

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y
AGROINDUSTRIA

DISEÑO DE UN FERMENTADOR DE BANDEJAS A ESCALA
PILOTO PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS CON ACTIVIDAD
LIGNINOLÍTICA Y CELULOLÍTICA A PARTIR DEL HONGO
PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM MEDIANTE
FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO EN ASERRÍN DE
EUCALIPTO

PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO
QUÍMICO

BYRON FERNANDO REINOSO CHISAGUANO

bf_reinoso@hotmail.es

DIRECTORA: ING. NEYDA ESPÍN

neyda.espin@epn.edu.ec

Quito, mayo 2015

© Escuela Politécnica Nacional (2015)
Reservados todos los derechos de reproducción

DECLARACIÓN

Yo, Byron Fernando Reinoso Chisaguano, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

Byron Fernando Reinoso Chisaguano

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Byron Fernando Reinoso Chisaguano bajo mi supervisión.

Ing. Neyda Espín
DIRECTORA DEL PROYECTO

AGRADECIMIENTO

En primer lugar agradezco a mis padres Camilo y Mariana por haberme dado lo más importante además de su amor, su compañía y valores; la educación.

Gracias a mi hermano Diego cuyo esfuerzo y decisión han sido una gran motivación, y aunque se encuentre lejos siempre lo he sentido cerca apoyándome.

Gracias a mi hermano Iván por estar ahí conmigo como el hermano mayor en ausencia de Diego y mis padres.

Gracias a toda mi familia por acompañarme desinteresadamente en el largo trayecto en que puede tornarse este proyecto. Especialmente a Luisín que ha sido como mi hermano menor, mi amigo. A Naty que se ha preocupado por mí como una madre.

Gracias a mis tíos y tías Lupita, Luchín, María, Walter, Inés y Oswaldo, quienes siempre demostraron tenerme presente.

Gracias a Cris por alentarme, a su manera, y simplemente por estar ahí.

Gracias a Neyda por ser una guía pero más que eso, por mostrar que cualquier problema se puede solucionar con paciencia y una sonrisa.

Gracias a Don Rodri, más que por su ayuda en mis pruebas, por compartir con todos nosotros su tiempo y su experiencia, verdadera madre del conocimiento.

Gracias a Majito, sea cual sea la razón por la cual fuimos amigos, y entre disgustos y bromas siempre fue un refrescante baño de honestidad.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a todas las personas que prefieren entender el mundo a simplemente utilizarlo.

“Y aquel hombre es de suma estupidez, el cual siempre desea por miedo a que le falte; y la vida se le escapa bajo la esperanza de disfrutar los bienes adquiridos con suma fatiga”

Leonardo Da Vinci

“Mis argumentos se derivan de la experiencia, fuente de toda evidencia, única y sola madre de la verdadera ciencia. Argumentar citando autores no denota inteligencia, sino buena memoria”

Leonardo Da Vinci

“Es mejor saber después de haber pensado y discutido que aceptar los saberes que nadie discute para no tener que pensar”

Fernando Sabater

“Están, además, las Iglesias y los Estados para mantener convencido al hombre de su pequeñez, está la moral de esclavos y el engaño de la humildad, los opios de los pueblos y la autoridad, para someter por miedo al Estado y al pecado la ilimitada capacidad creadora del hombre”

Luis Racionero

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	PÁGINA
RESUMEN	
xx	
INTRODUCCIÓN	xxii
1. REVISIÓN	BIBLIOGRÁFICA
1	
1.1 Hongo <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	1
1.1.1 Hongos	1
1.1.2 Hongos basidiomicetes	2
1.1.2.1 Hongos de pudrición suave	4
1.1.2.2 Hongos de pudrición café	4
1.1.2.3 Hongos de pudrición blanca	5
1.1.3 <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	5
1.1.4 Enzimas	6
1.1.4.1 Lignino Peroxidasa (LiP) E.C. 1.11.1.14	7
1.1.4.2 Manganeso Peroxidasa (MnP) E.C. 1.11.1.13	10
1.1.4.3 Lacasa E.C. 1.10.3.2	11
1.1.4.4 Celulasas	12
1.2 Producción de enzimas por Fermentación en medio sólido	14
1.2.1 Lignocelulosa	17
1.2.1.1 Lignina	17
1.2.1.2 Celulosa	19
1.2.1.3 Hemicelulosa	20
1.2.2 Tipos de reactores para fermentación en medio sólido	20
1.2.2.1 Bioreactores sin agitación y aireación no forzada	21
1.2.2.2 Bioreactores sin agitación y aireación forzada	22
1.2.2.3 Bioreactores con aireación no forzada y con agitación continua o intermitente	23
1.2.2.4 Bioreactores con aireación forzada y con agitación continua o intermitente	23
1.3 Escalado de bioreactores para fermentación en medio sólido	23
1.3.1 Escalado de fermentadores de bandejas	24
1.3.1.1 Humedad del sustrato	25
1.3.1.2 Altura de lecho	25
1.3.1.3 Temperatura	26
1.3.1.4 Modelo para el escalado de un fermentador de bandejas	26
2. PARTE	EXPERIMENTAL
31	

2.1	Materiales	31
2.2	Estudio de la influencia del flujo de aire en la humedad y temperatura del sustrato en cada bandeja dentro del fermentador a escala de laboratorio	32
2.2.1	Construcción del fermentador de bandejas a escala de laboratorio	33
2.2.2	Diseño experimental para la determinación del efecto del flujo de aire sobre la humedad y temperatura del sustrato	34
2.3	Determinación de la mejor temperatura y altura de lecho para la producción de enzimas lignino peroxidasa, manganeso peroxidasa, lacasa y celulasa	35
2.3.1	Caracterización deL Sustrato	35
2.3.2	Diseño experimental	36
2.3.3	Preparación del inóculo	37
2.3.4	Siembra en el fermentador de bandejas	38
2.3.5	Determinación de la actividad lignino peroxidásica, manganeso peroxidásica, lacásica y celulásica en el fermentador de bandejas	38
2.3.5.1	Muestreo y obtención del extracto enzimático	38
2.3.5.2	Determinación de la actividad Lignino Peroxidásica	39
2.3.5.3	Determinación de la actividad Manganeso Peroxidásica	39
2.3.5.4	Determinación de la actividad Lacásica	40
2.3.5.5	Determinación de la actividad Celulásica	41
2.4	Diseño del fermentador de bandejas a escala piloto	41
2.4.1	Determinación de la densidad del lecho (ρ_b)	43
2.4.2	Cálculo del coeficiente de rendimiento para el calor producido por el metabolismo (Y)	44
2.4.3	Determinación de la velocidad de crecimiento específica a la mejor temperatura (μ_{opt})	44
2.4.4	Cálculo del coeficiente superficial de transferencia de calor entre el lecho estacionario y el aire circundante (h_A)	45
3.	RESULTADOS	Y
	46	DISCUSIÓN
3.1	Estudio de la influencia del flujo de aire en la humedad y temperatura del sustrato en cada bandeja dentro del fermentador a escala de laboratorio	46
3.2	Caracterización del sustrato	48
3.2.1	Caracterización química	48
3.2.2	Análisis granulométrico	49
3.3	Efecto de la temperatura en la producción enzimática para un lecho de 5 y 10 cm	50
3.3.1	Cambio en la lignino peroxidasa por la temperatura	50
3.3.2	Cambio en la manganeso peroxidasa por la temperatura	55
3.3.3	Cambio en la lacasa por la temperatura	59
3.3.4	Cambio en la celulasa por la temperatura	65

3.4	Efecto de la altura de lecho en la producción enzimática para 30 y 35 °C	66
3.4.1	Cambio en la lignino peroxidasa por la altura de lecho	66
3.4.2	Cambio en la manganeso peroxidasa por altura de lecho	69
3.4.3	Cambio en la lacasa por la altura de lecho	72
3.5	Determinación de la mejor temperatura y altura de lecho para la producción enzimática	75
3.5.1	Mejores condiciones para la lignino peroxidasa	75
3.5.2	Mejores condiciones para la manganeso peroxidasa	78
3.5.3	Mejores condiciones para la lacasa	81
3.6	Diseño del fermentador de bandejas a escala piloto	84
3.6.1	Parámetros de la ecuación del número modificado de Damköhler	85
3.6.1.1	Densidad de lecho (ρ_b)	85
3.6.1.2	Coefficiente de rendimiento para el calor producido por el metabolismo (Y)	86
3.6.1.3	Velocidad de crecimiento específica a la mejor temperatura (μ_{opt})	87
3.6.1.4	Coefficiente superficial de transferencia de calor entre el lecho estacionario y el aire circundante (h_A)	89
3.6.2	Dimensiones, número de bandejas y parámetros de operación del fermentador de bandejas a escala piloto	89
3.6.2.1	Influencia del flujo de aire y de la temperatura crítica en el número de bandejas del fermentador	90
3.6.2.2	Parámetros de operación del fermentador de bandejas a escala piloto	92
3.6.2.3	Dimensiones del fermentador de bandejas a escala piloto	93
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	99
4.1	Conclusiones	99
4.2	Recomendaciones	100
	BIBLIOGRAFÍA	101
	ANEXOS	111

ÍNDICE DE TABLAS

		PÁGINA
Tabla 1.1.	Comparación de los hongos de pudrición blanca, café y suave	4
Tabla 1.2.	Enzimas ligninolíticas producidas por el hongo <i>P. chrysosporium</i> responsables de la degradación de la lignina	6
Tabla 1.3.	Comparación detallada de los procesos de fermentación en medio sólido y líquido	14
Tabla 1.4.	Diferentes residuos agroindustriales utilizados como sustrato para procesos de fermentación en medio sólido (SSF)	16
Tabla 2.1.	Materiales usados en el desarrollo de la parte experimental	31
Tabla 2.2.	Reactivos utilizados para el desarrollo del proyecto	32
Tabla 2.3.	Condiciones de funcionamiento del fermentador de bandejas	34
Tabla 3.1.	Humedad del sustrato en cada una de las bandejas con dos flujos de aire diferentes a 30 °C	46
Tabla 3.2.	Temperatura del sustrato en cada una de las bandejas con dos flujos de aire diferentes a 30 °C	46
Tabla 3.3.	Humedad del sustrato en cada una de las bandejas con dos flujos de aire diferentes a 35 °C	47
Tabla 3.4.	Temperatura del sustrato en cada una de las bandejas con dos flujos de aire diferentes a 35 °C	47
Tabla 3.5.	Caracterización química del aserrín de eucalipto utilizado como sustrato en el proceso de fermentación	48
Tabla 3.6.	Composición química (% w/w) de <i>Eucalyptus globulus</i> y otras especies de eucalipto	48
Tabla 3.7.	Composición química de varios sustratos utilizados para la producción de enzimas con actividad ligninolítica	49
Tabla 3.8.	Análisis granulométrico del aserrín de eucalipto utilizado como sustrato en el fermentador de bandejas	50
Tabla 3.9.	Actividad lignino peroxidásica promedio en el fermentador de bandejas para una altura de lecho de 5 cm a 30 y 35 °C	51
Tabla 3.10.	Parámetros utilizados en el proceso de fermentación en medio sólido por Almeida (2012)	53
Tabla 3.11.	Actividad lignino peroxidásica promedio en el fermentador de bandejas para una altura de lecho de 10 cm a 30 y 35 °C	54
Tabla 3.12.	Actividad manganeso peroxidásica promedio en el fermentador de bandejas para una altura de lecho de 5 cm a 30 y 35 °C	55
Tabla 3.13.	Actividad manganeso peroxidásica promedio en el	58

	fermentador de bandejas para una altura de lecho de 10 cm a 30 y 35 °C	
Tabla 3.14.	Actividad lacásica promedio en el fermentador de bandejas para una altura de lecho de 5 cm a 30 y 35 °C	60
Tabla 3.15.	Actividad lacásica promedio en el fermentador de bandejas para una altura de lecho de 10 cm a 30 y 35 °C	64
Tabla 3.16.	Actividad celulásica promedio en el fermentador de bandejas para una altura de lecho de 5 y 10 cm a 30 y 35 °C	65
Tabla 3.17.	Actividad lignino peroxidásica promedio en el fermentador de bandejas para una altura de lecho de 5 y 10 cm a 30 °C	66
Tabla 3.18.	Actividad lignino peroxidásica promedio en el fermentador de bandejas para una altura de lecho de 5 y 10 cm a 35 °C	68
Tabla 3.19.	Actividad manganeso peroxidásica promedio en el fermentador de bandejas para una altura de lecho de 5 y 10 cm a 30 °C	69
Tabla 3.20.	Actividad manganeso peroxidásica promedio en el fermentador de bandejas para una altura de lecho de 5 y 10 cm a 35 °C	71
Tabla 3.21.	Actividad lacásica promedio en el fermentador de bandejas para una altura de lecho de 5 y 10 cm a 30 °C	72
Tabla 3.22.	Actividad lacásica promedio en el fermentador de bandejas para una altura de lecho de 5 y 10 cm a 35 °C	74
Tabla 3.23.	Actividades lignino peroxidásicas máximas obtenidas para los 4 tratamientos realizados	75
Tabla 3.24.	Actividad lignino peroxidásica obtenida en los 4 tratamientos realizados en el fermentador de bandejas los respectivos días de máxima producción	77
Tabla 3.25.	Análisis de varianza del diseño experimental para la producción de enzima lignino peroxidasa	78
Tabla 3.26.	Actividades manganeso peroxidásicas máximas obtenidas para los 4 tratamientos realizados	78
Tabla 3.27.	Actividad manganeso peroxidásica obtenida en los 4 tratamientos realizados en el fermentador de bandejas los respectivos días de máxima producción	80
Tabla 3.28.	Análisis de varianza del diseño experimental para la producción de enzima manganeso peroxidasa	80
Tabla 3.29.	Actividades lacásicas máximas obtenidas para los 4 tratamientos realizados	81
Tabla 3.30.	Actividad lacásica obtenida en los 4 tratamientos realizados en el fermentador de bandejas los respectivos días de máxima producción	83
Tabla 3.31.	Análisis de varianza del diseño experimental para la producción de enzima lacasa	84
Tabla 3.32.	Mejor temperatura y altura de lecho para la producción de	84

	enzima lignino peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa por el hongo <i>Phanerochaete chrysosporium</i> en un fermentador de bandejas	
Tabla 3.33.	Actividad lignino peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa alcanzada en los días 2 y 3 de la fermentación a 35 °C y 5 cm de altura de lecho	85
Tabla 3.34.	Densidad de lecho para una altura de 5 cm y 10 cm	85
Tabla 3.35.	Coefficiente de rendimiento para el calor producido por el metabolismo del hongo <i>phanerochaete chrysosporium</i> de los 4 tratamientos llevados a cabo en el fermentador de bandejas	86
Tabla 3.36.	Coefficientes superficiales de transferencia de calor entre el lecho estacionario y el aire circundante para flujos de aire de 13, 20 y 30 L/min en el fermentador de bandejas a 35 °C	89
Tabla 3.37.	Número de bandejas máximas del fermentador para diferentes flujos de aire y temperaturas críticas de 36, 37 y 38 °C, para una altura de lecho de 5 cm y una temperatura de 35 °C	90
Tabla 3.38.	Parámetros utilizados en la ecuación del número Damköhler modificado a 35 °C y una altura de lecho de 5 cm	92
Tabla 3.39.	Parámetros de funcionamiento del fermentador de bandejas a escala piloto	93
Tabla 3.40.	Dimensiones del fermentador de bandejas a escala piloto, de las bandejas y número de deflectores para una carga de 7 kg	93
Tabla AVI.1.	Densidad óptica por fracción de peso seco para la fermentación a 35 °C y 5 cm de altura de lecho	122
Tabla AIX.1.	Variación de la humedad del sustrato con el tiempo para un flujo de aire de 13 L/min a 30 °C	128
Tabla AIX.2.	Variación de la temperatura del sustrato con el tiempo para un flujo de aire de 13 L/min a 30 °C	129
Tabla AIX.3.	Variación de la humedad del sustrato con el tiempo para un flujo de aire de 13 L/min a 35 °C	129
Tabla AIX.4.	Variación de la temperatura del sustrato con el tiempo para un flujo de aire de 13 L/min a 35 °C	130
Tabla AIX.5.	Variación de la humedad del sustrato con el tiempo para un flujo de aire de 20 L/min a 30 °C	130
Tabla AIX.6.	Variación de la temperatura del sustrato con el tiempo para un flujo de aire de 20 L/min a 30 °C	131
Tabla AIX.7.	Variación de la humedad del sustrato con el tiempo para un flujo de aire de 20 L/min a 35 °C	131
Tabla AIX.8.	Variación de la temperatura del sustrato con el tiempo para un flujo de aire de 20 L/min a 35 °C	132
Tabla AXI.1.	Absorbancia de las 3 réplicas para la enzima lignino	134

	peroxidasa a 30 °C y con una altura de lecho de 5 cm	
Tabla AXI.2.	Absorbancia de las 3 réplicas para la enzima lignino peroxidasa a 35 °C y con una altura de lecho de 5 cm	134
Tabla AXI.3.	Absorbancia de las 3 réplicas para la enzima lignino peroxidasa a 30 °C y con una altura de lecho de 10 cm	134
Tabla AXI.4.	Absorbancia de las 3 réplicas para la enzima lignino peroxidasa a 35 °C y con una altura de lecho de 10 cm	135
Tabla AXII.1.	Absorbancia de las 3 réplicas para la enzima manganeso peroxidasa a 30 °C y con una altura de lecho de 5 cm	136
Tabla AXII.2.	Absorbancia de las 3 réplicas para la enzima manganeso peroxidasa a 35 °C y con una altura de lecho de 5 cm	136
Tabla AXII.3.	Absorbancia de las 3 réplicas para la enzima manganeso peroxidasa a 30 °C y con una altura de lecho de 10 cm	136
Tabla AXII.4.	Absorbancia de las 3 réplicas para la enzima manganeso peroxidasa a 35 °C y con una altura de lecho de 10 cm	137
Tabla AXIII.1.	Absorbancia de las 3 réplicas para la enzima lacasa a 30 °C y con una altura de lecho de 5 cm	138
Tabla AXIII.2.	Absorbancia de las 3 réplicas para la enzima lacasa a 35 °C y con una altura de lecho de 5 cm	138
Tabla AXIII.3.	Absorbancia de las 3 réplicas para la enzima lacasa a 30 °C y con una altura de lecho de 10 cm	138
Tabla AXIII.4.	Absorbancia de las 3 réplicas para la enzima lacasa a 35 °C y con una altura de lecho de 10 cm	139
Tabla AXV.1.	Actividad enzimática de las 3 réplicas para la enzima lignino peroxidasa a 30 °C y con una altura de lecho de 5 cm	141
Tabla AXV.2.	Actividad enzimática de las 3 réplicas para la enzima lignino peroxidasa a 35 °C y con una altura de lecho de 5 cm	141
Tabla AXV.3.	Actividad enzimática de las 3 réplicas para la enzima lignino peroxidasa a 30 °C y con una altura de lecho de 10 cm	141
Tabla AXV.4.	Actividad enzimática de las 3 réplicas para la enzima lignino peroxidasa a 35 °C y con una altura de lecho de 10 cm	142
Tabla AXVII.1.	Actividad enzimática de las 3 réplicas para la enzima manganeso peroxidasa a 30 °C y con una altura de lecho de 5 cm	144
Tabla AXVII.2.	Actividad enzimática de las 3 réplicas para la enzima manganeso peroxidasa a 35 °C y con una altura de lecho de 5 cm	144
Tabla AXVII.3.	Actividad enzimática de las 3 réplicas para la enzima manganeso peroxidasa a 30 °C y con una altura de lecho de 10 cm	144
Tabla AXVII.4.	Actividad enzimática de las 3 réplicas para la enzima	145

	manganeso peroxidasa a 35 °C y con una altura de lecho de 10 cm	
Tabla AXIX.1.	Actividad enzimática de las 3 réplicas para la enzima lacasa a 30 °C y con una altura de lecho de 5 cm	147
Tabla AXIX.2.	Actividad enzimática de las 3 réplicas para la enzima lacasa a 35 °C y con una altura de lecho de 5 cm	147
Tabla AXIX.3.	Actividad enzimática de las 3 réplicas para la enzima lacasa 30 °C y con una altura de lecho de 10 cm	147
Tabla AXIX.4.	Actividad enzimática de las 3 réplicas para la enzima lacasa a 35 °C y con una altura de lecho de 10 cm	148

