

**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC
FACULTAD DE INGENIERÍA**

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



“EVALUACIÓN DE TRES SISTEMAS DE FERMENTACIÓN PARA PRODUCIR
CELULASA A PARTIR DE SUERO DE LECHE Y *Aspergillus niger*”

TESIS

PRESENTADO POR:

Bach. PAOLA MARILYN HUARACA ESPINOZA

PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

ABANCAY - PERÚ

2019



Agradecimiento

Al MSc. Víctor Sarmiento por su asesoría, conocimiento científico y palabras de aliento, para lograr la finalización del presente trabajo.

Al Ing. Agustín Elguera por toda la ayuda en la presentación final de esta tesis.

A la Ing. Ruth Ccopa y al Ing. Alfredo Fernández por la disposición de su tiempo para con la tesis.

A mis compañeras y amigas del laboratorio de biotecnología.



Dedicatoria

A Dios, a mi mamá, hermana,
amigo favorito y a mí



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
CAPÍTULO I	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
1.1 Descripción del problema.....	4
1.2 Enunciado.....	5
a) General	5
b) Específicos	5
1.3 Objetivos	5
a) General	5
b) Específicos	5
1.4 Justificación.....	5
1.5 Delimitación.....	6
CAPÍTULO II	7
MARCO TEÓRICO	7
2.1 Antecedentes	7
2.2 Marco referencial	8
2.2.1 Suero	8
2.2.1.1 Composición general del suero de leche	9
2.2.1.2 Clasificación del suero de leche	10
2.2.1.3 Lactosa	11
2.2.1.4 Usos del suero de leche	12
2.2.2 Los hongos	12
2.2.2.1 Los hongos filamentosos en la producción de enzimas celulasas	13
2.2.2.2 <i>Aspergillus niger</i>	15
2.2.2.2.1 Propiedades fisiológicas	17
2.2.2.2.2 Ciclo de crecimiento del <i>Aspergillus niger</i>	17
2.2.2.2.3 Síntesis de enzimas por <i>Aspergillus niger</i>	18
2.2.3 Sistemas de fermentación.....	19
2.2.3.1 Fermentación sumergida (FS)	19
2.2.3.2 Fermentación por adhesión a superficies (FAS)	20
2.2.3.2.1 Fermentación en sustrato sólido (FSS).....	20
2.2.3.2.2 Fermentación por biopelículas (FB).....	21
2.2.3.3 Fermentación con células inmovilizadas (FCI).....	26
2.2.3.3.1 Aplicación de la fermentación con células inmovilizadas	29

2.2.4 Celulasas	30
2.2.4.1 Nomenclatura y clasificación	30
2.2.4.2 Mecanismo de acción de las celulasas	31
2.2.4.3 Factores que influyen la producción de celulasas	33
2.2.4.3.1 Fuente de carbono	33
2.2.4.3.2 pH.....	33
2.2.4.3.3 Temperatura	33
2.2.4.4 Celulasas fúngicas	33
2.2.4.5 Características y propiedades de las celulasas	35
2.2.4.6 Aplicación de las celulasas.....	35
2.2.4.7 Producción industrial de la enzima celulasa.....	35
2.2.5 Método de cuantificación enzimáticos	36
2.2.5.1 Determinación de azúcares reductores prueba cuantitativa por DNS	37
2.2.5.2 Espectrometría ultravioleta-visible.....	38
2.2.5.2.1 Instrumentación.....	38
CAPÍTULO III	40
DISEÑO METODOLÓGICO	40
3.1 Definición de Variables.....	40
3.2 Operacionalización de variables.....	40
3.3 Hipótesis de la Investigación.....	41
3.4 Tipo y diseño de la investigación	41
3.5 Población y muestra	41
3.6 Procedimiento de la investigación.....	42
3.6.1 Medio de producción.....	42
3.6.2 Preparación del inóculo	44
3.6.3 Sistemas de fermentación.....	45
3.6.4 Cosecha	46
3.7 Material de investigación	46
3.7.1 Pruebas de entrada, proceso y salida de la investigación.	46
3.7.1.1 Pruebas de entrada.....	46
3.7.1.2 Pruebas de proceso	47
3.7.1.3 Pruebas de salida	47
3.7.2 Instrumentos de investigación.....	48
CAPÍTULO IV	54
RESULTADOS	54
4.1 Descripción de los resultados	54
4.1.1 Formulación del medio de producción con suero de leche	54
4.2 Evaluación del medio de producción con suero de leche.....	55

4.2.1 Producción de biomasa total	55
4.2.2 Lactosa residual.....	57
4.2.3 Actividad enzimática.....	57
4.2.4 Rendimiento y productividad de la enzima	59
4.2 Discusión de resultados	60
4.2.1 Formulación del medio de producción con suero de leche	60
4.2.2 Evaluación del medio de producción con suero de leche	60
4.2.2.1 Producción de biomasa total	60
4.2.2.2 Lactosa residual.....	61
4.2.2.3 Actividad enzimática.....	62
4.2.2.4 Rendimiento y productividad de la enzima	63
CAPÍTULO V	65
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	65
5.1 Conclusiones	65
5.2 Recomendaciones.....	65
Referencia Bibliografía	67
Anexos.....	73



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura vegetativa de los hongos	13
Figura 2. Estructuras de reproducción asexual del <i>Aspergillus spp.</i>	15
Figura 3. Microfotografía en luz blanca a 400X de <i>Aspergillus niger</i>	16
Figura 4. Ciclo de reproducción del <i>Aspergillus niger</i>	18
Figura 5. Pellets de hongos <i>Aspergillus ficuum</i> en fermentación sumergida.	20
Figura 6. A) Biopelícula en un soporte espiral, B) Biopelícula al final de la fermentación.	21
Figura 7. Etapas comunes del proceso para la fermentación por adhesión.	23
Figura 8. Diagrama (a) y fotografía (b) de biorreactor para la producción de etanol.	26
Figura 9. Biomasa inmovilizada por atrapamiento en alginato.	28
Figura 10. Clasificación de la enzima celulasa.	30
Figura 11. Acción coordinada de las celulasas sobre la celulosa amorfa y cristalina.	32
Figura 12. Reacción de reducción del DNS.	38
Figura 13. Partes del espectrofotómetro UV.	38
Figura 14. Diagrama de flujo de producción de celulasas	43
Figura 15. Biomasa en las tres fermentaciones.	56
Figura 16. Formación de biomasa de <i>Aspergillus niger</i>	56
Figura 17. Lactosa residual en las tres fermentaciones.	57
Figura 18. Actividad enzimática (UI/L) en las tres fermentaciones.	57
Figura 19. Producción de celulasas por la fermentación sumergida, fermentación por biopelículas y fermentación con células inmovilizadas	58
Figura 20. Esferas de alginato de la fermentación con células inmovilizadas.	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución porcentual de los sólidos en la leche, el queso blanco y el suero de leche	9
Tabla 2. Composición general del suero de leche y distribución proteica	9
Tabla 3. Caracterización fisicoquímica del suero de leche dulce, ácido y ácido salado	11
Tabla 4. Propiedades fisiológicas del <i>Aspergillus</i>	17
Tabla 5. Soportes inorgánicos y soportes orgánicos	28
Tabla 6. Ventajas y desventajas de la utilización de células inmovilizadas.....	29
Tabla 7. Principales microorganismos productores de celulasas	34
Tabla 8. Celulasas comerciales producidas por las empresas y sus respectivas fuentes	36
Tabla 9. Operacionalización de variables.....	40
Tabla 10. Medio de producción de referencia	44
Tabla 11. Soluciones para la curva estándar de lactosa.....	46
Tabla 12. Soluciones para la determinación de la actividad enzimática	48
Tabla 13. Descripción de equipos, materiales y reactivos	49
Tabla 14. Otros materiales	53
Tabla 15. Concentración de lactosa del suero de leche	54
Tabla 16. Comparación de la actividad enzimática, biomasa y lactosa residual	55
Tabla 17. Comparación del rendimiento y los parámetros productivos de la actividad enzimática	59

“EVALUACIÓN DE TRES SISTEMAS DE FERMENTACIÓN PARA PRODUCIR
CELULASA A PARTIR DE SUERO DE LECHE Y *Aspergillus niger*”

Esta publicación está bajo una Licencia Creative Commons



INTRODUCCIÓN

En la región de Apurímac, actualmente se está dando un crecimiento de la actividad agroindustrial como opción económica de la explotación de los recursos minerales, el desarrollo de su cuenca lechera en la provincia de Abancay es notorio, representado por la empresa Agroindustrial El Tambo, el suero de leche del área de quesería no es utilizado en su totalidad, este suero debido a su composición, posee una diversidad de usos nutricionales, por lo que se tiene claro que es mejor utilizarlo en algún procesamiento de tipo agroindustrial que desecharlo como efluente agroindustrial. El suero de leche es un subproducto que durante muchos años ha sido considerado como un agente contaminante cuando se desecha, actualmente es utilizado por sus múltiples nutrientes y propiedades funcionales en procesos tecnológicos. Las estadísticas indican que una importante porción de este residuo sigue siendo descartado como efluente el cual crea un serio problema ambiental (Fernández et al., 2009), la lactosa del suero de leche es el principal componente que contribuye a la alta demanda biológica de oxígeno (DBO) y demanda química de oxígeno (DQO) transformándose en contaminante cuando es arrojado al ambiente sin ningún tipo de tratamiento, cuando el suero se vierte a los ríos, provoca que los microorganismos que degradan la materia orgánica necesiten una gran cantidad de oxígeno disuelto en el agua y si la cantidad de oxígeno baja significativamente, provoca la muerte por asfixia de la fauna de estos ecosistemas, si el suero es descargado en suelos, genera una disminución en el rendimiento de cultivos agrícolas (Araujo et al., 2013; Riofrío, 2014).

La obtención de aditivos enzimáticos es posible mediante procesos biotecnológicos, el suero sirve como sustrato fermentable, disminuyendo la carga contaminante al ambiente, existen investigaciones que muestran la utilización de la lactosa en la producción de enzimas celulasas, aprovechándola para utilizarlo como sustrato para algunos microorganismos. El *Aspergillus niger*, es el microorganismo que más se utiliza para la generación de metabolitos, este necesita de una fuente de carbono para producir enzimas como la celulasas, la lactosa que contiene el suero de leche, cumple con los requisitos para ser consumida por el hongo y como resultado producir enzimas celulasas. Las aplicaciones de las celulasas como aditivos en las diferentes industrias son, en alimentos para consumo humano, alimentos para animales, textilera, en la industria de producción de detergentes, celulosa y papel, biocombustibles y en la formulación de medicamentos (LLenque et al., 2015), en la actualidad el mercado mundial de las enzimas se ha estimado en US\$ 430 millones, con un crecimiento anual del 5,7%, la celulasas representa aproximadamente el 20% del mercado mundial de enzimas (Boggione et al., 2016; Matute, Bertsch y Díaz, 2014), por esto se busca nuevas fuentes de producción de celulasas debido a su demanda, encontrándolos en subproductos agroindustriales, asimismo, se busca nuevas alternativas de uso de efluentes altamente contaminantes como el suero, para disminuir los costos en su tratamiento como desecho.

RESUMEN

El suero de leche fresco del área de elaboración de quesos de la empresa Agroindustrial El Tambo, una proporción es destinado para el consumo animal y otra cantidad es desechado como efluente, en la presente investigación se utilizó este suero como sustrato en la formulación del medio de producción, para la producción de enzimas celulasas utilizando *Aspergillus niger* en tres sistemas de fermentación. Se evaluó la concentración de lactosa del suero de leche por el método de azúcares reductores, también la actividad enzimática a partir de *Aspergillus niger* con código ATCC 10864 en tres sistemas de fermentación (fermentación sumergida, fermentación por biopelículas y fermentación con células inmovilizadas) con las siguientes condiciones: 70 mL de medio de producción, pH inicial del medio de 5.5, temperatura de 28°C y velocidad de agitación de 175 rpm, por 72 horas de fermentación, los resultados se analizaron estadísticamente en un Diseño Completamente al Azar (DCA) con tres repeticiones. A cada fermentación se midió la actividad enzimática (UI/L), producción de biomasa (g/L), lactosa residual (g/L) y la productividad volumétrica de la enzima (UI/h) como principales resultados de comparación. Se encontró que la concentración de lactosa del suero de leche analizado por el método de azúcares reductores fue de 35.6 ± 0.3 g/L y tubo un pH de 5.9 ± 0.1 , con este suero se pudo formular un medio de producción para las tres fermentaciones. La máxima actividad enzimática de celulasas fue de la fermentación con células inmovilizadas de 768 ± 132 UI/L, representando la mayor producción de la enzima, así mismo esta fermentación tuvo la mayor productividad volumétrica de la actividad enzimática con 10.7 ± 1.83 UI/h, por lo tanto la fermentación con células inmovilizadas presenta la mejor actividad enzimática y productividad de la enzima celulasa.

Palabras clave: Celulasas, *Aspergillus niger*, lactosa, inmovilización, biopelículas.

ABSTRACT

The fresh whey from the cheese making area of Agroindustrial El Tambo Company, a proportion is destined for animal consumption and another quantity is discarded as an effluent, in the present investigation this serum was used as a substrate in the formulation of médium production, for the production of cellulase enzymes using *Aspergillus niger* in three fermentation systems. The lactose concentration of the milk serum was evaluated by the reducing sugar method, also the enzymatic activity from *Aspergillus niger* with code ATCC 10864 in three fermentation systems (submerged fermentation, fermentation by biofilms and fermentation with cells immobilized) with the following conditions: 70 mL of production medium, initial pH of the medium of 5.5, temperature of 28 ° C and agitation speed of 175 rpm, for 72 hours of fermentation, the results were analyzed statistically in a Design Completely Random (DCA) with three repetitions. At each fermentation the enzymatic activity (IU/L), biomass production (g/L), residual lactose (g/L) and the volumetric productivity of the enzyme (IU/h) were measured as the main comparison results. It was found that the lactose concentration of the milk serum analyzed by the reducing sugars method was 35.6 ± 0.3 g/L and a pH of 5.9 ± 0.1 , with this serum a means of production could be formulated for the three fermentations. The maximum enzymatic activity of cellulases was the fermentation with immobilized cells of 768 ± 132 IU/L, representing the highest production of the enzyme, likewise this fermentation had the highest volumetric productivity of the enzymatic activity with 10.7 ± 1.83 IU/h, therefore the fermentation with immobilized cells presents the best enzymatic activity and productivity of the cellulase enzyme.

Keywords: Cellulases, *Aspergillus niger*, lactose, immobilization, biofilms.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción del problema

En la actualidad en la región de Apurímac, existen recursos de tipo agropecuario, que no son explotados en su totalidad, uno de estos recursos es el suero de leche, algunas posibilidades de la utilización del suero han sido propuestas, pero las estadísticas indican que una importante porción de este residuo es descartado como efluente el cual crea un serio problema ambiental (Aider, Halleux y Melnikova, 2009; Fernandes et al., 2009), las proteínas y la lactosa del suero de leche se transforman en contaminantes cuando el líquido es arrojado al ambiente sin ningún tipo de tratamiento, ya que la carga de materia orgánica que contiene permite la reproducción de microorganismos, debido a que el suero es altamente orgánico por su contenido de nutrientes, genera aproximadamente 3,5 kg de demanda biológica de oxígeno (DBO) y 6,8 kg de demanda química de oxígeno (DQO) por cada 100 kg de lactosuero líquido (Muñi, Paez, Faría, Ferrer y Ramones, 2005), siendo la lactosa, el principal componente de sólidos solubles que contribuye a la alta DBO y DQO (Mukhopadhyay, Chatterjee, Chatterjee, Banerjee y Guha, 2005; Almeida, Tamime y Oliveira, 2009), cuando se desecha en el agua, reduce la vida acuática al agotar el oxígeno disuelto, afecta física y químicamente la estructura del suelo, lo anterior resulta en una disminución en el rendimiento de cultivos agrícolas (Aider et al., 2009), el vertido de 1 litro de suero causaría la muerte de todos los peces contenidos en 10 toneladas de agua (Londoño et al., 2008).

En todo el mundo se han realizado considerables esfuerzos dirigidos a su aprovechamiento, tanto a nivel de investigación tecnológica como a políticas gubernamentales que alienten o presionen a las industrias hacer uso de este subproducto evitando que sea vertido al seno de cursos acuíferos donde resulta altamente perjudicial. Para que el suero pueda ser descartado al medio ambiente tiene que pasar por un tratamiento, este tratamiento es costoso para las industrias lecheras, por tal razón, se buscan alternativas para la utilización del suero (Tin y Mawson, 1993). El tratamiento de efluentes industriales altamente contaminantes requiere de nuevas alternativas tendientes a la disminución de costos y la mayor factibilidad para ser adoptadas por el respectivo sector industrial.

El problema radica en que una cantidad de este suero de leche es destinado a bajo precio como alimento para el ganado porcino y el resto está siendo desechado como efluente a los ríos al no contar con un tratamiento para recuperar este subproducto, restos de leche, suero y salmueras aumentan considerablemente la carga contaminante del vertido final siendo los desechos más contaminantes de la industria de los alimentos.

Por lo cual se plantea las siguientes interrogantes.

1.2 Enunciado

a) General

- ¿Se podrá utilizar suero de leche como sustrato para la producción de enzimas celulasas utilizando *Aspergillus niger* en tres sistemas de fermentación?

b) Específicos

- ¿Será posible la sustitución de la lactosa utilizando suero de leche para la formulación de un medio de producción para celulasas?
- ¿Cuál será el sistema de fermentación de mayor actividad enzimática, producción de biomasa y lactosa residual?
- ¿Cuál será el sistema de fermentación más productivo para producir celulasas con *Aspergillus niger* utilizando un medio de producción a base de suero de leche?

1.3 Objetivos

a) General

- Utilizar el suero de leche como sustrato para la producción de enzimas celulasas utilizando *Aspergillus niger* en tres sistemas de fermentación.

b) Específicos

- Evaluar la sustitución de la lactosa utilizando suero de leche para la formulación de un medio de producción para producir celulasas.
- Establecer el sistema de fermentación de mayor actividad enzimática, producción de biomasa y lactosa residual.
- Determinar el sistema de fermentación más productivo para producir celulasas con *Aspergillus niger* utilizando un medio de producción a base de suero de leche.

1.4 Justificación

La región de Apurímac es una zona ganadera y productora de leche, transformando esta materia prima en productos derivados como es el queso, actualmente las agro-industrias que producen queso, generan cantidades considerables de suero de leche, se estima que a partir de 10 litros de leche de vaca se puede producir de 1 a 1.5 kg de queso y un promedio de 8 a 9 kg de suero, resultando grandes volúmenes como subproducto durante su elaboración. Sin embargo, es posible la utilización de este suero de leche para producir enzimas de uso agroindustrial, entre otros productos, existen investigaciones que pueden mostrar su utilización en la producción de enzimas celulasas, aprovechando la lactosa que contienen como sustrato para algunos microorganismos.

Los microorganismos producen una amplia variedad de enzimas potencialmente útiles, muchas de las cuales son excretadas al medio, la mayoría de las enzimas extracelulares son producidas por organismos pertenecientes a dos géneros: *Bacillus* y *Aspergillus* y que en su mayoría son del tipo hidrolítico (Gacesa 1990 y Godfrey 1983 tomado de Carrera, 2003).

El *Aspergillus niger* es un microorganismo que se utiliza mucho para la generación de metabolitos, este necesita de una fuente de carbono para producir enzimas como la celulasas, la lactosa que es el azúcar que contiene el suero de leche, cumple con los requisitos para ser consumida por el hongo y como resultado produce las enzimas celulasas. Esta enzima posee un rol muy importante en la biosfera, ya que es responsable de la degradación de la celulosa, la que comprende la fuente de carbono más abundante en la tierra, en la actualidad estas enzimas poseen variadas aplicaciones en la industria biotecnológica y diferentes industrias tales como de alimentos para consumo humano, alimentos para animales, en textiles y combustibles (Mandels 1985; Beguin y Aubert 1993).

En la actualidad existen disponible numerosos preparados enzimáticos comerciales de grado alimenticio que contienen principalmente actividad celulasa (endo- β -1,4-glucanasa E.C.3.2.1.4, exo- β -1,4-glucanasa E.C.3.2.1.91, β -1,4-glucosidasa E.C.3.2.1.21). Estos preparados enzimáticos son obtenidos de microorganismos de origen fúngico y bacteriano, que principalmente provienen de los microorganismos *Trichoderma sp.*, *Aspergillus niger* y *Bacillus subtilis* (Bhat 2000).

Es por esto que se plantea la posibilidad de obtener enzimas celulasas a partir del suero de leche por *Aspergillus niger* mediante tres sistemas de fermentación permitiendo verlo no como un subproducto de desecho sino como una alternativa para disminuir la contaminación y/o problema ambiental.

1.5 Delimitación

Entre las principales delimitaciones que se encuentran para realizar el presente trabajo de investigación tenemos:

- Poca cultura de generar valor agregado a los residuos agroindustriales considerándolos como desechos.
- Elevados costos de producción de celulasas debido a las materias primas recurrentes que suben su precio y a los equipos tecnológicos comunes que se utilizan; así como también los escasos insumos disponibles debido a las pocas tiendas que ofrecen y de elevados costos.
- Escasa disponibilidad de tipos de cepas de *Aspergillus niger*, para evaluar su efectividad en la producción de celulasas.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Villena G. y Gutiérrez-Correa M. (2003)

Evaluaron biopelículas de *Aspergillus niger* desarrolladas sobre tela de poliéster y el comportamiento fisiológico específicamente relacionado con la producción de celulasas.

Evaluaron la estructura de la biopelícula usando microfotografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) desde el momento de la inoculación y adsorción de esporas hasta las 120 horas de crecimiento. Sus resultados mostraron que la formación de la biopelícula ocurre en tres fases: la adhesión, la fase de crecimiento inicial de desarrollo y finalmente la fase de maduración; Además, evaluaron la actividad celulasa de las biopelículas, siendo hasta 40% mayor que en los cultivos sin soporte de crecimiento (durante el transcurso de la fermentación), lográndose un incremento del 55% en la productividad.

Alcarraz et al. (2005)

Inmovilizaron esporas de *Aspergillus niger* y evaluaron la producción de celulasas en diferentes medios de cultivo a base de bagazo de caña. Para inmovilizar utilizaron agar como soportes y evaluaron la actividad celulasa sobre celulosa microcristalina midiendo la liberación de glucosa espectrofotométricamente durante 5 días de incubación. El medio compuesto por bagazo de caña al 4%, sulfato de amonio 0.1%, sulfato de magnesio al 0.5% y bifosfato de potasio al 0.2% induce mayor actividad celulasa a los 3 días de fermentación con *Aspergillus niger*.

Izarra et al. (2010)

Evaluaron la influencia de la concentración de inóculo en la morfología y producción de celulasas y xilanasas con *Aspergillus niger* en cultivo sumergido, utilizaron 10 g/L de lactosa como fuente de carbono. Para ello inocularon matraces de 250 mL con 40 mL de medio con 3% (v/v) de una suspensión de 10^4 o 10^8 esporas por mililitro e incubados a 28 °C y 175 rpm durante 120 horas. En cada caso determinaron la cantidad de biomasa, la proteína extracelular soluble, lactosa residual, actividad de celulasa total y xilanasas cada 24 horas. Aunque no encontraron un efecto notorio en la morfología de crecimiento, salvo en el color y el diámetro de pellets obtenidos, notaron que afectó la concentración máxima en biomasa; mientras que las productividades volumétricas de celulasa ($8,2$ y $8,0$ UI*L-1*h-1 para 10^4 y 10^8 esporas*mL-1, respectivamente) fueron similares para ambos inóculos.

LLenque-Díaz et al. (2015)

Investigaron la producción de celulasas por *Aspergillus niger* en un biorreactor de lecho empacado en condiciones de laboratorio, con el objetivo de aprovechar el bagazo, residuo de la caña de azúcar, como soporte y sustrato.

Determinaron la cantidad de celulasas excretadas desde el segundo día de incubación y obtuvieron una producción final de 0,025 UE/mL a los 20 días de incubación, con tendencia a ir incrementando, por lo que concluyeron que si es posible producir celulasas utilizando el bagazo de caña de azúcar tratado, a pH 6,0 en un biorreactor aireado.

2.2 Marco referencial

2.2.1 Suero

Según el Codex Alimentarius de la FAO/OMS (2011), es el producto lácteo líquido obtenido durante la elaboración del queso, la caseína o productos similares, mediante la separación de la cuajada, después de la coagulación de la leche y/o los productos derivados de la leche.

El suero de leche es un producto lácteo y/o residuo líquido translúcido verde o amarillento, obtenido del proceso de elaboración del queso, a partir de leche previamente pasteurizada, a la cual se añade el cuajo o fermento natural (contenido en el estómago de los rumiantes que posee una enzima que hace coagular la leche) que permite la precipitación de la caseína y posterior separación del coágulo de la leche durante la fabricación del queso (Hernández-Rojas y Vélez-Ruíz, 2014; Burgos, 2015), la coagulación se da mediante la acción ácida o de enzimas del tipo del cuajo (renina, enzima digestiva de los rumiantes) principalmente de esta última que rompen el sistema coloidal de la leche en dos fracciones: 1) Una fracción sólida, compuesta principalmente por proteínas insolubles (caseína) y lípidos, las cuales en su proceso de precipitación arrastran y atrapan minoritariamente algunos de los constituyentes hidrosolubles, 2) Una fracción líquida, correspondiente al suero de leche en cuyo interior se encuentran suspendidos todos los otros componentes nutricionales que no fueron integrados a la coagulación de la caseína (Hernández-Rojas y Vélez-Ruíz, 2014).

De esta forma, se encuentran en el suero de leche partículas suspendidas solubles y no solubles (proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales) y compuestos de importancia biológica-funcional (Elpidia, 2013).

Su composición varía dependiendo de las características de la leche y de las condiciones de elaboración del queso de procedencia, en términos generales, el suero de leche contiene: 4,9% de lactosa, 0,9% de proteína cruda, 0,6% de cenizas, 0,3% de grasa y 93,1% de agua. En términos promedio, el suero de leche contiene aproximadamente la mitad de los sólidos presentes en la leche original, incluyendo alrededor del 20% de las proteínas (lactoalbuminas y lactoglobulinas), la mayor parte de la lactosa y cerca de la mitad de minerales (calcio, fósforo,

sodio y magnesio) (Hernández-Rojas y Vélez-Ruíz, 2014), esto se puede observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Distribución porcentual de los sólidos en la leche, el queso blanco y el suero de leche

Componente	Leche	Queso Blanco	Suero de leche
Proteínas (%)	3,1	2,3	0,8
Grasa (%)	3,4	3,1	0,3
Lactosa (%)	4,7	0,2	4,5
Minerales (%)	0,9	0,5	0,4
Total	12,1	6,1	6

Fuente: Adaptado por Motta-Correa y Mosquera (2015).

2.2.1.1 Composición general del suero de leche

La composición general del lactosuero puede variar considerablemente dependiendo de las características de la leche utilizada para la elaboración del queso, el tipo de queso producido, del sistema de coagulación, así mismo, del proceso de tecnología empleado en la elaboración del queso.

En la Tabla 2, se puede observar la composición general del suero de leche y su distribución proteica.

Tabla 2. Composición general del suero de leche y distribución proteica

COMPONENTE	OBSERVACIONES
Lactosa	95% de la lactosa de la leche, en una proporción de (4,5-5,0 % p-v) 46,0-52,0 g/L en suero dulce y 44,0-46,0 de suero ácido.
Proteína	En una proporción 0,8-1,0% p/v. Corresponde alrededor del 25% de las proteínas contenidas normalmente en la leche 6,0 g/L en suero dulce y 6,0-8,0 g/L en suero ácido. Alto contenido de aminoácidos (Leucina, Isoleucina, Valina) vs proteínas de referencia, caseína, proteína de soya y proteína humana.
α -Lactoalbumina	30% del total del contenido proteico.
β -Lactoglobulina	Es importante porque tiene propiedades emulsionantes y cumple una función importante al interactuar con compuestos como el retinol y los ácidos grasos.
Globulina	Corresponden a 10% del total de proteínas.

Proteasa-peptonas	Corresponden a 10% del total de proteínas. Lactoferrinas, albumina (idéntica a la albumina sérica de la sangre), inmunoglobulinas, factores de crecimiento, glicoproteínas y enzimas (nucleasas, lactoperoxidasas, xantina oxidasa, lipasa estearasa, amilasa, fosfatasas acidas y alcalinas, lizozima, aldolasa, catalasa, inhibidor de la tripsina, lactosa sintetasa, ceruloplasmina, sulfidriloxidasa y otras) son proteínas de alto valor biológico al proporcionar aminoácidos esenciales para el organismo, entre ellos, triptófano, leucina e isoleucina.
Lípidos	5% y 8% de la materia grasa de la leche.
Vitaminas	Tiamina 0,38 mg/mL; Riboflavina 1,2 mg/mL; Acido nicotínico 0,85 mg/mL; Ácido pantoténico 3,4 mg/mL; Piridoxina 0,42 mg/mL; Cobalamina 0,03 mg/mL; Ácido ascórbico 2,2 mg/mL.
Minerales	8-10% del extracto seco. Calcio (0,4-0,6 g/L en suero dulce y 1,2-1,6 g/L en suero ácido), potasio, fosforo, sodio y magnesio.
Compuestos biológicamente activos y péptidos bioactivos	Para ejercer determinado efectos biológicos y fisiológicos. Con potencial antihipertensivo, actividad antimicrobial, antioxidante, incremento de la saciedad, entre otros.

