cada matraz.

Es posible calcular la velocidad de consumo de oxígeno representando gráficamente la cantidad de oxígeno consumida (en ordenadas) frente al tiempo en el que tiene lugar este consumo (abscisas). Las pendientes de la rectas que se obtienen ajustando estos puntos experimentales por el método de los Mínimos Cuadrados, es la velocidad de consumo de oxígeno para cada valor de pH expresada en mMoles/hora.

Para poder hacer comparaciones, se calculó la tasa específica de consumo de oxígeno ( $q_{\text{O}_2, \text{pH}}$ ). (Tasas Específicas de Consumo de Oxígeno para cada valor de pH). Esta tasa se calculó dividiendo la velocidad de consumo de oxígeno para cada valor de pH entre la biomasa presente en cada frasco.

## 2.11.- TIPOS DE CULTIVO.

### 2.11.1.- Crecimiento en Cultivo Cerrado con Agitación Orbital.

Matraces de 250 ml. de capacidad, se llenaron con 135 ml. de los distintos medios de cultivo, dichos medios de cultivo fueron esterilizados en un autoclave (Selecta. Mod Autester-G) a 120°C durante 15 minutos.

Una vez fríos, fueron inoculados con 15 ml. de una suspensión de esporas de una densidad de  $7 \times 10^5$  esp./ml.

Los matraces fueron sometidos a agitación en un agitador orbital (Gallenkamp) a 250 r.p.m. durante un periodo de 48 horas.

En este periodo de tiempo, se extrajeron muestras de 5 ml. cada cuatro horas para determinar la evolución de los valores de pH, el consumo de azúcares reductores y la evolución del consumo de peptona.

Los ensayos se efectuaron por serie doble con un desfase en la inoculación de 12 horas para salvar así las extracciones de muestras en la noche.

### 2.11.2.- Crecimiento en Fermentador en Cultivo Cerrado.

Para efectuar estos ensayos se empleó un fermentador Bioflo, Modelo C 30 de New Brunswick, de 1500 ml de capacidad útil.

El fermentador se llenó con 1.350 ml de medio de medio de cultivo estéril. Como inóculo se emplearon 150 ml. de una suspensión de micelio con una biomasa de 3.5 g/l. Crecida como se describe en el apartado (2.11.1.).

Se procedió al estudio del crecimiento de *T. reesei* QM 9414, empleando los medios de cultivo nº 3, 10, 11, bajo distintas

condiciones de agitación. 300, 500 y 700 r.p.m. con una aireación de 1 litro de aire/litro de medio de cultivo/minuto, a una temperatura de 28°C durante 24 horas.

Como agente antiespumante se añadieron 200 µl. de Sillicex G-500.

Con estas condiciones se tomaron muestras cada 2 horas para determinar, biomasa, consumo de azúcares reductores y la evolución de los valores de pH.

## 2.12.- MODELOS DE CRECIMIENTO.

Para determinar la forma en que crece *T. reesei QM 9414*, se utilizaron dos modelos matemáticos que describen el comportamiento microbiano en el crecimiento. El primero es el Modelo de Crecimiento Exponencial descrito por Monod en 1942.

Este es el modelo matemático que siguen la mayor parte de los microorganismos unicelulares: Bacterias, Protozoos y Levaduras.

El segundo modelo (En Raíz Cúbica), mas restringido, fue descrito por Pirt en 1966, fue diseñado para explicar el comportamiento de los Actinomicetos y los Hongos Filamentosos que no seguían exactamente el modelo anteriormente expuesto.

Para poder aplicar los modelos de crecimiento, Exponencial y en Raíz Cúbica al crecimiento de *T. reesei QM 9414*, se cultivó el hongo filamentosos en fermentador como se describe en el apartado (2.11.2.).

Cada 2 horas, durante un periodo de veinticuatro, se tomaron muestras de 20 ml. para determinar la biomasa producida en el tiempo.

Una vez conocida la biomasa producida, se representó el logaritmo Neperiano de la misma frente al tiempo, y, análogamente la Raíz cúbica de la biomasa frente al tiempo en que se produce. Los puntos obtenidos

en cada caso, fueron ajustados por el método de los Mínimos Cuadrados, obteniéndose las respectivas rectas de regresión con sus coeficientes de correlación.

## **2.13.- DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS.**

Para realizar la determinación de las distintas actividades enzimáticas del complejo celulolítico, se partió de un extracto crudo que se obtuvo centrifugando a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos los distintos medios de cultivo para la inducción de las citadas enzimas.

### **2.13.1.- Actividad Endoglucanasa. (Endo $\beta$ 1-4 Glucan hidrolasa). (Ec. 3.2.1.4.).**

Para la determinación de esta actividad enzimática, se partió de una alícuota de 200  $\mu$ l. del sobrenadante a valorar, que se resuspendió en 0.8 ml. de Tampón acetato 0.1 M. pH 4.8. Dicha muestra fue atemperada durante diez minutos a 50°C, transcurridos los cuales se añadió 1 ml de carboximetilcelulosa (Sigma) al 1% en Tampón acetato 0.1 M. pH 4.8.

La mezcla se incubó a 50°C durante 60 minutos, transcurrido ese tiempo, se determinaron los azúcares reductores liberados utilizando el método de Nelson y Somogy (1944), que se describe en el apartado (2.5.2.).

### **2.13.2.- Actividad Avicelasa. (Exo $\beta$ 1-4 Glucan hidrolasa). (Ec. 3.2.1.91).**

Para la determinación de esta actividad enzimática, se partió de una alícuota de 200  $\mu$ l. del sobrenadante a valorar, que se resuspendió en 0.8 ml. de Tampón acetato 0.1 M. pH 4.8. Dicha muestra fue atemperada durante 10 minutos a 50°C, transcurridos los cuales se añadió 1 ml de una suspensión de Avicel en Tampón acetato 0.1 M. pH 4.8.

La mezcla se incubó a 50°C durante 60 minutos con agitación mecánica, transcurrido este tiempo, se determinaron los azúcares reductores liberados, utilizando el método de Nelson y Somogy (1944), que se describe en el apartado (2.3.5.2.).

### **2.13.3.- Actividad de Papel de Filtro (F.P.A.).(Ec. 3.2.1.).**

Para la determinación de esta actividad enzimática, se partió de una alícuota de 200 µl. del sobrenadante a valorar, que se resuspendió en 1.8 ml. de Tampón acetato 0.1 M. pH 4.8. Dicha muestra fue atemperada durante 10 minutos a 50°C, transcurridos los cuales, se añadió una tira de 50 mg. de papel de filtro Watman 3.

La mezcla se incubó a 50°C durante 60 minutos, transcurrido ese tiempo, se determinaron los azúcares reductores liberados utilizando el método de Nelson y Somogy (1944), que se describe en el apartado (2.5.2.).

### **2.13.4.- Actividad β-Glucosidasa. (Ec. 3.2.1.21.).**

#### **FUNDAMENTO.**

El fundamento de esta determinación se basa en la capacidad de reconocimiento de un enzima (la β-Glucosidasa) por un sustrato sintético (el P-Nitrofenil β-D Glucopiranosido) (P.N.P.G.).

El P.N.P.G. posee una estructura y un enlace intramolecular similar al enlace β-D glicosídico de su sustrato natural: la celobiosa (4-O-β-D Glucopiranosil-D-α Glucopiranososa).

La β-Glucosidasa ataca al P.N.P.G. hidrolizándolo, liberando Glucosa + P-Nitrofenol.

El P-Nitrofenol, es una sustancia de color amarillo que puede determinarse espectrofotométricamente a una longitud de onda de 410 nm.

## METODO.

A partir de una solución patrón de P-Nitrofenol a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ . Se preparó una bacteria de tubos con una concentración decreciente de P-Nitrofenol hasta 10  $\mu\text{M}$ , hasta un volumen de 200  $\mu\text{l}$ . en Tampón acetato 0.1 M. pH 4.8.

La mezcla se incubó a 50°C durante 30 minutos para descartar la posible hidrólisis espontánea del P-Nitrofenol en estas condiciones.

Transcurrido este tiempo, y para detener la reacción, se añadieron 4 ml. de una solución de carbonato sódico al 2% en agua destilada. Después, se determinó la densidad óptica de las muestras a 410 nm. de longitud de onda frente a un blanco de agua destilada con reactivos.

## DETERMINACION.

Para la determinación de esta actividad, se empleó una modificación de la técnica de Bergehm y Pettersson 1974.

Se tomó una alícuota de 200  $\mu\text{l}$ . del sobrenadante a valorar, que fue diluido en 0.8 ml. de P.N.P.G. al 0.5% en Tampón acetato 0.1 M. pH 4.8.

La mezcla se trató como se ha descrito anteriormente, determinando su densidad óptica a 410 nm. frente a un blanco con agua destilada y reactivos.

### 2.13.5.- Definición de las Unidades de Actividad Enzimática.

#### 2.13.5.1.- Actividad Endoglucanasa, Exoglucanasa (Avicelasa) y Actividad de Papel de Filtro.

Se define la Unidad de Actividad Enzimática (U.A.E. Para la actividad Endoglucanasa y Exoglucanasa y F.P.A. para la actividad de Papel de Filtro), como la cantidad de enzima que es capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$ . de azúcares reductores por mililitro de sobrenadante y por minuto.

#### 2.13.5.2.- Actividad $\beta$ -Glucosidasa.

Se define la Unidad de Actividad Enzimática (U.A.E.), como la cantidad de enzima que es capaz de liberar 1  $\mu$ mol. de P-Nitrofenol por mililitro de sobrenadante y por minuto.

#### 2.14.- INDUCCION ENZIMATICA.

Para lograr la inducción del complejo celulolítico es necesaria la presencia de dos factores:

- Ausencia de Represión Catabólica del complejo enzimático (por ausencia de represores en el medio).
- Presencia de Inductores.

Una vez alcanzado el primer punto, con el consumo de toda la glucosa presente en los medios de cultivo, se planteó el segundo.

Con tal fin, se utilizaron dos productos e bajo coste económico, capaces de servir como inductores de la síntesis de las enzimas del complejo celulolítico. Estas sustancias son:

- Avicel. (Celulosa microcristalina de 40  $\mu$ m. de tamaño de partícula).
- Papel de Filtro Watman 3.

Estas sustancias se adicionaron tras 48 horas de crecimiento a los matraces conteniendo medios de cultivo con hidrolizado de almidón como fuente de carbono.

La concentración de la celulosa empleada en cada uno de los ensayos es de 2.5 g/l. Ajustando posteriormente los valores de pH mediante la adición de Hidróxido sódico o Acido Clorhídrico 1 N.

### **2.14.1.- Pretratamiento Físico del Papel de Filtro.**

El papel de filtro es un producto lignocelulósico que se caracteriza por su dificultad para ser atacado por parte de los microorganismos celulolíticos, en parte por su compactación y por tanto la difícil exposición de las fibras del mismo con el medio, y por otro lado por su estructura netamente cristalina.

Por esta razón, y para facilitar su degradación, se efectuó un tratamiento físico sobre el inductor, previo a la exposición al microorganismo.

Este tratamiento consiste básicamente en la disgregación de las fibras del papel, facilitando de esta forma el ataque enzimático por parte del microorganismo.

#### **METODO.**

Se partió de papel de filtro Watman 3, que se partió en trozos, que fueron hervidos en un baño de agua durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, y con ayuda de una batidora, se trituró el papel de filtro hasta obtener una pasta homogénea. Esta pasta se filtró a vacío, eliminando así una gran parte del agua retenida; A continuación, se procedió al secado de la pasta de papel empleando un horno Pasteur a 80°C durante 24 horas, al cabo de este tiempo, la pasta de papel seca se sometió a trituración durante 2 minutos, al cabo de este tiempo, la pasta de papel se transforma en una estructura de aspecto algodonoso con las fibras totalmente disgregadas.

### **2.14.2.- Pretratamiento Químico.**

Con el pretratamiento químico de los sustratos se pretendió transformar la estructura cristalina de la celulosa, de difícil acceso por parte de los microorganismos en una estructura amorfa, mucho más fácilmente atacable.

Con tal fin se utilizó una modificación del pretratamiento químico descrito por Acebal y Castillon en 1986.

#### **METODO.**

Este método consiste básicamente en un ataque químico al sustrato por la acción de una solución de hidróxido sódico concentrada en caliente.

Para ello, se preparó una solución de Hidróxido Sódico al 1% p/v. en una relación 1/50 p/v. Inductor/Hidróxido Sódico.

La mezcla así formada se sometió al pretratamiento en el autoclave a 120°C durante 60 minutos, transcurridos los cuales, se filtró a vacío el producto obtenido eliminando así el exceso de hidróxido sódico. Posteriormente se secó a temperatura ambiente dejándolo listo para su utilización.

#### **2.15.- CONDICIONES DE PRODUCCION ENZIMATICA.**

##### **2.15.1.- Ensayos en Matraz.**

En los primeros ensayos, la producción enzimática se realizó en dos fases.

Una primera fase de crecimiento micelial según el sistema descrito en el apartado (2.11.1.).

Tras 48 horas de cultivo en estas condiciones, se añadieron a los matraces los inductores para comenzar la producción enzimática, considerándose este punto el tiempo  $t = 0$  de la inducción. El valor de pH de los medios de producción enzimática se ajustó mediante la adición de hidróxido sódico o ácido clorhídrico 1 N.

Las condiciones de producción enzimática fueron las mismas que las de producción de micelio. Agitación orbital 250 r.p.m., 28°C, prolongando el tiempo de incubación hasta 120 horas.

Cada 24 horas, se extrajo una muestra de 5 ml. de cada matraz, se centrifugó a 3.000 r.p.m. durante 3 minutos para separar el micelio y la celulosa del sobrenadante, realizándose las siguientes valoraciones:

- Azúcares Reductores.
- Glucosa.
- Actividad  $\beta$ -Glucosidasa.
- Actividad Endoglucanasa.
- Actividad Exoglucanasa.
- Actividad de Papel de Filtro.

#### 2.15.2.- Ensayos en Fermentador.

Para efectuar el estudio de la producción enzimática en fermentador, se necesitó una fase previa de producción de biomasa fúngica. Esta fase se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado (2.11.2.).

Una vez consumida la totalidad de la fuente de carbono (unas 24 horas), se inició el proceso de inducción enzimática, adicionando las sustancias inductoras del complejo celulolítico tal y como se indica en el apartado (2.14.).

Para este proceso se utilizó una agitación de 300 y 500 r.p.m. con un flujo de aire de 1 volumen de aire/litro de medio de cultivo/minuto.

Se extrajeron muestras de 20 ml. cada 24 horas durante un periodo de 96 horas, determinándose los mismos parámetros que los indicados en el apartado (2.12.).

Con este proceso se pretendió conocer las condiciones óptimas de producción enzimática en cultivo cerrado, discontinuo en fermentador y compararlas con las que se obtienen cuando el cultivo se desarrolla en matraz y en cultivo en agitación orbital.

### **III.- RESULTADOS**

### 3.1.- SELECCION DE VARIEDADES DE PATATA.

De las 81 variedades de Patata de Siembra Certificada existentes en España, fueron seleccionadas 11 variedades, por ser las de más fácil acceso, mayor extensión en su siembra (más amplia distribución geográfica), y de menor coste económico.

### 3.2.- COMPOSICION DE LAS VARIEDADES DE PATATA.

Para efectuar el análisis de los componentes mayoritarios de las variedades de patata seleccionadas para este estudio, fue necesario en primer lugar eliminar la piel.

A continuación se determinó la composición mayoritaria del parénquima vegetal, valorando su contenido en almidón, agua y fibra vegetal, según las técnicas descritas en el apartado 2.3.

En las Tabla 3.1 se describen los resultados obtenidos, y en la Tabla 3.2 se muestran los coeficientes Almidón/Agua y Almidón/Fibra, obtenidos para cada variedad de patata.

Como puede observarse, no se apreciaron variaciones muy significativas en cuanto al contenido en almidón, siendo los valores extremos de un 10% para la variedad Monalisa y un 20% para las variedades Claustar y Palogan, respecto al 14.81%, que fue el valor medio obtenido con todas las variedades.

En cuanto al porcentaje de agua, se apreció una mayor oscilación que como el almidón, alcanzando valores extremos entre la variedad Bintje con un 45% de agua y la variedad Kennebec con un 76%, respecto a la media de todas las variedades (64,18%).

Por último, donde mayores son las diferencias en los porcentajes es en la fibra vegetal, oscilando entre el 6% para la variedad Palogan y el 43% para la variedad Bintje, con valores promedio del 22.36%.

VAR. DE PATATA.	% ALMIDON.	% AGUA.	% FIBRA.
1.- BARAKA.	12	63	25
2.- ARRAN BANNER.	12	68	20
3.- BINTJE.	17	45	43
4.- CLAUSTAR.	20	71	9
5.- DESIREE.	15	67	18
6.- EDZINA.	18	75	7
8.- KENNEBEC.	15	76	9
9.- MONALISA.	10	55	35
10.- PALOGAN.	20	74	6
11.- REC PONTIAC.	12	57	41

Tabla (3.1).- Porcentajes de almidón, agua y fibra obtenidos con las 11 variedades de patata seleccionadas.

VAR. DE PATATA.	%ALMIDON/%AGUA.	%ALMIDON/%FIBRA.
1.- BARAKA.	0.190	0.480
2.- ARRAN BANNER.	0.176	0.600
3.- BINTJE.	0.377	0.395
4.- CLAUSTAR.	0.281	2.220
5.- DESIREE.	0.223	0.830
6.- EDZINA.	0.240	2.570
7.- JAERLA.	0.218	0.360
8.- KENNEBEC.	0.197	1.660
9.- MONALISA.	0.181	0.280
10.- PALOGAN.	0.270	3.330
11.- REC PONTIAC.	0.210	0.290

Tabla (3.2).- Coeficientes almidón/agua y almidón/fibra obtenidos con las variedades de patata seleccionadas.

Para realizar este estudio se requería una variedad de patata que presentase:

- Un elevado contenido en almidón.
- Un aceptable contenido en agua.
- Un bajo contenido en fibra.

Por esta razón, con los datos obtenidos, se calcularon los coeficientes Almidón/Agua y Almidón/Fibra.

De esta forma, aquellas variedades que presentaran elevados índices para estos coeficientes, corresponderían a las variedades utilizadas en el trabajo.

Como puede observarse, los datos obtenidos no se dispersaron demasiado del valor de la media. Para el cociente Almidón/Agua, estos valores son:  $X = 0.2330$ .  $\sigma = 0.0587$ .

Se observaron dos variedades que destacaban notablemente sobre la media. La variedad Claustrar con un coeficiente Almidón/Agua de 0.2816, y de 0.2700 para la variedad Pálogan. Esto suponía un incremento del 20.85% para la primera y de un 15.87% para la segunda respecto al valor de la media.

Al estudiar el coeficiente Almidón/Fibra, se apreció que la dispersión de los datos era mucho mayor. Obteniéndose unos valores extremos de 0.280 para la variedad Monalisa y 3.330 para la variedad Palogan. Con unos valores de  $X = 1.183$  y  $\sigma = 1.031$ .

En función de los datos obtenidos, se seleccionó la variedad Palogan como fuente de almidón para el estudio. Además de tratarse de una variedad de gran tamaño, es poco utilizada para el consumo humano y su coste es moderado.

### 3.3.- HIDROLISIS DEL ALMIDON DE PATATA.

En este apartado se indican los resultados obtenidos a partir de cada una de las variables analizadas, estudiando el efecto de las mismas sobre el proceso de optimización en la hidrólisis del almidón de patata para su mejora.

Con los resultados obtenidos en:

- Selección del tipo de ácido para la hidrólisis. (HCl o  $\text{SO}_4\text{H}_2$ ).
- Concentración del mismo. (0.5, 1.0, 1.5% v/v.).
- Relación sólido/líquido óptima para la impregnación del almidón. (1/5, 1/6, 1/7, 1/8, 1/9, 1/10. p/v.).
- Temperatura de hidrólisis a 1.1 atmósferas de sobrepresión. (115 ó 120°C.).
- Tiempo de la hidrólisis. (15 ó 20 minutos.).
- Empleo de agentes tensoactivos. (Glicerina o Tween 80).

Se calcularon parámetros que permitieron determinar las condiciones idóneas para efectuar el proceso.

Todas las determinaciones se efectuaron por triplicado, siendo los valores indicados las medias aritméticas de los distintos ensayos.

#### 3.3.1.- Influencia del Acido en el proceso de hidrólisis.

Con el objeto de determinar la influencia del ácido en el proceso de hidrólisis del almidón de patata, se efectuaron distintas experiencias utilizando ácido clorhídrico ó ácido sulfúrico diluido hasta alcanzar unas concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5% v/v, empleando las condiciones de hidrólisis descritas en el apartado (3.3).

La metodología para efectuar estos ensayos se describe en el apartado (2.4.2.).

Los resultados obtenidos aparecen reflejados en la Tabla 3.3.

### **3.3.2.- Influencia de la Relación Sólido/Líquido.**

En este apartado se determinó la influencia de la relación sólido líquido en el proceso de hidrólisis del almidón de patata.

Para ello, siguiendo el proceso descrito en el apartado 2.4.2. Se efectuó la hidrólisis en matraces de 250 ml. de capacidad, con una Relación Sólido/Líquido de 1/5, 1/6, 1/7, 1/8, 1/9 y 1/10. p/v, hasta un volumen máximo que no superó el 5% de la capacidad total del matraz.

Se comenzó estudiando una Relación de 1/5 p/v. por ser este el mínimo volumen al cual se logró una impregnación homogénea del almidón.

En la Tabla 3.3 se reflejan los resultados obtenidos con las distintas relaciones Sólido/Líquido a las distintas concentraciones de ácido empleadas.

### **3.3.3.- Efecto de la Temperatura y del Tiempo en la Hidrólisis.**

De forma análoga a la de las variables estudiadas anteriormente, se procedió al análisis del efecto de la temperatura y del tiempo en el proceso de hidrólisis del almidón de patata.

En la Tabla 3.3 se muestran los resultados obtenidos empleando 115 ó 120°C como temperatura de hidrólisis a 1.1 atmósferas de sobrepresión durante intervalos de 15 ó 20 minutos.

### **3.3.4.- Influencia de los tensoactivos.**

A fin de determinar el efecto de esta variable sobre el proceso de hidrólisis se efectuaron experiencias utilizando dos sustancias con características tensoactivas; la Glicerina y el Tween 80. A una concentración final de  $10^{-4}$  g/l.

		HCl	115° C.		120° C.	
p/v	V/V	15'	20'	15'	20'	
1/10	0.5	54.78	63.08	90.10	126.90	
	1.0	127.50	103.70	90.10	156.90	
	1.5	150.23	128.50	154.00	185.60	
1/9	0.5	67.82	42.15	77.40	140.10	
	1.0	155.80	114.50	133.30	176.50	
	1.5	148.40	140.40	152.70	170.10	
1/8	0.5	71.29	92.25	110.70	131.20	
	1.0	156.52	137.70	194.40	221.40	
	1.5	185.80	153.09	182.75	195.60	
1/7	0.5	76.36	97.93	108.70	171.20	
	1.0	195.60	131.99	213.30	251.50	
	1.5	208.80	150.50	202.80	253.15	
1/6	0.5	104.63	96.58	101.90	195.80	
	1.0	207.90	161.24	244.50	279.80	
	1.5	266.00	165.20	226.80	293.50	
1/5	0.5	124.80	188.80	188.80	192.00	
	1.0	243.00	246.24	285.12	295.68	
	1.5	293.70	244.20	300.70	410.90	

		H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	115° C.		120° C.	
p/v	V/V	15'	20'	15'	20'	
1/10	0.5	1.00	0.93	0.85	1.39	
	1.0	1.18	1.16	1.02	1.22	
	1.5	1.51	1.75	1.04	0.88	
1/9	0.5	1.27	1.27	1.13	1.50	
	1.0	1.80	1.60	1.68	1.90	
	1.5	1.70	1.70	1.20	1.45	
1/8	0.5	1.27	1.09	1.05	1.73	
	1.0	1.78	1.61	1.70	2.00	
	1.5	2.10	1.66	1.46	1.72	
1/7	0.5	1.21	1.28	1.08	1.66	
	1.0	1.84	2.00	1.60	1.92	
	1.5	2.10	2.22	1.58	2.01	
1/6	0.5	1.70	1.27	1.09	1.00	
	1.0	1.37	1.98	1.52	2.75	
	1.5	2.10	2.49	2.00	2.50	
1/5	0.5	1.42	1.47	1.21	0.93	
	1.0	2.14	2.13	1.63	2.36	
	1.5	3.30	2.67	2.10	2.51	

Tabla (3.3).- Hidrólisis del almidón de patata utilizando ácido clorhídrico y sulfúrico.

Estos tensoactivos se adicionaron a las distintas diluciones de ácido, dejando en contacto durante 5 minutos el almidón con el ácido y el tensoactivo para favorecer la impregnación del mismo.

Transcurrido este tiempo, se procedió a efectuar la hidrólisis, utilizando las condiciones descritas en el apartado (2.4.2.).

Los resultados obtenidos con cada uno de los tensoactivos se muestran en las Tablas 3.4 y 3.5.

### 3.4.- COMPOSICION CUANTITATIVA DE AZUCARES DEL HIDROLIZADO.

Tras determinar las condiciones más favorables entre las experimentadas para la hidrólisis del almidón (Acido clorhídrico al 1.5% v/v, una Relación 1/5 p/v. a 120°C durante 20 minutos a 1.1 atmósferas de sobrepresión). Se procedió a analizar el producto obtenido, con el fin de determinar su composición cuantitativa y cualitativa en azúcares, mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución. (H.P.L.C.).

El producto del hidrolizado se filtró y diluyó hasta 1/20 para facilitar la separación de los azúcares en la cromatografía, evitando así mismo posibles alteraciones en la columna.

Como patrón (externo), se empleó una mezcla de azúcares de concentración conocida.

En la Figura 3.1, se muestra el patrón de azúcares empleado y el cromatograma obtenido con ese patrón.

Las condiciones en que se efectuó la cromatografía se indican en el apartado (2.5.1.).

En la Figura 3.2, se muestran los resultados obtenidos en la cromatografía de la muestra de hidrolizado de almidón de patata.

p/v	V/V	HCl		115° C.		120° C.	
		15'	20'	15'	20'	15'	20'
1/10	0.5	10.00	24.00	18.00	32.00		
	1.0	10.50	34.00	34.00	54.00		
	1.5	60.00	42.00	62.00	63.33		
1/9	0.5	8.00	25.30	29.60	42.22		
	1.0	31.90	35.90	44.33	55.00		
	1.5	75.90	80.00	54.88	78.00		
1/8	0.5	28.25	40.50	38.25	47.25		
	1.0	56.90	47.25	60.75	61.22		
	1.5	77.33	81.00	81.00	81.00		
1/7	0.5	43.71	43.70	41.28	50.00		
	1.0	65.42	58.28	58.28	70.42		
	1.5	87.42	90.00	94.70	94.71		
1/6	0.5	60.00	48.00	60.00	53.33		
	1.0	70.42	72.00	69.33	77.33		
	1.5	90.00	99.57	82.66	119.99		
1/5	0.5	63.00	54.00	61.05	54.31		
	1.0	74.23	81.00	105.00	96.00		
	1.5	92.25	120.00	108.00	132.00		

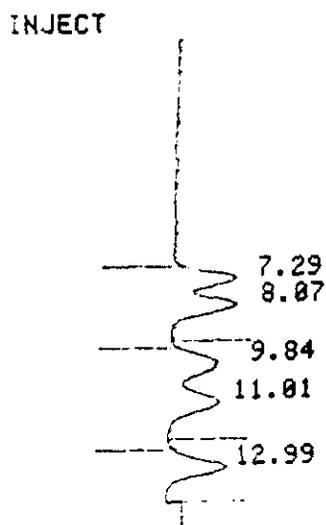
p/v	V/V	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		115° C.		120° C.	
		15'	20'	15'	20'	15'	20'
1/10	0.5	22.00	30.00	40.00	36.00		
	1.0	64.00	45.00	58.00	48.00		
	1.5	70.00	55.00	70.00	58.00		
1/9	0.5	31.66	35.33	21.11	40.00		
	1.0	76.16	50.66	42.25	61.22		
	1.5	107.66	76.00	69.66	67.25		
1/8	0.5	43.25	37.00	40.50	47.25		
	1.0	81.00	54.00	47.25	67.50		
	1.5	112.50	69.66	54.00	84.37		
1/7	0.5	74.25	42.49	41.14	60.71		
	1.0	80.14	72.85	72.85	72.85		
	1.5	120.30	91.07	80.14	80.14		
1/6	0.5	60.00	53.33	42.66	85.33		
	1.0	104.00	93.33	66.66	88.00		
	1.5	154.66	100.00	88.00	100.00		
1/5	0.5	72.00	56.00	60.00	82.50		
	1.0	96.00	96.00	67.50	108.00		
	1.5	162.00	163.00	90.00	126.00		

Tabla (3.4).- Hidrólisis del almidón de patata utilizando Tween 80 como agente humectante, con ácido clorhídrico y sulfúrico.

		115° C.		120° C.	
p/v	V/V	15'	20'	15'	20'
1/10	0.5	18.00	22.00	40.00	36.94
	1.0	35.00	44.00	66.00	60.00
	1.5	48.00	48.80	81.00	80.05
1/9	0.5	19.00	48.57	54.66	44.80
	1.0	37.16	42.22	67.55	66.50
	1.5	46.93	47.28	85.49	84.20
1/8	0.5	20.25	55.99	59.00	58.28
	1.0	39.60	61.87	75.28	65.25
	1.5	50.90	67.50	87.50	90.04
1/7	0.5	33.99	61.22	70.42	69.75
	1.0	50.99	66.78	80.00	74.14
	1.5	64.70	77.42	87.42	99.57
1/6	0.5	35.33	87.00	77.33	103.99
	1.0	56.00	87.30	85.20	104.00
	1.5	73.88	103.33	139.99	107.99
1/5	0.5	40.00	100.00	82.59	100.00
	1.0	78.00	101.50	129.00	121.50
	1.5	90.00	132.20	162.50	175.00

		115° C.		120° C.	
p/v	V/V	15'	20'	15'	20'
1/10	0.5	28.00	32.00	60.00	62.33
	1.0	47.28	42.00	65.00	66.33
	1.5	62.00	48.00	85.49	67.00
1/9	0.5	35.20	36.94	65.00	66.33
	1.0	55.00	50.66	66.37	67.66
	1.5	69.66	63.33	87.75	70.99
1/8	0.5	40.25	61.87	67.50	69.75
	1.0	65.25	65.12	72.85	74.25
	1.5	81.00	87.42	91.07	91.12
1/7	0.5	42.49	70.42	75.28	97.14
	1.0	70.42	75.28	85.49	99.57
	1.5	91.07	92.25	94.03	107.50
1/6	0.5	58.28	72.00	77.33	103.99
	1.0	75.28	77.33	119.99	119.99
	1.5	94.71	115.33	121.99	131.99
1/5	0.5	87.00	99.00	117.00	120.00
	1.0	95.00	99.99	135.00	135.00
	1.5	98.00	135.00	136.00	240.00

Tabla (3.5).- Hidrólisis del almidón de patata utilizando Glicerina como agente humectante, con ácido clorhídrico y sulfúrico.

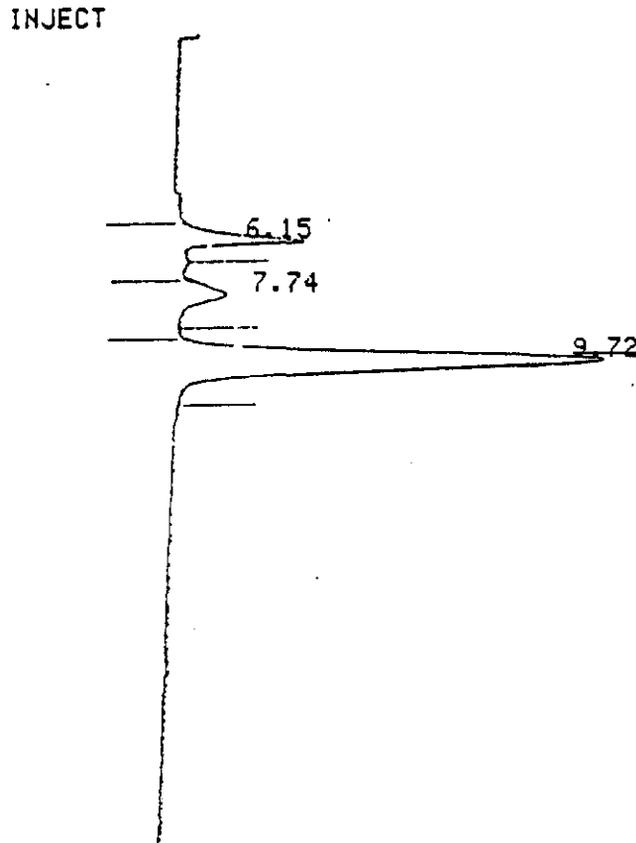


APR. 27, 1988 00:46:32 CHART 0.50 CM/MIN  
 COLUMN RUN #3 SOLVENT CALC #0  
 OPR ID: 5  
 CALIBRATION

PEAK#	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	RF
1	1.00000	7.29		17132432 F	0.583600E-4
2	1.00000	8.07		18915976 L	0.528600E-4
3	1.00000	9.84		19377225 F	0.516000E-4
4	1.00000	11.01		19245088 L	0.519600E-4
5	1.00000	12.99		19603250 L	0.510100E-4

PATRON EXTERNO DE AZUCARES		
TIEMPO DE RETENCION	AZUCAR	CONCENTRACION
<	DP3 y DP4	—
7.29	Maltotriosa	1 gr/l
8.07	Maltosa	1 gr/l
9.84	Glucosa	1 gr/l
11.01	Xilosa	1 gr/l
12.99	Arabinosa	1 gr/l

Figura (3.1).- Patrón externo de azúcares para H.P.L.C, mostrando la separación de los distintos azúcares utilizados en el mismo.



APR. 27, 1988 01:06:42 CHART 0.50 CM/MIN  
 COLUMN RUN #4 SOLVENT CALC #0  
 OPR ID: 5

EXTERNAL STANDARD QUANTITATION

PEAK#	AMOUNT	RT	EXP RT	AREA	RF
UNK		6.15		18590985 L	
2	0.74901	7.74		14169860 L	0.528600E-4
3	7.25192	9.72		140542485 L	0.516000E-4
TOTAL	8.00093				

Figura (3.2).- Cromatograma obtenido a partir del hidrolizado de almidón de patata mostrando tres picos correspondientes a glucosa, maltosa y dextrinas solubles.

### **3.5.- PRESELECCION DE HONGOS FILAMENTOSOS.**

#### **3.5.1.- Hongos Filamentosos capaces de crecer en medios de cultivo con hidrolizado de almidón como fuente de carbono**

Con objeto de efectuar una preselección a partir de distintas estirpes de hongos filamentosos en función de su capacidad de crecimiento sobre hidrolizado de almidón de patata, se diseñaron distintos medios de cultivo sólidos (1 a 4), cuya fuente de carbono era este hidrolizado. La composición de estos se indica en el apartado (2.6).

Cada uno de estos medios fue inoculado con suspensiones de esporas procedentes de las distintas cepas a testar.

Tras un periodo de incubación de 5 días a 28°C en estufa de cultivo, se determinó el crecimiento de cada una de las cepas ensayadas.

Los resultados obtenidos aparecen en la Tabla 3.6.

#### **3.5.2.- Hongos Filamentosos capaces de crecer en medios de cultivo con celulosa y derivados.**

De forma análoga a la expuesta en el apartado anterior, se intentó seleccionar distintas cepas de hongos filamentosos que presentaran buen crecimiento sobre medios de cultivo cuya fuente de carbono fuera celulosa o derivados de la misma.

Con tal fin se diseñaron distintos medios de cultivo sólidos (12 a 20), que fueron inoculados con suspensiones de esporas de las cepas de hongos filamentosos a testar. La composición de los medios se indica en el apartado (2.7)

Tras un periodo de incubación de 15 días a 28°C, se determinó el crecimiento en dichos medios de cultivo.

MEDIOS DE CULTIVO.				
HONGOS FILAMENTOSOS.	1	2	3	4
- <i>Alternaria tenuissima</i> 9005.	+	++	++	++
- <i>Aspergillus alliaceus</i> .	+	++	+++	+++
- <i>Aspergillus awamorii</i> .	+	++	+++	++
- <i>Aspergillus creameus</i> .	+	++	++	++
- <i>Aspergillus fumigatus</i> . A-2.	-	+	++	+
- <i>Aspergillus fumigatus</i> . A-3.	-	-	+	+
- <i>Aspergillus sulfureus</i> .	+	++++	++++	++
- <i>Aspergillus sydowi</i> .	-	++	+++	++
- <i>Aspergillus wentii</i> . A-1.	+	++	+++	++
- <i>Aspergillus wentii</i> . A-4.	-	+++	++++	++
- <i>Chaetomium globosum</i> . 2103.	++	++++	++++	+++
- <i>Talaromyces emersoni</i> . 7117.	-	++	+++	++
- <i>Trichoderma harzianum</i> . 2413.	++	+++	++++	++++
- <i>Trichoderma reesei</i> . 218.	++	++++	++++	++++
- <i>Trichoderma reesei</i> . 2415.	+	+++	++++	+++
- <i>Trichoderma reesei</i> . 2416.	++	++++	++++	++++
- <i>Trichoderma reesei</i> . QM 9414.	++	++++	++++	++++
- <i>Ulocladium atrum</i> . 7339.	-	++	++	++

- Sin Crecimiento.
+ Crecimiento Escaso.
++ Crecimiento Bueno.
+++ Crecimiento Muy Bueno.
++++ Crecimiento Excelente.

Tabla (3.6).- Crecimiento de distintos hongos filamentosos en medios de cultivo que contienen hidrolizado de almidón como fuente de carbono.

En la Tabla 3.7, aparecen los resultados obtenidos para cada medio de cultivo.

### 3.6.- EFECTO DE LOS TENSOACTIVOS EN EL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE HONGOS FILAMENTOSOS.

Para estudiar el comportamiento de las cepas de hongos celulolíticos seleccionados frente a concentraciones crecientes de tensoactivos, se efectuaron distintas experiencias, en ellas, se utilizaron concentraciones de Glicerina y de Tween 80 desde  $10^{-1}$ . hasta  $10^{-4}$ . g/l; que se añadieron a los medios de cultivo n<sup>o</sup> 2, 3 y 4.

Los medios de cultivo fueron inoculados con una suspensión de esporas. Como control de crecimiento se utilizaron los mismos medios de cultivo sin la adición de tensoactivos.

Los medios de cultivo, fueron incubados durante 5 días a 28<sup>o</sup>C en estufa de cultivo. Los resultados que se obtuvieron, se muestran en las Tablas 3.8.1, 3.8.2, y 3.8.3.

### 3.7.- ESTUDIO DE DISTINTOS PARAMETROS EN LA SELECCION DE HONGOS FILAMENTOSOS.

Bajo este epígrafe, se abordó uno de los aspectos más importantes en la elaboración del presente trabajo. La determinación de los parámetros que permitieron la cuantificación del comportamiento de las cepas de hongos filamentosos seleccionados en los medios de cultivo diseñados.

Todos los estudios fueron realizados en batch, unos en matraces de 250 ml. y otros en fermentador, dependiendo de las características de los parámetros a determinar así como de la complejidad de los mismos.

HONGOS FILAMENTOSOS.	MEDIOS DE CULTIVO.								
	12	13	14	15	16	17	18	19	20
- <i>Alternaria tenuissima</i> 9005	+++	++	++	++	-	+	-	+	+++
- <i>Aspergillus alliaceus</i>	+	++	++	+++	+++	++	++	++	+
- <i>Aspergillus awamori</i>	++	++	++	+++	++++	++++	+++	++++	++++
- <i>Aspergillus cretensis</i>	+	+	++	+++	+	-	+	+	+
- <i>Aspergillus fumigatus</i> A-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- <i>Aspergillus fumigatus</i> A-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- <i>Aspergillus sulfureus</i>	+	+	-	+++	++	+	+	++	++
- <i>Aspergillus sydowii</i>	-	+	++	+++	++	+	+++	+++	+++
- <i>Aspergillus wentii</i> A-1	-	++	++	+++	++++	+++	++	+++	+++
- <i>Aspergillus wentii</i> A-4	-	+	+	++	++	++	++	++	++
- <i>Chaetomium globosum</i> 2103	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++	+++	+++
- <i>Talaromyces emersoni</i> 7117	++	++	++	++	-	+	-	+	-
- <i>Trichoderma harzianum</i> 2413	+	+++	+++	++++	++++	++	++	+++	+++
- <i>Trichoderma reesei</i> 218	+	++	++	+++	+++	+	+	++	+++
- <i>Trichoderma reesei</i> 2415	++	++	++	++++	++++	++++	++	++++	++++
- <i>Trichoderma reesei</i> 2416	++	++	+++	+++	+++	++++	++	+++	+++
- <i>Trichoderma reesei</i> QM 9414	+++	+++	++++	++++	+++	++++	++	++++	++++
- <i>Ulocladium atrum</i> 7339	++	++	++	+++	++	++	+++	+++	+++

- Sin Crecimiento.  
+ Crecimiento Escaso.  
++ Crecimiento Bueno.  
+++ Crecimiento Muy Bueno.  
++++ Crecimiento Excelente.

Tabla (3.7).- Crecimiento de distintos hongos filamentosos sobre medios de cultivo que contienen celulosa o derivados de esta como fuente de carbono.

MEDIO DE CULTIVO Nº 2 (HIDROLIZADO + SALES MINERALES)										
HONGOS FILAMENTOSOS	GLICERINA					TWEEN 80				
	10-1	10-2	10-3	10-4	C <sup>1</sup>	10-1	10-2	10-3	10-4	C
	g/l.					g/l.				
<i>Chaetomium globosum</i> 2103	+	+	+	+	o	*	*	*	*	o
<i>Trichoderma harzianum</i> 2413	+	+	+	+	o	+	*	*	*	o
<i>Trichoderma reesei</i> 2415	+	+	+	+	o	+	*	*	*	o
<i>Trichoderma reesei</i> 2416	+/-	+/-	+/-	+/-	o	+/-	+/-	+/-	+/-	o
<i>Trichoderma reesei</i> QM 9414	+	+	+	+	o	+	*	*	*	o

Tabla (3.8.1).- Crecimiento de distintos hongos filamentosos en el medio de cultivo nº2 tras la incorporación al mismo de distintas concentraciones de Tween 80 o Glicerina.

MEDIO DE CULTIVO Nº 3 (HIDROLIZADO + SALES MINERALES + PEPTONA)										
HONGOS FILAMENTOSOS	GLICERINA					TWEEN 80				
	10-1	10-2	10-3	10-4	C	10-1	10-2	10-3	10-4	C
	g/l.					g/l.				
<i>Chaetomium globosum</i> 2103	+	+	*	*	o	*	*	*	*	o
<i>Trichoderma harzianum</i> 2413	*	*	*	*	o	*	*	*	*	o
<i>Trichoderma reesei</i> 2415	*	*	*	*	o	*	*	*	*	o
<i>Trichoderma reesei</i> 2416	+/-	+/-	*	*	o	+/-	+/-	*	*	o
<i>Trichoderma reesei</i> QM 9414	*	*	*	*	o	*	*	*	*	o

Tabla (3.8.2).- Crecimiento de distintos hongos filamentosos en el medio de cultivo nº3 tras la incorporación al mismo de distintas concentraciones de Tween 80 o Glicerina.

<sup>1</sup>Como control se utilizan los mismos medios de cultivo sin añadir ni Tween 80 ni glicerina.

MEDIO DE CULTIVO Nº 4 (HIDROLIZADO + PEPTONA)										
HONGOS FILAMENTOSOS	GLICERINA					TWEEN 80				
	10-1	10-2	10-3	10-4	C	10-1	10-2	10-3	10-4	C
	g/l.					g/l.				
<i>Chaetomium globosum</i> 2103	+	+	*	*	o	+	+	*	*	o
<i>Trichoderma harzianum</i> 2413	+	*	*	*	o	+	*	*	*	o
<i>Trichoderma reesei</i> 2415	+	*	*	*	o	*	*	*	*	o
<i>Trichoderma reesei</i> 2416	+/-	+/-	*	*	o	+/-	+/-	*	*	o
<i>Trichoderma reesei</i> QM 9414	+	*	*	*	o	*	*	*	*	o

Tabla (3.8.3).- Crecimiento de distintos hongos filamentosos sobre el medio de cultivo nº3 tras la incorporación al mismo de distintas concentraciones de Tween 80 o Glicerina.

o : Crecimiento normal.  
 +/-: Estimulación baja de crecimiento.  
 + : Estimulación moderada de crecimiento.  
 \* : Estimulación alta de crecimiento.

### 3.7.1.- Calibración de Inóculos.

Los inóculos que se precisaron en este trabajo, se obtuvieron en su mayor parte a partir de suspensiones de conidiosporas en suero salino al 0.9%, resultando éstas de más fácil manejo que cuando se empleó micelio como agente inoculador.

La preparación, así como el mantenimiento de las suspensiones de esporas se describe en el apartado (2.9.2).

Para calcular el contenido exacto de esporas del inóculo, y estandarizar así el tamaño del mismo, se efectuaron diluciones sucesivas de conidiosporas en suero salino midiendo la densidad óptica de las mismas y efectuando un recuento directo del número de esporas en cámara cuentaglóbulos.

De esta forma, los valores así obtenidos se ajustaron por mínimos cuadrados, obteniendo rectas de regresión que permitieron establecer una Relación entre el número de esporas y la densidad óptica de una suspensión de las mismas.

Las ecuaciones de rectas de regresión obtenidas aparecen en la Tabla 3.9, al representar gráficamente estas rectas, se observó una zona común entre las mismas al rededor de un valor de densidad óptica de 0.522, equivalente a un valor promedio entre todas las cepas de hongos filamentosos de  $X = 7.14 \times 10^5$  esp/ml, con una  $\sigma = 36,535$  esp/ml.

En función de los resultados obtenidos, se decidió estandarizar la densidad óptica del inóculo para todas las cepas a 0.522, trabajando con un error del 5.11% en el cálculo del número de esporas.

HONGO FILAMENTOSO	A	B	r
<i>Ch. globosum</i> 2103	294585	785924	0.993
<i>T. harzianum</i> 2413	369843	710798	0.994
<i>T. reesei</i> 2414	326007	653072	0.998
<i>T. reesei</i> 2415	218841	1036841	0.978
<i>T. reesei</i> QM 9414	17036	1191911	0.990

Tabla (3.9).- Coeficientes de las ecuaciones de correlación correspondientes a las suspensiones de esporas de los distintos hongos filamentosos ensayados.

$$y = Bx + A$$

donde

- A: Ordenada en el origen
- B: Pendiente de la recta
- r: Coeficiente de correlación

### **3.7.2.- Estudio del Contenido de Nitrógeno y Carbono Orgánico del Medio de Cultivo.**

#### **3.7.2.1.- Contenido en Nitrógeno orgánico.**

El objetivo de este punto del trabajo fue la optimización de un medio de cultivo que proporcionara un elevado rendimiento en la producción de biomasa de las cepas de hongos filamentosos previamente seleccionadas.

Con tal fin, y partiendo de medios de cultivo (con base de hidrolizado de almidón de patata), que proporcionaron buen crecimiento en la selección de las cepas, se les incorporaron concentraciones crecientes de peptona o de una mezcla de L-aminoácidos según se indica en el apartado (2.7).

Tras su inoculación, los medios de cultivo fueron incubados durante 48 horas en agitación orbital a 250 r.p.m. a 28°C.

Transcurrido este tiempo, se efectuaron determinaciones de biomasa y de consumo de azúcares reductores.

Los resultados que se obtuvieron aparecen indicados en las Tablas 3.10.1 a 3.14.4.

#### **3.7.2.2.- Contenido en Carbono Orgánico.**

El parámetro que se determinó a continuación fue la concentración idónea de fuente de carbono (Hidrolizado de Almidón) que permitiera obtener una elevada producción de biomasa fúngica.

Se emplearon dos concentraciones de hidrolizado de almidón: 6 y 12 g/l, permaneciendo constante en ambos casos la concentración de la fuente de nitrógeno orgánico a 2.5 g/l, seleccionada en el apartado anterior.

MEDIO BASE: HIDROLIZADO + SALES MINERALES		
PEPTONA (g/l.)	AZUCARES CONSUMIDOS (g/l.)	BIOMASA (g/l.)
0.00	1.50	1.39
0.50	1.70	0.66
1.00	1.80	1.13
1.50	1.80	1.26
2.00	1.90	1.59
2.50	1.90	1.59

Tabla (3.10.1).- Comportamiento de *Chaetomium globosum* 2103 en medios de cultivo con peptona como fuente de nitrógeno orgánica

MEDIO BASE: HIDROLIZADO		
PEPTONA (g/l.)	AZUCARES CONSUMIDOS (g/l.)	BIOMASA (g/l.)
0.00	0.00	---
0.50	1.90	1.59
1.00	1.50	1.73
1.50	2.50	2.19
2.00	2.70	2.26
2.50	3.00	2.39

Tabla (3.10.2).- Comportamiento de *Chaetomium globosum* 2103 en medios de cultivo con peptona como fuente de nitrógeno orgánica.

MEDIO BASE: HIDROLIZADO + SALES MINERALES		
AMINOACIDOS (g/l.)	AZUCARES CONSUMIDOS (g/l.)	BIOMASA (g/l.)
0.00	1.50	1.39
0.50	3.30	1.33
1.00	3.00	1.33
1.50	3.00	1.42
2.00	3.00	1.50
2.50	3.00	1.60

Tabla (3.10.3).- Comportamiento de *Chaetomium globosum* 2103 en medios de cultivo con aminoácidos como fuente de nitrógeno orgánico.

MEDIO BASE: HIDROLIZADO		
AMINOACIDOS (g/l.)	AZUCARES CONSUMIDOS (g/l.)	BIOMASA (g/l.)
0.00	0.00	---
0.50	1.80	2.56
1.00	1.80	2.93
1.50	3.10	2.99
2.00	1.80	3.13
2.50	1.80	4.19

Tabla (3.10.4).- Comportamiento de *Chaetomium globosum* 2103 en medios de cultivo con aminoácidos como fuente de nitrógeno orgánico.

MEDIO BASE: HIDROLIZADO + SALES MINERALES		
PEPTONA (g/l.)	AZUCARES CONSUMIDOS (g/l.)	BIOMASA (g/l.)
0.00	4.05	1.60
0.50	5.50	2.66
1.00	5.50	2.75
1.50	5.50	2.86
2.00	5.50	2.90
2.50	5.80	3.15

Tabla (3.11.1).- Comportamiento de *Trichoderma harzianum* 2413 en medios de cultivo con peptona como fuente de nitrógeno orgánica.

MEDIO BASE: HIDROLIZADO		
PEPTONA (g/l.)	AZUCARES CONSUMIDOS (g/l.)	BIOMASA (g/l.)
0.00	0.00	---
0.50	1.30	1.26
1.00	1.80	1.33
1.50	2.10	1.33
2.00	2.70	1.33
2.50	3.00	1.90

Tabla (3.11.2).- Comportamiento de *Trichoderma harzianum* 2413 en medios de cultivo con peptona como fuente de nitrógeno orgánico.

MEDIO BASE: HIDROLIZADO + SALES MINERALES		
AMINOACIDOS (g/l.)	AZUCARES CONSUMIDOS (g/l.)	BIOMASA (g/l.)
0.00	4.05	1.60
0.50	5.60	2.50
1.00	5.38	2.40
1.50	5.65	2.70
2.00	5.70	2.93
2.50	5.65	3.06

Tabla (3.11.3).- Comportamiento de *Trichoderma harzianun* 2413 en medios de cultivo con aminoácidos como fuente de nitrógeno orgánico.

MEDIO BASE: HIDROLIZADO		
AMINOACIDOS (g/l.)	AZUCARES CONSUMIDOS (g/l.)	BIOMASA (g/l.)
0.00	0.00	---
0.50	4.10	2.20
1.00	4.30	2.60
1.50	4.30	2.90
2.00	4.50	3.66
2.50	5.00	4.13

Tabla (3.11.4).- Comportamiento de *Trichoderma harzianun* 2413 en medios de cultivo con peptona como fuente de nitrógeno orgánico.