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1.1.	Estructura general de un hongo 1
Figura 1.2.	Ciclo de vida de un hongo basidiomicete. (A) Basidioesporas. (B) Monocarión. (C) Somatogamia. (D) Dicarión. (K) Basidio con esporas 2
Figura 1.3.	Degradación aeróbica de la madera a CO ₂ , agua y energía 3
Figura 1.4.	Hifa del hongo de pudrición blanca <i>Trametes versicolor</i> penetrando la pared celular 3
Figura 1.5.	(A) Cuerpo fructífero <i>P. chrysosporium</i> . (B) Vista microscópica de las hifas del hongo <i>P. chrysosporium</i> . 5
Figura 1.6.	Ciclo catalítico de la enzima lignino peroxidasa 8
Figura 1.7.	Estructura del alcohol veratrílico 9
Figura 1.8.	Esquema de la acción de la enzima lignino peroxidasa sobre la molécula subestructura de la lignina. ruptura del (1) enlace C _α -C _β en la cadena lateral (2) enlace β-O-4 entre la cadena lateral y el siguiente anillo (3) anillo aromático 9
Figura 1.9.	Ciclo catalítico de la enzima manganeso peroxidasa 10
Figura 1.10.	Ciclo catalítico de la enzima catalasa 12
Figura 1.11.	Mecanismo de acción de los diferentes tipos de celulasas 13
Figura 1.12.	Diagrama del arreglo que forman las partículas sólidas de sustrato, la fase gaseosa, la fase líquida y las hifas del hongo 15
Figura 1.13.	Fragmento de la estructura de la lignina 18
Figura 1.14.	Precusores de la lignina. (A) Alcohol p-cumaril (B) coniferil (C) sinapil 19
Figura 1.15.	Diagrama de la estructura de la celulosa 19
Figura 1.16.	Esquema de la asociación entre la celulosa (C), hemicelulosa (H) y lignina (L) en la pared celular de la madera 20
Figura 1.17.	Tipos de bioreactores en SSF. Grupo (I) sin agitación y aireación no forzada, Grupo (II) sin agitación y aireación forzada, Grupo (III) con aireación no forzada y agitación continua o intermitente, Grupo (IV) con aireación forzada y agitación continua o intermitente 21
Figura 1.18.	Transferencia de calor y de masa dentro de un fermentador de bandejas. (W) pared de la bandeja; (B) lecho; (H) espacio entre bandejas; (1) liberación de calor metabólico; (2) entrada de masa y energía por el aire de ingreso; (3) salida de masa y energía por el aire que abandona la bandeja; (4) conducción y difusión dentro del lecho; (7) transferencia de calor del lecho a la pared de la bandeja; (8) conducción de calor en la pared de la bandeja; (11) flujo de aire dentro del 22

	espacio libre entre bandejas; (12) transferencia de calor desde la pared al espacio libre entre bandejas	
Figura 1.19.	Perfiles de concentración de oxígeno en una bandeja con fondo sin perforar (izquierda) y una bandeja con fondo perforado (derecha)	26
Figura 2.1.	(A) Fermentador y (B) soporte interno con deflectores utilizados para el proceso de fermentación a escala de laboratorio	33
Figura 2.2.	Esquema del sistema de control de temperatura y humedad del aire que ingresa al fermentador de bandejas	34
Figura 2.3.	Esquema de división de las cajas petri con malta agar y 0,7 % de aserrín para la siembra en frascos con aserrín del 70 % de humedad	37
Figura 3.1.	Actividades lignino peroxidadas obtenidas en el fermentador de bandejas a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 5 cm	51
Figura 3.2.	Actividades lignino peroxidadas obtenidas en el fermentador de bandejas a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 10 cm	54
Figura 3.3.	Actividades manganeso peroxidásicas obtenidas en el fermentador de bandejas a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 5 cm	56
Figura 3.4.	Actividades lignino y manganeso peroxidásicas obtenidas en el fermentador de bandejas a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 5 cm	57
Figura 3.5.	Actividades manganeso peroxidásicas obtenidas en el fermentador de bandejas a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 10 cm	59
Figura 3.6.	Actividades lacásicas obtenidas en el fermentador de bandejas a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 5 cm	60
Figura 3.7.	Actividades lacásica y manganeso peroxidásica obtenidas en el fermentador de bandejas a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 5 cm	62
Figura 3.8.	Actividades lacasas obtenidas en el fermentador de bandejas a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 10 cm	64
Figura 3.9.	Actividades lignino peroxidásicas obtenidas en el fermentador de bandejas a 30 °C para una altura de lecho de 5 y 10 cm	67
Figura 3.10.	Actividades lignino peroxidásicas obtenidas en el fermentador de bandejas a 35 °C para una altura de lecho de 5 y 10 cm	68
Figura 3.11.	Actividades manganeso peroxidásicas obtenidas en el fermentador de bandejas a 30 °C para una altura de lecho de 5 y 10 cm	70
Figura 3.12.	Actividades manganeso peroxidásicas obtenidas en el fermentador de bandejas a 35 °C para una altura de lecho de 5 y 10 cm	71

Figura 3.13.	Actividades lacásicas obtenidas en el fermentador de bandejas a 30 °C para una altura de lecho de 5 y 10 cm	73
Figura 3.14.	Actividades lacásicas obtenidas en el fermentador de bandejas a 35 °C para una altura de lecho de 5 y 10 cm	74
Figura 3.15.	Actividades lignino peroxidásicas obtenidas en el fermentador de bandejas a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 5 y 10 cm	76
Figura 3.16.	Actividades manganeso peroxidásicas obtenidas en el fermentador de bandejas a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 5 y 10 cm	79
Figura 3.17.	Actividades lacásicas obtenidas en el fermentador de bandejas a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 5 y 10 cm	82
Figura 3.18.	Curva de crecimiento del hongo <i>Phanerochaete chrysosporium</i> en función de la densidad óptica para una temperatura de 35 °C y una altura de lecho de 5 cm en el fermentador de bandejas	88
Figura 3.19.	Efecto del flujo de aire y la temperatura crítica en el número de bandejas máximas obtenidas para el fermentador para una altura de lecho de 5 cm y una temperatura de 35 °C	91
Figura 3.20.	Vista isométrica del fermentador de bandejas a escala piloto. (Todas las dimensiones se encuentran en centímetros)	95
Figura 3.21.	Vista frontal del fermentador (en negro), del soporte interno (en azul) y bandejas (en verde). (todas las dimensiones se encuentran en centímetros)	96
Figura 3.22.	Vista lateral del fermentador (en negro), del soporte interno (en azul) y las bandejas (en verde). (todas las dimensiones se encuentran en centímetros)	97
Figura 3.23.	Vista frontal del fermentador (en negro), del soporte interno (en azul), de las bandejas (en verde) y los deflectores acoplados (en rojo). (todas las dimensiones se encuentran en centímetros)	98

ÍNDICE DE ANEXOS

	PÁGINA
ANEXO I Determinación de resinas, ceras y grasas 112	
ANEXO II Determinación de celulosa	
ANEXO III Determinación de lignina	
ANEXO IV Determinación de la densidad del lecho	
ANEXO V Determinación del coeficiente de rendimiento para el calor producido por el metabolismo	120
ANEXO VI Determinación de la velocidad de crecimiento específica a la mejor temperatura	
ANEXO VII Determinación de la densidad del aire húmedo que ingresa al fermentador	
ANEXO VIII Informe de resultados del análisis del aserrín de eucalipto	
ANEXO IX Datos de la variación de humedad y temperatura del sustrato en cada una de las bandejas	
ANEXO X Determinación del número de bandejas del fermentador a escala piloto	
ANEXO XI Datos de absorbancia para la enzima lignino peroxidasa	
ANEXO XII Datos de absorbancia para la enzima manganeso peroxidasa	
ANEXO XIII Datos de absorbancia para la enzima lacasa	
ANEXO XIV Determinación de la actividad lignino peroxidásica de los extractos	

ANEXO XV

Datos de actividad enzimática para la lignino peroxidasa

ANEXO XVI

Determinación de la actividad manganeso peroxidasa de los extractos

ANEXO XVII

Datos de actividad enzimática para la manganeso peroxidasa

ANEXO XVIII

Determinación de la actividad lacasa de los extractos

ANEXO XIX

Datos de actividad enzimática para la lacasa

RESUMEN

El objetivo de este proyecto fue diseñar un fermentador de bandejas a escala piloto para la producción de enzima lignino peroxidasa, manganeso peroxidasa, lacasa y celulasa por el hongo *Phanerochaete chrysosporium* mediante fermentación en medio sólido. Para esto se estudió la producción enzimática a dos temperaturas: 30 y 35 °C, y 2 alturas de lecho: 5 y 10 cm en un fermentador a escala laboratorio.

Para determinar las mejores condiciones de temperatura y altura de lecho para la producción enzimática se inoculó el hongo en un fermentador de bandejas a escala laboratorio, se trabajó con un flujo de aire de 13 L/min para mantener la temperatura y humedad deseada. La actividad lignino peroxidásica se midió por el método de formación de aldehído veratrílico a partir de alcohol veratrílico; para la actividad manganeso peroxidásica se utilizó el método de oxidación del rojo fenol; la actividad lacásica se determinó por oxidación del ABTS y la actividad celulásica se midió con el método DNS.

La actividad enzimática se expresó en Unidades Internacionales (UI) por 1 000 gramos de sustrato seco, donde una Unidad Internacional se definió como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de una μmol de sustrato a producto por minuto.

La mayor actividad lignino peroxidásica fue de 19,769 U/1 000 gss, se obtuvo en el día 2 de fermentación al trabajar con una temperatura de 35 °C y una altura de lecho de 5 cm; para la enzima manganeso peroxidasa se obtuvo 13,876 U/1 000 gss el mismo día y bajo las mismas condiciones. La mayor actividad lacásica obtenida fue de 6,739 U/1 000 gss, se obtuvo el día 3 de fermentación a 35 °C y 5 cm de altura de lecho. No se detectó actividad celulásica en el período de fermentación.

De acuerdo a las mejores condiciones de temperatura y altura de lecho para la producción enzimática se determinó que el flujo de aire que ingresa debe ser

30 L/min para que el fermentador a escala piloto de 10 bandejas y con una carga total de 7 kg mantenga las mismas condiciones de operación y permita obtener el mismo rendimiento que a nivel laboratorio.

INTRODUCCIÓN

Aproximadamente 5 billones de toneladas métricas de “desechos” agroindustriales son producidos anualmente. Por esta razón en la actualidad el aprovechamiento de los residuos lignocelulósicos para usos biotecnológicos y como fuente de energía ha tomado gran importancia (United Nations Environment Programme, 2011, p. 2).

Los residuos lignocelulósicos pueden provenir de partes de plantas como semillas o tallos provenientes de la actividad agrícola o como subproductos al procesarlos; de la industria de pulpa y papel y de la actividad forestal. (Grunwald, 2015, p. 380). Lamentablemente la mayor parte es quemada para obtener energía y esto no se limita a los países en desarrollo sino que es un fenómeno a nivel mundial.

Este tipo de materia prima considerada como “desechos” se puede utilizar para obtener varios productos de alto valor como biocombustibles, químicos, alimentos para animales, enzimas, antibióticos, etc (Howard, Abotsi, Jansen Van Rensburg y Howard, 2003, p. 606).

Los avances en la investigación de microorganismos conocidos como hongos de pudrición blanca y sus enzimas, capaces de degradar los materiales lignocelulósicos han mostrado potencial en varias industrias como la producción de papel, alimentación animal, biotransformación, bioremediación, producción de químicos, entre otras (Kuhad y Singh, 2013, p. 1).

La producción de enzimas celulasas y hemicelulasas representa el 20 % de más de 1 billón de dólares que representa la venta de enzimas a nivel mundial. Son usadas principalmente para el pulpaje y blanqueamiento en la industria del papel y en conjunto con enzimas ligninolíticas, existen varias patentes para procesos de deslignificación de madera. Mediante este proceso de biopulpaje se logran ahorros de energía del 30 – 38 % (Howard et al., 2003, p. 605).

Además las enzimas producidas por este tipo de hongos, entre las cuales están las ligninasas y lacasas, por su baja especificidad pueden degradar compuestos aromáticos contaminantes como diclorofenol, dinitrotolueno y antraceno y gran variedad de colorantes sintéticos utilizados en la industria textil (Rosales, Couto y Sanromán, 2002, p. 702).

El método de fermentación que utiliza para obtener este tipo de enzimas se denomina Fermentación en Medio Sólido (SSF) y en la actualidad ciertas características como su bajo consumo de agua, sus mayores rendimientos y la posibilidad de aprovechar “desechos” agroindustriales como sustratos la han convertido en una importante alternativa frente al proceso convencional de fermentación sumergida (SLF) (Chen, 2013, p. 4).

La fermentación en medio sólido permite que los microorganismos se desarrollen en un medio muy similar a su hábitat natural y esto influye en varios aspectos de su morfología. Se ha demostrado que las enzimas producidas mediante SSF poseen características diferentes a las obtenidas por fermentación sumergida o en medio líquido (SLF) (Viniegra-Gonzalez, 1997, p. 8).

A diferencia de la fermentación sumergida, en la fermentación en medio sólido no se cuenta con criterios para el escalado de bioreactores. La descripción de los procesos de transferencia de calor y masa en este tipo de fermentadores es más compleja y solamente se cuenta con modelos que pueden servir como una guía para el proceso de escalado. Uno de los tipos de fermentadores más utilizados a nivel comercial es el de bandejas y no se cuenta con criterios claros para llevar a cabo su escalado a nivel industrial (Mitchell, Pandey, Sangsurasak y Krieger, 1999, p. 167).

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 HONGO *Phanerochaete chrysosporium*

1.1.1 HONGOS

Los hongos son organismos eucariotas saprófitos que cumplen un papel importante dentro de los ciclos de descomposición de la materia orgánica y de esta forma la reutilización de nutrientes como nitrógeno y carbono (Hamilton, 2006, p. 1).

Existen más de 80 000 especies y todos son organismos saprófitos, obteniendo nutrientes del medio ambiente por absorción. Los hongos excretan enzimas que permiten descomponer los sustratos y así absorber los nutrientes necesarios por pequeñas fibras conocidas como hifas (Hamilton, 2006, p. 5). En la Figura 1.1 se muestra los componentes básicos de la estructura del hongo.

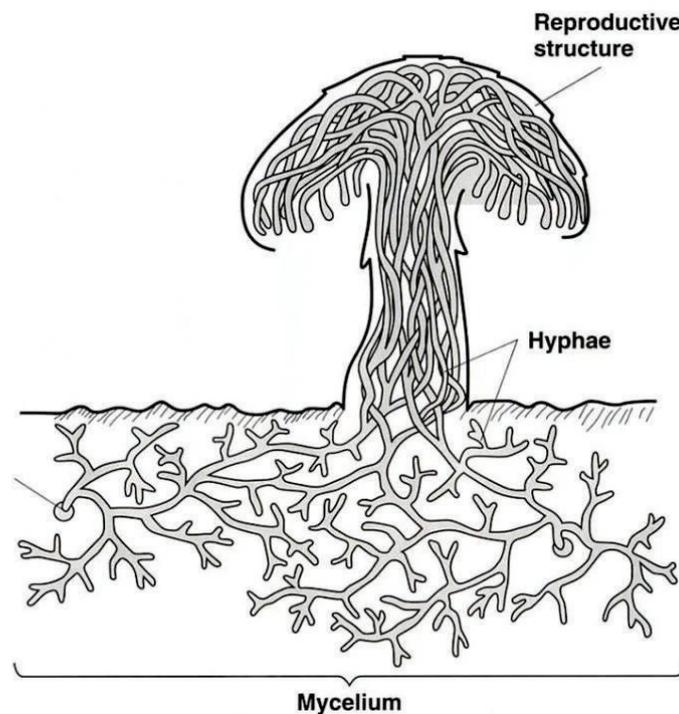


Figura 1.1. Estructura general de un hongo
(Hamilton, 2006, p. 5)

La mayoría de los hongos se clasifican por la forma de esporulación en la etapa de reproducción sexual. Existen 7 grupos reconocidos: Micomicota, Chitridiomicota, Zigomicota, Ascomicota, Basidiomicota, Deuteromicota y Glomeromicota (Hamilton, 2006, p. 9).

Tanto los hongos basidiomicetes como ascomicetes tienen la capacidad de producir cantidades considerables de enzimas extracelulares que pueden degradar materiales lignocelulósicos como madera para liberar los azúcares fermentables (Znameroski y Glass, 2013, p. 1).

1.1.2 HONGOS BASIDIOMECETES

En la Figura 1.2 se presenta el ciclo de vida de un hongo basidiomeceto. La basidioespora (A) germina en el micelio principal o monocarión (B). Estos hongos no forman órganos sexuales sino que se unen sus hifas por somatogamia (C), y si los núcleos son compatibles se forma el dicarión (D). Las hifas crecen una a continuación de la otra (D-G) y finalmente se produce la meiosis para formar las basidioesporas (H-K) (Schmidt, 2006, p. 21).