Fuente: Elpidia (2013).

2.2.1.2 Clasificación del suero de leche

Según las propiedades fisicoquímicas, el suero de leche puede ser clasificado como ácido o dulce, dependiendo del proceso que se haya llevado a cabo para la elaboración del queso (Riofrío, 2014), su variación radica en los métodos utilizados para la coagulación de la leche o elaboración del queso, sus macro-nutrientes permanecen casi en las mismas proporciones en ambos sueros (Burgos, 2015).

Si en la coagulación de la leche se utiliza enzimas el suero de leche se denomina dulce y si se reemplaza la enzima por ácidos orgánicos se denomina ácido.

A partir de estas diferencias se conoce dos sistemas de coagulación: enzimática y ácida.

- Por coagulación enzimática y por la fabricación de quesos de pasta cocida y prensada, de quesos provenientes de leche de vaca y/o de oveja, se obtiene un suero dulce que contiene menores cantidades de calcio, este suero es pobre en ácido láctico, en calcio, fósforo, contiene mayor concentración de lactosa y el pH es mayor a 6 de 5,9 a 6,6 (Riofrío, 2014; Elpidia, 2013).
- Por coagulación ácida y por la fabricación de quesos frescos de pasta blanda, obtenidos a partir de leche de vaca y/o de cabra, se obtiene un suero ácido con un pH entre 4,3 a 4,7. En este suero, la lactosa se ha transformado en ácido láctico, son ricos en calcio, fósforo,

con mayor concentración de proteínas (Riofrío, 2014; Elpidia, 2013). Este suero se genera mediante la precipitación ácida de la caseína, esta precipitación se realiza disminuyendo el pH de la leche a un valor de 4,5 a 4,6; a este pH se alcanza el punto isoeléctrico de la mayoría de las caseínas presentes, en este punto, la carga eléctrica neta de la proteína es igual a cero, lo cual produce que la micela de caseína se desestabilice y precipite, dejando en solución solamente las proteínas séricas (Burgos, 2015). Este suero contiene más del 80 % de los minerales de la leche, por lo que para la mayoría de sus aplicaciones debe neutralizarse; además el contenido en lactosa se ve reducido a causa de la fermentación láctica (Parzanese, 2008).

La diferencia entre los dos tipos de suero de leche son el contenido mineral, la acidez y la composición de la fracción de proteína del suero (Riofrío, 2014). En la Tabla 3, se observa la composición detallada del suero de leche dulce, ácido y ácido salado, observándose que el suero de leche dulce tiene mayor concentración de lactosa y proteína, con respecto al ácido.

Tabla 3. Caracterización fisicoquímica del suero de leche dulce, ácido y ácido salado

Parámetro	Suero dulce	Suero ácido	Suero ácido salado
Agua (%)	93 – 95	93 – 95	-
Lactosa (%)	4,5 5,3	3,8 – 5,2	-
Proteínas (%)	0,6 – 1,1	0,2 – 1,1	0,86 ± 0,04
Grasa (%)	0,1 – 0,4	0,1 – 0,5	0,32 ± 0,03
Sales minerales (%)	0,5 – 0,7	0,5 – 1,2	0,61 ± 0,03
Valor pH	5,8 - 6,45	4,5 – 5	6,12 ± 0,01

Fuente: Adaptado de Motta-Correa y Mosquera (2015); Burgos (2015).

2.2.1.3 Lactosa

La lactosa constituye la parte esencial de los sueros, la mayor concentración forma parte del suero tras la separación de la cuajada de la caseína y materia grasa en quesería, la lactosa se encuentra en una proporción de 40 a 50 g/L. La lactosa ha sido un componente despreciado de la leche de vaca, por no tener aplicación para su consumo al natural, hoy en día la situación ha evolucionado, se ha adquirido el conocimiento de métodos de recuperación y de las amplias posibilidades de utilización de los sueros. La lactosa aislada de la leche, tiene varias aplicaciones: formando parte de productos dietéticos como soporte y diluyente de diversas drogas en farmacia o como componente de los medios de cultivo capaces de metabolizar la lactosa, y como mohos y actinomicetos en la industria de los antibióticos como es el caso de la

penicilina. El empleo de lactosa y sus hidrolizados permite obtener beneficios económicos al reducir las cantidades de ingredientes más costosos (Riofrío, 2014).

2.2.1.4 Usos del suero de leche

Basados en el valor nutricional del suero de leche un número de usos comerciales se han obtenido por que proporciona una interesante posibilidad comercial en la fabricación de productos alimenticios. Es por esto que actualmente se encuentran en desarrollo nuevos procesos para la obtención de alimentos y productos de elevada calidad nutricional. Dentro de las posibles aplicaciones del suero de leche en la elaboración de alimentos, se considera al suero tanto líquido como en polvo. En el mercado internacional se obtienen bebidas proteicas en formas de concentrado proteico y aislados, en la industria láctea se utiliza para la elaboración de helados, yogures, bebidas fermentadas y quesos; en carnes procesadas (embutidos), concentrados de proteína y obtener aislados de proteína, para obtener hidrolizados de proteína, purificación de proteínas aisladas, fuente de compuesto bioactivos, fuente de lactosa, fuente para extraer minerales, también en productos de panificación como base para pasteles, galletas y barras nutritivas; en confitería, en chocolates, coberturas, caramelos y en la industria de bebidas como mezclas con cacao, crema para café, y sobre todo en bebidas para deportistas por su alto contenido de electrolitos; por su contenido de lactosa y sólidos se utiliza para alimentos dietéticos, dulces y productos farmacéuticos (Riofrío, 2014; Elpidia, 2013).

2.2.2 Los hongos

Los hongos son organismos eucariotas heterótrofos (necesitan alimentarse a partir de otros organismos vivos o muertos), no realizan fotosíntesis porque no poseen cloroplastos y no producen clorofila, se caracterizan por ser inmóviles y obtienen su alimento de forma directa e indirecta por absorción de los productos generados por exoenzimas. Los hongos están adaptados para descomponer la materia orgánica, como la celulosa y la lignina, que son los componentes de las paredes celulares, lo constituyen su principal fuente de nutrientes y sirven como fuente de carbono a los hongos (Prado, 2016).

La reproducción o colonización de los hongos comienza con las esporas, estas son dispersadas por el viento, la lluvia o por los animales, en condiciones de humedad y de temperatura adecuada, de las esporas emergen las hifas que son las que degradan el material celulósico (asimilación de nutrientes), ya que se alimentan de las sustancias de reserva del interior de las células y segregan enzimas hidrolasas (enzimas extracelulares necesarias para la degradación de una gran variedad de sustratos complejos) que descomponen la pared celular permitiendo ser asimiladas por éstas. Luego, las hifas aumentan en tamaño y número formando el micelio

que se desarrolla interna o externamente del sustrato, finalmente, en el caso de los basidiomycetos, se forma el cuerpo fructífero del hongo, el cual es característico de cada tipo y se observa macroscópicamente, este cuerpo fructífero tiene la capacidad de formar esporas (Prado, 2016; Sánchez, 2017).

Los hongos de acuerdo a su estructura vegetativa se dividen en hongos filamentosos, levaduriformes y dimorfos (Álvarez, 2011; Sánchez, 2017).

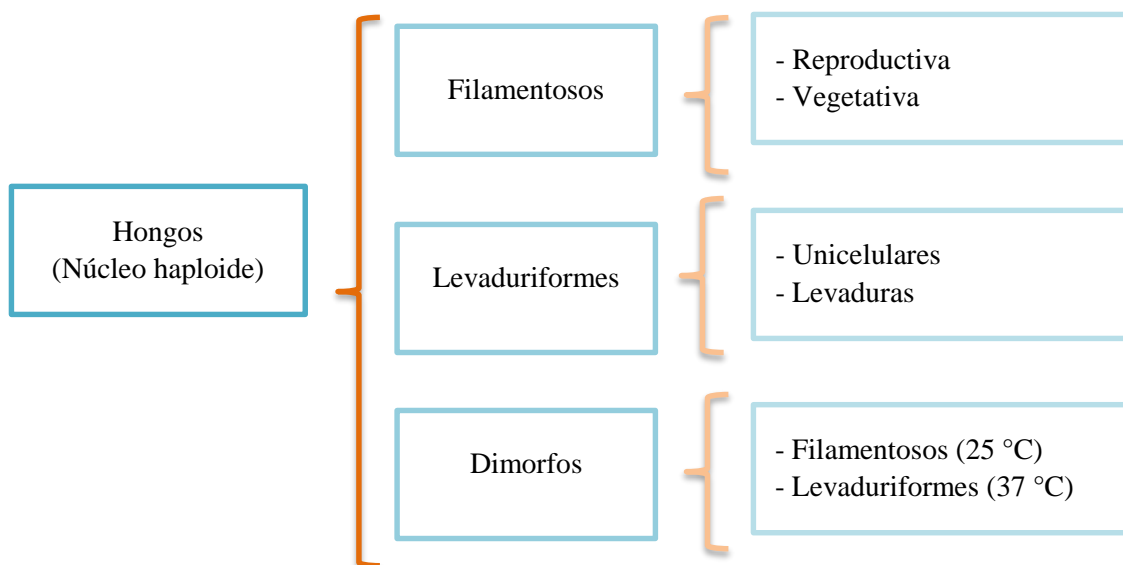


Figura 1. Estructura vegetativa de los hongos (Álvarez, 2011).

Los hongos son los organismos más estudiados porque tienen la facilidad de colonizar rápidamente el sustrato produciendo diferentes complejos enzimáticos, son los principales microorganismos productores de celulasas aunque se han identificado también algunas bacterias y actinomicetos, en la naturaleza son los principales degradadores de materiales celulósicos, tienen ventajas adaptativas como son: la rápida colonización de los sustratos y una eficiente remoción de los productos de hidrólisis (De la Cruz-Martorell et al., 2016).

2.2.2.1 Los hongos filamentosos en la producción de enzimas celulasas

Los hongos filamentosos están compuestos por hifas o filamentos que se pueden unir y/o entrelazar hasta formar el micelio que se puede ver a simple vista, las hifas pueden estar divididas por tabiques llamados septos con la presencia de un núcleo (tabicadas), o también pueden ser sin septos que parecen con muchos núcleos (cenocíticas); el micelio crece en la superficie y dentro del medio de cultivo para absorber y obtener los nutrientes, al micelio lo conforman las estructuras reproductivas (conidios o esporas) (Álvarez, 2011; Sánchez, 2017).

El uso de hongos filamentosos para la producción industrial de importantes metabolitos ha aumentado rápidamente en los últimos años, principalmente el uso de hongos filamentosos se destaca en la producción de enzimas por el potencial de secreción de enzimas hidrolíticas, las hifas les permiten ser más eficientes y competitivos al colonizar matrices sólidas, degradan los sustratos que les sirven como medio de soporte y fuente de alimento para la sobrevivencia, toleran baja actividad de agua (A_w), resisten a condiciones de alta presión osmótica y pH (Mora, 2015). Los hongos filamentosos secretan un conjunto de enzimas capaces de atacar los componentes de la pared celular vegetal como las hidrolasas (celulasas, xilanasas) (Cortez, 2015; Sánchez, 2017). Existen distintos tipos de hongos mesófilos y termófilos, siendo este último fuente potencial de enzimas con interés científico y/o comercial. Las propiedades de sus enzimas muestran diferencias no solo entre especies, sino entre cepas (Cortez, 2015); se pueden producir enzimas celulasas para la hidrólisis de material lignocelulósico. Dentro de los diferentes géneros y especies de hongos productores de celulasas se encuentran *Trichoderma*, *Phanerochaeta*, *Sporotrix*, *Alternaria*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Neurospora crassa*, incluyendo además algunos hongos comestibles como: *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea*, *Pleurotus spp* (Mora, 2015).

En la actualidad, las celulasas comerciales provienen de especies de *Trichoderma* y *Aspergillus*, principalmente por sus altos niveles de secreción de proteínas, producción de enzimas extracelulares y su fácil recuperación (Sánchez, 2017; Cortez, 2015). Estos organismos son utilizados en una gran cantidad de procesos industriales (producción de enzimas, vitaminas, polisacáridos, pigmentos, lípidos, entre otros), algunos de los productos ya se producen de manera comercial y otros son promisorios para la producción biotecnológica. Estos hongos son capaces de degradar material lignocelulósico y secretar enzimas y otros metabolitos de interés, lo cual los coloca como microorganismos útiles para los procesos biotecnológicos en términos de recuperación de sustancias, que por lo tanto inciden directamente en los costos de purificación. Estos organismos son considerados muy exitosos para procesos de fermentación y principalmente son capaces de llevar a cabo procesos importantes mediante tecnologías de biotransformación (Mora, 2015).

El *Aspergillus niger* y otros hongos del género *Aspergillus* han sido hongos ampliamente explotados en la producción industrial de enzimas durante décadas. La mayoría de investigaciones relacionadas con estos hongos se ha enfocado en la producción de enzimas que degradan hemicelulosa y pectina. Aunque poseen una variedad de genes que codifican endoglucanasas y celobiohidrolasas en sus genomas, nunca han sido considerados seriamente como alternativa a *Trichoderma reesei* como productores comerciales de celulasas, probablemente por el hecho de que estas enzimas no se secretan en grandes cantidades. Sin embargo, podrían utilizarse para completar los combinados enzimáticos para degradar la

lignocelulosa ya que producen altos niveles de hemicelulasas, (xilanasas, xiloglucanasas y α -L-arabinofuranosidasas) (Gil, 2015) y una gran variedad de glucanasas, con un espectro tal que puede lograrse la completa degradación de la celulosa (Sánchez, 2017).

2.2.2.2 *Aspergillus niger*

El género *Aspergillus* son hongos muy abundantes, algunas especies intervienen en las alteraciones que experimentan los alimentos, mientras que otros son de utilidad para preparar determinados alimentos, lo comprenden 180 especies aproximadamente, pertenece a la división Deutoromycota, estos mismos corresponden a los hongos filamentosos. Los *Aspergillus* dentro de la división pertenecen a la clase de Hyphomicetes estos son hongos que son capaces de formar micelios, pero carecen de esporocarpos (cuerpo fructífero). A este tipo de hongos hasta la fecha no se le conoce una forma sexuada de reproducción, por lo que se reproducen asexualmente por conidios que se originan de grupos de fiálides localizadas en un ensanchamiento terminal del conidióforo (vesícula) (Méndez, 2015; Sánchez, 2017), en la Figura 2 se observa el conidióforo y la cabeza aspergiliar conformada por la vesícula, fiálide, conidio y cadenas de fialoconidias (fiálides mas conidios), estas estructuras intervienen en la reproducción asexual de los hongos de este género.

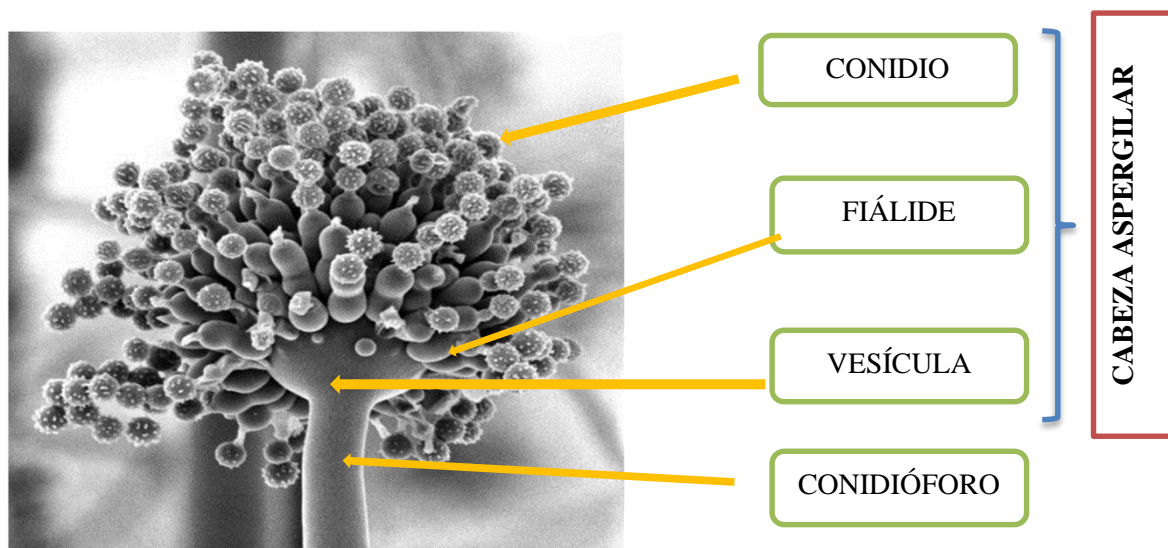


Figura 2. Estructuras de reproducción asexual del *Aspergillus spp*, adaptado de Méndez (2015).

El *Aspergillus niger* es la especie que más existe en la naturaleza, es común observarlos en alimentos en descomposición y sobre detritus, destruye el material de origen natural en especial los abundantes en azúcares, almidones o gomas, tienen cabezas esporales esféricas, próximas unas con otras, son de color negro, negro parduzco o pardo morado (Escudé, 2007 y

Sánchez, 2017), el color negro se debe a los conidios en la superficie, la vesícula está rodeada de fiálides en los 360°, estas características son propios de la especie, en la Figura 3, se observan cepas de *Aspergillus niger* de muestras de suelo.

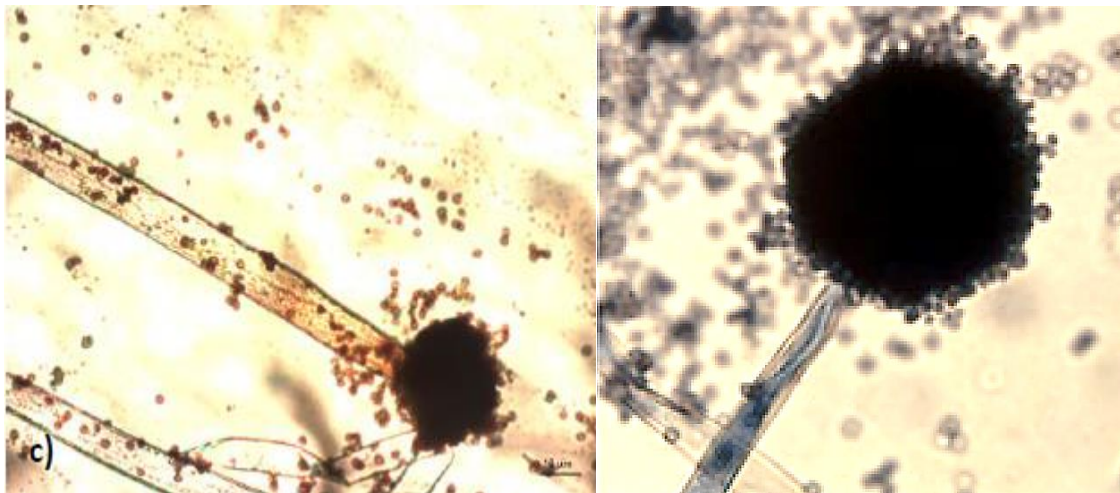


Figura 3. Microfotografía en luz blanca a 400X de *Aspergillus niger* (Tamariz, 2014).

El *Aspergillus niger* es un importante microorganismo muy utilizado en el campo de la biotecnología, también se ha utilizado para el tratamiento de modificación química conocida como biotransformación en los últimos 20 años (Tamariz, 2014), muestra ventajas para la producción industrial de enzimas: tiene un alto nivel de producción, presenta buenas propiedades para el cultivo lo que posibilita la producción a gran escala y produce metabolitos de importancia económica, como ácidos orgánicos (ácido cítrico) y enzimas necesarias para la hidrólisis de biopolímeros, entre ellas, celulasas, oligosacáridos, amilasas, lipasas, fructosiltransferasas, xilanasas y proteasas (Alcarraz et al., 2010; Gutiérrez et al., 2015); todos los metabolitos se consideran GRAS (Generally Regarded as Safe - Generalmente Reconocido como Seguro) por la Ley de Alimentos, Drogas y Cosméticos de los Estados Unidos, Aditivo Alimentario Tolerance Requirement (Requisito de tolerancia de Aditivo Alimentario) (Ganaie, Lateef y Gupta, 2014), lo que permite su aplicación en la industria de alimentos tanto para el hombre y animales (Alcarraz, Florez y Godoy, 2010).

Las esporas de estos hongos son considerados estructuras durmientes, las esporas de *Aspergillus niger* poseen la ventaja de ser estables, pueden ser transportadas y luego utilizadas como un conveniente catalizador biológico, está claro que muchas esporas contienen enzimas que permiten expresar un amplio rango de actividades, y que puede ser utilizada comercialmente. El medio requerido es sencillo, constituido por un tampón con o sin glucosa añadida. Cualquier espора que no germine puede ser utilizada posteriormente (Alcarraz et al., 2010).

2.2.2.2.1 Propiedades fisiológicas

Las propiedades fisiológicas son necesidades imprescindibles para el crecimiento del *Aspergillus*, tal como se ve en la tabla 4.

Tabla 4. Propiedades fisiológicas del *Aspergillus*.

NECESIDAD	CARACTERIZACIÓN
Humedad	El <i>Aspergillus</i> necesita menor cantidad de humedad disponible, entre un 14 y 15% en comparación con la mayoría de las levaduras y de las bacterias, esto impedirá o retardará su crecimiento.
Temperatura	Se desarrolla en condiciones cálidas, su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 25 a 30 °C.
Oxígeno y pH	El <i>Aspergillus</i> es aerobio, sobre todos los que crecen en la superficie de los alimentos y de preferencia en condiciones ácidas entre 4 – 6.
Nutrientes	Utilizan muchos tipos de alimentos, desde sencillos hasta complejos. Distintas fuentes de carbono se utilizan industrialmente para su desarrollo, especialmente ambientes dulces con presencia de azúcares en el medio que incluyen glucosa, sacarosa, jugo de caña, almidón, y melazas de caña y de remolacha, etc.

Fuente: Escudé (2007) y Mora (2015).

2.2.2.2.2 Ciclo de crecimiento del *Aspergillus niger*

El ciclo de vida de las especies *Aspergillus* comprende desde la germinación mediante esporas y el crecimiento micelar, este se da por el crecimiento de una serie de árboles ramificados a nivel microscópico, descrita como un agregado de hilos ramificados (hifas) las cuales se organizan para dar soporte a los procesos de producción y diseminación de esporas (esporulación), las hifas aéreas se extienden sobre el sustrato formando una red que es la formación del micelio, el cual crece para encontrar nutrientes disponibles para procesos metabólicos y fisiológicos del hongo (Mora , 2015; Sánchez, 2017) (ver Figura 4).

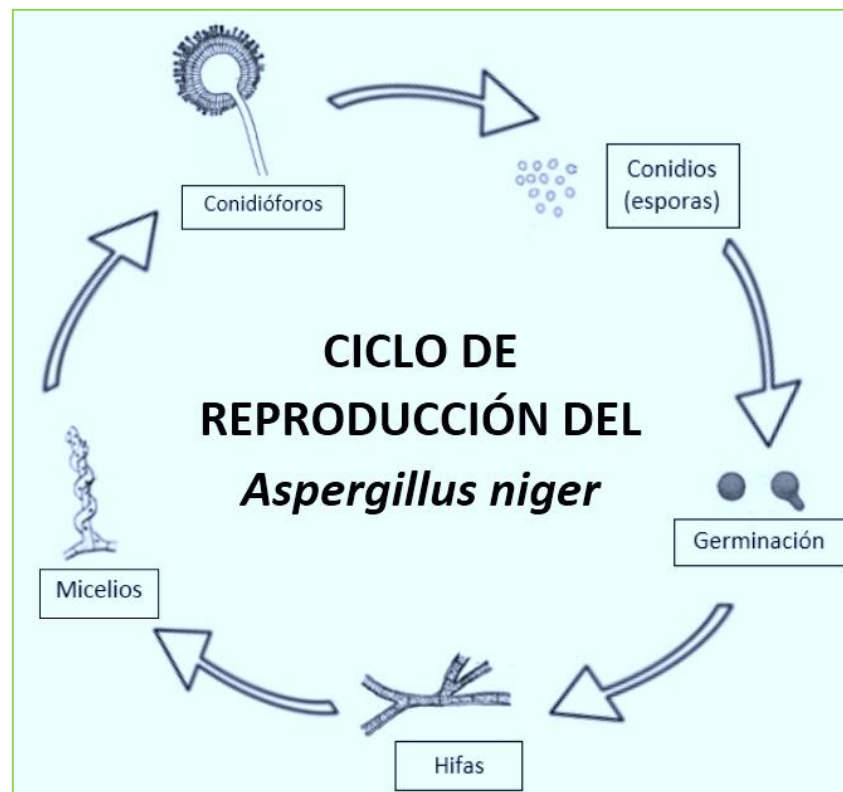


Figura 4. Ciclo de reproducción del *Aspergillus niger*, Mendez (2015).

2.2.2.2.3 Síntesis de enzimas por *Aspergillus niger*

Las enzimas son sintetizadas en la superficie del retículo endoplasmático y transportadas a través de la membrana al espacio de este. Las proteínas contenidas en estos espacios se procesan posteriormente en el aparato Golgi y en otras vesículas y se secretan al medio ambiente externo de la célula por fusión de las vesículas con la membrana plasmática (Sánchez, 2017).

El proceso de síntesis de enzimas en *Aspergillus niger*, el ARN polimerasa dentro de la célula de este, se une a centros de ADN específicos denominados promotores, iniciando la síntesis de ARN mensajero (ARN) y la transcripción de un opero. La transcripción se produce en el núcleo y el ARN primario que se transcribe se modifica ampliamente en el núcleo antes de que salga al citoplasma para asociarse con los ribosomas. En el extremo del gen estructural, una región de terminación hace que la ARN polimerasa cese la transcripción y se disocie del ADN (Sánchez, 2017).

2.2.3 Sistemas de fermentación

Desde el punto de vista biotecnológico un sistema de fermentación es el proceso en el cual los microorganismos producen biomasa y metabolitos a partir de utilizar sustancias orgánicas y la descomposición de los sustratos se lleva a cabo por enzimas que son producidas por los microorganismos. Los sistemas de fermentación pueden ser naturales o artificiales (intervención del hombre), también se pueden clasificar según el estado del sustrato que se vaya a emplear (Sánchez, 2017), el sistema de fermentación en lactosuero, es uno de los procesos que ha permitido valorizar este subproducto, una interesante área de investigación para la industria láctea (Ramírez, 2012).

Los sistemas de fermentación para la producción de enzimas se clasifican de acuerdo a las propiedades biológicas de las células, se considera tres sistemas de fermentación: fermentación en líquido o de micelio libre conocida como “fermentación sumergida” (FS), fermentación por adhesión a superficies (FAS) y fermentación con células inmovilizadas (FCI), siendo la diferencia entre ellas la cantidad de agua libre del sistema y el uso de microorganismos, a continuación se describen cada una de ellas.

2.2.3.1 Fermentación sumergida (FS)

La fermentación sumergida es una técnica de crecimiento de microorganismos en un medio líquido, donde todos los nutrientes se encuentran disueltos en el medio de producción y el proceso se lleva a cabo bajo condiciones fisicoquímicas controladas, este es el método más usado por la industria biotecnológica, el uso de la fermentación sumergida se ha divulgado extensamente debido al mejor monitoreo y facilidad de manejo como: mayor facilidad de controlar los factores del sistema de fermentación (temperatura, aireación, agitación y pH), presenta mejor distribución del oxígeno y del calor suministrado al sistema, mantiene una mayor homogeneidad y se puede llevar a cabo la medición directa de la biomasa (Grupta, Jana, Kumar y Jana, 2015; Gracia et al., 2016) (Figura 5).

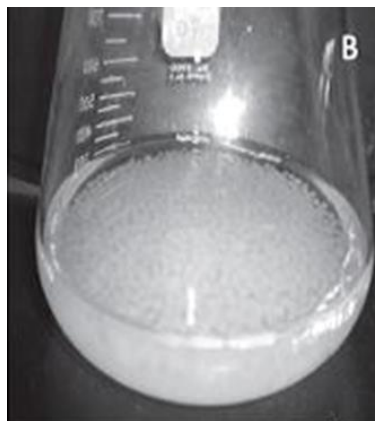


Figura 5. Pellets de hongos *Aspergillus ficuum* en fermentación sumergida (Costa et al., 2009).

2.2.3.2 Fermentación por adhesión a superficies (FAS)

La fermentación por adhesión a superficies (FAS) es una fermentación propuesta por Villena y Gutiérrez (2003b), quienes explican que los hongos filamentosos son microorganismos adaptados a crecer en superficies o soportes sólidos naturales o sintéticos, en los cuales el hongo crece, adaptándose al entorno, produciendo cambios fenotípicos que le permiten permanecer unidos al lugar formando una biopelícula.