MEDIO BASE: HIDROLIZADO + SALES MINERALES		
PEPTONA (g/l.)	AZUCARES CONSUMIDOS (g/l.)	BIOMASA (g/l.)
0.00	4.10	1.53
0.50	5.10	1.60
1.00	5.50	1.70
1.50	5.50	1.80
2.00	5.60	2.00
2.50	5.60	2.10

Tabla (3.12.1).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* 2415 en medios de cultivo con peptona como fuente de nitrógeno orgánico.

MEDIO BASE: HIDROLIZADO		
PEPTONA (g/l.)	AZUCARES CONSUMIDOS (g/l.)	BIOMASA (g/l.)
0.00	0.00	---
0.50	3.30	2.20
1.00	3.60	1.90
1.50	4.30	2.30
2.00	4.40	2.60
2.50	5.50	3.00

Tabla (3.12.2).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* 2415 en medios de cultivo con peptona como fuente de nitrógeno orgánico.

MEDIO BASE: HIDROLIZADO + SALES MINERALES		
AMINOACIDOS (g/l.)	AZUCARES CONSUMIDOS (g/l.)	BIOMASA (g/l.)
0.00	4.10	1.30
0.50	4.51	1.46
1.00	4.40	1.13
1.50	4.25	1.93
2.00	4.10	2.33
2.50	4.40	3.00

Tabla (3.12.3).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* 2415 en medios de cultivo con aminoácidos como fuente de nitrógeno orgánico.

MEDIO BASE: HIDROLIZADO		
AMINOACIDOS (g/l.)	AZUCARES CONSUMIDOS (g/l.)	BIOMASA (g/l.)
0.00	0.00	---
0.50	1.70	1.66
1.00	2.10	1.80
1.50	1.70	2.20
2.00	1.90	2.60
2.50	2.15	2.70

Tabla (3.12.4).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* 2415 en medios de cultivo con aminoácidos como fuente de nitrógeno orgánico.

MEDIO BASE: HIDROLIZADO + SALES MINERALES		
PEPTONA (g/l.)	AZUCARES CONSUMIDOS (g/l.)	BIOMASA (g/l.)
0.00	0.55	0.33
0.50	3.60	1.00
1.00	3.50	1.15
1.50	3.60	1.15
2.00	3.70	1.18
2.50	3.70	1.40

Tabla (3.13.1).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* 2416 en medios de cultivo con peptona como fuente de nitrógeno orgánico.

MEDIO BASE: HIDROLIZADO		
PEPTONA (g/l.)	AZUCARES CONSUMIDOS (g/l.)	BIOMASA (g/l.)
0.00	0.00	---
0.50	1.90	1.30
1.00	2.10	1.29
1.50	2.30	1.34
2.00	2.30	1.51
2.50	2.20	1.67

Tabla (3.13.2).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* 2416 en medios de cultivo con peptona como fuente de nitrógeno orgánico.

MEDIO BASE: HIDROLIZADO + SALES MINERALES		
AMINOACIDOS (g/l.)	AZUCARES CONSUMIDOS (g/l.)	BIOMASA (g/l.)
0.00	0.55	0.33
0.50	0.59	0.53
1.00	0.64	0.46
1.50	0.60	0.46
2.00	0.60	0.50
2.50	0.64	0.60

Tabla (3.13.3).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* 2416 en medios de cultivo con aminoácidos como fuente de nitrógeno orgánico.

MEDIO BASE: HIDROLIZADO		
AMINOACIDOS (g/l.)	AZUCARES CONSUMIDOS (g/l.)	BIOMASA (g/l.)
0.00	0.00	---
0.50	0.64	0.13
1.00	0.59	0.26
1.50	0.60	0.60
2.00	0.60	0.66
2.50	0.60	1.06

Tabla (3.13.4).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* 2416 en medios de cultivo con aminoácidos como fuente de nitrógeno orgánico.

MEDIO BASE: HIDROLIZADO + SALES MINERALES		
PEPTONA (g/l.)	AZUCARES CONSUMIDOS (g/l.)	BIOMASA (g/l.)
0.00	4.00	2.90
0.50	3.90	2.10
1.00	5.90	3.20
1.50	5.80	3.30
2.00	5.80	3.60
2.50	5.80	4.00

Tabla (3.14.1).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* QM 9414 en medios de cultivo con peptona como fuente de nitrógeno orgánico.

MEDIO BASE: HIDROLIZADO		
PEPTONA (g/l.)	AZUCARES CONSUMIDOS (g/l.)	BIOMASA (g/l.)
0.00	0.00	---
0.50	3.30	1.53
1.00	3.00	2.39
1.50	3.60	2.46
2.00	3.60	3.13
2.50	3.30	2.46

Tabla (3.14.2).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* QM 9414 en medios de cultivo con peptona como fuente de nitrógeno orgánico.

MEDIO BASE: HIDROLIZADO + SALES MINERALES		
AMINOACIDOS (g/l.)	AZUCARES CONSUMIDOS (g/l.)	BIOMASA (g/l.)
0.00	4.00	2.90
0.50	5.95	3.06
1.00	5.97	3.50
1.50	5.97	3.60
2.00	5.97	3.86
2.50	5.98	4.00

Tabla (3.14.3).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* QM 9414 en medios de cultivo con aminoácidos como fuente de nitrógeno orgánico.

MEDIO BASE: HIDROLIZADO		
AMINOACIDOS (g/l.)	AZUCARES CONSUMIDOS (g/l.)	BIOMASA (g/l.)
0.00	0.00	---
0.50	4.60	1.60
1.00	4.70	3.00
1.50	4.70	3.20
2.00	5.00	3.40
2.50	5.20	3.50

Tabla (3.14.4).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* QM 9414 en medios de cultivo con aminoácidos como fuente de nitrógeno orgánico.

Como control se empleó el medio de cultivo n° 2 que carecía de fuente de nitrógeno orgánica.

Los medios de cultivo fueron inoculados y mantenidos en agitación orbital durante 48 horas en las condiciones descritas en el apartado (2.11.1).

Se extrajeron muestras de 5 ml. a intervalos de 4 horas, determinando en ellas: pH, azúcares reductores y proteínas, de esta forma, se efectuó el seguimiento de todo el proceso.

Los resultados que se obtuvieron se muestran en las Tablas 3.15 a 3.54, y la evolución del proceso se muestra en las Figuras 3.3 a 3.42.

### **3.7.3.- Selección de cepas de Hongos Filamentosos en función de la velocidad de asimilación de la Fuente de Carbono.**

Con objeto de seleccionar los hongos filamentosos que agotaran la fuente de carbono con mayor velocidad y proporcionaran niveles aceptables de biomasa, se utilizó el estudio reseñado en el apartado (3.7.2).

Con estos datos se calculó la cantidad de biomasa así como el consumo de la fuente de carbono para cada medio de cultivo durante el tiempo de fermentación.

En las Tablas 3.55 a 3.59, aparecen los resultados que se obtuvieron.

### **3.8.- FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ASIMILACION DE LA FUENTE DE CARBONO POR EL HONGO FILAMENTOSO TRICHODERMA REESEI QM 9414.**

Bajo este epígrafe se incluyen los estudios fisiológicos realizados con *T. reesei* QM 9414 en los procesos de mejora de las condiciones para la asimilación de la fuente de carbono y la

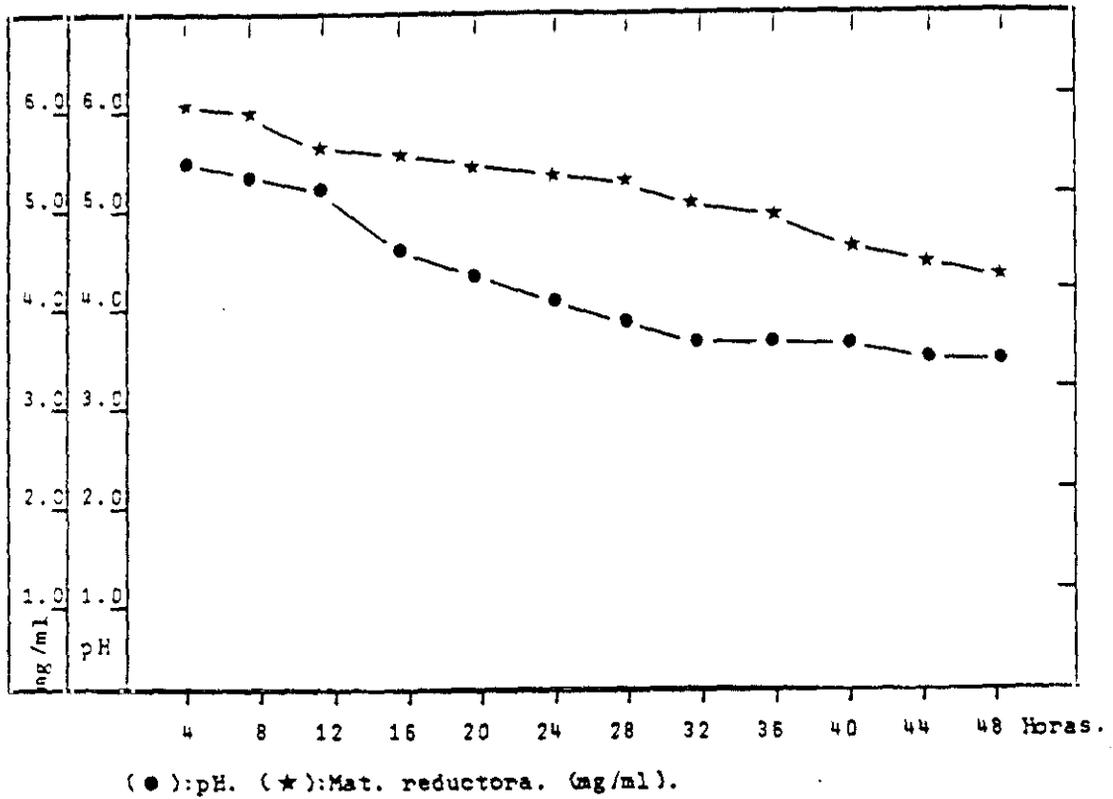


Figura (3.15).- Comportamiento de *Chaetomium globosum* 2103 en el medio de cultivo nº 2 (Hidrolizado + Sales Minerales).

Tabla (3.3).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	5.5	
4	0.00	5.4	
8	1.66	5.3	
12	6.66	5.2	
16	8.33	4.6	
20	10.00	4.3	
24	11.66	4.1	
28	13.33	3.9	
32	15.00	3.6	
36	16.66	3.6	
40	21.66	3.6	
44	23.33	3.5	
48	25.00	3.5	0.54

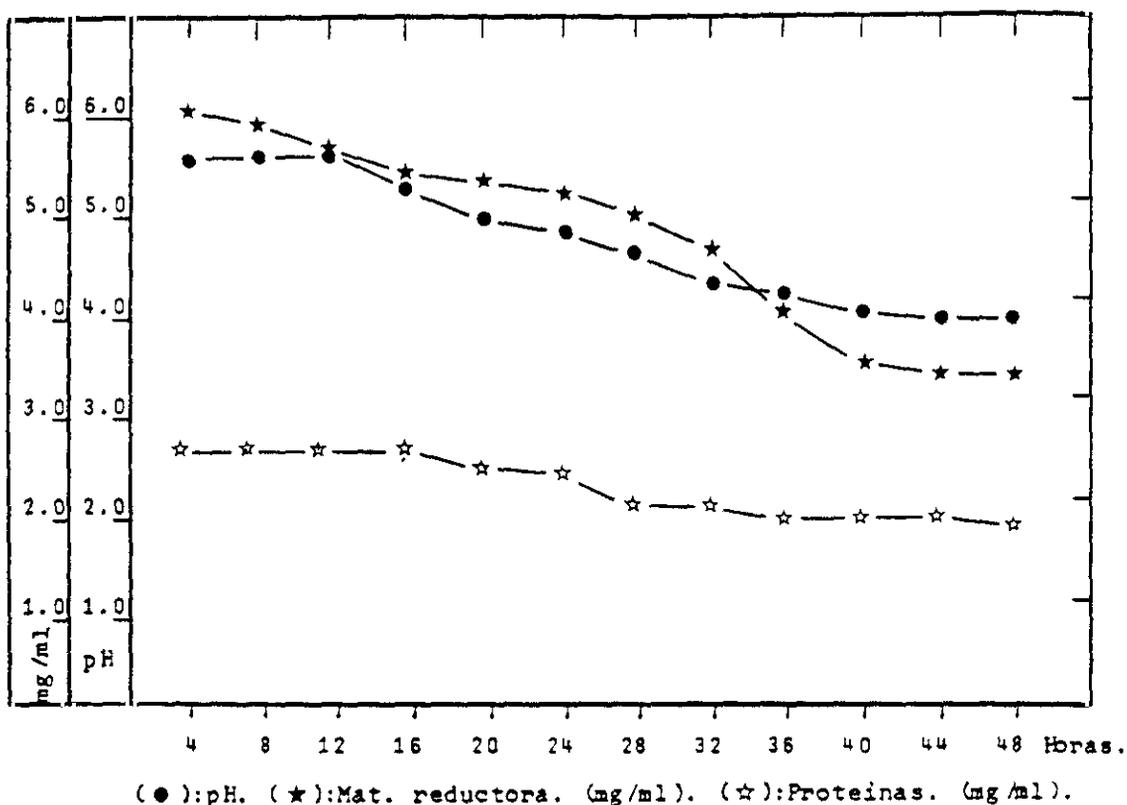


Figura (3.16).- Comportamiento de *Chaetomium globosum* 2103 en el medio de cultivo n° 3 (Hidrolizado + Sales Minerales + Peptona).

Tabla (3.4).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	PROTEINA CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	0.00	5.5	
4	0.00	0.00	5.5	
8	5.00	0.00	5.5	
12	8.33	0.00	5.5	
16	10.00	0.00	5.2	
20	11.66	4.00	5.0	
24	13.33	8.00	4.9	
28	16.66	16.00	4.7	
32	21.66	20.00	4.3	
36	31.66	20.00	4.2	
40	41.66	20.00	4.1	
44	43.33	24.00	4.0	
48	43.33	24.00	4.0	1.96

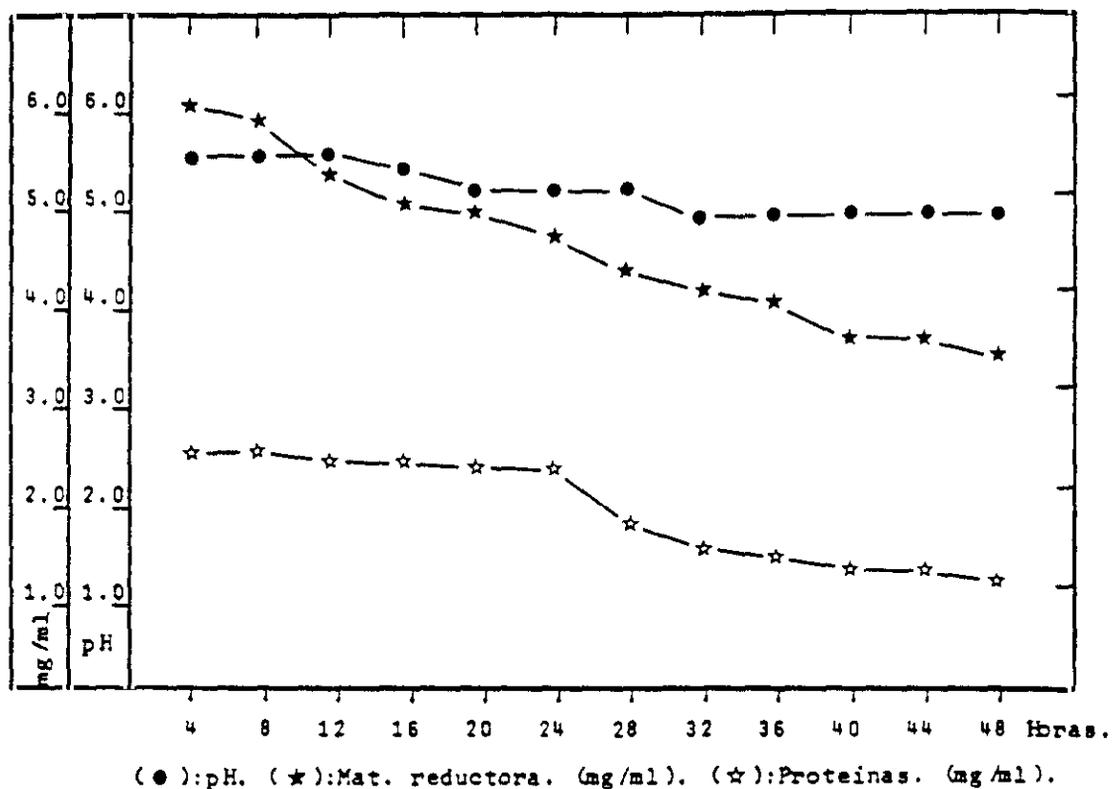


Figura (3.17).- Comportamiento de *Chaetomium globosum* 2103 en el medio de cultivo n° 4 (Hidrolizado + Peptona).

Tabla (3.5).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	PROTEINA CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	0.00	5.5	
4	0.00	0.00	5.5	
8	1.66	0.00	5.5	
12	11.66	4.00	5.5	
16	15.00	4.00	5.4	
20	16.66	8.00	5.2	
24	21.66	8.00	5.2	
28	26.66	28.00	5.2	
32	30.00	40.00	5.0	
36	31.66	44.00	5.0	
40	36.66	48.00	5.0	
44	36.66	48.00	5.0	
48	38.33	52.00	5.0	2.35

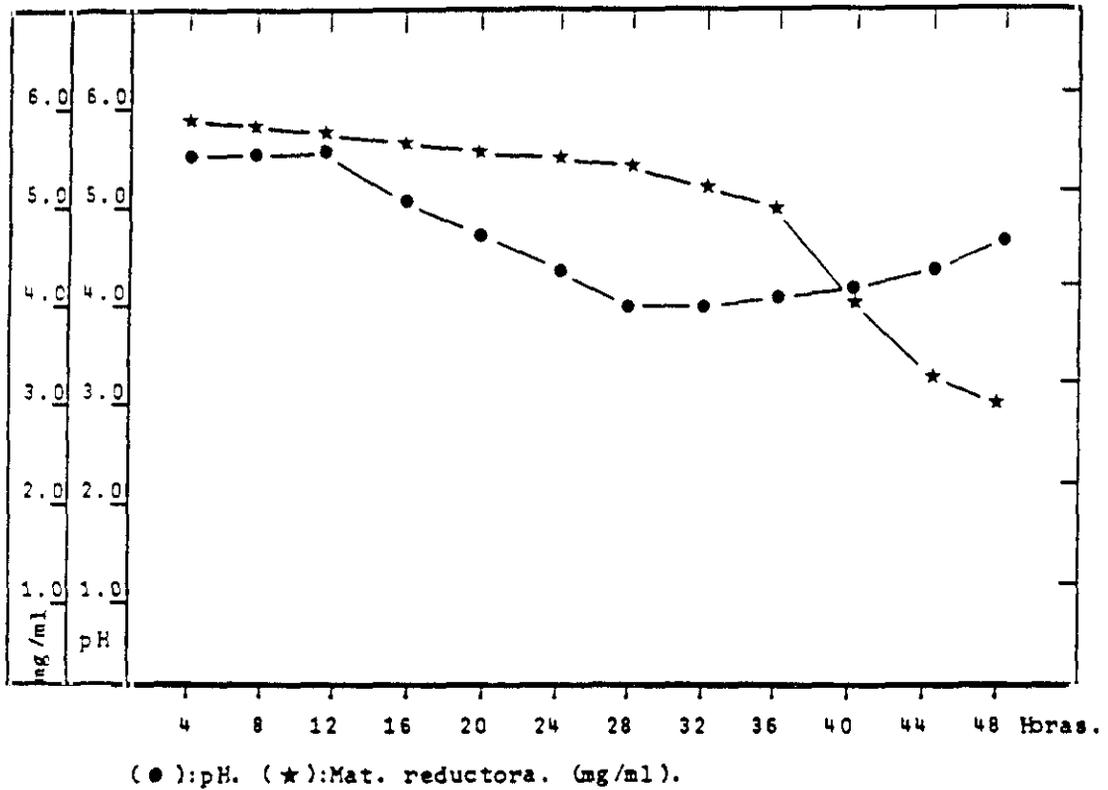


Figura (3.18).- Comportamiento de *Chaetomium globosum* 2103 en el medio de cultivo nº 5 (Hidrolizado + Sales Minerales + Aminoácidos).

Tabla (3.6).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	5.5	
4	3.33	5.5	
8	5.00	5.5	
12	6.66	5.5	
16	8.33	5.1	
20	10.00	4.8	
24	11.66	4.4	
28	13.33	4.0	
32	18.33	4.0	
36	21.66	4.1	
40	36.66	4.2	
44	50.00	4.4	
48	53.33	4.7	3.15

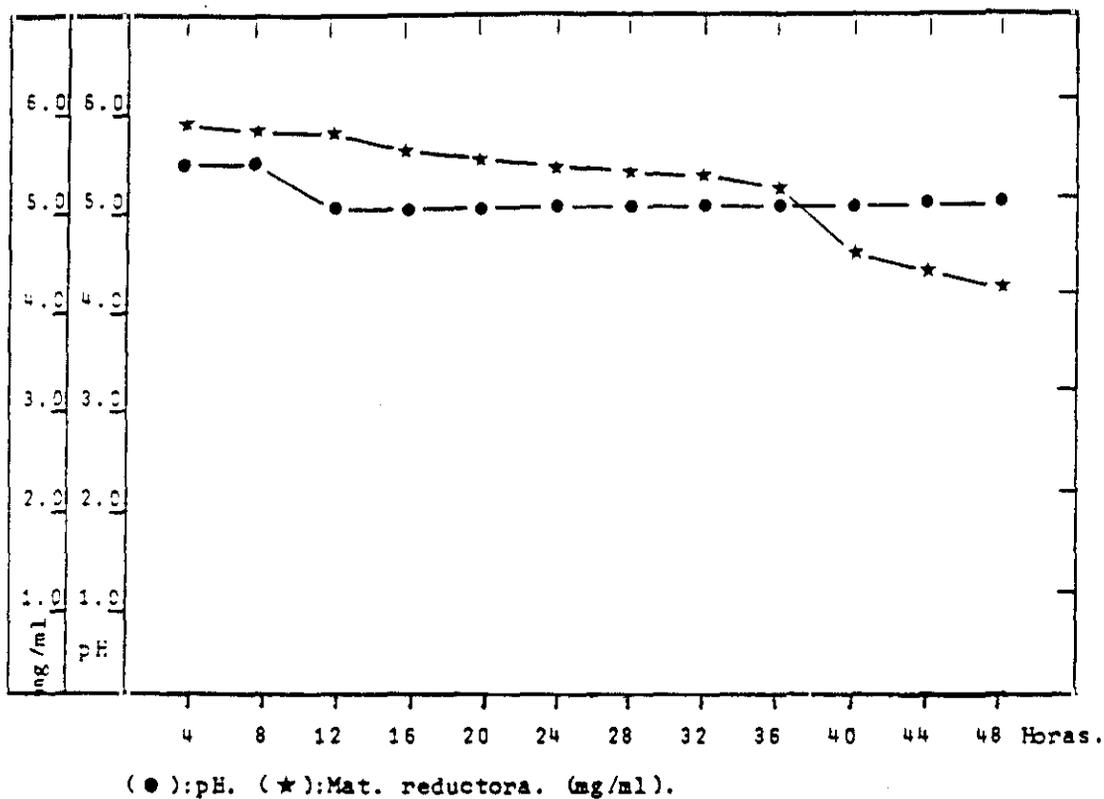


Figura (3.19).- Comportamiento de *Chaetomium globosum* 2103 en el medio de cultivo nº 6 (Hidrolizado + Aminoácidos).

Tabla (3.7).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	5.5	
4	3.33	5.5	
8	5.00	5.5	
12	6.66	5.5	
16	8.33	5.0	
20	10.00	5.0	
24	11.66	5.0	
28	13.33	5.0	
32	15.00	5.0	
36	16.66	5.0	
40	25.00	5.0	
44	28.33	5.0	
48	31.66	5.0	1.89

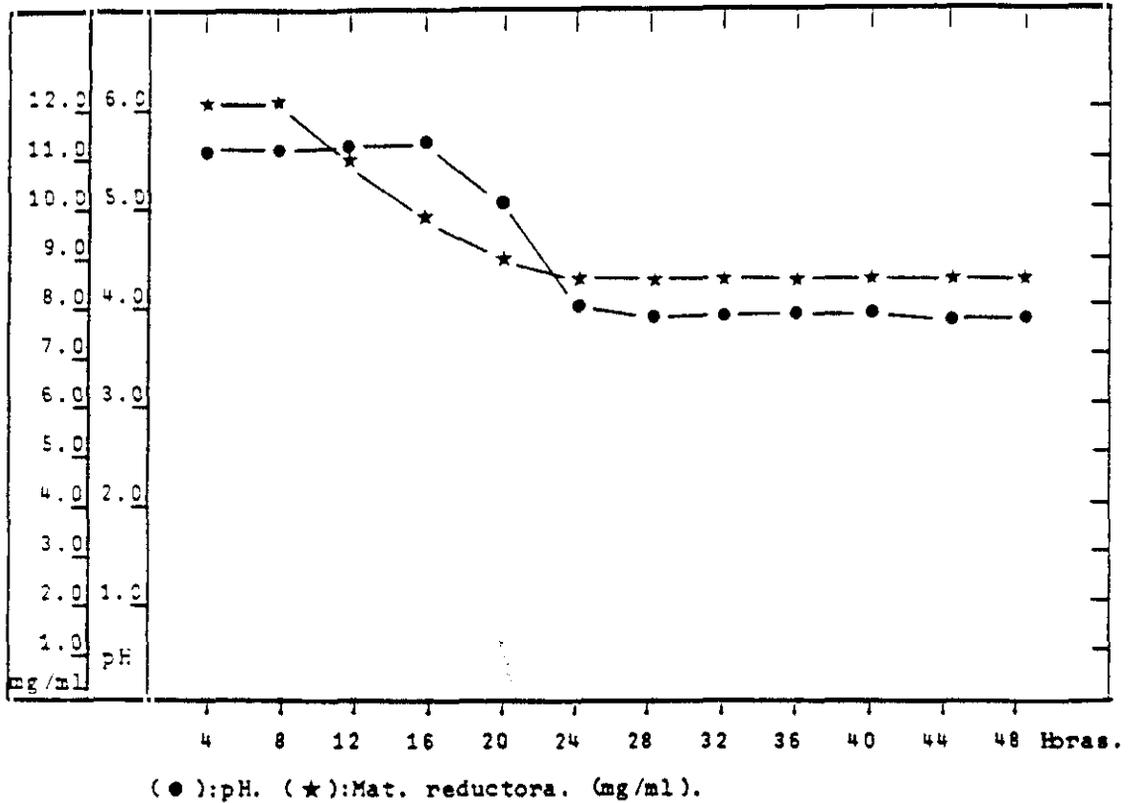
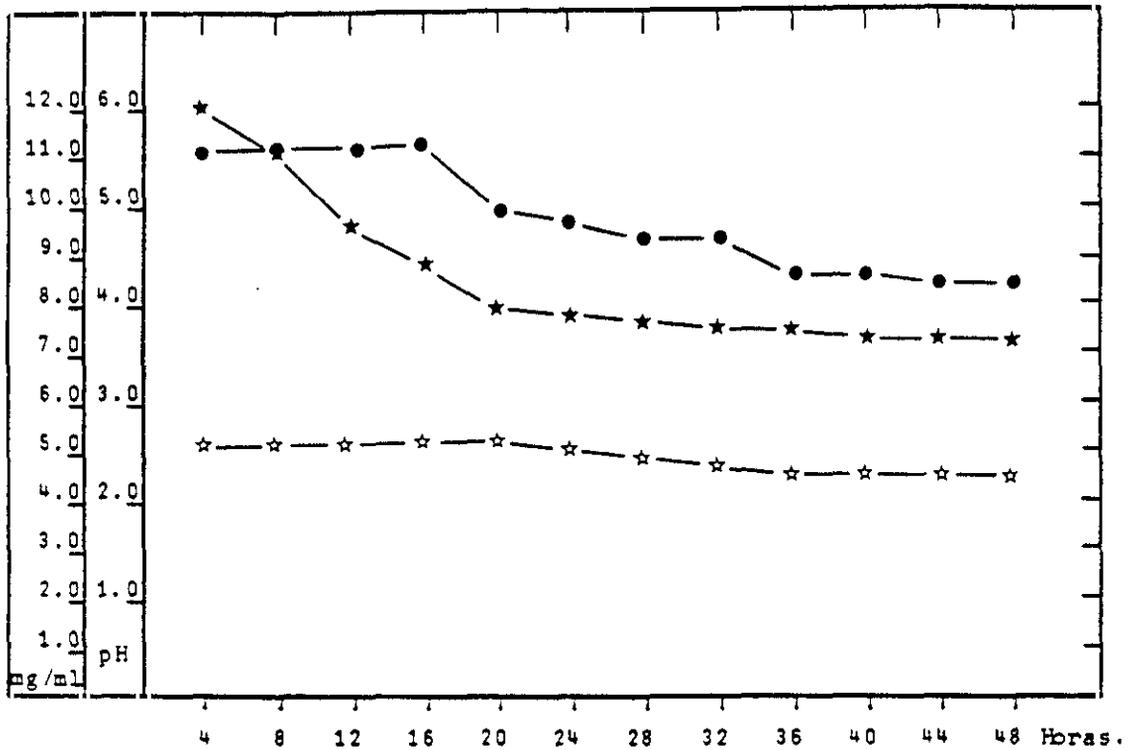


Figura (3.20).- Comportamiento de *Chaetomium globosum* 2103 en el medio de cultivo n° 7 (2 x Hidrolizado + Sales Minerales).

Tabla (3.8).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	PH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	5.5	
4	0.00	5.5	
8	0.00	5.5	
12	8.33	5.5	
16	17.50	5.5	
20	25.00	5.1	
24	27.50	4.1	
28	28.33	3.9	
32	28.33	3.9	
36	28.33	3.9	
40	28.33	3.8	
44	28.33	3.7	
48	28.33	3.7	0.66



(●):pH. (★):Mat. reductora. (mg/ml). (☆):Proteínas. (mg/ml).

Figura (3.21).- Comportamiento de *Chaetomium globosum* 2103 en el medio de cultivo n° 8 (2 x Hidrolizado + Sales Minerales + Peptona).

Tabla (3.9).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	PROTEINA CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	0.00	5.5	
4	0.00	0.00	5.5	
8	8.33	0.00	5.5	
12	20.00	0.00	5.5	
16	25.00	0.00	5.5	
20	32.50	0.00	5.0	
24	33.33	4.00	4.8	
28	34.16	8.00	4.7	
32	35.00	12.00	4.7	
36	35.83	16.00	4.4	
40	36.66	16.00	4.2	
44	36.66	16.00	4.2	
48	36.66	16.00	4.2	0.96

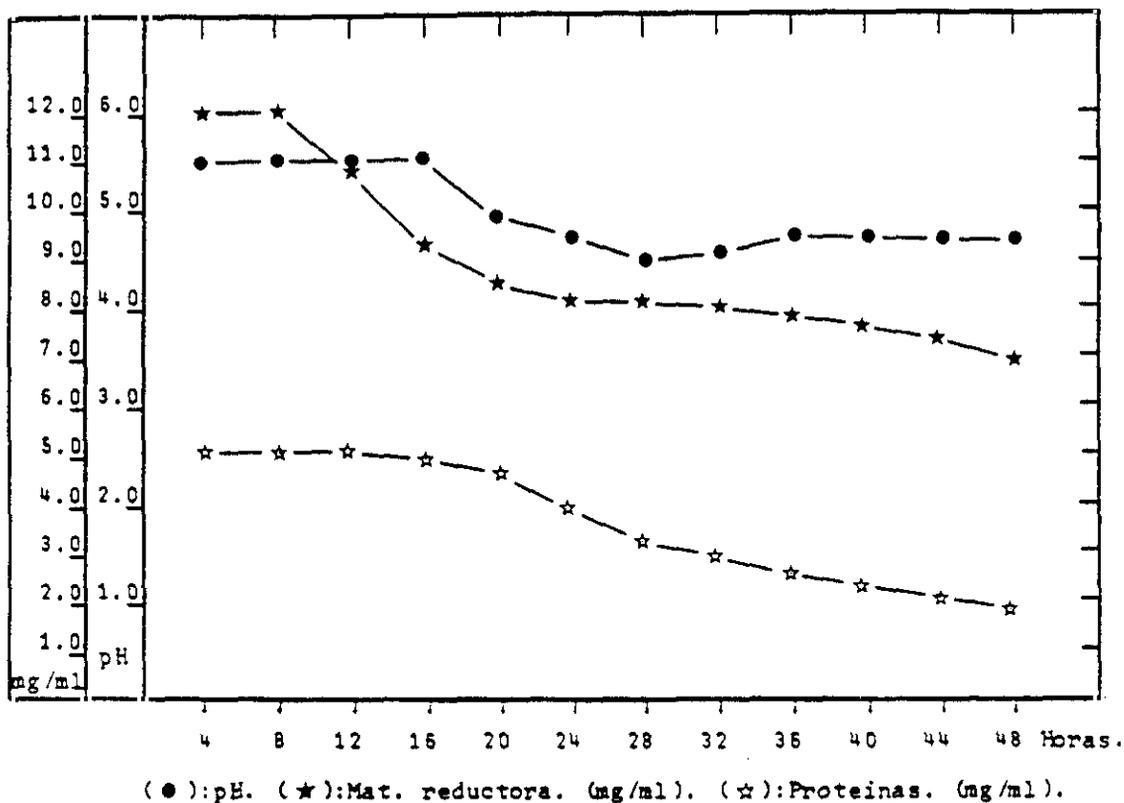


Figura (3.22).- Comportamiento de *Chaetomium globosum* 2103 en el medio de cultivo n<sup>o</sup> 9 (2 x Hidrolizado + Peptona).

Tabla (2.10).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	PROTEINA CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	0.00	5.5	
4	0.00	0.00	5.5	
8	0.00	0.00	5.5	
12	10.00	0.00	5.5	
16	23.33	8.00	5.5	
20	28.33	12.00	5.0	
24	30.83	20.00	4.8	
28	31.16	28.00	4.6	
32	32.49	32.00	4.7	
36	34.16	40.00	4.9	
40	35.83	44.00	4.9	
44	37.49	48.00	4.9	
48	41.66	52.00	4.9	5.08

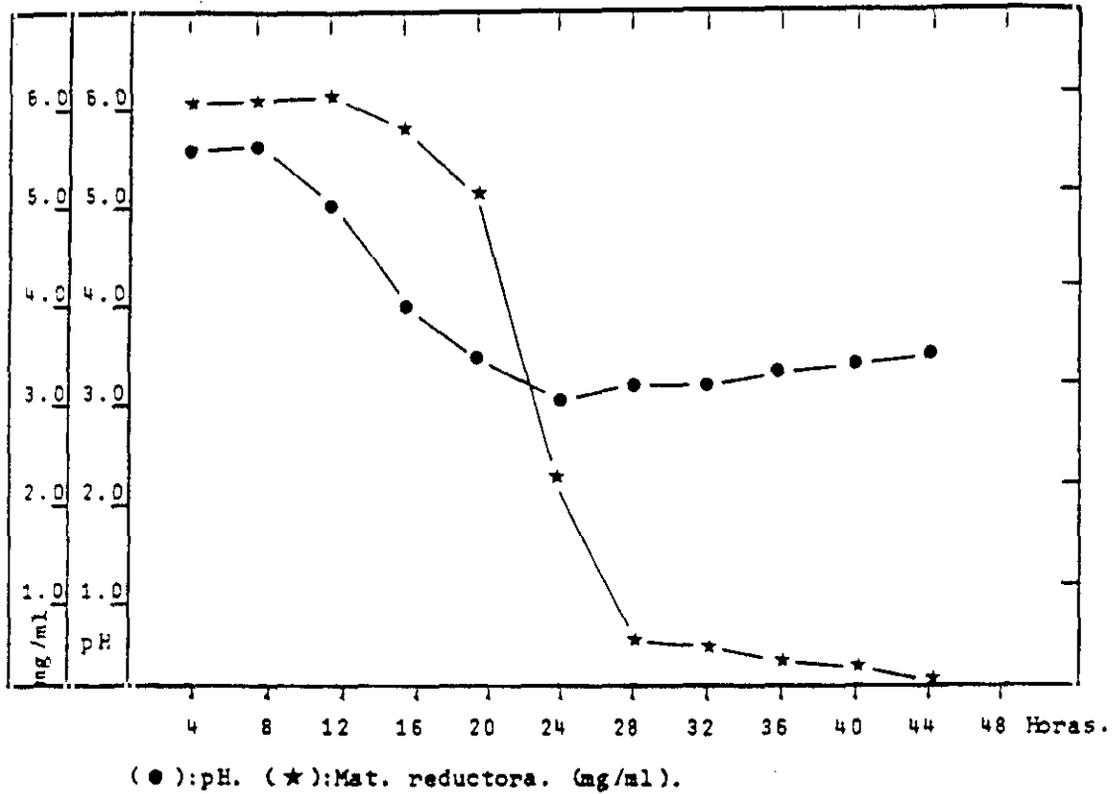


Figura (3.23).- Comportamiento de *Trichoderma harzianum* 2413 en el medio de cultivo n° 2 (Hidrolizado + Sales Minerales).

Tabla (3.11).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	5.5	
4	0.00	5.5	
8	0.00	5.5	
12	0.00	5.0	
16	3.33	4.0	
20	15.00	3.4	
24	63.33	3.1	
28	91.66	3.2	
32	93.33	3.2	
36	96.66	3.3	
40	98.33	3.4	
44	100.00	3.5	2.42

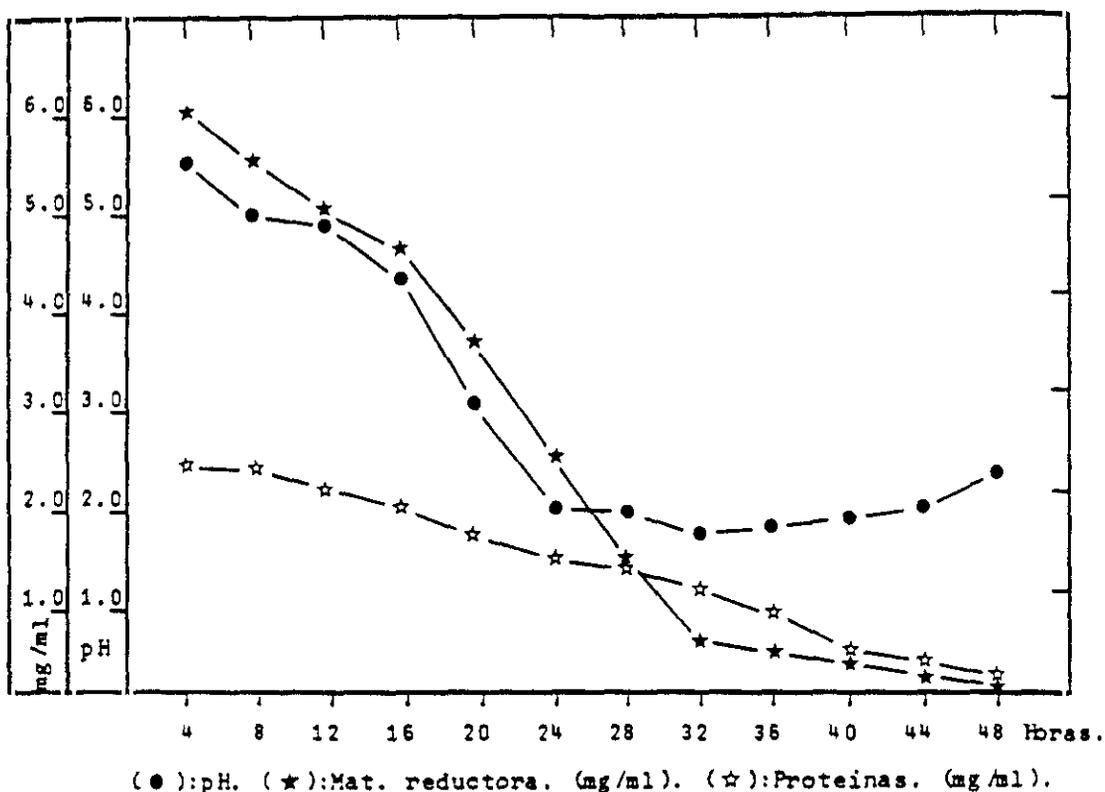


Figura (3.24).- Comportamiento de *Trichoderma harzianum* 2413 en el medio de cultivo nº 3 (Hidrolizado + Sales Minerales + Peptona).

Tabla (3.12).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	PROTEINA CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	0.00	5.5	
4	0.00	0.00	5.5	
8	8.33	4.00	5.0	
12	16.66	10.00	4.9	
16	23.33	20.00	4.3	
20	38.33	28.00	3.1	
24	58.33	40.00	2.1	
28	75.00	44.00	2.0	
32	90.00	52.00	1.8	
36	91.66	60.00	1.9	
40	96.66	80.00	2.0	
44	98.33	88.00	2.1	
48	100.00	92.00	2.5	2.65

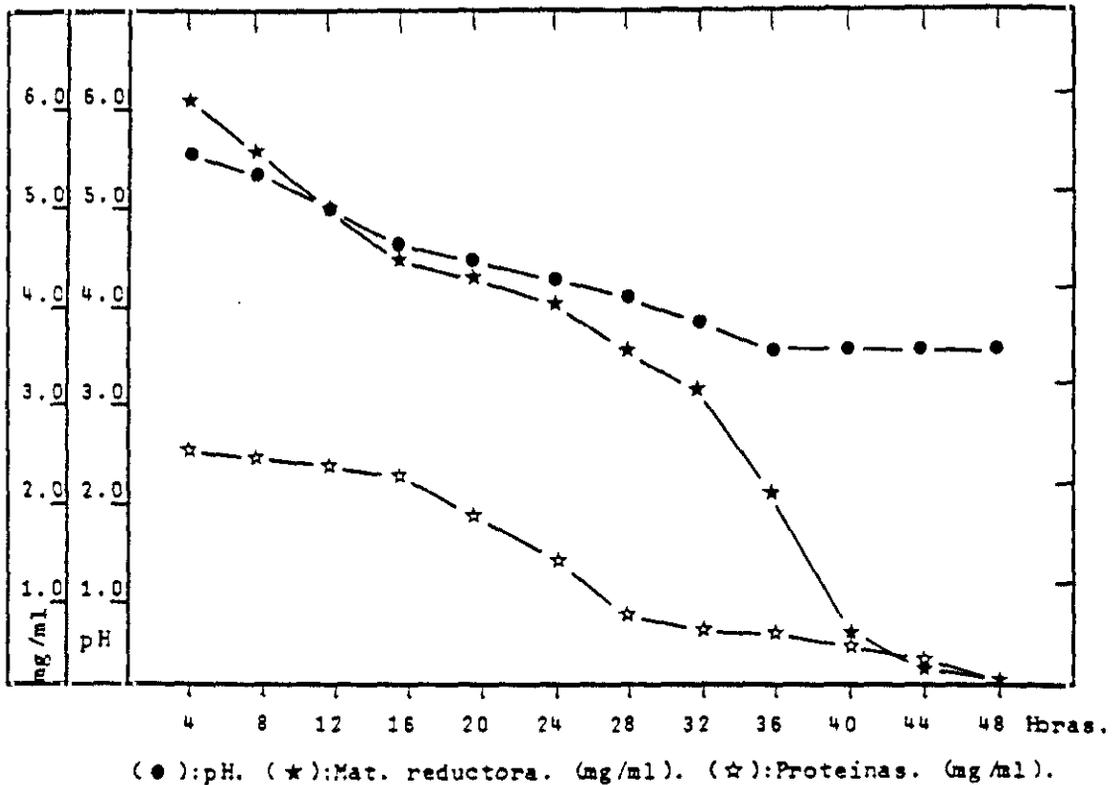


Figura (3.25).- Comportamiento de *Trichoderma harzianum* 2413 en el medio de cultivo n° 4 (Hidrolizado + Peptona).

Tabla (3.13).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	PROTEINA CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	0.00	5.5	
4	0.00	0.00	5.5	
8	8.33	8.00	5.3	
12	16.66	12.00	5.0	
16	25.00	16.00	4.6	
20	28.33	24.00	4.4	
24	33.33	44.00	4.3	
28	40.00	64.00	4.1	
32	46.66	72.00	3.9	
36	66.33	76.00	3.6	
40	88.33	80.00	3.6	
44	96.66	88.00	3.6	
48	100.00	97.20	3.6	2.64

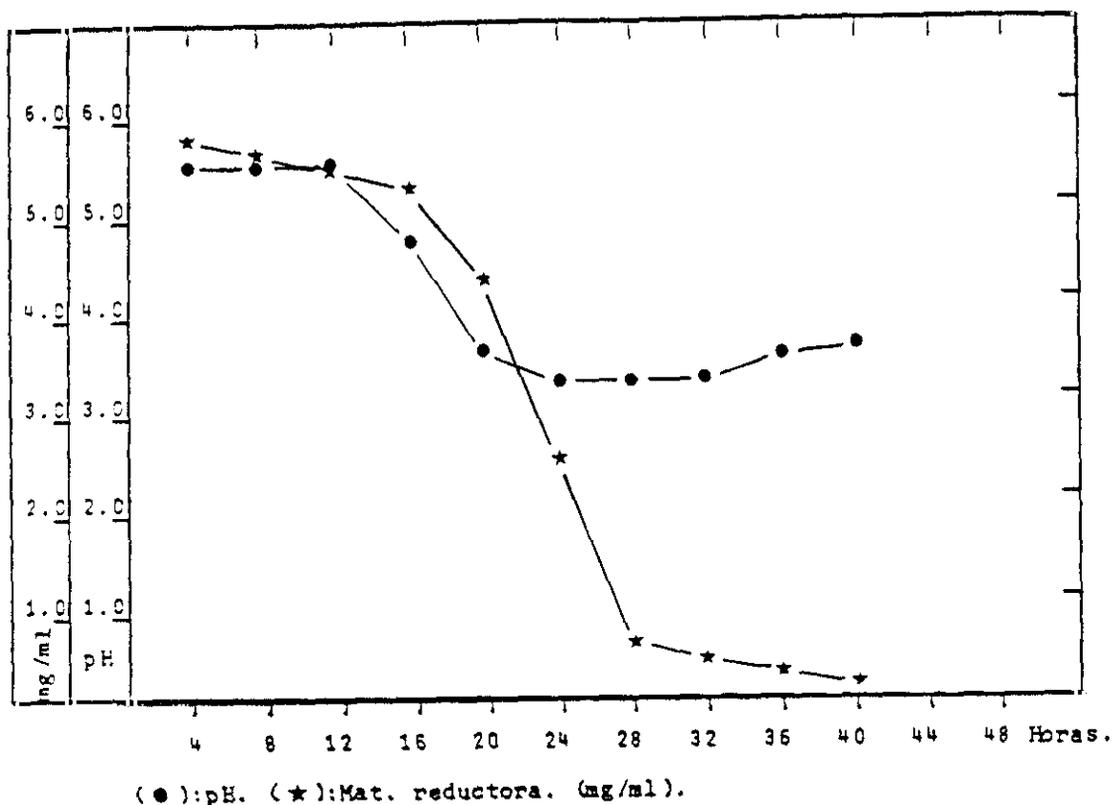


Figura (3.26).- Comportamiento de *Trichoderma harzianum* 2413 en el medio de cultivo n° 5 (Hidrolizado + Sales Minerales + Aminoácidos).

Tabla (3.14).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	5.5	
4	3.33	5.5	
8	6.66	5.5	
12	10.00	5.5	
16	13.33	4.4	
20	26.66	3.5	
24	53.33	3.2	
28	80.00	3.2	
32	93.33	3.2	
36	96.66	3.3	
40	100.00	3.4	2.99

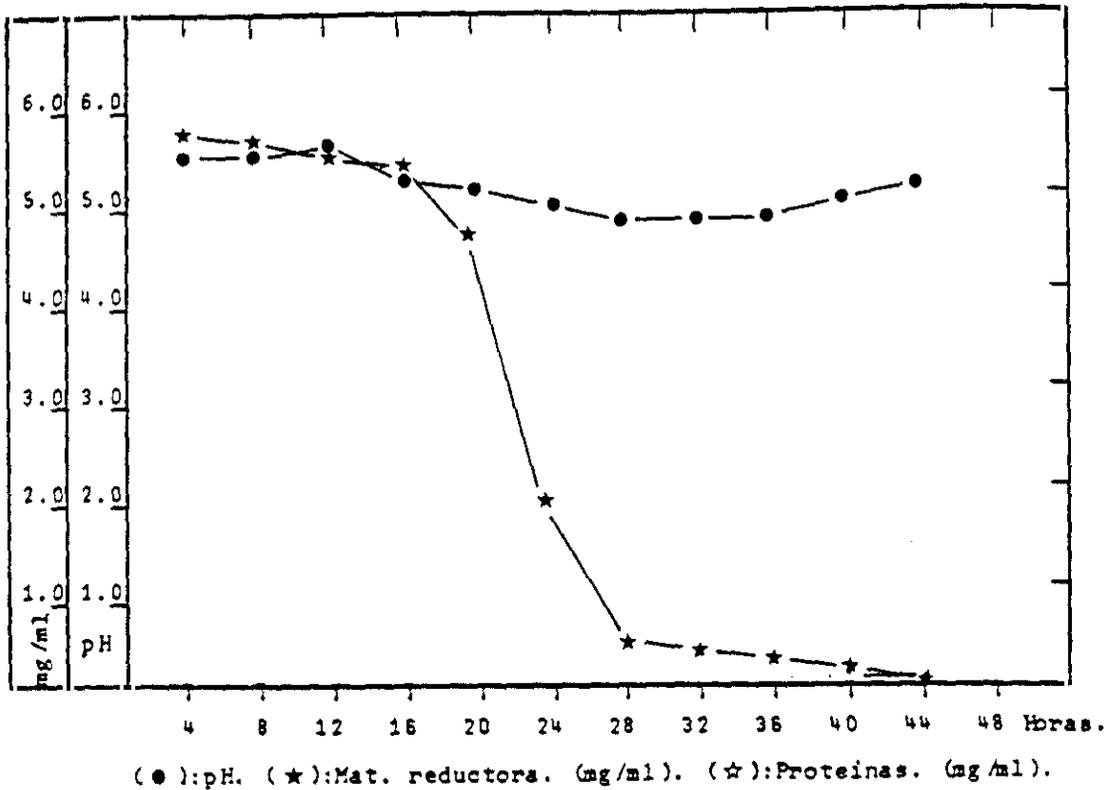
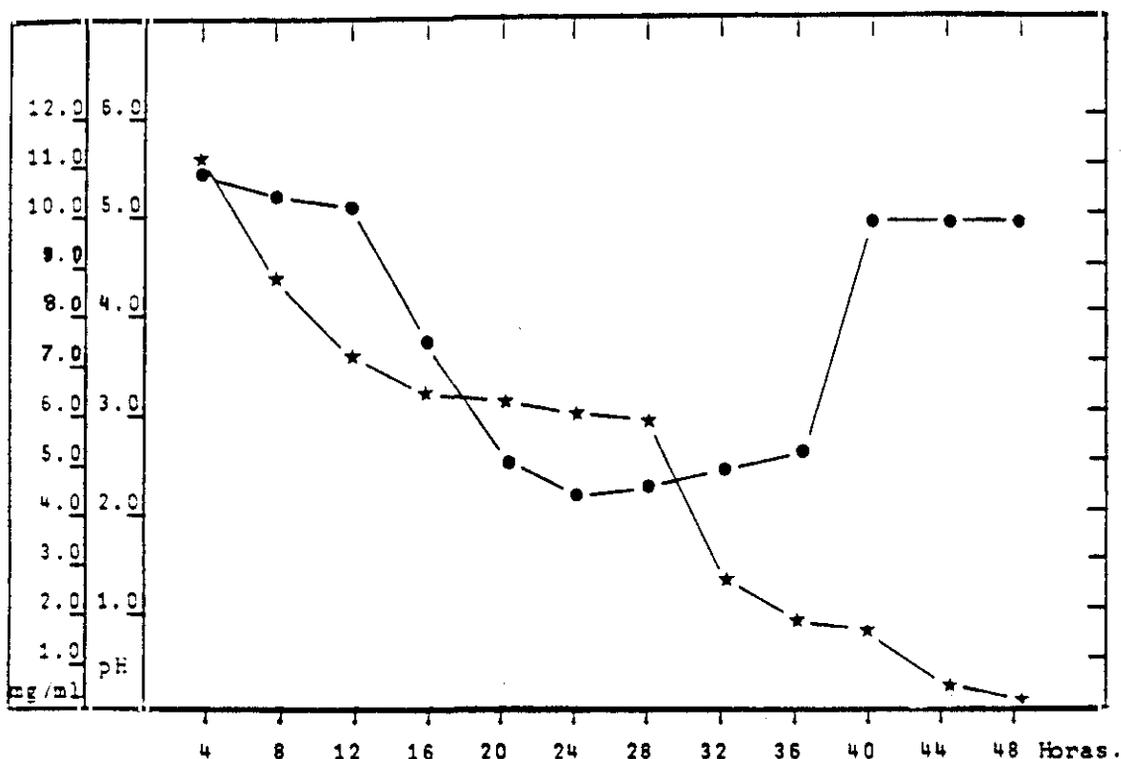


Figura (3.27).- Comportamiento de *Trichoderma harzianum* 2413 en el medio de cultivo n° 6 (Hidrolizado + Aminoácidos).