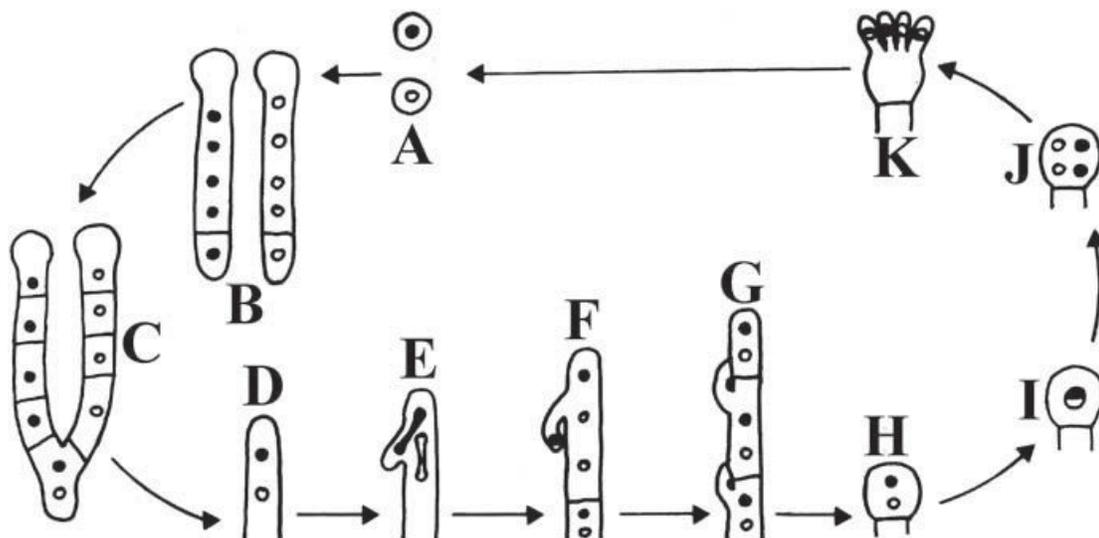


Figura 1.2. Ciclo de vida de un hongo Basidiomycete. (A) basidiosporas. (B) monocarión. (C) somatogamia. (D) dicarión. (K) basidio con esporas
(Schmidt, 2006, p. 21)

La mayoría de hongos utilizan los nutrientes disponibles en la madera, pero los hongos basidiomycetes utilizan el carbono de los componentes complejos de la pared celular: celulosa, hemicelulosa y lignina (Schmidt, 2006, p. 54). En la

celulosa, hemicelulosa, lignina de la madera – (ectoenzimas)→
azúcares, derivados de la lignina – (enzimas intracelulares)→ $\text{CO}_2 + 2(\text{H})$
 $2(\text{H}) + 1/2\text{O}_2$ – (respiración)→ $\text{H}_2\text{O} + \text{energía (ATP)}$

Figura 1.3 se muestra el proceso de degradación de la madera.

Figura 1.3. Degradación aeróbica de la madera a CO_2 , agua y energía

La celulosa, hemicelulosa y lignina son macromoléculas muy grandes para ser absorbidas directamente por las hifas. Por lo tanto las hifas deben penetrar en la pared celular y degradar sus componentes a pequeños fragmentos mediante enzimas extracelulares y así absorberlos y metabolizarlos por medio de enzimas intracelulares (Schmidt, 2006, p. 90). En la Figura 1.4 se muestra cómo penetra el hifa en la pared celular.

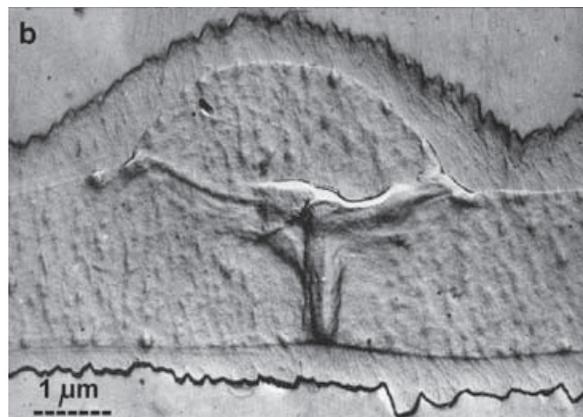


Figura 1.4. Hifa del hongo de pudrición blanca *Trametes versicolor* penetrando la pared celular
(Schmidt, 2006, p. 139)

Estos hongos se han clasificado de acuerdo a la apariencia que tiene la madera después de haber sido descompuesta. Se los ha clasificado en 3 grupos: hongos

de pudrición suave, hongos de pudrición café y hongos de pudrición blanca. En la Tabla 1.1 se presenta sus principales características (Faraco, 2013, p. 96).

Tabla 1.1. Comparación de los hongos de pudrición blanca, café y suave

	Pudrición Blanca	Pudrición café	Pudrición suave
Apariencia	Blanca y esponjosa; pérdida de resistencia	Café, quebradiza, polvosa, pérdida de resistencia	Suave en ambientes húmedos; café y desmoronado en ambientes secos
Tipo de madera	Madera dura y suave	Principalmente madera suave	Principalmente madera dura
Componente afectado	Celulosa, hemicelulosa y lignina	Celulosa y hemicelulosa, lignina modificada ligeramente	Celulosa y hemicelulosa, lignina modificada ligeramente
Hongos pertenecientes	<i>Trametes versicolor</i> <i>Phanerochaete chrysosporium</i> <i>Heterobasidium annosum</i> <i>Ganoderma australe</i> <i>Phlebia tremelosa</i> <i>Pleurotus spp.</i>	<i>Laetiporus sulfureus</i> <i>Postia placenta</i> <i>Serpula lacrymans</i>	<i>Thielavia terrestres</i> <i>Paecilomyces spp.</i> <i>Trichoderma reesei</i>

(Kubicek, 2012, p. 32)

1.1.2.1 Hongos de pudrición suave

Los hongos de pudrición suave están compuestos principalmente por hongos de la familia ascomicete. Principalmente descomponen polisacáridos, mientras que la lignina queda intacta. Aunque se ha demostrado que los hongos pertenecientes a esta clasificación pueden producir enzimas modificadoras de la lignina como lacasas (Faraco, 2013, p. 96).

1.1.2.2 Hongos de pudrición café

Metabolizan principalmente a la celulosa y hemicelulosa presente en las paredes celulares de la madera. Los residuos después de la degradación tienen una coloración café debido a que la lignina es modificada parcialmente. Estos hongos son de la familia basidiomicota (Faraco, 2013, p. 96).

1.1.2.3 Hongos de pudrición blanca

Se conocen pocos organismos que efectivamente utilizan todos los componentes de la lignocelulosa. Los hongos basidiomicetes de pudrición blanca son los más eficientes degradadores de lignina y además transforman la celulosa y la hemicelulosa; dónde el hongo *Phanerochaete chrysosporium* ha sido uno de los más estudiados (Howard et al., 2003, p. 607).

1.1.3 *Phanerochaete chrysosporium*

Es un hongo basidiomicete de pudrición blanca amigable con el medioambiente que participa en la degradación de maderas duras. Su cuerpo fructífero es muy plano y el hongo tiende a formar una delgada capa sobre el sustrato (Kuhad y Singh, 2013, p. 14). En la Figura 1.5 se muestra el sistema de hifas y el cuerpo fructífero del hongo.



Figura 1.5. (A) Cuerpo fructífero *P. chrysosporium*. (B) Vista microscópica de las hifas del hongo *P. chrysosporium*.
(Volk, 1997)

El hongo *Phanerochaete chrysosporium* es termotolerante pero se desarrolla mejor entre 20 y 40 °C, aunque puede soportar temperaturas de hasta 50 °C (Schmidt, 2006, p. 67).

Las enzimas producidas por el hongo además de degradar la lignina pueden degradar ciertos contaminantes tóxicos aromáticos. En la Tabla 1.2 se presentan algunas de las enzimas producidas por el hongo *P. chrysosporium*.

Tabla 1.2. Enzimas ligninolíticas producidas por el hongo *P. chrysosporium* responsables de la degradación de la lignina

Enzima	Cofactor	Sustrato/mediador	Principal efecto o reacción
Lignino Peroxidasa	H ₂ O ₂	Alcohol veratrílico	Anillos aromáticos oxidados a radicales catiónicos
Manganeso Peroxidasa	H ₂ O ₂ Mn ²⁺	Ácidos orgánicos	Mn ²⁺ es oxidado a Mn ³⁺ Oxidación de compuestos fenólicos a radicales fenoxi
Lacasa	O ₂	ABTS	Oxidación de fenoles a radicales fenoxil; radicales mediadores

(Kuhad y Singh, 2013, p. 15)

El sistema enzimático de degradación se caracteriza por despolimerizar la lignina y dejar intacta la celulosa, lo cual se conoce como degradación selectiva. Esto no significa que este hongo no degrade la celulosa sino que primero degrada la lignina y la hemicelulosa (Nigam y Pandey, 2009, p. 299).

1.1.4 ENZIMAS

Casi en su totalidad todas las enzimas son proteínas, que incrementan la velocidad de una reacción química sin estar presentes en los productos de la reacción, es decir sin ser alteradas en el proceso. Son muy específicas y requieren condiciones determinadas de temperatura y pH para catalizar una reacción (Hames y Hooper, 2005, p. 84).

La actividad enzimática se puede medir por la velocidad de formación de producto o la velocidad de consumo de reactivo. Si el sustrato o el producto absorben luz a una determinada longitud de onda, entonces se puede medir los cambios en la concentración según la variación de la absorbancia mediante un espectrofotómetro (Hames y Hooper, 2005, p. 87).

El cambio de concentración puede ser determinado a partir de la absorbancia medida por medio de la Ecuación 1.1. Esta ecuación se conoce como la Ley de Lambert y Beer (Nobel, 2012, p. 230).

$$A = \epsilon \cdot c \cdot b$$

[1.1]

Donde

A: absorbancia de la solución a una longitud de onda determinada

ϵ : coeficiente de absorción o extinción a una longitud de onda determinada ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

b: camino óptico (cm)

La definición más utilizada de actividad enzimática es la Unidad Internacional (UI), definida por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de una μmol de sustrato a producto por minuto bajo condiciones específicas (Shukla, 2009, p. 30).

1.1.4.1 Lignino Peroxidasa (LiP) E.C. 1.11.1.14

Comúnmente conocida como ligninasa, fue descubierta en 1983 en el hongo de pudrición blanca *Phanerochaete chrysosporium*. Es una peroxidasa extracelular que contiene un grupo hemo, se caracteriza por ser dependiente del H_2O_2 y poseer un potencial redox alto (Kuhad y Singh, 2013, p. 16).

Posee baja especificidad hacia sustratos por lo cual también actúa sobre varios compuestos similares a la lignina. Múltiples isoenzimas son producidas por el hongo *P. chrysosporium* y se han designado como H1 hasta H10 de acuerdo a su punto isoeléctrico. Sus masas moleculares están entre 38 y 47 kDa (Kuhad y Singh, 2013, p. 16; Nigam y Pandey, 2009, p. 251).

La función de esta enzima en el sistema de degradación de la lignina puede ser la transformación posterior de los fragmentos de lignina liberados por la acción de la enzima manganeso peroxidasa (MnP), ya que muchos estudios muestran que un gran número de hongos basidiomicetes de pudrición blanca no producen esta enzima, sino solamente manganeso peroxidasa y lacasa (Kuhad y Singh, 2013, p. 17).

La producción por parte del hongo *P. chrysosporium* se da únicamente durante el metabolismo secundario, es decir cuando el crecimiento primario se detiene por falta de nutrientes. El metabolismo secundario se produce por limitación de nitrógeno, azufre o carbono (Schmidt, 2006, p. 103). En la Figura 1.6 se muestra el ciclo catalítico de esta enzima.

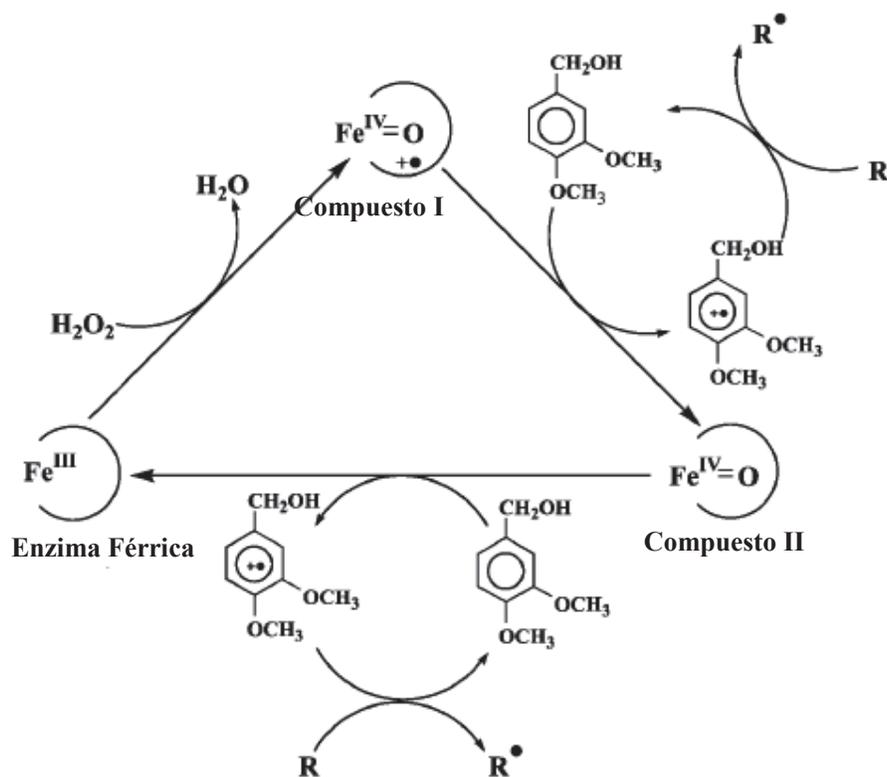


Figura 1.6. Ciclo catalítico de la enzima lignino peroxidasa (Modificada)
(Cameron, Timofeevski y Aust, 2000, p. 753)

La interacción de la enzima lignino peroxidasa con su sustrato se produce por un mecanismo denominado de ping-pong. La enzima original o nativa reacciona con el peróxido de hidrógeno y genera el Compuesto I, este puede oxidar una molécula de sustrato o un mediador y ser reducido al Compuesto II. El Compuesto II oxida otra molécula de sustrato y regresa a su forma original (Nigam y Pandey, 2009, p. 401).

En algunos casos la enzima no puede oxidar directamente al sustrato, sino que se necesita la acción de un mediador. El alcohol veratrílico (alcohol 3,4-dimetoxi bencil), cuya estructura se presenta en la Figura 1.7, es un buen sustrato de la lignino peroxidasa y puede actuar como mediador redox para la oxidación indirecta de otros sustratos (Nigam y Pandey, 2009, p. 401).

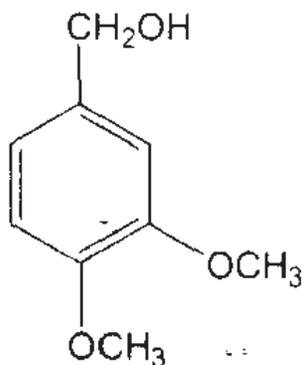


Figura 1.7. Estructura del alcohol veratrílico
(Brambl y Marzluf, 2004, p. 251)

Los radicales producidos por la acción de la enzima actúan como oxidantes mediante reacciones no enzimáticas y así atacan los principales enlaces de la molécula de lignina. En la Figura 1.8 se muestran las reacciones iniciadas por la enzima lignino peroxidasa.

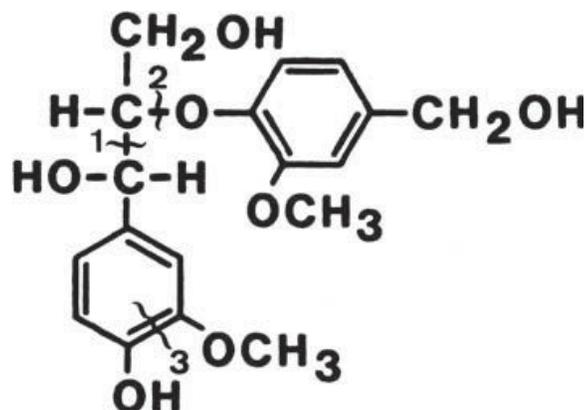


Figura 1.8. Esquema de la acción de la enzima lignino peroxidasa sobre la molécula subestructura de la lignina. Ruptura del (1) enlace C_{α} - C_{β} en la cadena lateral (2) enlace β -O-4 entre la cadena lateral y el siguiente anillo (3) anillo aromático
(Schmidt, 2006, p. 103)

A diferencia de la celulosa y hemicelulosa, a lignina no contiene enlaces disponibles para hidrólisis directa a lo largo de su cadena. En lugar de esto se tiene una cadena tridimensional amorfa con enlaces C – C, C – O – C y β – O – 4, este último es el más común (Nigam y Pandey, 2009, p. 400).

1.1.4.2 Manganeso Peroxidasa (MnP) E.C. 1.11.1.13

Peroxidasa extracelular que posee un grupo hemo y requiere de Mn^{2+} como su sustrato reductor. Fue descubierta poco después que la enzima lignino peroxidasa en el hongo *P. chrysosporium*, y al igual que la enzima lignino peroxidasa se encuentran diferentes isoenzimas con un peso molecular entre 32 y 62,5 kDa (Kuhad y Singh, 2013, p. 17). En la Figura 1.9 se muestra el ciclo catalítico de esta enzima.

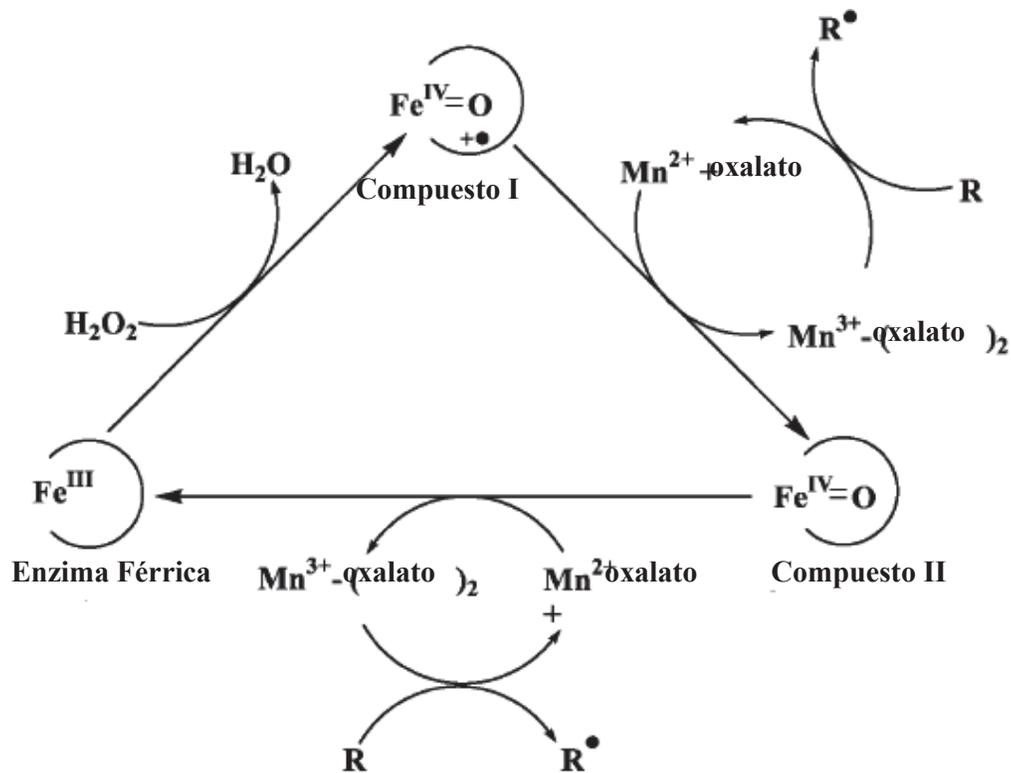


Figura 1.9. Ciclo catalítico de la enzima manganeso peroxidasa (Modificado)
(Cameron, Timofeevski y Aust, 2000, p. 753)

La enzima original (Compuesto I) es oxidada por el H_2O_2 que se transforma en H_2O , este es reducido por el ión Mn^{2+} y por los fenoles al Compuesto II. El Compuesto II entonces es reducido a su forma original por el Mn^{2+} y no por fenoles (Brambl y Marzluf, 2004, p. 252).