La fermentación por adhesión a superficies genera un aumento en el rendimiento de actividad enzimática, a partir de altos títulos de producción enzimática, en contraste presenta una disminución en la biomasa en comparación con otras técnicas de fermentación (Gracia et al., 2016), este tipo de fermentación puede ser dividida en dos: a) Fermentación en estado sólido y b) Fermentación por adhesión, son técnicas del mismo proceso biológico y se deben referir como fermentación por adhesión a superficies (Gutiérrez y Villena, 2003b).

2.2.3.2.1 Fermentación en sustrato sólido (FSS)

Se le nombra así debido a la formación de una biopelícula sobre el sustrato sólido, este proceso inicia con el crecimiento microbiano en la superficie de los materiales sólidos y también la formación del producto, esto implica la ausencia (o casi ausencia) de agua "libre", el sustrato sólido absorbe la humedad para favorecer el crecimiento y el metabolismo microbiano (Ray y Behera, 2017).

2.2.3.2.2 Fermentación por biopelículas (FB)

La fermentación por biopelículas es una modificación de la fermentación en sustrato sólido donde las esporas del microorganismo se adhieren a un soporte o matriz sólida (natural o sintético) y las células crecen uniformemente en un medio líquido creando una biopelícula (Gracia et al., 2016), en la Figura 6, se muestra una biopelícula fúngica de un biorreactor de tanque agitado, desarrollado en un soporte espiral de poliéster fijado al eje.

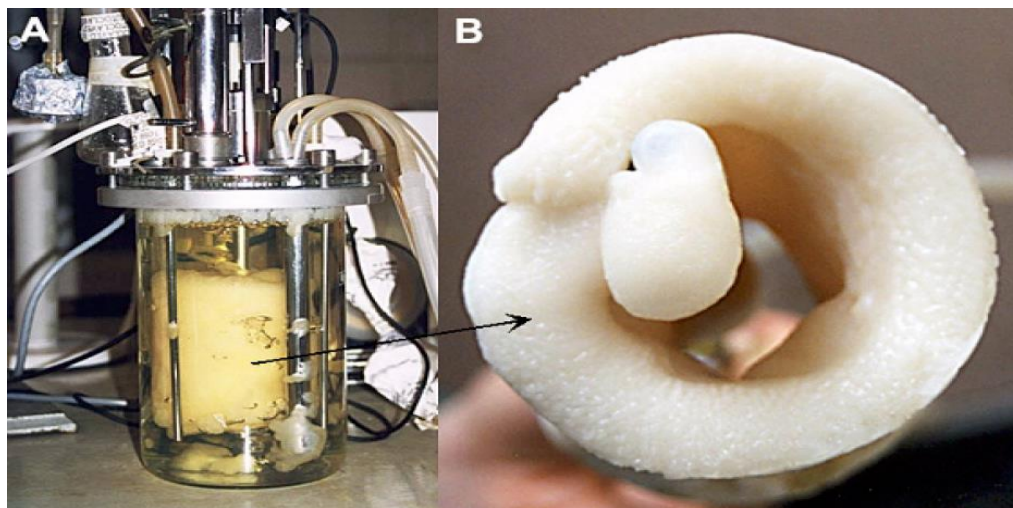


Figura 6. A) Biopelícula en un soporte espiral, B) Biopelícula al final de la fermentación (Gutiérrez y Villena, 2003b).

Las biopelículas se caracterizan principalmente por la presencia de canales internos, mostrando similitud con el crecimiento de la fermentación en sustrato sólido mientras que son notoriamente distintos a la morfología de pellet, característica de la fermentación sumergida (Villena, 2006), entonces el concepto de biopelícula supone una población o una comunidad de microorganismos que viven unidos a una superficie, a su vez pueden ser de una sola especie o como una comunidad derivada de varias especies, es necesario resaltar que los organismos que forman parte del biofilm no se encuentran completamente inmovilizados, sino que tienen la capacidad de moverse en el interior de la biopelícula y hasta llegar a desprenderse de la misma, esta forma de crecimiento es el estilo de vida de microorganismos incluyendo bacterias, levaduras, hongos filamentosos e incluso protozoarios (Gutiérrez y Villena, 2003).

La formación de biopelículas se puede dividir en tres fases importantes: 1) la adhesión, que es fuertemente aumentada por la hidrofobicidad de las esporas de *Aspergillus*, 2) la fase de crecimiento y desarrollo inicial, empieza con la germinación de las esporas hasta la colonización de la superficie y 3) la fase de maduración, donde la densidad de la biomasa se incrementa y evidentemente se produce una organización de canales internos que asegura un flujo medio a través de la biopelícula (Gutiérrez y Villena, 2003a;2003b) sobre la fermentación por biopelículas, en la Figura 7, se observa el proceso de adhesión de hongos filamentosos mostrando las etapas comunes.

a) Contacto con la superficie

Cuando la espora entra en contacto con la superficie se adhiere para iniciar la germinación, esta etapa tiene que ver con las propiedades físicas de la superficie para que las esporas se adhieran con facilidad, las superficies naturales son comúnmente hidrofóbicas, por lo que las propiedades más importantes de otras superficies deberían ser:

- **Rugosidad y dureza superficial:** La colonización se incrementa cuando la rugosidad de la superficie aumenta y también cuando el área de superficie es mayor.
- **Resistencia al desgaste:** Es una de las características del soporte en la que se desarrollará la biopelícula, garantizando que después del desarrollo y formación de la biopelícula, la matriz se mantendrá firme.
- **Hidrofobicidad:** Es un mecanismo importante para el proceso de adhesión ya que las interacciones hidrofóbicas tienden a incrementarse cuando aumenta la despolarización natural de uno o ambas superficies involucradas (superficie celular y substrato de la superficie).
- **Soporte limpio:** La superficie en donde se realizara la adhesión tiene que ser limpia para evitar la contaminación de la biopelícula cuando se desarrolle (Gutiérrez y Villena, 2003b; Trujillo, 2017).

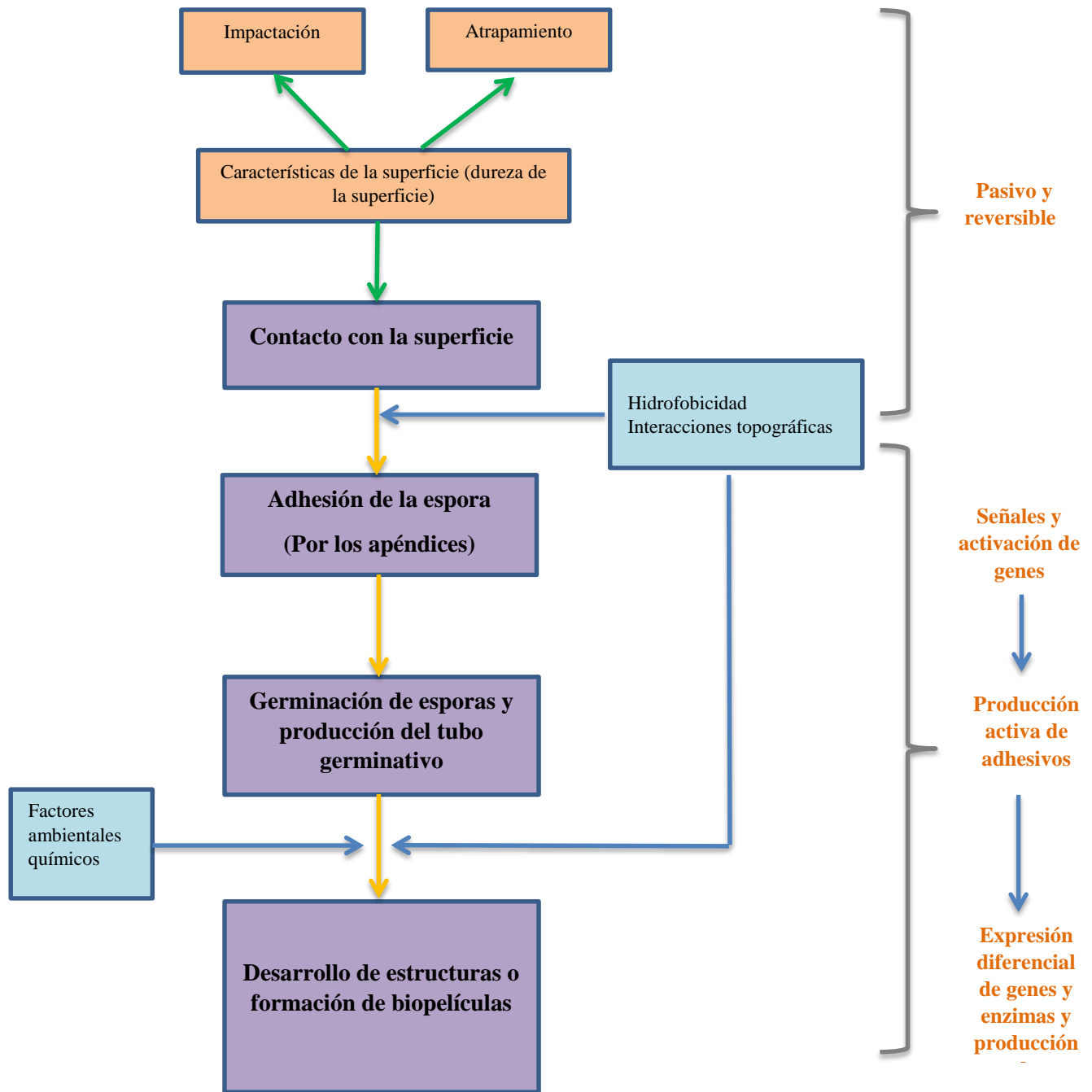


Figura 7. Etapas comunes del proceso para la fermentación por adhesión, adaptado de Gutiérrez y Villena (2003b).

b) Adhesión de las esporas

La formación de biopelículas por los hongos es un proceso complejo que inicia con la adhesión de esporas a una superficie, la cual está influenciada por factores físicos, químicos y medioambientales. Consiste en el encuentro de las esporas y la superficie, basándose en una serie de variables fisicoquímicas que dan lugar a la interacción entre la pared del microorganismo y la superficie del soporte. Los microorganismos y las superficies tienen un potencial negativo que generarían repulsión electrostática, esto se podría contrarrestar con fuerzas de atracción temporales tipo Van der Waals o atracción hidrofóbica. La adhesión en hongos filamentosos se produce por la presencia de proteínas hidrofóbicas, que es una clase de pequeñas proteínas anfipáticas llamadas hidrofobinas, se caracteriza por la formación de una membrana anfipática en contacto con una interfase hidrofílica-hidrofóbica que permite cambiar la naturaleza de la superficie, son producidas por ascomicetos y basidiomicetos, también pueden ser producidas por zigomicetos. Las hidrofobinas estabilizan la adhesión de esporas y micelio a superficies hidrofóbicas naturales y artificiales, esto da como resultado señales morfológicas y la formación de estructuras hidrofóbicas aéreas como micelio y cuerpos fructíferos. Otras moléculas como las glicoproteínas también participan en la adhesión, hay evidencia sobre la producción de una matriz extracelular que mejora la adhesión (Gutiérrez y Villena, 2003b; Trujillo, 2017).

c) Germinación de esporas y producción del tubo germinativo

Se consolida la adhesión de las esporas cuando el microorganismo queda firmemente unido a la superficie inerte, el desarrollo de la biopelícula de *Aspergillus* inicia con la germinación de esporas y posterior formación del tubo germinativo, se producirán microcolonias donde sus hifas se alargarán para iniciar la colonización de la superficie durante su crecimiento, las características de sus hifas es que crecen manteniendo distancia entre ellas, conocido como exclusión hifal (evita la compactación del micelio cuando la densidad de la película aumenta); la formación y el mantenimiento de biofilms son procesos dinámicos que implican interacciones complejas de procesos físicos-químicos y biológicos determinado por fuerzas electrostáticas entre las células y la superficie (la superficie externa de microorganismos determina si se da o no la formación de biopelículas), las otras propiedades físicas del soporte como hidrofobicidad y rugosidad superficial también son importantes en la etapa de adhesión inicial de bacterias, levaduras y hongos filamentosos (Gutiérrez-Correa y Villena, 2003b; Trujillo, 2017), algunos factores medioambientales son:

- **Actividad de agua / contenido de humedad:** El contenido de humedad influye en el crecimiento y la biosíntesis de la celulosa. Sin embargo, los requerimientos de humedad de los microorganismos deben definirse mejor en términos de actividad de agua (A_w), en lugar de contenido de humedad, la actividad del agua afecta el desarrollo de la biomasa, las reacciones metabólicas y los procesos de transferencia de masa.
- **Temperatura:** La temperatura afecta directamente la germinación de las esporas, el crecimiento de los microorganismos y la producción de celulosa. Además, el nivel de temperatura alcanzado es una función del tipo de microorganismo y la porosidad, diámetro de partícula y profundidad del sustrato.
- **Difusión de gas:** La aireación tiene esencialmente dos funciones: (1) suministro de oxígeno para el metabolismo aeróbico y (2) eliminación de CO_2 , calor, vapor de agua y componentes volátiles producidos durante el metabolismo. En general, la difusión del gas aumenta con el tamaño del poro y disminuye con la reducción del diámetro de la partícula debido al empaquetamiento del sustrato.
- **Difusión de nutrientes:** La difusión de nutrientes se refiere a la transferencia de masa de nutrientes y enzimas, que incluye tanto la difusión de nutrientes intraparticulados hacia las células como la hidrólisis de sustratos sólidos por las enzimas microbianas.
- **Otros factores:** Como el pH de un cultivo, el tamaño de la inoculación (tamaño óptimo de los inóculos) y los efectos estimulantes de los surfactantes pueden actuar como agentes reguladores de la producción de enzimas por microorganismos (Trujillo, 2017; Ray y Behera, 2017).

d) Desarrollo de estructuras o formación de biopelículas

Una vez que la bacteria se ha unido de forma irreversible, comienza el proceso de maduración del biofilm, las bacterias se dividen activamente y los compuestos extracelulares originados por ellas mismas interactúan con las moléculas orgánicas e inorgánicas del medio creando así, el glicocálix (Busscher y Van Der Mei, 1997).

Las biopelículas de *Aspergillus* aparentemente no presentan una matriz extracelular, pese al aumento de la densidad de la biopelícula, tiene una gran capacidad de retención de agua, originando canales internos que permiten el movimiento de fluidos al interior de la biopelícula.

En la propagación por adhesión a superficie se han utilizado diversos soportes y/o matrices insolubles en los cuales el microorganismo se une para poder crecer, a menudo los hongos filamentosos muestran una gran afinidad por las superficies, se consideran como inmovilización pasiva (Linko et al., 1996). Se debe procurar que el soporte no inhiba el crecimiento del microorganismo o de los metabolitos de interés, además debe tener resistencia adecuada a las condiciones de operación del reactor tales como pH, temperatura, agitación,

fuerza iónica y presentar la facilidad de ser separado del medio líquido para que pueda ser reutilizado (Gracia et al., 2016).

Los soportes más usados son: poliéster, poliestireno, perlas de vidrio, perlas magnéticas de alginato de calcio (PMAC), micropartículas magnéticas de quitosán (MPMQ), nanopartículas magnéticas con celulosa (NPMC) (Gracia et al., 2016).

2.2.3.3 Fermentación con células inmovilizadas (FCI)

La inmovilización es el proceso por el cual el movimiento de enzimas o células, se ve restringido total o parcial en un espacio, y da lugar a una forma de célula insoluble en el agua, estas células se encuentran soportadas o ligadas a una matriz, inmovilizar células en soportes supera otras tecnologías, debido a la utilización del sistema por varios ciclos, esto permite bajos costos de producción, facilidad en las operaciones unitarias, altos niveles de rendimiento en los metabolitos de interés (lipasas, celulasas, xilanasas, bioetanol, entre otros) o en la absorción de iones metálicos presentes en el medio (Gutiérrez y Villena, 2003b; Gracia et al., 2016), en la Figura 8, se observa la producción de etanol en cepas de *Saccharomyces uvarum* inmovilizadas en alginato al 2%.

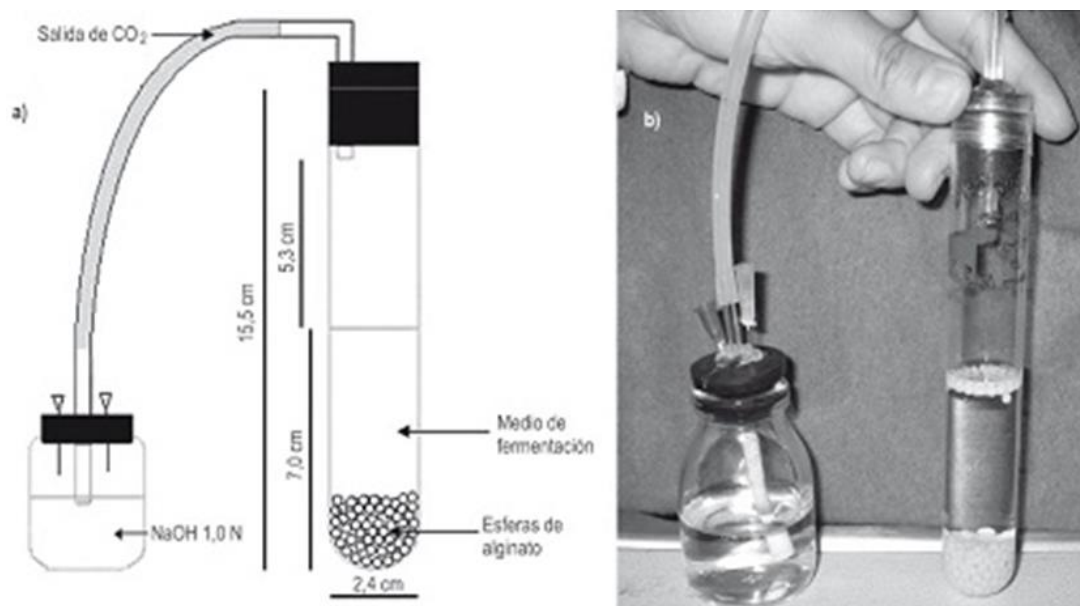


Figura 8. Diagrama (a) y fotografía (b) de biorreactor para la producción de etanol (Jiménez et al., 2011).

El uso de sistemas inmovilizados (biocatalizadores) para llevar a cabo biotransformaciones, es un área de la biotecnología en continua expansión. Un aspecto clave del proceso es el uso del catalizador (célula o enzima) en un sistema continuo que permite extender el uso del mismo en el tiempo, dando como resultado una disminución de los costos del proceso y otras ventajas

como una mayor pureza del producto, mayor productividad, etc. También se puede pensar en la reutilización del biocatalizador en procesos batch, para lograr este objetivo los biocatalizadores se inmovilizan. La definición de la European Federation of Biotechnology (1983) aclara el concepto “Los biocatalizadores inmovilizados son enzimas, células u organelos (o combinación de ellos) confinados o localizados en cierta región definida del espacio, con retención de su actividad catalítica y si es necesario de su viabilidad, que pueden ser usados de modo repetido y continuo” (Alcarraz, 2010).

Existen inmovilización de células y de enzimas, los métodos de inmovilización de enzimas son: por enlaces covalentes, cruzados, por atrapamiento en micro-encapsulación, por adsorción, por quelación, por enlaces disulfuro, etc., los métodos de inmovilización de células son: la adsorción (método de unión a portador), método de atrapamiento (Fajardo et al., 2011; Sirisha et al., 2016). A continuación se muestra los tipos de inmovilización:

a) Inmovilización de enzimas

La inmovilización de enzimas combina la actividad elevada de las biomoléculas activas, con la estabilidad química y mecánica del soporte, las enzimas pueden ser inmovilizadas en sustratos naturales y/o sintéticos por medios químicos (uniéndose al sustrato por enlaces covalentes) o físicos (fuerzas electrostáticas o membranas) (Fajardo et al., 2011).

b) Inmovilización de células

La incorporación de células se da por el atrapamiento en matrices sólidas (material polimérico), también se pueden inmovilizar células en matrices independientes, por difusión de las células o por formación de las matrices alrededor de ellas. En este método la biomasa es colocada en una solución que posteriormente es gelificada (por temperatura o adición de polimerizantes), quedando atrapadas dentro de la matriz y como resultado se obtiene esferas, la red polimérica permite al sustrato y a los productos pasar a través de ella y no permite la producción de biomasa, el tamaño de los poros no puede ser controlado (Figura 9). La micro-encapsulación por atrapamiento en geles de alginato representa una gran alternativa para proteger a los componentes bioactivos en un aditivo alimentario, ya que se ha demostrado que estabiliza a las enzimas y células, alarga su viabilidad y estabilidad en la producción, almacenamiento y manejo de los productos (Nava, Illiná, Álvarez y Martínez, 2016).

Se pueden usar diversos materiales como matriz o sistemas de soporte para la inmovilización de células, las matrices sólidas de células se obtienen por atrapamiento en un material polimérico inerte y materiales inorgánicos u orgánicos, especiales para soportar a los biocatalizadores.

La matriz ideal debe tener las siguientes propiedades: (i) ser económica, (ii) inercial, (iii) estabilidad, (iv) resistencia física, (v) capacidad para mejorar la actividad/especificidad enzimática, (vi) capacidad de regeneración, (vii) capacidad para reducir la inhibición del producto y (viii) capacidad para prevenir adsorción inespecífica y contaminación bacteriana. En el caso de la producción de celulasas los soportes más utilizados son: alginato de sodio, carragenina, gel de poliacrilamida, tronco de Opuntia ficus-indica y poliestireno (Gracia et al., 2016).

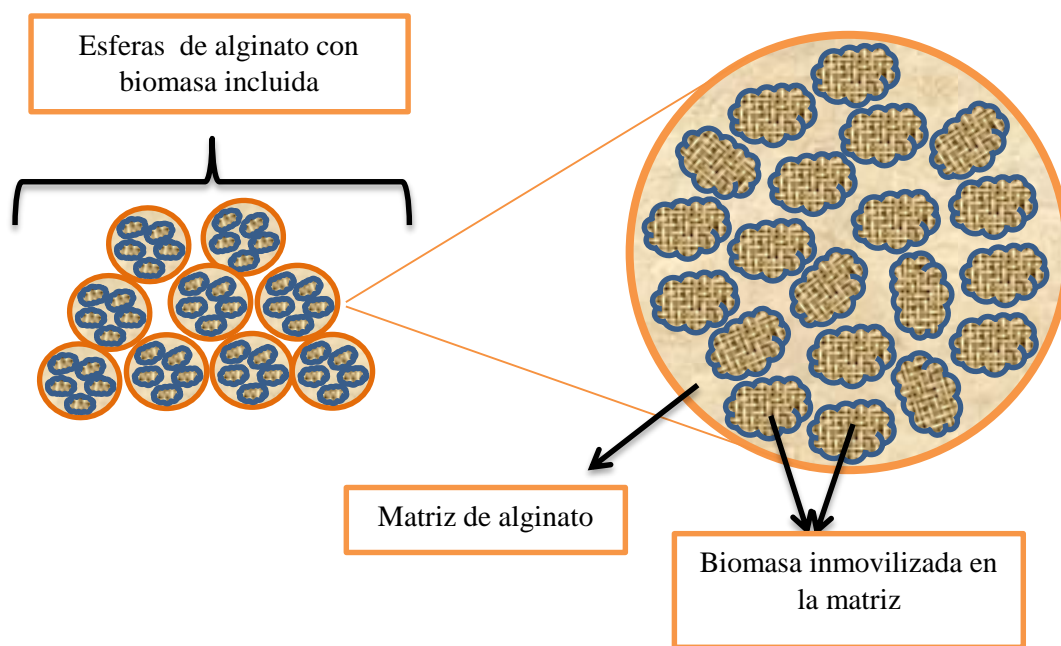


Figura 9. Biomasa inmovilizada por atrapamiento en alginato, adaptado de Fajardo et al. (2011).

El origen de los soportes puede ser natural u obtenido por síntesis, las matrices más adecuadas son los soportes inorgánicos (S.I) y los soportes orgánicos (S.O.):

Tabla 5. Soportes inorgánicos y soportes orgánicos

SOPORTES	Naturales	Sintéticos
Inorgánicos	Arena, silicatos, arcillas	Vidrios de porosidad controlada, cerámicas
Orgánicos	Virutas de madera, antracita, colágeno, celulosa, alginatos, carragenatos, albúmina y el agar (polimerizan en condiciones muy suaves).	PVC, polipropileno, poliacrilamida, resinas de intercambio iónico, epóxidos, poliuretanos

Fuente: Alcarraz (2010) y Fajardo-Ochoa (2011).

2.2.3.3.1 Aplicación de la fermentación con células inmovilizadas

La mayor aplicación de la inmovilización es en levaduras, Fajardo et al. (2011) menciona, que utilizaron levaduras inmovilizadas en perlas de alginato y poliacrilamida con éxito en la producción de vino blanco y etanol. Algunas de las ventajas y desventajas que ofrece la inmovilización se en listan en la Tabla 6.

Tabla 6. Ventajas y desventajas de la utilización de células inmovilizadas

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Operación continua del reactor sin riesgo de lavado y pérdida de células.	Problemas de difusión de nutrientes y productos a través de la matriz porosa, debido a la alta densidad celular y la baja solubilidad del oxígeno en el agua.
Separación sencilla de células del medio donde se encuentran.	Cambios en la fisiología celular que pudieran afectar la productividad
Reutilización de las células	Cambios en la composición de poblaciones microbianas (pudiera ser un problema en aguas residuales).
Menor volumen de los biorreactores	Altos costos de inmovilización
Especies microbianas espacialmente separadas para realizar diferentes funciones en un mismo reactor	La pobre resistencia mecánica de los soportes sólidos.
Protección de los microorganismos inmovilizados de agentes tóxicos y estrés ambiental, el soporte protege la célula de la acción de inhibidores, metales pesados, fenoles y temperaturas extremas.	Impone barreras disfuncionales adicionales (pared celular) de modo que se puede requerir de la permeabilización de las células. En este caso, puede ser difícil el mantenimiento de la integridad celular.
Fácil de manejar porque permiten un mejor control de la actividad catalítica en reactores de tipo lote y continuos; menor costo de manejo.	
Los catalizadores atrapados en alginato se vuelven más activos.	
Se logra la intensificación del proceso, las células inmovilizadas permiten el uso de una densidad celular considerablemente mayor.	

Fuente: Escudé (2007) y Hernández (2011).

2.2.4 Celulasas

La celulasa es una enzima extracelular producida por algunos microorganismos, que poseen acción catalítica de forma específica para algunos sustratos, es un complejo de enzimas inducibles que son sintetizadas por muchos microorganismos durante su crecimiento en materiales celulósicos (Tomckowiack, 2014). Las celulasas son enzimas complejas que se encargan de la degradación de la celulosa denominadas también glicosil hidrolasas o glicohidrolasas, pueden hidrolizar oligosacáridos o polisacáridos de glucosa, consta de dos unidades importantes una que rompe los enlaces de hidrogeno liberando de esta manera cadenas de glucosa susceptibles a una segunda hidrólisis y la otra unidad que se encarga de hidrolizar estas cadenas hasta celobiosa y glucosa (Cortez, 2015; Gutiérrez, Moreno y Montoya, 2015).

2.2.4.1 Nomenclatura y clasificación

Las enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar los enlaces glicosídicos entre dos o más carbohidratos o entre un carbohidrato y un compuesto no glucídico (aglicón) reciben el nombre de glicosil hidrolasas (GH) (Cortez, 2015). El enlace glicosídico es uno de los enlaces más estables que existen en la naturaleza, con una vida media de más de 5 millones de años, por lo que las GH están consideradas como uno de los catalizadores más eficientes que se conocen (Gutiérrez et al., 2015). Al igual que el resto de enzimas, las GH poseen un número EC (Enzyme Commission number), de acuerdo a la clasificación de la IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology). En esta clasificación, basada en las reacciones catalizadas por las enzimas (capacidad para hidrolizar el enlace glicosídico) las GH están incluidas en el grupo EC 3.2.1.x. (Gil, 2015), en la Figura 10, se observa la clasificación de la enzima celulasa según su número de clase y su especificidad de la enzima.

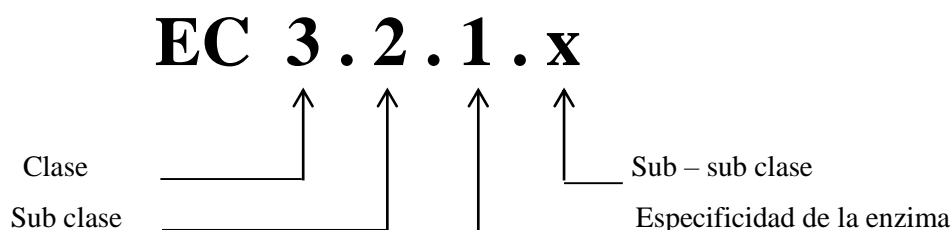


Figura 10. Clasificación de la enzima celulasa, adaptado de Gil (2015).

Las celulasas (EC 3.2.1.4) constituyen un sistema enzimático que está conformado por cuatro o tres grandes clase o tipos de enzimas: endo-β-1,4-glucanasa (E.C 3.2.1.4), exo- β-1,4-glucanasas (EC 3.2.1.74), la celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91) y las β-glucosidasas (EC 3.2.1.21).