Tabla (3.15).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	5.5	
4	3.33	5.5	
8	5.00	5.5	
12	10.00	5.5	
16	11.66	5.2	
20	23.33	5.0	
24	68.33	4.9	
28	91.66	4.7	
32	95.00	4.7	
36	96.66	4.7	
40	98.33	4.8	
44	100.00	4.9	3.00

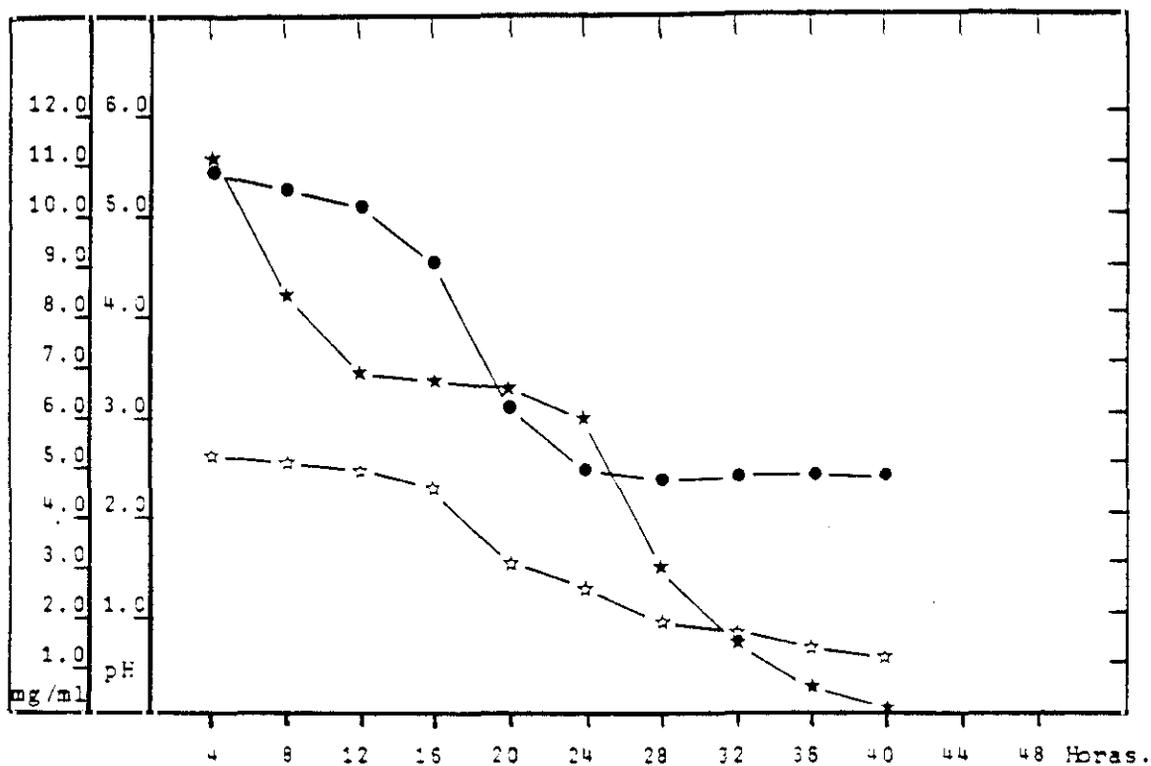


(●):pH. (★):Mat. reductora. (mg/ml).

Figura (3.28).- Comportamiento de *Trichoderma harzianum* 2413 en el medio de cultivo nº 7 (2 x Hidrolizado + Sales Minerales).

Tabla (3.16).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	5.5	
4	6.66	5.4	
8	26.66	5.2	
12	38.36	5.0	
16	46.66	3.7	
20	47.50	2.6	
24	49.16	2.2	
28	50.00	2.3	
32	77.50	2.6	
36	82.49	2.7	
40	83.33	5.0	
44	95.83	5.0	
48	100.00	5.0	3.64



(●):pH. (★):Mat. reductora. (mg/ml). (☆):Proteínas. (mg/ml).

Figura (3.29).- Comportamiento de *Trichoderma harzianum* 2413 en el medio de cultivo nº 8 (2 x Hidrolizado + Sales Minerales + Peptona).

Tabla (3.17).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	PROTEINA CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	0.00	5.5	
4	8.33	0.00	5.4	
8	30.00	4.00	5.2	
12	41.66	8.00	5.0	
16	42.50	12.00	4.6	
20	43.33	40.00	3.2	
24	50.00	52.00	2.5	
28	74.16	56.00	2.5	
32	85.41	60.00	2.5	
36	95.83	68.00	2.5	
40	100.00	72.00	2.9	2.56

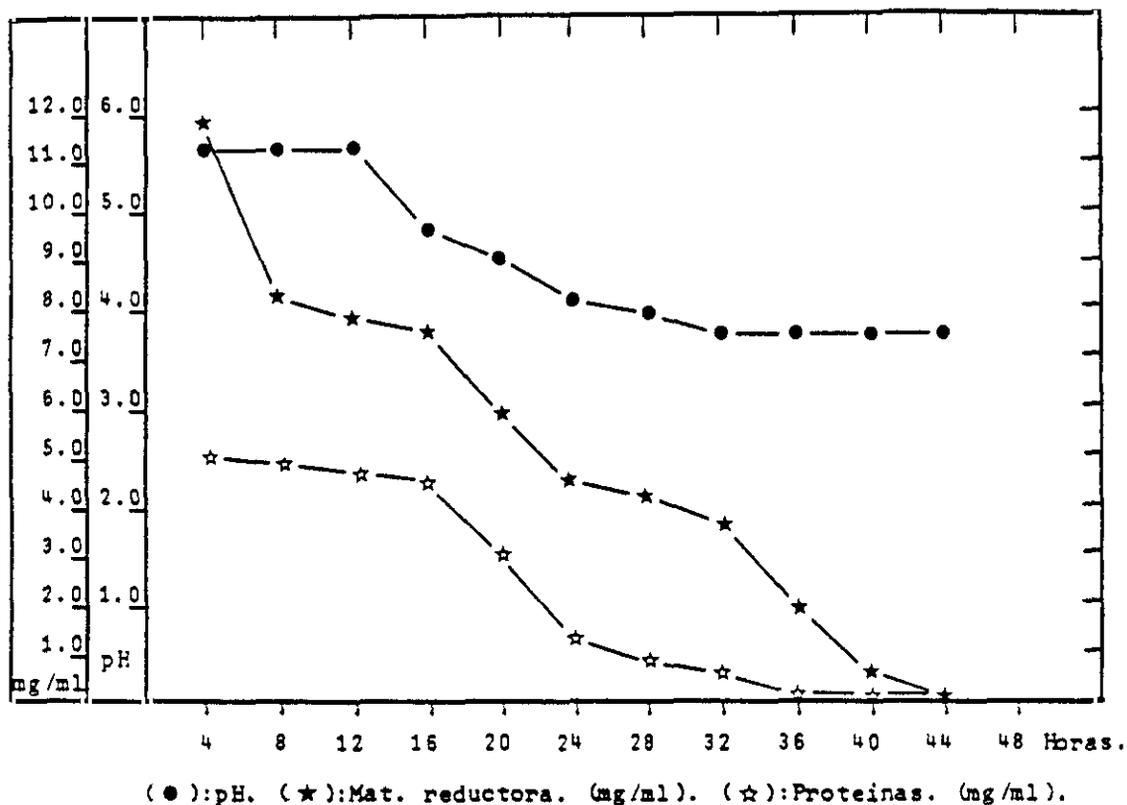


Figura (3.30).- Comportamiento de *Trichoderma harzianum* 2413 en el medio de cultivo n° 9 (2 x Hidrolizado + Peptona).

Tabla (3.18).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	PROTEINA CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	0.00	5.5	
4	3.33	0.00	5.5	
8	30.00	4.00	5.5	
12	33.33	8.00	5.5	
16	36.66	12.00	4.9	
20	50.00	36.00	4.5	
24	60.00	68.00	4.2	
28	63.33	80.00	4.0	
32	67.49	84.00	3.8	
36	82.49	100.00	3.8	
40	92.50	100.00	3.8	
44	100.00	100.00	3.8	3.02

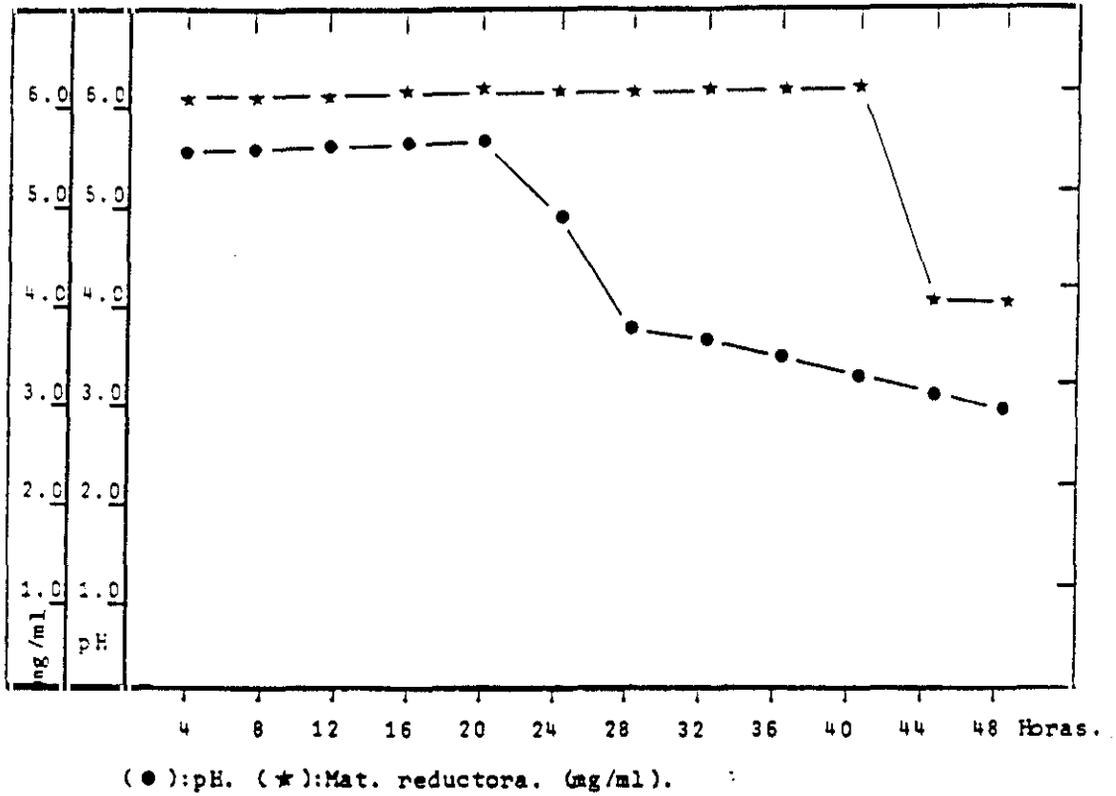


Figura (3.31).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* 2415 en el medio de cultivo n° 2 (Hidrolizado + Sales Minerales).

Tabla (3.19).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	5.5	
4	0.00	5.5	
8	0.00	5.5	
12	0.00	5.5	
16	0.00	5.5	
20	0.00	5.5	
24	0.00	4.9	
28	0.00	3.8	
32	0.00	3.7	
36	0.00	3.5	
40	0.00	3.2	
44	33.33	3.1	
48	33.33	3.0	1.11

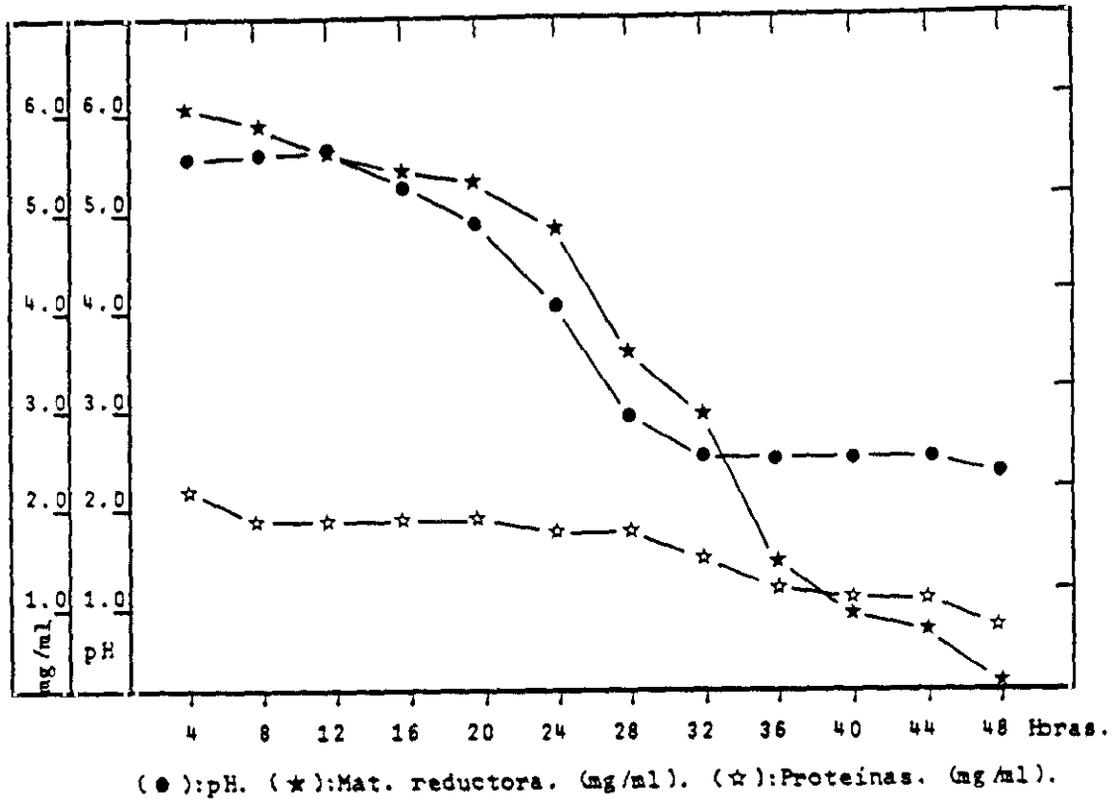


Figura (3.32).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* 2415 en el medio de cultivo n° 3 (Hidrolizado + Sales Minerales + Peptona).

Tabla (3.20).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	PROTEINA CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	0.00	5.5	
4	0.00	16.00	5.5	
8	1.66	28.00	5.5	
12	6.66	28.00	5.5	
16	10.00	28.00	5.3	
20	11.66	28.00	4.9	
24	20.00	32.00	4.0	
28	40.00	32.00	2.9	
32	50.00	44.00	2.6	
36	76.66	52.00	2.5	
40	83.33	56.00	2.5	
44	85.00	56.00	2.5	
48	100.00	64.00	2.4	2.75

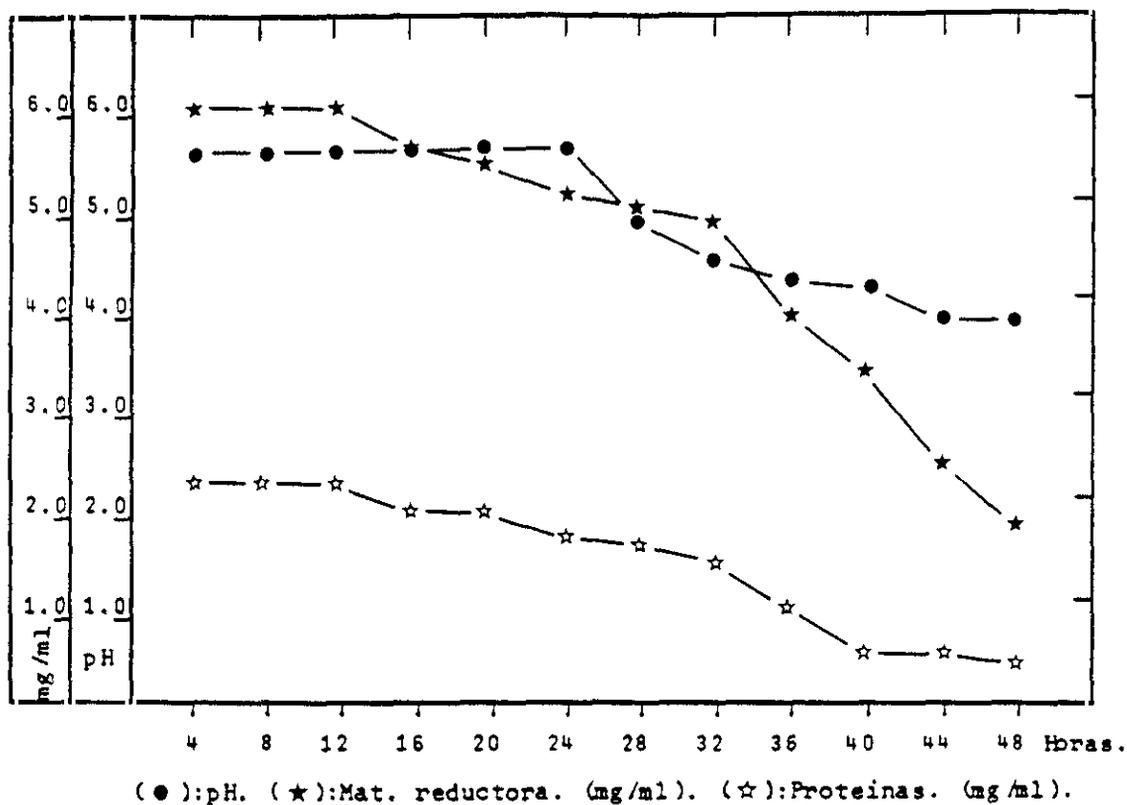


Figura (3.33).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* 2415 en el medio de cultivo n° 4 (Hidrolizado + Peptona).

Tabla (3.21).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	PROTEINA CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	0.00	5.5	
4	0.00	12.00	5.5	
8	0.00	12.00	5.5	
12	0.00	12.00	5.5	
16	5.00	20.00	5.5	
20	8.33	20.00	5.5	
24	13.33	28.00	5.5	
28	15.00	32.00	5.1	
32	16.66	40.00	4.5	
36	33.33	56.00	4.3	
40	43.33	76.00	4.2	
44	58.33	76.00	4.0	
48	66.66	80.00	4.0	2.69

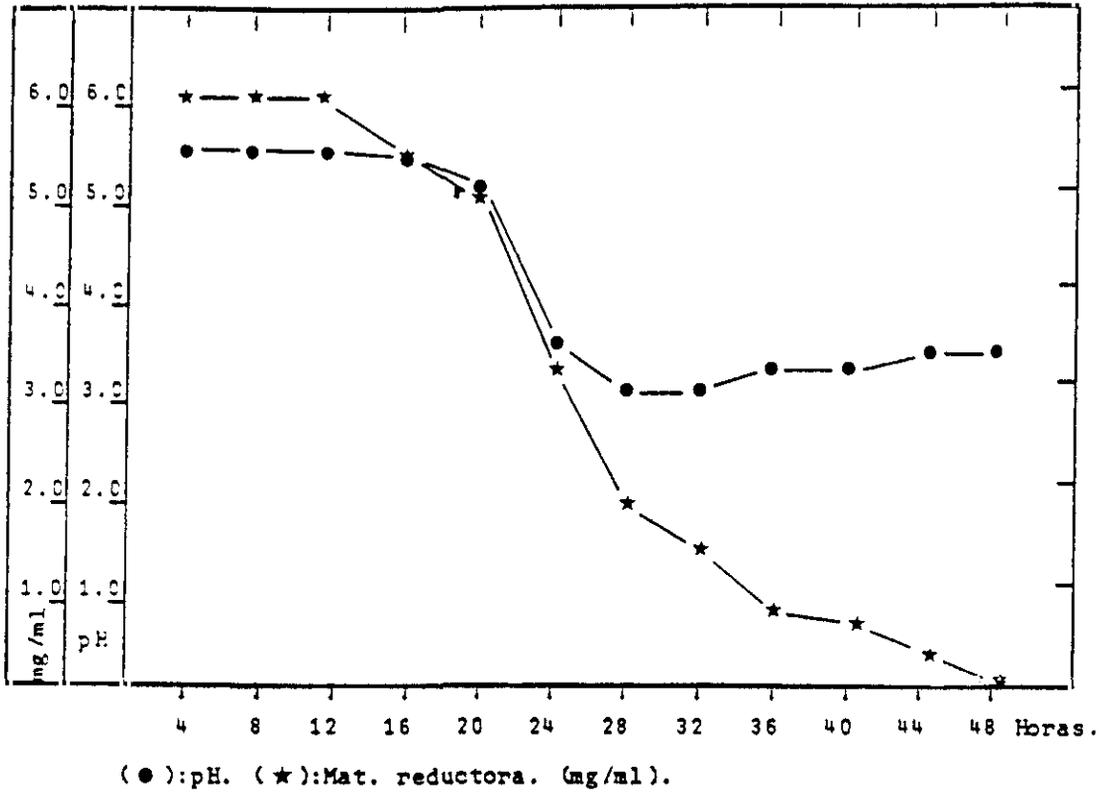


Figura (3.34).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* 2415 en el medio de cultivo n° 5 (Hidrolizado + Sales Minerales + Aminoácidos).

Tabla (3.22).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	5.5	
4	0.00	5.5	
8	0.00	5.5	
12	0.00	5.5	
16	10.00	5.3	
20	15.00	5.0	
24	45.00	3.4	
28	66.66	3.0	
32	75.00	3.0	
36	83.30	3.2	
40	86.60	3.2	
44	93.30	3.3	
48	100.00	3.3	2.04

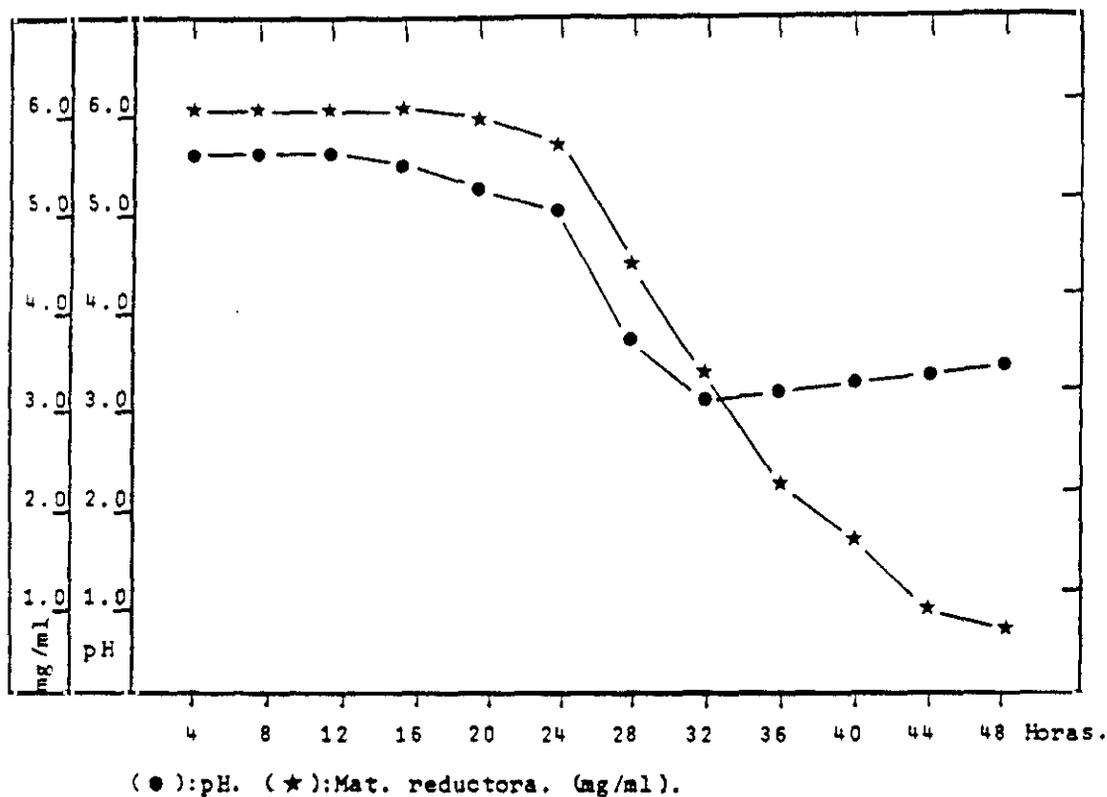


Figura (3.35).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* 2415 en el medio de cultivo n° 6 (Hidrolizado + Aminoácidos).

Tabla (3.23).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	5.5	
4	0.00	5.5	
8	0.00	5.5	
12	0.00	5.5	
16	0.00	5.0	
20	3.30	4.9	
24	10.00	4.8	
28	30.00	3.6	
32	46.60	3.0	
36	65.00	3.1	
40	75.00	3.2	
44	83.30	3.3	
48	86.60	3.4	1.99

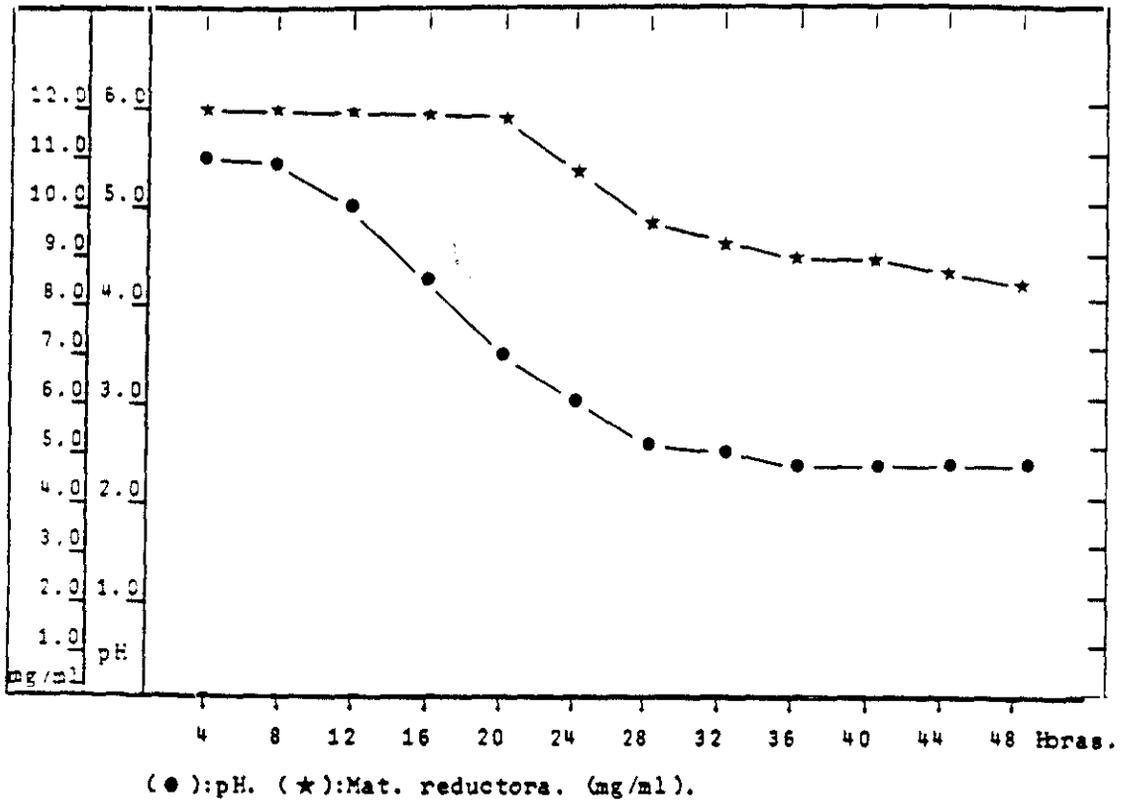
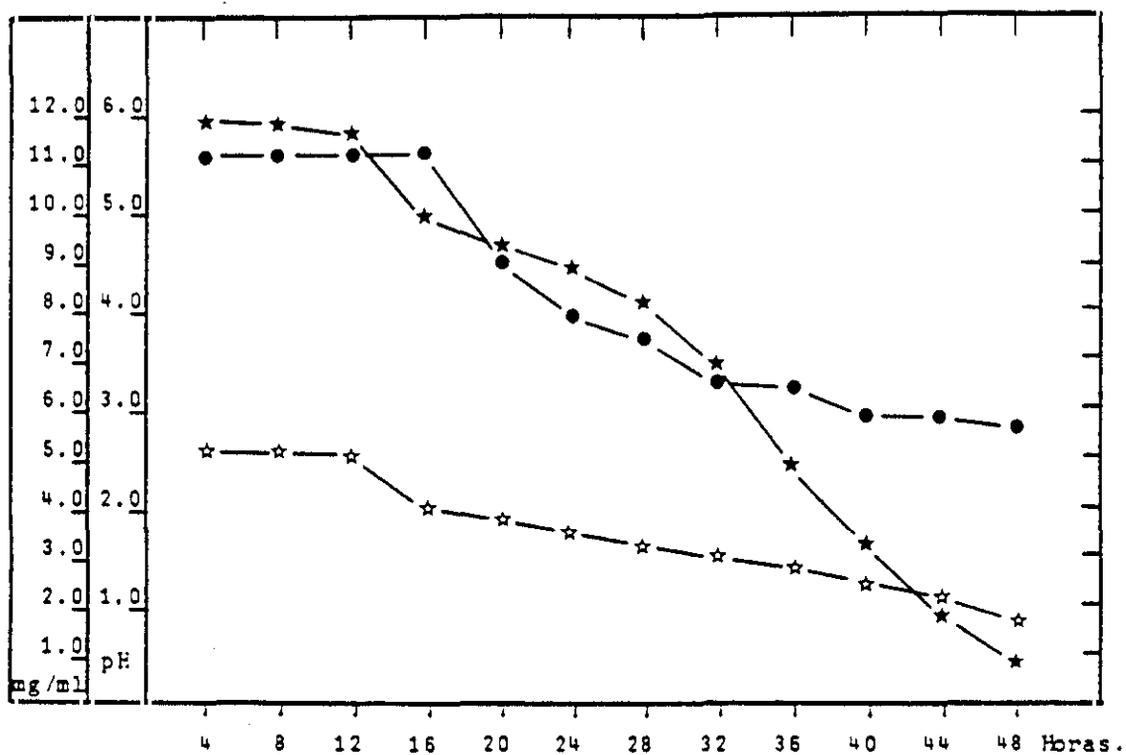


Figura (3.36).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* 2415 en el medio de cultivo n° 7 (2 x Hidrolizado + Sales Minerales).

Tabla (3.24).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	5.5	
4	0.83	5.4	
8	1.66	5.3	
12	2.49	5.0	
16	3.33	4.2	
20	4.16	3.4	
24	10.00	3.1	
28	18.33	2.7	
32	23.33	2.5	
36	25.00	2.4	
40	25.83	2.4	
44	27.50	2.4	
48	30.00	2.4	0.81



(●):pH. (★):Mat. reductora. (mg/ml). (☆):Proteínas. (mg/ml).

Figura (3.37).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* 2415 en el medio de cultivo n° 8 (2 x Hidrolizado + Sales Minerales + Peptona).

Tabla (3.25).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	PROTEINA CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	0.00	5.5	
4	2.50	0.00	5.5	
8	3.33	0.00	5.5	
12	4.16	4.00	5.5	
16	16.66	20.00	5.5	
20	20.83	24.00	4.6	
24	25.00	28.00	4.0	
28	31.66	32.00	3.7	
32	40.83	40.00	3.4	
36	58.33	44.00	3.2	
40	71.66	52.00	3.0	
44	83.33	56.00	3.0	
48	91.66	64.00	2.9	3.78

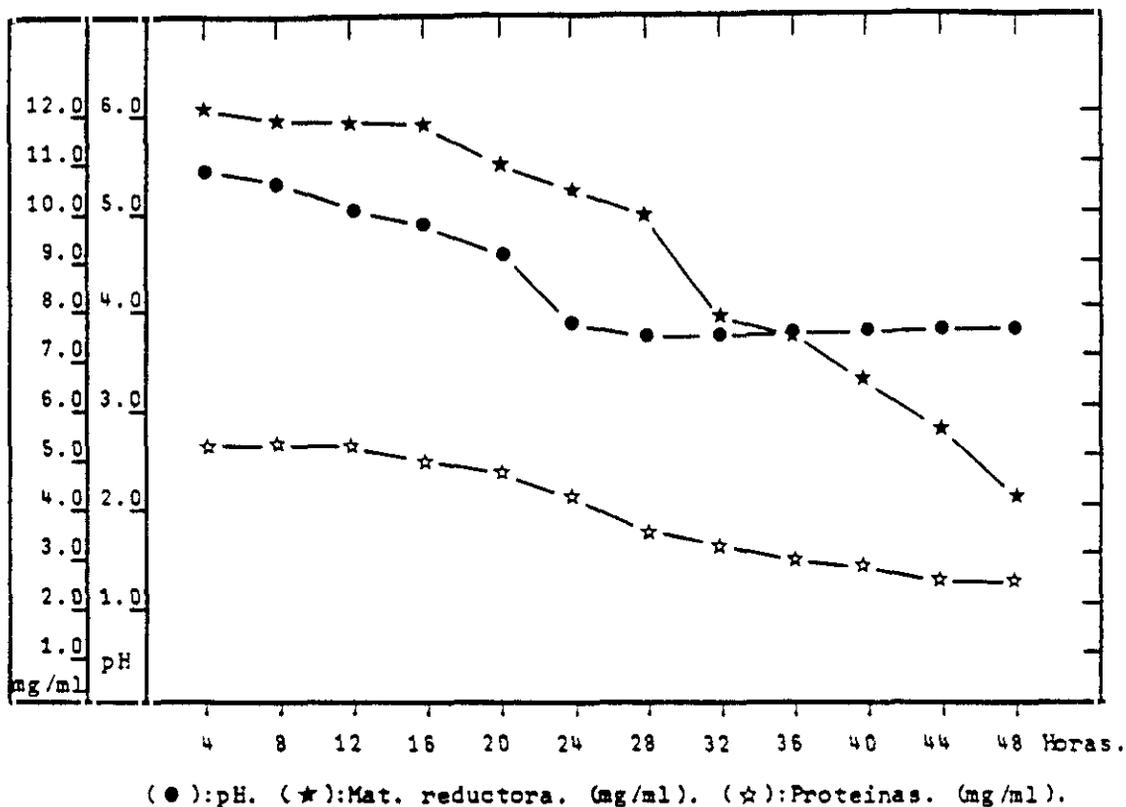


Figura (3.38).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* 2415 en el medio de cultivo n° 9 (2 x Hidrolizado + Peptona).

Tabla (3.26).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	PROTEINA CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	0.00	5.5	
4	0.83	0.00	5.4	
8	1.66	0.00	5.1	
12	2.49	4.00	5.0	
16	4.16	12.00	4.9	
20	8.33	16.00	4.5	
24	12.49	20.00	3.9	
28	16.66	32.00	3.8	
32	33.33	36.00	3.8	
36	37.49	40.00	3.8	
40	50.00	44.00	3.8	
44	52.49	48.00	3.8	
48	64.16	48.00	3.8	2.14

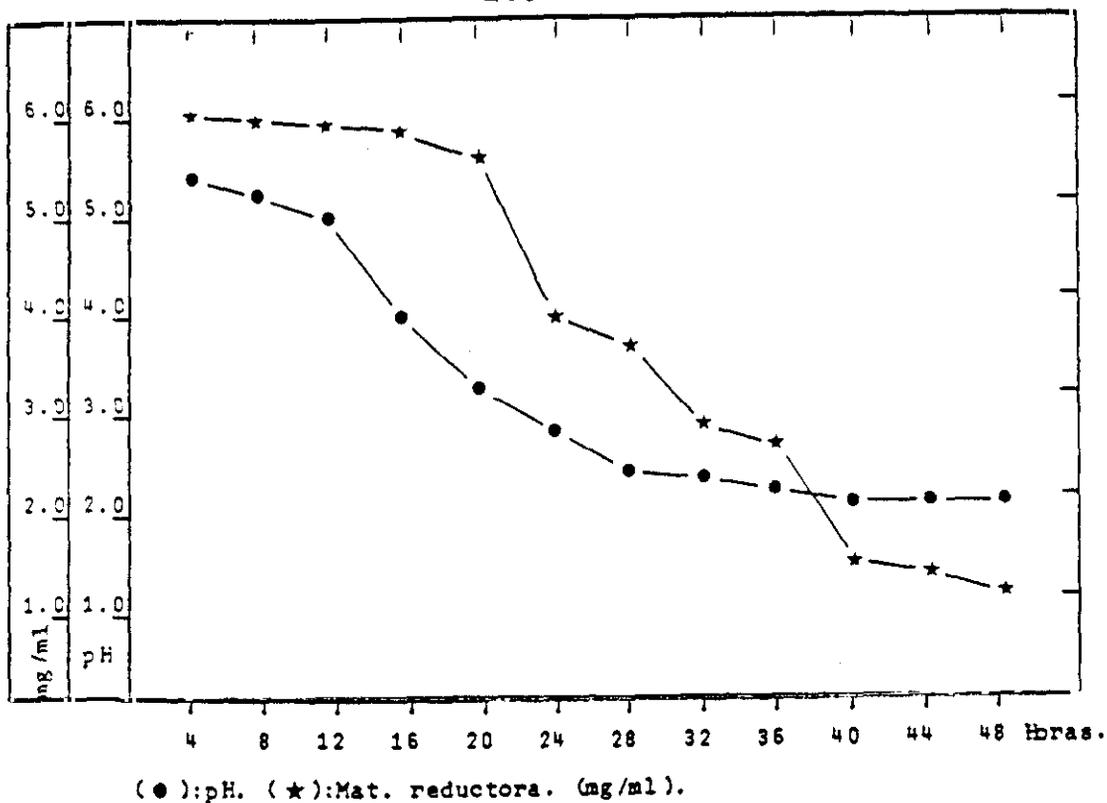


Figura (3.39).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* 2416 en el medio de cultivo n° 2 (Hidrolizado + Sales Minerales).

Tabla (3.27).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	5.5	
4	0.00	5.3	
8	1.66	5.2	
12	3.33	5.0	
16	6.66	4.0	
20	8.33	3.2	
24	33.33	2.9	
28	40.00	2.4	
32	51.66	2.3	
36	55.00	2.2	
40	75.00	2.1	
44	76.66	2.1	
48	80.00	2.1	1.54

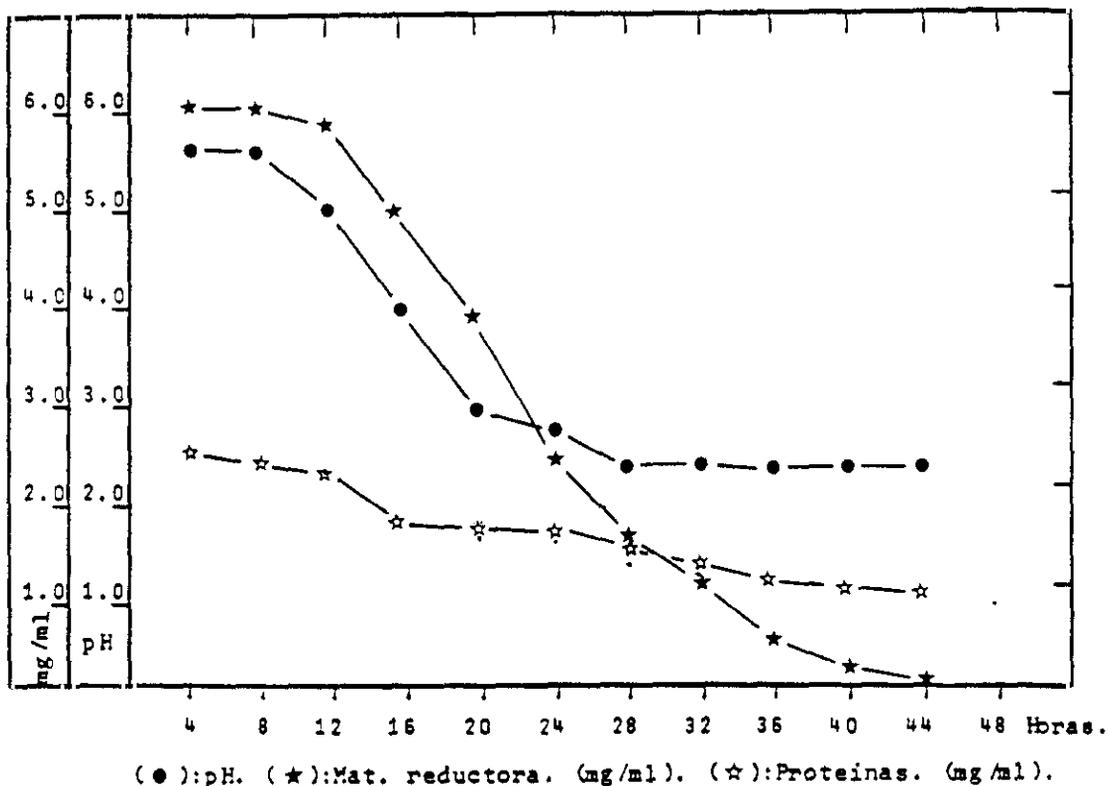


Figura (3.40).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* 2416 en el medio de cultivo n° 3 (Hidrolizado + Sales Minerales + Peptona).

Tabla (3.28).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	PROTEINA CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	0.00	5.5	
4	0.00	4.00	5.4	
8	1.66	8.00	5.0	
12	5.00	12.00	4.0	
16	16.66	28.00	3.0	
20	35.00	28.00	2.7	
24	60.00	28.00	2.4	
28	71.66	32.00	2.4	
32	80.00	36.00	2.3	
36	91.66	40.00	2.3	
40	98.33	42.00	2.3	
44	100.00	43.00	2.3	2.61

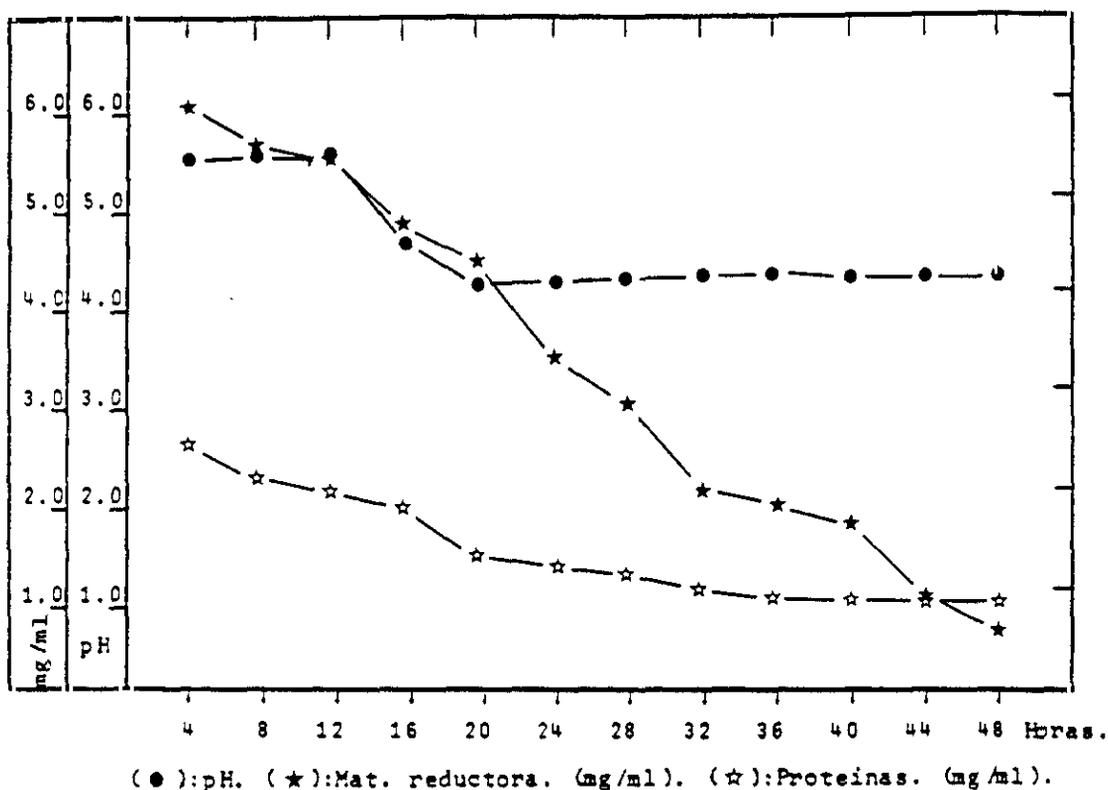
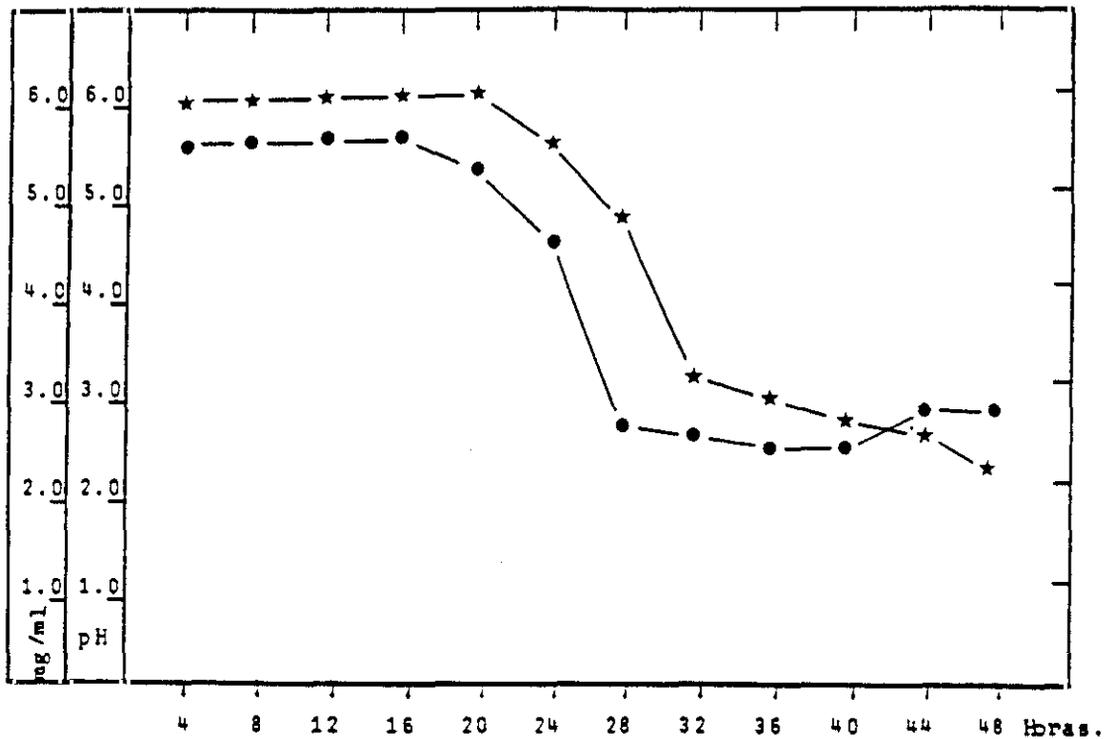


Figura (3.41).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* 2416 en el medio de cultivo n<sup>o</sup> 4 (Hidrolizado + Peptona).

Tabla (3.29).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	PROTEINA CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	0.00	5.5	
4	0.00	0.00	5.5	
8	5.00	12.00	5.4	
12	6.66	16.00	5.3	
16	18.33	20.00	4.7	
20	25.00	40.00	4.3	
24	41.66	44.00	4.3	
28	48.33	48.00	4.3	
32	63.33	56.00	4.3	
36	65.00	56.00	4.3	
40	68.33	56.00	4.2	
44	81.66	56.00	4.2	
48	86.66	56.00	4.2	3.20



(●):pH. (★):Mat. reductora. (mg/ml). (☆):Proteínas. (mg/ml).

Figura (3.42).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* 2416 en el medio de cultivo n° 5 (Hidrolizado + Sales Minerales + Aminoácidos).

Tabla (3.30).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	5.5	
4	0.00	5.5	
8	0.00	5.5	
12	0.00	5.5	
16	0.00	5.5	
20	0.00	5.0	
24	13.33	4.3	
28	23.33	2.6	
32	45.00	2.5	
36	50.00	2.3	
40	55.00	2.3	
44	58.33	2.5	
48	65.00	2.5	3.90

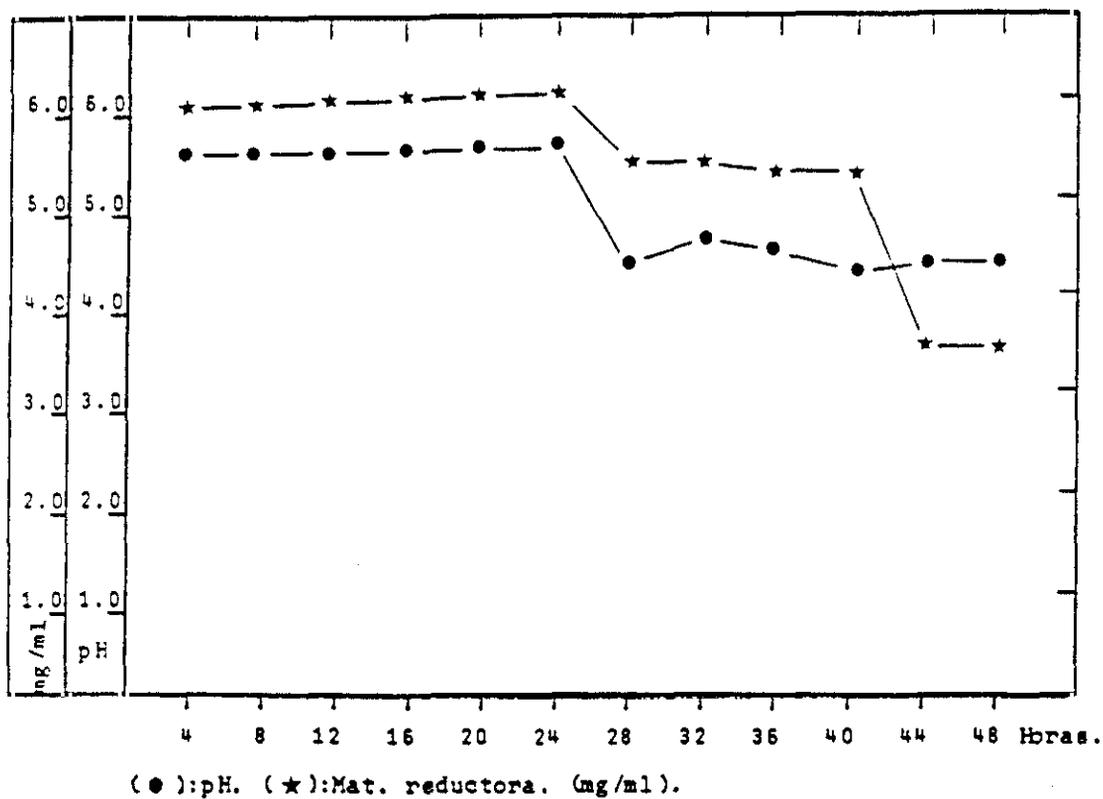


Figura (3.43).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* 2416 en el medio de cultivo n° 6 (Hidrolizado + Aminoácidos).