El potencial redox del sistema MnP – Mn es menor que el de la enzima lignino peroxidasa y solo oxida compuestos fenólicos. Esto plantea la pregunta de cuál es el papel de esta enzima en la degradación de la lignina. La oxidación de la lignina por el Mn^{3+} sugiere que actúa sobre los residuos fenólicos y no fenólicos de la lignina (Brambl y Marzluf, 2004, p. 252).

1.1.4.3 Lacasa E.C. 1.10.3.2

Polifenol oxidasa parte de la familia de oxidasas azul multicobre. Esta enzima posee una cantidad amplia de sustratos, preferentemente compuestos fenólicos. Pero en presencia de mediadores puede oxidar sustratos con un potencial redox mayor al suyo (Nigam y Pandey, 2009, p. 403).

Al igual que los quelantes Mn(III), la enzima lacasa oxida las unidades fenólicas de la lignina a radicales fenoxi, los cuales pueden romper los enlaces carbono-carbono en las cadenas laterales de la molécula de lignina (Brambl y Marzluf, 2004, p. 253).

Muchos hongos de pudrición blanca producen esta enzima, pero algunos no. Esto indica que esta enzima no es indispensable en el proceso de degradación de la lignina. No se tiene claro si el hongo *P. chrysosporium* produce o no esta enzima debido a que algunos investigadores han reportado la presencia de enzima en cultivos con exceso de Cu^{2+} , pero estudios recientes afirman que el genoma del hongo *P. chrysosporium* no presenta las secuencias de codificación de la lacasa (Larrondo, Salas, Melo, Vicuña y Cullen, 2003, p. 6262)

A diferencia de las enzimas lignino y manganeso peroxidasas, la lacasa no necesita del H_2O_2 . El centro activo de la molécula de lacasa posee 4 iones de cobre que permiten atrapar oxígeno. La enzima oxida 4 moléculas de sustrato mientras se lleva a cabo una reducción simultánea de oxígeno molecular a agua (Nigam y Pandey, 2009, p. 403).

En la Figura 1.10 se muestra el mecanismo de acción de la enzima lacasa sobre las subestructuras de la lignina.

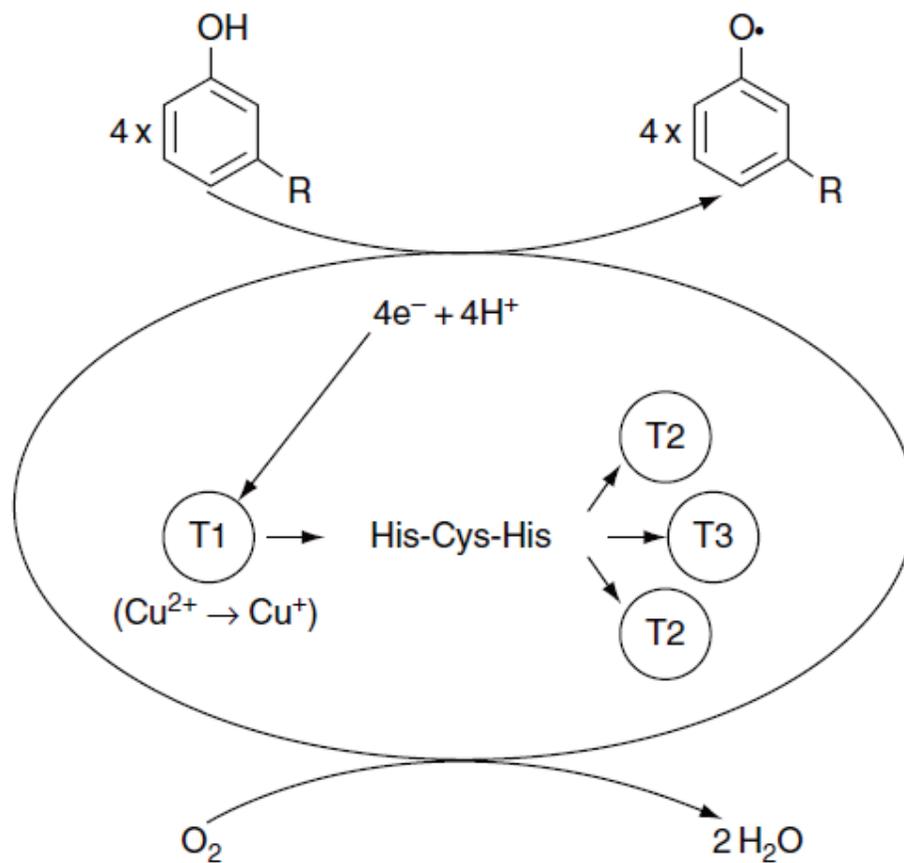


Figura 1.10. Ciclo catalítico de la enzima catalasa
(Nigam y Pandey, 2009, p. 403)

1.1.4.4 Celulasas

No existe una sola enzima celulasa sino que se trata de una mezcla compleja de enzimas que poseen diferente especificidad por los enlaces glucosídicos. Se pueden dividir las celulasas en 3 clases: endoglucanasas o endo-1,4- β -glucanasa (E.C. 3.2.1.4), celobiohidrolasa o exo-1,4- β -glucanasa (E.C. 3.2.1.91) y β -glucosidasa (E.C. 3.2.1.21) (Howard et al., 2003, p. 612).

El primer paso en la degradación de la celulosa es la acción de las endoglucanasas (EG) sobre las zonas amorfas de la celulosa, estas liberan fragmentos pequeños con terminaciones reductoras y no reductoras. Las exoglucanasas (CBH) entonces actúan sobre las terminaciones libres para liberar

celobiosa, la cual es finalmente hidrolizada por la β -glucosidasa (BGL) para obtener glucosa como producto final (Nigam y Pandey, 2009, p. 372).

El diagrama de las etapas involucradas en la degradación de la cadena de celulosa por acción de las enzimas endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas como se muestra en la Figura 1.11.

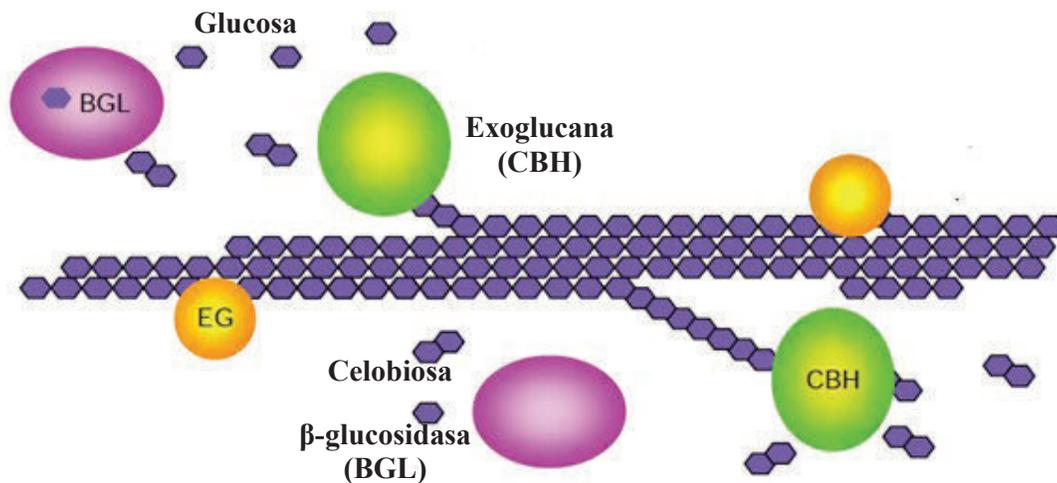


Figura 1.11. Mecanismo de acción de los diferentes tipos de celulasas (Modificado)
(Nigam y Pandey, 2009, p. 372)

En hongos basidiomicetes de pudrición blanca la celulosa como fuente de carbono induce la producción de celulasas, pero la celulosa se encuentra atrapada en lignina como varas de acero en el concreto. Por lo tanto primero se debe degradar la lignina para utilizar la celulosa pues no se conoce ningún hongo de pudrición blanca que pueda utilizar la lignina como única fuente de carbono (Schmidt, 2006, p. 88; Brambl y Marzluf, 2004, p. 250).

1.2 PRODUCCIÓN DE ENZIMAS POR FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

La fermentación en medio sólido no es un proceso nuevo, fue desarrollada en muchos lugares del mundo como Japón con el proceso koji para la producción de salsa de soja y en general para la preparación de alimentos fermentados tradicionales (Mitchell, Krieger y Berovic, 2006, p. 6).

Después de 1940 la industria de la fermentación sumergida (SLF) creció rápidamente por la demanda de acetona, butanol y penicilina. Pero debido a su alto consumo de energía y la gran cantidad de desperdicios, la fermentación en medio sólido se ha convertido en una mejor opción por el ahorro de agua, energía y la posibilidad de reutilizar desechos agro-industriales (Chen, 2013, p. 2).

La diferencia más clara entre la fermentación en medio sólido (SSF) y sumergida (SLF) es la fase continua, en SSF se maneja una fase continua gaseosa mientras que en SLF es líquida. En la Tabla 1.3 se presentan las principales diferencias entre los dos tipos de fermentación.

Tabla 1.3. Comparación detallada de los procesos de fermentación en medio sólido y líquido

Fermentación en medio sólido	Fermentación sumergida (SLF)
No existe agua libre, y el contenido de agua del sustrato es bajo	El principal componente del cultivo es el agua
El medio es muy similar al natural. Algunas enzimas solo se pueden obtener con este tipo de fermentación	Los microorganismos crecen en un medio líquido artificial
Inóculo grande $\geq 10\%$	Inóculo menor al 10 %
Consumo de energía bajo	Una gran cantidad de energía es utilizada para disolver el oxígeno en el agua
Los microorganismos crecen en la superficie del sustrato o en los poros de la matriz	Los microorganismos se distribuyen homogéneamente
Al terminar la fermentación se obtiene sustrato húmedo y una alta concentración de producto	Al terminar la fermentación el medio es líquido y la concentración de producto es baja
Una mayor concentración de sustrato puede provocar una mayor concentración de producto	El incremento de la concentración de sustrato lleva al fenómeno de fluido no-newtoniano

Tabla 1.3. Comparación detallada de los procesos de fermentación en medio sólido y líquido (continuación...)

Fácil sobrecalentamiento debido a la dificultad en remover el calor	La temperatura de fermentación es controlada fácilmente
El crecimiento del microorganismo, la absorción de nutrientes y la producción de metabolitos no es homogénea	Fermentación homogénea
Materia prima de bajo costo	Materia prima de alto costo
Baja actividad de agua	Alta actividad de agua
El proceso de extracción es simple; poca cantidad de desperdicios líquidos orgánicos	El proceso de extracción generalmente es complejo y se obtiene una cantidad grande de

(Chen, 2013, p. 4; Chen y Zhu, 2013, p. 5)

La fermentación en medio sólido involucra el crecimiento de microorganismos en partículas sólidas. Aunque existe una fase líquida alrededor de las partículas o incluso gotas de agua entre estas la mayoría del espacio interparticulado se encuentra ocupado por una fase gaseosa (Mitchell et al., 2006, p. 1).

En la Figura 1.12 se muestra un esquema del arreglo que forman las partículas sólidas con la fase gaseosa.

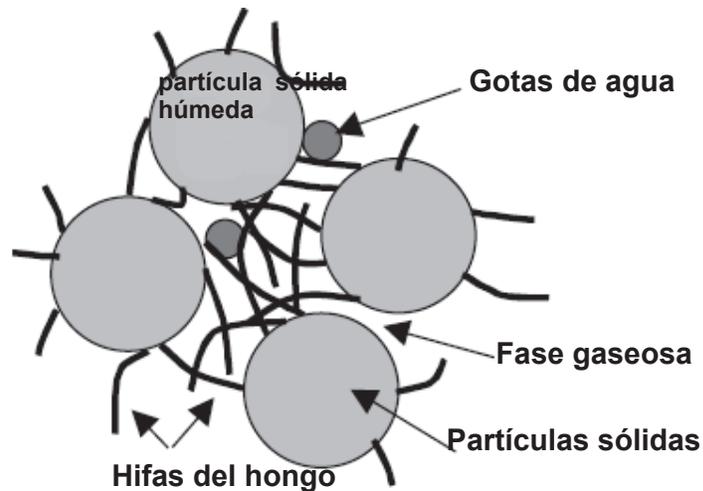


Figura 1.12. Diagrama del arreglo que forman las partículas sólidas de sustrato, la fase gaseosa, la fase líquida y las hifas del hongo (Modificado)
(Mitchell et al., 2006, p. 2)

Se ha demostrado que la agitación presente en la fermentación en medio líquido perjudica la producción de lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa en el hongo *P. chrysosporium* (Kuhad y Singh, 2013, p.15).

En la fermentación sumergida el equipo utilizado generalmente es el mismo debido a que el medio casi en su totalidad es líquido. Pero en la fermentación en medio sólido existe una gran variedad de sustratos que se utilizan y se los clasifica en 3 categorías: materiales lignocelulósicos, minerales y sintéticos. Por

esta razón también se tiene varios tipos de bioreactores (Durand, Renaud, Maratray y Almanza, 1997, p. 72).

Los materiales sintéticos y minerales solo sirven como soporte y deben ser bañados con sustratos líquidos que contengan los nutrientes necesarios. A diferencia de estos, los materiales lignocelulósicos forman una matriz sólida que provee soporte y nutrientes al mismo tiempo. Algunos materiales lignocelulósicos se presentan en la Tabla 1.4 (Durand et al., 1997, p. 72; Rodríguez y Sanromán, 2005, p. 212).

Tabla 1.4. Diferentes residuos agroindustriales utilizados como sustrato para procesos de fermentación en medio sólido (SSF)

Sustratos para SSF	Microorganismos usados en SSF
Almidones	<i>Aspergillus spp</i>
Desperdicios de plátano	<i>A. niger</i>
Cáscara de cebada	<i>Bjkendra adusta</i>
Tusas de maíz	<i>A. niger</i>
Cáscaras de cítricos	<i>A. niger</i>
Subproductos de la caña de azúcar	<i>A. terreus</i>
Mandioca	<i>Rhizopus oryzae</i>
Pulpa de remolacha azucarera	<i>Trichoderma viride</i>
Paja de trigo	<i>T. reesei, Chaetominum</i>
Pulpa de remolacha azucarera	<i>T. reesei y Fusarium oxysporum</i>
Bagazo de caña de azúcar	<i>Pleurotus spp</i>
Aserrín, astillas de madera	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>

(Nigam y Pandey, 2009, p. 198)

1.2.1 LIGNOCELULOSA

La lignocelulosa es el componente principal de las plantas y constituye la mayor fuente de carbono renovable del planeta. Sus principales componentes son la celulosa, la hemicelulosa y la lignina (Howard et al., 2003, p. 602).

Los “desechos” lignocelulósicos provienen principalmente de prácticas agrícolas, de la industria del papel y de la madera y la silvicultura. Generalmente son quemados para aprovechar la energía generada pero podrían ser utilizados para la obtención de productos de mayor valor agregado (Howard et al., 2003, p. 602).

Se pueden obtener varios productos químicos de alto valor agregado que incluyen biocombustibles como bioetanol y solventes como butanol mediante el proceso de fermentación (Nigam y Pandey, 2009, p. 4).

Entre los componentes de la lignocelulosa la lignina constituye su mayor componente y el más recalcitrante a la degradación, y por lo tanto es la responsable de su resistencia. A diferencia de la hidrólisis en la celulosa y hemicelulosa, la degradación de la lignina requiere un ataque en los enlaces carbono carbono y carbono oxígeno (Brambl y Marzluf, 2004, p. 250).

1.2.1.1 Lignina

Es uno de los principales componentes de la madera. Representa del 15 al 36 % de su peso seco y después de la celulosa es polímero natural más abundante en el planeta. Debido a su compleja estructura es la encargada de proveer resistencia mecánica, rigidez y protección contra patógenos; además por ser altamente hidrofóbica reduce la higroscopicidad de la madera (Jouanin y Lapierre, 2012, p. 3).

En la Figura 1.13 se presenta un fragmento de la compleja estructura del polímero de lignina.