2.2.4.2 Mecanismo de acción de las celulasas

Las celulasas degradan el polímero de celulosa que está formado por regiones amorfas y cristalinas, la región amorfa está formada por cadenas de celulosa con organización más reducida y por lo tanto más susceptible al ataque enzimático y químico, mientras que en la región cristalina, se encuentra formando agregados extensos y cristalinos llamados microfibrillas, las cuales están estabilizadas por enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, la cual le confiere más alta estabilidad química. La mayoría de las cadenas de celulosa tienen un extremo reductor y otro no reductor, es decir, se encuentran polarizadas (Martínez et al., 2005; Prado, 2016).

Las endoglucanasas, cortan al azar los enlaces internos de la celulosa amorfa, generando oligosacáridos de varias longitudes y en consecuencia, nuevos extremos de cadena, también un lento incremento de los grupos reductores libres. Las exoglucanasas, actúan de una manera progresiva en los extremos reductores y no reductores de las cadenas del polisacárido (celulosa), liberando glucosa y la celobiohidrolasa libera celobiosa de la celulosa cristalina, esto resulta un incremento rápido de los azúcares o grupos reductores y produce poco cambio en el tamaño del polímero, finalmente las glucosidasas hidrolizan las celodextrinas solubles y la celobiosa a glucosa (Gutiérrez et al., 2015; Llenque et al., 2015; Castro, 2016). El rompimiento de la celulosa ocurre raramente aislado, sino como una reacción compleja implicando celulosa, lignina y hemicelulosa, la acción combinada de enzimas extracelulares con especificidades complementarias es esencial (Prado, 2016). El mecanismo de acción de las celulasas se muestra en la Figura 11.

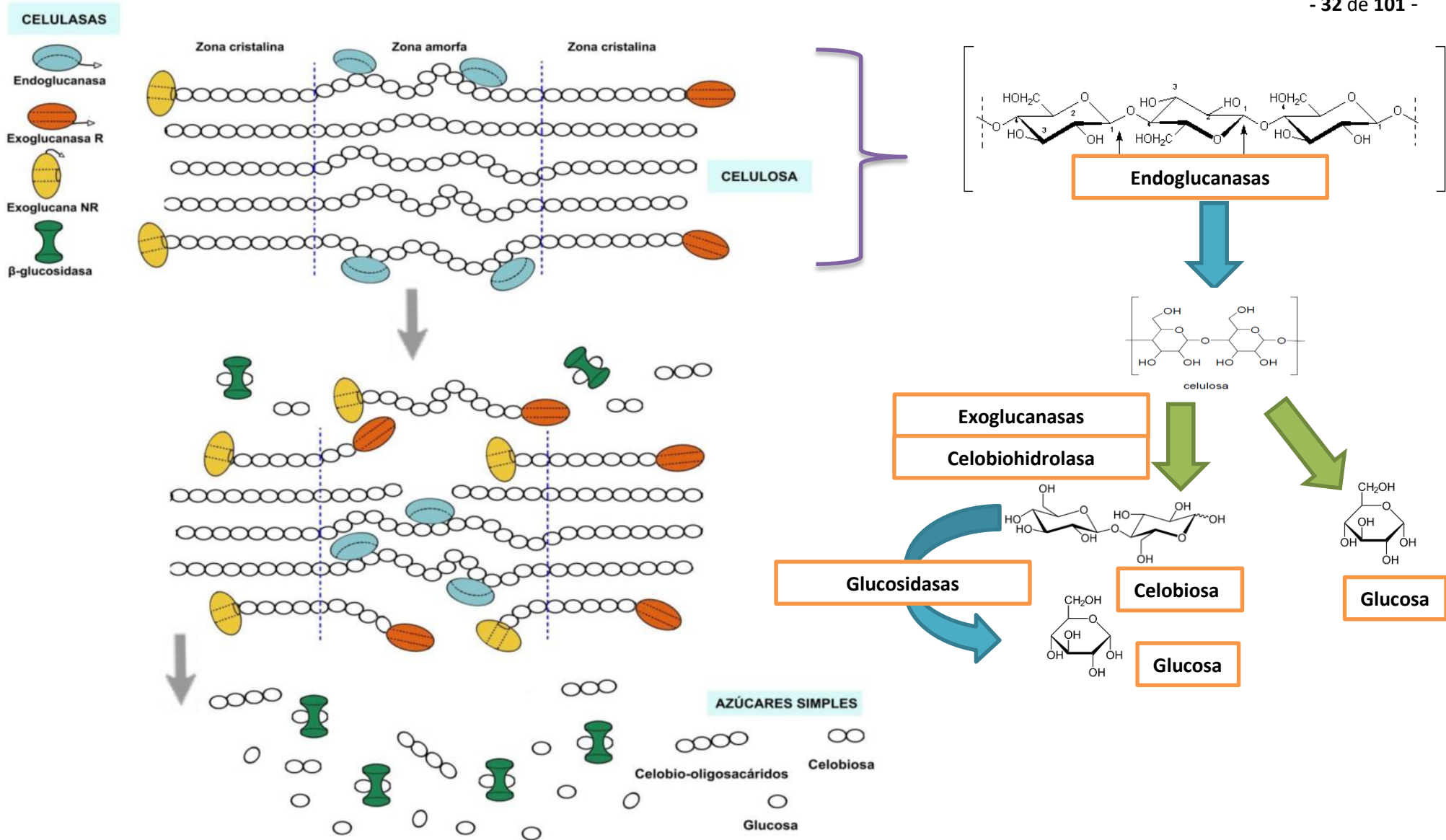


Figura 11. Acción coordinada de las celulasas sobre la celulosa amorfa y cristalina (Tamariz, 2014).

2.2.4.3 Factores que influyen la producción de celulasas

Los principales factores que influyen en la actividad enzimática son: la fuente de carbono, la temperatura y el pH.

2.2.4.3.1 Fuente de carbono

La selección del sustrato se realiza de acuerdo al tipo de microorganismo y tipo de enzima que se requiere, para una interacción eficaz entre el sustrato y la enzima, los grupos ionizables, del sustrato como del centro activo de la enzima, deben estar en estados apropiados para mantener su conformación (Vásquez, 2013).

2.2.4.3.2 pH

El pH se toma en cuenta como una variable relevante del proceso, debido a que puede afectar los niveles de producción de enzimas celulasas, dependiendo del microorganismo utilizado y del tipo de enzima (Vásquez, 2013).

2.2.4.3.3 Temperatura

La temperatura también influye en la producción de celulasas, si aumenta, las velocidades de las reacciones químicas, enzimáticas y de crecimiento, se vuelven más rápidas, existen temperaturas óptimas donde se presentan las funciones metabólicas y si este se sobrepasa, las funciones empiezan a decaer drásticamente (Vásquez, 2013).

2.2.4.4 Celulasas fúngicas

Los procesos biotecnológicos para la obtención de celulasas hacen uso de microorganismos capaces de sintetizar fácilmente las enzimas y secretarlas al medio exterior, además de requerir un sustrato inductor que propicie la formación del complejo enzimático (Mora, 2015). Las celulasas son producidas por varios microorganismos, bajo ciertas condiciones de desarrollo y crecimiento, en la Tabla 7, se observa los principales microorganismos productores de celulasas.

Tabla 7. Principales microorganismos productores de celulasas

MICROORGANISMO	SUSTRATOS	ESCALA	PRODUCTIVIDAD	REFERENCIA
<i>Cellulomonas biazotea</i>	Bagazo, tallo de algodón, paja de trigo, celobiosa, CMC y papel filtro	1 litro	37.5 IU/L/h en CMC, 17.5 IU/L/h FPA (Actividad Papel Filtro)	Ibrahim M. y Malik K., 1996
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Paja de trigo, bagazo, paja de arroz	Fermentación en estado sólido	240 U/g sustrato endoglucanasa, 9.73 FPA	Soni R. et al., 2010
<i>Acremonium cellulolyticus</i>	Paja de arroz	Matraz	10.8 U/mL en papel de filtro	Hideno A. et al., 2011
<i>Penicillium echimulatum</i>	Bagazo de caña, salvado de trigo	Fermentación en estado sólido	32.9 U/dm/g en papel filtro	Camassola M. y Dillon A.J.P., 2007
<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. nidulans</i>	Jacintos de agua	250 mL	0.9 U/mg CMCasa, y 0.8 U/mg proteína en Avicelasa	Usama F. et al., 2008
<i>Aspergillus niger MS82</i>	CMC de baja densidad	Matraz	0.3 U/mL endoglucanasa	Sohail M. et al., 2009
<i>Neurospora Crassa</i>	Paja de trigo	Matraz	FPA 1.33 U/mL, CMC 19.7 U/mL, BGL 0.58 U/mL	Singhania R. et al., 2010
<i>Trichoderma Reesei</i>	Sauce pretratado	Fermentador 22 litros	FPA 108 U/g celulosa	Reczey K. et al., 1996
<i>Trichoderma reesei RUT C30</i>	Avicel ®	Fermentador	FPA 1.8 U/mL	Weber J. y Agblevor F.A., 2005

Fuente: Mora (2015).

Aunque existen diferentes complejos enzimáticos bacterianos comercializados, principalmente de *Clostridium*, *Cellulomonas* y *Thermomonospora*, la mayor parte de las celulasas comerciales proceden de hongos filamentosos. Esto es debido a que producen enzimas extracelulares en mayor cantidad y normalmente poseen alta eficacia catalítica. Desde 1976 se han aislado más de 14.000 especies fúngicas degradadoras de celulosa, aunque los crudos enzimáticos comercializados proceden mayoritariamente de los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Penicillium* (Gil, 2015).

Las celulasas son producidas por varios hongos incluyendo *Trichoderma* y *Aspergillus* (Jung, Yoo, Kim, Lee, Park y Kin, 2015), las celulasas de *Trichoderma reesei* se caracterizan por una alta proporción de endoglucanasa y exoglucanasa, pero una proporción baja de beta-glucosidasa. Por este motivo, otros microorganismos se analizaron tales como el género *Aspergillus* y especialmente el *Aspergillus niger* ha sido ampliamente utilizado porque produce las tres enzimas fundamentales requeridas para la celulólisis (Boggione et al., 2016).

2.2.4.5 Características y propiedades de las celulasas

Las características de las celulasas varían dependiendo de su origen, la mayoría de las celulasas microbianas estudiados, han demostrado ser proteínas ácidas con un contenido de hidratos de carbono significativo. Los extractos de celulasa pueden descomponer las celulosas modificadas tales como carboximetilcelulosa o hidroxietilcelulosa (Serva, 2014). La estabilidad térmica y especificidad exacta de la celulasa por cada sustrato puede variar, sin embargo el pH óptimo de las preparaciones de las enzimas varía de 4 a 5, para su actividad catalítica la temperatura óptima es de 40 a 50°C y el pH varía entre 5 y 7, las celulasas se conservan a 4 °C (Serva, 2014).

2.2.4.6 Aplicación de las celulasas

En la actualidad la producción de celulasas constituye la tercera industria más grande a nivel mundial, por sus distintas aplicaciones biotecnológicas, como el procesamiento del algodón, el reciclaje de papel, las industrias alimentaria humana y animal, industria de los detergentes y textilera, industria del papel, producción de bioetanol, dentro de las cuales, su aplicación en la bioconversión de biomasa a etanol es una alternativa sustentable en la producción de combustibles renovables, entre otros (Tamariz, 2014).

Las celulasas son ampliamente utilizadas en la industria textil para el ablandamiento de algodón y desteñido de mezclilla, en el mercado de los detergentes para el cuidado del color y anti-deposición. Dentro de la industria alimentaria, son empleadas para favorecer la extracción y filtración de jugos y en la industria de la pasta kraft y de papel se usan para la eliminación de tinta (Cortez, 2015).

Actualmente, las celulasas han adquirido notable importancia en la industria bioenergética para hidrolizar biomasa lignocelulósica con la finalidad de emplearse en la producción de etanol celulósico, por lo que ha aumentado la demanda de celulasas con altas actividades y estabilidad en diferentes condiciones de temperatura, pH, etc., (Cortez, 2015).

2.2.4.7 Producción industrial de la enzima celulasa

Las celulasas son actualmente la tercera enzima industrial más grande en todo el mundo, su costo por volumen es en dólares, la demanda de celulasas está en constante aumento debido a sus diversas aplicaciones, varias empresas están involucradas en la producción de la celulasa, a nivel mundial hay dos grandes productores principales de celulasa, Genencor y Novozymes, ambas compañías han jugado un papel importante en la reducción del costo de la celulasa por su investigación activa y continua a reducir el costo, mediante la adopción de nuevas tecnologías, del origen de producción no hay información disponible, en general todos contienen diferentes componentes de enzimas necesarias para la hidrólisis eficiente de diferentes materias primas, ver Tabla 8.

Tabla 8. Celulasas comerciales producidas por las empresas y sus respectivas fuentes

MUESTRAS DE ENZIMA	PROVEEDOR	FUENTE
Cellubrix (Celluclast)	Novozymes (Denmark)	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
Novozymes 188	Novozymes	<i>Aspergillus niger</i>
Cellulase 2000L	Rhodia-Danisco (Denmark)	<i>Aspergillus niger</i>
Rohament CL	Rohm-AB Enzymes (Rajamaki, Finland)	<i>T. longibrachiatum/Trichoderma reesei</i>
Viscostar 150L	Dyadic (Júpiter, FL)	<i>T. longibrachiatum/T. reesei</i>
Multifect CL	Genencor International (South	<i>T. longibrachiatum/T. reesei</i>
Bio-Feed Beta L	San Francisco, CA)	<i>Trichoderma reesei</i>
Energex L	Novozymes	<i>T. longibrachiatum/T. reesei</i>
Ultraflo L	Novozymes	<i>T. longibrachiatum/T. reesei</i>
Viscozyme L	Novozymes	<i>T. longibrachiatum/T. reesei</i>
Cellulyve 50 L	Novozymes	<i>T. longibrachiatum/T. reesei</i>
GC 440	Lyven (Columbelles, France)	<i>T. longibrachiatum/T. reesei</i>
GC 880	Genencor-Danisco (Rochester, NY)	<i>T. longibrachiatum/T. reesei</i>
Spezyme CP	Genencor	<i>T. longibrachiatum/T. reesei</i>
GC 220	Genencor	<i>T. longibrachiatum/T. reesei</i>
Accelerase 1500	Genencor	<i>T. longibrachiatum/T. reesei</i>
Cellulase AP30K	Genencor	<i>Trichoderma reesei</i>
Cellulase TRL	Amano Enzyme (Troy, VA)	<i>Aspergillus niger</i>
Econase CE	Solvay Enzymes (Elkhart, IN)	<i>T. reesei/T. longibrachiatum</i>
Cellulase TAP 106	Alko—EDC (New York, NY)	<i>T. reesei/T. longibrachiatum</i>
Biocellulase TRI	Amano Enzyme	<i>Trichoderma viride</i>
Biocellulase A	Quest International (Sarasota, FL)	<i>T. reesei/T. longibrachiatum</i>
Ultra-Low Microbial (ULM)	Quest International	<i>Aspergillus niger</i>
Accelerase TRIO	Logen (Ottawa, ON, Cánada)	<i>T. reesei/T. longibrachiatum</i>
	DuPont-Genencor	<i>Trichoderma reesei</i>

Fuente: Singhania et al. (2017).

2.2.5 Método de cuantificación enzimáticos

La cuantificación de la actividad celulolítica se puede hacer (a) mediante la evaluación individual de cada tipo de celulasa: endoglucanasa, exoglucanasa y glucosidasa, o (b) midiendo celulasas totales (Percival, Himmel y Mielenz, 2006). Para la actividad endoglucanasa se utiliza una celulosa soluble con alto grado de polimerización como es la carboximetilcelulosa (Dashtban, Maki, Leung, Mao y Qin, 2010). Las exoglucanasas muestran relativamente alta actividad sobre Avicel (Percival et al., 2006; Dashtban et al., 2010).

La cuantificación de la actividad de celulasa total mide la acción sinérgica de los tres tipos de celulasas, para su cuantificación se usa sustratos insolubles como el papel filtro, algodón, celulosa microcristalina, lignocelulosa pre-tratada, etc. (Percival et al., 2006). En 1987 la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) estandarizó el método de actividad

papel filtro (FPA), que tradicionalmente utiliza como sustrato una tira de 1 x 6 cm de papel filtro Whatman N° 1 y para la cuantificación se emplea el método del DNS (Tamariz, 2014).

2.2.5.1 Determinación de azúcares reductores prueba cuantitativa por la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

La formación de productos de la hidrólisis frecuentemente se mide mediante el método de DNS ó el método de Nelson Somogy porque tienen un alto grado de detección de azúcares reductores y poca interferencia con la celulosa (Percival et al., 2006), además, como reactivo sensible a los productos de reacción y poca interferencia con la celulosa, empleando glucosa como reactivo patrón para la obtención de la curva de calibrado del método. Este procedimiento se fundamenta en la reacción de los grupos reductores de los productos de la reacción catalítica, con el reactivo oxidante ácido dinitrosalicílico (DNS) (Cortez, 2015).

Para cualquier método colorimétrico consiste en obtener curvas completas mediante el control directo y continuo de la reacción, primero es necesario realizar una curva patrón que sirva de apoyo en la determinación de la concentración deseada, la curva se elabora con una disolución cuya concentración es conocida (Solís, 2015).

Esta técnica demuestra la presencia del grupo carbonilo libre (C=O) de los azúcares reductores que implica la oxidación del grupo funcional aldehído de la glucosa (Miller, 1959).

En este método el Ácido 3,5-dinitrosalicílico (de color amarillo) es reducido a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo), mientras que los grupos aldehídos del azúcar son oxidados a grupos carboxilos. La reducción del ácido da un cambio de coloración, el cual es proporcional a la concentración del azúcar reductor presente y se evidencia por medio de la lectura de absorbancias (densidad óptica) en el espectrofotómetro, lo que implica la aplicación de la ley de Lambert-Beer cuya presencia puede detectarse por la lectura de la absorbancia a una determinada longitud de onda (en la zona de 540-570 nm) (Miller, 1959).

La lectura de la prueba de DNS es altamente influenciada por las mismas condiciones de la prueba, como la temperatura del agua de calentamiento, la transferencia de calor, el tiempo de reacción, la proporción de glucosa presente y el tiempo de preparación del reactivo, el cual con frecuencia es ignorado (Tamariz, 2014).

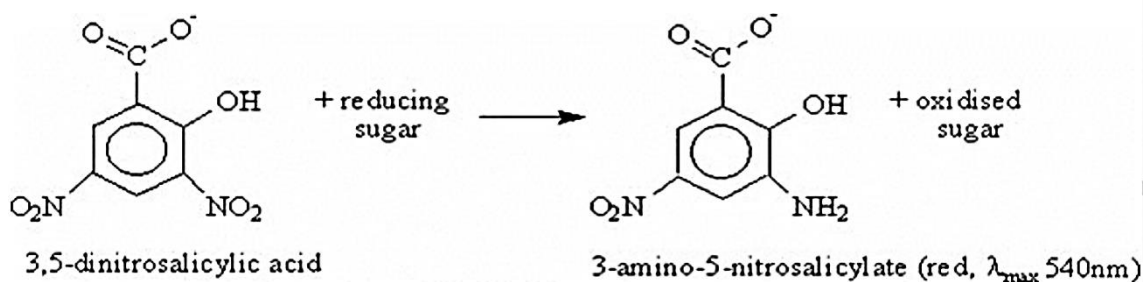


Figura 12. Reacción de reducción del DNS (Miller, 1959).

2.2.5.2 Espectrometría ultravioleta-visible

La espectrometría ultravioleta-visible (UV-Vis), utiliza la luz en los rangos visibles del espectro electromagnético (400-700 nm), es la forma más sencilla y común de analizar azúcares reductores, es un método cuantitativo de análisis químico que utiliza la luz para medir la concentración de sustancias químicas. Se refiere a la medida de cantidades relativas de luz absorbida por muestra, en función de la longitud de onda, cada componente de la solución tiene su patrón de absorción de luz característico, comparando la longitud de onda y la intensidad del máximo de absorción de luz de una muestra versus soluciones estándar, es posible determinar la identidad y la concentración de componentes disueltos en la muestra (solución incógnita) (Solís, 2015).

2.2.5.2.1 Instrumentación

Los instrumentos para espectrometría de absorción molecular se muestra en la Figura 13 y constan de una fuente de luz, un monocromador, un selector de longitud de onda, un soporte de muestra, un detector y un procesador de señal y lectura (Skoog et al., 2008).

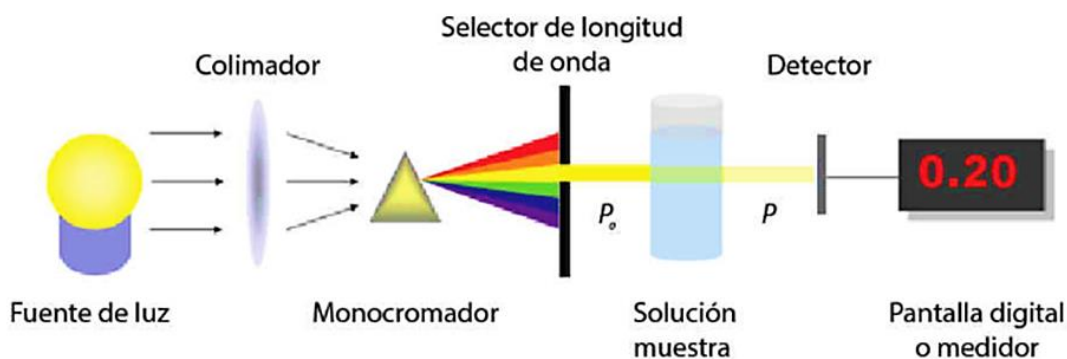


Figura 13. Partes del espectrofotómetro UV, adaptado de Filip et al. (2012).

Los componentes básicos generales de un espectrofotómetro son:

A) Fuente de luz: Proporciona energía a la muestra para la excitación, puede ser producida por lámpara de Wolframio (Tungsteno), lámpara de arco de xenón y lámpara de deuterio (Nielsen, 2003).

B) Monocromador: Su propósito es separar la línea de resonancia de interés del resto de la radiación procedente de la lámpara, de tal manera que solamente la radiación de la longitud de onda deseada alcance el detector, está constituido por las rendijas de entrada y salida (Miller y Rutzke, 2003).

C) Soporte de la muestra: Es donde tiene lugar la interacción de radiación con la muestra, en este proceso se aplica la ley de Lambert-Beer en su máxima expresión, en lo que concierne al paso de la molécula del estado fundamental al excitado (Nielsen, 2003).

D) Detector: El detector es quien detecta una radiación, transforma la energía radiante que incide sobre él, en una señal eléctrica (Miller y Rutzke, 2003).

CAPÍTULO III

DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 Definición de Variables

Variable independiente:

- Sistemas de fermentación
- Medio productivo

Variables dependientes:

- Producción de celulasas

3.2 Operacionalización de variables

En la Tabla 9 se observa la operacionalización de las variables dependientes e independientes.

Tabla 9. Operacionalización de variables.

TIPO	DENOMINACIÓN	INDICADORES	ÍNDICES
Variable independiente	Sistemas de fermentación con suero de leche y <i>Aspergillus niger</i>	Sistemas de fermentación	Fermentación Sumergida
			Fermentación por Adhesión Superficies
Fermentación por Inmovilización			
	Medio productivo	Formulación de ingredientes y suero de leche	g/L
Variable dependiente	Producción de celulasas	Actividad de celulasa	UI/L
		Biomasa	g/L
		Actividad Específica	UI/g
		Proteínas	mg/mL

3.3 Hipótesis de la Investigación

Hipótesis general

- Se puede utilizar suero de leche como sustrato para la producción de enzimas celulasas utilizando *Aspergillus niger* en tres sistemas de fermentación.

Hipótesis específicas

- Es posible la sustitución de la lactosa utilizando suero de leche para la formulación de un medio de producción para celulasas.
- Existe un sistema de fermentación de mayor actividad enzimática, producción de biomasa y lactosa residual.
- Existe un sistema de fermentación más productivo para producir celulasas con *Aspergillus niger* utilizando un medio de producción a base de suero de leche.

3.4 Tipo y diseño de la investigación

El tipo de investigación es básica porque se realizara corridas a nivel exploratorio en el laboratorio y aplicada porque los resultados de los ensayos exploratorios podrían aplicarse a la realidad, es decir puede ser utilizada inmediatamente, porque el suero de leche que se genera en el proceso de elaboración de queso es desechado, por ende se plantea aprovechar el suero de leche en la obtención de enzimas celulasas y de esta manera ayudar a combatir la contaminación.

El proceso de la investigación se realizará utilizando el método científico experimental, que se basa en un estudio visual, manipulación de equipos e instrumentos de los laboratorios de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, el tipo de diseño de investigación es experimental de uso general, porque involucra la manipulación intencional de una acción para analizar sus posibles efectos.

3.5 Población y muestra

Se utilizó suero de leche fresco obtenido de la producción de queso andino en el área de quesería de la empresa “Agroindustrial El Tambo”, procediendo así de un mismo lugar y de una sola producción, que tienen uniformemente la misma composición y características.

Para este trabajo de investigación la determinación de la muestra fue no probabilístico, determinándose por cuotas, por esto la población se definió de acuerdo a la cantidad necesaria para el número total de muestras de suero de leche, para cumplir con las unidades experimentales propuestas.

Las muestras de suero de leche se recogieron de una sola producción de queso andino, elaborados en el turno de la mañana de 7 am a 3 pm, con la leche de la comunidad de Kerapata del distrito de

Tamburco, en un envase de plástico de 7 litros de capacidad, limpio y desinfectado, y se trasladaron al laboratorio de Biotecnología en una caja isotérmica a 10°C, seguidamente el suero de leche se dividió en 14 envases de plástico con tapa limpios y desinfectados de 500 mL cada uno, luego se almacenaron a 4°C para su conservación hasta el momento de su uso.

3.6 Procedimiento de la investigación

La presente investigación se dividió en 3 etapas para facilitar el estudio, recolección de datos y el reporte de los mismos, en la primera etapa se llevó a cabo la preparación del medio de producción con suero de leche y la preparación del inóculo, desde la recepción del *Aspergillus niger* y su replicado; en la segunda etapa fue la producción de las enzimas celulasas con los tres sistemas de fermentación y en la tercera etapa se evaluaron los parámetros de rendimiento de la enzima y su productividad.

En la Figura 14 se muestra el esquema del flujo de operaciones para la producción de celulasas.

I ETAPA: Preparación del medio de producción y del inóculo

3.6.1 Medio de producción

El suero de leche fue incluido en la composición del medio de producción de Duff (1988) (tomado de Izarra et al., 2010) (ver Tabla 10) sustituyendo la lactosa en polvo, el cual fue estándar para los tres sistemas de fermentación. Se determinó la concentración de lactosa mediante el método de DNS (Anexo 2). Para la formulación del medio de producción con suero de leche, se tomó como referencia el medio de producción de Duff (1988), los cálculos se pueden ver en resultados de la formulación del medio de producción.

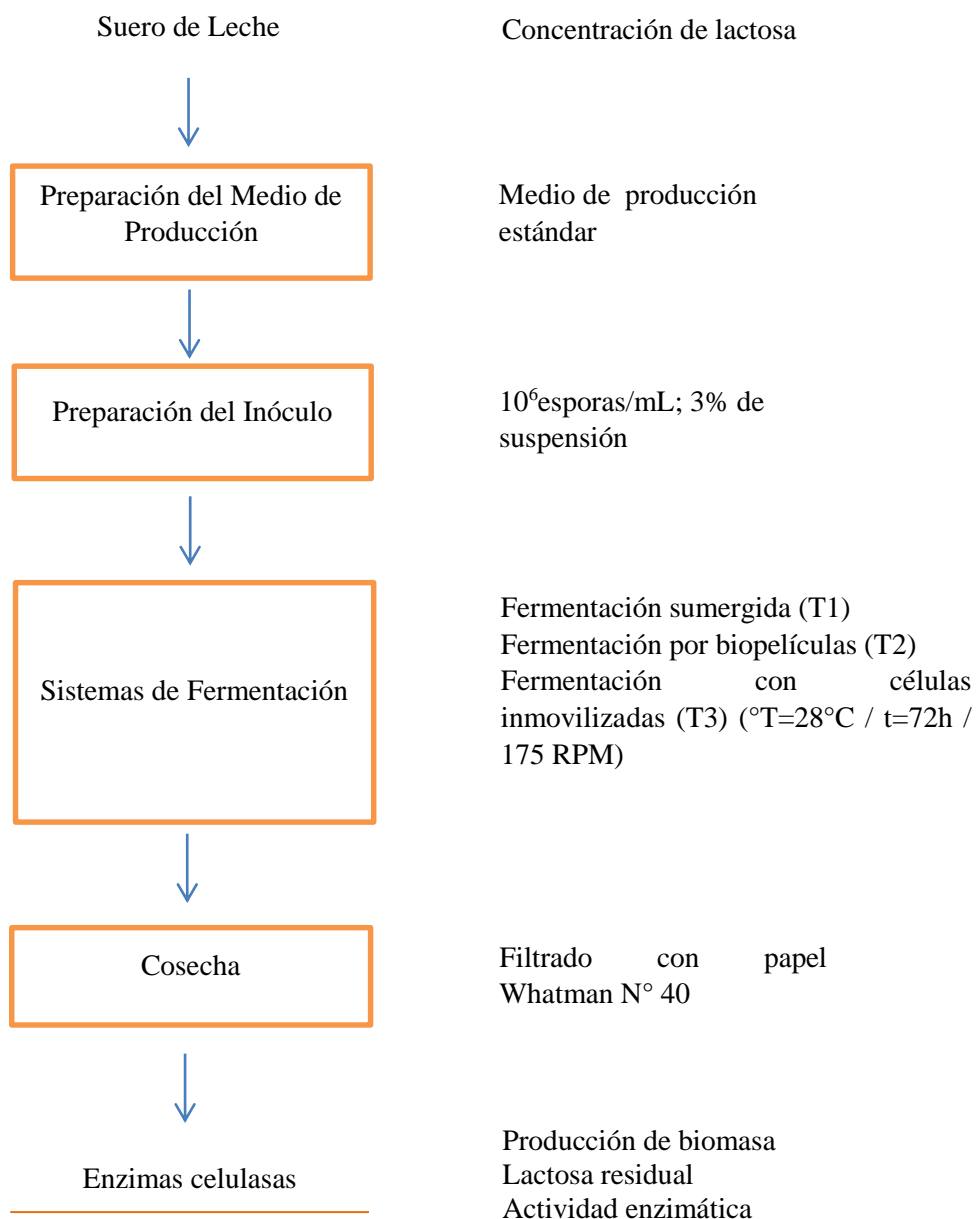


Figura 14. Diagrama de flujo de producción de celulasas

Tabla 10. Medio de producción de referencia

Reactivo	Cantidad (g/L)
CaCl₂.2H₂O	0.3 g/L
FeSO₄.7H₂O	5 mg/L
KH₂PO₄	2 g/L
MgSO₄.7H₂O	0.3 g/L
NH₄CL	1.4 g/L
Peptona	1 g/L
Úrea	0.3 g/L
ZnSO₄.7H₂O	1.4 mg/L
Lactosa	10 g/L
pH final del medio	5,5

Fuente: Duff (1988) (tomado de Izarra et al., 2010).