Tabla (3.31).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	5.5	
4	0.00	5.5	
8	0.00	5.5	
12	0.00	5.5	
16	0.00	5.5	
20	0.00	5.5	
24	0.00	5.5	
28	13.33	4.3	
32	15.00	4.5	
36	16.66	4.4	
40	17.00	4.2	
44	38.33	4.2	
48	39.00	4.2	2.49

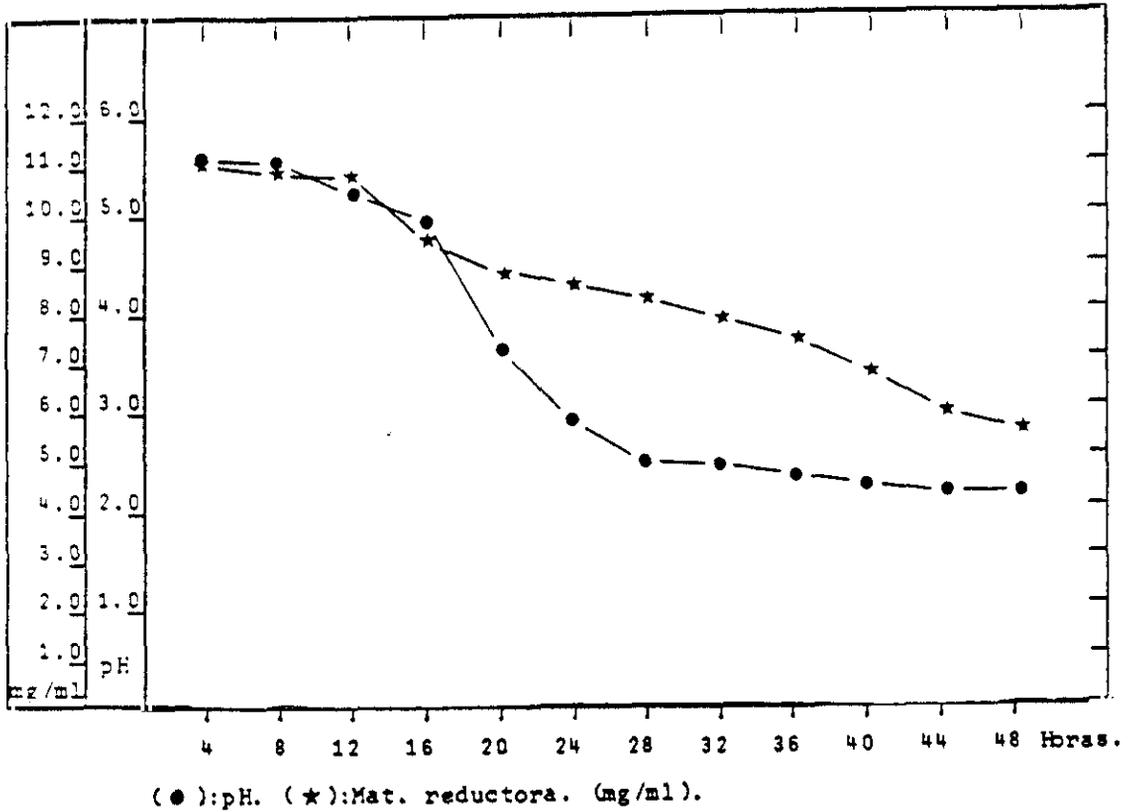
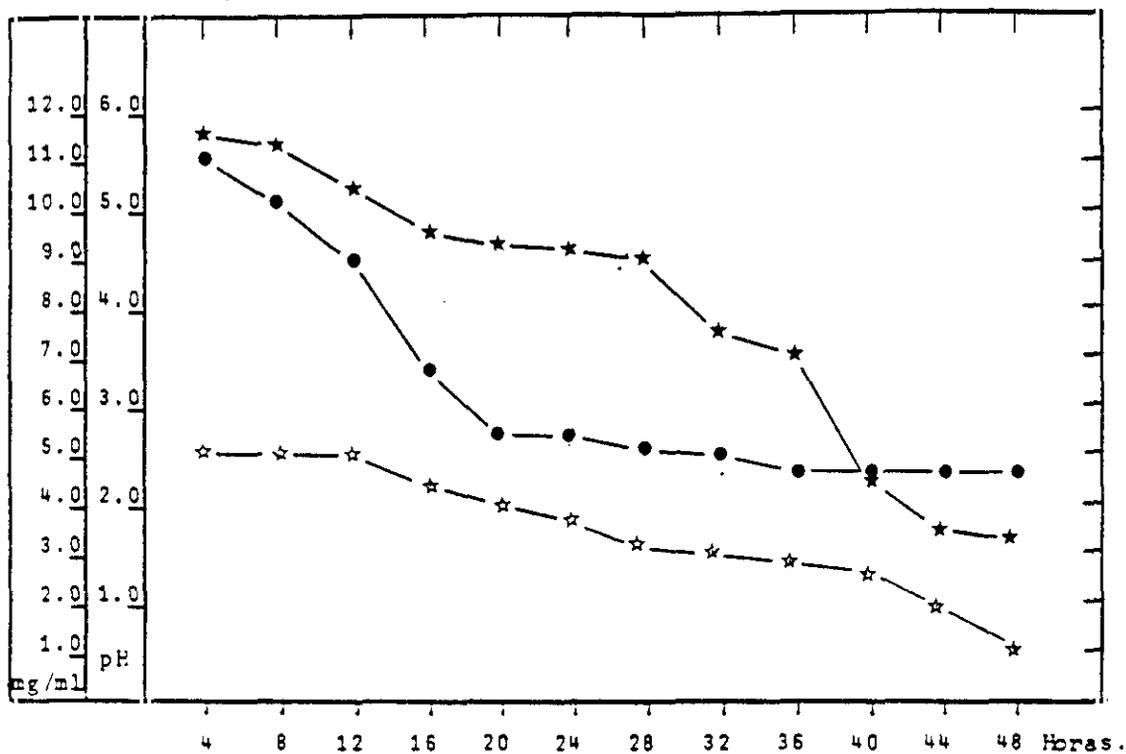


Figura (3.44).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* 2416 en el medio de cultivo n° 7 (2 x Hidrolizado + Sales Minerales).

Tabla (3.32).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	5.5	
4	8.33	5.4	
8	10.83	5.2	
12	12.50	5.0	
16	20.83	3.7	
20	25.00	3.0	
24	28.00	2.6	
28	30.00	2.6	
32	32.50	2.5	
36	35.83	2.3	
40	40.83	2.3	
44	48.33	2.3	
48	50.00	2.3	0.98



(●):pH. (★):Mat. reductora. (mg/ml). (☆):Proteínas. (mg/ml).

Figura (3.45).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* 2416 en el medio de cultivo n° 8 (2 x Hidrolizado + Sales Minerales + Peptona).

Tabla (3.33).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	PROTEINA CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	0.00	5.5	
4	3.35	0.00	5.4	
8	6.66	0.00	5.0	
12	12.50	0.00	4.5	
16	19.16	8.00	3.4	
20	20.00	20.00	2.9	
24	20.83	24.00	2.9	
28	21.66	32.00	2.8	
32	35.83	40.00	2.7	
36	40.83	48.00	2.4	
40	58.40	60.00	2.4	
44	67.49	68.00	2.4	
48	68.33	80.00	2.4	1.71

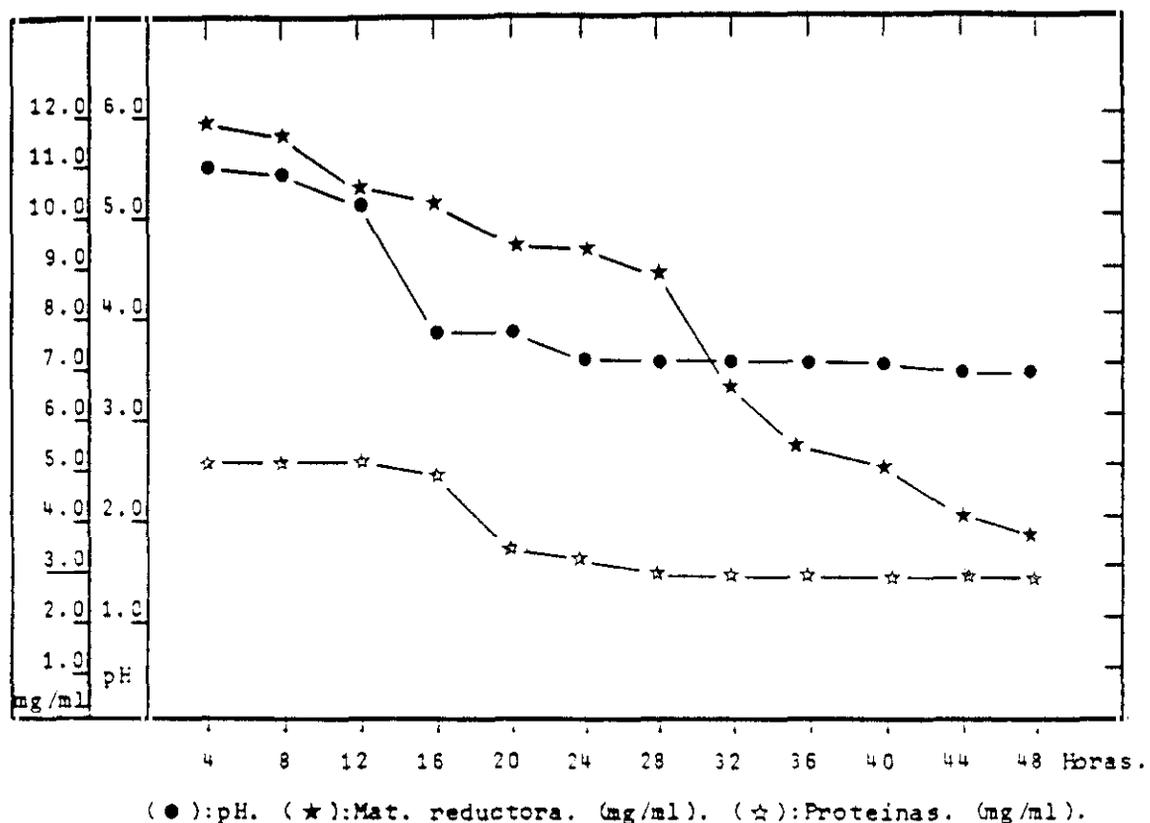


Figura (3.46).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* 2416 en el medio de cultivo n<sup>o</sup> 9 (2 x Hidrolizado + Peptona).

Tabla (3.34).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	PROTEINA CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	0.00	5.5	
4	2.50	0.00	5.4	
8	5.00	0.00	5.3	
12	12.50	0.00	5.0	
16	15.00	4.00	3.9	
20	20.83	28.00	3.9	
24	21.66	32.00	3.6	
28	25.80	40.00	3.6	
32	43.00	40.00	3.6	
36	55.00	40.00	3.6	
40	56.66	40.00	3.6	
44	65.00	40.00	3.5	
48	66.66	40.00	3.5	1.68

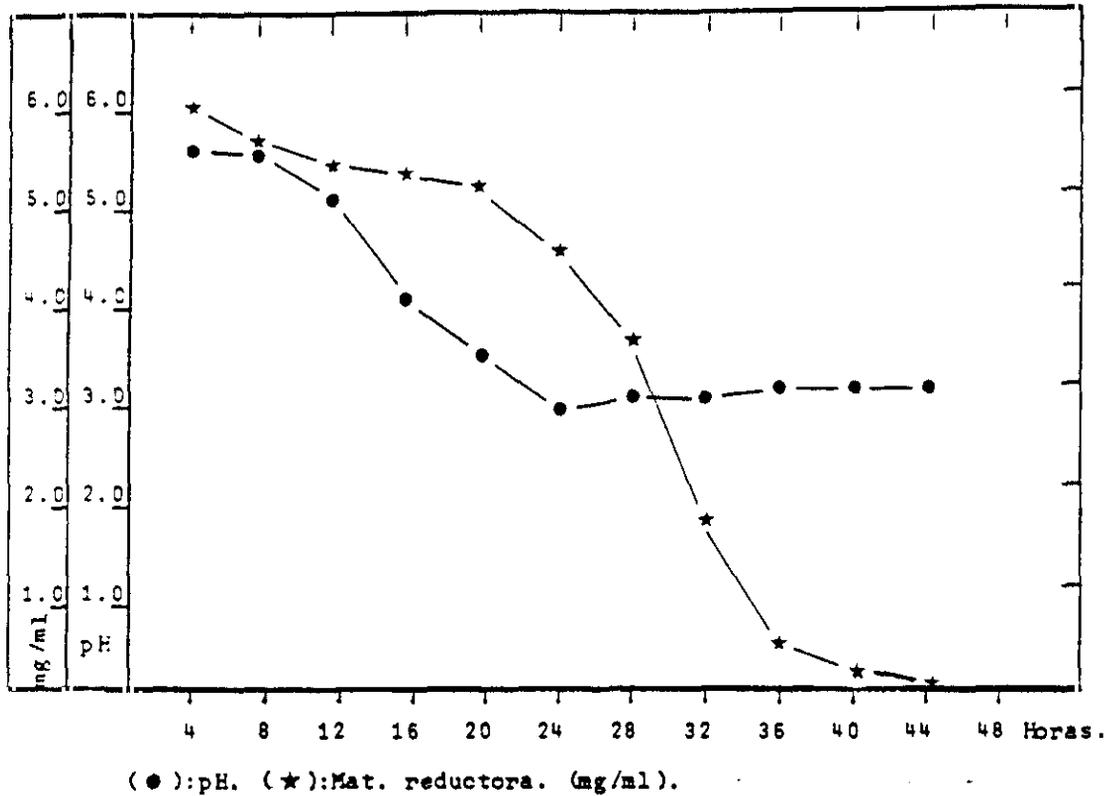


Figura (3.47).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* QM 9414 en el medio de cultivo n<sup>o</sup> 2 (Hidrolizado + Sales Minerales).

Tabla (2.35).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	5.5	
4	0.00	5.5	
8	5.00	5.4	
12	10.00	5.1	
16	11.66	4.1	
20	13.33	3.5	
24	23.33	3.0	
28	38.33	3.1	
32	68.33	3.1	
36	91.66	3.2	
40	98.33	3.2	
44	100.00	3.2	2.02

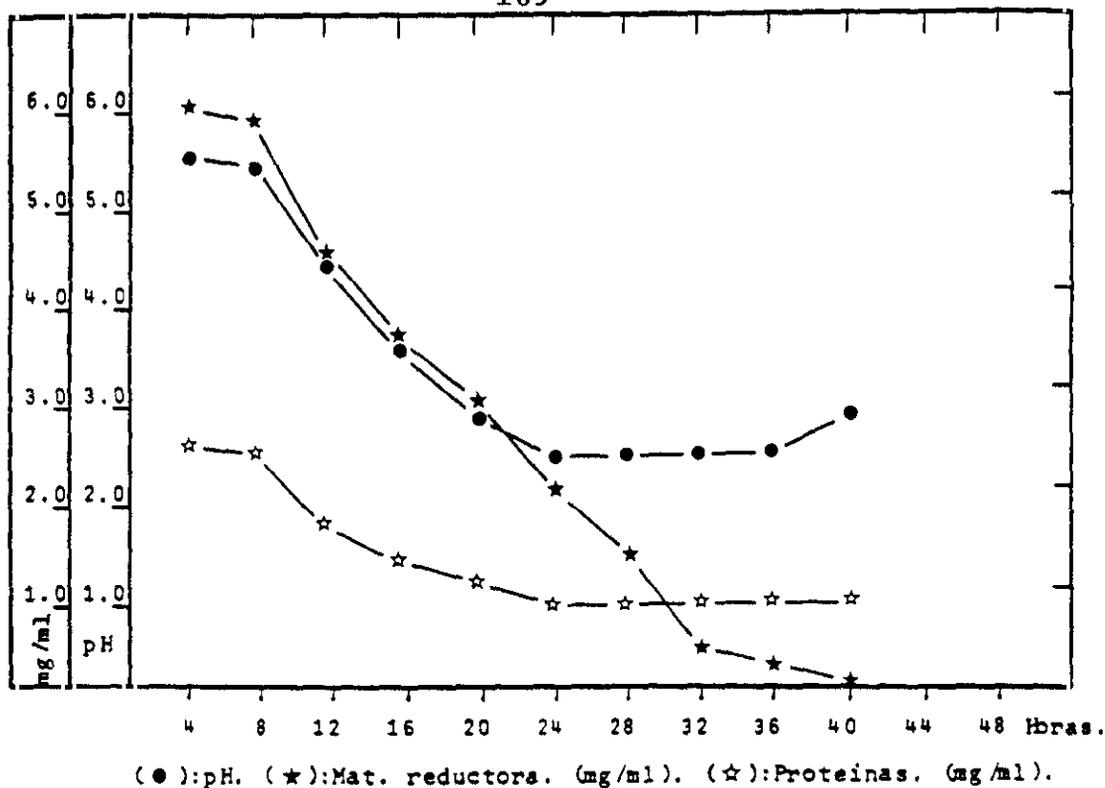


Figura (3.48).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* QM 9414 en el medio de cultivo n<sup>o</sup> 3 (Hidrolizado + Sales Minerales + Peptona).

Tabla (2.36).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	PROTEINA CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	0.00	5.5	
4	0.00	0.00	5.3	
8	1.66	4.00	4.6	
12	25.00	28.00	3.7	
16	38.33	44.00	3.0	
20	48.33	52.00	2.6	
24	63.33	60.00	2.6	
28	73.33	60.00	2.6	
32	91.66	60.00	2.6	
36	95.00	60.00	2.6	
40	100.00	60.00	2.9	3.15

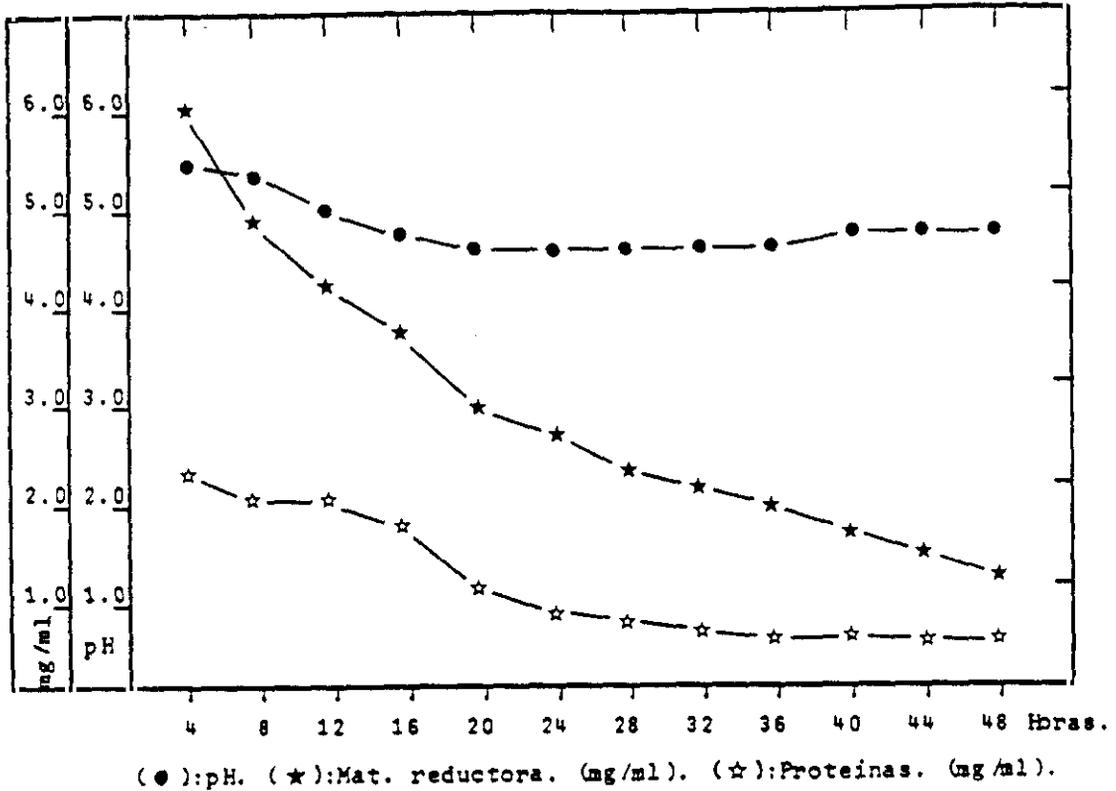


Figura (3.49).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* QM 9414 en el medio de cultivo n° 4 (Hidrolizado + Peptona).

Tabla (2.37).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	PROTEINA CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	0.00	5.5	
4	0.00	10.00	5.3	
8	18.33	20.00	5.2	
12	30.00	20.00	5.0	
16	37.50	30.00	4.7	
20	50.00	56.00	4.6	
24	55.00	68.00	4.6	
28	61.66	72.00	4.6	
32	63.33	76.00	4.6	
36	66.66	84.00	4.6	
40	70.00	84.00	4.7	
44	75.00	84.00	4.7	
44	78.33	84.00	4.7	3.00

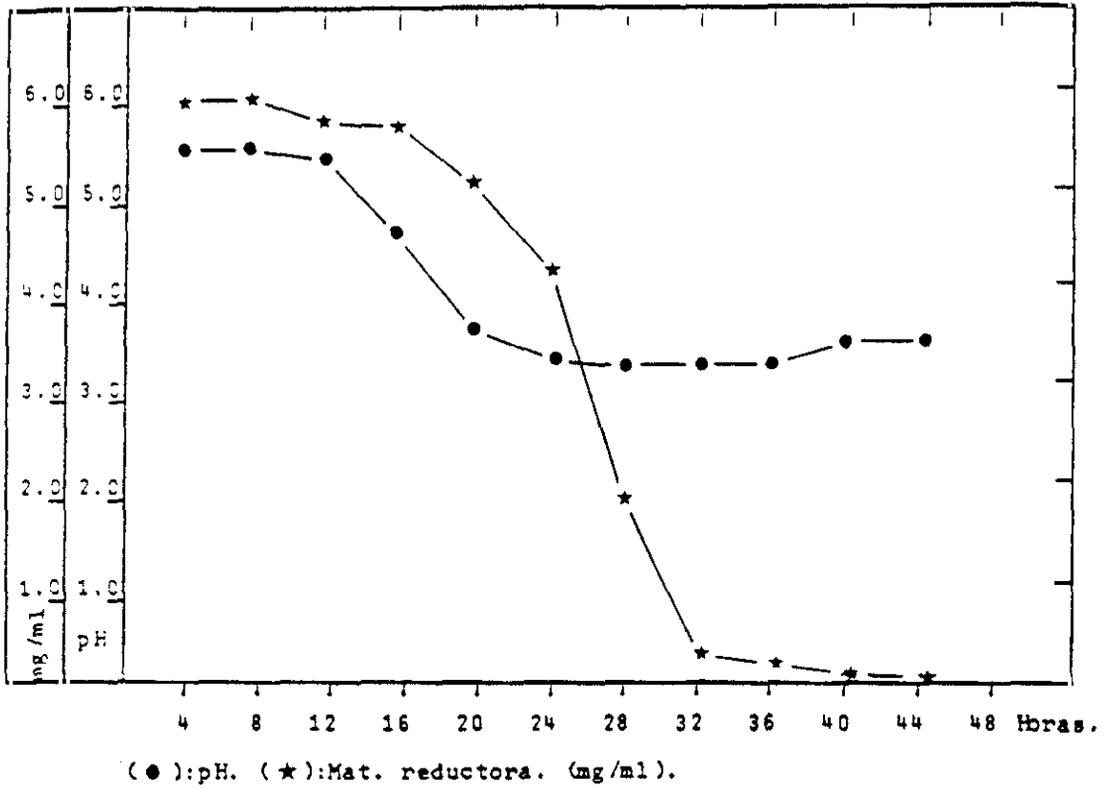


Figura (3.50).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* QM 9414 en el medio de cultivo n° 5 (Hidrolizado + Sales Minerales + Aminoácidos).

Tabla (3.38).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	5.5	
4	0.00	5.5	
8	0.00	5.5	
12	5.00	5.4	
16	6.66	4.6	
20	16.66	3.6	
24	31.66	3.2	
28	65.00	3.1	
32	91.66	3.1	
36	98.33	3.1	
40	99.16	3.2	
44	100.00	3.2	3.04

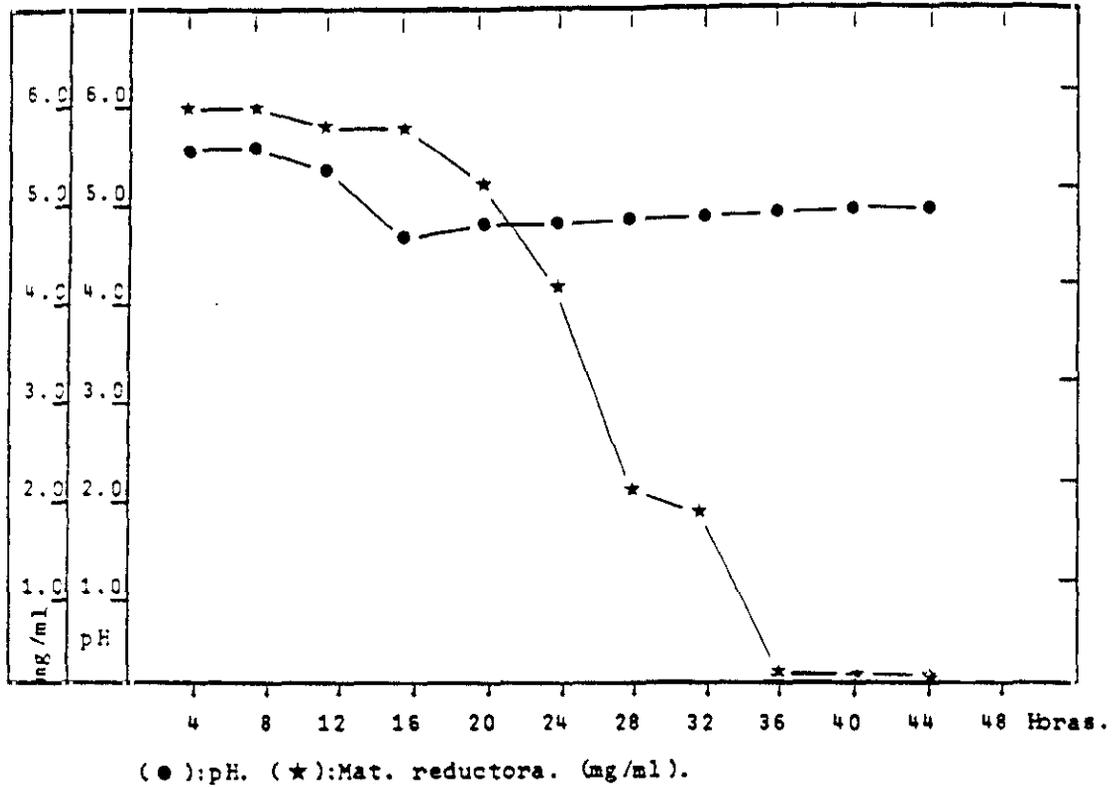
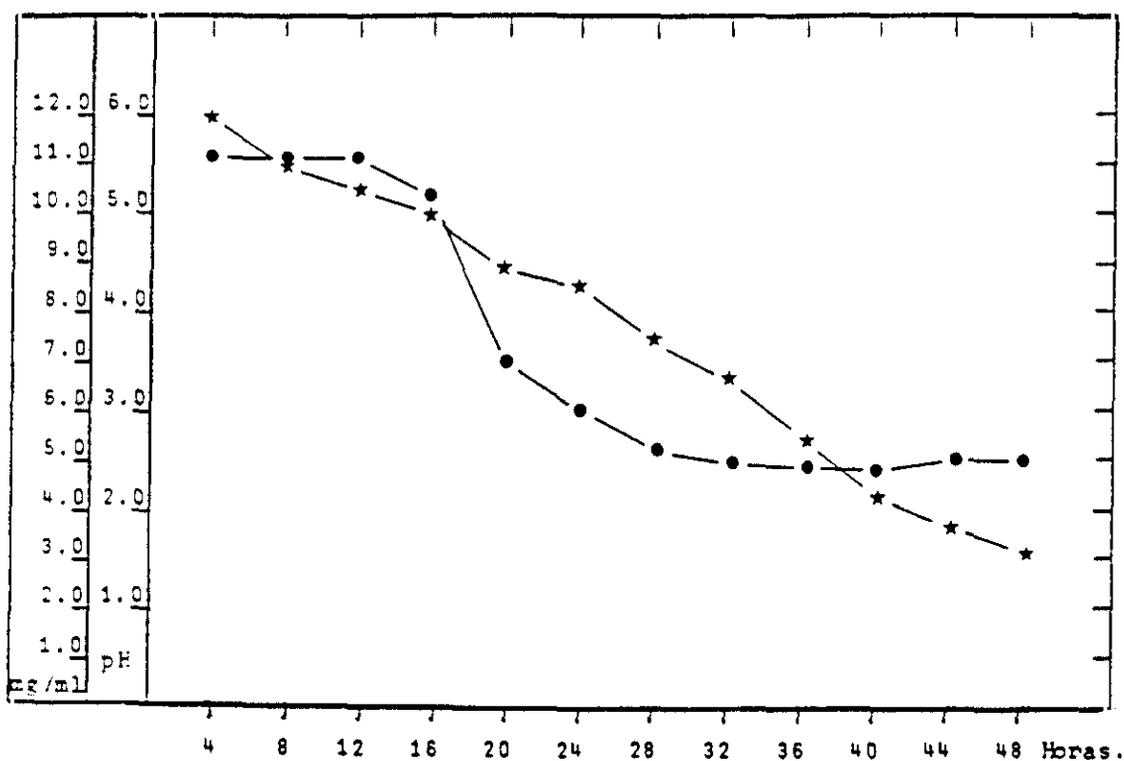


Figura (3.51).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* QM 9414 en el medio de cultivo n° 6 (Hidrolizado + Aminoácidos).

Tabla (3.39).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	5.5	
4	0.00	5.5	
8	0.00	5.5	
12	3.33	5.1	
16	5.00	4.5	
20	6.66	4.7	
24	25.00	4.7	
28	61.66	4.7	
32	66.66	4.7	
36	91.66	4.7	
40	98.33	4.7	
44	100.00	4.7	1.93

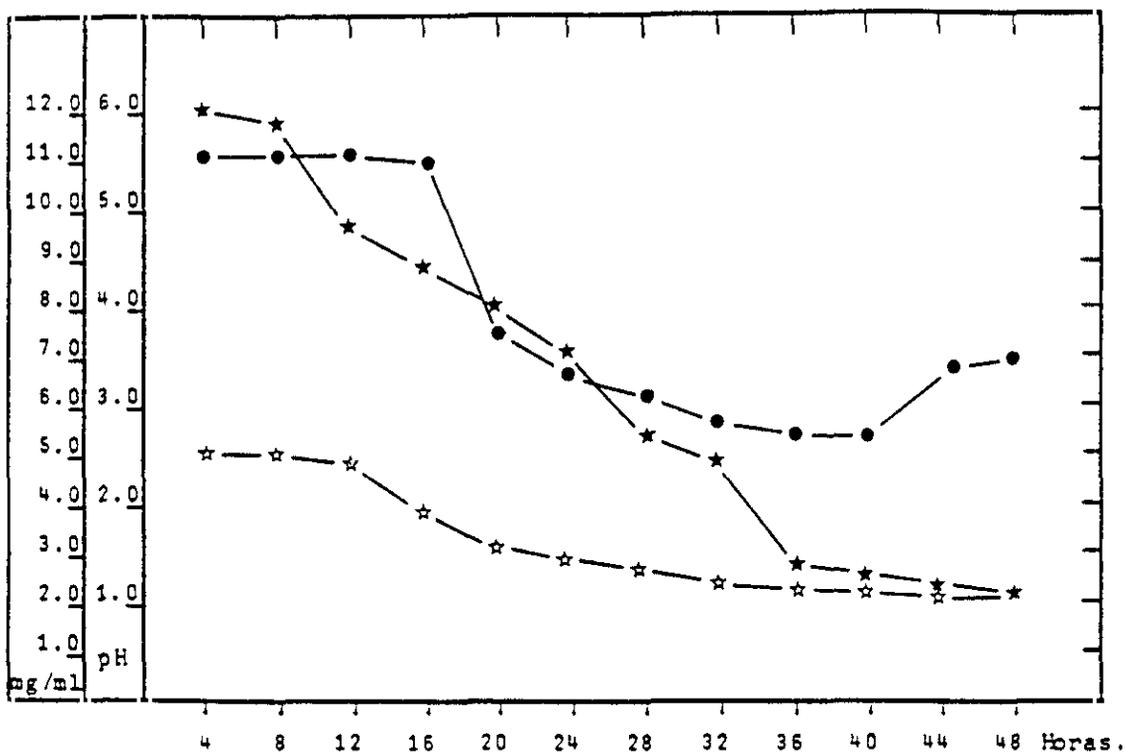


(●):pH. (★):Mat. reductora. (mg/ml).

Figura (3.52).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* QM 9414 en el medio de cultivo n° 7 (2 x Hidrolizado + Sales Minerales).

Tabla (3.40).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	5.5	
4	0.00	5.5	
8	7.50	5.5	
12	12.50	5.5	
16	16.66	5.2	
20	25.00	3.5	
24	27.50	3.1	
28	37.50	2.7	
32	42.50	2.6	
36	53.33	2.5	
40	62.50	2.5	
44	66.66	2.7	
48	70.83	2.7	2.36



(●):pH. (★):Mat. reductora. (mg/ml). (☆):Proteínas. (mg/ml).

Figura (3.53).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* QM 9414 en el medio de cultivo n° 8 (2 x Hidrolizado + Sales Minerales + Peptona).

Tabla (3.41).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	PROTEINA CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	0.00	5.5	
4	0.00	0.00	5.5	
8	2.50	0.00	5.5	
12	19.16	4.00	5.5	
16	25.00	20.00	5.4	
20	32.49	32.00	3.9	
24	40.00	36.00	3.4	
28	55.00	40.00	3.2	
32	57.50	44.00	3.0	
36	75.00	48.00	2.9	
40	76.66	48.00	2.9	
44	77.50	48.00	3.5	
48	79.16	48.00	3.6	2.66

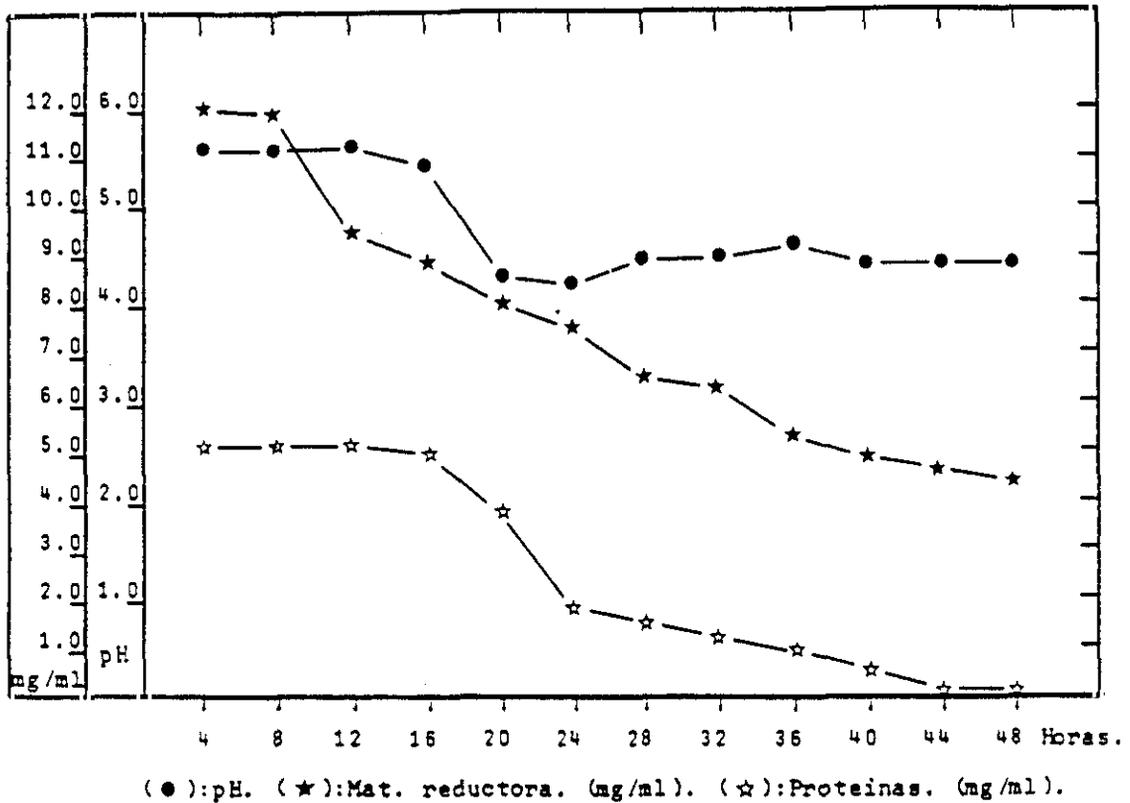


Figura (3.54).- Comportamiento de *Trichoderma reesei* QM 9414 en el medio de cultivo n° 9 (2 x Hidrolizado + Peptona).

Tabla (3.42).-

TIEMPO (h).	MAT. RED. CONSUMIDA (%)	PROTEINA CONSUMIDA (%)	pH	BIOMASA (g/l).
0	0.00	0.00	5.5	
4	0.00	0.00	5.5	
8	2.50	0.00	5.5	
12	20.00	0.00	5.5	
16	25.00	4.00	5.3	
20	32.50	20.00	4.5	
24	35.00	60.00	4.4	
28	42.50	64.00	4.6	
32	45.83	72.00	4.6	
36	54.16	76.00	4.7	
40	57.49	92.00	4.5	
44	59.16	100.00	4.5	
48	60.00	100.00	4.5	1.84

MEDIO DE CULTIVO	TIEMPO DE CONSUMO (h).	AZUCARES CONSUMIDOS (%)	BIOMASA PRODUCIDA g/l.
2	48	80.00	1.54
3	44	100.00	2.60
4	48	86.66	3.19
5	48	65.00	3.90
6	48	39.00	2.49
7	48	50.00	0.98
8	48	68.33	1.71
9	48	66.66	1.68

Tabla (3.55).- Comportamiento de *T. reesei* 2416 en distintos medios de cultivo.

MEDIO DE CULTIVO	TIEMPO DE CONSUMO (h).	AZUCARES CONSUMIDOS (%)	BIOMASA PRODUCIDA g/l.
2	48	25.00	0.53
3	44	43.33	1.95
4	48	38.33	2.35
5	48	53.33	3.15
6	48	31.66	1.89
7	48	28.33	0.66
8	48	36.66	0.96
9	48	41.66	5.08

Tabla (3.56).- Comportamiento de *Ch. globosum* 2103 en distintos medios de cultivo.

MEDIO DE CULTIVO	TIEMPO DE CONSUMO (h).	AZUCARES CONSUMIDOS (%)	BIOMASA PRODUCIDA g/l.
2	48	33.33	1.11
3	48	100.00	2.75
4	48	66.66	2.65
5	48	100.00	2.04
6	48	86.60	1.99
7	48	30.00	0.80
8	48	91.66	3.78
9	48	64.16	2.14

Tabla (3.57).- Comportamiento de *T. reesei* 2415 en distintos medios de cultivo.

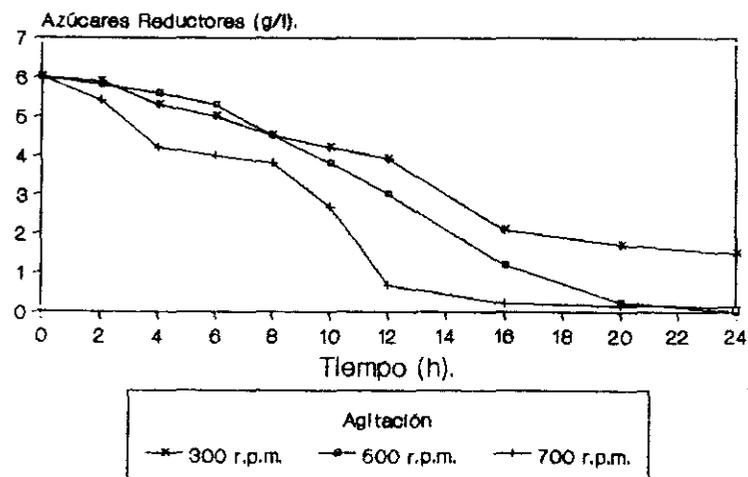
MEDIO DE CULTIVO	TIEMPO DE CONSUMO (h).	AZUCARES CONSUMIDOS (%)	BIOMASA PRODUCIDA g/l.
2	44	100.00	2.02
3	40	100.00	3.15
4	48	78.33	3.00
5	44	100.00	3.04
6	44	100.00	1.93
7	48	70.83	2.36
8	48	79.16	2.66
9	48	60.00	1.84

Tabla (3.58).- Comportamiento de *T. reesei* QM 9414 en distintos medios de cultivo.

MEDIO DE CULTIVO	TIEMPO DE CONSUMO (h).	AZUCARES CONSUMIDOS (%)	BIOMASA PRODUCIDA g/l.
2	44	100.00	2.42
3	48	100.00	2.65
4	48	100.00	2.64
5	44	100.00	2.99
6	44	100.00	3.00
7	48	100.00	3.64
8	40	100.00	2.56
9	44	100.00	3.00

Tabla (3.59).- Comportamiento de *T. harzianum* 2413 en distintos medios de cultivo.

### CONSUMO DE AZUCARES REDUCTORES MEDIO DE CULTIVO 3



### CONSUMO DE AZUCARES REDUCTORES MEDIO DE CULTIVO 10

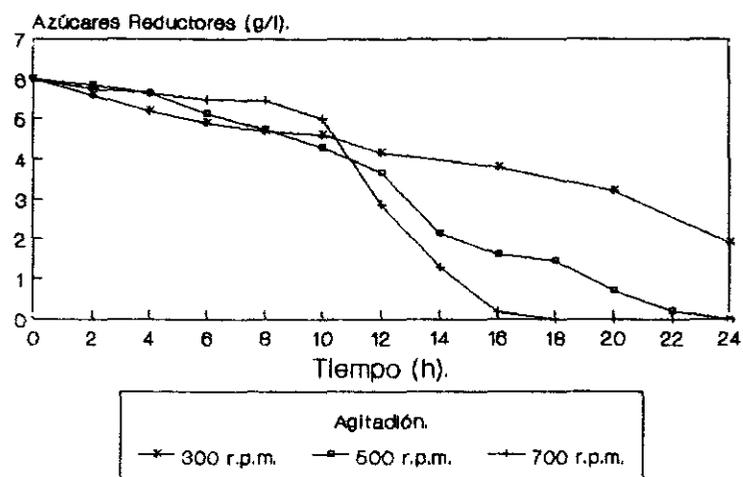


Figura (3.43).- Efecto de la agitación en el consumo de la fuente de carbono por *T. reesei* QM 9414 en dos medios de cultivo con distinta concentración de fosfatos, en fermentador en cultivo en batch.

desrepresión catabólica de la biomasa fúngica producida, biomasa que será destinada a la producción de celulasas.

### 3.8.1.- Efecto de la agitación en el consumo de la fuente de carbono.

Tras seleccionar la fuente de nitrógeno, el medio de cultivo y la Relación C/N más adecuada en este, se procedió a estudiar el efecto de la agitación sobre la velocidad de consumo de la fuente de carbono para mejorar la misma. Se utilizó para tal fin un fermentador de 1.500 ml de capacidad para el cultivo en batch de *T. reesei* QM 9414, se mantuvieron las mismas condiciones de pH inicial y temperatura que las utilizadas en los estudios efectuados con agitación orbital.

Se efectuaron diversas experiencias modificando el régimen de agitación (300, 500 y 700 r.p.m.), efectuando determinaciones de pH, azúcares reductores y biomasa a intervalos de 2 horas durante un periodo de 24 horas.

En la Figura 3.43 se muestran los resultados obtenidos con cada agitación.

### 3.8.2.- Efecto del pH.

Una vez comprobado el efecto positivo de la agitación sobre el consumo de la fuente de carbono, se observó que el aumento en la velocidad de la misma lleva consigo una acidificación del medio de cultivo, planteándose entonces si esta disminución en el valor del pH era la responsable o no del aumento en la velocidad del consumo de la fuente de carbono.

Para comprobar esta hipótesis se diseñó el medio de cultivo nº 10 que quintuplicaba la concentración de fosfato bipotásico del medio de cultivo nº 3 (1 g/l.), ejerciendo de esta forma un efecto amortiguador más grande frente a la acidificación del medio de cultivo.

El valor de pH del medio de cultivo se ajustó a 5.5 efectuándose en él las mismas determinaciones que las descritas en el apartado anterior en el medio de cultivo nº 3.

En la Figura 3.44 se muestran los efectos del aumento de la concentración de fosfato bipotásico en el medio de cultivo sobre la velocidad de consumo de la fuente de carbono.

En la Figura 3.45 se muestra gráficamente la evolución de la asimilación de la fuente de carbono en los medios de cultivo frente a sus respectivos valores de pH.

En la Tabla 3.60 se muestran los valores de azúcar residual, pH y biomasa alcanzados tras doce horas de cultivo.

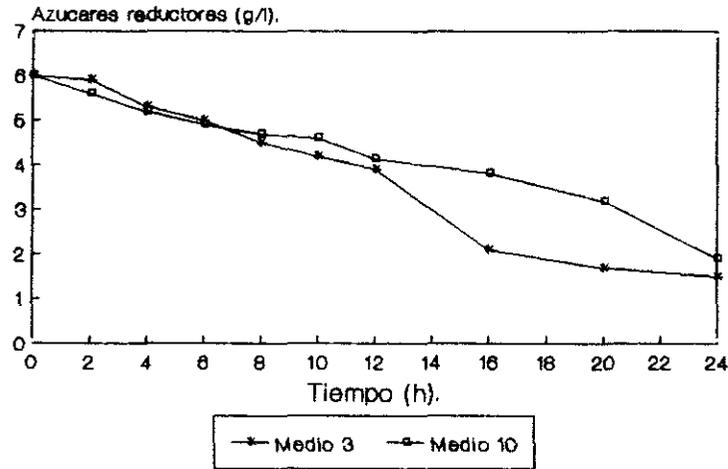
Con estas experiencias se observó que la disminución del valor de pH en el medio parecía ser la causa del aumento de la velocidad de consumo de la fuente de carbono. Para confirmar estos datos, se midió el consumo de azúcares reductores por parte de *T. reesei* QM 9414 a distintos valores de pH. Para ello se tamponó el medio de cultivo a valores de pH entre 2.5 y 5.5 manteniéndose estos valores a lo largo de todo el ensayo. Tras 24 horas de cultivo en matraces de 250 ml en agitación orbital (250 r.p.m.), se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 3.46.

En la Tabla 3.61 se muestran los valores de pH, biomasa y azúcar consumida al final del proceso, así como las constantes cinéticas obtenidas para cada valor de pH.

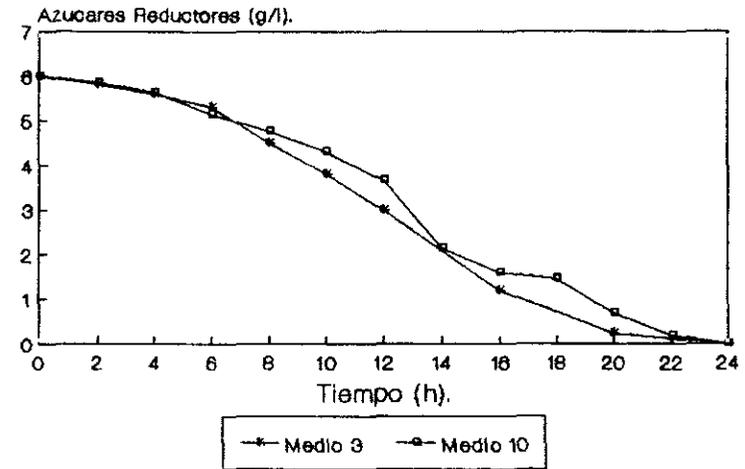
Estas experiencias confirmaron que es el pH y no la disponibilidad de oxígeno la responsable final del aumento en la velocidad de consumo de la fuente de carbono.

En la Figura 3.47 se muestra la Relación entre los valores de pH del medio y la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ).

**CONSUMO DE AZUCARES REDUCTORES  
300 r.p.m.**



**CONSUMO DE AZUCARES REDUCTORES  
500 r.p.m.**



**CONSUMO DE AZUCARES REDUCTORES  
700 r.p.m.**

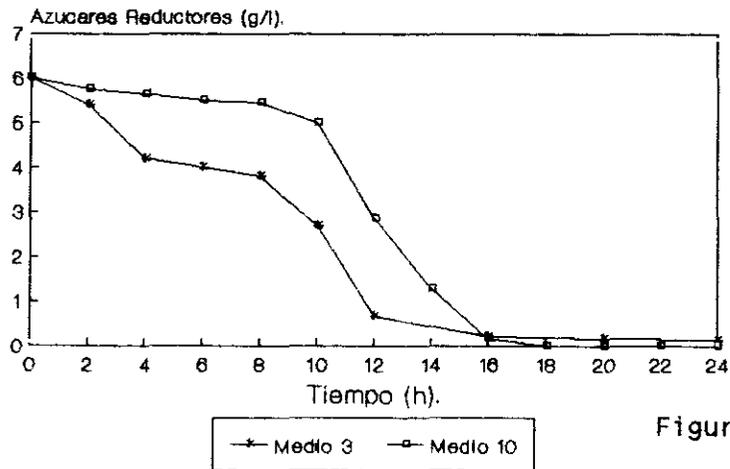


Figura (3.44).- Efecto de la concentración de fosfatos en el consumo de la fuente de carbono por *T. reesei* QM 9414 con distintas agitaciones en fermentador en cultivo en batch.

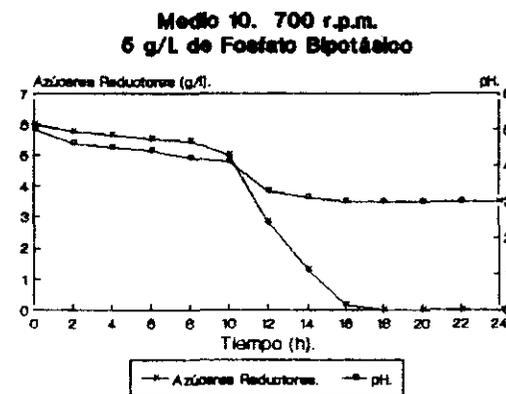
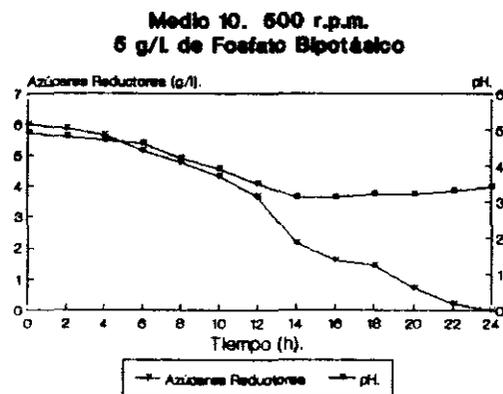
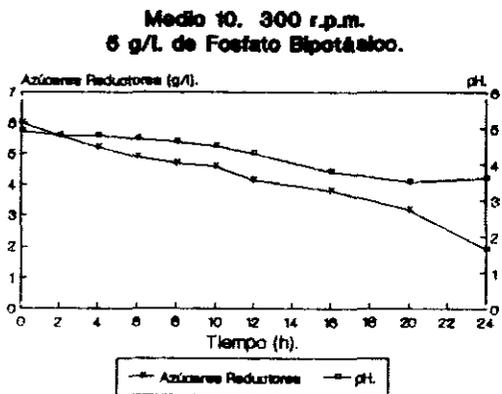
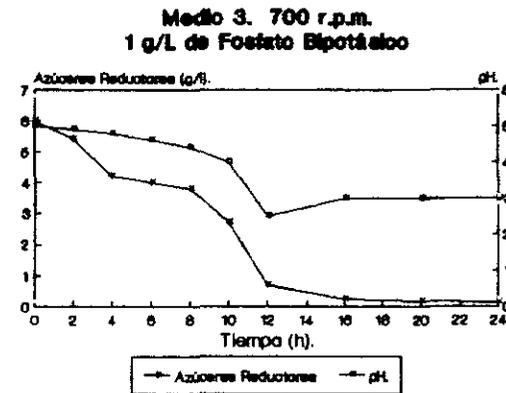
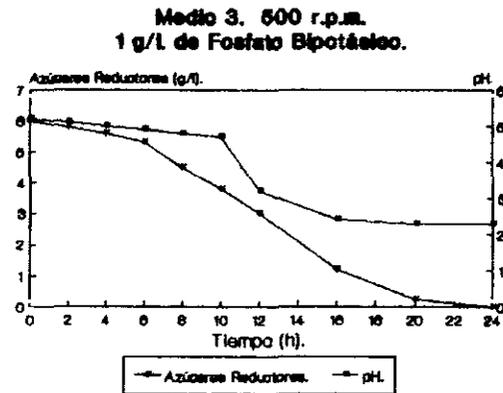
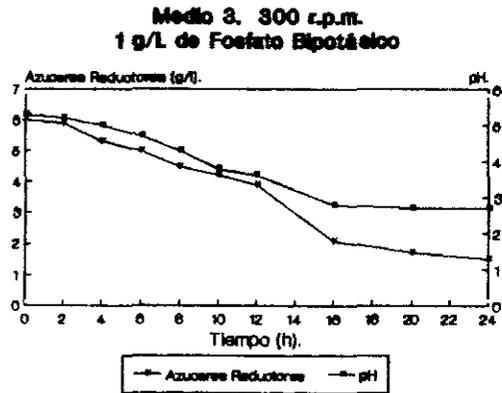


Figura (3.45).- Evolución del consumo de azúcares reductores y pH de *T. reesei* QM 9414 en dos medios de cultivo modificando el régimen de agitación, en fermentador en cultivo en batch.