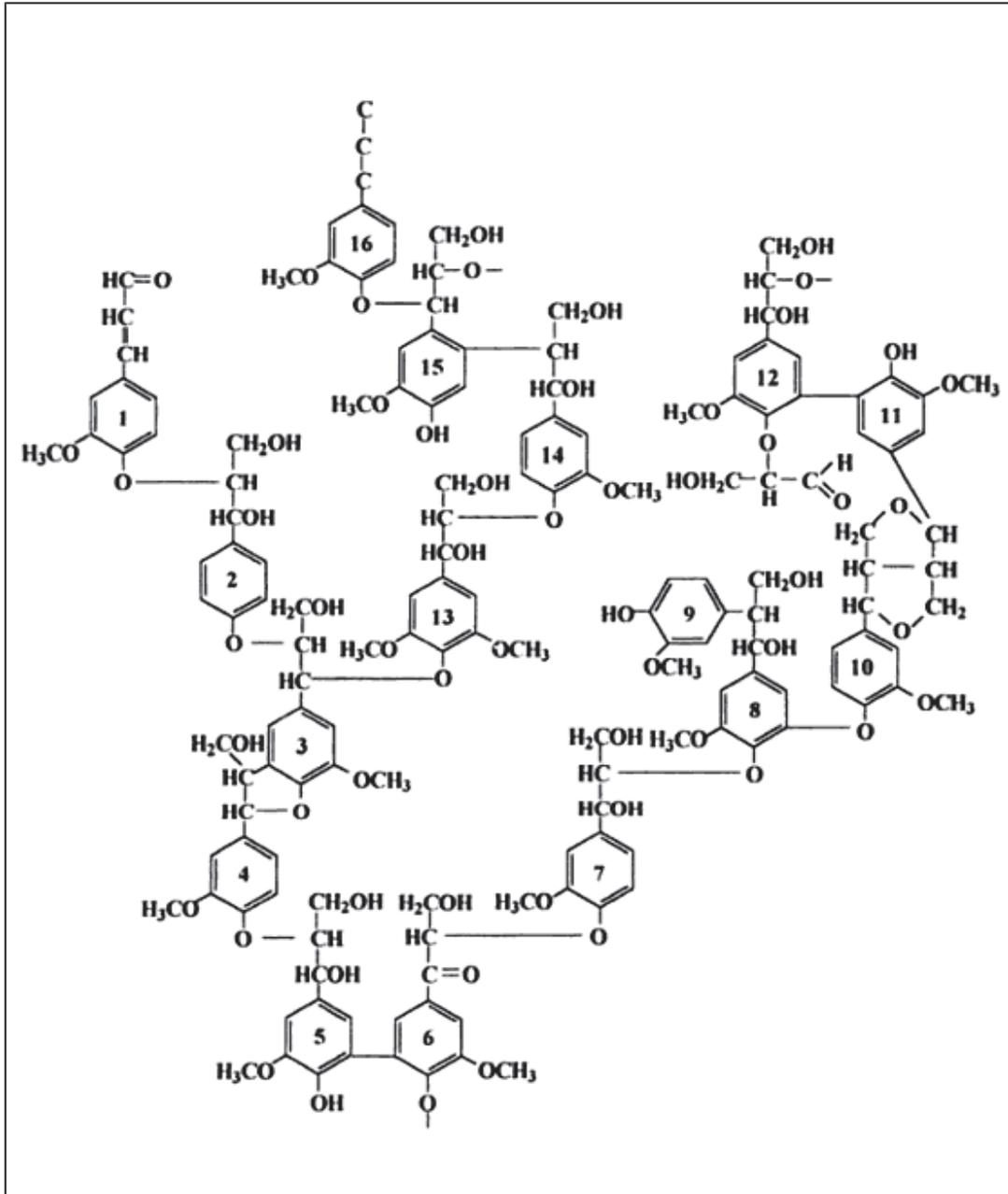


Figura 1.13. Fragmento de la estructura de la lignina
(Cho, 2001, p. 323)

A diferencia de los polisacáridos como la celulosa, la lignina es una macromolécula compleja, estereoirregular tridimensional con un peso molecular en el rango de los 100 kDa. Está formada por 3 tipos básicos de monómeros que constituyen sus precursores: alcohol p-cumaril, coniferil y sinapil (Heitner, Dimmel

y Schmidt, 2011, p. 3). En la Figura 1.14 se muestra la estructura de los precursores de la lignina.

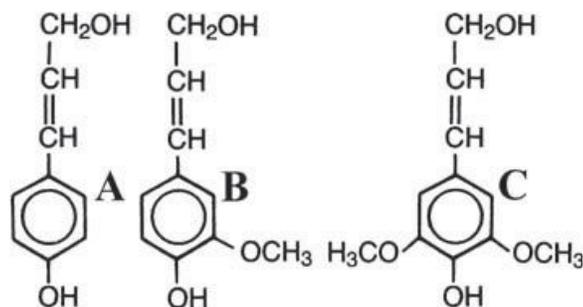


Figura 1.14. Precursores de la lignina. (A) Alcohol p-cumaril (B) coniferil (C) sinapil
(Schmidt, 2006, p. 100)

La resistencia que presenta la lignina contra el ataque de las enzimas se debe a la variedad de enlaces que existen entre las subunidades de la molécula y a que los anillos aromáticos son generalmente más difíciles de degradar (Lima, Barbosa, Marcelo, Silvérico y Colodette, 2008, p. 702).

1.2.1.2 Celulosa

Cerca de 4×10^{10} toneladas de celulosa son producidas en el mundo por año. La celulosa está presente en todas las plantas y constituye un polímero formado por unidades de glucosa conectadas entre sí por enlaces β -1,4. Dependiendo de la especie de madera, las cadenas de celulosa poseen de 10 000 a 15 000 unidades de glucosa (Schmidt, 2006, p. 95).

Las cadenas de celulosa están alternadas por zonas cristalinas y zonas amorfas como se muestra en la Figura 1.15. Los modelos de degradación de lignina sugieren que el ataque enzimático se da en las zonas amorfas (Alonso, 2007, p. 4).

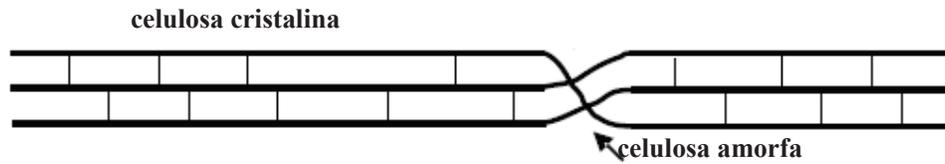


Figura 1.15. Diagrama de la estructura de la celulosa (Modificado)
(Schmidt, 2006, p. 95)

1.2.1.3 Hemicelulosa

La hemicelulosa posee una estructura más compleja que la celulosa. Las hemicelulosas son un grupo de homo y heteropolímeros sustituidos compuestos de xilosa, arabinosa, galactosa, manosa y glucosa. La hemicelulosa presente en mayor cantidad en las maderas duras es la O-acetil-(4-O-metilglucurono)-xilano o comúnmente conocida como xilano (Gelbrich, 2009, p. 30).

Las hemicelulosas son matrices de polisacáridos que están unidas a las microfibrillas de celulosa por medio de enlaces hidrógeno y a la lignina por medio de enlaces covalentes (Pallardy, 2010, p. 203). En la Figura 1.16 se esquematiza la asociación de la celulosa, lignina y hemicelulosa en la pared celular de la madera.

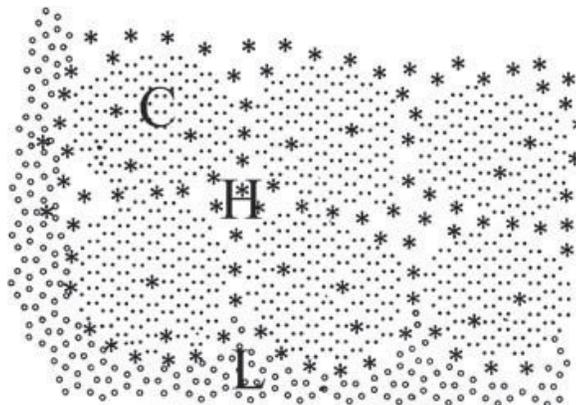


Figura 1.16. Esquema de la asociación entre la celulosa (C), hemicelulosa (H) y lignina (L) en la pared celular de la madera
(Schmidt, 2006, p. 92)

1.2.2 TIPOS DE REACTORES PARA FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

Existen varios tipos de bioreactores de acuerdo al tipo de los productos, aunque tienen características de diseño y operación similares. Han recibido diferentes nombres por varios autores pero se los clasifica en 4 grupos de acuerdo a cómo son agitados y aireados: (I) sin agitación y aireación no forzada, (II) sin agitación y con aireación forzada, (III) aireación no forzada con agitación continua o intermitente y (IV) aireación forzada con agitación continua o intermitente (Chen y Zhu, 2013, p. 12; Mitchell et al., 2006, p. 38).

En la Figura 1.17 se muestran los diferentes tipos de bioreactores utilizados en procesos de fermentación en medio sólido (SSF).

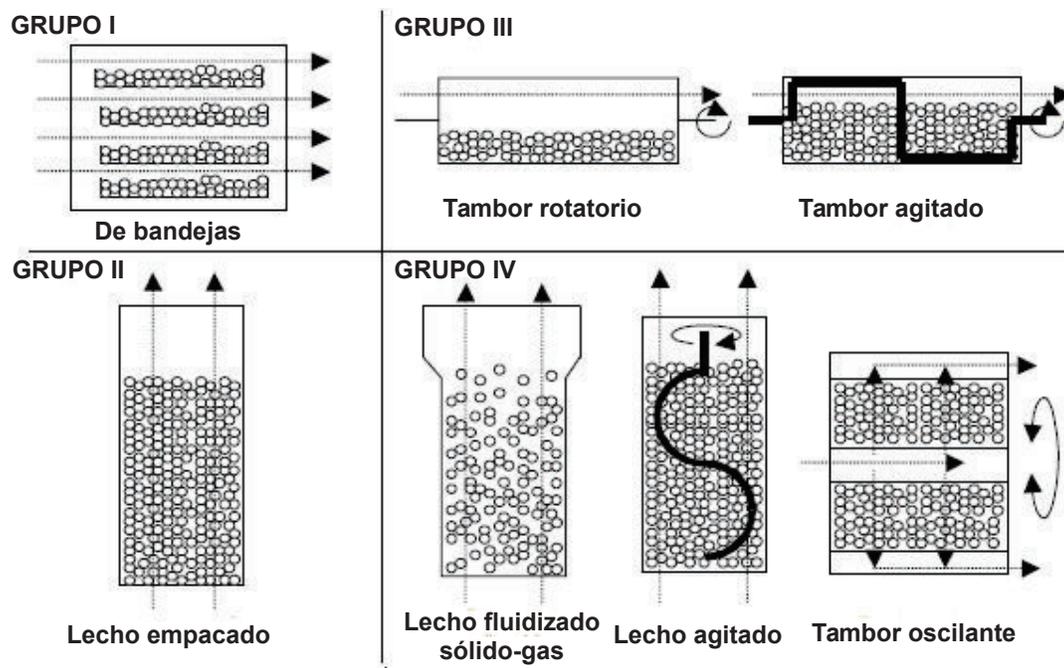


Figura 1.17. Tipos de bioreactores en SSF. Grupo (I) Sin agitación y aireación no forzada, Grupo (II) Sin agitación y aireación forzada, Grupo (III) Con aireación no forzada y agitación continua o intermitente, Grupo (IV) Con aireación forzada y agitación continua o intermitente (Modificado)
(Mitchell et al., 2006, p. 39)

1.2.2.1 Bioreactores sin agitación y aireación no forzada

Generalmente son conocidos como fermentadores de bandejas, este tipo de bioreactores poseen una cámara cerrada con varias bandejas removibles. El aire circula alrededor de las bandejas pero no de manera forzada a través de esta y es utilizado para regular la temperatura. De igual manera se puede utilizar aire húmedo o seco para controlar la humedad (Chen y Zhu, 2013, p. 13).

En la Figura 1.18 se presenta los fenómenos de transferencia de masa y energía que se dan dentro del fermentador, en una de las bandejas.

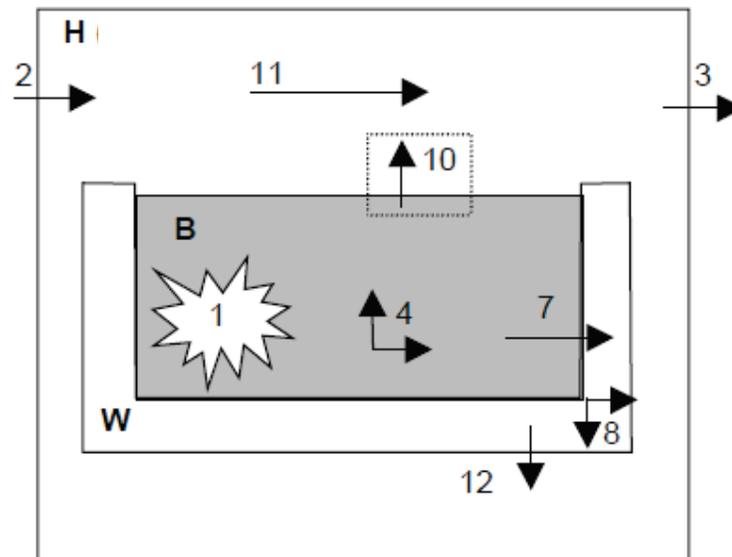


Figura 1.18. Transferencia de calor y de masa dentro de un fermentador de bandejas. (W) Pared de la bandeja; (B) lecho; (H) espacio entre bandejas; (1) liberación de calor metabólico; (2) entrada de masa y energía por el aire de ingreso; (3) salida de masa y energía por el aire que abandona la bandeja; (4) conducción y difusión dentro del lecho; (7) transferencia de calor del lecho a la pared de la bandeja; (8) conducción de calor en la pared de la bandeja; (11) flujo de aire dentro del espacio libre entre bandejas; (12) transferencia de calor desde la pared al espacio libre entre bandejas

(Mitchel et al., 2006, p. 48)

1.2.2.2 Bioreactores sin agitación y aireación forzada

También conocidos como bioreactores de lecho empacado, consisten de un lecho estático por el cual pasa aire a través de este (Mitchell et al., 2006, p. 38). El flujo de aire permite un mejor control de la temperatura dentro del lecho, pero siempre existirá un gradiente de temperatura a la entrada y salida de aire. Esto puede producir un crecimiento más lento o incluso la muerte de los microorganismos así como la disminución del rendimiento (Chen y Zhun, 2013, p. 14).

1.2.2.3 Bioreactores con aireación no forzada y con agitación continua o intermitente

Generalmente son conocidos como bioreactores de tambor rotatorio donde el lecho es mezclado continuamente o intermitentemente y circula aire alrededor (Mitchell et al., 2006, p. 38). La ventaja que presenta la agitación es eliminar las caídas de presión que se pueden obtener en lechos empacados y el hecho de que sea posible agregar agua mientras se mezcla el contenido del fermentador (Chen y Zhun, 2013, p. 14).

1.2.2.4 Bioreactores con aireación forzada y con agitación continua o intermitente

Bioreactores donde el lecho es agitado y el aire circula forzosamente a través de este. Este tipo de bioreactores pueden operar de dos modos, con agitación continua o con agitación intermitente y generalmente se los subdivide en dos grupos (Mitchell et al., 2006, p. 38).

1.3 ESCALADO DE BIOREACTORES PARA FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

A diferencia de la fermentación sumergida (SLF), en los procesos de fermentación en medio sólido (SSF) no se cuenta con una amplia teoría que permita el diseño y

la optimización de bioreactores a escala industrial debido a que los procesos limitantes son diferentes (Mitchell et al., 2006, p. 7).

En la fermentación sumergida (SLF) el proceso limitante en la mayoría de los casos es la transferencia de oxígeno en el medio. Por otro lado cuando se utiliza la fermentación en medio sólido (SSF) el crecimiento del microorganismo, y el proceso en sí puede verse afectado por la transferencia de calor y de oxígeno (Mitchell et al., 1999, p. 167).

Las reacciones necesarias para el crecimiento del microorganismo son exotérmicas y por esta razón es necesario un control de la temperatura. El incremento de la temperatura depende mucho del tipo de bioreactor utilizado (de bandejas, de lecho empacado, tambor rotatorio) (Smits et al., 1999, p. 391).

Generalmente el mayor inconveniente en bioreactores de SSF a escala industrial es la remoción del calor generado. Esto se debe a que las propiedades térmicas de un medio sólido húmedo y con aire entre partículas son menores a las del agua líquida presente en SLF (Mitchell et al., 2006, p. 58).

Después de obtener un rendimiento alto a nivel laboratorio no basta aplicar similitud geométrica para escalar el bioreactor. Esto se debe a que los microorganismos se comportan igual sin importar la escala para unas condiciones específicas. Entonces el objetivo del escalado debe ser mantener las mismas condiciones de temperatura, humedad, concentración de oxígeno y pH a nivel laboratorio y a nivel industrial (Chen, 2013, p. 221).

Debido a la falta de criterios para el escalado de bioreactores de procesos SSF, a nivel comercial se maneja escalas intermedias y fermentadores de bandejas. En los últimos años se han desarrollado modelos que describen la transferencia de calor y masa en fermentadores de lecho empacado, de bandejas y rotatorios que pueden servir como guía para el escalado (Mitchell et al., 1999, p. 167).

1.3.1 ESCALADO DE FERMENTADORES DE BANDEJAS

Si se utiliza la similitud geométrica como única guía para el escalado de un fermentador de bandejas se obtiene una mayor distancia entre el centro del lecho y la superficie en el bioreactor a escala industrial. Esto produce una disminución en el aporte de remoción por conducción del calor generado debido a que disminuye de acuerdo al cuadrado de la distancia a la cual esta ocurre, y por lo tanto un sobrecalentamiento (Mitchell, 2006, p. 61).

Cuando se escala un bioreactor de bandejas se debe mantener constante la altura del lecho y aumentar el número de bandejas debido a que el objetivo del escalado es mantener las condiciones de temperatura, nutrientes, oxígeno y humedad dentro del fermentador a nivel industrial (Ali y Zulkali, 2011, p. 258).

La alternativa de determinar las mejores condiciones para obtener el mayor rendimiento de un producto mediante fermentación en medio sólido y utilizar un modelo para evaluar el fermentador escalado a nivel industrial es una de las más utilizadas en la actualidad (Ali y Zulkali, 2011, p. 256).

Dentro de las variables que afectan el rendimiento del proceso de SSF, las más importantes son la humedad del sustrato, la altura de lecho y la temperatura.

1.3.1.1 Humedad del sustrato

La humedad del sustrato afecta el crecimiento del microorganismo dentro del fermentador en los procesos de SSF. Niveles elevados de humedad afectan el crecimiento mientras que niveles bajos producen una disminución de la actividad enzimática debido a la baja solubilidad de los nutrientes.

1.3.1.2 Altura de lecho

Una altura de lecho elevada puede afectar la transferencia de oxígeno por la disminución de la porosidad, además disminuye la eficacia de la remoción de calor por conductividad. Para fermentadores de bandejas generalmente se utilizan alturas de lecho entre 5 y 15 cm (Ali y Zulkali, 2011, p. 256).

Las bandejas con fondo perforado permiten que la distribución del oxígeno sea más uniforme a lo largo del lecho debido a que el aire circundante está en contacto con la superficie inferior además de la superior como se puede observar en

la Figura 1.19 (Mitchell et al., 2006, p. 69).