3.6.2 Preparación del inóculo

Se utilizó *Aspergillus niger* con código ATCC 10864 (almacenado por el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac), conservados en tubos eppendorf inclinados de Agar Papa Dextrosa (PDA).

El *Aspergillus niger* del tubo eppendorf, se cultivaron en matraces de 50 mL con Agar Papa Dextrosa (PDA), el sembrío de esporas se dio por incorporación, se incubaron a 28°C por 60 horas (esporas formadas) (ver Anexo 16).

Para obtener el inóculo se cosecharon esporas de los cultivos en Agar Papa Dextrosa (PDA) de 60 horas de crecimiento, utilizando agua estéril en tubos de ensayo. Se realizó el recuento en una cámara Neubauer (ver Anexo 3) hasta obtener la concentración final requerida (10⁶ esporas por mililitro). Esta suspensión se utilizó como inóculo para los tres tipos de fermentaciones, se inocularon de la suspensión de 10⁶ esporas/mL un equivalente a 3% v/v para 70 mL del medio de producción modificado con suero de leche en matraces de 250 mL.

II ETAPA: Producción de celulasas

3.6.3 Sistemas de fermentación

Para la producción de celulasas se realizó tres sistemas de fermentación: fermentación sumergida, fermentación por biopelículas y fermentación con células inmovilizadas, en los tres fermentaciones se consideraron iguales las siguientes condiciones: un medio de producción de 70 mL conteniendo suero de leche, por 72 horas de fermentación, a 28°C de temperatura y agitación de 175 rpm para la obtención de enzimas celulasas.

A) Fermentación sumergida

Se determinó de acuerdo al método reportado por Izarra et al. (2010), se preparó el inóculo de 3% v/v de la suspensión de esporas (2,1 mL), se cultivaron en 4 matraces de 250 mL que contenían 70 mL del medio de producción, a una temperatura de 28 °C, en agitación a 175 rpm por 72 horas de fermentación (ver Anexo 14).

B) Fermentación por biopelículas

Se determinaron de acuerdo al método de Villena y Gutiérrez (2006), se preparó el inóculo de 2,1 mL (3% v/v) de la suspensión de esporas se cultivó directamente sobre la matriz de sujeción (tela poliéster) de 3.1 x 3.1 cm de lado (Villena et al., 2001), en cada uno de los cuatro matraces que contenían 70 mL de agua estéril, se agitaron a 175 rpm por 15 minutos y se vació el agua de cada uno de ellos, este procedimiento se repite dos veces (1° y 2° lavado) para retirar las esporas no adheridas, luego se transfiere uno por uno a matraces que contienen 70 mL del medio de producción para iniciar la fermentación (ver Anexo 14).

C) Fermentación con células inmovilizadas

Se determinaron de acuerdo al método de Ríos, Crespo, Terrazas y Álvarez (2007) modificado por Gutiérrez y Villena (2013), la fermentación con células inmovilizadas necesita de una etapa previa antes de la propia fermentación: primero se realizó la fermentación sumergida para obtener biomasa, luego continúa con la fermentación con células inmovilizadas.

En un matraz vacío estéril se colocó el suero fisiológico al 0.9% (5 mL), luego se agrega la solución de alginato al 4% (5 mL) y finalmente la biomasa (pellets), todo esto se homogenizó, la mezcla se succionó con una jeringa estéril y luego se hizo gotear en un matraz que contenía cloruro de calcio a 0.05M en constante agitación para permitir la formación de las perlas, se mantuvieron las esferas en el cloruro por media hora, pasado este tiempo y una vez polimerizadas, las perlas o esferas obtenidas se colocan en los matraces de 250 mL que contenían 70 mL del medio de producción (ver Anexo 14).

3.6.4 Cosecha

Después del término de las fermentaciones, el medio de cada matraz es filtrado por papel Whatman N° 40, el retentado es la biomasa formada y al permeado se evaluó la lactosa residual y la actividad enzimática.

III ETAPA: Evaluación de los parámetros de rendimiento y productividad de la enzima

En esta etapa se evaluaron los parámetros de rendimiento y productividad de la enzima en cada fermentación.

3.7 Material de investigación

3.7.1 Pruebas de entrada, proceso y salida de la investigación.

3.7.1.1 Pruebas de entrada

La determinación de lactosa residual en el medio de producción y la concentración de la lactosa en el suero de leche, se realizó de acuerdo al método de Miller para azúcares reductores utilizando ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959; Villena y Gutiérrez, 2003). Se procedió a realizar una curva estándar de lactosa para cada uno para obtener una ecuación (ver Anexo 2) y poder determinar la concentración de lactosa, en la Tabla 11, se observa las soluciones y cantidades que se utilizaron.

Tabla 11. Soluciones para la curva estándar de lactosa

Reactivos	BR	1	2	3	4	5
Solución estándar de lactosa (mL)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Tampón acetato pH 4,8 50mM (mL)	1.5	1.4	1.3	1.2	1.1	1.0
Concentración final de lactosa (mg/mL)	0	0.2	0.4	0,6	0.8	1.0
Reactivo DNS (mL)	3	3	3	3	3	3

BR (Blanco reactivo) y las numeraciones del 1 al 5 son la codificación de los tubos de ensayo y cada uno de ellos se realizó por duplicado

Después de haber adicionado el reactivo DNS, se colocó en baño de agua hirviendo todos los tubos durante 5 minutos, para cortar la reacción inmediatamente se enfriaron los tubos en agua corriente, luego se adicionaron 5 mL de agua destilada a cada tubo de ensayo, se mezclaron bien los tubos con un vórtex y se procedió a leer en el espectrofotómetro a 540 nm contra el blanco reactivo (BR).

Los valores de absorbancia se graficaron contra la concentración de lactosa, realizando una regresión lineal:

$$y = a + bx$$

Dónde: y = absorbancia, x = concentración de lactosa.

3.7.1.2 Pruebas de proceso

No se realizó ninguna prueba durante el proceso.

3.7.1.3 Pruebas de salida

Al finalizar el proceso se realizó la determinación de biomasa y actividad enzimática, a continuación se describe cada uno de ellos:

- **Determinación de biomasa**

Fermentación sumergida: Se determinó de acuerdo al método reportado por Izarra et al. (2010), por diferencia de peso seco, para ello el contenido de cada matraz se filtró en el papel filtro previamente pesado, luego fue secado en estufa a 28 °C durante 48 horas, a lo obtenido se le resta el peso del papel filtro. La biomasa se expresa en gramos por litro.

Fermentación por biopelículas: Se determinaron de acuerdo al método de Villena y Gutiérrez (2006), se filtró el contenido de cada matraz sobre papel filtro previamente pesado, la biomasa no adherida en el medio y la biomasa adherida al soporte (se comprimió con una bagueta el líquido absorbido por el soporte), luego el papel filtro fue secado a 28 °C durante 48 horas. Se determinó la biomasa por diferencia de peso con el soporte y el papel filtro.

Fermentación con células inmovilizadas: La biomasa obtenida de este tipo de fermentación por bibliografía no aumenta, la biomasa inicial inmovilizada que se coloca en los matraces es la misma al final.

- **Determinación de la actividad enzimática**

La actividad de celulasa total fue determinada a partir del líquido filtrado después de la biomasa por el ensayo de actividad sobre papel de filtro (FPA) (la reacción se puede ver en el Anexo 17), de acuerdo al método descrito por Mandels (Mandels, 1975; Ghose, 1987). Una Unidad Internacional (UI) de enzima se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de glucosa por minuto.

Se prepararon diluciones 1/5 y 1/10 de la muestra de enzima (1 mL de enzima + 4 mL de tampón acetato y 1 mL de enzima + 9 mL de tampón acetato), luego se determinó la actividad enzimática según se muestra en la siguiente Tabla 12.

Tabla 12. Soluciones para la determinación de la actividad enzimática

Reactivos	BR	BPF	M	BM
Enzima diluida (mL)	-	-	0.5	0.5
Tampón acetato 50mM, pH 4.8 (mL)	0.5	0.5	1	1
Se incubaron los tubos en baño maría a 50 °C por 5 minutos				
Papel filtro (1 x 6 cm) (unidad)	-	1	1	-
Se incubaron los tubos por 1 hora en baño maría a 50 °C				
Reactivo DNS (mL)	3	3	3	3

BR (Blanco Reactivo), BPF (Blanco Papel Filtro), M (Muestra), BM (Blanco Muestra) son la codificación de los tubos de ensayo y cada uno de ellos se realizó por duplicado.

Después de haber adicionado el reactivo DNS, se colocó en baño de agua hirviente todos los tubos durante 5 minutos, para cortar la reacción inmediatamente se enfriaron los tubos en agua corriente, luego se adicionaron 5 ml de agua destilada a cada tubo de ensayo, se mezclaron bien los tubos con un vórtex y se procedió a leer en el espectrofotómetro a 540 nm contra el blanco reactivo (BR).

Se calculó la concentración de glucosa en los tubos BPF, BM y M utilizando la curva estándar o la ecuación de regresión lineal obtenida previamente (Anexo 2), si los valores de la absorbancia de la muestra se encontraran fuera del rango de la curva estándar, se realizaran otras diluciones.

La concentración de glucosa estaría dada de la siguiente manera:

$$\text{Concentración de glucosa} = M - (\text{BM} + \text{BPF})$$

Una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de glucosa por minuto. La actividad de la celulasa se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\text{Celulasas (U/mL)} = \text{Concentración de glucosa} \times 0.38 \times \text{factor de dilución}$$

Dónde: 0.38 es un factor para obtener el número de μmoles de glucosa formados en un minuto.

3.7.2 Instrumentos de investigación

En la tabla 13, se detallan los equipos, materiales y reactivos utilizados para la ejecución de los ensayos antes mencionados.

Tabla 13. Descripción de equipos, materiales y reactivos

EQUIPOS DE LABORATORIO		
EQUIPO	FABRICANTE Y MODELO	CARACTERÍSTICAS
Agitador mecánico orbital (cocinilla)	CAT – M 12	Velocidad de rotación: Min.: 60 rpm (376.99 rad. Min-1) Máx.: 1600 rpm (10053.1 rad. min-1) Temperatura continuamente ajustable: 40 – 330 °C.
Agitador (vórtex)	CAT – VM2	Velocidad de rotación: Min.: 400 rpm (2513.27 rad. min-1) Máx.: 2800 rpm (17592.92 rad. min-1)
Autoclave vertical (cap. 30-35 litros)	FAMAREL – FV 3035	Acero inoxidable (304), Potencia 1.6 KW, Voltaje 220 VAC 60HZ
Balanza Analítica (cap. g)	EXPLORER de OHAUS – E12130	Calibración interna, Max. 210 gs, D=1 mg. Temp. 10 °C, Salida RS 232 bidireccional SERIE: C033015332
Balanza digital (cap. 300g)	TRAVELER de OHAUS – TA302	Lectura mínima 0.1 g, margen de error 0.01g.
Baño María	MEMMERT	Rango de temperatura de trabajo en °C: Al menos 5 por encima de la temperatura ambiente hasta +95 con nivel de cocción adicional (100). Resolución del indicador/precisión de ajuste: 0.1 °C hasta +99.9 °C / 1°C a partir de +100°C. Vol. 14 litros.
Bomba de vacío	LESCO – REF: ME 2 NT	Max. Resistencia (contrapresión) (EX) bar 2, Capacidad de motor kw 0.18, Velocidad nominal 50/60

		Hzmin-11500/1800, Peso kg 10.2 Nivel de ruido a 50 Hz.
Espectrofotómetro	I.C.T : MODELO 6405	Rango de longitud de onda: 320 a 1100 nm (modelo Visible 6400) 190 a 1100 nm (modelo UV- Visible 6405), Resolución 0,1 nm., Stray light (luz difusa): menor de 0,05% T a 340 nm y 220 nm el modelo UV-Visible, Precisión fotométrica + 1nm, Rangos de medida: -0,3 a 3A / 0 a 199,9%T / - 300 a 9999 C, Factor de 0 a 9999, Ruido fotométrico: 1%, Estabilidad fotométrica 0,001A/hora, Peso: 15 kg.
Estufa	MEMMERT	Rango de temperatura: 5 a 80°C Volumen interior: 20 litros Humedad: 40 a 90 % H.R.
Horno microondas	SAMSUNG	Volumen: 5 litros Medidas: 27.2x47x38 cm Pantalla controlador táctil y LED
Microscopio	NITLAB	Cuatro objetivos: de 4, 10, 40 y 100x de aumento, planos cromáticos Platina deslizable x-y con micas y macrofocalización y filtros d luz Lámpara halógena de 6V Energía:220-230 VAC 60 HZ
pH-metro	CORNING	Rango: 1 a 14 Electrodo calometrado Pantalla LED y controlador táctil Energía: 220-230 VAC Rango de temperatura: <30°C
Refrigeradora	MABE	De dos puertas, con sistema antifrost Volumen: 450 litros Peso: 73 kg Humedad óptima: 70%

Vórtex	NITLAB	Capacidad: 5-300 rpm Energía: 220-230 VAC 60HZ Adaptador de goma para tubos de vidrio y control mecánico
MATERIALES DE VIDRIO		
Descripción	Marca	
Asa de vidrio triangular	LMS-Germany	
Cámara de Neubauer	MARIENFELD	Profundidad de cámara 0.1 mm, área 0.0025 mm ²
Fiolas de 50 mL	LMS-Germany	
Láminas porta y cubre objeto	PEARL	
Matraz Erlenmeyer (50 ,250 y 500 mL)	PYREX, BOECO, KIMAX	
Matraz Kitasato	SCHOTT DURAND	
Pipetas graduadas (2,5,10 mL)	KIMAX, LMS GERMANY	
Placas de vidrio Petri	NORMAX, SCHOTT DURAND	
Probeta (50, 100 mL)	BOECO, KYNTEL	
Sistema de filtración	SIGMA	
Termómetro	BOECO	
Tubos de ensayo	PYREX	
Tubos de ensayo con tapa rosca (10 mL)	PYREX	

Vaso precipitado (80, 250, 500 y 1000 mL)	BOECO, KIMAX	
REACTIVOS		PUREZA
Acetato de sodio anhidro	SIGMA	99%
Ácido 3,5 dinitrosalicílico	SIGMA	98 %
Ácido acético glacial	MERCK	100 %
Ácido clorhídrico	J.T.BAKER	Valor de Grado ACS,ISO,Reag. Ph Eur
Agar agar	MERCK	Purificado y libre de inhibidores microbiológicos.
Agua destilada	AQUALITY	Purificada
Alcohol etílico		96° GL
Alginato de sodio	MERCK	98% de pureza
Cloruro de amonio	MERCK	99.99%
Cloruro de calcio dihidratado	MERCK	Valor de Grado FCC, E 509
Cloruro de sodio	EMSAL	99%
Cloruro férrico	MERCK	Valor de Grado ACS, R eag. Ph Eur
Fenol (disuelto a 50 °C)	RIEDEL-DE HAEN	En cristales
Fosfato de potasio monobásico	MERCK, BAKER	99 %
Hidróxido de sodio	MERCK	98%
Lactosa anhidra	SIGMA	99%
Metabisulfito de sodio	RIEDEL-DE HAEN	97%
Peptona	MICROGEN	90 %
Sulfato de magnesio heptahidratado	SIGMA	99%
Sulfato de zinc heptahidratado	SIGMA, SCHARLAU	99%
Tartrato de sodio y potasio	MERCK	Valor de Grado ACS,ISO,Reag. Ph Eur
Úrea	MERCK	Valor de Grado ACS,Reag. Ph Eur

Medio de cultivo

- Agar Papa Dextrosa (PDA) (ver Anexo 1).

Otros materiales usados en laboratorio

Tabla 14. Otros materiales

1. Algodón	10. Guantes de látex
2. Asa de col (Asa bacteriológica)	11. Jeringas de plástico estéril
3. Bolsas de polietileno	12. Magneto SPINBAR
4. Bombilla de succión <i>ISOLAB</i>	13. Mascarillas
5. Cinta de embalaje	14. Membrana de filtro 0,2 μm GE Healthcare Life Sciences
6. Embudo	15. Papel filtro N° 40 Whatman
7. Frascos ámbar	16. Pinza
8. Gorra	17. Pissetas
9. Gradillas	18. Matriz de sujeción (tela poliéster)

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Descripción de los resultados

4.1.1 Formulación del medio de producción con suero de leche

Para realizar la formulación del medio de producción con suero de leche, se realizó la determinación de la concentración de lactosa por el método de azúcares reductores con ácido dinitrosalicílico (DNS) (ver la determinación de lactosa, pág. 46), y se midió el pH. En la Tabla 15, se aprecia los valores respectivos.

Tabla 15. Concentración de lactosa del suero de leche

ITEM	CARACTERÍSTICAS	VALORES
1	Lactosa	35.6 ± 0.3 g/L
2	pH	5.9 ± 0.1

Los valores son las medias de dos replicas \pm desviación estándar.

Una vez determinado la concentración de la lactosa del suero de leche por el método de azúcares reductores con ácido dinitrosalicílico (DNS), se procedió a sustituir la concentración de lactosa en polvo del medio de producción de Duff (1988) (tomado de Izarra et. al, 2010) (ver metodología del medio de producción, pág. 44), donde se observa que la concentración de lactosa del medio de producción es de 10 g/L, el suero de leche contiene 35.6 g/L, entonces se realizó los siguiente:

- Se requerían preparar medios de producción de 70 mililitros cada uno, si se necesita 10 gramos de lactosa en polvo para preparar 1000 mL de medio de producción, para 70 mililitros se necesita 0.7 gramos de lactosa en polvo.
- Considerando que el suero de leche contiene 35.6 gramos de lactosa por 1000 mililitros, y se necesita 0.7 gramos de lactosa, se separó 19.66 mililitros de suero de leche y se aforo a 70 mililitros con agua destilada, es decir se sustituyó la concentración de lactosa y una parte del agua del medio de producción. Luego de esto se agregaron el resto de reactivos y se verificó que el pH sea 5.5, el pH se reguló con ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH).

Entonces para 1 litro de medio de producción, se necesitará de 280.9 mililitros de suero de leche, 719.10 mililitros de agua destilada y el resto de los reactivos de la formulación de Duff (1988).

4.2 Evaluación del medio de producción con suero de leche

La Tabla 16, muestra las cantidades máximas de la actividad enzimática, biomasa y lactosa residual en los tres tipos de fermentaciones.

Tabla 16. Comparación de la actividad enzimática, biomasa y lactosa residual

Tratamientos (Tipos de fermentaciones)	Biomasa (g/L)	Lactosa residual (g/L)	Actividad enzimática (U/L)
T3 (Inmovilizado)	0 ± 0^a	0.415 ± 0.07^a	768 ± 132^a
T2 (Biopelículas)	1.7 ± 0.26^b	0.055 ± 0.03^b	102 ± 55^b
T1 (Sumergido)	0.74 ± 0.01^c	0.009 ± 0.004^b	17 ± 7^b

Los valores son las medias de tres replicas \pm desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas con un 95% de confianza ($p = 0.05$).

Los resultados obtenidos de las tres repeticiones de la producción de biomasa, lactosa residual y actividad enzimática se ven en el Anexo 13, estos fueron sometidos a los análisis estadísticos ANVA y Tukey con un nivel de significancia de 0.05 para los tres tipos de fermentaciones, los cuales permitieron establecer diferencias significativas entre ellos y agruparlos de acuerdo a los valores obtenidos (ver Anexo 4, 5 y 6).

4.2.1 Producción de biomasa total

En la Figura 15, se muestra la producción de biomasa en las tres fermentaciones, donde se evidencia diferencias estadísticamente significativas (ver Anexo 4).

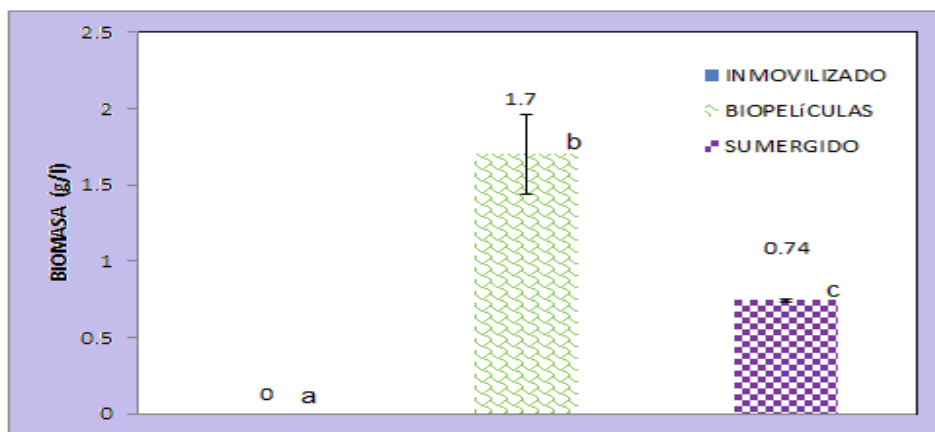


Figura 15. Biomasa en las tres fermentaciones.

La mayor producción de biomasa fue de 1.7 g/L en la fermentación por biopelículas (T2), la fermentación sumergida (T1) tuvo de 0.74 g/L de biomasa total y la fermentación con células inmovilizadas (T3) no tuvo producción de biomasa.

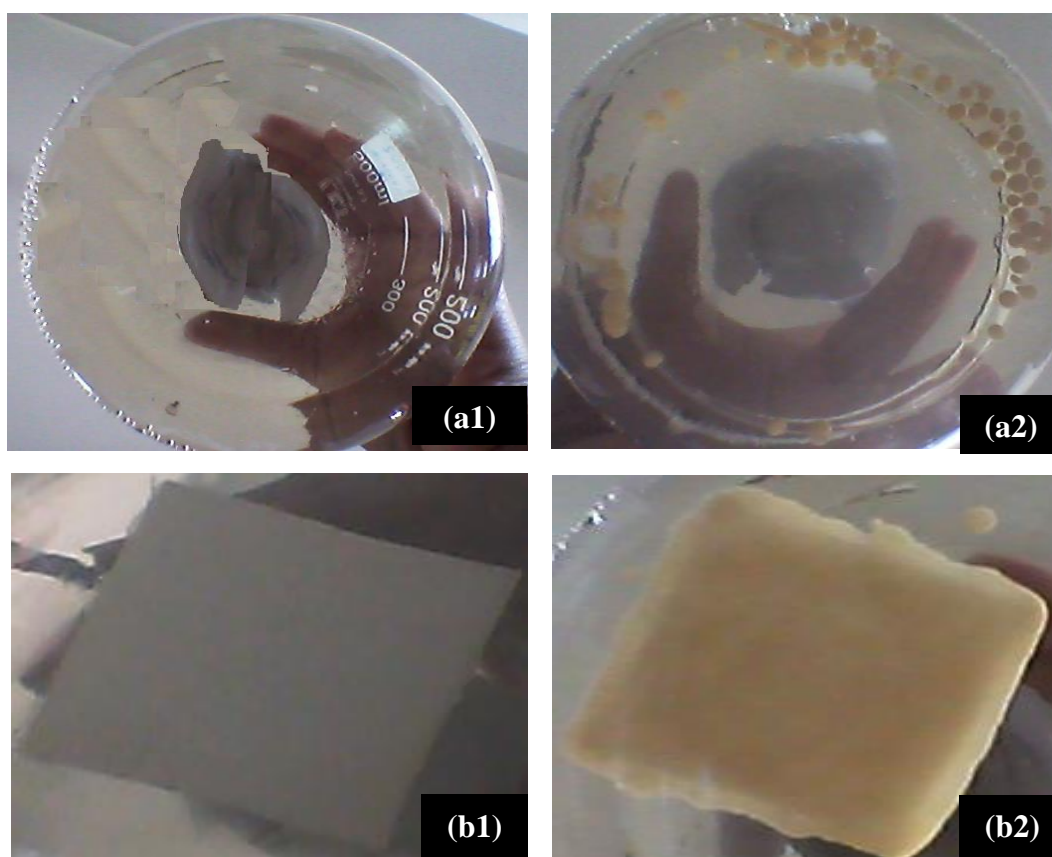


Figura 16. Formación de biomasa de *Aspergillus niger*, Fermentación sumergida (T1) (a1) 0 horas y (a2) 72 horas, Fermentación por biopelículas (T2) (b1) 0 horas y (b2) 72 horas.

4.2.2 Lactosa residual

En la Figura 17, se muestra que la lactosa residual disminuyó en los tres tipos de fermentaciones hasta las 72 horas de fermentación, donde se evidencia diferencias estadísticamente significativas (ver Anexo 5).

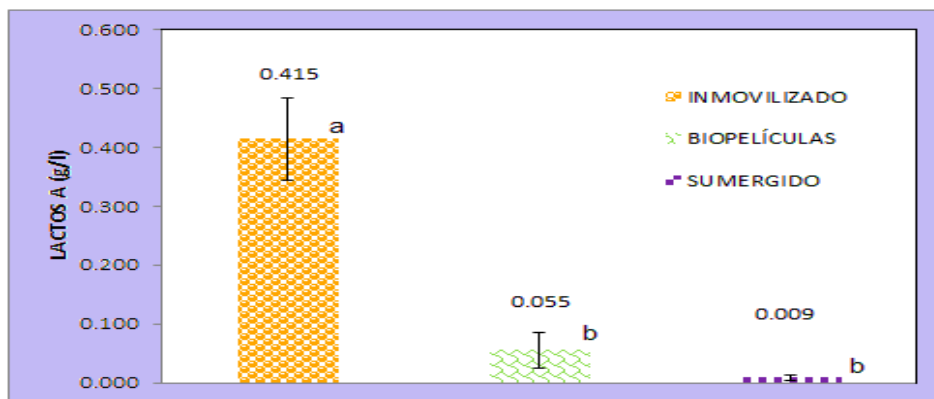


Figura 17. Lactosa residual en las tres fermentaciones.

4.2.3 Actividad enzimática

La Figura 18, se muestra la actividad enzimática en los tipos de fermentaciones, donde la máxima actividad enzimática fue en la fermentación con células inmobilizadas (T3) con un total de 768 UI/L, seguido por la fermentación por biopelículas (T2) de 102 UI/L y la fermentación sumergida (T1) de 17 UI/L, estos se obtuvieron de promediar 3 repeticiones (ver anexo 13).

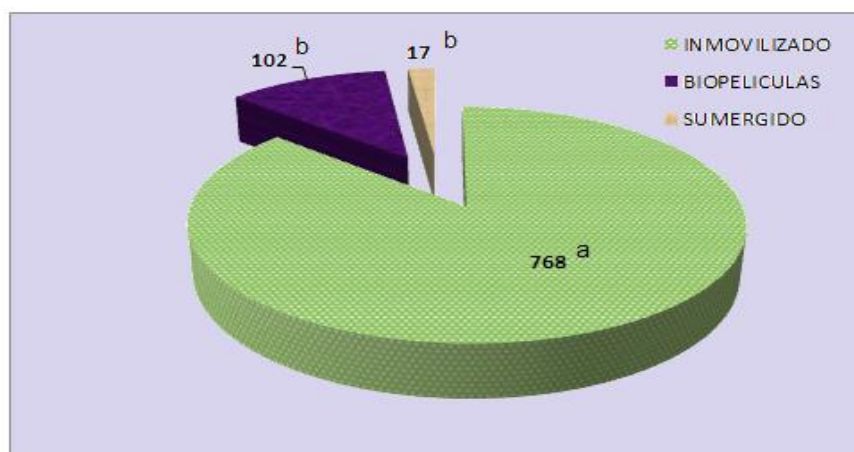


Figura 18. Actividad enzimática (UI/L) en las tres fermentaciones.