MEDIO DE CULTIVO	R.P.M.	AZUCARES CONSUMIDOS g/l.	VALOR DE pH FINAL
3	300	2.10	3.6
	500	3.00	3.2
	700	5.33	2.5
10	300	1.85	4.3
	500	2.33	3.5
	700	3.15	3.3

Tabla (3.60).- Influencia de los valores de pH en la asimilación de la fuente de carbono por *T. reesei* QM 9414 tras 12 horas de cultivo en Fermentador en Batch a 28°C con 1 volumen de aire por litro de medio de cultivo por minuto.

## PARAMETROS CINETICOS Agitación Orbital (250 r.p.m.)

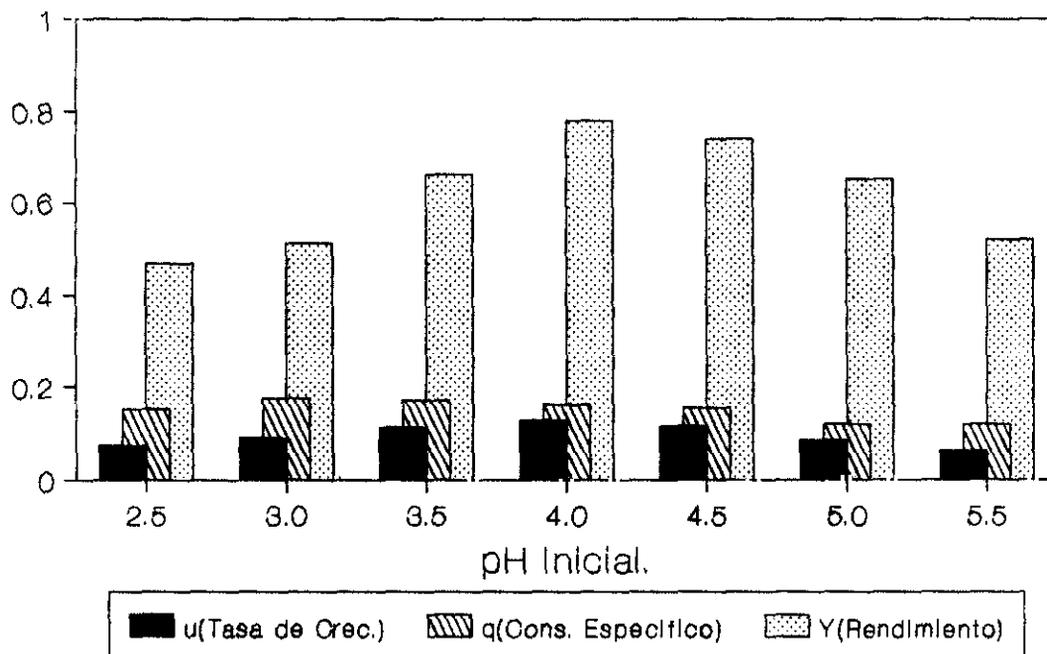


Figura (3.46).- Constantes de crecimiento de *T. reesei* QM 9414 tamponando el medio de cultivo a distintos valores de pH.

VALOR DE pH	AZUCARES		Y g/g.	$\mu$ 1/h.	q g/g.h
	BIOMASA g/l.	CONSUMIDOS g/l.			
2.5	1.41	3.00	0.470	0.073	0.155
3.0	2.21	4.30	0.513	0.090	0.175
3.5	2.91	4.40	0.661	0.114	0.172
4.0	3.51	4.50	0.780	0.126	0.161
4.5	2.30	3.10	0.741	0.115	0.155
5.0	1.81	2.75	0.650	0.086	0.119
5.5	1.11	2.10	0.520	0.062	0.119

Tabla (3.61).- Efecto de los valores de pH sobre la metabolización de la fuente de carbono y la producción de biomasa.

Se calculó la energía de mantenimiento celular de *T. reesei* QM 9414 para poder conocer la energía que dedica este microorganismo al crecimiento y la destinada a mantener sus estructuras y su maquinaria metabólica. En la Figura 3.48 se representa gráficamente la obtención de la misma.

### 3.8.3.- Efecto de la Fuente de Nitrógeno.

Para comprobar nuevamente el efecto de la adición de peptona frente a las sales minerales sobre el consumo de la fuente de carbono por parte de *T. reesei* QM 9414, y producir biomasa abundante, se sustituyó la peptona como fuente de nitrógeno orgánico, por una inorgánica como el nitrato amónico en la misma proporción, manteniendo constantes el resto de los componentes del medio de cultivo.

Las condiciones utilizadas en este proceso, fueron seleccionadas a partir de los resultados obtenidos en apartados anteriores.

En la Figura 3.49. se muestra la evolución de la asimilación de la fuente de carbono, la producción de biomasa y la variación del pH a lo largo de todo el proceso, utilizando tanto nitrato amónico como peptona como fuente de nitrógeno.

### 3.9.- CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE T. REESEI QM 9414. EN CONDICIONES OPTIMAS.

Tras analizar la influencia de cada uno de los parámetros estudiados en el apartado (3.8). Se determinaron las condiciones y los parámetros cinéticos que permitieron la mejora en el consumo de la fuente de carbono y la producción de biomasa.

En la Figura 3.50, se muestra la cinética de crecimiento de *T. reesei* QM 9414, para las mejores condiciones de cultivo.

## RELACION ENTRE $\mu$ y EL pH.

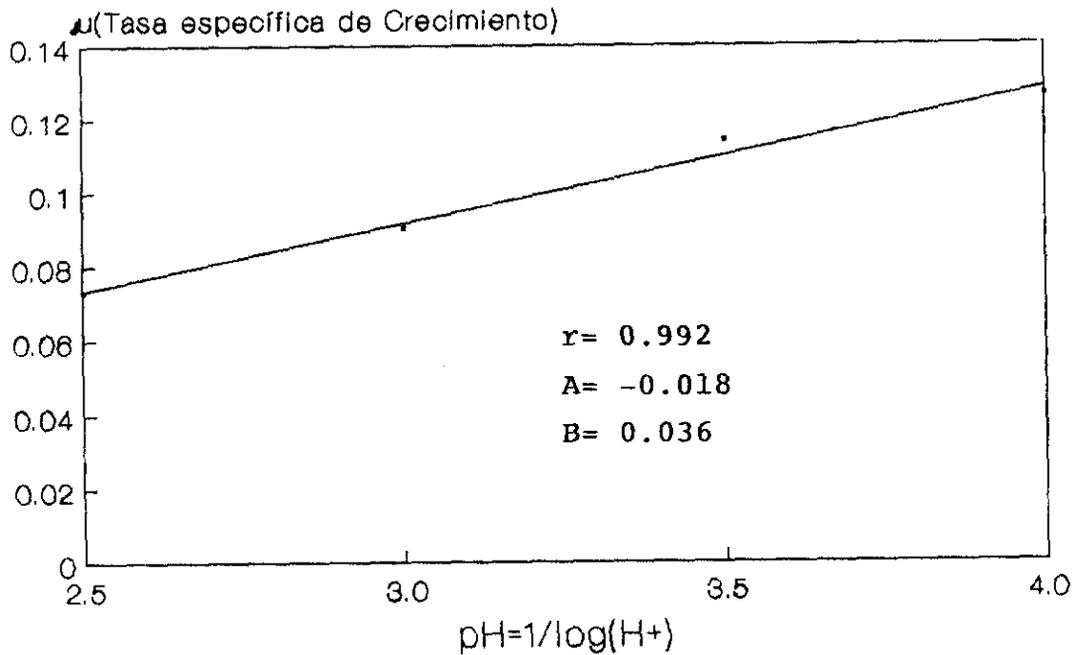


Figura (3.47).- Relación entre las tasa específicas de crecimiento de *T. reesei* QM 9414 cultivado en batch a distintos valores de pH.

## CALCULO DE LA ENERGIA DE MANTENIMIENTO DE *T. REESEI* QM 9414

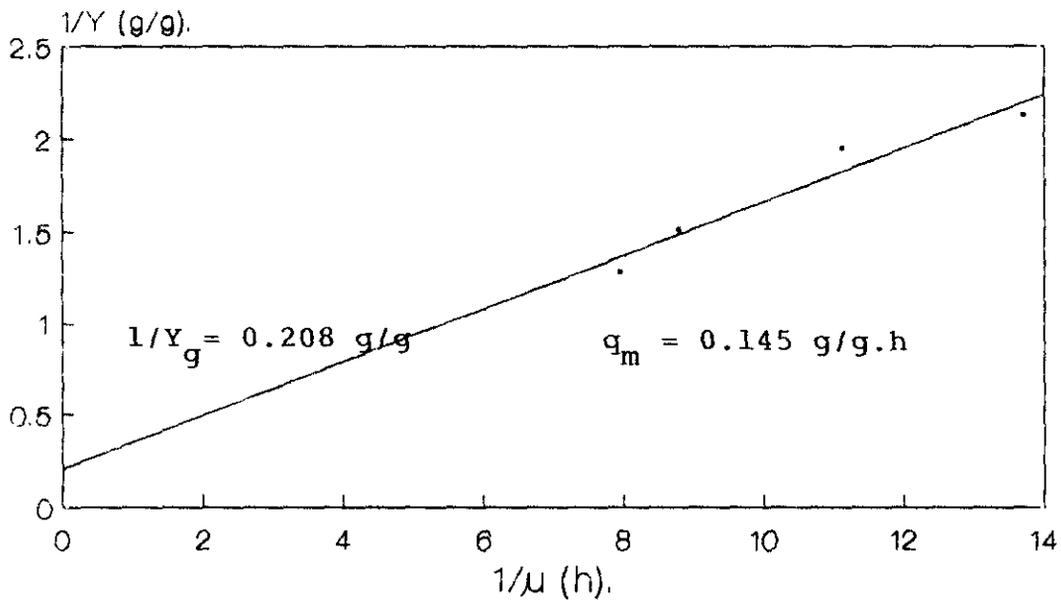
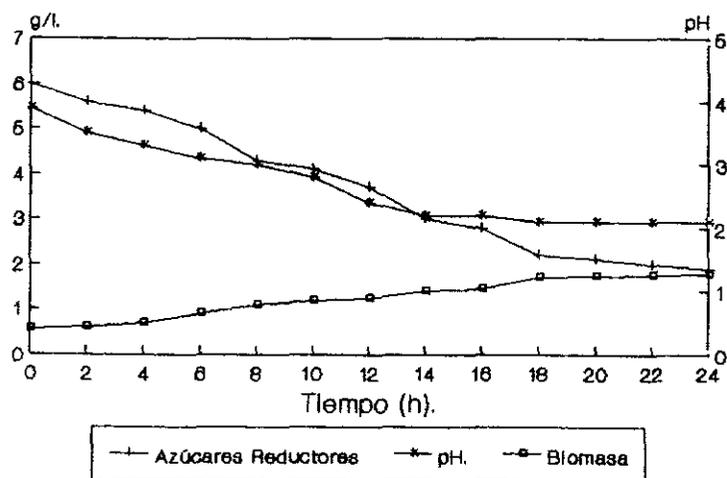


Figura (3.48).- Cálculo de la energía de mantenimiento de *T. reesei* QM 9414 en cultivo en batch.

**NITRATO AMONICO 2.5 g/L pH 4.0**  
**28°C 500 r.p.m.**



**PEPTONA 2.5 g/L pH 4.0**  
**28°C 500 r.p.m.**

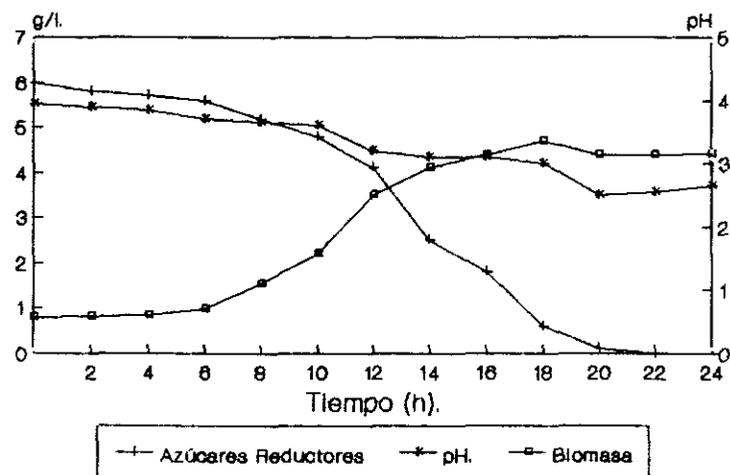


Figura (3.49).- Comportamiento de *T. reesei* QM 9414 a 500 r.p.m. en cultivo en batch en fermentador con distintas fuentes de nitrógeno.

En la Tabla 3.62, se muestran comparativamente los valores de los parámetros calculados en las condiciones más significativas.

### 3.10.- ESTUDIOS DE CONSUMO DE LA FUENTE DE CARBONO POR RESPIROMETRIA.

Para poder efectuar comparaciones a través de distintos métodos del efecto del pH sobre la asimilación de la fuente de carbono por *T. reesei QM 9414*, fueron empleadas técnicas respirométricas. Con estas técnicas mucho más sensibles que la valoración de azúcares, se determinó la capacidad respiratoria del micelio metabólicamente activo de *T. reesei QM 9414*, extraído de un cultivo en la fase exponencial.

El micelio fue resuspendido en tampón acetato con valores de pH de 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, y 4.5.

Posteriormente, se dispuso este micelio en las vasijas del aparato de Warburg y se les dio un pulso de glucosa (6 g/l.), de 0.5 ml, midiéndose a continuación el oxígeno consumido en el proceso respiratorio.

En la Tabla 3.63, se muestran los valores de oxígeno consumido obtenidos frente a los distintos valores de pH empleados en los distintos intervalos de tiempo.

En la Figura 3.51, se calcula gráficamente la velocidad de consumo de oxígeno para cada valor de pH, y en la Tabla 3.64, se muestran los mismos.

En la Tabla 3.65, Se muestran las tasas específicas de consumo de oxígeno obtenidas para cada valor de pH.

En la Figura 3.52, se representa esquemáticamente la Relación entre  $qO_2$  y la concentración de protones del medio de cultivo.

MEDIO DE CULTIVO	pH INICIAL	$\mu$ 1/h.	q g/g.h	Y g/g.
3	5.5	0.100	0.162	0.615
3	4.0	0.183	0.233	0.782
11	4.0	0.041	0.143	0.285

Tabla (3.62.).- Parámetros cinéticos obtenidos con los mejores medios de cultivo en las mejores condiciones de crecimiento.

## CURVA DE CRECIMIENTO DE T. REESEI QM9414 EN CONDICIONES OPTIMAS

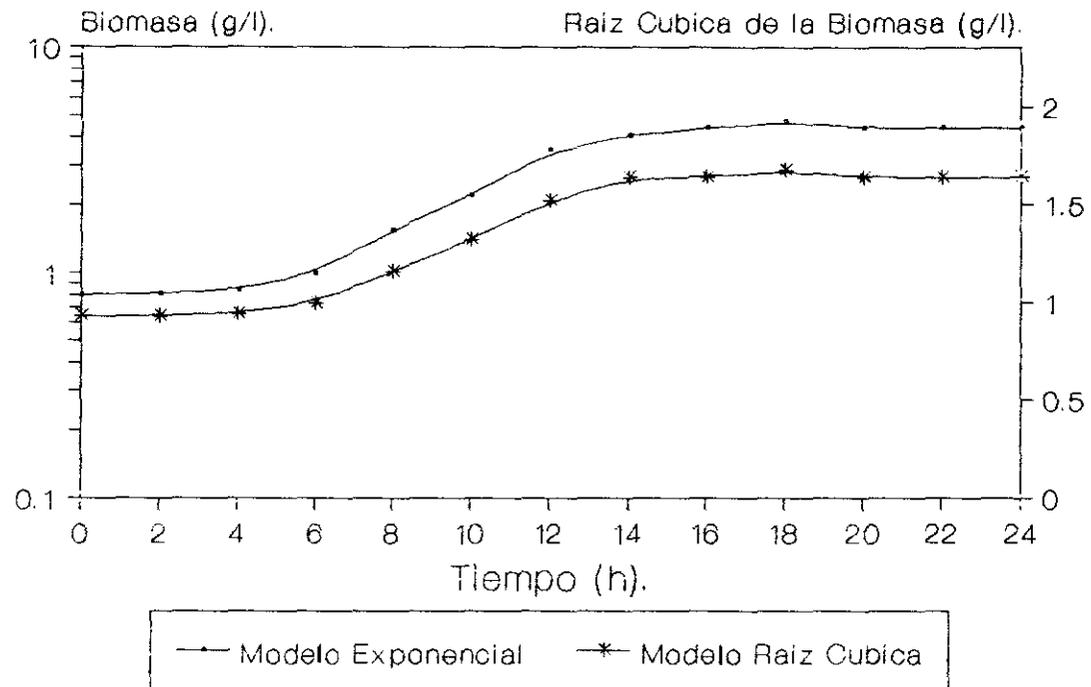


Figura (3.50).- Cinética de crecimiento de T. reesei QM 9414 para las mejores condiciones de cultivo aplicando los modelos de crecimiento exponencial y en raíz cúbica.

## CONSUMO DE OXIGENO A DISTINTOS VALORES DE pH.

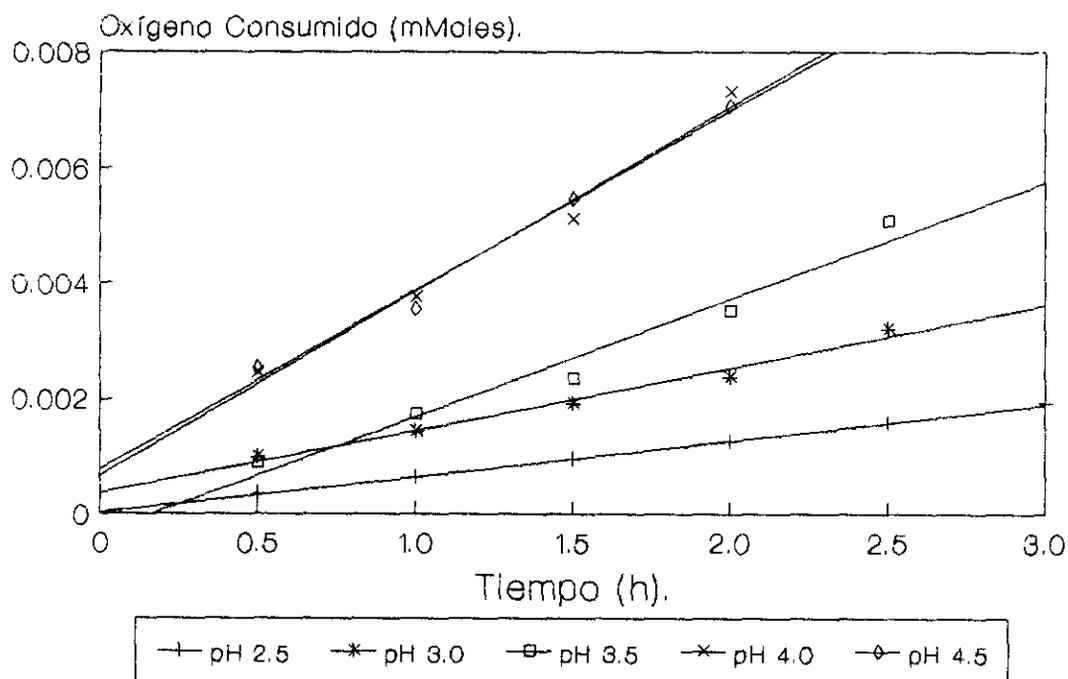


Figura (3.51).- Velocidad de consumo de oxígeno de *T. reesei* QM 9414 a distintos valores de pH.

VALOR DE pH	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5
TIEMPO (h).	Oxígeno Consumido mMoles.				
0.00	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.50	3.50 E-4	9.98 E-4	8.84 E-4	2.45 E-3	2.53 E-3
1.00	6.41 E-4	1.44 E-3	1.73 E-3	3.74 E-3	3.53 E-3
1.50	9.56 E-4	1.92 E-3	2.35 E-3	5.13 E-3	5.46 E-3
2.00	1.27 E-3	2.39 E-3	3.51 E-3	7.31 E-3	7.06 E-3
2.50	1.58 E-3	3.22 E-3	5.08 E-3	7.18 E-3	7.09 E-3
3.00	1.93 E-3	3.14 E-3	5.90 E-3	7.16 E-3	7.11 E-3

Tabla 3.63.- Efecto del valor de pH en el consumo de oxígeno por parte de *T. reesei* QM 9414.

## RELACION ENTRE LA TASA ESPECIFICA DE CONSUMO DE OXIGENO Y LOS VALORES DE pH

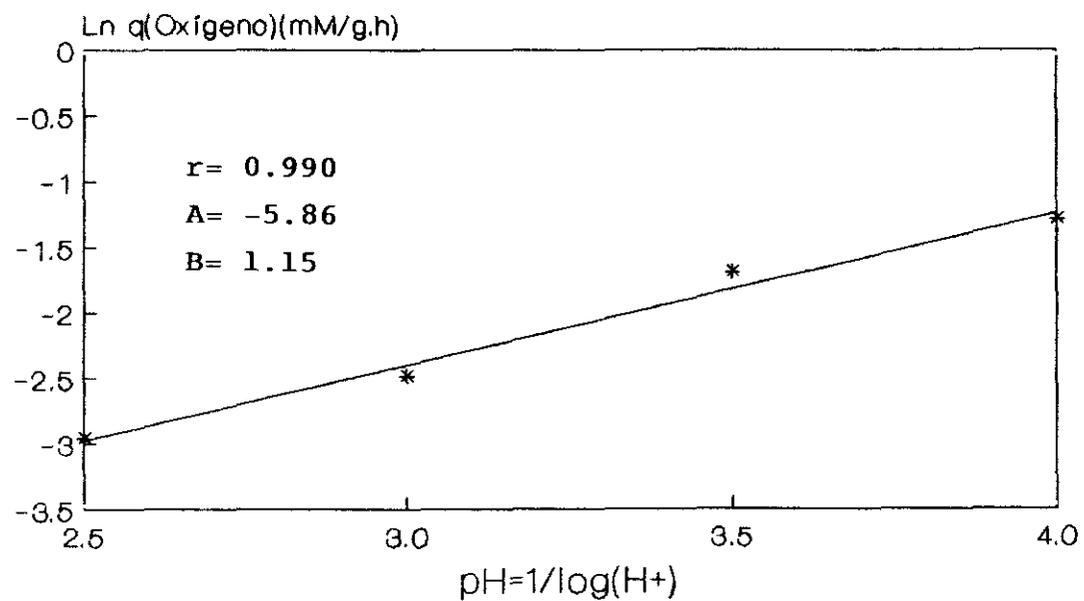


Figura (3.52).- Relación entre las tasas específicas de consumo de oxígeno de *T. reesei* QM 9414 a distintos valores de pH.

VALOR DE pH	A	B	r
2.5	1.80 E-5	6.30 E-4	0.999
3.0	3.75 E-4	1.07 E-3	0.990
3.5	-3.86 E-4	2.07 E-3	0.991
4.0	-6.65 E-4	3.19 E-3	0.991
4.5	-7.65 E-4	3.10 E-3	0.993

Tabla 3.64.- Coeficientes de las ecuaciones de regresión para los distintos valores de pH.

$$y = Bx + A$$

donde

A: Ordenada en el origen.

B: Pendiente de la recta. (Velocidad de consumo de oxígeno expresada en mMol/h.).

r: Coeficiente de Correlación.

VALOR DE pH	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5
BIOMASA g	0.0121	0.0128	0.0112	0.0116	0.0128
qO <sub>2</sub> mMol/g/h	0.0520	0.0835	0.1848	0.2750	0.2420

Tabla 3.65.- Biomasa responsable del consumo de oxígeno en cada matraz, y tasas específicas de consumo de oxígeno obtenidas para cada valor de pH con estas biomazas.

### 3.11.- MODELOS MATEMATICOS QUE DESCRIBEN EL CRECIMIENTO DE T. REESEI QM 9414. EN CULTIVO SUMERGIDO.

Para determinar la forma en la que se desarrolla el micelio de *T. reesei QM 9414* en cultivo sumergido, se efectuaron distintas experiencias en fermentador en cultivo en batch, frente a distintas condiciones de agitación, pH, adición de nutrientes etc...

Durante todo el periodo de crecimiento se extrajeron muestras de 20 ml. para determinar la biomasa presente en el cultivo en cada momento.

Los resultados que se obtuvieron se ajustaron a los modelos matemáticos descritos por Monod en 1942 y Pirt en 1966.

Los datos que se obtuvieron para las distintas condiciones se muestran gráficamente en las Figuras 3.53 y 3.54.

En la Figura 3.55, se muestra la distribución estadística de los coeficientes de correlación obtenidos al ajustar los datos experimentales a cada uno de los modelos de crecimiento.

En la Tabla 3.66, se muestran los parámetros cinéticos obtenidos para cada una de las condiciones ensayadas.

En las Figuras 3.56.1 y 3.56.2, se muestra a microscopia óptica el crecimiento de *T. reesei QM 9414*, frente al de *Chaetomium globosum* 2103. Así mismo en las Figuras 3.57.1 y 3.57.2, se muestra con más detalle dicho desarrollo a microscopia electrónica de barrido.

## DISTRIBUCION DE LOS COEFICIENTES DE CORRELACION ENTRE LOS MODELOS

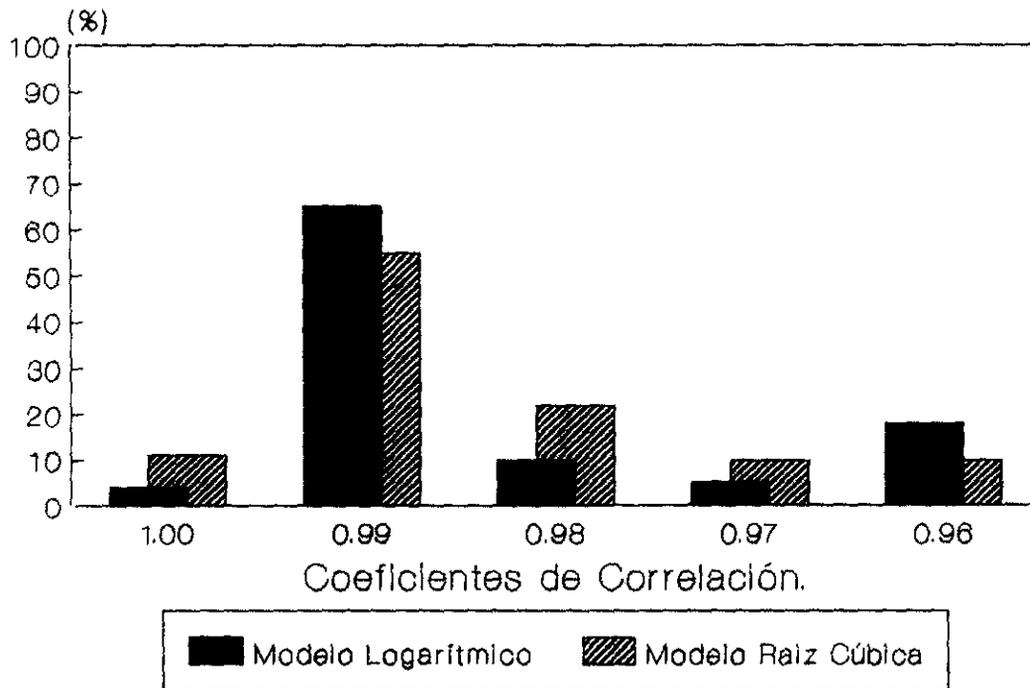


Figura (3.55).- Distribución de los coeficientes de correlación de las rectas obtenidas ajustando los datos del crecimiento de *T. reesei* QM 9414 a dos modelos de crecimiento.

AGITACION	1 g/l Fosfato Bipotásico			5 g/l Fosfato Bipotásico			pH Inicial
	$\mu(h^{-1})$	$Y(g/g)$	$q(g/g.h)$	$\mu(h^{-1})$	$Y(g/g)$	$q(g/g.h)$	
300 r.p.m.	0.028	0.166	0.156	0.104	0.954	0.092	5.5
	0.083	0.645	0.097	0.032	0.346	0.092	
500 r.p.m.	0.055	0.363	0.999	0.164	0.960	0.170	5.5
	0.100	0.615	0.162	0.107	0.714	0.149	
	0.027	0.680	0.039	0.102	0.222	0.459	
700 r.p.m.	0.048	0.168	0.285	0.094	0.850	0.114	5.5
	0.024	0.200	0.120	0.225	0.513	0.438	
				0.049	0.538	0.091	
500 r.p.m.	0.183	0.783	0.223				4.0

Tabla (3.66).- Parámetros cinéticos obtenidos a partir de distintas condiciones de cultivo utilizando *T. reesei* QM 9414.

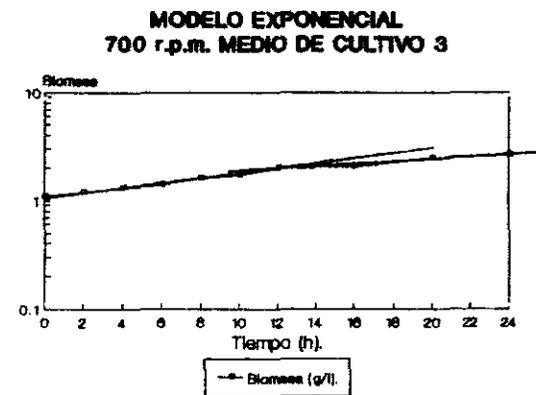
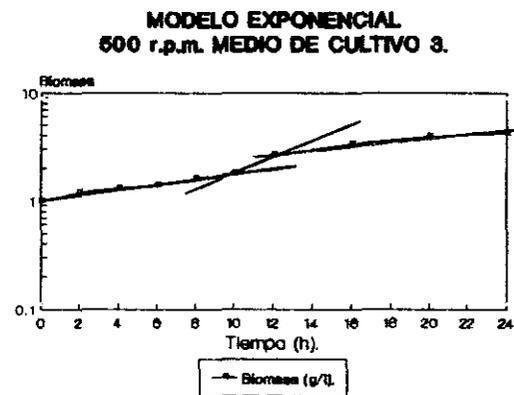
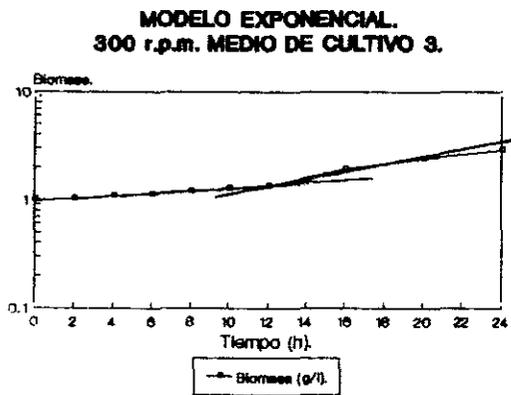
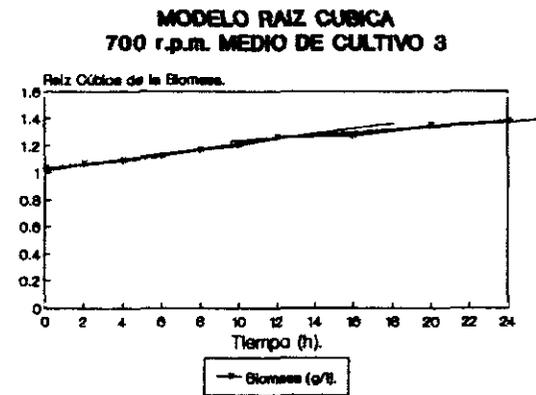
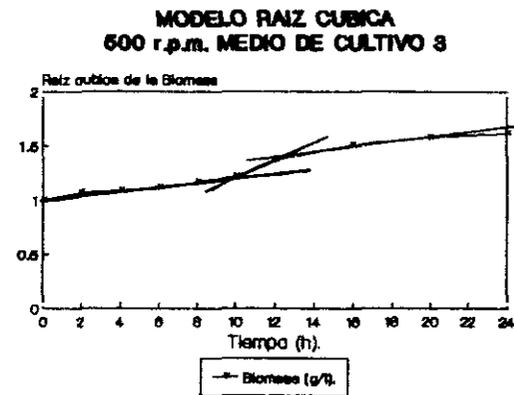
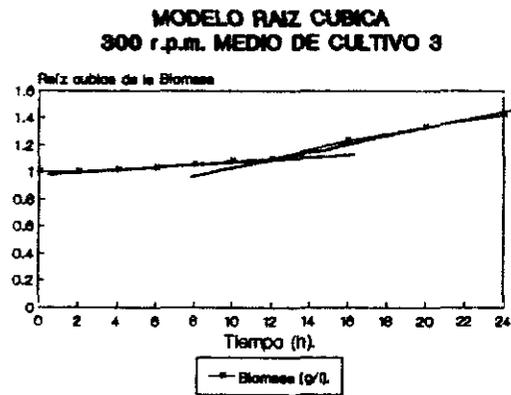


Figura (3.53).- Cinéticas de crecimiento de *T. reesei* QM 9414 en distintas condiciones de cultivo ajustadas a los modelos de crecimiento exponencial y en raíz cúbica

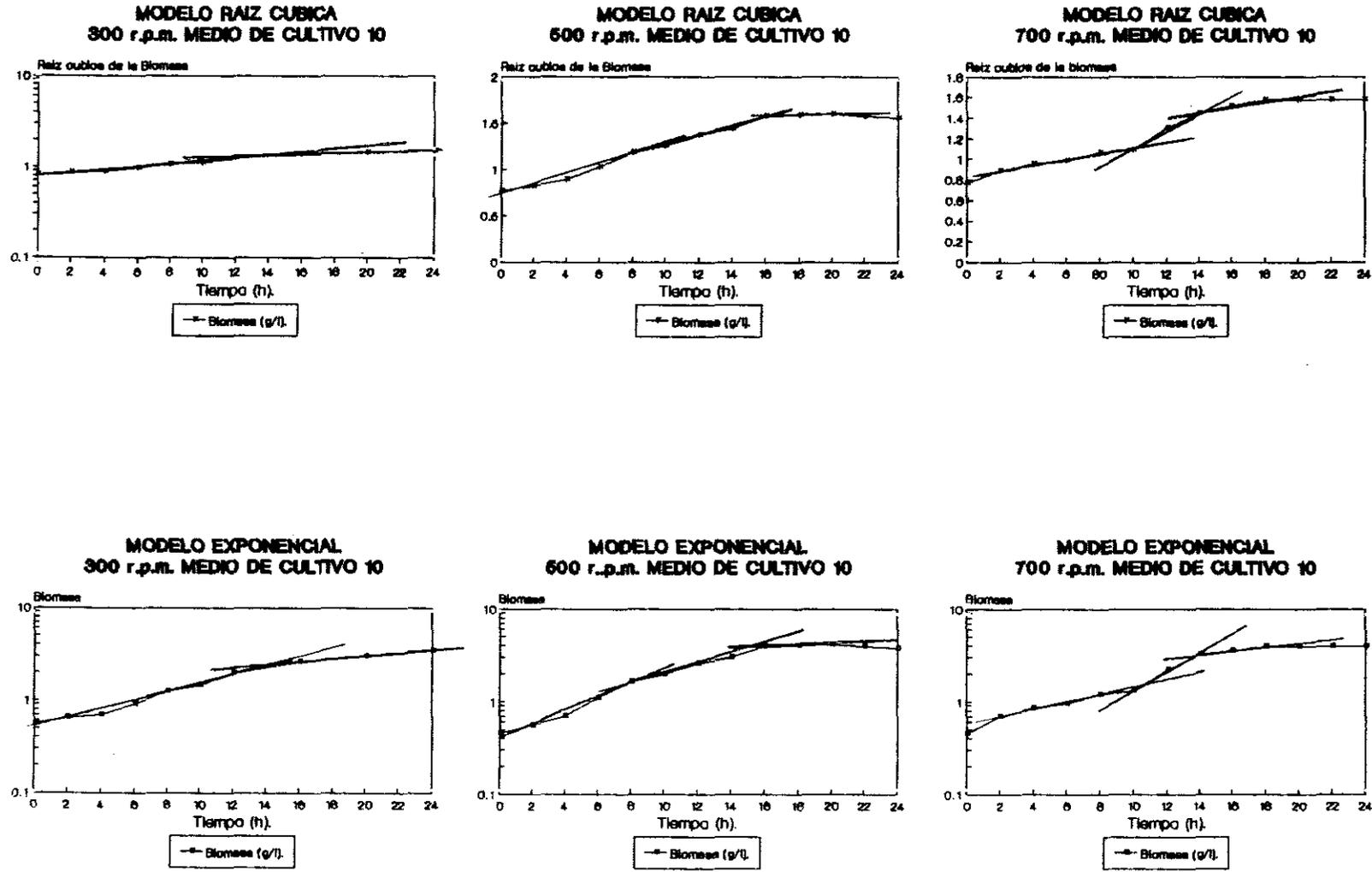


Figura (3.54).- Cinéticas de crecimiento de *T. reesei* QM 9414 en distintas condiciones de cultivo ajustadas a los modelos de crecimiento exponencial y en raíz cúbica.

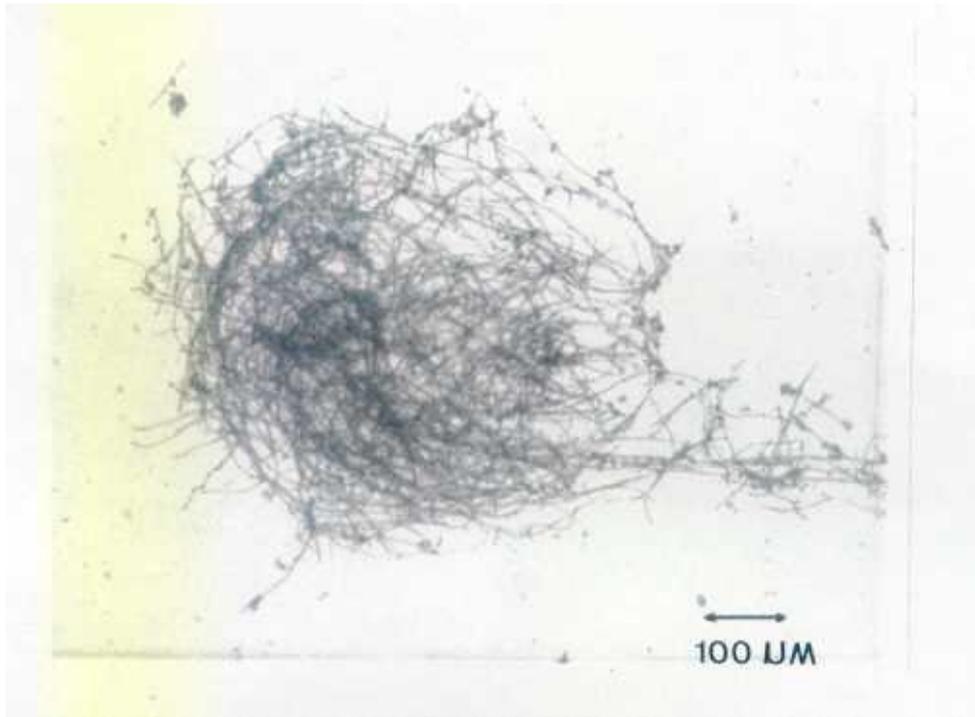


Figura (3.56.1).- Pellet que desarrolla *Trichoderma reesei* QM 9414 en cultivo sumergido.

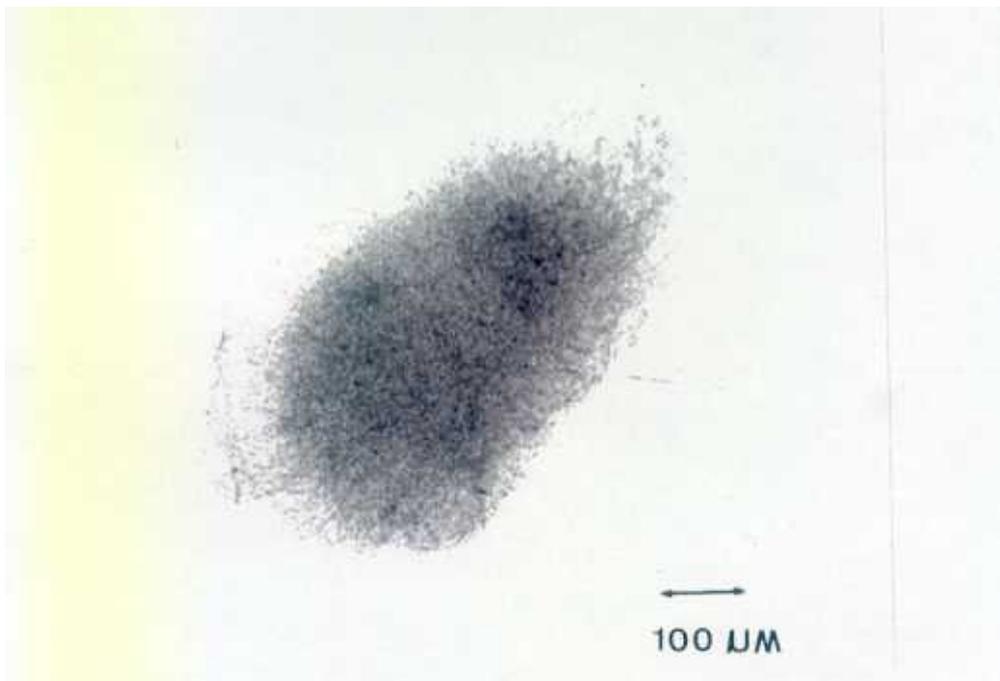


Figura (3.56.2).- Pellet desarrollado por *Chaetomium globus* 2103 en cultivo sumergido.



Figura (3.57.1).- Detalle del micelio de *Trichoderma reesei* QM 9414 mostrando las hifas disgregadas.



Figura (3.57.2).- Detalle de los peritecios de *Chaetomium globosum* 2103, responsables del crecimiento en pellet denso del mismo.

### 3.12.- PRODUCCION ENZIMATICA.

#### 3.12.1.- Ensayos previos con distintas sustancias (Inductores y Represores).

Con el fin de determinar el comportamiento de *T. reesei* QM 9414. frente a distintas fuentes de carbono descritas como potenciales inductores y represores del complejo enzimático celulolítico, se llevaron a cabo diversos ensayos en matraz donde el hongo filamentoso fue crecido en el medio de cultivo n° 3 a pH 4.0 según el procedimiento descrito en el apartado (2.11.1.).

Tras concluir la fase de crecimiento, se procedió a la incorporación de las distintas sustancias a ensayar, ajustando nuevamente el pH a su valor inicial de 4.0 y tomando muestras cada 24 horas durante un periodo de 264 horas, determinando glucosa libre y las actividades endoglucanasa, exoglucanasa,  $\beta$ -glucosidasa y la actividad de papel de filtro (F.P.A.)

El interés de esta experiencia radicó en que además de conocer los valores de las distintas actividades que conforman el complejo celulolítico sobre cada sustrato empleado, conocer en que periodo de tiempo se producen y cuales son los valores máximos de actividad.

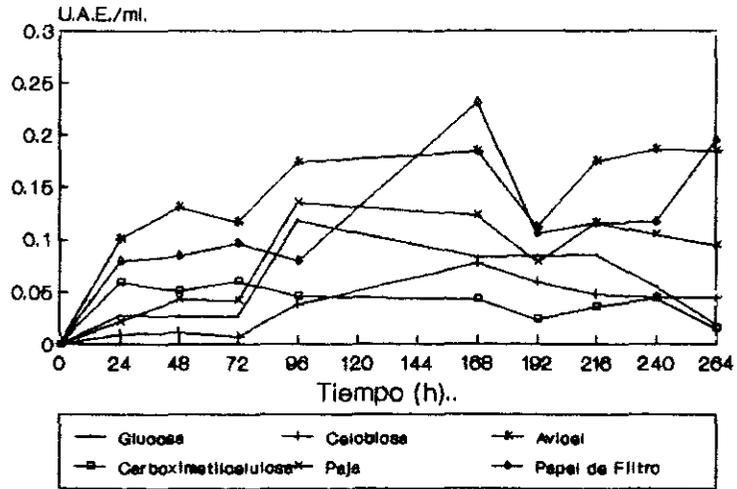
Las sustancias empleadas fueron:

- |              |          |                    |
|--------------|----------|--------------------|
| - Glucosa.   | - C.M.C. | - Avicel.          |
| - Celobiosa. | - Paja.  | - Papel de Filtro. |

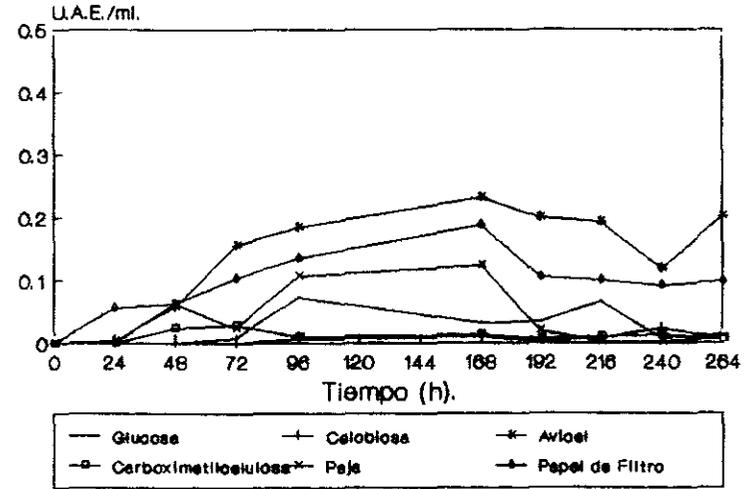
Todas ellas a una concentración final de 2.5 g/l.

Con los resultados obtenidos tras 11 días, y que aparecen en la Figura 3.58, puede observarse que tanto la glucosa, celobiosa y la carboximetilcelulosa resultan sustancias represoras de la síntesis del complejo enzimático celulolítico. Con glucosa y celobiosa los niveles de actividad durante todo el ensayo están próximos a cero, tanto

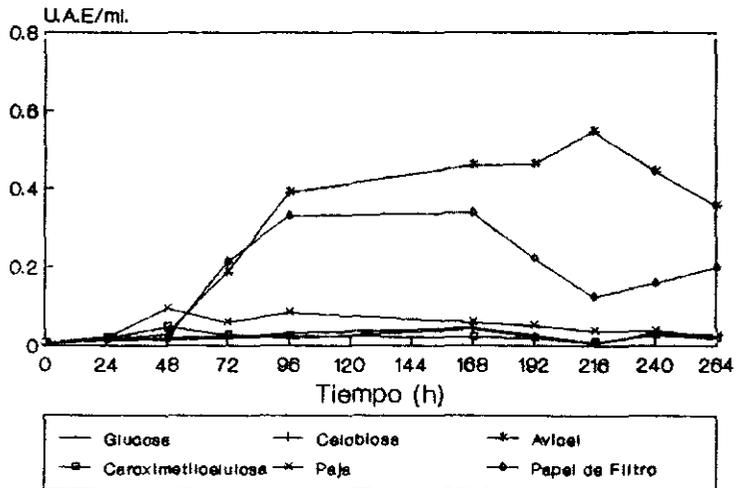
### ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA



### ACTIVIDAD EXOGLUCANASA



### ACTIVIDAD B-GLUCOSIDASA



### ACTIVIDAD DE PAPEL DE FILTRO

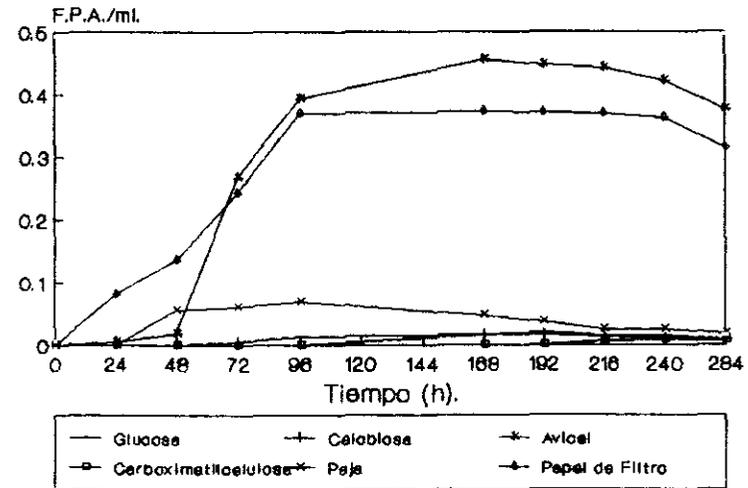


Figura (3.58).- Comportamiento de las distintas actividades del complejo celulolítico de *T. reesei* QM 9414 sobre distintas fuentes de carbono.

cuando se determina la actividad del complejo total (Actividad de papel de filtro F.P.A.), como cuando se determinan las actividades del complejo por separado (Endoglucanasa, Exoglucanasa,  $\beta$ -Glucosidasa).

La carboximetilcelulosa si bien no produce inducción del complejo enzimático completo si muestra ciertos niveles de inducción sobre la actividad endoglucanasa (aunque muy bajos 0.05 U.A.E./ml.) tras 24 horas de la adición de dicha sustancia.

La paja de alfalfa, aunque no manifiesta una capacidad inductora notable sobre el complejo enzimático, resulta ser un sustrato más adecuado que los anteriores, alcanzando (0.07 F.P.U./ml) a las 96 horas de haber sido adicionado al medio de cultivo, frente a las (0.01 F.P.U./ml), obtenidas con glucosa y las (0.00 F.P.U./ml), con celobiosa y carboximetilcelulosa en el mismo intervalo de tiempo.

Analizando los niveles de actividad enzimática de los componentes del complejo por separado, estos fueron superiores a los alcanzados al medir la actividad total de los mismos (F.P.A.).

Endoglucanasa (0.135 U.A.E./ml.), Exoglucanasa (0.110 U.A.E./ml.),  $\beta$ -Glucosidasa (0.080 U.A.E./ml.) (ver Figura 3.58) todas ellas medidas a las 96 horas .

El papel de filtro resulta ser un buen inductor, pues a las 96 horas de incubación se obtienen niveles de F.P.A. de (0.370 F.P.U./ml), que se mantienen hasta las 240 horas de incubación.

Las actividades individuales del complejo También experimentan un aumento frente a los anteriores sustratos. Endoglucanasa (0.230 U.A.E./ml.) a las 168 horas. Exoglucanasa (0.190 U.A.E./ml.) También a las 168 horas, y  $\beta$ -Glucosidasa (0.330 U.A.E./ml.) a las 96 horas.

En cuanto al Avicel, resulta ser un muy buen inductor del complejo celulolítico. El perfil de actividades enzimáticas que se obtiene con él a lo largo del tiempo es muy similar al obtenido con el

papel de filtro como fuente de carbono, aunque las actividades enzimáticas obtenidas con el avicel están ligeramente por encima de las del papel de filtro. F.P.A. (0.390 F.P.U./ml.) a las 96 horas; (0.450 F.P.U./ml.) a las 168 horas. Endoglucanasa (0.170 U.A.E./ml.) a las 96 horas y (0.180 U.A.E./ml.) a las 168 horas, valores que se mantienen hasta las 264 horas.