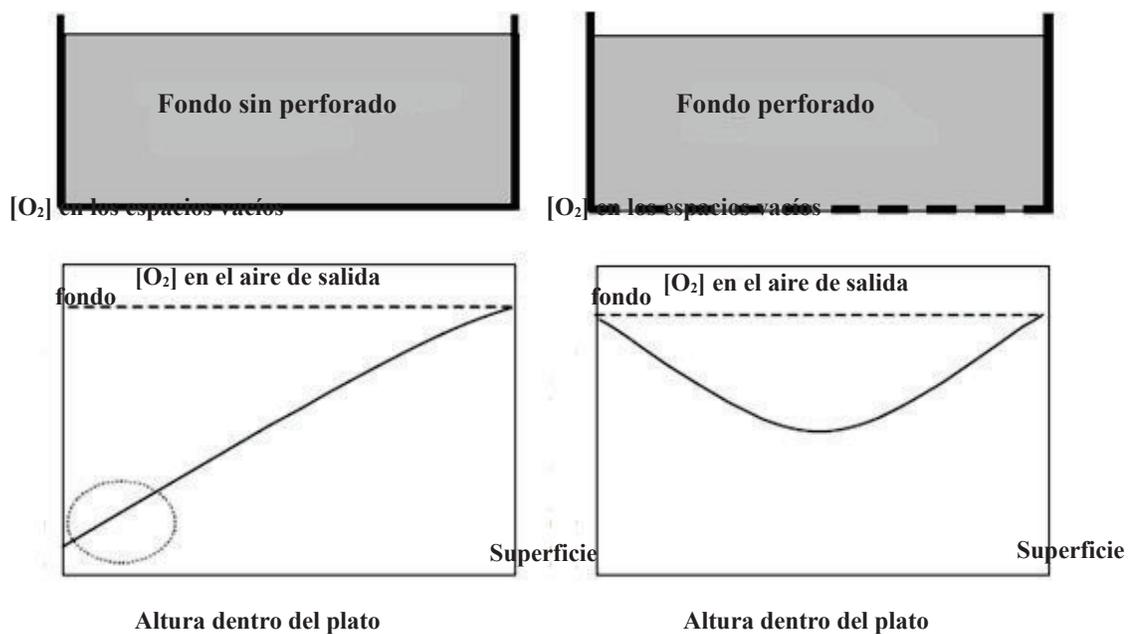


Figura 1.19. Perfiles de concentración de oxígeno en una bandeja con fondo sin perforar (izquierda) y una bandeja con fondo perforado (derecha) (Modificado) (Mitchell et al., 2006, p. 68)

1.3.1.3 Temperatura

La temperatura en los procesos de SSF se incrementa debido al calor metabólico generado por el microorganismo. En este tipo de fermentación puede elevarse hasta 3 °C/cm de lecho, lo cual provoca la disminución del rendimiento del producto deseado. En este tipo de fermentadores la temperatura nunca podrá ser igual a la del aire circundante, por esta razón se define una temperatura crítica que no afecte o afecta en la menor medida el rendimiento del proceso (Mitchell et al., 1999, p. 172).

1.3.1.4 Modelo para el escalado de un fermentador de bandejas

Una de las principales limitaciones en el escalado de bioreactores para SSF es la transferencia de oxígeno. Esta depende de la difusividad efectiva, la cual se ve afectada por la altura de lecho. Al utilizar alturas de lecho menores a 10 cm la transferencia de oxígeno no es un factor limitante en el desarrollo del microorganismo (Smits et al., 1999, p. 401).

Si se considera a la transferencia de calor como única limitante en la fermentación en medio sólido (SSF) entonces el balance de energía en el pico máximo de generación de calor permite evaluar el escalado de un fermentador de bandejas de acuerdo al modelo planteado por Mitchell et al. (1999) mediante el número de Damköhler modificado (p. 170).

El número modificado de Damköhler relaciona el calor producido y el calor removido en el pico máximo de calor generado. La velocidad de producción de calor en el pico de generación (Q_x) depende del calor generado por el metabolismo del microorganismo, el cual viene dado por la Ecuación 1.2 (Mitchell et al., 1999, p. 169).

$$Q_M = \rho_b Y \frac{dx}{dt}$$

[1.2]

Donde:

Q_M = calor generado por el metabolismo del microorganismo

El crecimiento del microorganismo se define empíricamente por la ecuación logística, que viene dada por la Ecuación 1.3.

$$\frac{dx}{dt} = \mu * X * \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)$$

[1.3]

Donde:

μ : velocidad de crecimiento específica

X: concentración de biomasa

X_m : concentración máxima de biomasa

La velocidad de producción de calor en el pico máximo de generación es igual al calor generado por el microorganismo cuando la concentración de biomasa es la mitad de la concentración máxima de biomasa, de donde se obtiene la Ecuación 1.4.

$$Q_X = 0,25 \rho_b Y \mu_{opt} X_m$$

[1.4]

Donde:

ρ_b : densidad del lecho (kg/m³)

Y : coeficiente de rendimiento de calor metabólico (J/kg biomasa seca)

μ_{opt} : velocidad de crecimiento específica a la mejor temperatura (h^{-1})

X_m : concentración máxima de biomasa (kg biomasa seca/kg sustrato húmedo)

La velocidad de eliminación de calor en el pico máximo de generación depende de los mecanismos presentes en la remoción de calor. Para un fermentador de bandejas estos mecanismos son: la conducción de calor por la pared del fermentador, la evaporación y la convección libre (Smits et al., 1999, p. 394).

Si se desprecia la conducción por el aislamiento del fermentador, y considerando que al trabajar con humedades relativas del 98 % dentro del fermentador la evaporación es despreciable, la velocidad de eliminación de calor en el pico máximo de generación viene dada por la Ecuación 1.5 (Smits et al., 1999, p. 402).

$$Q_R = \frac{h_A (T_{crit} - T_a)}{V_T}$$

[1.5]

Donde:

h_A : coeficiente superficial de transferencia de calor entre un lecho estacionario

y el aire circundante ($J/s \text{ } ^\circ C$)

T_{crit} : temperatura máxima permitida en la última bandeja ($^\circ C$)

T_a : temperatura de ingreso del aire húmedo al fermentador ($^\circ C$)

V_T : volumen total del fermentador (m^3)

Para utilizar el modelo como una guía en el proceso de escalado se puede evaluar la temperatura del aire máxima alcanzada a la salida del fermentador.

Esto se logra cuando la velocidad de producción de calor en el pico máximo de generación es igual a la velocidad de eliminación de calor en el pico máximo de generación, entonces la temperatura a la salida del fermentador viene dada por la Ecuación 1.6 (Mitchell et al., 1999, p. 171).

$$T_o = \frac{0,25 \rho_b Y \mu_{opt} X_m V}{h_A} + T_a$$

[1.6]

Donde:

T_o : temperatura del aire máxima alcanzada a la salida del fermentador

h_A : coeficiente superficial de transferencia de calor entre un lecho estacionario y el aire circundante

T_a : temperatura de ingreso del aire húmedo al fermentador

V_T : volumen del lecho

ρ_b : densidad del lecho

Y : coeficiente de rendimiento de calor metabólico

μ_{opt} : velocidad de crecimiento específica a la mejor temperatura

X_m : concentración máxima de biomasa

Si se conoce la temperatura crítica a la cual el fermentador debe trabajar y se la reemplaza por la temperatura del aire máxima alcanzada a la salida del fermentador, acomodando la Ecuación 1.6 se puede determinar el número de bandejas máximo que puede tener el fermentador, el cual viene dado por la Ecuación 1.7.

$$n = \frac{h_A (T_{\text{crit}} - T_a)}{0,25 \rho_b Y \mu_{\text{opt}} X_m}$$

[1.7]

Donde:

T_{crit} : temperatura máxima permitida en la última bandeja

h_A : coeficiente superficial de transferencia de calor entre un lecho estacionario y el aire circundante

T_a : temperatura de ingreso del aire húmedo al fermentador

V_T : volumen del lecho

ρ_b : densidad del lecho

Y : coeficiente de rendimiento de calor metabólico

μ_{opt} : velocidad de crecimiento específica a la mejor temperatura

X_m : concentración máxima de biomasa

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 MATERIALES

Se utilizó una cepa del hongo *Phanerochaete chrysosporium* provista por el Laboratorio de Bioprocesos de la Escuela Politécnica Nacional.

El aserrín de eucalipto usado como sustrato es un subproducto de la empresa ANCÉS ubicada en la ciudad de Atuntaqui, provincia de Imbabura; la misma que elabora palillos, paletas de helado y palos para pinchos.

Los materiales utilizados para el desarrollo de la parte experimental se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.5. Materiales usados en el desarrollo de la parte experimental

Materiales	Capacidad
Balones de vidrio	1000 mL
Balones de vidrio aforados	25 mL, 50 mL, 100 mL y 1000 mL
Cajas Petri	-
Celdas de volumen reducido de cuarzo para espectrofotómetro	1 cm de paso
Celdas de volumen reducido de vidrio para espectrofotómetro	1 cm de paso
Embudos Buchner	-
Erlenmeyers	500 mL
Frascos de plástico para centrifuga	50 mL
Kitasatos	500 mL
Micropipetas	1 mL y 0,1 mL
Pipetas	10 mL
Probetas	50 mL
Tubos de ensayo	10 mL y 25 mL
Vasos de precipitación	50 mL y 100 mL

Los reactivos usados para el desarrollo del proyecto se presentan en la Tabla 2.2.

Tabla 2.6. Reactivos utilizados para el desarrollo del proyecto

Reactivo	Pureza	Casa Comercial
Acetato de sodio	Analítico-99 %	Merck
Ácido acético	Analítico-99 %	Riel de Haen ag seelza hannover
Ácido cítrico	Técnico-99 %	J.T. Baker Inc
Ácido perclórico	Técnico-99 %	Fisher Scientific
Ácido tartárico	Analítico-99 %	Fisher Scientific
Ácido 3,5 dinitrosalicílico	Analítico-98 %	Fluka AG, Chem. Fabric.
Albúmina de huevo	Técnico	J.T. Baker Inc
Alcohol 3,4 dimetoxibencil (alcohol veratrílico)	Analítico-96 %	Sigma-Aldrich
Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS)	HPLC-99 %	Sigma-Aldrich
Bisulfito de sodio	Técnico-67 %	Fisher Scientific
Citrato de sodio	Analítico-99 %	J.T. Baker Inc
Fenol	Analítico-99 %	BDH Chemicals Ltd.
Fosfato de sodio	Técnico-98 %	BDH Chemicals Ltd.
Hidróxido de sodio	Analítico-99 %	Merck
Peróxido de hidrógeno	Analítico-30 %	Mallinckrodt AR
Rojo fenol	Técnico	Fisher Scientific
Sulfato de manganeso (II)	Analítico-99 %	Mallinckrodt AR
Tartrato de sodio	Analítico-99 %	Fisher Scientific
Tartrato de sodio y potasio	Analítico-99 %	Riedel de Haën
Tween 80		Fisher Scientific
Malta agar	Analítico	Difco

2.2 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL FLUJO DE AIRE EN LA HUMEDAD Y TEMPERATURA DEL SUSTRATO EN CADA BANDEJA DENTRO DEL FERMENTADOR A ESCALA DE LABORATORIO

2.2.1 CONSTRUCCIÓN DEL FERMENTADOR DE BANDEJAS A ESCALA DE LABORATORIO

Para diseñar el fermentador a escala piloto y llevar a cabo el proceso de fermentación se construyó un fermentador de bandejas a escala de laboratorio que consta de un armario metálico de 60 x 60 x 100 cm (largo, ancho, altura), una

estructura interna desmontable que soporta 5 bandejas de 56 x 40 cm (largo, ancho) y 6 deflectores dispuestos en las zonas laterales para distribuir homogéneamente el aire que ingresa a temperatura y humedad controlada. Las bandejas están compuestas por un marco de aluminio y una malla metálica que sirve como soporte para el sustrato, y se pueden deslizar fuera del fermentador para facilitar la toma de muestras. El equipo se muestra en la Figura 2.1.



Figura 2.20. (A) Fermentador y (B) soporte interno con deflectores utilizados para el proceso de fermentación a escala de laboratorio

Para controlar la temperatura y humedad del aire que ingresa al fermentador se cuenta con un sistema de calentamiento y humidificación; el cual consiste en un compresor y un tanque metálico hermético y aislado que contiene agua a 55-65 °C. El aire, después de burbujear en el agua caliente, sale del tanque e ingresa al fermentador a la temperatura y humedad deseada. El sistema se esquematiza en la Figura 2.2.

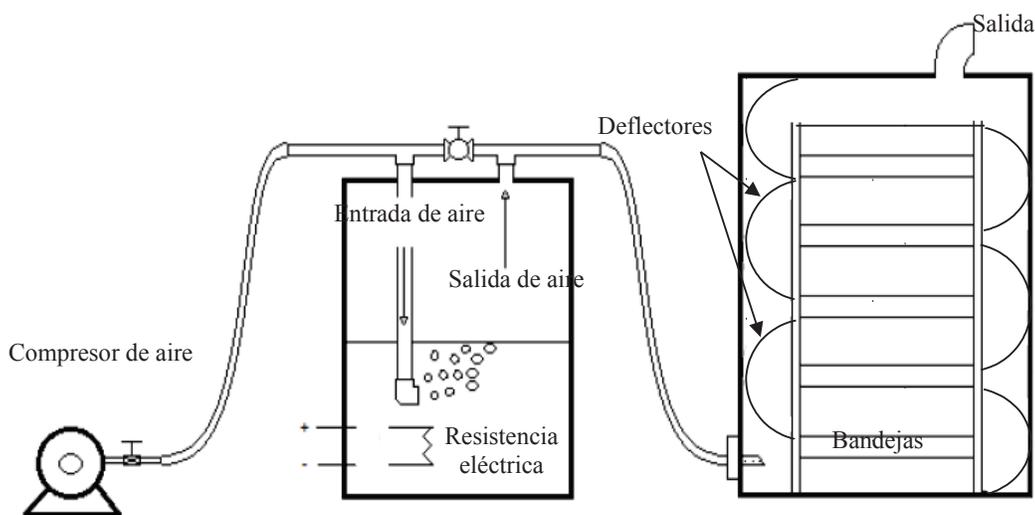


Figura 2.21. Esquema del sistema de control de temperatura y humedad del aire que ingresa al fermentador de bandejas (Modificada)
(Almeida, 2012, p. 43)

Las condiciones a las cuales se trabajó en el fermentador de bandejas se presentan en la Tabla 2.3.

Tabla 2.7. Condiciones de funcionamiento del fermentador de bandejas

Variable	Valor
Temperatura dentro del fermentador	30 y 35 °C
Altura de lecho	5 y 10 cm
Humedad del sustrato	70 %
Flujo de aire	13 L/min

2.2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL FLUJO DE AIRE SOBRE LA HUMEDAD Y TEMPERATURA DEL SUSTRATO

Para analizar si la distribución del aire a lo largo del fermentador es uniforme se determinó la variación de la humedad y la temperatura del sustrato sin inocular en cada una de las bandejas dentro del fermentador.

Se trabajó con 2 flujos de aire: 13 y 20 L/min, y con dos temperaturas: 30 y 35 °C. Se efectuó una repetición para cada prueba.

Se midieron la temperatura y la humedad del sustrato en cada bandeja cada 2 h a lo largo del día durante un período de 48 h. La temperatura se determinó directamente, en cada bandeja, mediante un medidor de humedad y temperatura EXTECH Instruments. Se midió la humedad de 3 g de aserrín tomados al azar de cada bandeja en una termobalanza Ohaus MB-25.

El análisis estadístico se realizó una comparación múltiple de Duncan al 95 % de confiabilidad en el programa STATGRAPHICS Centurion XV, para determinar si existe diferencia significativa en la humedad y temperatura entre bandejas y entre los flujos utilizados.

2.3 DETERMINACIÓN DE LA MEJOR TEMPERATURA Y ALTURA DE LECHO PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNINO PEROXIDASA, MANGANESO PEROXIDASA, LACASA Y CELULASA

2.3.1 CARACTERIZACIÓN DEL SUSTRATO

La caracterización del aserrín constó de un análisis granulométrico y un análisis químico. En el análisis químico se determinó la humedad y el contenido de celulosa, lignina, resinas, ceras y grasas mediante la metodología descrita en las normas TAPPI T-412-M(6), TAPPI T-17-M-55, TAPPI T-13-os-54 y TAPPI T-6-os-59 respectivamente. Todos los análisis fueron realizados en el Laboratorio de Pulpa y Papel de la Escuela Politécnica Nacional por medio de los métodos detallados en el Manual sobre la Fabricación de Pulpa y Papel de Grant, los cuales se presentan en los Anexos I, II y III.

2.3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para determinar la mejor temperatura y altura de lecho en el proceso fermentativo se planteó un diseño experimental 2 x 2 con 3 repeticiones para 2 temperaturas: 30 y 35 °C, y 2 alturas de lecho: 5 y 10 cm. En todos los casos se trabajó con un flujo de aire de 13 L/min.

El inóculo para el fermentador de bandejas se preparó en frascos de 500 mL con aserrín de eucalipto al 70 % de humedad a partir de cajas Petri con un medio de malta agar y 0,7 % en peso de aserrín.

Se utilizó aserrín estéril como sustrato para la fermentación. Una vez adecuado al 70 % de humedad, el aserrín se colocó dentro del fermentador en cada una de las bandejas y se utilizó como inóculo el contenido de los frascos de 500 mL incubados a 30 °C durante 4 semanas.

Se midió la actividad enzimática por el método espectrofotométrico para todas las enzimas cada día durante los 4 días de fermentación y se seleccionaron la temperatura y altura de lecho que permitieron alcanzar una mayor actividad lignino peroxidásica, manganeso peroxidásica, lacásica y celulásica.

La actividad lignino peroxidásica se determinó por la formación de aldehído veratrílico a partir del alcohol veratrílico a 310 nm. Para la manganeso peroxidasa se midió la oxidación del rojo fenol a 610 nm. La actividad lacásica se determinó por la oxidación del ABTS a 420 nm y la actividad celulásica se midió mediante la determinación de los azúcares reductores a 540 nm.

Finalmente, el análisis estadístico se realizó con una comparación múltiple de Duncan al 95 % de confiabilidad y un análisis de varianza en el programa STATGRAPHICS Centurion XV, para determinar si existió diferencia estadísticamente significativa entre las alturas de lecho y las temperaturas empleadas en el experimento.

2.3.3 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

La cepa del hongo *Phanerochaete chrysosporium* se duplicó en cajas Petri con malta agar y papa dextrosa agar, para seleccionar el medio en el que haya crecido con mayor rapidez durante un período de 21 días a 30 °C.

Después de haber escogido el mejor medio se inocularon con este cajas Petri que contenían un medio de malta agar y 0,7 % (Almeida, 2012) en peso de aserrín de eucalipto seco, y se incubaron a 30 °C hasta que el hongo cubrió toda la superficie del agar en la caja. Se mezcló 60 g de aserrín de eucalipto de 16,34 % de humedad con 107,32 mL de agua en un recipiente para obtener aserrín con una humedad del 70 %. Se colocaron 167,32 g de este aserrín en frascos de 500 mL, que fueron esterilizados durante 15 min en un autoclave a 121 °C (p. 34).

Se inocularon los frascos con el micelio y el medio de malta agar y aserrín al 0,7 % donde se desarrolló. Se dividió el contenido de cada caja Petri en 8 partes, de las cuales se tomaron 4 para cada frasco como se muestra en la Figura 2.3.