Las tres fermentaciones analizadas son diferentes estadísticamente, de acuerdo a sus medias se agrupan homogéneamente en dos grupos, el primero, la fermentación con células inmobilizadas (T3) estadísticamente diferente del segundo, que abarca la fermentación por biopelículas (T2) y la fermentación sumergida (T1) estos dos siendo iguales estadísticamente (ver Anexo 6).

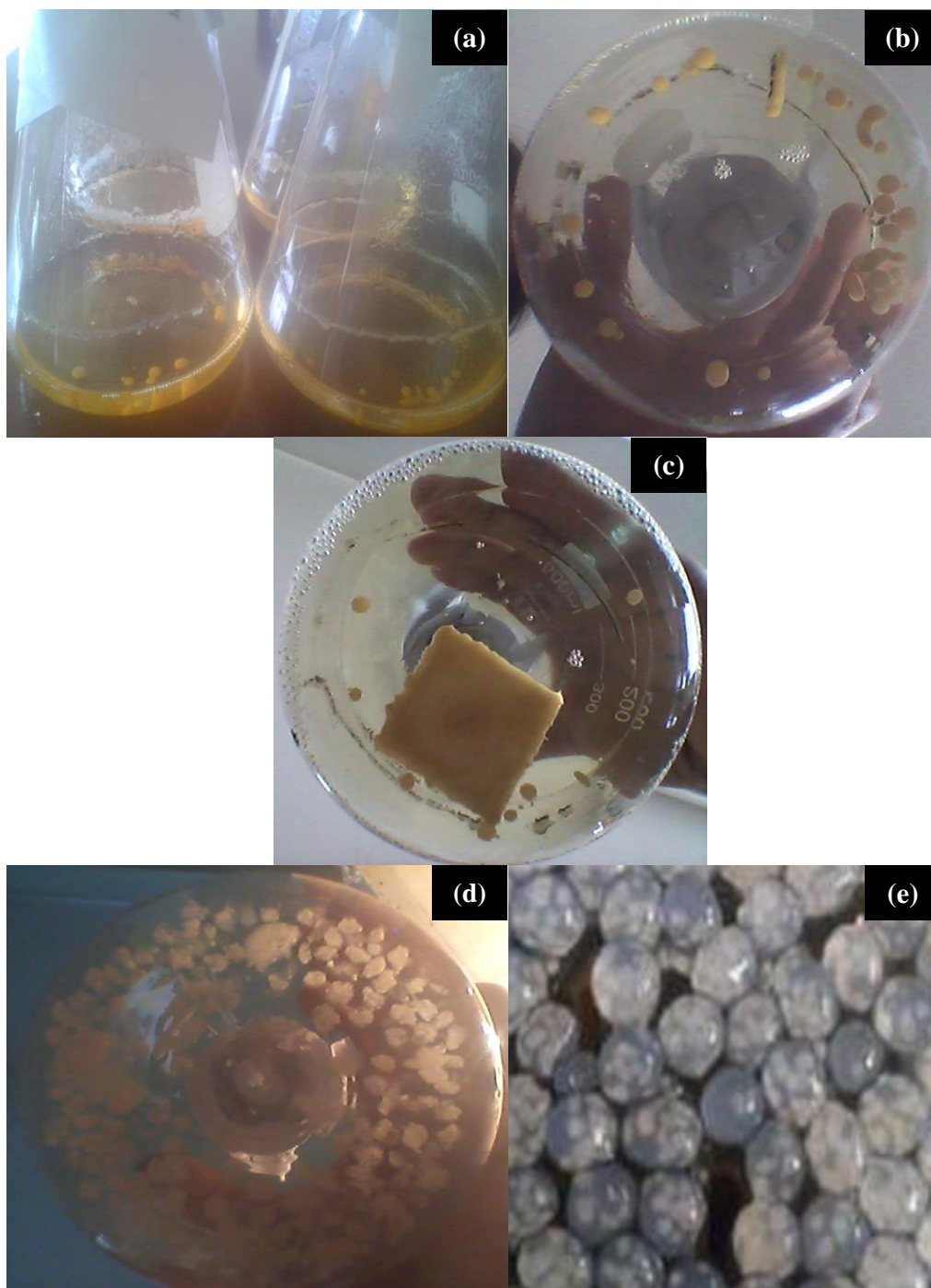


Figura 19. Producción de celulasas por la fermentación sumergida (T1) (a) vista frontal, (b) vista inferior; por la fermentación por biopelículas (T2) (c) vista inferior; y por la fermentación con células inmobilizadas (T3) (d) vista inferior, (e) vista de las esferas de alginato.

En la Figura 20 se muestra el diámetro aproximado de las esferas de alginato formadas para la fermentación por inmovilización

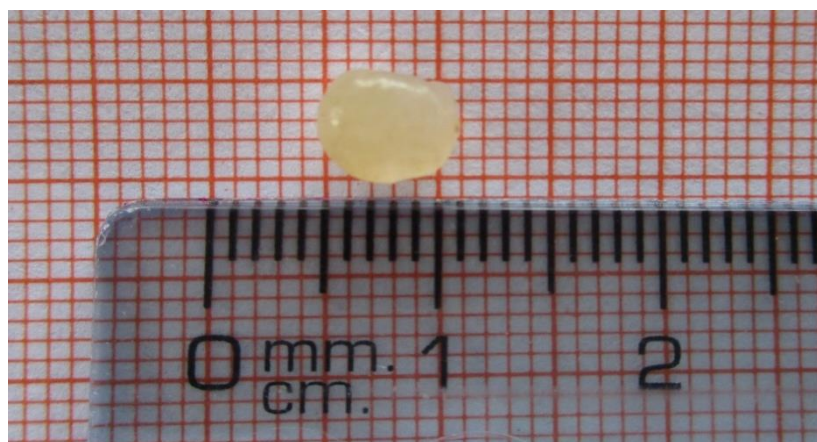


Figura 20. Esferas de alginato de la fermentación con células inmovilizadas, 5 mm de diámetro.

4.2.4 Rendimiento y productividad de la enzima

El rendimiento y los parámetros de productividad máximos calculados de la actividad enzimática se muestran en la Tabla 17, donde se observan diferencias estadísticamente significativas para cada rendimiento y productividad sobre las tres fermentaciones.

Tabla 17. Comparación del rendimiento y los parámetros productivos de la actividad enzimática.

Tratamientos (Fermentaciones)	$Z_{AE/B}$ (UI/g)	$Z_{AE/L}$ (UI/g)	$Z_{B/L}$ (g/g)	U_{AE} (UI/h)	U_B (g/h)	U_L (g/h)
T3-Inmovilizado	0 ^a	1850 ± 1 ^a	0 ^a	10.7 ± 1.83 ^b	0 ^a	0.0058 ± 0 ^b
T2-Biopelículas	63.8 ± 39 ^b	1849 ± 4.9 ^a	41 ± 31.6 ^{ab}	1.42 ± 0.76 ^a	0.02 ± 0 ^b	0.00077 ± 0 ^a
T1-Sumergido	23 ± 9 ^{ab}	1856 ± 29 ^a	89 ± 37 ^b	0.24 ± 0.09 ^a	0.01 ± 0 ^c	0.00013 ± 0 ^a

Rendimiento: $Z_{AE/B}$ (UI/g) = Actividad enzimática (UI/L) / biomasa formada (g/L); $Z_{AE/L}$ (UI/g) = Actividad enzimática (UI/L) / sustrato consumido (lactosa) (g/L); $Z_{B/L}$ (g/g) = biomasa formada (g/L) / sustrato consumido (lactosa) (g/L), Parámetros productivos: U_{AE} = productividad volumétrica de la actividad enzimática, U_B = productividad volumétrica de la biomasa, U_L = productividad volumétrica de la lactosa. Los valores representan tres repeticiones ± desviación estándar. La misma letra dentro de una columna significa que no son diferentes estadísticamente con un 95% de confianza ($p = 0,05$).

Los resultados que se reportaron son obtenidos de tres repeticiones para cada parámetro como se ven en el Anexo 13, estos fueron sometidos a los análisis estadísticos ANVA y seguido de un Tukey con un nivel de significancia de 0.05 para los tres tipos de fermentación, los cuales

permitieron establecer diferencias significativas entre ellos y agruparlos de acuerdo a los valores obtenidos (ver Anexo del 7 al 12).

4.2 Discusión de resultados

4.2.1 Formulación del medio de producción con suero de leche

La concentración de lactosa del suero de leche fue de 35.6 ± 0.3 g/L, por debajo de la concentración de lactosa para el suero dulce de leche reportado por Hernández-Rojas y Vélez-Ruiz (2014) siendo de 46–52 g/L de lactosa, pudiendo compararse con el suero ácido que tiene una concentración de lactosa de 38 a 52 g/L reportado por Mota-Correa y Mosquera (2015). Asimismo, el suero evaluado tuvo un pH de 5.9 ± 0.1 similar al suero dulce descrito por Burgos (2015), donde considera que el pH del suero dulce tiene un rango de 5.8 a 6.6.

La menor concentración de lactosa en el suero puede ser debido a los cultivos lácticos, en la elaboración del queso fresco andino de la empresa Agroindustrial el Tambo, se le agrega cultivos lácticos como parte de su procesamiento, al respecto Almaza y Barrera (2012) mencionan que los cultivos lácticos producen ácido láctico por fermentación de la lactosa, esto mejora la textura de los quesos, produce compuesto volátiles, aseguran la su calidad y uniformidad, Riofrío (2014) determinó la concentración de lactosa del suero de leche fresco que en su proceso se le agregaban cultivos lácticos que contenían cepas como *Lactococcus lactis* y *Leuconostoc mesenteroides*, encontrando que el suero obtenido de este queso contenía 4.3 % de lactosa lo que representa a 43 g/L siendo mayor a lo encontrado en este trabajo.

El pH del suero de leche podría estar dado por la presencia de ácido láctico u otros ácidos producidos por microorganismos, y la concentración de lactosa por la conversión de lactosa a ácido láctico por microorganismos presentes en la adición de cultivos lácticos, como mencionan Riofrío (2014) y Burgos (2015).

Los datos indican que el suero de leche contiene lactosa suficiente para la formulación del medio de producción, para ser utilizado como fuente de carbono para el crecimiento del *Aspergillus* durante las fermentaciones.

4.2.2 Evaluación del medio de producción con suero de leche

4.2.2.1 Producción de biomasa total

Como se puede apreciar en la Figura 16-b, la producción de biomasa de la fermentación por biopelículas (T2) se ve reflejada en la formación de un compacto y esponjoso pellet en la matriz de sujeción que se consolida a las 72 horas, de acuerdo a Izarra et al. (2010) y Sánchez (2017) el aumento de la biomasa inicia con la adhesión de las hifas del *Aspergillus niger* y continua con su reproducción llamada fase vegetativa, esto lo explican Gutiérrez-Correa y Villena (2003b), donde indican que la adhesión es favorecido por el carácter hidrofóbico del *Aspergillus niger* por su producción de hidrofobinas intracelulares en esporas y micelios, y

también indican que la fase de maduración de la biomasa se da entre las 48 y las 120 horas. La fermentación sumergida (T1) se realiza sin soporte y las esporas del *Aspergillus niger* no pueden adherirse, aquí las hifas se encuentran dispersas en el recipiente agitado con nutrientes disueltos, de acuerdo a Sánchez (2017) se juntan entre ellos formando pellets como soporte para sobrevivir (Figura 16-a). En la fermentación con células inmovilizadas (T3) no hubo producción de biomasa, debido a que el alginato de sodio inmoviliza a las células quedando atrapadas en forma de esferas por el procedimiento que se menciona (ver metodología experimental del tratamiento 3), según menciona Jiménez et al. (2011) se detiene la producción de biomasa.

Según lo reportado por Cortez (2015) la producción de biomasa por *Aspergillus niger* (aislado de los suelos de Contamana) en la fermentación sumergida (T1) durante 48 horas de fermentación fue de 2,2 g/L, mayor a lo encontrado en este trabajo para este tipo de fermentación, así mismo Villena y Gutiérrez (2006), reportaron de 2.5 ± 0.4 g/L de biomasa obtenido de la fermentación sumergida (T1), mayor a lo nuestro para esta fermentación, sin embargo Izarra et al. (2010), reportaron concentraciones de biomasa de 0.62 ± 0.03 g/L para un inóculo de 10^4 esporas por mililitro y de 1.05 ± 0.07 g/L de biomasa para un inóculo de 10^8 esporas por mililitro, siendo congruente con nuestros datos de 0.74 g/L de biomasa para esta fermentación con un inóculo de 10^6 esporas por mililitro y con un tiempo de fermentación de 72 horas, indicado como producción máxima y óptimo por De la Cruz-Martorell et al. (2016); para la fermentación con adhesión Villena y Gutiérrez (2006), reportaron de 1.0 ± 0.01 g/L de biomasa, menor a lo nuestro siendo de 1.7 g/L para esta fermentación, según nuestros resultados indica que la fermentación por biopelículas (T2) genera mayor producción de biomasa que la fermentación sumergida (T1), lo que es contrario con lo encontrado por Villena et al. (2001) y Villena y Gutiérrez (2006). Los resultados que difieren a la cantidad encontrada de biomasa, pueden estar relacionadas con la naturaleza del *Aspergillus*, la concentración del inóculo (a mayor esporas por ml, mayor cantidad de biomasa), la fuente de carbono, el tiempo incubación, así como también el tipo de fermentación que se elija.

4.2.2.2 Lactosa residual

El consumo de lactosa no fue completo en las tres fermentaciones, y se observa que no existe diferencia significativa entre la fermentación sumergida (T1) y la fermentación por biopelículas (T2), la concentración de lactosa inicial en el medio de producción fue de 10 g/L para cada tratamiento, el *Aspergillus niger* consumió el 99.9 % de lactosa en la fermentación sumergida (T1), en la fermentación con células inmovilizadas (T3) consumió el 96 % de lactosa, Villena y Gutiérrez-Correa (2006), encontraron para la fermentación sumergida (T1) 6.2 ± 1.5 g/L y para la fermentación por biopelículas (T2) de 5.5 ± 0.2 g/L, siendo un 62 % y 55 % de consumo de lactosa respectivamente, esto indica mayor lactosa residual, y según Izarra et al. (2010) encontraron para la fermentación sumergida (T1) 5.4 ± 0.050 g/L y

2.6±0.001 g/L de lactosa residual para inóculos de 10⁴ y 10⁸ esporas por mililitro respectivamente, esto nos indica que el *Aspergillus niger* no consumió por completo la lactosa que se utilizó para los medios de producción de estos estudios, lo favorable según los datos encontrados en este trabajo el *Aspergillus niger* utilizó hasta el 95% de la lactosa proveniente del suero de leche el cual forma parte del medio de producción, se puede indicar que la lactosa del suero como fuente de carbono es asimilable por el microorganismo para su producción de energía y esta fuente de carbono no será un factor limitante para la producción de la enzima.

4.2.2.3 Actividad enzimática

Los resultados señalan la presencia de actividad enzimática en un medio de producción con suero de leche, inoculado con *Aspergillus niger* en los tres fermentaciones debido a la lactosa presente en el medio de producción que actúa como fuente de carbono. La producción enzimática de celulasas es altamente influenciada no solo por la disponibilidad de los nutrientes y el sustrato carbonado, Tamariz (2014), al respecto menciona que también se da por las condiciones del medio de producción, tales como: pH del medio, concentración de inductores o represores, temperatura y tiempo de fermentación, el suero de leche posee nutrientes que el *Aspergillus niger* puede utilizar, el más importante es la lactosa, Ramírez (2012) indica que el suero por su composición puede ser utilizado en un gran número de procesos fermentativos.

La actividad enzimática evaluada en los tres tipos de fermentación (ver Figura 19), la mayor actividad mostrada fue de la fermentación con células inmovilizadas (T3) con un valor de 768 ± 132 UI/L, Cortez (2015) reportó una mayor actividad producida por *Aspergillus niger* a un pH 7,4 con 1400 UI/L y para otros hongos como *Trichoderma curvata* y *Streptomyces sp.* presentaron actividades enzimáticas aún más altas, de 2720 y 2490 UI/L para la endoglucanasas y exoglucanasas respectivamente, en otro estudio utilizando bagazo de caña otro sustrato como fuente de carbono Llenque et al., (2015) obtuvieron 25 UI/L valor mucho menor a actividad encontrada en este trabajo, la actividad enzimática de la fermentación con células inmovilizadas (T3) representó hasta un 87% más alto que lo producido con la fermentación por biopelículas (T2) y hasta un 98 % mayor que la fermentación sumergida (T1), Villena y Gutiérrez (2003), realizaron el crecimiento de *Aspergillus niger* por la fermentación por biopelículas (T2) y utilizaron como soporte poliéster, generando la formación de una biopelícula, obteniendo altos títulos enzimáticos, permitiendo al mismo tiempo la inmovilización pasiva del hongo, porque la biomasa se seguirá formando en cada reutilización, para la fermentación sumergida (T1) (ver Figura 20) Mora (2015), menciona que las hifas que crecen del *Aspergillus niger* buscan los nutrientes disponibles del medio para su crecimiento y producción de la enzima.

La fermentación con células inmovilizadas (T3) en alginato (ver Figura 19), presenta un gran potencial para aumentar la producción de celulasas, según Nava et al. (2016) las esferas no quedan aisladas del sustrato y de la formación del metabolito porque tienen poros, también brinda el poder de reutilizar las esferas (biomasa encapsulada) en otros ciclos de fermentación sin el aumento de biomasa, facilitando la recuperación de los metabolitos, Alcarráz (2010) inmovilizó esporas y evaluó la producción de celulasas en un medio de producción a partir de bagazo de caña en forma de una fermentación en estado sólido, la poca actividad enzimática de la fermentación con células inmovilizadas (T3) puede ser debido al diámetro de las esferas, Jiménez, Zarkovic, Villena y Gutiérrez (2011) estudiaron la producción de alcohol con levadura inmovilizada en alginato y evaluaron la influencia del diámetro de las esferas, concluyendo que a mayor diámetro de las esferas inmovilizadas mayor producción de alcohol, se podría decir que la baja actividad obtenida de la fermentación con células inmovilizadas (T3) fue influenciado por el diámetro que fue de 5 mm siendo de mayor densidad celular (Figura 20).

Haciendo la comparación de la actividad enzimática obtenida de los tres tipos de fermentación, se observa que depende de las fermentaciones con *Aspergillus* para la producción de celulasas, estas enzimas extracelulares son producidas en la parte exterior de las membranas celulares de los microorganismos por lo que son de fácil recuperación, según Rendueles y Díaz (2014) para la producción de metabolitos mediante procesos aerobios el tratamiento más estudiado es la fermentación sumergida (T1), sin embargo la producción máxima de las enzimas celulasas fue de la fermentación con células inmovilizadas (T3) de 768 ± 132 comparado con la fermentación sumergida (T1) y la fermentación por biopelículas (T2).

4.2.2.4 Rendimiento y productividad de la enzima

Como se observa en la Tabla 18, en el rendimiento de la enzima respecto a la biomasa, no existe diferencias significativas estadísticamente entre la fermentación con células inmovilizadas (T3) y la fermentación sumergida (T1), teniendo el mayor rendimiento de la enzima por biomasa formada con respecto a esta fermentación y la biomasa nula de la fermentación con células inmovilizadas (ver Tabla 17), sin embargo entre esta última fermentación y la fermentación por biopelículas, existen diferencias estadísticamente significativas, el valor cero de $Z_{AE/B}$ (UI/g) indica que esta fermentación produjo enzimas celulasas por cero unidad de biomasa (ver Tabla 17), Villena y Gutiérrez (2006) encontraron que el rendimiento de la enzima respecto a la biomasa en fermentación sumergida es de 469 ± 68 UI/g mayor a nuestro datos obtenidos en los tres tipos de fermentaciones.

En el rendimiento de la enzima respecto al consumo de la lactosa no existen diferencias significativas estadísticamente entre las fermentaciones, considerándose el rendimiento en las tres fermentaciones iguales, según lo reportado por Arias, Bastida, Salgado y Zárata (2013) *Aspergillus niger* en la fermentación sumergida (T1) tuvo un rendimiento de la enzima respecto al sustrato con 39.94 UI/g sustrato en salvado de trigo por 24 horas de fermentación, por otra parte Campomanes de Lara, Morales, Zárata y Delgado (2015), obtuvieron para el sustrato de plátano y salvado con *Aspergillus niger* un rendimiento máximo de la actividad enzimática respecto al sustrato a los 7 días aprox. de 22 y 10 UI/g de sustrato respectivamente, estos datos mencionados son menores comparados con los obtenidos que se encuentran aproximadamente sobre los 1850 UI/g de lactosa, la actividad enzimática producida por la cantidad de sustrato consumido (lactosa) Z_{AEL} (UI/g), nos indica que depende del consumo de la fuente de carbono (sustrato) para la producción de enzimas, el de mayor rendimiento sería la fermentación con células inmovilizadas (T3) debido que no consumió toda la fuente de carbono, y el de menor rendimiento es de la fermentación sumergida (T1), debido que esta fermentación consumió el 99.9% de la lactosa del medio, para producir celulasas en cantidades menores a las otras fermentaciones.

En la Tabla 17, se puede observar, que la fermentación con células inmovilizadas (T3) y la fermentación sumergida (T1) son diferentes estadísticamente, debido que la fermentación con células inmovilizadas (T3) tuvo un mayor rendimiento de biomasa por consumo de lactosa (0 g/g), ello muestra que no existió producción de biomasa y un menor consumo de lactosa (ver Tabla 17), por otro lado la fermentación sumergida (T1) obtuvo un menor rendimiento de producción de biomasa con respecto al consumo de lactosa (89 ± 37 g/g), reflejando un mayor consumo de lactosa (ver Tabla 17).

Por otro lado Izarra et al. (2010) reportaron un valor superior de 16.4 UI/h cuando utilizo un inóculo de 10^6 esporas por ml en una fermentación por biopelículas con un medio que contenía lactosa en polvo, así mismo Villena y Gutiérrez (2006), reportaron para una fermentación por biopelículas de 27.4 ± 4.5 con un inóculo de 10^6 esporas por mL, lo que indica que la fermentación con células inmovilizadas (T3) tuvo una menor productividad con lo que reportaron, sin embargo tiene una mayor productividad de enzima comparado con la fermentación sumergida (T1) y la fermentación por biopelículas (T2) de este estudio. De acuerdo con los resultados de las fermentaciones la mayor productividad volumétrica de la actividad enzimática fue de la fermentación con células inmovilizadas (T3) con 10.7 ± 1.83 UI/h, con diferencias estadísticamente significativas con la fermentación por biopelículas (T2) y la fermentación sumergida (T1).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se evaluó la sustitución de la lactosa utilizando suero de leche para la formulación de un medio de producción para celulasas, por lo que, para 1 litro de medio de producción de necesita 280.9 mililitros de suero de leche, 719.10 mililitros de agua destilada y el resto de los reactivos de la formulación de Duff (1988).
- Se observó actividad enzimática en los tres sistemas de fermentación, utilizando *Aspergillus niger* y suero de leche como sustrato para la producción de enzimas celulasas, siendo la mayor actividad enzimática y lactosa residual la fermentación con células inmovilizadas (T3) con valores de 768 ± 132 UI/L y 0.415 ± 0.07 g/L respectivamente, mientras que la mayor producción de biomasa fue de la fermentación por biopelículas (T2) con 1.7 ± 0.26 g/L, por lo tanto, la fermentación con células inmovilizadas representó el de mayor producción de enzimas.
- La fermentación con células inmovilizadas (T3) tuvo la más alta productividad volumétrica de producción de enzimas por hora de fermentación, siendo de 10.7 ± 1.83 UI/h, por lo tanto, es la fermentación más productiva con respecto a la fermentación por biopelículas (T2) y la fermentación sumergida (T1).

5.2 Recomendaciones

- Para la preparación de 1 litro de medio de producción con suero de leche, se recomienda utilizar 280.9 mililitros de suero de leche, 719.10 mililitros de agua destilada y el resto de los reactivos de la formulación de Duff (1988).
- Una mayor producción de enzimas celulasas se obtiene utilizando la fermentación con células inmovilizadas.
- La mayor productividad de la enzima por hora se alcanza con la fermentación con células inmovilizadas.
- Aprovechar el suero de leche de las industrias lácteas, como fuente de carbono para formular medios de producción para producir celulasas como una nueva alternativa de uso y no desecharlo como efluente.
- Realizar estudios para optimizar el proceso de la fermentación con células inmovilizadas (T3) para la producción de celulasas, así mismo realizar cinéticas de crecimiento celular (producción de biomasa), consumo de lactosa y actividad enzimática, para tener herramientas de escalamiento en biorreactores, para la máxima producción de celulasas con este tipo de fermentación.

- Evaluar la rentabilidad de producción de enzimas celulasas con la fermentación con células inmovilizadas (T3), después de su optimización.

Referencia Bibliografía

- Alcarraz, Curi M., Flores, P. A., y Godoy A. J. (2010). Producción de celulasas por inmovilización celular para el tratamiento de efluentes industriales lignocelulósicos. Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM. Lima, Perú.
- Almaza, F. y Barrera, E. (2012). Cultivo Láctico. Tecnología de Leche y Derivados. Recuperado de <http://www.docstoc.com/docs/115081499/CULTIVO-LACTICO>
- Almeida, K. E., Tamime, A. Y., & Oliveira, M. N. (2009). Influence of total solids contents of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Technology*, 42(2), 672–678.
- Álvarez (2011). Hongos. Microbiología General. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa, México D. F.
- Araujo, G. A., Monsalve, C. L., y Quintero, T. A. (2013). Aprovechamiento del lactosuero como fuente de energía nutricional para minimizar el problema de contaminación ambiental. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 4(2). Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Valledupar, Colombia.
- Arias-Orozco, P., Bastida-González, F., Salgado-Manjarrez, E. y Zárate-Segura, P. (2013). Producción de enzimas lignocelulolíticas en fermentación sumergida y sólida a partir de residuos sólidos orgánicos autores. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional. Departamento de Bioprocesos, Ticomán, México, D. F. 07340.
- Boggione, M. J., Allasia, M. B., Bassani, G., y Farruggia, B. (2016). Potential use of soybean hulls and waste paper as supports in SSF for cellulase production by *Aspergillus niger*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.
- Burgos I. V. (2015). Estudio investigativo del suero de leche y propuesta gastronómica. Trabajo de tesis para optar el título de administrador gastronómico. Quito, Ecuador.
- Campomanes-de Lara, E., Morales-Reyes, C., Zárate-Segura, P., y Salgado-Manjarréz, E. (2015). Producción de enzimas por fermentación sumergida a partir de residuos sólidos orgánicos con hongos para tecnologías limpias. *Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional*. Ticomán, México, D. F. 07340.
- Castro, V. J. (2016). Búsqueda preliminar de morfotipos fúngicos degradadores de sustratos celulósicos en residuos sólidos asociados a pañales desechables. Trabajo de tesis para optar el grado de ingeniero ambiental. Universidad Libre Facultad de Ingeniería Departamento de Ingeniería Ambiental. Bogotá.
- Codex alimentario - CODEX STAN 289-2011 Segunda edición.

- Cortez, C. B. (2015). Aislamiento de microorganismos productores de celulasas alcalinas de aguas termales y suelos de bosques de Contamana. Trabajo de tesis para optar el título profesional de Biólogo. Iquitos, Perú.
- Costa et al., (2009). Producción de enzima fitasa de *Aspergillus ficuum* con residuos agroindustriales en fermentación sumergida y sobre sustrato sólido. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(1), 73 – 83.
- Dashtban, M., Maki, M., Leung, K. T., Mao, C. & Qin, W. (2010). Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. *Crit. Rev. in Biotechnology*, 30(4), 302-329.
- De la Cruz-Martorell et al., (2016). Caracterización de enzimas celulasas de nuevas cepas fúngicas obtenidas a partir de bagazo de caña de azúcar. *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar*, 50(2), 35-42. Ciudad de la Habana – Cuba.
- Duff, J. (1988). Use of surfaceimmobilized Trichoderma in batch and fedbatch fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 31, 345-348.
- Elpidia P. E. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta disponibilidad. *Revista de Chile*, 40(4).
- Escudé (2007). Producción de ácido cítrico a partir de aguas residuales con altos contenidos de almidón mediante fermentación de *Aspergillus niger unigras* 0007 ASP HSA utilizando microorganismos libres e inmovilizados. Tesis para optar el título de ingeniero en ciencia y tecnología de alimentos. Coahuila - México.
- Fajardo et al. (2011). Inmovilización de células y enzimas. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 3 (6), México.
- Fernández, M. V., Jagus R. J. y Mugliaroli S. L. (2014). Effect of combined natural antimicrobial on spoilage microorganism and listeria innocua in a whey cheese. *Springer Science y Business Media*. New York.
- Fernández, M., Fornari, R., Mazutti, M., Oliveira, D., Ferreira, F., Cichoski, A., Cansian, R., y Treichel, H. (2009). Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. *Journal of Food Engineering*, 90(1), 119–123.
- Filip et al., (2012). Spectrophotometric Measurements Techniques for Fermentation Process: Base theory for uv-vis spectrophotometric measurements. University of Oradea, Hunday-Romania.
- Ganaie M. A., Lateef A. y Gupta U.S. (2014). Enzymatic trends of fructooligosaccharides production by microorganisms. *Appl. Biochem. Biotechnol*, 172 (4), 2143-2159.