Exoglucanasa (0.185 U.A.E./ml.) a las 96 horas y (0.231 U.A.E./ml.) a las 168 horas.  $\beta$ -Glucosidasa (0.390 U.A.E./ml.) a las 96 horas y (0.460 U.A.E./ml.) a las 168 horas.

En general, puede observarse con los resultados obtenidos que los máximos valores de actividad enzimática, tanto para la actividad total del complejo, como de sus componentes por separado se obtuvieron en un intervalo de tiempo entre las 96 y las 168 horas después de la incorporación de estas sustancias al medio de cultivo.

### 3.12.2.- Ensayos con Papel de Filtro y Avicel: Estudio de la Inducción del Complejo Celulolítico.

De acuerdo con los ensayos anteriores, se obtuvieron dos sustancias con un elevado potencial inductor del complejo celulolítico:

- Avicel.
- Papel de Filtro.

Utilizando este último, se obtuvieron niveles de actividad enzimática elevados, tanto del complejo enzimático total (F.P.A.), como de cada una de las actividades enzimáticas del mismo (Endoglucanasa, Exoglucanasa,  $\beta$ -Glucosidasa.).

El problema que presentó el empleo de avicel en la producción de celulasas, consistió en su elevado coste, lo que le hace poco aconsejable para ser empleado industrialmente.

Se efectuaron nuevos ensayos según las condiciones descritas en el apartado (2.15.1.), pero utilizando tan sólo papel de filtro, y avicel como control de la inducción.

Con estas experiencias se pretendió determinar las condiciones óptimas de producción del complejo enzimático celulolítico con estos dos inductores: el papel como sustrato que puede ser utilizado a gran escala, y el avicel como control, considerándolo un buen inductor. Para ello, se determinaron todas las actividades enzimáticas del complejo celulolítico, tanto juntas (F.P.A.) como por separado.

### 3.12.2.1.- Pretratamiento Físico del Inductor.

Con el fin de facilitar el contacto entre el papel de filtro y el complejo enzimático, mejorando así el ataque de esta último, se sometió al papel de filtro a un pretratamiento físico que permitiera la disgregación de las fibras que lo componen, logrando así un aspecto algodonoso. Apartado (2.14.1.).

Como control se utilizó en el ensayo Avicel y papel de filtro Watman 1, cortado en discos de 6 mm de diámetro frente al papel de filtro pretratado.<sup>1</sup>

Los resultados que se obtuvieron, se indican en la Figura 3.59

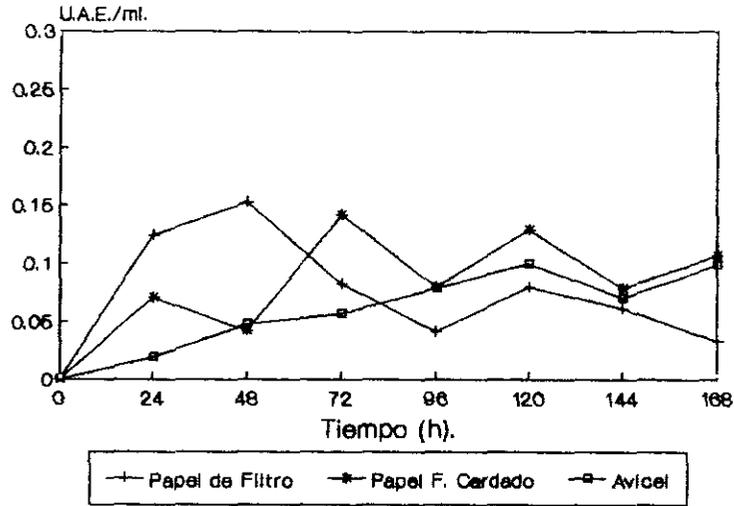
Con los datos obtenidos, se observa que tras 48 horas de incubación (después de la adición de los sustratos), se aprecia una fuerte inducción del complejo celulolítico (F.P.A.) con valores de (0.130 F.P.U./ml.) (ver Figura 3.59) utilizando papel de filtro cardado<sup>2</sup> frente a las (0.011 F.P.U./ml.) alcanzadas con papel de filtro y las (0.020 F.P.U./ml.) del avicel en el mismo tiempo. Esto supone un aumento en la actividad empleando papel de filtro cardado

---

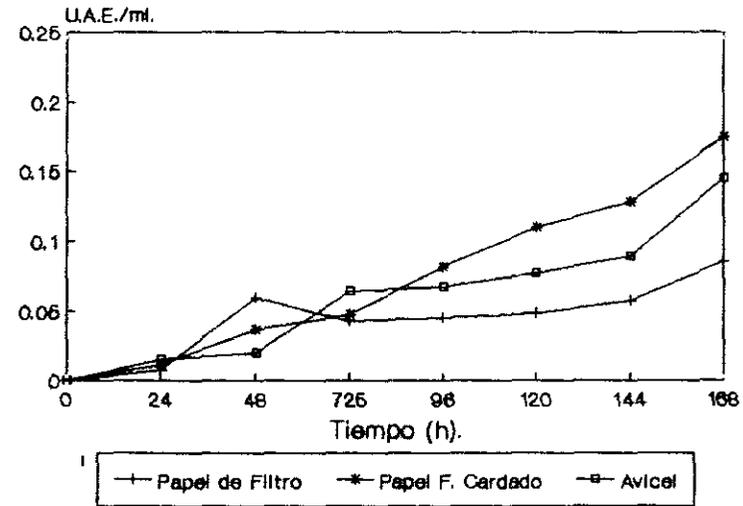
<sup>1</sup>Como sinónimo de Papel de Filtro Pretratado Físicamente, se utilizará de ahora en adelante el nombre de Papel de Filtro Cardado, o solamente Papel Cardado.

<sup>2</sup>El papel de filtro cardado es sinónimo de papel de filtro pretratado físicamente. De ahí que se haga alusión a este nombre por el aspecto que presenta dicha sustancia después del pretratamiento. Así mismo, recibe el nombre de papel de filtro el sustrato sin pretratamiento físico.

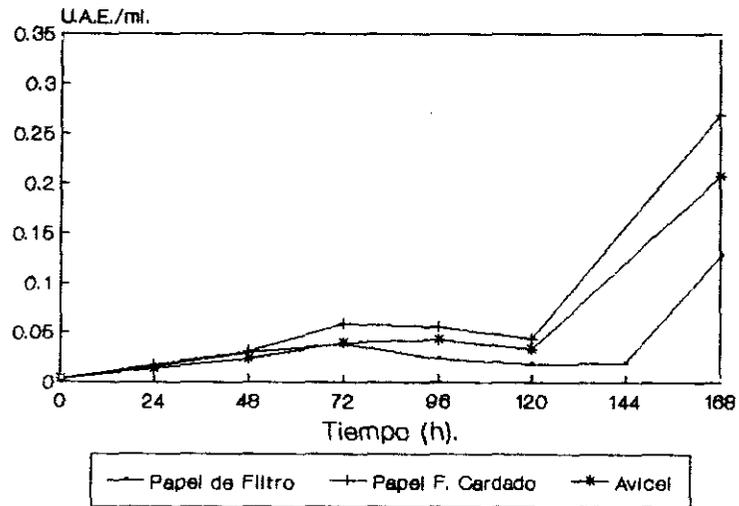
### ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA



### ACTIVIDAD EXOGLUCANASA



### ACTIVIDAD B-GLUCOSIDASA



### ACTIVIDAD DE PAPEL DE FILTRO

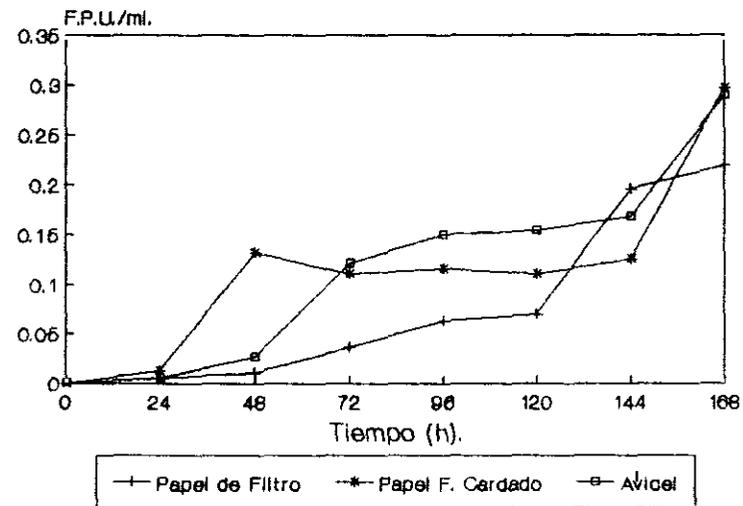


Figura (3.59).- Efecto del pretratamiento físico del papel de filtro sobre las distintas actividades enzimáticas que componen el complejo celulolítico de *T. reesei* QM 9414.

del 1181% respecto a la actividad F.P.A. alcanzada con el papel de filtro y de un 650% respecto a la actividad alcanzada con el avicel.

Tras 168 horas, tanto con avicel como con papel de filtro cardado se alcanzan valores de actividad enzimática similares (0.296 F.P.U./ml.) para el avicel y ligeramente más bajos para el papel de filtro cardado (0.289 F.P.U./ml.).

Al analizar por separado el comportamiento de cada uno de los componentes del complejo enzimático se observa que la endoglucanasa es el primer enzima que se induce en niveles significativos. Así mismo, se aprecia un retraso en el tiempo de inducción de la misma cuando se emplea papel de filtro como sustrato; se alcanzan valores de (0.153 U.A.E./ml.) a las 48 horas, mientras que con el papel de filtro cardado se obtiene el máximo de actividad (0.142 U.A.E./ml.) a las 72 horas, mientras que con avicel esto ocurre a la 120 horas.

En cualquier caso el papel de filtro bajo cualquiera de las dos formas ensayadas resulta ser mejor inductor para la actividad endoglucanasa en estas condiciones que el avicel.

Así mismo, y a la vista de los resultados (Figura 3.59), parece ser que la actividad exoglucanasa posee un tiempo de inducción más largo, el máximo nivel de producción se logra con papel de filtro cardado a las 168 horas (0.174 U.A.E./ml.) seguido en este tiempo por el avicel con (0.145 U.A.E./ml.) y las (0.085 U.A.E./ml.) del papel de filtro.

Todo ello supone un incremento del 120% de la actividad del papel de filtro cardado frente al avicel y de un 209.3% frente al papel de filtro. De esto se desprende que el papel de filtro cardado mejora considerablemente la inducción de la exoglucanasa con respecto al avicel y al papel de filtro.

Con la actividad  $\beta$ -Glucosidasa ocurre algo similar a lo que sucede con la actividad exoglucanasa; los valores máximos de

actividad se alcanzan a las 168 horas tras la adición de los sustratos inductores, resultando ser los más elevados los alcanzados con papel de filtro cardado (0.268 U.A.E./ml.) frente a las (0.207 U.A.E./ml.) obtenidas con avicel y las (0.127 U.A.E./ml.) obtenidas con papel de filtro.

Ello presupone un incremento en actividad con el papel de filtro cardado del 129% respecto al avicel y del 211% respecto al papel de filtro.

De forma general, y exceptuando la actividad endoglucanasa puede considerarse que con el papel de filtro cardado se obtienen valores de actividad más elevados (en general) seguido a continuación por el avicel, empleado como control de inducción y por último el papel de filtro, que si bien presenta niveles de actividad aceptables, nunca se elevan por encima de los alcanzados con los anteriores sustratos.

#### **3.12.2.2.- Pretratamiento Químico del Inductor.**

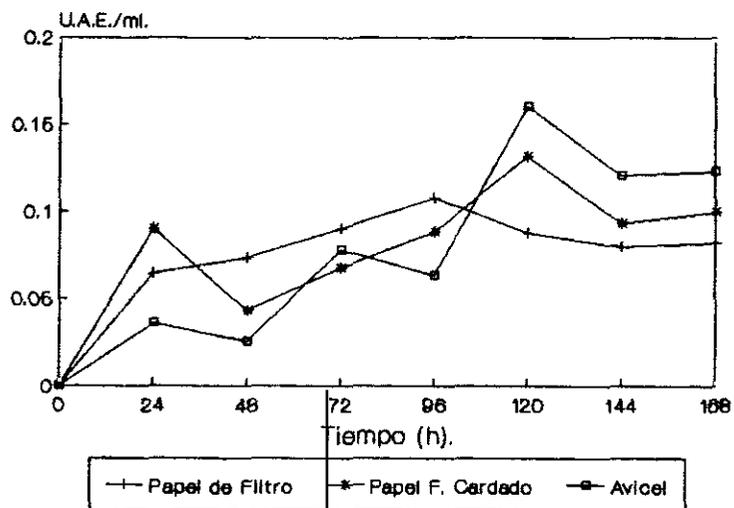
Con objeto de favorecer la accesibilidad del complejo celulolítico sobre el inductor, este fue sometido a un tratamiento con hidróxido sódico al 1% en caliente. Su misión fue alterar la estructura cristalina de la celulosa transformándola en otra, más amorfa y por tanto mucho más accesible por las celulasas.

Las sustancias tratadas fueron:

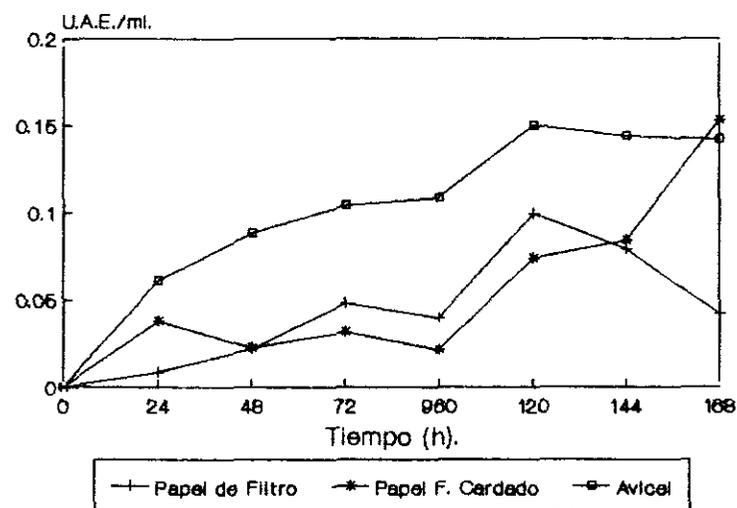
- Papel de Filtro.
- Papel de Filtro Cardado.
- Avicel.

Los resultados obtenidos en la producción del complejo enzimático bajo estas condiciones se indican en la Figura 3.60.

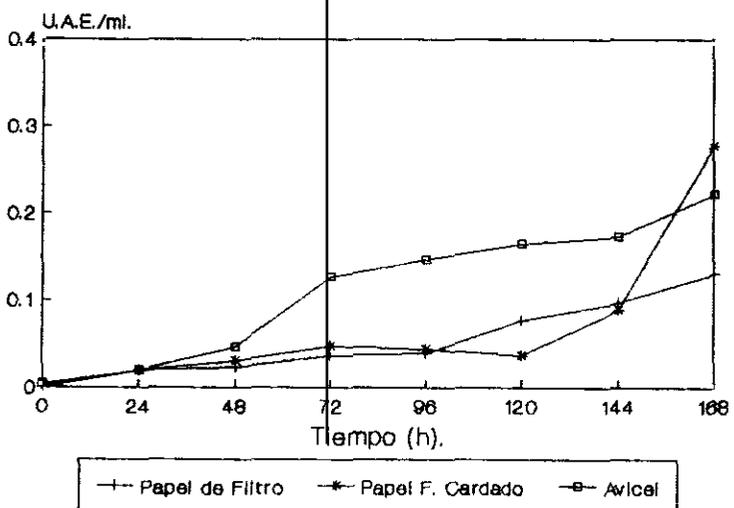
### ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA



### ACTIVIDAD EXOGLUCANASA



### ACTIVIDAD B-GLUCOSIDASA



### ACTIVIDAD DE PAPEL DE FILTRO

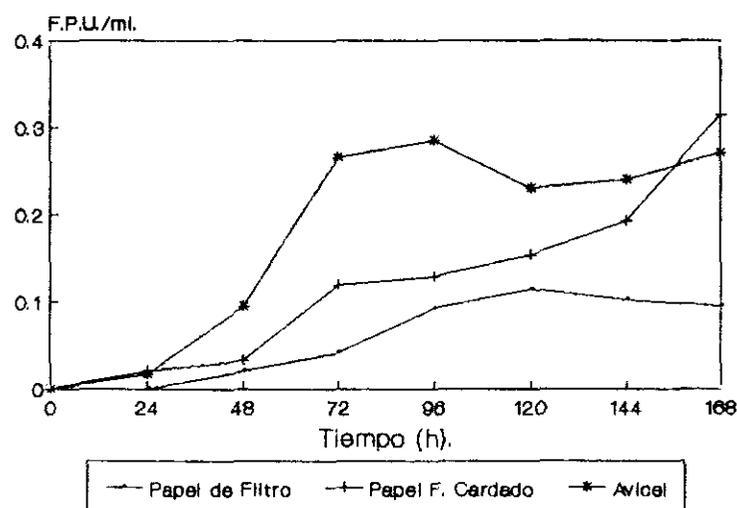


Figura (3.60).- Efecto del pretratamiento (alcalino) sobre las distintas sustancias inductoras de las actividades enzimáticas que componen el complejo celulolítico de *T. reesei* QM 9414.

### 3.12.2.2.1.- Papel de filtro.

Al determinar el efecto del pretratamiento químico sobre la actividad de papel de filtro (F.P.A.) se observa que dicho efecto resulta ser positivo (comparar las Figuras 3.59 y 3.60), pues permite que la actividad aparezca antes que si no se efectúa el tratamiento. En este punto resulta interesante reseñar que los valores de actividad con sustratos inductores pretratados, permanecen por encima de los obtenidos empleando papel de filtro sin pretratar hasta las 120 horas, y que por encima de este tiempo, se disparan los niveles de actividad empleando el inductor sin pretratar.

En cuanto a la actividad endoglucanasa, parece que el pretratamiento del inductor resulta negativa para la misma (Comparar estas actividades en las Figuras 3.59 y 3.60), en las primeras 24 horas de cultivo, ya se experimenta una pérdida de actividad del 40.6% respecto a los valores del inductor no pretratado.

En la actividad exoglucanasa, no se aprecia ningún efecto positivo con el pretratamiento, obteniéndose niveles de actividad similares con o sin él (Figuras 3.59 y 3.60).

Con la actividad  $\beta$ -glucosidasa sucede algo similar, la única diferencia radica en que la producción enzimática con el inductor pretratado se origina de una forma progresiva, mientras que con el inductor sin pretratamiento, esta actividad se dispara entre las 144 y las 168 horas en los dos casos, y transcurridas 168 horas los niveles de actividad enzimática son muy similares.

### 3.12.2.2.2.- Papel de Filtro Cardado.

El pretratamiento del papel de filtro cardado, origina un ligero aumento de la actividad total del complejo enzimático (F.P.A.), (comparar Figuras 3.59 y 3.60). Tal y como sucede al papel de filtro, este aumento de actividad es progresivo y se produce por encima de las 72 horas de incubación.

A las 120 horas, se obtienen (0.110 F.P.U./ml.) cuando no se pretrata el sustrato y (0.153 F.P.U./ml.) con pretratamiento.

Esto supone en este punto un aumento de la actividad del 39%, valor que se reduce hasta un 6% tras 168 horas de incubación.

En la actividad endoglucanasa, el pretratamiento por sí mismo no resulta positivo, obteniendo siempre valores de actividad con el inductor sin pretratar por encima de los tratados. Este hecho ocurre de igual forma en la actividad exoglucanasa.

En cuanto a la actividad  $\beta$ -glucosidasa, los valores de actividad enzimática alcanzados son También muy similares, tanto con pretratamiento del inductor como sin él.

#### 3.12.2.2.3.- Avicel.

El pretratamiento químico usando avicel, incrementa notablemente la producción del complejo celulolítico (F.P.A.), probablemente debido a la propia naturaleza del inductor, muy elaborado y puro, reduciendo así mismo, la fase de latencia de la producción del complejo de 48 a 24 horas.

A las 72 horas se pasa de (0.120 F.P.U./ml.) con avicel sin pretratar a (0.265 F.P.U./ml.) con avicel pretratado, lo que supone un incremento del 121% de la actividad. Estos niveles de actividad se mantienen hasta las 168 horas con el avicel pretratado, mientras que con el no tratado, tan sólo se alcanzan estos valores (0.290 F.P.U./ml.) tras 168 horas de incubación.

El pretratamiento en la actividad endoglucanasa parece tener un efecto positivo pero a largo plazo. Sólo a partir de las 120 horas se aprecia un efecto significativo por parte del mismo, con unos valores de (0.160 U.A.E./ml.) con pretratamiento frente a los (0.100 U.A.E./ml.) sin pretratar.

En cambio en la actividad exoglucanasa, se observa desde las primeras 24 horas un efecto positivo, reduciendo

notablemente el tiempo de aparición de esta actividad, así como, el incremento progresivo de la misma.

Tras 96 horas de incubación se alcanzan (0.060 U.A.E./ml.) con el avicel sin pretratar frente a las (0.104 U.A.E./ml.) con pretratamiento.

En la actividad  $\beta$ -glucosidasa este efecto es igualmente acusado, tras 72 horas de incubación se pasa de (0.060 U.A.E./ml.) con el avicel sin pretratar a (0.127 U.A.E./ml.) con el avicel tratado, esto presupone un aumento del 217% de la actividad.

También puede observarse que el aumento de la actividad enzimática en el medio con avicel pretratado es gradual hasta alcanzar un máximo de actividad de (0.222 U.A.E./ml.) a las 168 horas. Este aumento en cambio en el medio con avicel sin pretratar es muy brusco, y se produce entre las 144 y las 168 horas, pasando de (0.090 U.A.E./ml.) a (0.207 U.A.E./ml.) en este intervalo de tiempo.

#### **3.12.2.3.- Adición de Nutrientes al Medio.**

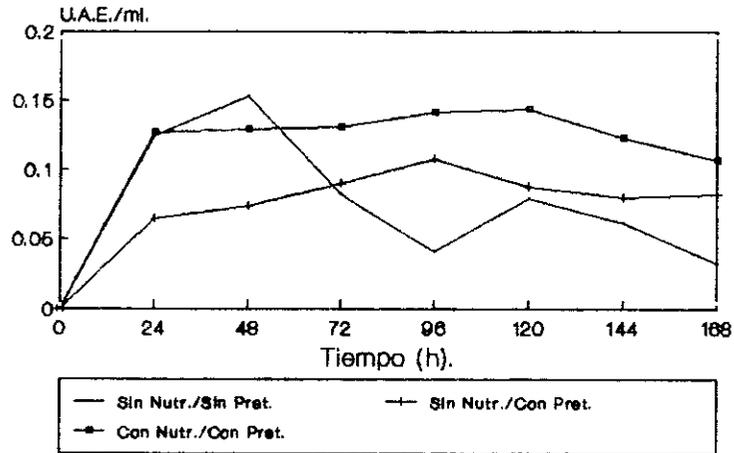
Para determinar el efecto que ejercen los nutrientes del medio de cultivo sobre la producción del complejo celulolítico, fueron nuevamente incorporados al medio de producción enzimática junto con el inductor, como control se empleó un medio de cultivo en el que únicamente se incorporó el inductor.

Las experiencias se efectuaron con los inductores ensayados anteriormente.

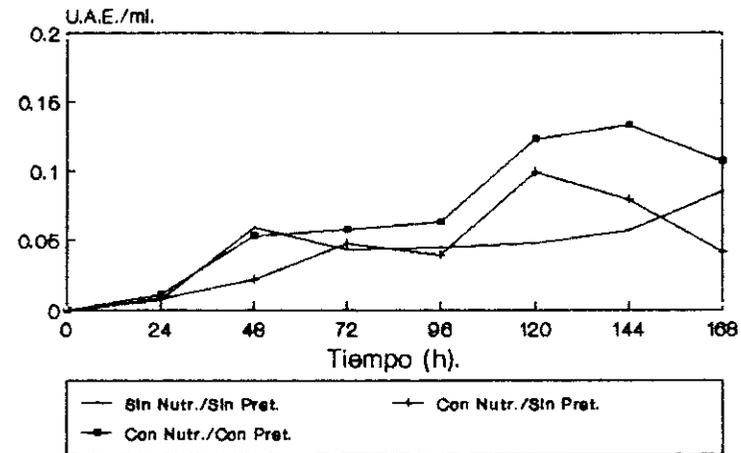
- Papel de Filtro.
- Papel de Filtro Cardado.
- Avicel.

Los resultados que se obtuvieron se indican en las Figuras 3.61.1, 3.61.2 y 3.61.3.

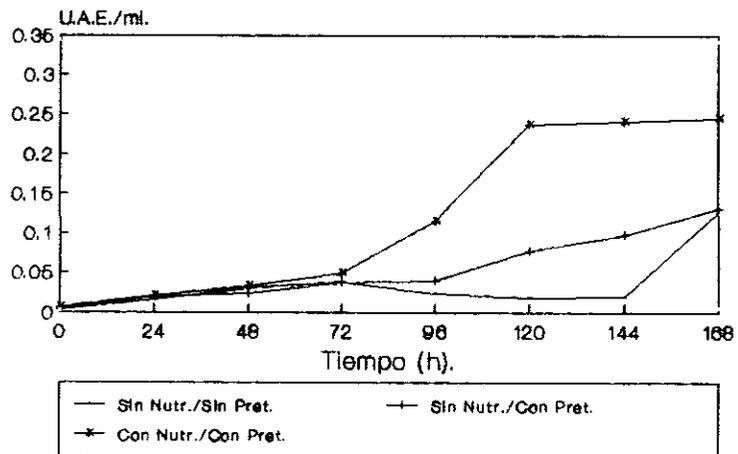
**ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA  
PAPEL DE FILTRO**



**ACTIVIDAD EXOGLUCANASA  
PAPEL DE FILTRO.**



**ACTIVIDAD B-GLUCOSIDASA  
PAPEL DE FILTRO**



**ACTIVIDAD DE PAPEL DE FILTRO  
PAPEL DE FILTRO**

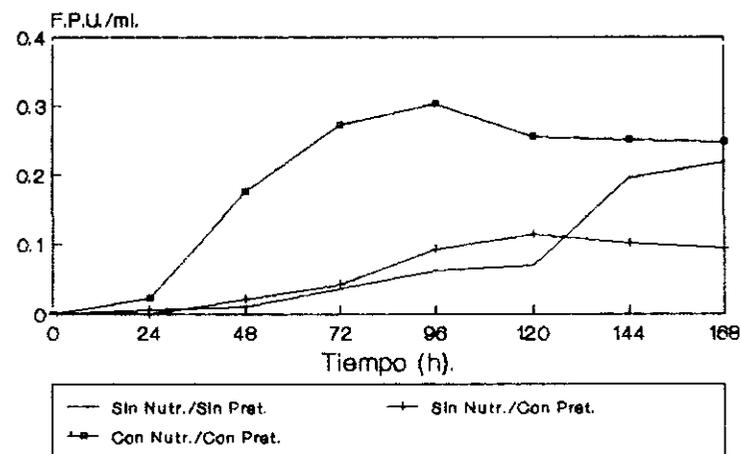
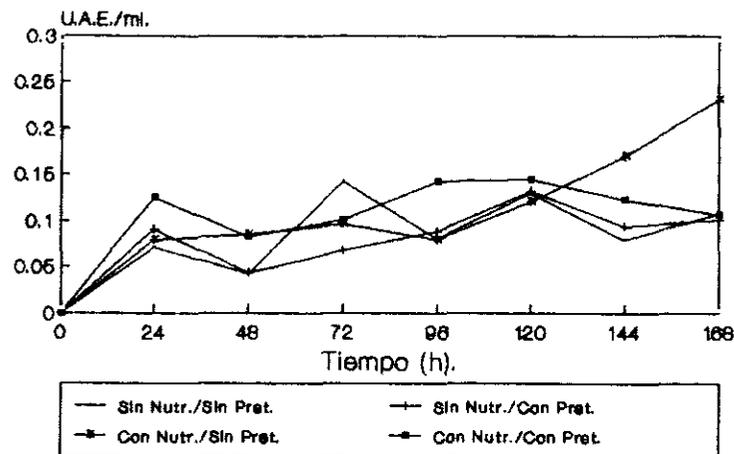
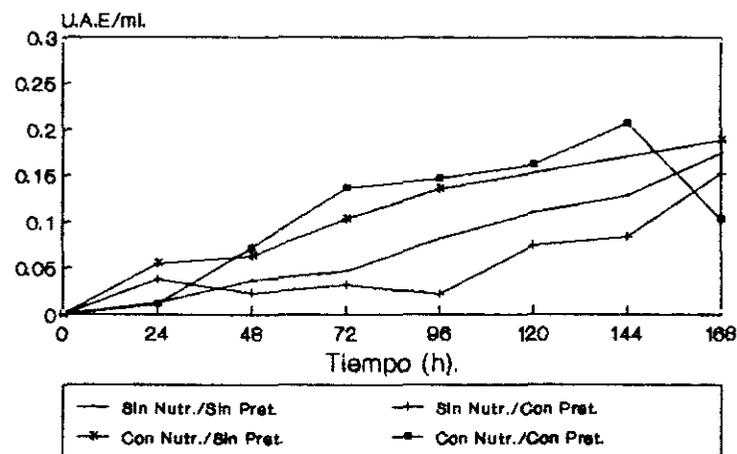


Figura (3.61.1).- Efecto de la incorporación de nutrientes sobre las actividades enzimáticas que componen el complejo celulolítico de *T. reesei* QM 9414 cultivado sobre papel de filtro como agente inductor.

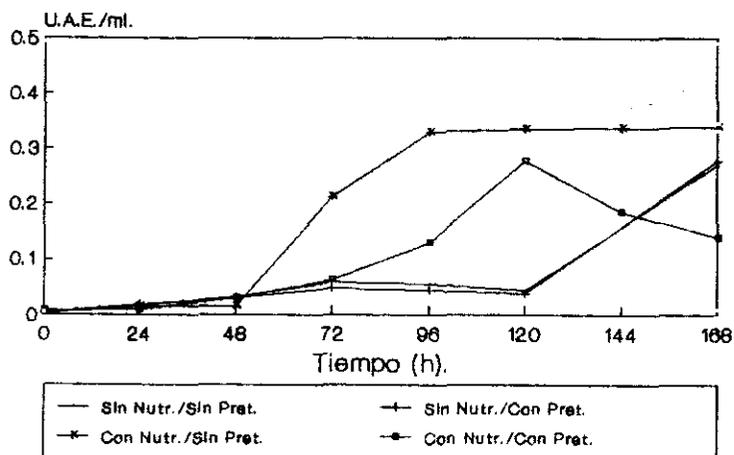
**ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA  
PAPEL DE FILTRO CARDADO**



**ACTIVIDAD EXOGLUCANASA  
PAPEL DE FILTRO CARDADO**



**ACTIVIDAD B-GLUCOSIDASA  
PAPEL DE FILTRO CARDADO**



**ACTIVIDAD DE PAPEL DE FILTRO  
PAPEL DE FILTRO CARDADO**

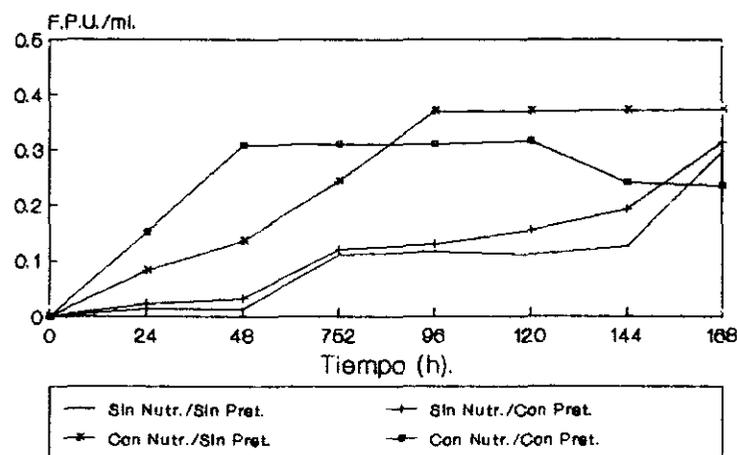
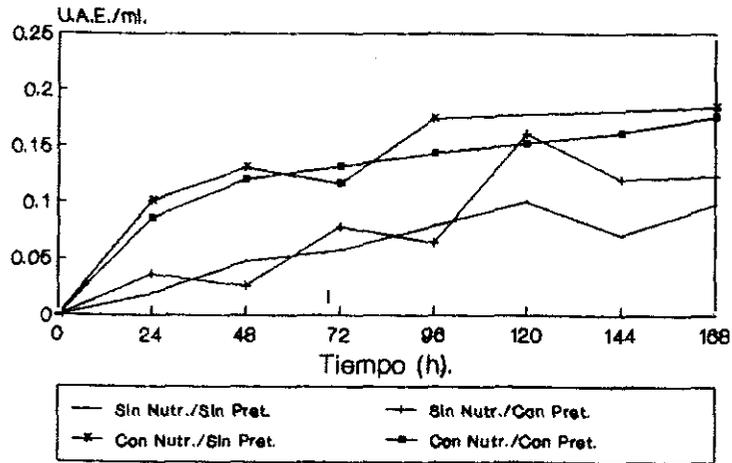
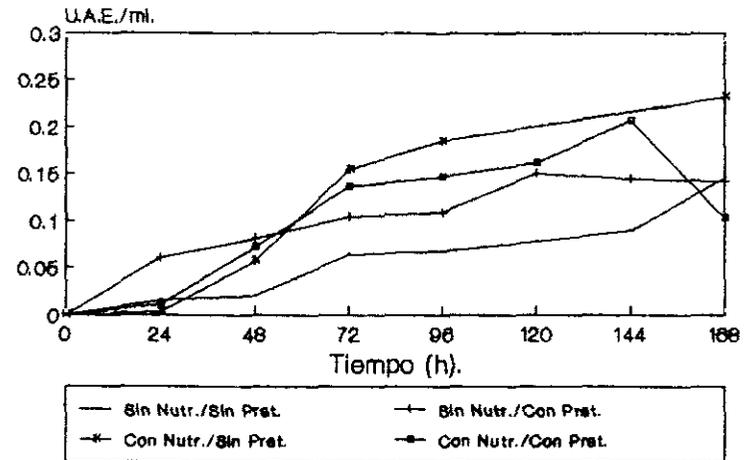


Figura (3.61.2).- Efecto de la incorporación de nutrientes sobre las actividades enzimáticas que componen el complejo celulolítico de *T. reesei* QM 9414 cultivado sobre papel de filtro cardado como inductor.

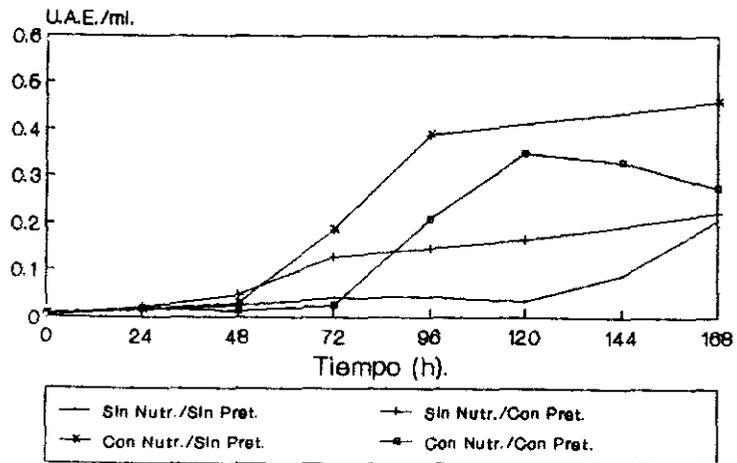
**ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA  
AVICEL**



**ACTIVIDAD EXOGLUCANASA  
AVICEL**



**ACTIVIDAD B-GLUCOSIDASA  
AVICEL**



**ACTIVIDAD DE PAPEL DE FILTRO  
AVICEL**

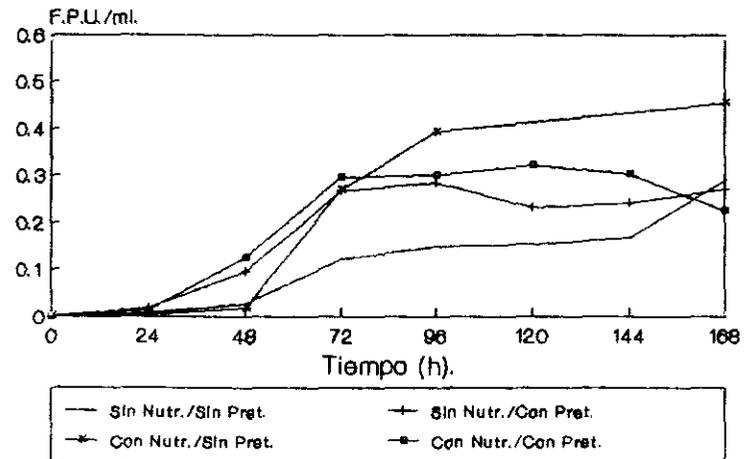


Figura (3.61.3).- Efecto de la incorporación de nutrientes sobre las actividades enzimáticas que componen el complejo celulolítico de *T. reesei* QM 9414 cultivado sobre avicel como inductor.

### 3.12.2.3.1.- Papel de filtro.

A la vista de los resultados presentados en la Figura 3.61.1 parece que la adición de nutrientes junto con el inductor en el medio de cultivo aumenta claramente la actividad enzimática del complejo celulolítico (F.P.A.) desde las primeras 24 horas.

A las 96 horas, se obtiene el máximo de actividad (F.P.A.) con adición de nutrientes (0.300 F.P.U./ml.) en contraposición a las (0.090 F.P.U./ml.) sin la adición de los mismos. Esto supone un aumento en la actividad del orden del 234% respecto a esta última.

En cuanto a la actividad endoglucanasa, la adición de nutrientes produce también un incremento en esta actividad, alcanzando a las 24 horas (0.064 U.A.E./ml.) sin la adición y (0.127 U.A.E./ml.) con la adición de nutrientes, lo que supone un incremento de la actividad del 95% mientras que a las 96 horas, estas diferencias si bien son significativas son menos acusadas (0.108 U.A.E./ml.) sin la adición de nutrientes y (0.142 U.A.E./ml.) con la adición, lo que supone un aumento en la actividad del 31.5% (ver Figura 3.61.1).

La adición de nutrientes también influye en la actividad exoglucanasa de una forma positiva, a lo largo de todo el proceso, puede apreciarse un incremento en la actividad enzimática a las 96 horas que supone un 81.3%, mientras que con el inductor sin pretratar la adición de nutrientes origina un aumento en la actividad de tan sólo el 39.7% respecto al medio con el inductor sin pretratar sin adición de nutrientes.

La adición de nutrientes produce así mismo un aumento considerable en los niveles de la actividad  $\beta$ -glucosidasa que supone un 188.5% tras 96 horas de incubación en el medio con inductor pretratado químicamente con adición de nutrientes frente a los que no tienen nutrientes (Figura 3.61.1).

### 3.12.2.3.2.- Papel de Filtro Cardado.

En vista de los resultados que se muestran en la Figura 3.61.2, puede apreciarse un gran aumento de las actividades enzimáticas del complejo, tanto si el inductor está pretratado químicamente como si no. Se aprecia un proceso de aceleración en la producción del complejo enzimático.

A las 96 horas, con el inductor sin pretratar se obtienen (0.110 F.P.U./ml.) sin adicionar nutrientes extra al medio de cultivo frente a las (0.370 F.P.U./ml.) con la adición de los mismos.

No obstante, con el pretratamiento químico del papel de filtro cardado se obtienen (0.130 F.P.U./ml.) sin la adición de nutrientes y (0.310 F.P.U./ml.) tras la adición de los mismos.

Ello supone un aumento en la actividad en el primer caso de un 236.3% y de un 138.4% en el segundo. En cambio, en la actividad endoglucanasa, se observa una respuesta variable a la adición de nutrientes.

Al analizar el efecto de los nutrientes se observa que no hay variaciones significativas en el comportamiento de esta actividad a lo largo del tiempo, obteniendo valores semejantes. (ver Figura 3.61.2). Quizás lo más significativo radica en que por encima de las 120 horas los valores de actividad se equiparan, y tras 168 horas la adición de nutrientes logra un incremento de la actividad del 115% respecto al medio sin nutrientes.

Al unir el efecto de los nutrientes y del pretratamiento químico del inductor se observa que la asociación de ambos permite obtener valores de actividad más altos que en otros casos y en mucho menos tiempo.

A las 24 horas se obtienen (0.090 U.A.E./ml.) con el inductor pretratado sin nutrientes frente a las(0.125 U.A.E./ml.) con la adición de los mismos.

Así se logra aumentar la actividad en un 39% en tan sólo 24 horas.

También es significativo hacer mención a que la adición de nutrientes ejerce un efecto positivo aumentando de una forma constante la producción enzimática, a diferencia de los medios en los que no se adicionan en los que las oscilaciones de actividad son más bruscas.

En la actividad exoglucanasa, la incorporación de nutrientes junto con el inductor no pretratado, se pone ya de manifiesto a las 24 horas de incubación, resultando significativa a las 96 horas, logrando un incremento de actividad del 65.7% frente a la no adición de nutrientes.

Por otro lado, al pretratar químicamente al sustrato se observa que la adición de nutrientes frente a la no adición presupone también una elevación de la actividad a las 96 horas del 434.7%, no obstante, este aumento es relativo, pues al estudiar por separado el efecto del pretratamiento sobre la actividad se observa que es negativo, con una reducción de la misma del 384% si no se adicionan nutrientes y del 119% si hay adición. Así pues, puede hacerse notar que la adición de nutrientes favorece esta actividad con este inductor, mientras que el pretratamiento alcalino la inhibe, y, que la adición de nutrientes al pretratar el inductor anula o de alguna forma contrarresta el efecto negativo del pretratamiento.

En la actividad  $\beta$ -glucosidasa, se aprecia un gran aumento en la misma con la adición de nutrientes. Este efecto es mucho más marcado cuando el inductor no ha sido pretratado.

A las 96 horas, con el inductor sin pretratar, la incorporación de nutrientes supone un aumento del 594.5% y de un 294%

con el inductor pretratado. De igual forma a la observada con la actividad exoglucanasa, el pretratamiento del sustrato por sí mismo tiene efectos negativos sobre la producción de  $\beta$ -glucosidasa.

Con la adición de nutrientes a las 96 horas el pretratamiento químico produce una reducción de la actividad del 40%, mientras que sin la adición el efecto se reduce al 20%. Así pues, con esta actividad parece existir un efecto antagónico y además sumatorio entre la adición de nutrientes y el pretratamiento químico.

#### 3.12.2.3.3.- Avicel.

La adición de nutrientes junto al avicel eleva la actividad del complejo celulolítico (F.P.A.), aunque el efecto es mucho mayor cuando el inductor no está pretratado químicamente.

La adición de nutrientes con el avicel sin pretratar supone un aumento de la actividad a las 96 horas del 160%, mientras que con el avicel pretratado para el mismo tiempo, este aumento es tan sólo del 7.1%.

Por otro lado, el pretratamiento del avicel, si bien disminuye por una parte la fase de latencia al igual que ocurre sin añadir nutrientes al medio, a partir de las 96 horas el efecto del pretratamiento se hace negativo, cosa que no sucede si no se añaden nutrientes al medio. (ver Figura 3.61.3).

En la actividad endoglucanasa, el pretratamiento químico del inductor no favorece la producción enzimática. En el caso de no incorporar nutrientes al medio, se aprecia una reducción de la actividad en un 12.8% a las 96 horas, mientras que si se añaden nutrientes esta reducción asciende hasta un 21.2%.

Por el contrario, si se estudia por separado el efecto de la adición de nutrientes, esta resulta positiva, tanto si el avicel está pretratado como si no lo está.

Con el inductor sin pretratar, la adición de nutrientes aumenta la actividad en un 120% a las 96 horas, y en el caso del inductor pretratado este aumenta hasta un 125%.

También en la actividad exoglucanasa la adición de nutrientes resulta favorable en la producción enzimática. Este efecto es más acusado cuando el sustrato está sin pretratar.

Tras 96 horas de cultivo, cuando el sustrato no es tratado, la actividad enzimática experimenta un aumento del 174.3% frente al 35.3% con el inductor pretratado. Así mismo, se aprecia un efecto negativo con el pretratamiento, experimentando un descenso de actividad del 25.7% a las 96 horas de la incorporación de nuevos nutrientes al medio.

El efecto de la adición de nutrientes en la actividad  $\beta$ -glucosidasa resulta así mismo positiva, el efecto más notable se aprecia alrededor de las 96 horas cuando el avicel no ha sido pretratado aumentando la actividad nada menos que en un 807% mientras que si el inductor ha sido pretratado, si bien la adición de medio es positiva no resulta tan espectacular, siendo tan sólo del 42.5%.

En cuanto al pretratamiento hay que decir: que si bien la no adición de nutrientes al avicel (con pretratamiento), parece tener efectos positivos a las 96 horas aumentando la actividad hasta un 240% respecto al no pretratado, la adición de nutrientes junto con el pretratamiento retrasan en 24 horas los niveles de producción.

#### **3.12.2.4.- Selección del inductor y de las condiciones óptimas de producción de celulasas en las condiciones ensayadas.**

Con los resultados obtenidos en las experiencias comentadas anteriormente, puede seleccionarse la mejor sustancia inductora y las condiciones de producción del complejo enzimático. Puede observarse el efecto beneficioso del pretratamiento físico sobre el papel de filtro en todas las condiciones ensayadas, obteniéndose siempre niveles de

F.P.A superiores empleando el papel de filtro cardado frente al normal (comparar las Figuras 3.61.1, 3.61.2 y 3.61.3).

Por otro lado puede apreciarse que la adición de nutrientes aumenta en general para los distintos inductores en las distintas condiciones ensayadas la producción del complejo enzimático.

Así mismo, se produce un aumento considerable en los valores de F.P.A. al suplementar el medio con nuevos nutrientes (sales minerales y peptona) en el momento de añadir el inductor al medio de cultivo, frente a la adición exclusiva de este último al medio de cultivo.

En función de estos resultados, es lógico seleccionar el papel de filtro cardado y la adición de nutrientes al medio de producción enzimática como condiciones óptimas de la inducción.

Al analizar las gráficas de actividad de papel de filtro de la Figura 3.61.2 se aprecia que si además, el papel de filtro cardado está pretratado químicamente se alcanzan a las 48 horas (0.300 F.P.U./ml.), frente a las (0.130 F.P.U./ml.) obtenidas con el mismo pero sin pretratar químicamente.

Hay que hacer notar que aunque con el papel de filtro cardado se alcanzan a las 96 horas niveles de F.P.A. de (0.370 F.P.U./ml.) parece más aconsejable obtener menos actividad (0.307 F.P.A./ml.) y ganar dos días en el proceso aún a expensas de adicionar nuevos nutrientes.

Otro aspecto interesante radica en que los valores de F.P.A. alcanzados con el papel de filtro cardado son superiores a los obtenidos con avicel (control de actividad) a las 24 y 48 horas, y sólo a partir de las 72 horas estos valores se hacen aproximadamente iguales. (comparar las figuras 3.61.2 y 3.61.3).

Así pues, y de acuerdo con estos datos, si lo que se pretende es la producción del complejo celulolítico completo (F.P.A.) las

condiciones seleccionadas para el mismo deberían ser: emplear papel de filtro cardado, pretratado químicamente y suplementar el medio con nuevos nutrientes.

Tras seleccionar las condiciones de producción para el complejo enzimático, hay que analizar las relaciones entre las distintas actividades enzimáticas del complejo celulolítico (F.P.A., Endoglucanasa, Exoglucanasa y  $\beta$ -Glucosidasa en dichas condiciones).

La actividad F.P.A. alcanza su valor máximo a las 48 horas y permanece más o menos constante hasta las 120 horas en que empieza a descender.

La actividad endoglucanasa, comienza a las 24 horas con (0.120 U.A.E./ml.) y permanece en rango de (0.100 U.A.E./ml.) hasta las 96 horas, en que alcanza su máximo de actividad (0.140 U.A.E./ml.) apreciándose un leve descenso de actividad después.

Por el contrario, no se detecta apenas actividad exoglucanasa durante las primeras 72 horas, y es a las 96 horas donde esta actividad alcanza su máximo valor (0.110 U.A.E./ml.), valor que se mantiene hasta las 120 horas, a partir de las cuales comienza a descender.

La  $\beta$ -Glucosidasa, También presenta valores de actividad bajos hasta las 96 horas, y no consigue alcanzar su máximo hasta las 120 horas (0.280 U.A.E./ml.). A partir de las 120 horas desciende esta actividad de una forma más brusca que la endoglucanasa y la exoglucanasa, coincidiendo con el descenso de la F.P.A.

Estos datos parecen coincidir con el modelo de producción y acción de las celulasas, donde en primer lugar actúa la endoglucanasa, rompiendo al azar los enlaces glicosídicos de la fibra de celulosa.

Desde las 24 horas se tiene una actividad más o menos constante, pues el enzima tiene sustrato sobre el que actuar y no existen represores en el medio.

Por el contrario los niveles de exoglucanasa deben ser basales, pues hasta que no se produzca un nivel de sustrato elevado sobre el que actuar no se inducirá su síntesis, aumentando el número de extremos no reductores libres originados por la endoglucanasa. Esto puede explicar el largo periodo de latencia de la exoglucanasa.

En cuanto a la  $\beta$ -Glucosidasa, depende a su vez de la liberación de celobiosa producida por acción de la exoglucanasa, y por ello no alcanza su máximo de acción hasta las 120 horas; 24 horas más tarde de alcanzarlo la exoglucanasa.

Según estos datos, es la endoglucanasa el componente más importante del complejo celulolítico, y por tanto al mantenerse dentro de unos determinados niveles constantes de actividad facilita que la actividad F.P.A. alcance su valor máximo a las 48 horas, y mantenga este valor hasta las 120 horas.

Sin embargo, parece ser que el descenso brusco de la actividad  $\beta$ -glucosidasa a las 120 horas lo que ocasiona el descenso del resto de los componentes del complejo.

Este fenómeno puede explicarse por fenómenos de adsorción de los componentes del complejo al sustrato, o por inactivación enzimática por las propias proteasas excretadas por el hongo al medio.

#### **3.12.2.5.- Ensayos con Sales y Peptona.**

Una vez que se comprobó que la adición de sales minerales y peptona junto al inductor aumentaba la producción del complejo celulolítico, se estudió el efecto de la adición de esas sustancias por separado sobre todas las actividades enzimáticas del complejo. Estos ensayos se efectuaron en las mismas condiciones que los anteriores, empleando las condiciones óptimas de producción del complejo enzimático (F.P.A.), con Papel de Filtro Cardado pretratado químicamente.

El objeto del ensayo fue determinar si la adición de peptona es realmente determinante en el aumento de la actividad enzimática, y en caso contrario, utilizar sólo las sales minerales que resultan más baratas, y, de esta forma, economizar el proceso.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.62

A la vista de los resultados obtenidos que se muestran en la Figura 3.62, parece no existir diferencias significativas entre los niveles de F.P.A. obtenidos tras 96 horas de cultivo tanto si se añaden al medio junto con el inductor sales minerales y peptona unidos o por separado Figura 3.62, alcanzándose niveles de actividad enzimática de (0.110 F.P.U./ml.).

Del mismo modo, se aprecian diferencias ligeramente significativas en el mismo tiempo para la actividad endoglucanasa (0.116 U.A.E./ml.) con la adición de peptona, (0.112 U.A.E./ml.) con la adición de sales minerales y de (0.164 U.A.E./ml.) con la adición de sales minerales y peptona, apreciándose que la adición de sales y peptona mejora la actividad.

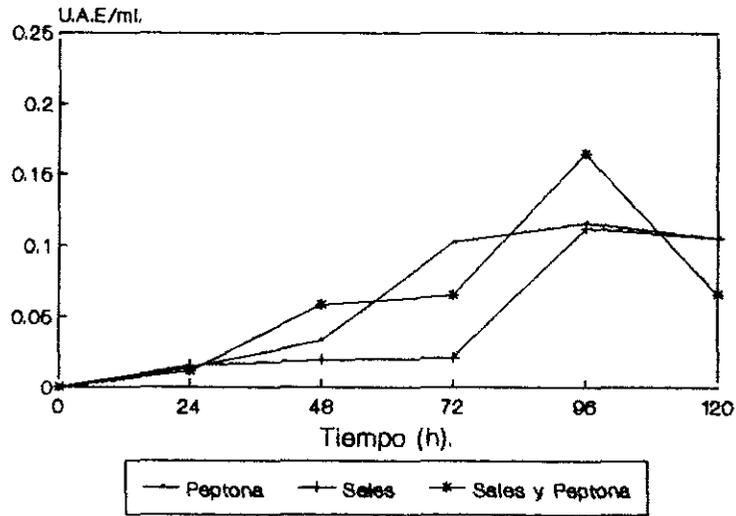
Por otro lado en la actividad exoglucanasa, se mejoran los niveles de actividad con la sola adición de sales minerales. (0.188 U.A.E./ml.) a las 96 horas frente a las (0.102 U.A.E./ml.) con peptona y las (0.169 U.A.E./ml.) con sales y peptona.