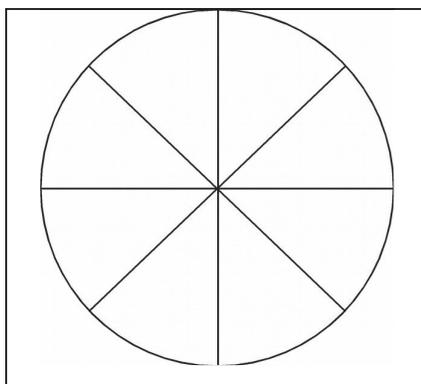


Figura 2.22. Esquema de división de las cajas Petri con malta agar y 0,7 % de aserrín para la siembra en frascos con aserrín del 70 % de humedad

Una vez inoculados, se cerraron los frascos de forma no hermética para permitir el ingreso de aire y se colocaron en una estufa a 30 °C durante 4 semanas. Estos frascos se utilizaron para sembrar el hongo en el fermentador de bandejas.

2.3.4 SIEMBRA EN EL FERMENTADOR DE BANDEJAS

Se esterilizó aserrín de eucalipto en sacos cerrados en un autoclave a 121 °C durante 60 minutos. Terminado el proceso se escurrió el exceso de agua y se los adecuó hasta una humedad del 70 %. Para una altura de lecho de 5 cm se distribuyó 700 g de aserrín en cada bandeja, mientras que para una altura de 10 cm se colocó 1 800 g de aserrín.

Para la inoculación se acondicionó el aserrín a la temperatura deseada, luego para la altura de lecho de 5 cm se dividieron 2 frascos de inóculo fresco por igual en cada bandeja. Para una altura de lecho de 10 cm se utilizaron 5 frascos como inóculo y se los distribuyó por igual en cada bandeja.

2.3.5 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIGNINO PEROXIDÁSICA, MANGANESO PEROXIDÁSICA, LACÁSICA Y CELULÁSICA EN EL FERMENTADOR DE BANDEJAS

2.3.5.1 Muestreo y obtención del extracto enzimático

Para la altura de lecho de 5 cm se tomó, diariamente, una muestra de 10 g aproximadamente de aserrín de cada una de las bandejas. La cantidad total de aserrín muestreada a lo largo de los 5 días fue de 250 g, y que al compararla con los 3 500 g que contiene el fermentador representa un porcentaje menor al 10 % de la carga total. Esto se hizo para evitar un cambio representativo en la cantidad de sustrato en cada bandeja debido al muestreo. La muestra total diaria de las 5 bandejas fue de 50 g, se homogenizó y se dividió en 3 partes iguales, las cuales se colocaron en erlenmeyers de 500 mL.

En cada uno de los erlenmeyers se colocaron 50 mL del buffer correspondiente de acuerdo al ensayo enzimático; tartrato de sodio para la lignino peroxidasa, acetato de sodio para la manganeso peroxidasa y lacasa y citrato de sodio para la celulasa. Se colocaron en agitación durante 30 minutos y se obtuvo el extracto al

filtrar el contenido de cada frasco en embudos Büchner sobre kitasatos conectados a una boba de vacío.

Para la preparación de extractos con una altura de 10 cm se procedió de igual manera, pero se tomaron 30 g de cada bandeja diariamente. La cantidad total muestreada fue de 750 g, la carga total de 9 000 g y se usó 70 mL de buffer correspondiente.

2.3.5.2 Determinación de la actividad Lignino Peroxidásica

La actividad lignino peroxidásica se midió mediante la oxidación del alcohol veratrílico a aldehído veratrílico de acuerdo al método propuesto por Tien y Kirk (1984) y modificado por Villa (2007). Se colocaron en un tubo de ensayo 9,4 mL de solución tampón de tartrato de sodio, 0,15 M y pH 3; 0,1 mL de Tween 80 al 10 % en volumen; 0,015 mL de alcohol veratrílico al 20 % en volumen y 0,5 mL de extracto enzimático. Se preparó la muestra y una paralela y se colocaron en un baño María a 30 °C, se añadió 0,02 mL de solución de peróxido de hidrógeno al 10 % en volumen para iniciar la reacción y se dejaron reaccionar por 60 minutos.

Se prepararon un blanco de reactivos y uno de muestra. En el blanco de reactivos se colocaron 0,5 mL de solución tampón en lugar de extracto enzimático; y para el blanco de muestra no se agregó la solución de peróxido de hidrógeno al 10 % en volumen. La actividad enzimática se expresó en Unidades Internacionales (UI) por 1 000 g de sustrato seco (gss); una UI se definió como la cantidad necesaria de enzima para oxidar una micromol de sustrato por minuto (Shukla, 2009), y se la midió a una longitud de onda de 310 nm (p. 30).

2.3.5.3 Determinación de la actividad Manganeso Peroxidásica

La actividad manganeso peroxidásica fue determinada mediante el método del Rojo fenol de acuerdo a Lopes, 2009. Se colocaron en un tubo de 10 mL: 1 mL de solución tampón de acetato de sodio 0,1 M y pH 4,5; 0,1 mL de solución de rojo fenol 0,1 %; 0,2 mL de solución de albúmina de huevo 0,5 %; 0,05 mL de solución de $MnSO_4$ 2 mM y 0,5 mL de extracto enzimático. Se adicionaron 0,05 mL de solución de peróxido de hidrógeno 2 mM preparada en solución tampón fosfato de sodio 0,2 M (pH 8) para iniciar la reacción y se colocaron la muestra y su paralela en un baño María a 30 °C por 10 minutos. Finalmente, se agregaron 0,04 mL de solución de hidróxido de sodio 2 N para detener la reacción.

Se prepararon un blanco de reactivos y uno de muestra. En el blanco de reactivos se colocaron 0,5 mL de solución tampón en lugar de extracto enzimático; y para el blanco de muestra no se agregó la solución de peróxido de hidrógeno 2 mM preparada en solución tampón fosfato de sodio 0,2 M (pH 8). La actividad enzimática se expresó en Unidades Internacionales (UI) por 1 000 g de sustrato seco (gss); una UI se definió como la cantidad necesaria de enzima para oxidar una micromol de sustrato por minuto, y se la midió a una longitud de onda de 610 nm.

2.3.5.4 Determinación de la actividad Lacásica

Para determinar la actividad lacásica se utilizó como sustrato 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) (ABTS) y se midió el incremento de la absorbancia a 420 nm por la oxidación del ABTS de acuerdo a Bourbonnais, 1990. En un tubo de ensayo de 10 mL se colocaron 0,5 mL de ABTS; 1 mL de solución tampón de acetato de sodio 0,1 M y pH 4,5 y 0,5 mL de extracto enzimático. Se preparó la muestra y una paralela, y se colocaron en un baño María a 30 °C durante 5 min.

Para el blanco se procedió de igual manera, pero una vez añadido el extracto enzimático se midió inmediatamente su absorbancia. La actividad enzimática se expresó en Unidades Internacionales (UI) por 1 000 g de sustrato seco (gss); una

UI se definió como la cantidad necesaria de enzima para oxidar una micromol de sustrato por minuto.

2.3.5.5 Determinación de la actividad Celulásica

Se midió la actividad celulásica de acuerdo a Ghose, 1987. Se utilizó como sustrato una solución de carboximetilcelulosa al 2 %, preparada en solución tampón citrato de sodio 0,05 M y pH 4,8. En un tubo de ensayo de 25 mL se colocaron 0,5 mL de esta solución, 0,5 mL de extracto enzimático y se lo colocó en un baño María a 50 °C durante 30 minutos. Se agregaron 3 mL de reactivo DNS y se colocó en agua hirviendo durante 5 minutos. Se detuvo la reacción mediante un enfriamiento con agua, se agregaron 20 mL de agua destilada y se agitó el tubo. Se preparó la muestra, una paralela, el blanco de reactivos y el blanco de muestra.

En el blanco de reactivos se colocaron 0,5 mL de solución tampón citrato de sodio 0,05 M y pH 4,8 en lugar de extracto enzimático. Para el blanco de muestra se colocó el extracto enzimático después del enfriamiento para corregir los azúcares. Se midió espectrofotométricamente a 540 nm.

2.4 DISEÑO DEL FERMENTADOR DE BANDEJAS A ESCALA PILOTO

El diseño a escala piloto del fermentador de bandejas se realizó de acuerdo al modelo de Mitchell et al. (2006), que consistió en incrementar el número de bandejas totales, pero mantener constantes sus dimensiones. La altura de la bandeja corresponde a la altura de lecho que produjo mayores actividades enzimáticas.

Para determinar el número de bandejas se utilizó el número de Damköhler modificado que relaciona el calor producido y eliminado al momento del pico

máximo de generación de calor, de acuerdo a Mitchell et al. (1999) en la Ecuación 2.1:

$$Da_M = \frac{Q_x}{Q_R}$$

[2.8]

Donde:

Q_x : velocidad de producción de calor en el pico máximo de generación

Q_R : velocidad de eliminación de calor en el pico máximo de generación

La velocidad de producción de calor en el pico máximo de generación se calculó mediante la Ecuación 2.2:

$$Q_x = 0,25 \rho_b Y \mu_{opt} X_m$$

[2.9]

Donde:

ρ_b : densidad del lecho (kg/m^3)

Y : coeficiente de rendimiento de calor metabólico (J/kg biomasa seca)

μ_{opt} : velocidad de crecimiento específica a la mejor temperatura (h^{-1})

X_m : concentración máxima de biomasa (kg biomasa seca/ kg sustrato húmedo)

La densidad del lecho, el coeficiente de rendimiento de calor metabólico y la velocidad de crecimiento específica se calcularon experimentalmente. Para la concentración máxima de biomasa se utilizó el valor de 0,353 según Viccini et al. (2001).

La velocidad de eliminación de calor en el pico máximo de generación se calculó mediante la Ecuación 2.3:

$$Q_R = \frac{h_A (T_{crit} - T_a)}{V * n}$$

[2.10]

Donde:

h_A : coeficiente superficial de transferencia de calor entre un lecho estacionario

y el aire circundante ($J/s \text{ } ^\circ C$)

T_{crit} : temperatura máxima permitida en la última bandeja ($^\circ C$)

T_a : temperatura de ingreso del aire húmedo al fermentador ($^\circ C$)

V: volumen del lecho (m^3)

n : número de bandejas del fermentador

El volumen de lecho y el coeficiente superficial de transferencia de calor entre un lecho estacionario y el aire circundante se determinaron experimentalmente. La temperatura de ingreso del aire húmedo al fermentador se escogió de acuerdo a la temperatura que permitió alcanzar mayores actividades.

Se utilizó 38 °C como temperatura máxima permitida en el último plato según Asgher et al. (2011). Este valor se escogió de acuerdo al criterio de Mitchell et al. (1999).

El número de bandejas se determinó con la Ecuación 2.4, que se obtuvo al igualar a 1 la Ecuación 2.1:

$$n = \frac{\frac{h_A (T_{crit} - T_a)}{V}}{0,25 \rho_b Y \mu_{opt} X_m}$$

[2.11]

2.4.1 Determinación de la densidad del lecho (ρ_b)

Se determinó la densidad del lecho con la masa de aserrín húmedo e inóculo colocados en cada bandeja y su respectivo volumen de acuerdo a la Ecuación 2.5. El ejemplo de cálculo se presenta en el Anexo IV.

$$\rho = \frac{S+I}{V}$$

[2.12]

Donde:

P: densidad del lecho (kg/m^3)

S: masa de sustrato húmedo en cada bandeja (kg)

I: masa de inóculo húmedo en cada bandeja (kg)

V: volumen del lecho (m^3)

2.4.2 Cálculo del coeficiente de rendimiento para el calor producido por el metabolismo (Y)

El coeficiente de rendimiento para el calor producido por el metabolismo se determinó con el calor ganado por el sustrato. Se midió la temperatura de entrada y salida del aire del fermentador mediante un medidor de humedad y temperatura EXTECH Instruments a lo largo de los 5 días de fermentación, y de acuerdo a la cantidad de sustrato e inóculo utilizados se determinó el calor generado mediante

la Ecuación 2.6. El procedimiento y un ejemplo de cálculo se detallan en el Anexo V.

$$Q = C_p \cdot \Delta T$$

[2.13]

Donde:

Q: calor ganado por el lecho (J/kg sustrato)

C_p: calor específico (J/kg °C), 2500; (Smits et al., 1999, p. 396)

ΔT: variación de temperatura (°C)

2.4.3 Determinación de la velocidad de crecimiento específica a la mejor temperatura (μ_{opt})

La velocidad de crecimiento específica a la mejor temperatura se calculó por medio de la pendiente en la zona de crecimiento exponencial de la curva obtenida a partir de la determinación de ácidos nucleicos.

La muestra de sustrato utilizada se tomó diariamente del fermentador durante 7 días. El experimento se realizó para el tratamiento llevado a cabo a 35 °C y con una altura de lecho de 5 cm, y se efectuó una repetición. El procedimiento para la determinación de ácidos nucleicos se detalla en el Anexo VI.

2.4.4 Cálculo del coeficiente superficial de transferencia de calor entre el lecho estacionario y el aire circundante (h_A)

El coeficiente superficial de transferencia de calor entre el lecho estacionario y el aire circundante se calculó con la Ecuación 2.7 planteada por Mitchell et al. (2006) para flujos lineales de aire que atraviesan una superficie:

$$h_A = 14,278 \left(\frac{F}{A_g} \right)^{0,8}$$

[2.14]

Donde:

F : flujo de aire que ingresa (kg aire seco/s)

A_g : área transversal, normal al flujo de aire (m²)

El flujo de aire en (kg aire seco/s) se calculó a partir del flujo volumétrico que ingresa al fermentador y la densidad del aire húmedo a 35 °C con una humedad relativa del 98%. El cálculo de la densidad del aire húmedo se presenta en el Anexo VII.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL FLUJO DE AIRE EN LA HUMEDAD Y TEMPERATURA DEL SUSTRATO EN CADA BANDEJA DENTRO DEL FERMENTADOR A ESCALA DE LABORATORIO

La variación de la humedad y la temperatura del sustrato en cada una de las bandejas para 2 flujos de aire, 13 y 20 L/min, a 30 °C se presentan en las Tablas 3.1 y 3.2 respectivamente. Los superíndices se colocaron de acuerdo a los resultados de la prueba de comparación múltiple de Duncan.

Tabla 3.8. Humedad* del sustrato en cada una de las bandejas con dos flujos de aire diferentes a 30 °C

Flujo de aire (L/min)	Humedad (%)				
	Bandeja 1	Bandeja 2	Bandeja 3	Bandeja 4	Bandeja 5
13 ^A	69,09 ± 0,11 ^a	69,03 ± 0,08 ^a	69,00 ± 0,01 ^a	69,04 ± 0,06 ^a	68,96 ± 0,16 ^a
20 ^A	69,2 ± 0,08 ^a	69,03 ± 0,21 ^a	69,07 ± 0,47 ^a	69,18 ± 0,26 ^a	69,19 ± 0,07 ^a

* Humedad promedio de las 2 réplicas ± desviación estándar

Las medias que poseen una letra en común del superíndice no son significativamente diferentes (P>0,05)

Las humedades del sustrato en las 5 bandejas del fermentador no poseen una diferencia estadísticamente significativa para un flujo de 13 L/min al igual que para un flujo de aire de 20 L/min. Además tampoco existe diferencia significativa entre los dos flujos de aire empleados.

Tabla 3.9. Temperatura* del sustrato en cada una de las bandejas con dos flujos de aire diferentes a 30 °C

Flujo de aire (L/min)	Temperatura (°C)				
	Bandeja 1	Bandeja 2	Bandeja 3	Bandeja 4	Bandeja 5
13 ^A	30,2 ± 0,1 ^a	30,2 ± 0,1 ^a	30,1 ± 0,1 ^a	30,1 ± 0,1 ^a	30,1 ± 0,1 ^a
20 ^A	30,2 ± 0,1 ^a	30,1 ± 0,2 ^a	30,2 ± 0,1 ^a	30,2 ± 0,1 ^a	30,0 ± 0,1 ^a

* Temperatura promedio de las 2 réplicas ± desviación estándar

Las medias que poseen una letra en común del superíndice no son significativamente diferentes (P>0,05)

Las temperaturas del sustrato en las 5 bandejas del fermentador no son estadísticamente diferentes tanto al utilizar un flujo de aire de 13 L/min como al

trabajar con un flujo de 20 L/min; y por esta razón tampoco existe una diferencia significativa entre los dos flujos de aire.

La variación de la humedad y la temperatura del sustrato en cada una de las bandejas para 2 flujos de aire, 13 y 20 L/min, a 35 °C se presentan en las Tablas 3.1 y 3.2 respectivamente. Los superíndices se colocaron de acuerdo a los resultados de la prueba de comparación múltiple de Duncan.

Tabla 3.10. Humedad * del sustrato en cada una de las bandejas con dos flujos de aire diferentes a 35 °C

Flujo de aire (L/min)	Humedad (%)				
	Bandeja 1	Bandeja 2	Bandeja 3	Bandeja 4	Bandeja 5
13 ^A	69,09 ± 0,11 ^a	69,03 ± 0,08 ^a	69,00 ± 0,01 ^a	69,04 ± 0,06 ^a	68,96 ± 0,16 ^a
20 ^A	69,2 ± 0,08 ^a	69,03 ± 0,21 ^a	69,07 ± 0,47 ^a	69,18 ± 0,26 ^a	69,19 ± 0,07 ^a

* Humedad relativa promedio de las 2 réplicas ± desviación estándar

Las medias que poseen una letra en común del superíndice no son significativamente diferentes (P>0,05)

Tabla 3.11. Temperatura * del sustrato en cada una de las bandejas con dos flujos de aire diferentes a 35 °C

Flujo de aire (L/min)	Temperatura (°C)				
	Bandeja 1	Bandeja 2	Bandeja 3	Bandeja 4	Bandeja 5
13 ^A	30,2 ± 0,1 ^a	30,2 ± 0,1 ^a	30,1 ± 0,1 ^a	30,1 ± 0,1 ^a	30,1 ± 0,1 ^a
20 ^A	30,2 ± 0,1 ^a	30,1 ± 0,2 ^a	30,2 ± 0,1 ^a	30,2 ± 0,1 ^a	30,0 ± 0,1 ^a

* Temperatura promedio de las 2 réplicas ± desviación estándar

Las medias que poseen una letra en común del superíndice no son significativamente diferentes (P>0,05)

Los resultados al trabajar con flujos de entrada a 35 °C coinciden con los obtenidos a una temperatura de 30 °C. En los dos casos no existe una diferencia significativa en la humedad y la temperatura del sustrato entre bandejas y entre flujos, es decir son iguales a lo largo del fermentador, lo que permite llevar a cabo la experimentación planteada.

Se escogió trabajar con un flujo de aire de 13 L/min ya que no afectó la distribución del aire en el fermentador y produce un gasto energético menor.