- Gil M. J. (2015). Estudio de las β -glucosidasas del complejo celulítico de *Talaromyces amestolkiae*: Caracterización y aplicaciones biotecnológicas. Tesis doctoral para optar al grado de doctor. Madrid, España.
- Gracia, A. C., Iliná A., Arechiga C. E., Segura C. E., Belmares C. R., Michelena A. G., y Martínez H. J. (2016). Producción de lipasa a través de la fermentación por adhesión a superficies sobre los derivados de la caña de azúcar. *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar*, 50(1), 34-38. Ciudad de La Habana, Cuba.
- Gupta, K., Jana, A. K., Kumar, S., y Jana, M. M. (2015). Solid state fermentation with recovery of amyloglucosidase from extract by direct immobilization in cross linked enzyme aggregate for starch hydrolysis. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 4, 486-492.
- Gutiérrez-Correa y Villena (2003). Fermentación por adhesión a superficies: una nueva categoría fermentativa. *Revista peruana de biología* 10(2), 113 – 124.
- Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N. y Montoya D. (2015). Mecanismos de regulación de la hidrólisis enzimática de la celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*.
- Hernández y González (2002). Introducción al análisis instrumental. Editorial Ariel, S.A.: 1ª ed., pp 480, Barcelona, España.
- Hernández (2011). Inmovilización de microorganismos en esferas de alginato como protección contra condiciones adversas en un tratamiento de agua residual. Tesis para optar el grado de maestro en ciencias. La Paz Baja California Sur - México.
- Hernández-Rojas y Vélez-Ruíz (2014). Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. Departamento de ingeniería química, alimentos y ambiental, Universidad de las Américas Puebla. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8(2), 13-22. San Andrés Cholula, Puebla, México.
- Izarra, M. L., Santayana, M. L., Villena, G. K., y Gutiérrez-Correa, M. (2010). Influencia de la concentración de inóculo en la producción de celulasa y xilanasa por *Aspergillus niger*. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, XIII (2).
- Jiménez et al., (2011). Efecto de diámetro de esfera y densidad celular en la producción de etanol con levadura inmovilizada en alginato. *Rev. Colombiana de Biotecnología*, 13(1), 8-15.
- Jiménez, M. V., Zarkovic G. G., Villena G. K., y Gutiérrez-Correa M. (2011). Efecto de diámetro de esfera y densidad celular en la producción de etanol con levadura inmovilizada en alginato. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(1).

- Jung, D.U., Yoo, H.Y., Kim, S.B., Lee, J.H., Park, C., y Kim, S.W. (2015). Optimization of medium composition for enhanced cellulase production by mutant *Penicillium brasilianum* KUEB15 using statistical method. *J. Ind. Eng. Chem*, 25, 145-150.
- Llenque-Díaz, L. A., Muñoz R. M., Espejo V. E., y Moreno R. A. (2015). Producción de celulasas por *Aspergillus niger* a partir de bagazo de caña de azúcar en biorreactor aireado. Facultad Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo. *Ciencia y Tecnología*, 11(4), 39-49. Trujillo, Perú.
- Matute, L., Bertsch A. y Díaz I. (2014). Characteristics of enzymatic additives obtained from cultures *Aspergillus niger* ANM-1 in submerged and solid state. *Rev. Téc. Ing.*, 37(1), 48 – 56. Zulia.
- Méndez (2015). Aspergilosis. Laboratorio de Investigación Médica, Hospital de Especialidades C.M.N. Siglo XXI. Recursos en Micología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Miller y Rutzke (2003). Las espectroscopías de absorción y de emisión atómica. En Análisis de los alimentos, Suzanne Nielsen, 3ª ed., Editorial Acribia, S. A.: pp 470-492, Zaragoza, España.
- Miller, G. (1959). Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Mora, V. V. (2015). Evaluación de dos hongos filamentosos para la biosíntesis de celulasas a partir de residuos agroindustriales de mora (*Rubus adenotrichos*) mediante fermentación en medio sólido. Universidad de Costa Rica San José, Costa Rica.
- Motta-Correa y Mosquera (2015). Aprovechamiento del lactosuero y sus componentes como materia prima en la industria de alimentos. *Alimentech Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 13(1), 81 – 91. Florencia, Caquetá, Colombia.
- Muñi, A., Paez G., Faría, J., Ferrer, J. y Ramones, E. (2005). Eficiencia de un sistema de ultrafiltración/ nanofiltración tangencial en serie para el fraccionamiento y concentración del lactosuero. *Revista Científica* 15(4), 361–367.
- Muñoz, A. (2010). Determinación analítica de la enzima enzimática. En “el mundo de la biología”.
- Nava, R., Iliná A, Álvarez G. M. y Martínez H. J. (2016). Evaluation of *in vitro* digestibility of enzymatic microcapsules. *Agronomía Colombiana*, 34(1), 1465-1468.
- Nielsen, S. (2003). Análisis de los Alimentos. Tercera Edición. Editorial Acribia, S.A. España.
- Organizacion Mundial de la Salud (OMS) & Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) (2011). Leche y Productos Lácteos. Segunda edición. Roma.

- Parzanese, M. (2008). Procesamiento de Lactosuero. *Tecnología para Industria Alimentaria*. MINAGRI, Argentina. Recuperado de: http://www.alimentosargentinos.gov.ar/contenido/sectores/tecnologia/Ficha_13_Lactosuero.pdf.
- Percival, Z. Y., Himmel M. E., y Mielenz J. R. (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*, 24, 452–548.
- Prado, M. (2016). Optimización de la producción de enzimas celulasas obtenidas de hongos xilófagos de madera en descomposición. Universidad de Carabobo, Valencia.
- Ramírez, N. J. (2012). Aprovechamiento industrial de lactosuero mediante procesos fermentativos. Escuela de Ingeniería de Alimentos, Universidad del Valle, Cali, Colombia.
- Ray y Behera (2017). Solid state fermentation for production of microbial cellulases. *Biotechnology of Microbial Enzymes*. Odisha – India.
- Rendueles, M. y Díaz M. (2014). Biotecnología industrial. *Universidad de Oviedo*, 190(768).
- Riofrío, G. R. (2014). Caracterización de lactosuero proveniente de cuatro producciones de diferentes tipos de queso. Trabajo de tesis para optar el grado de Ingeniero en Alimentos. Quito – Ecuador.
- Ríos, M. N., Crespo, M. C., Terrazas, S. L. y Álvarez, A. M. (2007). Aislamiento de cepas anaeróbicas termófilas productoras de celulasas y hemicelulasas implicadas en la producción de Bioetanol mediante técnicas de cultivo y aislamiento tradicionales y no tradicionales, 15(1). La Paz.
- Sánchez, F. A. (2017). Producción de la enzima β -glucosidasa en cultivo fúngico sólido con follaje de *flourensia cernua* usando un diseño experimental box-behnken. Trabajo de Tesis para optar el título de Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Saltillo, México.
- Serva (2014). Obtenido de Electrophoresis. GMBH. Cellulases. Recuperado de: <http://fe.rmutl.ac.th/2012wp-content/uploads/Cellulase.pdf>
- Singhania, et al. (2017). Cellulases. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products.
- Sirisha, et al. (2016). Enzyme immobilization: an overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes. *Advances in Food and Nutrition Research*. Mumbai – India.
- Skoog, Douglas, Holler, James, Crouch y Stanley (2008). PRINCIPIOS DE ANALISIS INSTRUMENTAL. Editorial Cengage Learning Editores. 6ª ed. México.

- Solís, S. N. (2015). Evaluación Cinética de la enzima celulasa obtenida de monilia (*Moniliophthora reoren*) crecida en residuos sólidos de zuro, cascarilla de arroz y cascara del cacao. Trabajo de tesis para optar el grado de ingeniero en Biotecnología. Sangolquí.
- Tamariz, A. C. (2014). Diversidad de bacterias termotolerantes celulolíticas y xilanolíticas aisladas de fuentes termales del callejón de Huaylas. Trabajo de tesis para optar el grado académico de doctor en ciencias biológicas. Facultad de ciencias biológicas. Lima, Perú.
- Tomckowiack, J. C. (2014). Evaluación de las actividades enzimáticas celulasa, ureasa y la producción de ácido indol acético en cepas de bacterias y hongos aisladas desde suelo de un bosque templado del sur de Chile. Trabajo de tesis para optar el grado de Licenciado en Bioquímica y título profesional de Bioquímico. Valdivia, Chile.
- Trujillo (2017). Biofilms microbianos. Universidad de La Laguna.
- Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) (1987).
- Vásquez, A. (2013). Producción de xilanasas por *Aspergillus spp.* en fermentación sumergida y fermentación en medio sólido. Universidad Iberoamericana, México.
- Villena, G. K., y Gutiérrez-Correa, M. (2003). Biopelículas de *Aspergillus niger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. *Rev. peru biol.*, 10(1), Lima - Perú.
- Villena, G. K., y Gutiérrez-Correa, M. (2006). Production of cellulase by *Aspergillus niger* biofilm developed on polyester cloth. *Letters in Applied Microbiolog*, 43, 262-268.
- Villena, G., Moreno, P., & Gutiérrez-Correa M. (2001). Cellulase production by fungal biofilms on polyester cloth. *AgrofoodIndustry HiTech*, 12(1), 3235.

Anexos

Anexo 1. Medio de cultivo y reactivos

Reactivos

- **Reactivo de Miller: Ácido dinitrosalicílico (DNS)**

En un vaso precipitado de 2 litros se adiciona 1416 mililitros de agua destilada y 19.80 gramos de NaOH, se disolvió con la ayuda de un agitador magnético, cuando está bien disuelto se adicionó 10.16 gramos de ácido 3,5 dinitrosalicílico, una vez disuelto lo anterior, se agregaron 306 gramos de tartrato de sodio y potasio, 7.6 mL de fenol (disuelto a 50 °C) y 8.3 gramos de metabisulfito de sodio.

- **Tampón Acetato 50mM, pH 4.8**

En un vaso precipitado de 1 litro se adicionó 900 mililitros de agua destilada, se agrega 2.15 gramos de acetato de sodio anhidro y 1.43 ml ácido acético glacial, se mezcló con un agitador magnético y se verifico el pH a 4.8, de ser necesario se ajusta el pH con una solución de NaOH 4M y HCl.

- **Estándar de lactosa (1 mg/mL)**

En un vaso precipitado de 100 mililitros se mezclaron 50 mililitros de tampón acetato 50 Mm pH 4.8 y 50 miligramos de lactosa anhidra.

Medio de cultivo

- **Agar Papa Dextrosa (PDA) para 300 mL**

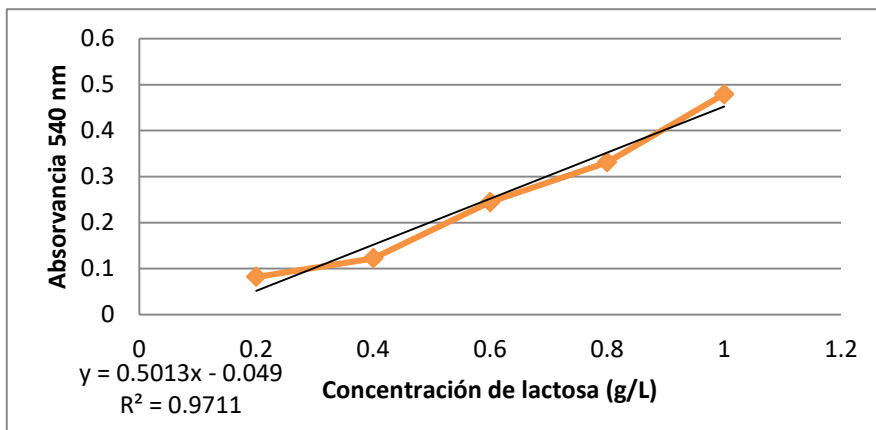
En un vaso precipitado de 1000 mililitros se adicionó 400 mililitros de agua destilada, se agrega 90 gramos de papa pelada y picada (de preferencia en cuadritos pequeños), se llevó a la cocina eléctrica y se hizo hervir hasta que la papa suelte su almidón, luego se filtró y del líquido 300 mililitros fueron separados en un vaso precipitado de 500 mililitros, se le agregó 6 gramos de agar y 6 gramos de glucosa, se removió con una varilla hasta que se disolvió completamente, de no ser así se coloca al microondas hasta que se disuelva observando que no se derrame.

Anexo 2. Curva estándar para la determinación de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

Se elaboraron las curvas para lactosa y celulasas, las cuales se utilizaron para calcular la concentración de los azúcares reductores provenientes de la hidrólisis de Papel Filtro para el segundo caso.

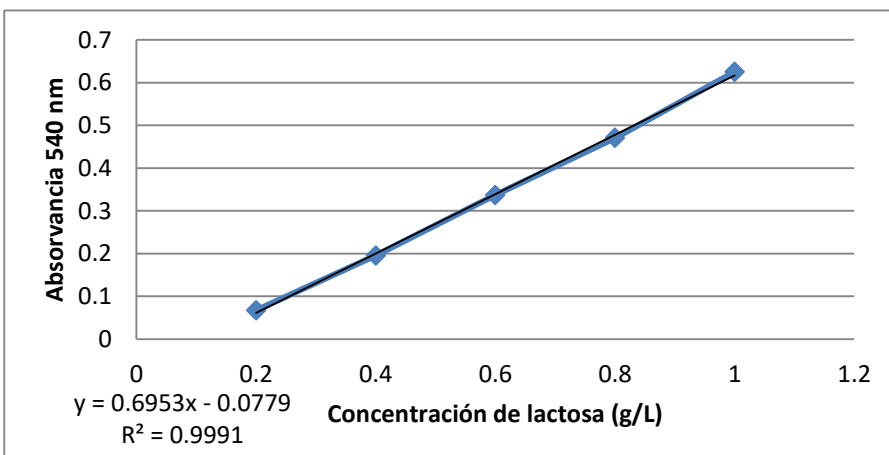
a) Curva patrón para la determinación de la concentración de lactosa del suero de queso

Concentración (g/L)	Absorvancia 540nm
0.2	0.082
0.4	0.1225
0.6	0.2445
0.8	0.331
1	0.479



b) Curva patrón para la determinación de lactosa residual

Concentración (g/L)	Absorvancia 540nm
0.2	0.068
0.4	0.196
0.6	0.337
0.8	0.471
1	0.625



Anexo 3. Conteo celular en cámara de Neubauer o hematocitómetro

PASO 1. Preparación de la muestra.

Dependiendo del tipo de muestra a medir, se habrá de preparar una muestra con una concentración apta para su recuento. Típicamente, el rango de concentraciones que permite contar el hematocitómetro está entre 250.000 células y 2,5 millones de células por mL. Intentaremos que la muestra tenga una concentración en torno a 10^6 (1 millón) aplicando las diluciones correspondientes. Por debajo de 250.000 células/mL ($2,5 * 10^5$) la cantidad de células contadas no es suficiente para poder dar una estimación lo suficientemente fiable de la concentración celular. La concentración óptima para conteo en hematocitómetro es de 1 millón de células por mL = 10^6 células /mL

Por encima de 2,5 millones ($2,5 * 10^6$) la probabilidad de cometer errores de conteo crece demasiado, y también el tiempo y esfuerzo necesario para realizar un recuento con fiabilidad. Por encima de esta concentración es conveniente diluir la muestra para acercar la concentración al rango óptimo.

PASO 2. Introducción de la muestra en la cámara de Neubauer

Se toman 10 μ L de la mezcla preparada en el paso 1 con la micropipeta.

- 1) Se coloca un cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer, y se coloca en posición horizontal sobre la mesa, en un lugar donde nos sea cómodo pipetear.
- 2) Se introduce una punta desechable en el extremo de la micropipeta,
- 3) Se ajusta la micropipeta para succionar 10 μ L de líquido. Generalmente este ajuste se realiza guiando el botón del embolo para seleccionar el volumen deseado.
- 4) Se introduce la punta de la micropipeta en la muestra
- 5) Se pulsa el pistón o embolo superior de la pipeta suavemente hasta que se siente como el pistón llega al final de su recorrido.
- 6) Se saca la punta de la pipeta de la muestra, y siempre manteniéndola en posición vertical se lleva hasta la cámara de Neubauer.
- 7) Se coloca la punta de la pipeta en el borde del cubreobjetos, en el extremo de la cámara de Neubauer. Se trata de dejar que el líquido penetre entre la cámara y el cubreobjetos desde el lateral, por capilaridad.
- 8) Se suelta el pistón suavemente mientras se supervisa que el líquido está entrando correctamente y de forma uniforme en la cámara.
- 9) En caso de que aparezcan burbujas, el cubreobjetos se haya movido o algo no haya salido bien, repetir la operación.

Ya tenemos la cámara de Neubauer cargada, lista para el recuento celular.

PASO 3. Preparación y enfoque del microscopio.

- 1) Colocar la cámara de Neubauer en la bandeja del microscopio. Si el microscopio dispone de pinza de sujeción, fijar la cámara con ella.
- 2) Encender la luz del microscopio.
- 3) Enfocar el microscopio hasta que pueden verse nítidas las células mirando por el binocular.
- 4) Buscar el primer cuadro donde vaya a realizarse el recuento. En este ejemplo vamos a contar 5 cuadros grandes de una cámara de Neubauer Improved de 0,1mm de profundidad.
- 5) Realizar el recuento de células en el primer cuadro.

Existe una convención por la cual si las células tocan el límite superior o el límite izquierdo del cuadro, deben contabilizarse, pero no se contabilizan si tocan el límite inferior o el límite derecho.

En caso de que la concentración celular sea muy alta, y sea fácil perderse en el recuento, se suele utilizar un orden de conteo en forma de zig-zag.

- 6) Anotar en una hoja de resultados la cantidad de células contadas en el primer cuadro.
- 7) Repetir el proceso para el resto de los cuadros que deseamos contar, anotando el resultado de cada uno de ellos. Cuantos más cuadros contemos, más precisión obtendremos en nuestra medida.

PASO 4. Cálculo de la concentración.

Aplicamos la fórmula del cálculo de concentración celular número de células

$$\text{Concentración (células/mL)} = \frac{\text{Número de células}}{\text{Volumen (mL)}}$$

El número de células es la suma de todas las células contadas en todos los cuadros donde hemos hecho el recuento.

Como el volumen de 1 cuadro grande es:

$$0,1 \text{ cm} \times 0,1 \text{ cm} = 0,01 \text{ cm}^2 \text{ de superficie}$$

$$0,01 \text{ cm}^2 * 0,1 \text{ mm (profundidad), entonces}$$

$$0,01 \text{ cm}^2 * 0,01 \text{ cm} = 0,0001 \text{ cm}^3 = 0,0001 \text{ mL}$$

La fórmula para recuento con cuadros grandes en cámara de Neubauer es:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Número de células} \times 10\,000}{\text{Número de cuadros}}$$

En el caso de que hayamos aplicado una dilución, deberemos transformar la concentración obtenida durante el recuento celular en la concentración de la muestra original.

En este caso tendremos que dividir el resultado por la dilución aplicada. La fórmula quedará:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Número de células} \times 10\,000}{\text{Número de cuadros} \times \text{dilución}}$$

Ejemplo:

Para una dilución de 1:10. Dilución = 0,1

Para una dilución de 1:100, Dilución = 0,01

Error

Errores de hasta 20% y 30% son comunes con este método de recuento debido al pipeteo, a los errores estadísticos por ser la muestra poco representativa, errores del volumen de muestra realmente introducido en la cámara, etc.

Sin embargo, el hematocitómetro sigue siendo uno de los métodos más ampliamente utilizados en los laboratorios de todo el mundo.

Anexo 4. Análisis estadístico para la producción de biomasa

Tabla 1. Resumen Estadístico para la Producción de Biomasa

Tratamientos (Fermentaciones)	Recuento	Promedio	Desviación Estándar
T2 (Biopelículas)	3	1.7	0.26
T3 (Inmovilización)	3	0.0	0.0
T1 (Sumergido)	3	0.74	0.01

Tabla 2. Análisis de Varianza (ANVA) para la Producción de Biomasa por tratamiento

Fuentes Variación	de Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Tratamientos	4.3592	2	2.1796	96.58	0.0000
Error Experimental	0.1354	6	0.0225667		
Total	4.4946	8			

La tabla ANVA descompone la varianza de BIOMASA en dos componentes: un componente entre tratamientos y el error. La razón-F, que en este caso es igual a 96.58, es el cociente entre el estimado de tratamientos y el estimado del error. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Biomasa entre un tratamiento y otro, con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se realizó la Prueba de Múltiples Rangos.

Tabla 3. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Biomasa por Tratamientos

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos	En letras
T3 (Inmovilización)	3	0.0	X	a
T1 (Sumergido)	3	0.74	X	c
T2 (Biopelículas)	3	1.7	X	b

El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes.

Se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en la columna. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, siendo el Tratamiento 2 (T2-Biopelículas) el que presentó mayor producción de biomasa, seguido del Tratamiento 1 (T1-Sumergido) y el Tratamiento 3 (T3-Inmovilización) que no presento producción de biomasa.

Tabla 4. Contrastes entre cada par de tratamiento con un nivel de significación del 5%

Contraste	Sig.	Diferencia
Biopelículas – Inmovilización	*	1.7
Biopelículas – Sumergido	*	0.96
Inmovilización – Sumergido	*	-0.74

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

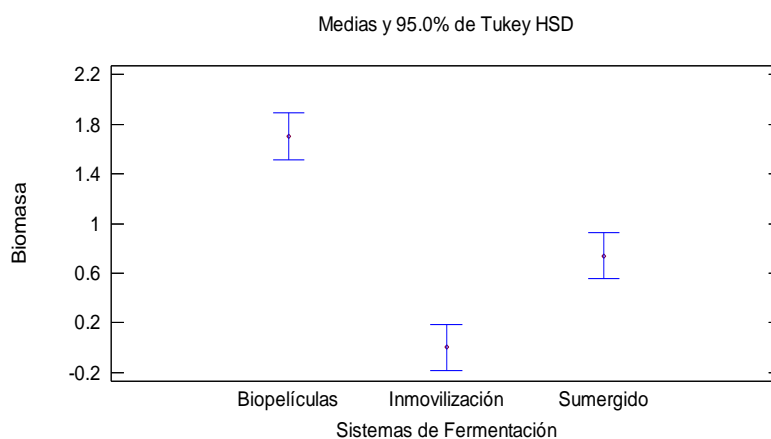


Figura 1. Gráfico de medias de la producción de biomasa por tratamiento

Anexo 5. Análisis estadístico para la lactosa residual

Tabla 5. Resumen Estadístico para Lactosa residual

Tratamientos (Fermentaciones)	Recuento	Promedio	Desviación Estándar
T2-Biopelículas	3	0.055	0.03
T3-Inmovilización	3	0.415	0.07
T1-Sumergido	3	0.009	0.004

Tabla 6. Análisis de Varianza (ANVA) para Lactosa residual por Tratamiento

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Tratamientos	0.296042	2	0.148021	74.96	0.0001
Error experimental	0.0118473	6	0.00197456		
Total	0.307889	8			

La tabla ANVA descompone la varianza de Lactosa residual en dos componentes: un componente entre tratamientos y el error. La razón-F, que en este caso es igual a 74.96, es el cociente entre el estimado de tratamiento y el estimado del error. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Lactosa residual entre un tratamiento y otro, con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se realizó la Prueba de Múltiples Rangos.

Tabla 7. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Lactosa residual por Tratamientos

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos	En letras
T1-Sumergido	3	0.009	X	b
T2-Biopelículas	3	0.055	X	b
T3-Inmovilizado	3	0.415	X	a

El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes.

Se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en la columna. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, siendo el Tratamiento 3 (T3-Inmovilización) el que presentó mayor lactosa residual, seguida del Tratamiento 1 (T1-Sumergido) y el Tratamiento 2 (T2-Sumergido) que son iguales estadísticamente.

Tabla 8. Contrastes entre cada par de tratamiento con un nivel de significación del 5%

Contraste	Sig.	Diferencia
Biopelículas – Inmovilización	*	-0.359667
Biopelículas – Sumergido		0.046
Inmovilización – Sumergido	*	0.405667

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

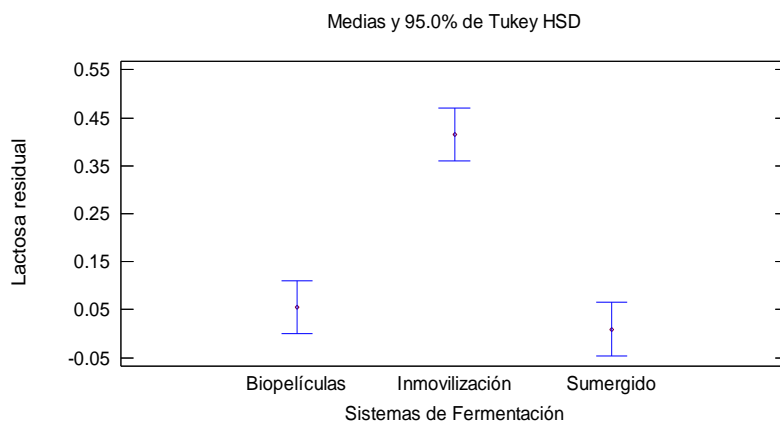


Figura 2. Gráfico de medias de Lactosa residual por tratamiento

Anexo 6. Análisis estadístico para la actividad enzimática

Tabla 9. Resumen Estadístico para Actividad Enzimática

Tratamientos (Fermentaciones)	Recuento	Promedio	Desviación Estándar
T2-Biopelículas	3	102.3	54.5
T3-Inmovilización	3	767.7	131.5
T1-Sumergido	3	17.3	6.5

Tabla 10. Análisis de varianza (ANVA) para Actividad Enzimática por Tratamiento

Fuente Variación	de Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Tratamientos	$1.01289 \cdot 10^{-6}$	2	506447	74.83	0.0001
Error experimental	40610.0	6	6768.33		
Total	$1.0535 \cdot 10^{-6}$	8			

La tabla ANVA descompone la varianza de Actividad Enzimática en dos componentes: un componente entre tratamientos y el error. La razón-F, que en este caso es igual a 74.83, es el cociente entre el estimado de tratamientos y el estimado de error. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Actividad Enzimática entre un tratamiento y otro, con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se realizó la Prueba de Múltiples Rangos.

Tabla 11. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para Actividad Enzimática por Tratamientos

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos	En letras
T1-Sumergido	3	17.3	X	b
T2-Biopelículas	3	102.3	X	b
T3-Inmovilización	3	767.7	X	a

El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes.

Se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en la columna. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, siendo el Tratamiento 3 (T3-Inmovilización) el que presentó mayor actividad enzimática, seguida del Tratamiento 1 (T1-Sumergido) y el Tratamiento 2 (T2-Sumergido) que son iguales estadísticamente.

Tabla 12. Contrastes entre cada par de tratamiento con un nivel de significación del 5%

Contraste	Sig.	Diferencia
Biopelículas – Inmovilización	*	-665.333
Biopelículas – Sumergido		85.0
Inmovilización – Sumergido	*	750.333

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza

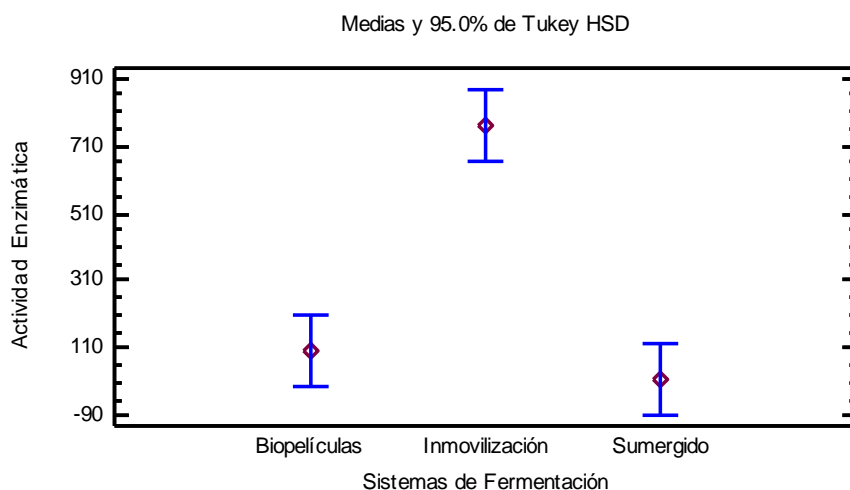


Figura 3. Gráfico de medias de la actividad enzimática por tratamiento

Anexo 7. Análisis estadístico para el rendimiento de la enzima respecto a la biomasa ($Z_{AE/B}$)

Tabla 13. Resumen Estadístico para rendimiento de la enzima respecto a la biomasa $Z_{AE/B}$

Tratamientos (Fermentaciones)	Recuento	Promedio	Desviación Estándar
T2-Biopelículas	3	63.8	39.06
T3-Inmovilización	3	0.0	0.0
T1-Sumergido	3	23.3	9.15

Tabla 14. Análisis de Varianza (ANVA) para el rendimiento de la enzima respecto a la biomasa ($Z_{AE/B}$) por Tratamiento

Fuente Variación	de	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón- F	Valor-P
Tratamientos		6262.0	2	3131.0	5.84	0.0391
Error experimental		3219.32	6	536.553		
Total		9481.32	8			

La tabla ANVA descompone la varianza del rendimiento de la enzima respecto a la biomasa ($Z_{AE/B}$) en dos componentes: un componente entre tratamientos y el error. La razón-F, que en este caso es igual a 5.84, es el cociente entre el estimado de tratamientos y el estimado de error. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del rendimiento de la enzima respecto a la biomasa ($Z_{AE/B}$) entre un tratamiento y otro, con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se realizó la Prueba de Múltiples Rangos.