De igual forma, la producción de  $\beta$ -Glucosidasa se ve mejorada con la adición de sales minerales. A las 96 horas se obtienen (0.179 U.A.E./ml.), (0.149 U.A.E./ml.) con peptona y (0.081 U.A.E./ml.) con sales minerales y peptona.

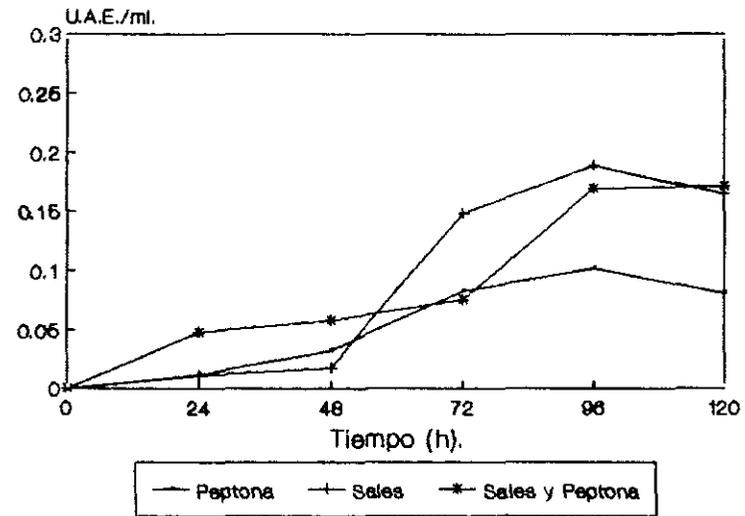
### **3.12.3.- Estudio de la Inducción del Complejo Celulolítico en Fermentador.**

Con los resultados obtenidos en los ensayos en matraz, se seleccionó el inductor, así como, las condiciones óptimas de producción del complejo celulolítico, procediendo a realizar un salto

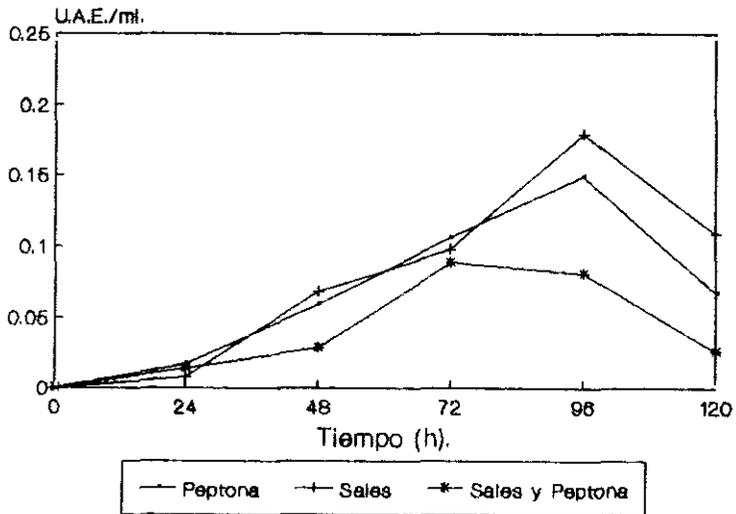
### ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA



### EXOGLUCANASA



### B-GLUCOSIDASA



### ACTIVIDAD DE PAPEL DE FILTRO

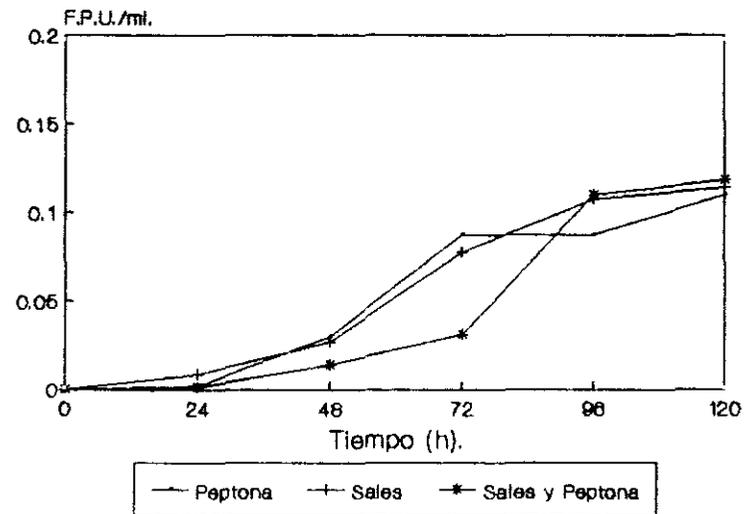


Figura (3.62).- Efecto de la incorporación de cada uno de los nutrientes por separado o en conjunto sobre las actividades enzimáticas del complejo celulolítico de *T. reesei* QM 9414 utilizando papel de filtro cardado como inductor.

a escala piloto, utilizando para ello un fermentador de 1.500 ml de capacidad útil.

Se seleccionó como inductor el papel de filtro cardado, sometido a pretratamiento químico, adicionando simultáneamente con este, sales minerales.

Los ensayos en fermentador fueron realizados en periodos de 96 horas ya que en este tiempo se alcanza el máximo nivel de producción enzimática en matraz. En ensayos preliminares se mantuvieron los cultivos hasta 168 horas sin obtener un aumento significativo en los niveles de producción enzimática.

En la Figura 3.63, aparecen indicados los resultados para cada una de las distintas actividades enzimáticas del complejo alcanzadas en estas condiciones.

Los valores de actividad enzimática (F.P.A.) que se obtienen utilizando una agitación de 500 r.p.m. son superiores a los observados a 300 r.p.m. a lo largo de las 96 horas del ensayo Figura 3.63<sup>3</sup>

De esta forma, durante las primeras 48 horas se consigue un aumento de un 357% en la actividad empleando 500 r.p.m. en lugar de 300 r.p.m., y este aumento a las 96 horas se reduce hasta un 69.7%.

Respecto a las actividades endoglucanasa y exoglucanasa, se ven influidas también notablemente por el incremento de la agitación, lográndose aumentos de actividad para la primera del 649% y del 160.9% respectivamente a las 48 y 96 horas, y del 529.6% y 497.7% para la segunda en los mismos intervalos de tiempo.

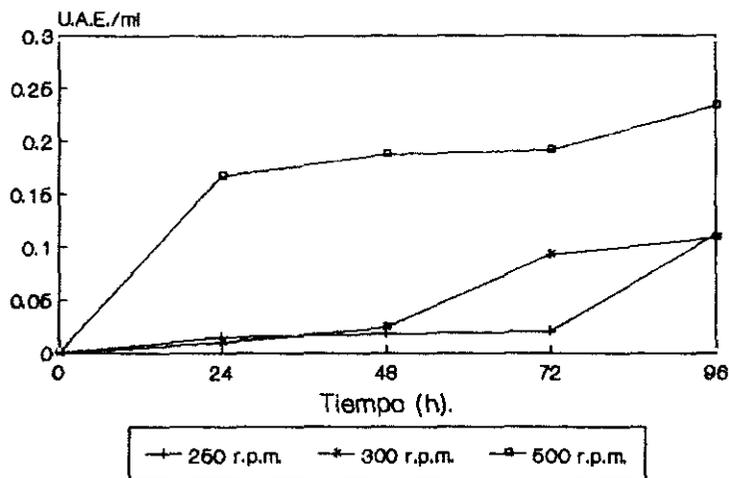
En la actividad  $\beta$ -glucosidasa, También parece influir muy notablemente la agitación, alcanzándose niveles de (0.577 U.A.E./ml.)

---

<sup>3</sup>En las experiencias en matraz, se aprecia que los niveles de todas las actividades enzimáticas descienden por encima de las 120 horas, por ello, en esta fase los ensayos se efectúan a lo largo de periodos de 96 horas como máximo.

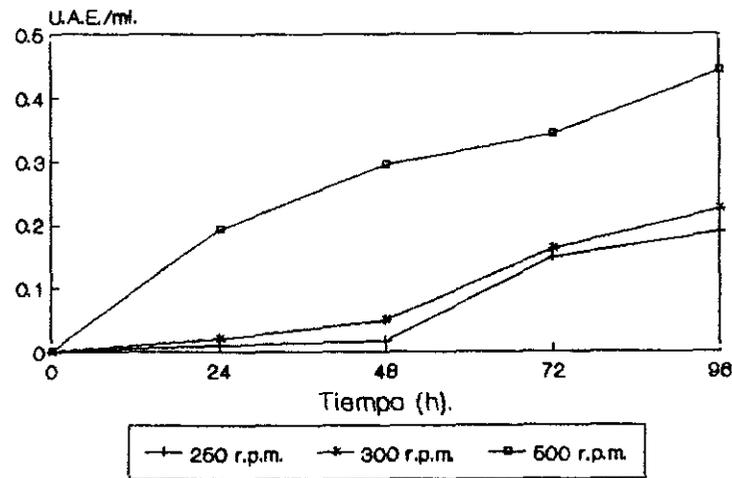
Figura (3.63). - Producción de las distintas enzimas del complejo celulo lítico de *T. reesei* QM 9414 en agitación orbital (250 r.p.m.) y en fermentador (300 y 500 r.p.m.) en cultivos en batch, utilizando el inductor y las mejores condiciones de producción.

**ENDOGLUCANASA.**  
250/300/500 r.p.m.



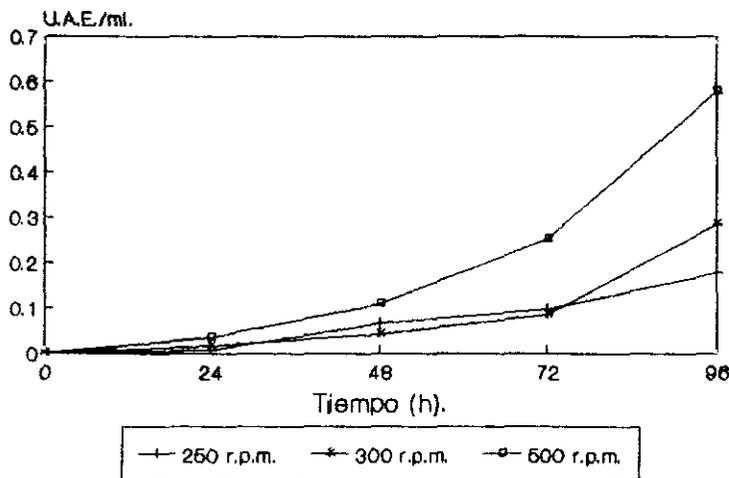
Papel F. Cardado Pret. y Sales.

**EXOGLUCANASA.**  
250/300/500 r.p.m.



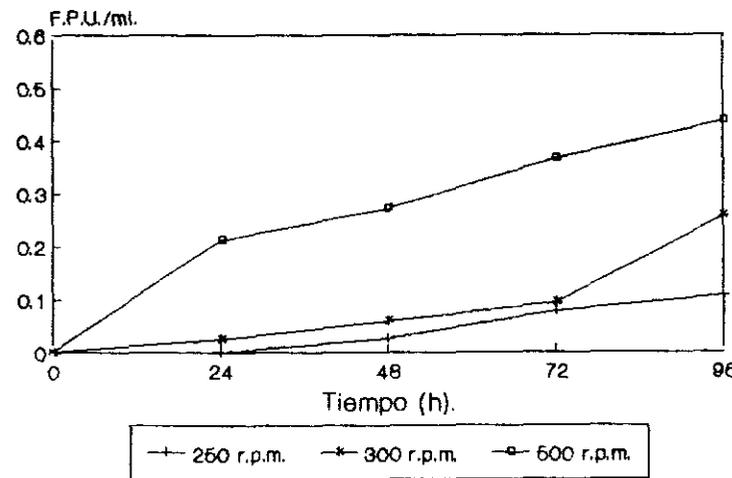
Papel F. Cardado Pret. y Sales.

**B-GLUCOSIDASA.**  
250/300/500 r.p.m.



Papel F. Cardado Pret. y Sales.

**ACTIVIDAD DE PAPEL DE FILTRO**  
250/300/500 r.p.m.



Papel F. Cardado Pret. y Sales.

a las 96 horas con 500 r.p.m. frente a las (0.285 U.A.E./ml.) alcanzadas en el mismo tiempo con 300 r.p.m. Ello supone un aumento de la actividad del 102.2%.

Al contrastar las actividades enzimáticas obtenidas en matraz con agitación orbital a 250 r.p.m. con papel de filtro cardado pretratado químicamente con incorporación de sales minerales en la fase de producción enzimática con las actividades obtenidas en las mismas condiciones en fermentador en cultivo en batch a 300 y 500 r.p.m., se aprecia, en general, un importante aumento en los niveles de actividad, pasando de valores de F.P.A. a 250 r.p.m. de (0.108 F.P.U./ml.) a (0.257 F.P.U./ml.) a 300 r.p.m. y de (0.436 F.P.U./ml.) a 500 r.p.m. suponiendo esto un incremento de actividad del 138.8% de la actividad a 300 r.p.m. y del 307.9% para 500 r.p.m. respecto a la máxima actividad obtenida a 250 r.p.m. en matraz.

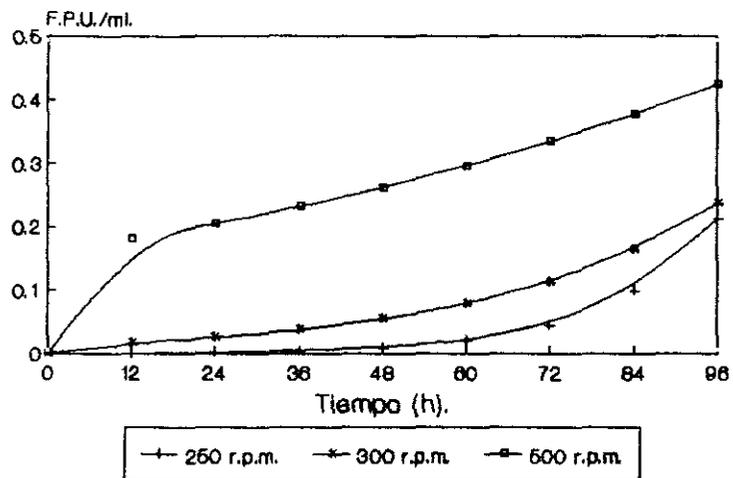
Con respecto a las distintas actividades enzimáticas del complejo, hay que hacer notar que el efecto de la agitación es mucho más acusado a 500 r.p.m. que a 300 r.p.m.

A 500 r.p.m. se observa una correlación positiva entre la velocidad de agitación y la actividad enzimática, con valores de actividad endoglucanasa de (0.233 U.A.E./ml.) frente a las (0.089 U.A.E./ml.) obtenidas a 300 r.p.m. o las (0.111 U.A.E./ml.) alcanzadas en agitación orbital a 250 r.p.m. Esto supone aumentar la actividad en un 109% al duplicar la agitación en 96 horas.

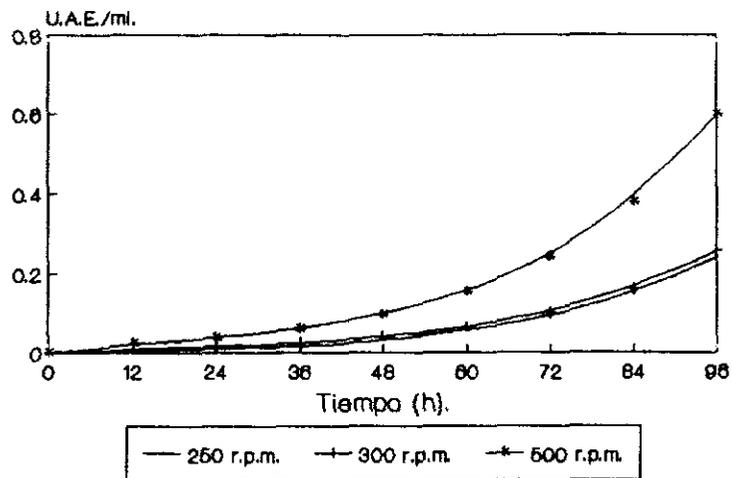
Algo similar sucede con la actividad exoglucanasa, en la que si bien las diferencias entre la agitación orbital a 250 y el fermentador a 300 r.p.m, no resultan significativas, si lo son al compararlas con las 500 r.p.m, en las que desde las primeras 24 horas se consigue un aumento importante de la actividad que supone un 1642% a 500 r.p.m, valor que se va reduciendo hasta un 133.9% a las 96 horas.

Con la  $\beta$ -glucosidasa, se observa un efecto similar al obtenido en las anteriores actividades enzimáticas, haciendo notar que

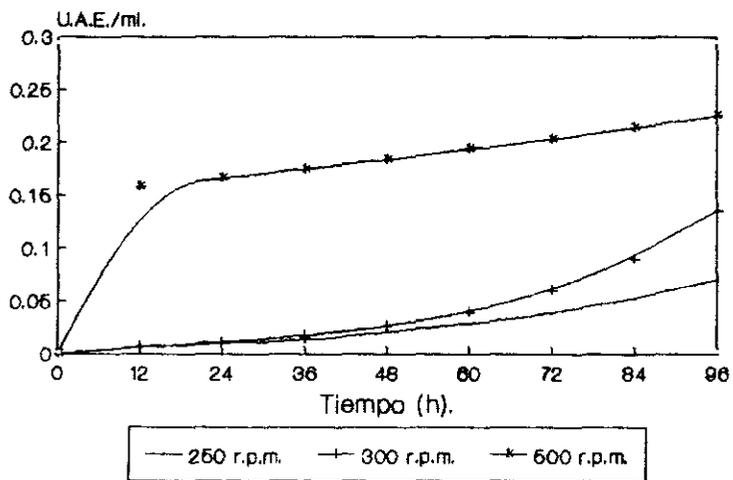
**ACTIVIDAD DE PAPEL DE FILTRO**  
Modelo de producción enzimática.



**B-GLUCOSIDASA.**  
Modelo de Producción Enzimática.



**ENDOGLUCANASA.**  
Modelo de Producción Enzimática.



**EXOGLUCANASA.**  
Modelo de Producción Enzimática.

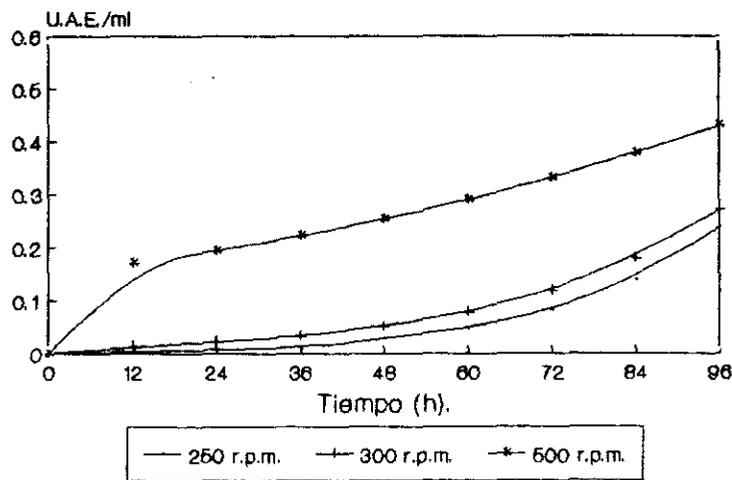


Figura (3.64). - Representación de gráficas de producción de las distintas enzimas del complejo celulolítico de *T. reesei* QM 9414 obtenidas a partir del ajuste matemático a los modelos teóricos de valores los valores reales de actividad que aparecen en la Figura 3.63.

AGITACION	250 r.p.m.	300 r.p.m.	500 r.p.m.
<b>ACTIVIDAD ENZIMATICA</b>			
F.P.A.	$C = 0.00045 \times e^{(0.064) \times T}$	$C = 0.012 \times e^{(0.030) \times T}$	$C = 0.16 \times e^{(0.01) \times T}$
$\beta$ -GLUCOSIDASA	$C = 0.0046 \times e^{(0.041) \times T}$	$C = 0.0065 \times e^{(0.038) \times T}$	$C = 0.015 \times e^{(0.038) \times T}$
ENDOGLUCANASA	$C = 0.0065 \times e^{(0.024) \times T}$	$C = 0.0052 \times e^{(0.034) \times T}$	$C = 0.150 \times e^{(0.0042) \times T}$
EXOGLUCANASA	$C = 0.0035 \times e^{(0.044) \times T}$	$C = 0.009 \times e^{(0.034) \times T}$	$C = 0.130 \times e^{(0.011) \times T}$

Tabla (3.67).- Ecuaciones de regresión que muestran el comportamiento de las distintas actividades enzimáticas del complejo celulolítico de *T. reesei* QM 9414.

$$C = C_0 \times e^{\Sigma t}$$

C: Actividad enzimática para un tiempo t.  
 C<sub>0</sub>: Actividad enzimática para un tiempo t=t<sub>0</sub>  
 Σ: Velocidad de producción enzimática.  
 t: Tiempo en horas.

si bien su producción en matraz presenta una fase de latencia de 24 a 48 horas, a 300 r.p.m. en fermentador esta fase se mantiene, mientras que a 500 r.p.m. También en fermentador, esta fase se reduce por debajo de las 24 horas, alcanzando niveles de actividad enzimática apreciables a partir de las 48 horas (0.110 U.A.E./ml.) frente a las (0.040 U.A.E./ml.) a 300 r.p.m. y las (0.060 U.A.E./ml.) a 250 r.p.m.

En la Figura 3.64, se muestran los modelos teóricos obtenidos con los datos experimentales en cada una de las condiciones ensayadas.

En la Tabla 3.67, aparecen las ecuaciones que determinan la producción del complejo celulolítico en conjunto y para cada una de las actividades por separado en las distintas condiciones ensayadas.

#### **IV.- DISCUSION DE RESULTADOS**

#### 4.1.- HIDROLISIS DEL ALMIDON DE PATATA: INFLUENCIA DEL TIPO DE ACIDO EN EL PROCESO DE HIDROLISIS.

Al someter el almidón a un proceso de hidrólisis utilizando ácidos fuertes diluidos (Ac. sulfúrico y clorhídrico), tal y como se muestra en la Tabla 3.3, se observa un aumento progresivo en la producción de azúcares libres solubles obtenidos a partir del mismo.

También puede apreciarse que para cualquiera de las condiciones que han sido empleadas existen diferencias significativas en la cantidad de azúcares reductores liberados, cuando se utiliza ácido clorhídrico en lugar de ácido sulfúrico a las mismas concentraciones. Esta diferencia es muy acusada, alcanzándose en las mejores condiciones ensayadas, valores de 410.90 g/l. de azúcares reductores libres empleando ácido clorhídrico diluido frente a los 2.51 g/l. obtenidos en las mismas condiciones cuando el ácido empleado es el ácido sulfúrico.

Este punto es concordante con los métodos empleados en la industria productora de jarabes azucarados, utilizando como sustrato almidón, el ácido más empleado es el ácido sulfúrico a temperaturas de 140°C a 170°C durante periodos de 10 a 60 minutos, obteniendo resultados similares a los que hemos obtenido empleando ácido clorhídrico a 120°C durante 20 minutos (Radley, 1976).

Lógicamente y como cabría de esperar, se encuentra una relación directa entre el incremento en la concentración de azúcares reductores liberados y el rango de concentraciones de ácido empleadas.

El hecho es interesante, ya que cuando el ácido que se emplea es el ácido clorhídrico y las condiciones de hidrólisis son poco energéticas (115°C durante 15 minutos con una concentración de ácido de 0.5, 1.0, y 1.5% v/v. para una relación de almidón/ácido de 1/10 p/v., mientras que empleando condiciones de hidrólisis más energéticas (120°C durante 20 minutos con una concentración de ácido de 0.5, 1.0 y 1.5% v/v. y una relación 1/5 p/v. almidón/ácido, tan sólo se duplicó el rendimiento al triplicar la concentración de ácido de azúcares

reductores libres.

La concentración de azúcares reductores obtenidos por este procedimiento es del mismo orden a las obtenidas por métodos patentados como el Kroyer y el Kingma (Kingma, 1966), (Kroyer, 1967) utilizando concentraciones de ácido y temperaturas más elevadas.

Dada la importancia, en este proceso de transformación, de ahorrar energía y reactivos, parece aconsejable utilizar como agente hidrolítico el ácido clorhídrico diluido frente al ácido sulfúrico.

#### 4.2.- EFECTO DE LA TEMPERATURA Y DEL TIEMPO EN EL PROCESO DE HIDROLISIS.

Para una temperatura de 115°C se puede apreciar que el aumento en el tiempo de hidrólisis, pasando de 15 a 20 minutos no aumenta significativamente el rendimiento de la misma, todo lo más lo mantiene, y, en algunas ocasiones lo reduce (ver Tabla 3.3).

Las mejores condiciones que se han obtenido para una temperatura de 115°C son una relación almidón/ácido de 1/5 p/v. con un 1.5% v/v. de ácido clorhídrico durante 15 minutos, obteniendo 293.70 g/l. de azúcares reductores libres.

Al elevar en 5°C la temperatura (120°C) se aprecia que los valores de azúcares reductores liberados en la hidrólisis son mayores que en las mismas condiciones a 115°C, y al contrario que con esta temperatura puede apreciarse un aumento en el rendimiento en la hidrólisis al prolongar el tiempo de la misma de 15 a 20 minutos. De esta forma, se obtienen los mejores resultados para estas condiciones, con una relación almidón/ácido de 1/5 p/v. con una concentración de ácido clorhídrico de 1.5% v/v. durante 20 minutos.

Si se comparan estos resultados con los obtenidos para las mejores condiciones a 115°C y 120°C, se confirma que con un aumento de 5 minutos en el tiempo de hidrólisis, elevando la temperatura en 5°C (de

115°C a 120°C), se logra un aumento en el rendimiento de la hidrólisis de alrededor de un 40%, lo que parece aconsejar el empleo de estas condiciones frente a cualquier otra en el proceso estudiado.

#### **4.3.- INFLUENCIA DE LA INCORPORACION DE AGENTES TENSOACTIVOS EN LA MEJORA DE LAS CONDICIONES DE HIDROLISIS.**

Según los resultados que se muestran en las Tablas 3.4 y 3.5, se aprecia un aumento en la eficacia de la hidrólisis al utilizar ácido sulfúrico frente a ácido clorhídrico, cuando previamente se incorpora un 0.1% de Tween 80 o glicerina.

Este aumento en la capacidad hidrolítica mejora unas 28 veces los resultados de la hidrólisis (115°C durante 15 minutos, una relación almidón/ácido de 1/10 p/v. y una concentración de ácido sulfúrico de 0.5% v/v) y casi 100 veces los resultados de las mejores condiciones anteriores (120°C durante 20 minutos una relación almidón/ácido de 1/5 p/v. y una concentración de ácido sulfúrico de 1.5% v/v) cuando el agente tensoactivo empleado es la glicerina. Entre unas 22 veces (115°C durante 15 minutos una relación almidón/ácido de 1/10 p/v. con una concentración de ácido sulfúrico de 0.5% v/v.) y más de 60 veces (115°C durante 20 minutos con una relación almidón/ácido de 1/5 p/v. y una concentración de ácido sulfúrico del 1.5% v/v.) cuando el tensoactivo empleado es Tween 80.

Por el contrario, puede apreciarse una reducción en la capacidad hidrolítica por parte del ácido clorhídrico tanto con la incorporación de Tween 80 como con glicerina.

Este descenso oscila entre un 67.15% en el peor de los casos (115°C durante 15 minutos con una relación almidón/ácido de 1/10 p/v. y una concentración de ácido clorhídrico de 0.5% v/v) y de un 57.4% para el mejor de los casos cuando el tensoactivo empleado es glicerina (120°C durante 20 minutos una relación almidón/ácido de 1/5 p/v. y una concentración de ácido clorhídrico de 0.5% v/v.) (ver Tabla 3.5).

Cuando el tensoactivo empleado fue el Tween 80, la pérdida de capacidad oscila entre un 81.75% (115°C durante 15 minutos una relación almidón/ácido de 1/10 p/v y una concentración de ácido clorhídrico de 0.5% v/v) y un 50.86% (115°C durante 20 minutos una relación almidón/ácido de 1/5 p/v. y una concentración de ácido clorhídrico del 1.5% v/v.) en el peor y en el mejor de los casos respectivamente.

En definitiva, en los resultados puede apreciarse un fenómeno antagónico, en el que dependiendo del tipo de ácido empleado en el proceso de hidrólisis, la incorporación de un agente tensoactivo dificulta o mejora la capacidad hidrolítica del ácido, resultando el efecto potenciador con el ácido sulfúrico mucho más importante que el efecto inhibitor ejercido sobre el ácido clorhídrico.

Aun así, empleando las mejores condiciones alcanzadas con el ácido sulfúrico con la incorporación de tensoactivos (glicerina) (115°C durante 20 minutos una relación almidón/ácido de 1/5 p/v y una concentración de ácido del 1.5% v/v.). La cantidad de azúcares reductores liberados es un 60.24% inferior que la obtenida empleado ácido clorhídrico en las mejores condiciones de hidrólisis (120°C durante 20 minutos una relación almidón/ácido de 1/5 p/v. y una concentración de ácido del 1.5% v/v.

#### **4.4.- COMENTARIOS SOBRE LA COMPOSICION CUANTITATIVA DEL HIDROLIZADO.**

Según los resultados obtenidos en el análisis cromatográfico (H.P.L.C.) de la muestra del hidrolizado, se aprecia un componente mayoritario con un coeficiente de retención de 9.96 minutos (Figura 3.2) identificado como glucosa, que supone el 89% de la composición del hidrolizado. En segundo lugar, aparece un segundo componente con un coeficiente de retención de 7.98 minutos que se identifica como maltosa, y que supone un 9.6% de los azúcares identificados en el hidrolizado. Asimismo se observa un tercer pico con un coeficiente de retención de 6.93 minutos identificado como maltotriosa, que tan sólo supone un 1.3% del total de azúcares.

Por último, aparece un cuarto pico con un coeficiente de retención de 6.48 minutos no identificado con ninguno de los componentes del patrón de azúcares empleado. Por las características de la muestra y su coeficiente de retención puede tratarse de dextrinas solubles de bajo peso molecular.

En definitiva, el contenido en azúcares totales del hidrolizado supone un equivalente en dextrosa (D.E.)<sup>1</sup> del 41.9%. Este rendimiento en dextrosa supone una efectividad en la hidrólisis, según las condiciones ensayadas, del 71%.

La concentración de azúcares producida en el hidrolizado es muy similar a la obtenida industrialmente en procesos de hidrólisis ácida, en los que se consiguen alcanzar niveles del 42% en equivalentes en dextrosa. Hay que considerar que, el máximo nivel de glucosa alcanzado por estos procedimientos industriales oscila entre el 16 y el 20% (Radley 1976), mientras que en el hidrolizado obtenido con el tratamiento aplicado se obtiene un 89% de glucosa.

Este proceso supone por tanto una mejora significativa en los procesos de hidrólisis ácida para producir mezclas azucaradas a partir de sustratos hidrocarbonados complejos.

#### 4.5.- SELECCION DE LAS CEPAS DE HONGOS FILAMENTOSOS.

Los criterios utilizados en la selección de las cepas de hongos filamentosos con las que se ha trabajado han sido varios:

1.- En primer lugar, las cepas deben desarrollar un buen crecimiento sobre medios de cultivo con hidrolizado como fuente de carbono. El comportamiento de las cepas de hongos filamentosos ensayadas ha sido bastante homogéneo.

---

<sup>1</sup>En las industrias productoras de jarabes azucarados no se emplea el concepto de azúcar reductor sino el de equivalente en dextrosa siendo ambos sinónimos.

En el medio de cultivo nº 1, que tan sólo contiene hidrolizado de almidón diluido se observa un escaso crecimiento en la mayoría de las cepas. Solamente *T. harzianum* 2413, *T. reesei* QM 9414, *Ch. globosum* 2103 y *T. reesei* 2416 presentaron crecimientos aceptables.

De forma similar, cuando se determina el crecimiento sobre medios de cultivo con más nutrientes se observa que en los medios 3 y 4 se obtienen mejores crecimientos con todas las cepas ensayadas.

De todas ellas pueden destacarse *A. sulfuros*, *T. reesei* 2414, *Ch. globosum* 2103, *T. harzianum* 2413 y *T. reesei* QM 9414.

2.- El segundo criterio utilizado es la capacidad de degradar celulosa y sus derivados.

Con una adaptación del sistema descrito por Hankin y Anagnostakis en 1975, para determinar actividades enzimáticas en medio sólido; se observa, en principio, ausencia de crecimiento en las dos cepas de *A. fumigatus* ensayadas.

En general, aparece una reducción en la actividad celulolítica medida en el crecimiento sobre avicel, frente a otros sustratos como papel de filtro, en el que se detecta gran crecimiento y una elevada actividad enzimática que llega hasta la destrucción completa del papel. Este punto también es interesante, pues permite comparar el potencial degradativo de las distintas cepas ensayadas frente a la celulosa bruta.

A la vista de los resultados obtenidos, las cepas con mayor potencial degradativo sobre el papel son *T. harzianum* 2413, *T. reesei* QM 9414, *Ch. globosum* 2103, *T. reesei* 2415 y *T. reesei* 2416.

Todas estas cepas han sido descritas con un elevado potencial celulolítico (Mandels y Reese, 1960), (Reese, 1980), (Mandels, 1982), y algunas como *Ch. globosum* además por su elevado potencial hemicelulolítico (Sorensen, 1952).

#### 4.6.- EFECTO DE LA FUENTE DE NITROGENO SOBRE LA ASIMILACION DE LA FUENTE DE CARBONO Y LA PRODUCCION DE BIOMASA.

En las Tablas 3.10.1 a 3.14.4, se pone de manifiesto el efecto de la incorporación en el medio de cultivo de una fuente de nitrógeno orgánica (L-aminoácidos o peptona) o inorgánica (nitrato amónico).

El empleo de nitrato amónico está justificada, pues la mayor parte de los hongos filamentosos utilizan el amonio como fuente de nitrógeno y asimismo, pueden utilizar los nitratos vía reducción a amonio. (Morgan, 1954) (Lewis, 1970); siendo esta asimilación secuencial, pues la nitrato reductasa se inhibe por amonio (Schoemer y Garret, 1974).

Al incorporar a los medios de cultivo base una fuente de nitrógeno orgánica, se observa una disminución en el consumo de la fuente de carbono, y un aumento en la producción de biomasa cuando en los medios no existe nitrato amónico, siendo este efecto menos acusado cuando la fuente de nitrógeno es peptona. Estos niveles de producción son demasiado elevados comparados con el consumo de la fuente de carbono.

El fenómeno puede ser explicado, ya que muchos hongos filamentosos pueden utilizar aminoácidos como fuente de carbono y nitrógeno (Jennings, 1978) (Lehninger, 1981).

De igual forma, cuando en el medio de cultivo existen aminoácidos o peptona, la biomasa fúngica parece tener un mayor contenido en nitrógeno que cuando solamente existe nitrato amónico en el medio de cultivo (Tablas 3.10.1 a 3.14.4).

Análogamente, puede observarse, que, en general, la adición de nitrato amónico junto con L-aminoácidos o peptona, inhibe el consumo de estos últimos, acelerando el consumo de la fuente de carbono.

Este efecto sobre el consumo de peptona, puede ser debido a que para su metabolización se precisa la acción de proteasas ácidas que son inhibidas por amonio, y el efecto sobre los aminoácidos porque los transportadores específicos son igualmente inhibidos por amonio.

(Wiley, 1970).

Con respecto a la concentración de la fuente de nitrógeno orgánica necesaria, según los resultados obtenidos, se observa un normal aumento de producción de biomasa al incrementar su contenido. De esta forma, parece aconsejable emplear una concentración de 2.5 g/l de peptona micológica o del complejo de L-aminoácidos en la elaboración de los medios de crecimiento para hongos filamentosos.

En las Tablas 3.15 a 3.54 y Figuras 3.3 a 3.42 aparecen los resultados obtenidos al incorporar 2.5 g/l de peptona o de L-aminoácidos a los distintos medios de cultivo, pudiendo apreciarse diferencias significativas en el consumo de la fuente de carbono y la producción de biomasa, entre los distintos medios de cultivo y sobre todo, diferencias entre las distintas cepas de hongos ensayadas.

Con estos resultados parece aconsejable utilizar una fuente de nitrógeno orgánica en la elaboración de los medios de cultivo. El coste de la incorporación de aminoácidos es un factor limitante a la hora de seleccionar la peptona como fuente de nitrógeno; la peptona ejerce una doble función, por un lado sirve de reserva de la fuente de nitrógeno cuando en el medio de cultivo se agota el amonio, y por otro lado, por sus características anfotéricas ayuda a mantener el valor de pH del medio.

Por otro lado, parece aconsejable la adición conjunta de nitrato amónico y peptona a los medios de cultivo, pues aunque se obtiene menos biomasa, se acelera el consumo de la fuente de carbono de los mismos.

#### **4.7.- INFLUENCIA DE LA RELACION CARBONO/NITROGENO EN EL RENDIMIENTO.**

En función de los resultados que se muestran en las Tablas 3.55 a 3.59, puede observarse que los medios de cultivo nº 7, 8 y 9 con un contenido doble en hidratos de carbono con respecto al resto de los medios de cultivo, para todas las cepas de hongos filamentosos

ensayadas presentan rendimientos más bajos. Tan sólo en el caso de *T. reesei* 2415 el rendimiento obtenido en el medio de cultivo n° 8 es similar al obtenido en el medio de cultivo n° 5 que posee la mitad de la fuente carbonada. Algo así ocurre con *Ch. globosum* 2103 al comparar el rendimiento obtenido en el medio de cultivo n° 9 respecto a los alcanzados en los medios de cultivo n° 4, 5, y 6 con la mitad del contenido de fuente de carbono.

Considerando, que una parte de la peptona y de los L-aminoácidos sean empleados como fuente de energía, los rendimientos de los medios de cultivo n° 8 y 9 resultan inferiores a los obtenidos con el medio de cultivo n° 2 que únicamente posee nitrato amónico como fuente de nitrógeno.

Del mismo modo, al comparar los rendimientos obtenidos con los medios de cultivo n° 2 y 7 en los que no existe fuente de nitrógeno orgánica, y que tan sólo se diferencian en la relación carbono/nitrógeno, se constata que al duplicar esta relación se produce una reducción en el rendimiento. Este fenómeno también puede comprobarse al comparar los rendimientos de los medios de cultivo n° 3 y 4 frente a los medios de cultivo n° 8 y 9. Este fenómeno puede explicarse por una posible insuficiencia en la fuente de nitrógeno, desequilibrando la citada relación carbono/nitrógeno, convirtiendo así a este factor, en limitante del proceso.

Así pues parece oportuno emplear para el cultivo en batch de estos hongos filamentosos, medios de cultivo cuyo contenido en hidratos de carbono sea de 6 g/l. frente a los que contengan 12 g/l.

#### **4.8.- SELECCION DE HONGOS CELULOLITICOS EN FUNCION DE LA VELOCIDAD DE ASIMILACION DE LA FUENTE DE CARBONO.**

Basándonos en los datos aportados en los apartados anteriores, podemos concluir que, la cepa *T. reesei* QM 9414 junto con la de *T. harzianum* 2413 logran consumir la totalidad de la fuente de carbono de la mayor parte de los medios de cultivo en un intervalo de tiempo

que oscila entre las 40 y las 48 horas.

Teniendo en cuenta que se pretende una rápida asimilación de la fuente de carbono, para conseguir la desrepresión catabólica del complejo celulolítico en estas cepas de hongos filamentosos, unido a conseguir niveles elevados de rendimiento, niveles que se traducen en una abundante producción de biomasa; consideramos que es aconsejable utilizar la cepa *T. reesei* QM 9414 en el medio de cultivo n° 3 para la producción de biomasa fúngica que presente desreprimido el complejo enzimático celulolítico.

#### 4.9.- INFLUENCIA DE LA AGITACION EN LA ASIMILACION DE LA FUENTE DE CARBONO POR *T. REESEI* QM 9414 EN CULTIVO EN BATCH EN FERMENTADOR.

A la vista de los resultados que se muestran en la Figura 3.43, se aprecia una correlación positiva entre el aumento en el régimen de revoluciones del fermentador y la velocidad de consumo de la fuente de carbono.

Durante las 12 primeras horas de incubación es cuando se aprecian las mayores variaciones en la velocidad de consumo de la fuente de carbono. A 700 r.p.m. utilizando el medio de cultivo n° 3 se consume el 88.5% de sustrato, mientras que en el mismo tiempo utilizando el medio de cultivo n° 10, tan sólo se consume un 52.5%. Al llegar a este punto es importante señalar que 4 horas después (16 horas desde el comienzo de la experiencia) tanto en el medio de cultivo n° 3 como en el n° 10 se ha agotado totalmente la fuente de carbono. Ello implica una reducción en la velocidad de asimilación en el medio de cultivo n° 3 y un aumento en el medio n° 10. Este fenómeno puede ser debido al brusco descenso del valor de pH entre las 10 y las 12 horas en el medio de cultivo n° 3, debido posiblemente a la alta velocidad de consumo de la fuente de carbono en este intervalo de tiempo (de 2.70 g/l. se pasa a 0.67 g/l.) y a la consecuente alteración de los componentes del medio de cultivo.

En cambio, en este intervalo de tiempo, en el medio de cultivo n<sup>o</sup> 10, si bien el valor de pH desciende bruscamente, se encuentra dentro del intervalo en el que la tasa de consumo de sustrato es más alta (ver Tabla 3.62).

Al calcular  $q$  (tasa específica de consumo de sustrato) para el intervalo entre las 12 y las 16 horas en estas condiciones, este hecho se pone de manifiesto de una forma aún más patente, obteniendo valores de  $q^{M3}_{12-16 \text{ h.}} = 0.120 \text{ g/g.h}$  y de  $q^{M10}_{12-16 \text{ h.}} = 0.438 \text{ g/g.h}$ . Análogamente, al comparar en este intervalo la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ), se obtienen valores de  $\mu^{M3}_{12-16 \text{ h.}} = 0.0241 \text{ h}^{-1}$ . y  $\mu^{M10}_{12-16 \text{ h.}} = 0.438 \text{ h}^{-1}$ .

Al reducir la agitación a 500 r.p.m., se logra la asimilación del 50% de la fuente de carbono utilizando el medio de cultivo n<sup>o</sup> 3 (en las 12 primeras horas de cultivo), y una del 38.8% cuando el medio de cultivo utilizado es el n<sup>o</sup> 10, con unos valores finales de pH de 3.2 y 4.3 respectivamente.

De una forma similar, al reducir la agitación a 300 r.p.m. se aprecia el mismo comportamiento, asimilando en las 12 primeras horas un 35% de la fuente de carbono en el medio de cultivo n<sup>o</sup> 3 frente al 30.8% del medio de cultivo n<sup>o</sup> 10, alcanzando unos valores finales de pH de 3.6 y 4.3 respectivamente.

Transcurridas las 24 horas de la experiencia, se comprueba que con este régimen de agitación (300 r.p.m.), no se consume en su totalidad la fuente de carbono, quedando un 25% en el medio de cultivo n<sup>o</sup> 3 y un 33% en el medio de cultivo n<sup>o</sup> 10.

Al efectuar estudios morfológicos sobre los hongos filamentosos en cultivo sumergido, se aprecia que con una agitación elevada (700 r.p.m.). si bien es favorable para el proceso de consumo de la fuente carbonada, las fuerzas de cizalladura derivadas del roce con las palas del fermentador provocan la rotura de las hifas del micelio. A 500 r.p.m. se observa una considerable reducción de este fenómeno.

Por ello, parece aconsejable llegar a un compromiso, y utilizar una

agitación de 500 r.p.m. en el desarrollo del proceso de producción de biomasa, de esta forma, alcanzamos unos niveles aceptables de consumo de la fuente de carbono, evitando además la ruptura del micelio.

#### 4.10.- EFFECTO DEL VALOR DE pH DEL MEDIO DE CULTIVO EN EL CONSUMO DE LA FUENTE DE CARBONO POR *T. REESEI* QM 9414 EN CULTIVO EN BATCH.

Los resultados que parecen en la Figura 3.44, reflejan que cuando en el medio de cultivo existe una concentración inicial de 1 g/l. de  $PO_4HK_2$  (medio de cultivo nº 3) existe una correlación positiva entre el consumo de azúcares reductores del medio de cultivo y el descenso del valor de pH del mismo, observando que en cualquiera de las condiciones, un mayor consumo de la fuente de carbono proporciona un descenso más acusado en los valores de pH.

Al comparar estos resultados con los obtenidos en el medio de cultivo nº 10 en el que se quintuplicaba la concentración de  $PO_4HK_2$ , se aprecia una menor oscilación en los valores de pH, estabilizándose en un intervalo entre 3.0 y 3.5, originando así, una ligera disminución en la velocidad de asimilación de la fuente de carbono.

Para confirmar estos resultados, se determinó el consumo de azúcares reductores por *T. reesei* QM 9414 a distintos valores de pH, determinando que el consumo de la fuente de carbono es más elevado a valores de pH inferiores a 5.0. Valores de pH inferiores a 3.5 proporcionan descensos significativos en el rendimiento ( $Y_{x/s}$ ), descensos comprendidos entre un 28.89% para pH 2.5 y de un 22.29% en el mejor de los casos frente a los obtenidos a otros valores de pH (ver Tabla 3.61).

Los valores de pH que proporcionan mejores rendimientos son pH 4.0 y 4.5 con  $Y_{x/s}$  de 0.780 g/g. y 0.741 g/g. respectivamente.

De igual forma la tasa específica de crecimiento más elevada se obtuvo con estos valores de pH, siendo estas de  $\mu = 0.126 \text{ h}^{-1}$  para pH 4.0 y de  $\mu = 0.115 \text{ h}^{-1}$  para pH 4.5.

Al analizar la reacción existente entre el pH del medio de cultivo y la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) se observa una correlación entre ambos para el intervalo de valores de pH comprendido entre 2.5 y 4.0 (Figura 3.47), ello parece indicar que un aumento exponencial en el número de protones en el medio de cultivo (descenso de pH) origina un descenso lineal en la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ).

Según estos resultados, se propone una ecuación que permita pronosticar la evolución de  $\mu$  en función del valor de pH del medio de cultivo, en los intervalos de pH estudiados. La cinética que describe la relación entre  $\mu$  y el pH debe ser de tipo hiperbólica, pues el crecimiento se debe inhibir a valores bajos de pH, pero en el intervalo estudiado el comportamiento es de tipo lineal, ajustándose por ello a una ecuación de este tipo.

$$\mu = \mu_0 - \delta \cdot \log(H^+)$$

- Donde  $\mu$ : Tasa específica de crecimiento para cada valor de pH.  
 $\mu_0$ : Tasa específica de crecimiento para valores de pH próximos a 0.<sup>2</sup>  
 $\delta$ : Parámetro que determina la reducción de  $\mu$  con respecto al valor del pH del medio de cultivo.  
 $(H^+)$ : Concentración de protones del medio de cultivo expresada en g/l.

Esta hipótesis parece estar de acuerdo También con los resultados obtenidos por Brown (1975) para *T. viride*.

Tras el cálculo del coeficiente de mantenimiento para *T. reesei* QM 9414, se ha observado que esta tasa es anómalamente alta (0.145 g/g.h). Representando un orden de magnitud por encima de los obtenidos para otros hongos filamentosos (Tabla 1.3).

Los valores tan bajos del pH, como factor físico-químico, puede ser la causa de que en la población celular coexistan células no viables

---

<sup>2</sup> $\mu_0$  es un parámetro teórico, pues ningún hongo filamentosos es capaz de desarrollarse bajo condiciones tan extremas de pH.

con células viables, siendo ambos tipos producidos por la población viable.

Las células no viables son incapaces de reproducirse, pero pueden metabolizar la fuente de energía, alterando de esta forma las relaciones de rendimiento y de mantenimiento de la población; existiendo por tanto una tasa de muerte y una de crecimiento, ambas exponenciales (Van Uden, 1974).

De esta forma, se justificaría que el descenso tan acusado de los valores de rendimiento y de crecimiento (tasa específica de crecimiento) no se correspondan con un descenso en la velocidad de consumo de la fuente de carbono.

#### **4.11.- CONSIDERACIONES SOBRE EL DESCENSO DE LOS VALORES DE pH DEL MEDIO DE CULTIVO Y LA VELOCIDAD DE AGITACION DEL MISMO.**

Como se ha descrito en el apartado anterior, los resultados obtenidos parecen indicar que es el valor del pH del medio de cultivo la causa indirecta de las diferencias observadas en las distintas agitaciones.

Lógicamente, un aumento en la velocidad de agitación facilita una mayor accesibilidad de los nutrientes para el hongo filamentoso, ocasionando un mayor aumento en la velocidad de consumo de la fuente carbonada y consiguiente, un brusco descenso del valor del pH del medio de cultivo. De esta forma, un descenso del valor del pH del medio de cultivo por debajo de 3.0 lleva consigo una reducción del valor de los parámetros cinético implicados en el proceso.

Probablemente esto puede deberse, junto con una elevada energía de mantenimiento, a que un descenso de este tipo en los valores de pH lleva asociado un aumento en la resistencia al paso de nutrientes a la célula (Mozychenko, 1973).

Según Andreyeva, (1973), las permeasas pueden inhibirse por acción de los protones a valores muy bajos de pH, provocando con ello

reducciones importantes en los valores de la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ).

También Brown, (1975) propone que a valores de pH inferiores a 3.0 predomina fundamentalmente el metabolismo endógeno frente al exógeno, lo que implica por tanto, una reducción considerable del metabolismo celular destinado al crecimiento.

En cambio, a valores de pH comprendidos entre 4.0 y 4.5 predomina la producción de biomasa frente al metabolismo endógeno (Brown, 1975).

Esta hipótesis está de acuerdo con los datos empíricos obtenidos, y supone una forma de regulación por parte del microorganismo de su cinética de crecimiento.

De esta forma parece aconsejable ajustar el valor del pH del medio de cultivo inicialmente entre 4.0 a 4.5 cuando el objetivo del ensayo sea la obtención de biomasa fúngica.

#### **4.12.- EFECTO DE LA SUSTITUCION DE LA PEPTONA POR NITRATO AMONICO EN EL MEDIO DE CULTIVO PARA LA RENTABILIZACION DEL PROCESO DE PRODUCCION DE BIOMASA FUNGICA.**

A tenor de los resultados obtenidos que se muestran en la Figura 3.49, se observa que transcurridas 24 horas desde la inoculación, el medio de cultivo nº 11 al que se le adicionó nitrato amónico en lugar de peptona, contiene aún un 31.6% de fuente de carbono. En el medio de cultivo nº 3 con peptona en el que toda la fuente de carbono se agota entre las 20 y las 22 horas.

También puede observarse que en el medio de cultivo con nitrato amónico, el valor de pH desciende por debajo de 3.0 desde las 8 horas de incubación, mientras que en el medio de cultivo con peptona, los valores de pH durante toda la fase de crecimiento exponencial se mantienen entre 3.7 y 3.2. Nuevamente se confirma el hecho de que los valores de pH inferiores a 3.0 disminuye el crecimiento drásticamente,

aumentando el metabolismo de mantenimiento celular.

#### **4.13.- COMENTARIOS SOBRE LAS CONDICIONES OPTIMAS DE PRODUCCION DE BIOMASA CON *T. REESEI* QM 9414 SOBRE HIDROLIZADO DE ALMIDON.**

Estudiando aisladamente cada parámetro, así como el conjunto de los mismos, puede comprobarse que a 300 r.p.m. no se agota la fuente de carbono a lo largo de todo el ensayo, y a 700 r.p.m. se produce la fragmentación del micelio, lo que hace no aconsejable el empleo de estas últimas condiciones en los ensayos de producción de biomasa.

Un valor de pH inicial de 4.0 parece el más adecuado para el proceso, ya que en estas condiciones y con la incorporación de peptona en el medio de cultivo, se mantienen los niveles de pH por encima de 3.0 durante el tiempo necesario para agotar la totalidad de la fuente de carbono del medio de cultivo (entre 18 y 20 horas).

Por debajo de un valor de pH de 4.0 se puede apreciar la reducción en los rendimientos, siendo por debajo de pH 3.0 cuando se hace más acusado este efecto.

Del mismo modo, la peptona resulta ser mejor fuente de nitrógeno que las sales amoniacaes, evitando un descenso brusco de pH con la consiguiente inhibición del crecimiento. El problema que plantea el uso de peptona como fuente de nitrógeno es su capacidad de ser utilizada como fuente de carbono. Por ello, los valores de rendimientos obtenidos deben ser considerados como la suma de los obtenidos por la asimilación de los componentes del hidrolizado de almidón y una pequeña proporción de peptona.

De cualquier modo, y sin lugar a dudas, la comparación de los parámetros que aparecen en la Tabla 3.62, muestran que las mejores condiciones, tanto de producción de biomasa como de consumo de nutrientes, se consiguen con el medio de cultivo nº 3 a 500 r.p.m. a un valor de pH inicial en el medio de cultivo de 4.0.

#### 4.14.- ESTUDIOS DE CONSUMO DE LA FUENTE DE CARBONO POR RESPIROMETRIA.

Este método, mucho más sensible que la determinación de azúcares reductores consumidos, permite efectuar una evaluación indirecta de los mismos.

El análisis de los resultados obtenidos por respirometría permite comprobar que la velocidad de consumo de oxígeno más elevada que se alcanza con *T. reesei* QM 9414 se obtiene cuando el valor de pH se estabiliza a 4.0, siendo esta de  $q_{O_2} = 0.275$  mmol/g.h. (Tabla 3.65).

De igual modo puede apreciarse que utilizando valores inferiores de pH se reduce considerablemente la velocidad de consumo de oxígeno.

Tomando como valor 100 el valor de  $q_{O_2}$  para el valor de pH 4.0, se observa que la tasa de consumo de oxígeno se reduce en un 32.80% cuando el valor del pH es de 3.5, a pH 3.0 esta tasa se reduce en un 69.63% y al descender hasta 2.5 el descenso supone un 81.09%.

Nuevamente, los resultados experimentales parecen indicar que el descenso brusco de los valores de pH por debajo de 4.0 es crucial a la hora de decidir si se pretende producir biomasa fúngica o potenciar el metabolismo endógeno del microorganismo.

A partir de los resultados obtenidos, que aparecen en la Figura 3.52, y siempre en función de los datos experimentales, es posible comprobar que la velocidad de consumo de oxígeno aumenta de forma exponencial al aumentar la concentración de protones del medio también de la misma forma. Así pues es posible obtener una ecuación que permita predecir la evolución de este parámetro.

$$\ln q_{O_2} = \ln q_{O_2} + \epsilon \cdot \text{pH}$$

En el que  $\epsilon$ , es un parámetro que determina la velocidad de consumo de oxígeno en función del valor de pH.

Considerando que *T. reesei* QM 9414 posee únicamente metabolismo oxidativo (Domsch, 1980), con los datos obtenidos en los apartados

3.8.2 y 3.10 puede determinarse que la reducción en la tasa de consumo de oxígeno lleva consigo una reducción en la velocidad de asimilación de la glucosa; y, así mismo, una reducción en la tasa específica de crecimiento (en estas condiciones).

El cálculo de  $\epsilon$  puede proporcionar una información indirecta sobre el fenómeno de inhibición del consumo de la fuente de carbono a valores de pH muy bajos permitiendo de igual forma una cuantificación indirecta del mismo.

#### 4.15.- MODELOS MATEMATICOS DE CRECIMIENTO PARA T. REESEI QM 9414 EN CULTIVO SUMERGIDO.

Con los datos que se muestran en las Figuras 3.52 y 3.54 puede apreciarse que en las condiciones de ensayo, utilizando hidrolizado de almidón como fuente de carbono para el crecimiento de *T. reesei* QM 9414, aparecen a lo largo del intervalo de tiempo estudiado distintas tasas de crecimiento.

Marshall y Alexander, (1960) al estudiar el comportamiento de *Neurospora crassa* en cultivo sumergido determinan mediante medidas de la velocidad de consumo de oxígeno que el modelo de crecimiento al que mejor se ajusta este microorganismo es el modelo en raíz cúbica.

Trici en 1975, establece el concepto de unidad de crecimiento micelial y empleando medidas de crecimiento de elongación de las hifas por microfotografía, establece que el modelo de crecimiento exponencial puede ser aplicado igualmente al crecimiento de *N. crassa*.

Al ajustar los datos experimentales obtenidos con *T. reesei* QM 9414, se ha observado que para los intervalos de tiempo empleados, ambos modelos son igualmente válidos para este microorganismo, al crecer en hidrolizado de almidón en cultivo sumergido.

Resulta interesante hacer una serie de comentarios a los resultados obtenidos por (Marshall, 1960) y (Trici, 1975) con *N. crassa*.

Marshall en principio, emplea como medida de crecimiento micelial una medida metabólica (la tasa de consumo de oxígeno en el tiempo).

Los resultados obtenidos con *T. reesei* QM 9414 al estudiar la evolución de esta tasa con el valor del pH del medio de cultivo, indican que esta medida sólo puede ser utilizada como medida de crecimiento cuando el medio de cultivo sobre el que se desarrolla el microorganismo tiene un valor de pH estable a lo largo del tiempo. Y que cualquier alteración en este valor de pH, lleva consigo una alteración en la velocidad de consumo de oxígeno del microorganismo y por lo tanto, del crecimiento.

Trici, al elaborar la hipótesis de la unidad de crecimiento hifal, demuestra que también a los microorganismos filamentosos se les pueden aplicar las ecuaciones del crecimiento exponencial. La base estructural de su hipótesis es del todo correcta, aunque Trici presupone que el crecimiento de las hifas en un pellet sumergido es homogéneo, haciendo únicamente alusión a problemas de diferenciación y de acceso de nutrientes en cultivos en medios sólidos.

La experiencia demuestra que esto no es así (Pirt, 1960), y que cuando un hongo filamentosos se desarrolla formando pellets más o menos densos en cultivo sumergido el comportamiento de las hifas no es del todo idéntico si se encuentran en la periferia o si están en el centro del pellet, pues la formación de la yemas es distinto según el consumo de oxígeno en un sitio o en otro.

Los estudios morfológicos llevados a cabo con *Trichoderma reesei* QM 9414, indican que crece en cultivo sumergido formando pellets de tipo laxo, es decir que todas las hifas están en contacto con el medio de cultivo no apreciándose diferencias morfológicas entre ellas, y por tanto, no presentando problemas de difusión de nutrientes al interior.

Por ello, al aplicar el modelo exponencial, los datos de peso seco obtenidos con *T. reesei* QM 9414 se ajustan perfectamente al mismo (Figuras 3.53 y 3.54).

De igual forma, teniendo en cuenta que los pellets de *T. reesei* QM 9414 son de tipo laxo, según la hipótesis de Pirt, (1960) en este tipo de pellets el radio de los mismos se aproxima al valor de la zona cortical metabólicamente activa, conocida como zona  $\Omega$ , así pues, *T. reesei* QM 9414 puede seguir entonces un modelo de crecimiento de tipo exponencial o de raíz cúbica indistintamente, hipótesis que parece ser confirmada con los resultados obtenidos.

En la Figura 3.55 aparece la distribución de los coeficientes de correlación de los ajustes de regresión utilizando uno u otro modelo.

A la vista de los resultados, pueden ser aplicados ambos modelos según criterios estadísticos, con un índice de confianza entre el 98 y el 100%.

La aplicación de uno u otro modelo sobre el crecimiento micelial conduce a la obtención de parámetros cinéticos similares, que básicamente definen la forma de crecimiento de los hongos filamentosos en cultivo sumergido.

Mientras que con el modelo de crecimiento exponencial es posible calcular  $\mu$  (tasa específica de crecimiento) que tan sólo obedece a la forma de reproducción del microorganismo, en el modelo en raíz cúbica, asumiendo que los pellets laxos de *T. reesei* QM 9414 crecen con una densidad uniforme, puede calcularse un parámetro  $\Sigma$  que puede ser definido como una tasa de producción de biomasa y por tanto de crecimiento del microorganismo. Esta tasa tiene en cuenta además de la forma de multiplicación del microorganismo su disposición espacial de desarrollo en el medio de cultivo así como su accesibilidad a los nutrientes del mismo.

De esta forma la ecuación que describe el crecimiento en raíz cúbica para pellets laxos puede ser transformada en:

$$M^{1/3} = M_0^{1/3} + \Sigma \cdot t \quad \text{donde } \Sigma = (4/3\pi \cdot \Gamma)^{1/3} \cdot W \cdot a$$

donde

M: Biomasa en un tiempo t, expresada g/l.

$M_0$ : Biomasa para t=0, expresada en g/l.

$\alpha$ :  $dr/dt$  (Elongación de las hifas por unidad de tiempo).

t: Tiempo expresado en horas.

$\pi$ : Constante numérica (3.14158)

$\Sigma$ : Tasa de crecimiento.

$\Gamma$ : Densidad media de los pellets expresada en g/cm<sup>3</sup>.

W: Radio metabólicamente activo del pellet.

#### 4.16.- ENSAYOS SOBRE INDUCCION Y REPRESION DEL COMPLEJO CELULOLITICO CON DISTINTAS FUENTES DE CARBONO.

Con los resultados que aparecen en la Figura 3.58 puede apreciarse que tanto la glucosa como la celobiosa se comportan como sustancias represoras de los distintos componentes del complejo enzimático celulolítico. Con estas dos sustancias, los niveles enzimáticos a lo largo del proceso están próximos a cero.

Estos efectos fueron ya observados por Mandels en 1982, y aparecen considerados en algunos modelos cinéticos de producción enzimática (Moreira, 1981).

Mandels sugiere que este efecto es debido a que tanto la glucosa como la celobiosa son los productos finales de la degradación de la celulosa, y debido a ello, las enzimas del complejo celulolítico se reprimen por producto final.

La carboximetilcelulosa si bien no produce inducción alguna sobre los componentes del complejo enzimático, sí muestra una cierta capacidad estimulante (aunque muy baja 0.05 U.A.E/ml) sobre la actividad endoglucanasa. Hay que tener en cuenta que la carboximetilcelulosa es un producto celulósico más complejo que la celobiosa, y además, que es el sustrato sintético sobre el que se determina la actividad endoglucanasa, por ello parece lógico pensar que pueda ejercer un cierto efecto sobre la misma.

En cuanto a otros sustratos como la paja, el papel de filtro y el avicel, resultan sustancias mucho más efectivas en la inducción de las actividades del complejo celulolítico.

Acebal, en 1985, propone la paja como un buen sustrato para la producción de enzimas celulolíticas, previo tratamiento físico-químico de la misma. Según los ensayos efectuados hasta este momento, indican que si bien la paja puede ser utilizada como un buen sustrato en la producción de celulasas, el papel de filtro sin pretratamiento alguno se decanta como un sustrato mucho más "activo", de ahí que un posible tratamiento físico-químico del papel de filtro, pueda mejorar los niveles de producción de celulasas.

A lo largo de todo el proceso, ha podido observarse que cuando se determinan las actividades del complejo celulolítico por separado (endoglucanasa, exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa) los niveles de actividad son superiores a cuando se determinan sobre el papel de filtro como actividad celulasa total. Este fenómeno puede ser debido a que cuando actúa el complejo celulolítico sobre sustratos complejos como el papel de filtro, pueden aparecer fenómenos de interferencias entre las actividades, así como, posibles fenómenos de inactivación.

Estos datos se repiten a lo largo de todo el proceso, indicando que cuando se miden las actividades del complejo enzimático por separado, al determinarse sobre sustratos específicos y sintéticos presentan unos niveles de actividad enzimática superiores a cuando en conjunto en el complejo enzimático sobre sustratos más complejos como el papel de filtro.

Otro punto interesante es estudiar el posible efecto de la soforosa teóricamente presente en el hidrolizado de almidón. (Mandels, 1962).

Según este autor, la soforosa aparece como disacárido de reversión en los hidrolizados ácidos de almidón, y resulta extremadamente activa en la inducción del complejo celulolítico de *Trichoderma reesei*.

El análisis cromatográfico (H.P.L.C.) de los productos del

hidrolizado no ha permitido identificar a la soforosa como una fracción presente en el mismo. Esto puede ser debido a la elevada concentración de glucosa y maltosa presente en el mismo, y a que los niveles de soforosa en los hidrolizados de almidón son del orden de  $\mu\text{g/ml}$ .

Si se une esto a los datos de actividades enzimáticas a tiempo cero (antes de añadir las sustancias inductoras), que aparecen en la Figura 3.58, parecen indicar que, o bien su concentración se encuentra por debajo del umbral de inducción ( $4 \mu\text{M}$ ) (Sternberg, 1980) o bien no se encuentra en el mismo.

#### 4.17.- ENSAYOS CON PAPEL DE FILTRO Y AVICEL: ESTUDIOS DE LA INDUCCION DEL COMPLEJO ENZIMATICO.

Con los resultados obtenidos puede observarse un importante efecto positivo debido a la acción del pretratamiento físico sobre el papel de filtro.

Al comparar las actividades obtenidas con el avicel y el papel de filtro, sin pretratamiento físico, frente a las obtenidas con papel de filtro tratado, se observa que con este último las actividades son mucho más elevadas. Este fenómeno de aumento tan acusado en la actividad total del complejo enzimático ("Actividad de Papel de Filtro", F.P.A.) puede ser explicada teniendo en cuenta que en la celulosa existen zonas amorfas y cristalinas, y estas últimas crean una fuerte resistencia al ataque enzimático (Fan, 1981).

Por otro lado, el avicel es un sustrato sintético y muy puro de celulosa microcristalina, y si bien el tamaño de partícula que posee resulta idóneo para su ataque (Gapuray, 1983) no lo es así su estructura, ofreciendo impedimentos de tipo estérico al ataque enzimático. Algo similar sucede con el papel de filtro, pues debido a su estructura fibrilar y altamente compacta, resulta muy difícil su ataque (Puri, 1984).

Con el pretratamiento físico del papel de filtro se ha logrado una disgregación de esta estructura compacta, dejando expuestos al ataque enzimático las zonas de celulosa amorfa, resultando de esta forma el sustrato mucho más accesible a la acción enzimática de lo que era antes, mejorando los niveles de actividad enzimática.

Este efecto de mejora por acción del pretratamiento físico, se pone de manifiesto tanto en la actividad celulolítica total (F.P.A.) como en cada una de las actividades del complejo (endoglucanasa, exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa).

#### **4.18.- EFECTO DEL PRETRATAMIENTO QUIMICO SOBRE LOS DISTINTOS INDUCTORES.**

A la vista de los resultados obtenidos, y que se observan en las Figuras 3.59 y 3.60, puede observarse que el pretratamiento químico influye de distinta forma según el sustrato pretratado y según las actividades enzimáticas ensayadas.

Si bien se observa una acción más o menos homogénea sobre la actividad de papel de filtro (F.P.A.), encontrándose los niveles de actividad de los sustratos pretratados por encima de los no tratados, esta acción a veces no existe o se vuelve desfavorable en el caso de las actividades endoglucanasa, exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa estudiadas sobre papel de filtro y papel de filtro cardado.

Este fenómeno, aparentemente contradictorio, puede explicarse por el efecto del pretratamiento químico sobre los sustratos.

Básicamente, con este procedimiento se pretende reducir la estructura cristalina de la celulosa, disolver los posibles complejos lignina-celulosa, difícilmente atacables, y aumentar la superficie de contacto de la fibra celulósica (Han, 1983).

De los tres sustratos empleados, el papel de filtro, el que reúne las tres características, altamente cristalino, compacto y con

complejos lignina-celulosa; por tanto, la acción del pretratamiento químico debe actuar sobre más factores que con el papel de filtro cardado, donde el pretratamiento físico ha disgregado en parte su masa compacta, aumentando la superficie de contacto. En el caso del avicel, no existen complejos lignina-celulosa, y la relación superficie volumen es muy alta (Kim-Dong-Won, 1988).

El pretratamiento químico sobre el avicel únicamente transforma la celulosa cristalina en amorfa, transformándolo en un sustrato muy fácilmente atacable; es por ello por lo que con el avicel pretratado químicamente se obtienen los mejores niveles de actividad enzimática de los tres sustratos, reduciendo el tiempo de aparición de las mismas y presentando un máximo de actividad F.P.A. a las 72 horas, frente al máximo obtenido a las 168 horas cuando no estaba tratado.

Sobre el papel de filtro cardado, también se observa un efecto beneficioso con el pretratamiento, aunque inferior al obtenido sobre el avicel. Por último, los niveles más bajos de actividad se han obtenido con el papel de filtro, probablemente porque el pretratamiento químico por sí sólo no es capaz de disgregar la masa del mismo, y romper las uniones lignina-celulosa.

Acebal y colaboradores, en 1985, proponen que un factor muy importante en la producción de celulasas por *Trichoderma reesei* es el pretratamiento químico (alcalino) del sustrato, aumentando la digestibilidad de la celulosa, debido a la disociación de los complejos lignina-celulosa.

Con todos los datos aportados, el pretratamiento físico de los sustratos parece tan importante o más que el pretratamiento químico de los mismos; pues cuando el sustrato es de naturaleza compleja, como es el caso de los residuos lignocelulósicos, parece necesaria una disgregación previa de la masa de los mismos, favoreciendo de esta forma el posterior tratamiento químico.

En resumen, las características fisico-químicas de cada uno de los sustratos, así como su mayor o menor complejidad, son la causa

fundamental de que el pretratamiento químico afecte en mayor o menor medida al comportamiento de las actividades enzimáticas del complejo celulolítico de *Trichoderma reesei* QM 9414.

#### **4.19.- EFECTO DE LA ADICION DE NUTRIENTES AL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA ACTIVIDAD DEL COMPLEJO CELULOLITICO.**

La incorporación de nutrientes (sales minerales y peptona) a los medios de producción enzimática parecen tener un efecto positivo sobre la misma.

Este aumento en las actividades enzimáticas del complejo celulolítico, es mucho más acusado en la actividad F.P.A. (Actividad de Papel de Filtro), llegando a niveles de actividad de 0.37 F.P.U/ml.

Del mismo modo, se ha podido observar que dependiendo de la fuente de carbono presente en el medio (avicel, papel de filtro o papel de filtro cardado), la incorporación de los nutrientes al añadir la citada fuente de carbono, puede tener un efecto sinérgico o antagónico sobre las distintas actividades del complejo, dependiendo de que la fuente de carbono haya sufrido pretratamiento químico o no.

Como ejemplo, cabe citar el papel de filtro cardado. El pretratamiento químico del mismo, junto con la adición de nutrientes, permiten obtener mayores niveles de actividad F.P.A. en menos tiempo (ver figura 3.6.1.2). En cambio, esta acción resulta negativa para la actividad exoglucanasa, determinada en las mismas condiciones.

Teniendo en cuenta que los estudios para la producción de celulasas en dos fases son escasos, resulta muy complejo analizar la influencia de estos parámetros. Brown en 1975 y Riu, Andreotti y Mandels en 1979, efectuaron estudios del crecimiento de *Trichoderma reesei* y *Trichoderma viride* sobre sustratos solubles potencialmente inductores de celulasas (lactosa, o la sofrosa contenida en la cerelesa), incorporando al medio de cultivo una base de sales minerales, y en algunas ocasiones una fuente de nitrógeno orgánico (peptona o urea) en

concentraciones variables (Mandels y Weber, 1969), (Mandels y Andreotti, 1978).

Estas experiencias, que resultan las más similares a las que aquí se plantean, no realizan estudio alguno sobre el efecto de los componentes del medio de cultivo sobre la producción de celulasas.

Cuando se ha efectuado el estudio de la incorporación de nutrientes al medio de cultivo (Figura 3.62), se ha observado que no aparecen diferencias significativas entre la incorporación de sales minerales y peptona o únicamente sales minerales sobre las distintas actividades enzimáticas del complejo. Según estos datos parece lógico emplear sales minerales, como único nutriente a incorporar junto con el inductor a los medios de cultivo, ya que con la sólo incorporación de estos nutrientes se alcanzan niveles de actividad enzimática similares a los obtenidos con sales minerales y peptona.

En este momento es importante mencionar la gran variación de las actividades enzimáticas obtenidas bajo las mismas condiciones de trabajo en distintas experiencias. Estas oscilaciones no sólo han sido observadas por nosotros, sino que otros equipos las han hecho notar (Mandels, KubickeK, Strenberg etc...), pudiendo ser debidas a alteraciones metabólicas de las cepas de hongos filamentosos al ser mantenidas en laboratorio, o a sucesivos pases sobre medios de cultivo frescos.

#### 4.20.- EFECTOS DEL SALTO DE ESCALA (MATRAZ A FERMENTADOR) EN LA PRODUCCION DEL COMPLEJO CELULOLITICO (CULTIVO EN BATCH).

Al abordar el estudio de la producción de celulasas, la mayor parte de los trabajos se efectúan con agitación orbital (Knapp, 1986) (Schaffner, 1990), en algunas ocasiones, estos estudios se efectúan a nivel de fermentador (Ryu, Andreotti y Mandels, 1979), (Herr, 1979), pero en raras ocasiones se efectúa un estudio comparativo de salto de escala.

Tras analizar los resultados obtenidos en las mejores condiciones en agitación orbital (papel de filtro cardado, pretratado químicamente, incorporando al medio de producción sales minerales), con los obtenidos en fermentador utilizando las mismas condiciones, puede apreciarse que el aumento de la agitación ejerce un fuerte efecto positivo en la actividad celulolítica. Ahora bien, este efecto se presenta de un forma mucho más acusada en algunas enzimas del complejo celulolítico.

Asimismo, el aumento de la agitación reduce el tiempo de "latencia" en la aparición de las actividades del complejo celulolítico. Este efecto aparece más marcado en la actividad endoglucanasa y exoglucanasa.

Esto puede deberse a que el micelio del hongo filamentoso se encuentra en un estado metabólico distinto cuando se cultiva en matraz o en fermentador. En este último la presión parcial de oxígeno no resulta ser un factor limitante para el crecimiento (Herr, 1979), o quizá haya que considerar otros motivos, bien de tipo espacial o de accesibilidad a los sustratos para la producción enzimática.

En cualquiera de los casos, parece aconsejable utilizar una agitación de 500 r.p.m. (en fermentador), para incrementar la producción de celulasas, incremento que llega al 307.9% en la actividad F.P.A., comparada con la actividad obtenida en las mejores condiciones bajo agitación orbital.

Las actividades endoglucanasa, exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa, también se ven incrementadas considerablemente, este aumento es de un 109% para la actividad endoglucanasa, de un 133.9% para la exoglucanasa a las 96 horas, y de un 40% para la  $\beta$ -glucosidasa en las primeras 48 horas.

De acuerdo con los datos empíricos, es posible determinar el comportamiento de las distintas actividades enzimáticas del complejo celulolítico a lo largo del tiempo.

Un análisis de regresión de estos datos parece indicar, que tanto la actividad F.P.A., como las distintas enzimas del complejo celulolítico (endoglucanasa, exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa) se producen siguiendo un modelo exponencial (Figura 3.64 y Tabla 3.67).

Al efectuar el ajuste de las ecuaciones descritas, el nivel de confianza de las mismas está comprendido entre el 96 y 99%, según la actividad enzimática y las condiciones de agitación.

Cuando los ajustes se efectúan sobre los datos obtenidos en experiencias en matraz, los coeficientes de correlación resultan ser inferiores a cuando se efectúan sobre datos obtenidos en fermentador a 300 ó 500 r.p.m.

Este fenómeno, como se ha mencionado antes, puede deberse una deficiente oxigenación en el matraz, pudiendo verse dificultada la síntesis enzimática (Solomons, 1983).

Estos estudios, unidos a los fenómenos de inactivación y de adsorción, pueden aportar datos para explicar el comportamiento del complejo celulolítico de *Trichoderma reesei* QM 9414 en estas condiciones.

**V. - CONCLUSIONES**

**CONCLUSIONES:****MEDIO DE CULTIVO.**

1.- La adición de sustancias de carácter tensoactivo en procesos de hidrólisis de almidón tiene efectos negativos cuando el ácido empleado es el clorhídrico, reduciendo el potencial hidrolítico de este. Mientras que cuando el ácido utilizado es el sulfúrico el potencial hidrolítico aumenta notablemente.

2.- Con el proceso de hidrólisis ácida desarrollado con el almidón se obtienen niveles de sacarificación similares a los ya publicados, aumentando el contenido en glucosa de los mismos en un 73%.

**FISIOLOGIA DEL CRECIMIENTO.**

3.- La adición de nitrato amónico, como en otros hongos filamentosos, tiene un efecto inhibitorio en el consumo de aminoácidos libres y de peptona por parte de *Trichoderma reesei* QM 9414.

4.- La velocidad de consumo de la fuente de carbono aumenta con la aireación en medios de cultivo no tamponados. Este aumento es debido al descenso del valor del pH del medio, ya que no ocurre en los medios tamponados.

5.- El descenso en los valores de pH del medio produce un descenso en el rendimiento y consecuentemente en la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ), ya que aunque aumenta el consumo no es suficiente para compensar la caída en el rendimiento.

6.- Si la disminución en el rendimiento se atribuye a la energía de mantenimiento, el coeficiente ( $m$ ) calculado para nuestra cepa es 0.145 g/g.h, un orden de magnitud superior a los obtenidos con otros hongos filamentosos.

7.- Para establecer una ecuación matemática que describiera el crecimiento del microorganismo, utilizamos los modelos exponencial y en raíz cúbica. Nuestros datos se ajustan en un 98% según criterios estadísticos a los dos modelos, lo que permite inferir que crecimiento es de tipo en "pellet" laxo. Esta conclusión puede confirmarse por la observación microscópica de los "pellets".

#### PRODUCCION ENZIMATICA.

8.- El aumento de la agitación incrementa la actividad del complejo celulolítico, tanto en su determinación global, como en la valoración de las actividades endoglucanasa, exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa.

9.- Durante el proceso de inducción, la actividad endoglucanasa es la predominante del complejo celulolítico en los primeros momentos, apareciendo posteriormente y de forma secuencial las actividades exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa.

10.- *Trichoderma reesei* QM 9414 en las condiciones estudiadas presenta una cinética de producción de enzimas celulolíticas de tipo exponencial, tanto del complejo en conjunto como de cada componente aislado.

11.- Durante el proceso de inducción, la actividad endoglucanasa es la predominante del complejo celulolítico en los primeros momentos, apareciendo posteriormente y de forma secuencial las actividades exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa.

12.- Los niveles de producción enzimática no están correlacionados con las actividades que componen el complejo a lo largo del proceso de producción. De forma que las condiciones óptimas para la producción del complejo total o las distintas actividades no son las mismas.

**VI.- BIBLIOGRAFIA**

- ACEBAL, C.; CASTILLON, M.P.; ESTRADA, P.; MATA, I.; COSTA, E.; AGUADO, J.; ROMERO, D.; LACABA, F. 1985. "Cellulase production by *Trichoderma reesei* on wheat straw". Biochem Soc. 13: 453-455.
- ACEBAL, C.; CASTILLON, M.P.; ESTRADA, P.; MATA, I.; COSTA, E.; AGUADO, J.; ROMERO, D.; y JIMENEZ, F. 1986. "Enhanced cellulase production from *Trichoderma reesei* QM 9414 on physically treated wheat straw". Appl. Microbiol. Biotechnol. 24: 218-223.
- ALLOCOCK, E.R. y WOODS, D.R. 1981. "Carboxymethyl cellulase and cellobiase production by *Clostridium acetobutylicum* in an industrial fermentation medium". Appl and Environment. Microbiol. 41: 539-541.
- ANDERYEVA, E.A. 1973. "Effect of acid pH on the growth kinetics of *Trichoderma viride*". Biotechnol. and Bioeng., 17: 1199-1210.
- ATALLA, R.H. 1983. In "Wood and agricultural residues research on use feed, fuels and chemicals". Academic Press NY 64-65.
- BAILLEY, J. E. y OLLINS, D. F. 1977. Biochemical Engineering Fundamentals. Mac Graw Hill. N.Y. Capitulo 8.
- BERGHEM, L.E.R. y PETERSSON, L.G. 1973. Europ. J. Biochem., 37: 21-27.
- BERRY, D.R. 1988. "Fungal enzymes". En Physiology of Industrial Fungi. 101-129. Berry D.R. Ed. Londres.
- BHUMIBRAMON, O. 1982. "Effect of some surfactants on the production of acid protease by *Aspergillus phoenicis* and *Aspergillus awamori*". J. Ferm. Technol., 60: 167-170.
- BROWN, D.E. y HALSTED, D.J. 1975. "The effect of acid pH on the growth kinetics of *T. viride*". Biotechnol and Bioeng., 17: 1199-1210.

- CALVIN, J.R. 1979. "The Biosynthesis of Cellulose". En The Biochemistry of Plants. Calvin, J.R. Ed. Tomo 3. pp. 543-570.
- CAMICI, L.; SERMONTI, G. y CHAIN, E.B. 1952. "Observations on *Penicillium chrisogenum* in submerged culture". Bulletin of the World Health Organization, 6: 256-276.
- CANNEL, E.; y MOO-YOUNG, M. 1980. "Solid-State fermentation systems". Proc. Biochem., 2: 24-25.
- CARRASCO, J.E. 1988. Producción de etanol a partir de la biomasa de *Onopordum hervorum* Boiss tratada mediante hidrólisis ácida. Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología Facultad de Biología Universidad Complutense Madrid.
- CASTANON, M.; y WILKE, C.R. 1981. "Effects of the surfactant Tween 80 on enzymatic hydrolysis of newspaper". Biotechnol and Bioeng., 23: 1365-1372.
- CHANG, M.M.; CHOU, T.V. y TSAO, G.T. 1981. "Structure, pretreatment and hydrolysis of cellulose". Adv. Biochem. Eng., 20: 15-42.
- COBB, J.; WHITTEN, M. Y NICHOLAS, p. (1982). Comunicación Personal.
- COWLING, E.B. y KIRK, T.K. 1976. "Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion Processes". Biotechnol. and Bioeng. Symp., 6: 95-123.
- DAUSON, C.; BELLOCH, M.C. y URUBURU, F. 1989. Catálogo de cepas de la Colección Española de Cultivos Tipo. Dauson, C.; Belloch, M.C. y Uruburu, F. Ed. Departamento de Microbiología Facultad de Ciencias, Universidad de Valencia.
- DOMSCH, K.H.; GAMS, W. y ANDERSON, T.H. 1980. Compendium of soil fungi. Domsch, K.H. Ed. Academic Press, Londres.

- DOPPELBAUER, R.; ESTERBAUER, H.; STEINER, W.; LAFFERTY, R.M. y STERNMULLER, H. 1987. "The use of lignocellulosic wastes for production of cellulases by *Trichoderma reesei*". Appl. Microbiol. Biotechnol. 26: 485-494.
- EMERSON, S. 1950. "The growth phase in *Neurospora* corresponding to the logarithmic phase in unicellular organisms". J. Bacteriol. 60: 221-223.
- ERIKSSON, K.E. 1978. "Enzyme mechanisms involved in cellulose hydrolysis by the rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*". Biotechnol. and Bioeng., 20: 317-322.
- ERIKSSON, K.E. 1981. "Fungal degradation of wood components". Pure and Applied Chemistry. 56: 33-43.
- ESTERBAUER, H.; STEINER, W. y LAFFERTY, R.M. 1985. "Production of fermentable sugars from lignocellulosic raw materials by an enzymatic process". Symposium Importance of Biotechnology for Future Economic Development UN-Economic Commission for Europe. Szeged (Hungary), 3-7 Juni.
- FAGAN, R.D.; GRETHLEIN, H.E.; CONVERSE, O. y PORTEOUS, A. 1971. "Kinetics of the acid hydrolysis found in paper refuse". Environ. Science and Technol., 5: 157-185.
- FAGERSTOM, L.G.; PETERSON, L.G. y ENGSTROM, J.A. 1984. "The primary structure of a 1-4  $\beta$ -glucan cellobiohydrolase from the fungus *Trichoderma reesei* QM 9414". FEBS lett., 167: 309-315.
- FAN, L.T.; LEE, H.Y. y BEARDMORE, D.H. 1980. "Major chemical and physical features of cellulosic materials as substrate for enzymatic hydrolysis". Adv. Biochem. Eng., 14: 101-117.
- FAN, L.T. LEE, H.Y. y BEARMORE, D.H. 1981. "The influence of mayor structural features of cellulose on rate of enzymatic hydrolysis". Biotechnol. and Bioeng., 23: 414-442.

- FAN, L.T.; YOUNG-HYUN, L. y GARPURAY, M.M. 1982. "The nature of lignocellulosic materials and their pretreatments for enzymatic hydrolysis". *Adv. Biochem. Eng.*, 23: 157-185.
- FERNANDEZ GONZALEZ, J. 1980. "Conceptos generales sobre el aprovechamiento energético de la biomasa". En *Fuentes de biomasa con fines energéticos*. Editado por el Instituto de Energía de España. pp. 7-28. Madrid.
- GALBRAITH, J.C. y SMITH, J.E. 1969. "Filamentous Growth of *Aspergillus niger* in submerged shake culture". *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 52: 237-246.
- GALLO, B.J.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C.; RYU, D. y MANDELS, M. 1978. "Cellulase production by a new mutant strain of *Trichoderma reesei* MCG 77". *Biotechnol. and Bioeng. Symp.*, 8: 89-101.
- GHAPURAY, M.M.; LEE, Y.H. y FAN, L.T. 1983. "Structural modification of lignocellulosics by treatment to enhance enzymatic hydrolysis". *Biotechnol. and Bioeng.*, 21: 131-146.
- GOLUEKE, C.G. 1977. *Biological reclamation of solid wastes*. Rodate Press. Pennsylvania.
- GONG, C.S.; LADISCH, M.R. y TSAO, G.T. 1979. "Cellobiase from *Trichoderma viride*: purification, properties, kinetics and mechanism". *Biotechnol. and Bioeng.*, 19: 959-981.
- GORING, D.A.I. 1977. "A speculative picture of the delignification process". *Cellulose Chemistry and Technology A.C.S. Symposium Series*, 48: 273-277.
- GOUVELLO, C.F. 1987. "Le Programme Proalcool Brésilien, 11 ans après". *Revue d'Énergie*. 393: 295-301.
- GRITZALI, M. y BROWN, R.D. 1979. "Hydrolysis of cellulose: mechanisms of enzymatic and acid catalysis". *Adv. in Chem. Ser.*, 181: p. 237.

- GUILLEN, F. 1986. Estudio del complejo celulolítico producido por *Alternaria alternata*. Memoria de Licenciatura Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Complutense de Madrid.
- GUM, E.K. y BROWN, R.D. 1977. "Comparation of four purified extracellular 1-4  $\beta$ -D-Glucancellobiohydrolase enzymes from *Trichoderma viride*". Biochem. Biophys. Acta., 492: 225-231.
- HAN, Y.W.; CATALANO, E.A. Y CIEGLER, A. 1983. "Treatments to improve the digestibility of crop residues" En: Wood and Agricultural Residues. pp. 217-238. Academic Press, N.Y.
- HANKIN, L. y ANAGNOSTAKIS, S.L. 1975. "The use of solid media for detection of enzyme production by fungi". Mycología, 67: 597-607.
- HERR, D. 1979 "Secrection of cellulase and  $\beta$ -glucosidase by *Trichoderma viride* ITCC 1433 in submerged culture on differents substrates" Biotechnol. and Bioeng. 21: 1361-1371.
- HIGHLEY, T.L. 1980. "Cellulose degradation by cellulase-clearing and non-cellulose-cleaning brown-rot fungi". Appl. Envirom. Microbiol., 40: 1145-1147.
- HYNES, M.J. 1974. "The effects of ammonium, L-glutamate and L-glutamine on nitrogen catabolism in *Aspergillus nidulans*". J. Bacteriol., 120: pp. 116-123.
- ILLANES, A.; GENTINA, J.C. y MARCHESE, M.P. 1988. "Production and stabilization of cellulases from *T. reesei*". Micer J., 4: 407-417.
- INNIS, M.A.; HOLLAND, M.J.; MCCABE, P.C.; COLE, G.C.; WITTMAN, U.P.; TAL, R.; WAT, K.W.K.; GELFAN, D.M.; HOLLAN, J.P. y MEADE, J.W. 1985. "Expresion, glycosylation and secretion of and *Aspergillus glucoamidase* by *S. cerevisiae*". Science, 228: 21-26.

- JENNINGS, D. H.; 1978 "Transport and Trnaslocation in filamentous fungi" En The Filamentous Fungi. Berry, D.R. Ed. Londres. Vol 2. 159-222.
- JONES, D.W. 1971. "Cellulose and cellulose derivatives (High polymeres)". Interscience. 5: 117.
- KERR, R.W. 1980. Chemistry and Industry of Starch. 2ª edición, capítulo 14. Academic Press, N.Y.
- KIM-DONG-WON, JAE HO YONG y YOUNG KYO JEONG 1988. "Adsorption of cellulase from *Trichoderma viride* on microcrystalline cellulose". Appl. Microb. and Biotechnol., 28: 148-154.
- KINGMA, W.G. 1966. Patente. I: 49 Dutch-Pat nº 6504840 17 Octubre de 1966 Publicada en Process Biochem.
- KIRK, T.K. 1987. "Enzymatic Combustion the microbial degradation of lignin". Ann. Rev. Microbiol., 41: 465-505.
- KIRK, T.K. 1983. "Degradation and converssion of lignocelluloses" En The filamentous fungi. Vol. 4. capítulo 11. 266-295. Edward Arnold Ed. Londres.
- KNAPP, J.S. y LEG, M. 1986. "The effect of different cellulosic growth substrates and pH on the production of cellulolytic enzymes by *Trichoderma reesei*". J. Appl. Microbiol. 61: 319-329.
- KNOWLES, J. y LEHTOVAARA, P. 1987. "The application of recombinant DNA technology to cellulases and lignocellulosic wastes". Phil. Trans. R. Soc. London A. 321: 449-454.
- KOENINGS, J,W. 1972. "Effects of hydrogen peroxide on cellulose and on its susceptibility to cellulase". Material und Organismen, 7: 133-147.
- KROYER, K.K. 1967. Patente. Dutch-Pat. nº 6612585 10 Marzo.

- LAMED, R, y ZEIKUS, J.G. 1980. "Ethanol production by thermophilic bacteria: relationship between fermentation product yields of an catabolic enzyme activities in *Clostridium thermoCELLUM* and *Thermoanaerobium brockii*". J. Bacteriol., 144: 569-578.
- LEHNINGER, A.L. 1982. Bioquímica: Las bases moleculares de la estructura y la función celular. Ed. Omega. Barcelona.
- LEWIS, C.M. y FINCHAM, J.R.S. 1970. "Regulation of nitrate reductase in the Basidiomycete *Ustilago maydis*". J. Bacteriol., 103: 55-61.
- MANDELS, M. 1975. Microbial sources of cellulose. Wilke, C. ed. Biotech. Bioeng. Symp., 5: 80-105.
- MANDELS, M. 1982. "Cellulases". An. Rep. on Ferm. Processes. 5: 35-78.
- MANDELS, M. 1985. "Applications of cellulases". Biochem. Soc. Transactions., 13: 414-416.
- MANDELS, M. y ANDEROTTI, R.E. 1978. "Problems and challenges in the cellulose to cellulase fermentation". Process. Biochem., 13: 6-13.
- MANDELS, M. y WEBER, J. 1969. "The production of cellulases" En Cellulases and their applications. Gould, R. Ed. Adv. in Chem. Ser., 95: 391-414.
- MANDELS, M.; PARRISH, F. y REESE, E. 1962. "Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*". J. Bacteriol., 83: 400-408.
- MANDELS, M. y REESE, E. 1960. "Induction of cellulase in fungi by cellobiose". J. Bacteriol., 79: 816-826.
- MARGARITIS, A. 1980. "Biomass: a renewable energy source". APEO Dimensions. 1: 21-23.

- MARSHALL, K.C. y ALEXANDER, M. 1960. "Growth characteristics of fungi and actinomycetes". J. Bacteriol., 80: 412-416.
- MISHRA, S.; RAO, S. y DEB, J.K. 1989. "Isolation and characterization of a mutant of *Trichoderma reesei* showing reduced levels of extracellular  $\beta$ -glucosidase". J. Gen. Microbiol., 135: 3459-3465.
- MONOD, J. 1944. Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes. Herman Ed. Paris.
- MONTENECOURT, B.S. y EVELEIGH, D.E. 1979. "Hydrolysis of cellulose: Mechanisms of enzymatic and acid catalysis". Adv. in Chem. Ser., 181: 289.
- MONTENECOURT, B.S. 1983. "*Trichoderma reesei* cellulases". Trends Biotechnol., 1: 156-161.
- MOREIRA, A.R.; PHILLIPS, J.A. y HUMPHREY, A.E. 1981. "Utilization of carbohydrates by *Thermomonospora* sp. grown on glucose, cellobiose and cellulose". Biotechnol. and Bioeng., 23: 1325-1338.
- MORGAN, A.G. y MacMILLAN, A. 1954. "The assimilation of nitrogen from ammonium salts and nitrate by fungi". J. Exper. Bot. 5: 232-252.
- MORPETH, F.F. y JONES, G.D. 1986. "Resolution, purification and some properties of the multiple forms of cellobiose quinone dehydrogenase from the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*". Biochem. J., 236: 221-226.
- MOZYCHENCO, L.A.; KANTERE, V. M. y GURKIN, V.A. 1973. Patol. Sper. Chir., 36: 339.
- MUSHIKOVA, L.H.; LOCIAKOVA, L.S. y JAROVENKO, V.L. 1978. "Pectinase production by *Aspergillus awamori*-16 by solid state fermentation". Microbial Synthesis., 1: 25-28.

- NEELY, W.C. 1984. "Factors affecting the pretreatment of biomass with gaseous ozone". *Biotechnol. and Bioeng.*, 20: 59-65.
- NELSON, N. 1944. "A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose". *J. Biol. Chem.* 153: 345-380.
- NISIZAWA, T.H.; SUZUKI, H. y NISIZAWA, K. 1971. "De novo synthesis of cellulase induced by sophorose in *Trichoderma viride* cells". *J. Biochem.*, 70: 387-393.
- OKAZAKI, M. y MOO-YOUNG, M. 1978. "Kinetics of enzymatic hydrolysis of cellulose: Analytical description of a mechanistic model". *Biotechnol and Bioeng.*, 20: 637-663.
- OOSHIMA, H.; SAKATA, M. y HARANO, Y. 1986. "Enhancement of enzymatic hydrolysis of cellulose by surfactant". *Biotechnol. and Bioeng.*, 28: 1727-1734.
- OVEREND, R.P. y MILNE, T.A. 1985. *Fundamentals of thermochemical biomass conversion*. Elsevier. Appl.; Science Publ. Londres, p. 1159.
- PARK, D. y ROBINSON, P.M. 1966. "Aspects of hyphal morphogenesis in fungi" *En Trends in plant morphogenesis*. Cutter, E.C. Ed. Londres. 22-24.
- PATHAK, A. y GHOSE, T. 1973. "Cellulases 1: Sources and technology". *Process. Biochem.*, 8: 35-37.
- PHILLIPS, D.H. 1966. "Oxygen transfer into mycelial pellets". *Biotechnol. and Bioeng.*, 8: 456-460.
- PIPYN, P. y VERSTRAETE, W. 1978. "Comparison of maximum cell yield and maintenance coefficients in axenic cultures and activated sludge communities". *Biotechnol. and Bioeng.*, 20: 1883-1893.

- PIRT, S.J.; 1965 "The maintenance energy of bacteria in growing cultures". Proc. R. Soc. B., 163: 224-231.
- PIRT, S.J. 1966. "A theory of the mode of growth of fungi in the form of pellets in submerged culture". Proc. R. Soc., 166: 369-373.
- PIRT, S. J. 1975. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific. Ed. Oxford.
- PIRT, S. J. y CALLOW, D. S. 1960. "Studies on the growth of *Penicillium chrysogenum* in continuous flow culture with reference to penicillin production". J. Appl. Bact., 23: 87-98.
- PLOMLEY, N.J.B. 1959. "Formation of the colony in the fungus *Chaetomium* sp.". Australian Journal of Biological Sciences, 12: 53-64.
- PRESTON, R.D. 1971. J. Microsc. 93: pp. 7-13.
- PURI, V.P. 1984. "Effect of crystallinity and degree of crystallinity and degree of polymerization of cellulase on enzymatic saccharification". Biotechnol. and Bioeng., 26: 1219-1222.
- RADLEY, J. A. 1976. Starch Production Technology. Radley, J. A. Ed. Londres. 273-294.
- RAO, M.; SEETA, R. y DESHPANDE, V. 1983. "Effect of pretreatment on the hydrolysis of cellulose by *Penicillium Funiculosus*. Cellulose and recovery of enzyme". Biotechnol. and Bioeng., 25: 1863-1871.
- REESE, E. T. ; MAQUIRRE, A. 1971. "Increase in cellulase yields by addition of surfactants to cellobiose cultures of *Trichoderma viride*". Devel. in Ind. Microbiol., 12: 212-220.
- REESE, E. T. y MANDELS, M. 1980. "Stability of the cellulase of *Trichoderma reesei* under use conditions". Biotechnol. and Bioeng., 22: 323-335.

- REESE, E. T. y RYU, D.Y. 1980. Shear inactivation of cellulase of *Trichoderma reesei*". Enzyme. Microbiol. Technol., 2: 239-240.
- RYU, D.; ANDEROTTI, R. y MANDELS, M. "Estudies on quantitative physiology of *Trichoderma reesei* with two-stage continuous culture for cellulase production". Biotechnol. and Bioeng., 21: 1887-1903.
- SCHABEL, J. 1973. Multiplicacion de levaduras sobre legias bisulfíticas de *Eucaliptus globosus* y prehidrolizados de cáscara de almendras. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid.
- SCHAFFNER, D.W. y TOLEDO, R.T. 1990. "Cellulase production by *Trichoderma reesei* when culture on xilose-based media supplemented with sorbose". Biotechnol. and Bioeng., 37: 12-16.
- SCHLOEMER, R.H. y GARRETT, R. H. 1974. "Nitrate transport system in *Neurospora crassa*". J. Bacteriol., 118: 259-269.
- SCHMIDT, C. J.; WHITTEN, B. K. y NICHOLAS, D. D. 1981. "A proposed role for oxalic acid in non enzymatic wood decay by brown-rot fungi". Proceedings for the American Wood Preservers Association, 77: 157-164.
- SCHNYDER, B.J. 1974. "The manufacture of dextrans and British gums". Die Stärke., 26: 409-412.
- SCHURZ, J. 1986. "Studies on the enzymatic hydrolysis of Phytomass by cellulase from *T. reesei*". Holzforschung, 40: 225-232.
- SCHURZ, J. 1984. "Die Cellulose und shre Begleitsubtanzer als Energien und Rohstoffquelle". Cell. Chem. Technol., 18: 225-267.
- SHIMAZONO, H. 1955. "Oxalic acid descarboxilase, a new enzyme from the mycelium of wood destroying fungi". Procdeeings of the American Wood Preservers Association. 77: 126-129.

- SHOEMAKER, S. P.; RAYMOND, J. C. y BRUNER, R. 1981. Trend in the Biology of fermentation for fuels and chemicals. Hollander, A. Ed. N.Y. 114-116.
- SILMAN, R. W. 1980. "Enzyme formation during solid substrate fermentation in rotating vessels". Biotechnol. and Bioeng., 22: 411-420.
- SILMAN, R. W. 1980. "Enzyme formation during solid substrate fermentation in rotating vessels". Biotechnol. and Bioeng. 22: 411-420.
- SIMMONS, E. G. 1977. "Identification of a new strain of *T. viride*". Abst. 2nd. International Mycological Congres, Tampa, Florida.
- SLEIGH, M. 1973. The flagellate protozoa. The biology of Protozoa. Barrington, E. J. and Willis, A. J. Ed. 2ª ed. Londres. p.p. 315.
- SOLOMONS, G.L. 1983. "Submerged culture production of mycelial biomass" En: The Filamentous Fungi. Edward Arnold Ed. Londres.
- SORENSEN, H. 1952. "On the specificity and products of action of xylanases from *Chaetomium globosum* Kunze". Physiologia Plantarum, 5: 183-198.
- STEELE, G.C. y TRICI, A. P. J. 1975. "Morphology and growth kinetics of hyphae of differentiated and undifferentiated mycelia of *Neurospora crassa*". J. Gen. Microbiol., 91: 362-368.
- STERNBERG, D. y DORVAL, S. 1979. "Cellulase production and ammonia metabolism in *T. reesei* on High levels of cellulose". Biotechnol. and Bioeng., 21: 181-191.
- STERNBERG, D. y MANDELS, G. R. 1979. "Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose". J. Bacteriol., 139: 761-769.

- STERNBERG, D. y MANDELS, G. 1980. "Regulation of the cellulolytic system in *Trichoderma reesei* by sophorose: Induction of cellulase and repression of  $\beta$ -glucosidase". J. Bacteriol. **144**: 1197-1199.
- STRAUSS, J. y KUBICEK, Ch. 1990. " $\beta$ -Glucosidase and cellulase formation by a *Trichoderma reesei* mutant defective in constitutive  $\beta$ -glucosidase formation". J. Gen. Microbiol., **136**: 1326-1326.
- SUNDSTROM, D. W.; KLEI, H.E.; COUGHLIN, R. W.; BIEDERMANN, G. T. y BROWWEN C. A. 1981. "Enzymatic hydrolysis of cellulose to glucose using immobilized  $\beta$ -glucosidase". Biotechnol. and Bioeng., **23**: 473-487.
- SZCZDRAK, J.; ILCZUK, Z.; ROGALSKI, J. y LEONOWICZ, A. 1986. "Intensification of oak sawdust enzymatic hydrolysis by chemical or hydrothermal pretreatment". Biotechnol. and Bioeng., **28**: 504-510.
- TARKOW, I. y FEIST, S. 1969. "A mechanism for improving the digestibility of lignocellulosic materials with alkali and liquid ammoning". Adv. Chem. Series. Amer. Chem. Soc., **95**: 197-218.
- TOKAO, S. 1965. "Organic acid production by basidiomycetes". Appl. Microbiol., **13**: 732-737.
- TOYAMA, N. 1976. "Feasibility of sugar production from agricultural and urban cellulosic wastes with *Trichoderma viride* cellulase". Biotechnol. and Bioeng. Symp., **6**: 207-219.
- TOYAMA, A. P. J. 1969. "Feasibility of sugar production from agricultural and urban cellulosic wastes with *Trichoderma viride* cellulase". Biotechnol. and Bioeng., **6**: 207-219.
- TRICI, A. P. J. 1974. "A study of the kinetics of hyphal extension and Branch initiation of fungal mycelia". J. Gen. Microbiol., **81**: 225-236.

- TSUMURA, N. y SATO, T. *Ag. Biol. Chem.* **29**: 1129-1137. Citado en: *Starch Production Technology*. Radley, J.A. ed. Londres 1976.
- UNDERKOFFER, L. A.; 1966. "Manufacture and uses of industrial microbial enzymes". *Chem. Eng. Prog. Symp. Ser.*, **62**: 11-20.
- VAN UDEN, N.; 1974. *Energia de manutenção en populações microbianas*. Monográfico del Instituto Gulbenkian de Ciencia. Oeiras, Lisboa.
- VANCE, C. P.; KIRK, T. K. y SHERWOD, R. T. 1980. "Lignification as a mechanism of disease resistance". *Ann. Rev. Phytopatol.*, **18**: 259-288.
- WEBSTER, J. 1985. *Introduction to Fungi*. 2ª Edición. Syndicate of the University of Cambridge Ed. Londres.
- WERTERMARK, U. y ERIKSSON, K.E. 1974. "Cellobiose quinone oxidoreductase, a new wood-degradating enzyme from white-rot fungi". *Acta Chemica Scandinavica*, **28**: 209-214.
- WHISTLEI, L. y RICHARD, S. 1970. *The Carbohydrates*. Pigman y Hoston Ed. Vol 37 pp. 447.
- WITEY, W. R. 1970. "Tryptophan transport in *Neurospora crassa*: a tryptophan binding protein released by cold shock". *J. Bacteriol.*, **103**: 656-662.
- ZWIETERING, M. M.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M. y RIET, K. 1990. "Modeling of the bacterial growth curve". *Appl. and Environ. Microbiol.*, **56**: 1875-1881.