Tabla 15. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para el rendimiento de la enzima respecto a la biomasa ($Z_{AE/B}$) por tratamientos

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos	En letras
T3-Inmovilización	3	0.0	X	a
T1-Sumergido	3	23.3	XX	ab
T2-Biopelículas	3	63.8	X	b

El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes.

Se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en la columna. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, siendo el Tratamiento 3 (T3-Inmovilización) el que presentó mayor rendimiento de actividad enzimática respecto a la biomasa, seguida del Tratamiento 1 (T1-Sumergido) y el Tratamiento 2 (T2-Sumergido) que son iguales estadísticamente.

Tabla 16. Contrastes entre cada par de tratamiento con un nivel de significación del 5%

Contraste	Sig.	Diferencia
Biopelículas – Inmovilización	*	63.8467
Biopelículas – Sumergido		40.5083
Inmovilización – Sumergido		-23.3383

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

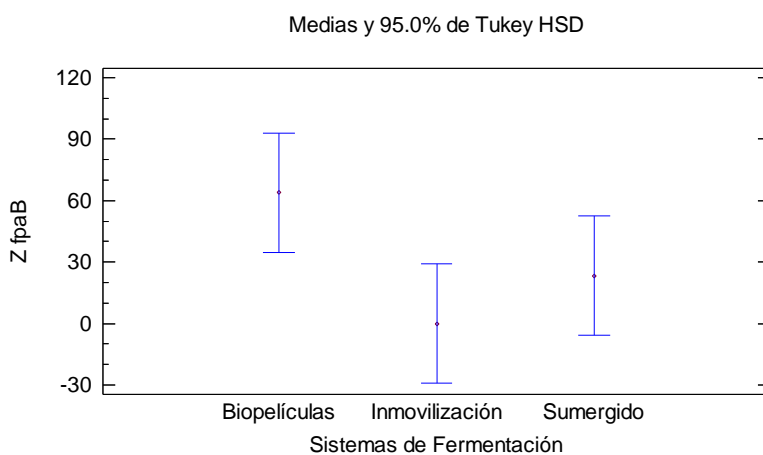


Figura 4. Gráfico de medias del rendimiento de la enzima respecto a la biomasa ($Z_{AE/B}$) por tratamiento

Anexo 8. Análisis estadístico para el rendimiento de la enzima respecto a la lactosa residual ($Z_{AE/L}$)

Tabla 17. Resumen estadístico para el rendimiento de la enzima respecto a la lactosa residual ($Z_{AE/L}$)

Tratamientos (Fermentaciones)	Recuento	Promedio	Desviación Estándar
T2-Biopelículas	3	1849.33	4.93
T3-Inmovilización	3	1850.0	1.0
T1-Sumergido	3	1856.0	29.3

Tabla 18. Análisis de Varianza (ANVA) para el rendimiento de la enzima respecto a la lactosa residual ($Z_{AE/L}$) por Tratamiento

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Tratamientos	80.8889	2	40.4444	0.14	0.8745
Error experimental	1768.67	6	294.778		
Total	1849.56	8			

La tabla ANVA descompone la varianza del rendimiento de la enzima respecto a lactosa residual ($Z_{AE/L}$) en dos componentes: un componente entre tratamientos y el error. La razón-F, que en este caso es igual a 0.14, es el cociente entre el estimado de tratamiento y el estimado del error. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del rendimiento de la enzima respecto a la lactosa residual ($Z_{AE/L}$) entre un tratamiento y otro, con un nivel del 95.0% de confianza. Ya no se realizó la Prueba de Múltiples Rangos de Tukey por no existir diferencias significativas entre tratamientos, se representó como un solo grupo homogéneo de la siguiente manera a continuación.

Tabla 19. Tratamientos sin diferencias significativas

Tratamiento	Grupos Homogéneos	En letras
T3-Inmovilización	X	a
T2-Biopelículas	X	a
T1-Sumergido	X	a

Anexo 9. Análisis estadístico del rendimiento de la biomasa respecto a la lactosa residual ($Z_{B/L}$)**Tabla 20. Resumen Estadístico para el rendimiento de la biomasa respecto a la lactosa residual ($Z_{B/L}$)**

Tratamientos (Fermentaciones)	Recuento	Promedio	Desviación Estándar
T2-Biopelículas	3	41.18	31.59
T3-Inmovilización	3	0.0	0.0
T1-Sumergido	3	88.72	37.08

Tabla 21. Análisis de Varianza (ANVA) para el rendimiento de la biomasa respecto a la lactosa residual ($Z_{B/L}$) por Tratamiento

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Tratamientos	11829.6	2	5914.29	7.47	0.0235
Error experimental	4747.66	6	791.291		
Total	16576.2	8			

La tabla ANVA descompone la varianza del rendimiento de la biomasa respecto a la lactosa residual ($Z_{B/L}$) en dos componentes: un componente entre tratamientos y el error. La razón-F, que en este caso es igual a 7.47, es el cociente entre el estimado de tratamientos y el estimado de error. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del rendimiento de la biomasa respecto a la lactosa residual ($Z_{B/L}$) entre un tratamiento y otro, con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se realizó la Prueba de Múltiples Rangos.

Tabla 22. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para el rendimiento de la biomasa respecto a la lactosa residual ($Z_{B/L}$) por tratamientos

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos	En letras
T3-Inmovilización	3	0.0	X	a
T2-Biopelículas	3	41.18	XX	ab
T1-Sumergido	3	88.72	X	b

El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes.

Se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en la columna. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, siendo el Tratamiento 3 (T3-Inmovilización) estadísticamente igual que el tratamiento 2 (T2-fermentación por

biopelículas) el primero no presentó producción de biomasa por consumo de lactosa, y el tratamiento 2 y 1 no tiene diferencias significativas.

Tabla 23. Contrastes entre cada par de tratamiento con un nivel de significación del 5%

Contraste	Sig.	Diferencia
Biopelículas – Inmovilización		41.1856
Biopelículas – Sumergido		-47.5401
Inmovilización – Sumergido	*	-88.7257

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

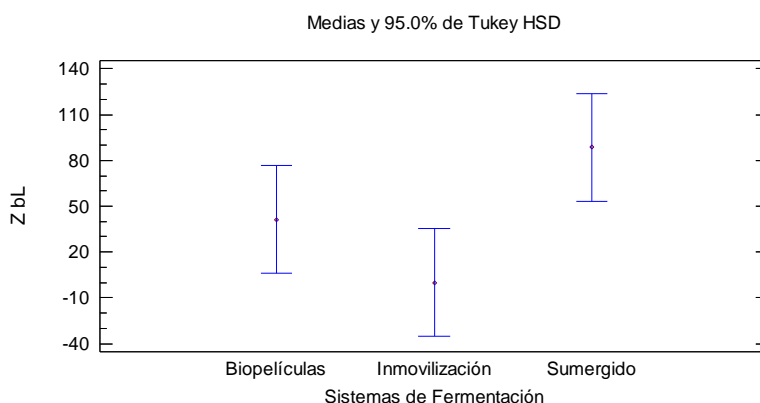


Figura 5. Gráfico de medias del rendimiento de la biomasa respecto a la lactosa residual ($Z_{B/L}$) por tratamiento.

Anexo 10. Análisis estadístico para la productividad volumétrica de la actividad enzimática (U_{AE})

Tabla 24. Resumen Estadístico para la productividad volumétrica de la actividad enzimática (U_{AE})

Tratamientos (Fermentaciones)	Recuento	Promedio	Desviación Estándar
T2-Biopelículas	3	1.42	0.755
T3-Inmovilización	3	10.66	1.83
T1-Sumergido	3	0.24	0.09

Tabla 25. Análisis de Varianza (ANVA) para la productividad volumétrica de la actividad enzimática (U_{AE}) por Tratamiento

Fuente Variación	de Suma de Cuadrados	de GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Tratamientos	195.293	2	97.6463	74.60	0.0001
Error experimental	7.85407	6	1.30901		
Total	203.147	8			

La tabla ANVA descompone la varianza de la productividad volumétrica de la actividad enzimática (U_{AE}) en dos componentes: un componente entre tratamiento y el error. La razón-F, que en este caso es igual a 74.60, es el cociente entre el estimado de tratamientos y el estimado de error. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de la productividad volumétrica de la actividad enzimática (U_{AE}) entre un tratamiento y otro, con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se realizó la Prueba de Múltiples Rangos.

Tabla 26. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para la productividad volumétrica de la actividad enzimática (U_{AE}) por Tratamientos

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos	En letras
T1-Sumergido	3	0.24	X	a
T2-Biopelículas	3	1.42	X	a
T3-Inmovilización	3	10.66	X	b

El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes.

Se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en la columna. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, siendo el Tratamiento 3 (T3-Inmovilización) el que presentó mayor productividad volumétrica de la actividad

enzimática, seguida del Tratamiento 1 (T1-Sumergido) y el Tratamiento 2 (T2-Sumergido) que son iguales estadísticamente.

Tabla 23. Contrastes entre cada par de tratamiento con un nivel de significación del 5%

Contraste	Sig.	Diferencia
Biopelículas – Inmovilización	*	-9.23667
Biopelículas – Sumergido		1.18333
Inmovilización – Sumergido	*	10.42

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

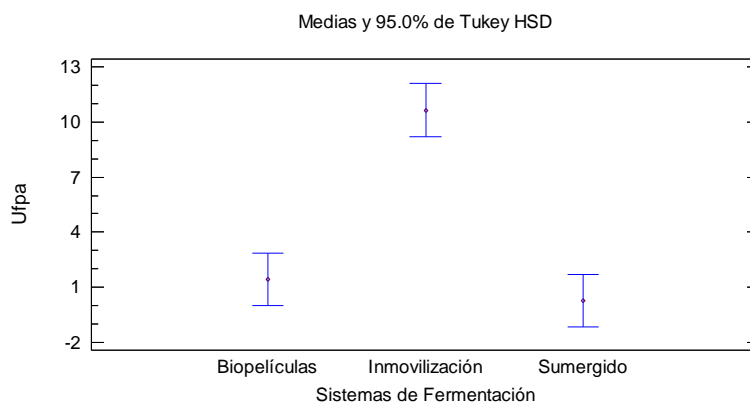


Figura 6. Gráfica de medias de la productividad volumétrica de la actividad enzimática (U_{AE}) por tratamiento

Anexo 11. Análisis estadístico para la productividad volumétrica de la biomasa (U_B)**Tabla 24. Resumen Estadístico para la productividad volumétrica de la biomasa (U_B)**

Tratamientos (Fermentaciones)	Recuento	Promedio	Desviación Estándar
T2-Biopelículas	3	0.023	0.0057
T3-Inmovilización	3	0.0	0.0
T1-Sumergido	3	0.01	0.0

Tabla 25. Análisis de Varianza (ANVA) para la productividad volumétrica de la biomasa (U_B) por Tratamiento

Fuente Variación	de	Suma Cuadrados	de	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Tratamientos		0.00082		2	0.00041	37.00	0.0004
Error experimental		0.000067		6	0.000011		
Total		0.00089		8			

La tabla ANVA descompone la varianza de la productividad volumétrica de la biomasa (U_B) en dos componentes: un componente entre tratamientos y el error. La razón-F, que en este caso es igual a 37.0, es el cociente entre el estimado de tratamientos y el estimado de error. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de la productividad volumétrica de la biomasa (U_B) entre un tratamiento y otro, con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se realizó la Prueba de Múltiples Rangos.

Tabla 26. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para la productividad volumétrica de la biomasa (U_B) por tratamientos

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos	En letras
T3-Inmovilización	3	0.0	X	a
T1-Sumergido	3	0.01	X	c
T2-Biopelículas	3	0.023	X	b

El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente.

Se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en la columna. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, siendo el Tratamiento 3 (T3-Inmovilización) el que presentó menor producción de biomasa, siendo esto

favorable por que se quiere enzimas no biomasa, seguido del Tratamiento 1 (T1-Sumergido) y el Tratamiento 2 (T2-Biopelículas).

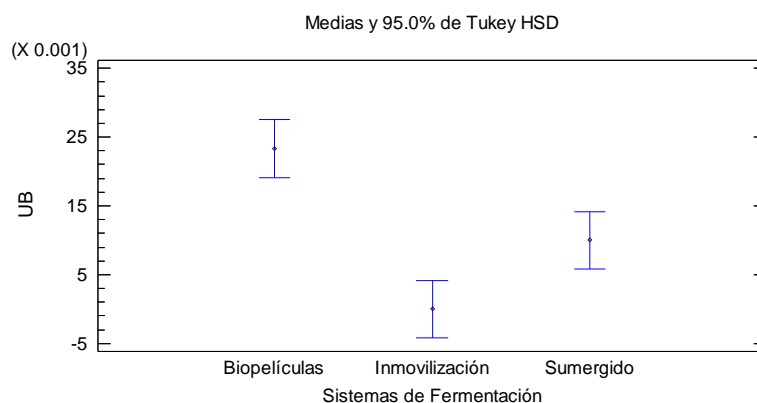
Tabla 27. Contrastes entre cada par de tratamiento con un nivel de significación del 5%

Contraste	Sig.	Diferencia
Biopelículas – Inmovilización	*	0.0233333
Biopelículas – Sumergido	*	0.0133333
Inmovilización – Sumergido	*	-0.01

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

Figura 7. Gráfica de medias de la productividad volumétrica de la biomasa (U_B) por tratamiento



Anexo 12. Análisis estadístico para la productividad volumétrica de la lactosa residual (U_L)**Tabla 28. Resumen Estadístico para la productividad volumétrica de la lactosa residual (U_L)**

Tratamientos (Fermentaciones)	Recuento	Promedio	Desviación Estándar
T2-Biopelículas	3	0.000769	0.0004
T3-Inmovilización	3	0.00576	0.00098
T1-Sumergido	3	0.000129	0.000049

Tabla 29. Análisis de Varianza (ANVA) para la productividad volumétrica de la lactosa residual (U_L) por Tratamiento

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Tratamientos	0.000057	2	0.000028539	74.59	0.0001
Error experimental	0.00000229	6	3.82623*10 ⁻⁷		
Total	0.00005937	8			

La tabla ANVA descompone la varianza de la productividad volumétrica de la lactosa residual (U_L) en dos componentes: un componente entre tratamientos y el error. La razón-F, que en este caso es igual a 74.59, es el cociente entre el estimado entre tratamientos y el estimado de error. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de la productividad volumétrica de la lactosa residual (U_L) entre un tratamiento y otro, con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras, se realizó la Prueba de Múltiples Rangos.

Tabla 30. Pruebas de Múltiple Rangos de Tukey para la productividad volumétrica de la lactosa residual (U_L) por Tratamientos

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos	En letras
T1-Sumergido	3	0.000129	X	a
T2-Biopelículas	3	0.000769	X	a
T3-Inmovilización	3	0.00576	X	b

El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes.

Se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en la columna. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, siendo el

Tratamiento 3 (T3-Inmovilización) el que presentó mayor consumo de lactosa, seguida del Tratamiento 1 (T1-Sumergido) y el Tratamiento 2 (T2-Sumergido) que son iguales estadísticamente.

Tabla 31. Contrastes entre cada par de tratamiento con un nivel de significación del 5%

Contraste	Sig.	Diferencia
Biopelículas – Inmovilización	*	-0.004994
Biopelículas – Sumergido		0.000639212
Inmovilización – Sumergido	*	0.00563306

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza.

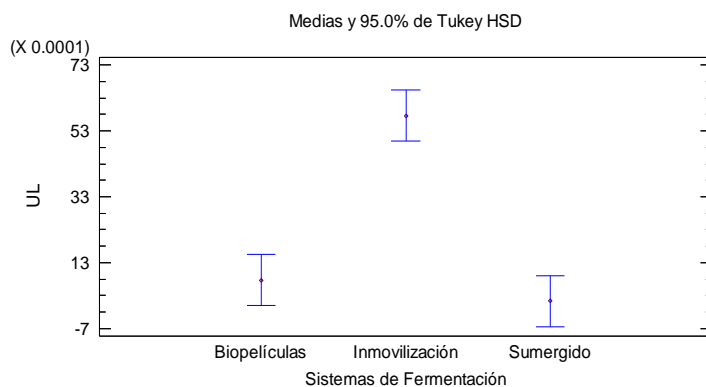


Figura 8. Gráfica de medias de la productividad volumétrica de la lactosa residual (U_L) por tratamiento

Anexo 13. Datos de las repeticiones de cada análisis realizado por cada sistema de fermentación

Tabla 32. Repeticiones de los análisis de cada fermentación

Tratamientos	Fermentaciones	Biomasa	Lactosa residual	Actividad Enzimática	Z AE/B	Z AE/L	Z B/L	UAE	UB	UL
Tratamiento 3 (T3)	Inmovilización	0	0.344	636	0	1849	0	8.83	0	0.00477
	Inmovilización	0	0.486	899	0	1850	0	12.49	0	0.00675
	Inmovilización	0	0.415	768	0	1851	0	10.66	0	0.00576
Tratamiento 2 (T2)	Biopelículas	1.54	0.085	157	102.031	1847	18.13	2.18	0.02	0.00118
	Biopelículas	2	0.026	48	23.964	1846	77.20	0.67	0.03	0.00036
	Biopelículas	1.56	0.055	102	65.545	1855	28.22	1.42	0.02	0.00077
Tratamiento 1 (T1)	Sumergido	0.73	0.013	24	32.612	1846	56.73	0.33	0.01	0.00018
	Sumergido	0.74	0.006	11	14.299	1833	129.38	0.15	0.01	0.00008
	Sumergido	0.75	0.009	17	23.104	1889	80.07	0.24	0.01	0.00013

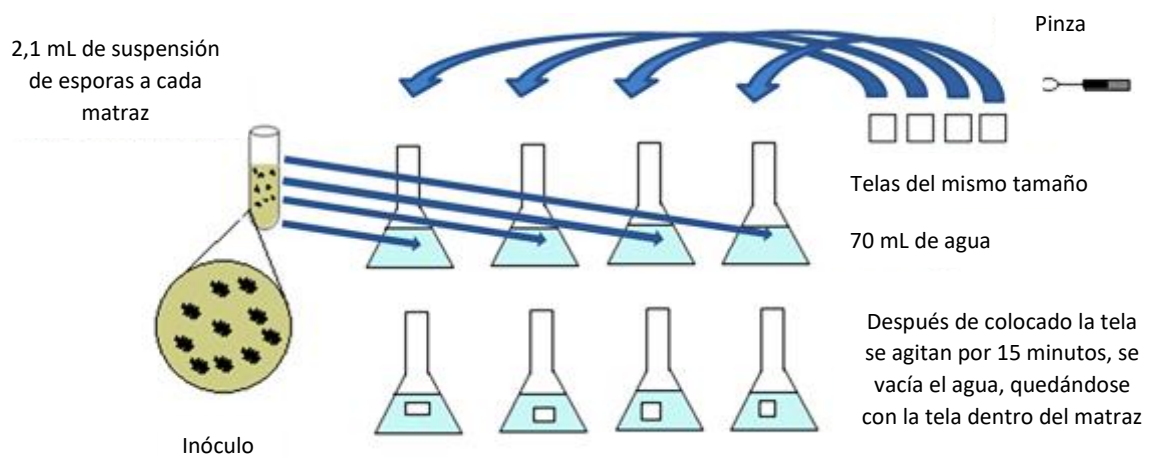
Anexo 14. Sistemas de fermentación

a. Fermentación sumergida



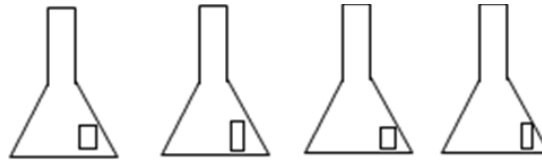
Figura 9. Fermentación sumergida

b. Fermentación por biopelículas



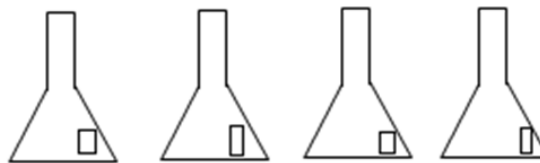
1er LAVADO

Se agrega 70 mL de agua a cada matraz, luego se agitan por 15 min y se vacía el agua, quedándose solo con la tela



2do LAVADO

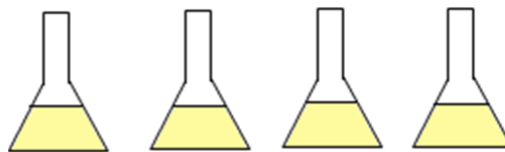
Se agrega 70 mL de agua a cada matraz, luego se agitan por 15 min y se vacía el agua, quedándose solo con la tela



Con la asa de col se retira la tela con las esporas adheridas

FERMENTACIÓN

28 °C
175 RPM
por 72 horas



70 mL medio de producción



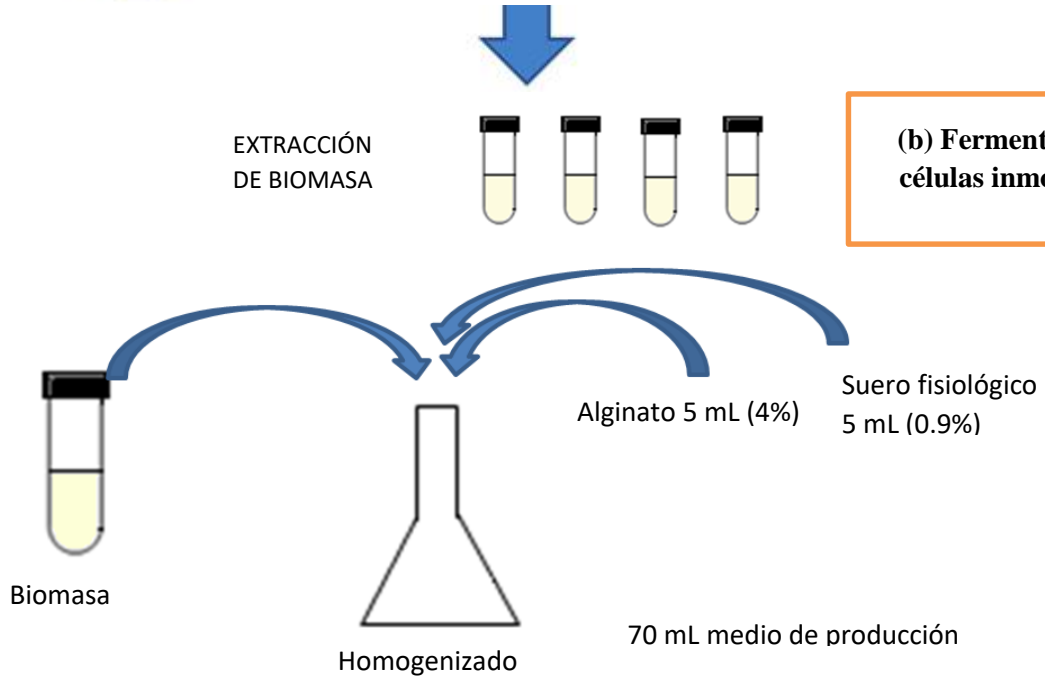
Figura10. Fermentación por biopelículas

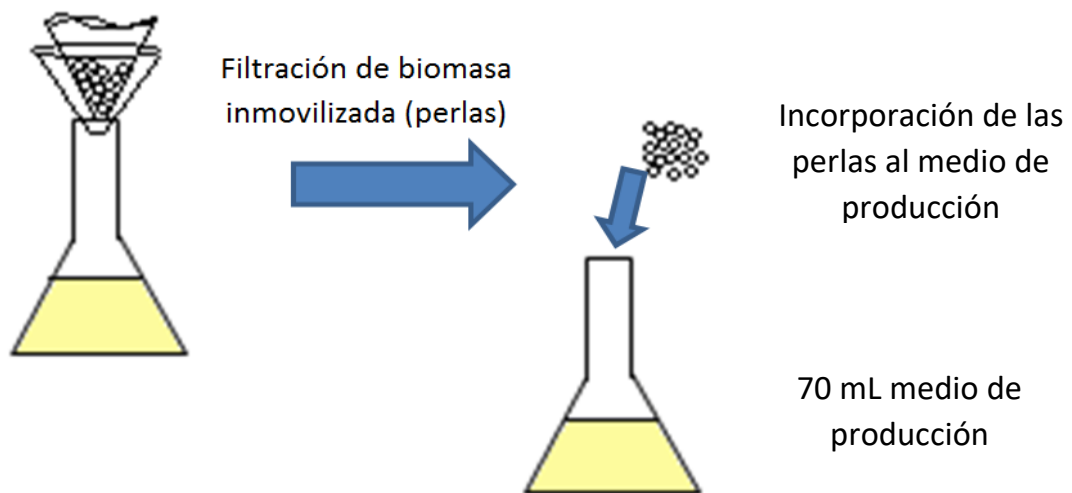
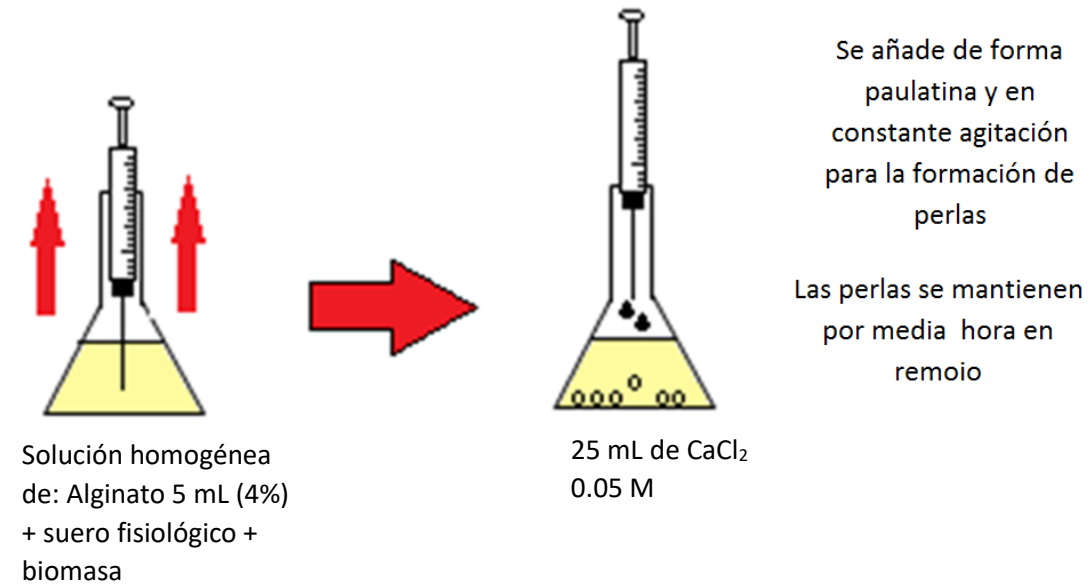
a. Fermentación con células inmovilizadas

(a) Fermentación sumergida



(b) Fermentación con células inmovilizadas





Realizar este procedimiento con cada tubo de biomasa de la primera etapa para cada matraz



FERMENTACIÓN

28 °C
175 RPM
por 72 horas

Figura 11. (a) Fermentación Sumergida (Primera etapa), (b) Fermentación con células inmovilizadas (Segunda etapa).

Anexo 15. Suero de leche esterilizado



Figura 12. Suero de leche esterilizado

Anexo 16. Replicado del *Aspergillus niger*

El *Aspergillus niger* con código ATCC 10864 conservado en tubos de ensayo se replicaron primero en tubos inclinados para tener diferentes unidades de *Aspergillus* de una misma especie, se incubaron a 28°C por 60 horas (esporas formadas).



Figura 13. Tubos inclinados de PDA



Figura 14. Tubo inclinado con esporas de *Aspergillus niger*



Se utilizó un tubo de *Aspergillus* esporulado para cada siembra de 4 matraces de 50 mL con agar papa dextrosa (PDA), el sembrío de esporas se dio por incorporación, luego se incubaron a 28°C por 60 horas (esporas formadas).



Figura 15. Matraces sembrados de *Aspergillus niger* (a) Vista frontal (b) Vista interna

Anexo 17. Actividad enzimática con papel filtro



Figura 16. Reacción del DNS con el papel filtro