3.2 CARACTERIZACIÓN DEL SUSTRATO

3.2.1 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

Los resultados de la caracterización química del aserrín de eucalipto utilizado en el proceso de fermentación obtenida en el laboratorio de Pulpa y Papel de la Escuela Politécnica Nacional se presentan como respaldo en el Anexo VIII y se muestra en la Tabla 3.5.

Tabla 3.12. Caracterización química del aserrín de eucalipto utilizado como sustrato en el proceso de fermentación

Contenido de Celulosa (%)	Contenido de lignina (%)	Resinas, grasas y ceras (%)	Humedad (%)	Otros
50,65	20,38	1,60	10,14	27,37

* Los contenidos de celulosa, lignina, resinas, ceras y grasas están reportados en base seca

De acuerdo al documento presentado por el INIAP (2012) las principales especies de eucalipto existentes en el Ecuador son el *E. globulus*, *E. urograndis* y *E. grandis*. En la Tabla 3.6 se muestra la composición química de estas tres especies de eucalipto.

Tabla 3.13. Composición química (% w/w) de *Eucalyptus globulus* y otras especies de eucalipto

	<i>E. globulus</i>	<i>E. urograndis</i>	<i>E. grandis</i>
Lignina	20,5	26,7	25,7
Celulosa	50,0	48,6	46,6
Pentosanos	14,1	11,3	13,5
Extraíbles	1,72	1,91	2,10
Cenizas	0,17	0,53	0,25

(Evtuguin y Neto, 2007, p. 1; Del Río, Rencoret, Gutierrez y Martinez, 2014, p. 15)

Como se puede ver en la Tabla 3.5 los porcentajes de lignina y celulosa del sustrato utilizado en el proceso de fermentación son muy similares a los valores hallados por Evtuguin y Neto (2007) en las especies de eucalipto presentes en el Ecuador. En la Tabla 3.7 se presenta la composición de varios sustratos utilizados en la producción de enzimas ligninolíticas.

Tabla 3.14. Composición química de varios sustratos utilizados para la producción de enzimas con actividad ligninolítica

Sustrato	Lignina (%)	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)
Salvado de cebada	21,4	23	32,7
Bagazo de caña	14	33	22
Tusas de maíz	20,3	31,7	34,7
Hojas de maíz	12,6	37,6	34,5
Semillas de uva	43,54	7,10	31,13
Tallos de uva	22,94	29,95	35,33
Paja de avena	18	49,3	25
Paja de arroz	17	35	25
Paja de trigo	15	30	50

(Rodríguez y Sanromán, 2005, p. 212)

De acuerdo a la Tabla 3.7 solo el salvado de cebada, las semillas de uva y los tallos de uva contienen una mayor cantidad de lignina que el aserrín utilizado como sustrato, pero ninguno posee una cantidad mayor de celulosa. Según Rodríguez, Domínguez y Sanromán (2001), un mayor contenido de lignina y celulosa favorece la actividad ligninolítica y celulolítica respectivamente (p.286).

3.2.2 ANÁLISIS GRANULOMÉTRICO

En la Tabla 3.8 se muestran los resultados obtenidos del análisis granulométrico realizado al aserrín de eucalipto utilizado como sustrato en el fermentador de bandejas.

Tabla 3.15. Análisis granulométrico del aserrín de eucalipto utilizado como sustrato en el fermentador de bandejas

Malla N°	Tamaño de partícula (mm)	Porcentaje retenido (%)
6	3,32	28,89
10	2,00	21,81
16	1,18	19,74

20	0,85	21,05
fondo	< 0,85	8,51

Como se observa en la distribución granulométrica, el tamaño de partícula del sustrato va desde 0,85 mm hasta 3,32 mm y su distribución es homogénea. En un proceso de fermentación en medio sólido, la granulometría es importante porque influye en la transferencia de oxígeno.

De acuerdo a Poorna y Prema (2007) solamente los tamaños de partícula menores a 0,3 mm provocan aglomeramiento y disminuyen la transferencia de oxígeno

(p. 487). Por lo tanto el sustrato utilizado aseguraría una transferencia de oxígeno adecuada.

3.3 EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA PARA UN LECHO DE 5 Y 10 CM

3.3.1 CAMBIO EN LA LIGNINO PEROXIDASA POR LA TEMPERATURA

- **Lecho de 5 cm**

En la Tabla 3.9 se presentan los valores de la actividad enzimática lignino peroxidásica obtenidos en el fermentador de bandejas al emplear una altura de lecho de 5 cm a 30 y 35 °C.

Tabla 3.16. Actividad Lignino Peroxidásica* promedio en el fermentador de bandejas para una altura de lecho de 5 cm a 30 y 35 °C

Tiempo (días)	Actividad enzimática (UI/1 000 gss)	
	30 °C	35 °C
0	0,239 ± 0,103	0,119 ± 0,103
1	2,927 ± 0,724	9,019 ± 1,694
2	8,839 ± 0,103	19,769 ± 1,034

3	10,034 ± 0,821	11,706 ± 1,095
4	8,063 ± 0,358	6,391 ± 2,226

* Actividad enzimática promedio de las 3 réplicas ± desviación estándar

En la Figura 3.1 se presenta la producción de enzima lignino peroxidasa durante el proceso fermentativo a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 5 cm en el fermentador de bandejas.

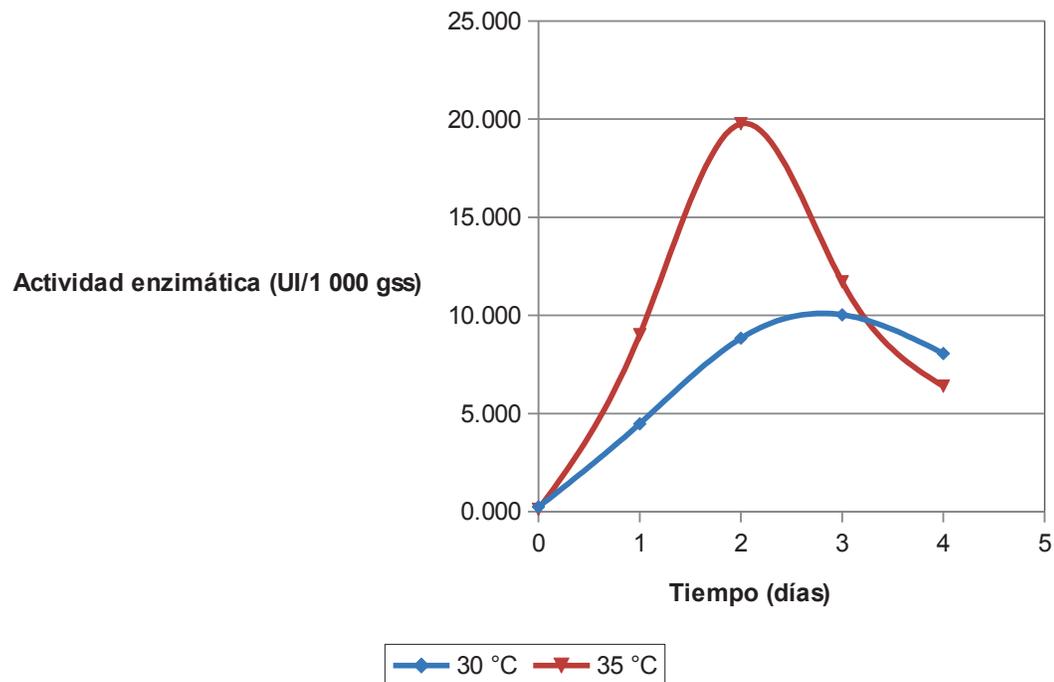


Figura 3.23. Actividades lignino peroxidadas obtenidas en el fermentador de bandejas a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 5 cm

Como se puede observar en la Figura 3.1 la temperatura favorece la producción de enzima lignino peroxidasa cuando se trabaja con una altura de lecho de 5 cm. En la Tabla 3.9 se muestra la producción de esta enzima, a 35 °C es mayor y presenta un valor máximo de 19,769 UI/1000 gss, mientras que cuando se trabaja a una temperatura de 30 °C se obtuvo un máximo de 10,034 UI/1000 gss.

El rango de temperatura óptimo para la producción de enzimas con actividad ligninolítica está entre 25 y 38 °C. Pero varios trabajos señalan que se obtiene una mayor actividad enzimática lignino y manganeso peroxidásica con el hongo

Phanerochaete chrysosporium cuando se trabaja a 35 °C (Asgher, Ahmed y Nasir, 2011, p. 4459; Shukla, Patel, Modi y Vyas, 2011, p. 715).

Shukla et al. (2011) encontraron que la temperatura óptima para la generación de biomasa del hongo *Phanerochaete chrysosporium* está entre 39 y 40 °C, pero al trabajar entre 28 y 33 °C se obtiene una cantidad de biomasa similar (p.715).

Como muestra la Figura 3.1, en el caso del proceso fermentativo a 35 °C el pico máximo conseguido es 1,97 veces mayor a la actividad obtenida a 30 °C. Esta diferencia en la actividad enzimática alcanzada podría deberse a la cantidad de biomasa producida.

Debido a que la generación enzimática se produce exclusivamente en el metabolismo secundario, una alta cantidad de biomasa significa una baja producción enzimática. Esto podría explicar la menor actividad enzimática obtenida a 30 °C.

De acuerdo a Shukla et al. (2011), al utilizar mayores temperaturas en el proceso de fermentación se provoca un incremento más rápido de la actividad en el transcurso del tiempo, pero también una caída rápida de la actividad después del pico máximo de producción (p. 716).

Esto se puede observar en la Figura 3.1, donde en el proceso fermentativo llevado a cabo a 35 °C el pico máximo de producción se alcanzó en el día 2, mientras que a 30 °C el valor máximo corresponde al día 3. Además para el proceso a 35 °C, la actividad disminuye súbitamente después del día 2; mientras que a 30 °C la actividad desciende más lentamente.

En la Tabla 3.10 se presentan las condiciones de operación utilizadas por Almeida (2012) en la obtención de enzimas lignino peroxidasa y manganeso peroxidasa mediante el hongo *Phanerochaete chrysosporium* en un fermentador de bandejas hecho de madera.

Tabla 3.17. Parámetros utilizados en el proceso de fermentación en medio sólido por Almeida (2012)

Condiciones	Valor
Temperatura en el fermentador	30 °C
Sustrato	Aserrín de eucalipto
Altura de lecho	3 cm
Tiempo de incubación del inóculo	5 semanas
Humedad del sustrato	70 %
Flujo de aire	11,4 L/min

Almeida (2012) obtuvo un pico de producción de 1,83 UI/1 000 gss para la enzima lignino peroxidasa en el día 2 del proceso de fermentación (p. 62). Si se compara con el proceso llevado a cabo a 30 °C y con una altura de lecho de 5 cm, se observa que el pico máximo alcanzado fue de 10,034 UI/1 000 gss como se muestra en la Tabla 3.9 y es 5,48 veces mayor.

3.3.1.1 Lecho de 10 cm

En la Tabla 3.11 se presentan los valores de la actividad enzimática lignino peroxidásica obtenidos en el fermentador de bandejas al emplear una altura de lecho de 10 cm a 30 y 35 °C.

Tabla 3.18. Actividad lignino peroxidásica* promedio en el fermentador de bandejas para una altura de lecho de 10 cm a 30 y 35°C

Tiempo (días)	Actividad enzimática (UI/1 000 gss)	
	30 °C	35 °C
0	0,084 ± 0,000	0,056 ± 0,048
1	0,864 ± 0,193	2,509 ± 0,145
2	1,840 ± 0,365	2,871 ± 0,193
3	3,373 ± 0,476	3,401 ± 0,210
4	3,652 ± 0,048	2,342 ± 0,418

* Actividad enzimática promedio de las 3 réplicas ± desviación estándar

En la Figura 3.2 se presenta la producción de enzima lignino peroxidasa durante el proceso fermentativo a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 10 cm en el fermentador de bandejas.

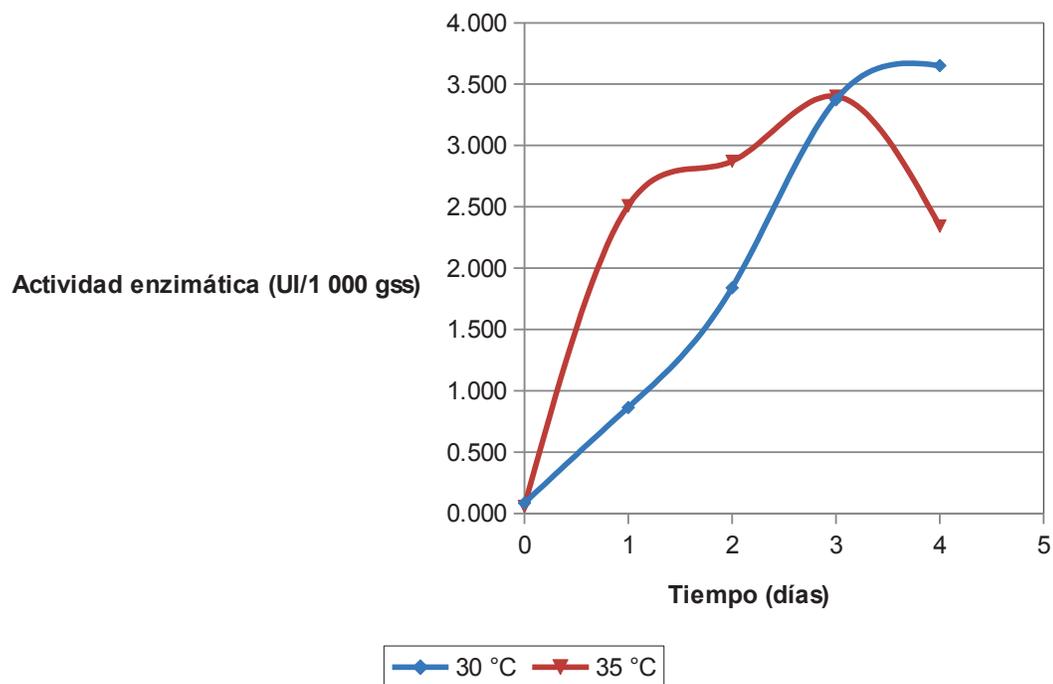


Figura 3.24. Actividades lignino peroxidasa obtenidas en el fermentador de bandejas a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 10 cm

Como se puede ver en la Figura 3.2 la actividad enzimática se incrementa más rápidamente cuando se trabaja a una temperatura de 35 °C, pues alcanza su valor máximo al día 3 (3,401 UI/1 000gss). Mientras que al trabajar a 30 °C la actividad enzimática máxima obtenida (3,652 UI/1 000gss) fue mayor pero se la alcanzó al día 4. El incremento más rápido en la actividad a 35 °C podría deberse a que una mayor temperatura favorece el crecimiento del hongo, lo que permite una adaptación más rápida y la producción temprana de la enzima.

Una mayor actividad a 30 °C podría deberse al lecho de 10 cm, ya que el incremento de la altura dificulta la transferencia de calor y es necesario trabajar a una temperatura de incubación menor para alcanzar la temperatura óptima (Mitchell et al., 2006, p. 74).

Un flujo de aire a 30 °C combinado con el calor metabólico podría causar que el lecho alcance una temperatura cercana a la óptima y por esta razón aunque el incremento de la actividad es menor en los primeros días, el pico de actividad es mayor que el obtenido a 35 °C.

3.3.2 CAMBIO EN LA MANGANESO PEROXIDASA POR LA TEMPERATURA

- **Altura de lecho de 5 cm**

En la Tabla 3.12 se presentan los valores de la actividad enzimática manganeso peroxidásica al emplear una altura de lecho de 5 cm a 30 y 35 °C.

Tabla 3.19. Actividad manganeso peroxidásica* promedio en el fermentador de bandejas para una altura de lecho de 5 cm a 30 y 35 °C

Tiempo (días)	Actividad enzimática (UI/1 000 gss)	
	30 °C	35 °C
0	0,151 ± 0,052	0,151 ± 0,052
1	1,091 ± 0,962	6,423 ± 1,013
2	5,363 ± 0,596	13,876 ± 0,555
3	7,362 ± 0,157	9,634 ± 0,962
4	6,665 ± 0,773	4,423 ± 0,910

* Actividad enzimática promedio de las 3 réplicas ± desviación estándar

En la Figura 3.3 se presenta la producción de enzima manganeso peroxidasa durante el proceso fermentativo a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 5 cm en el fermentador de bandejas.

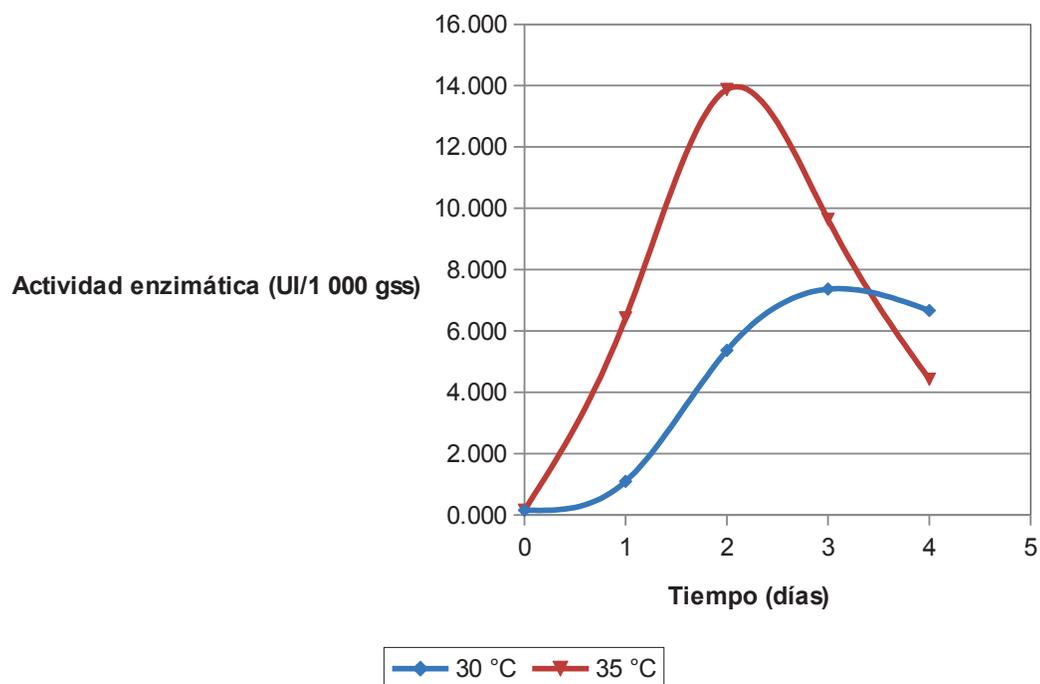


Figura 3.25. Actividades manganeso peroxidásicas obtenidas en el fermentador de bandejas a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 5 cm

Como se puede observar en la Figura 3.3 la temperatura favorece la producción de la enzima manganeso peroxidasa para una altura de lecho de 5 cm. A 35 °C la actividad crece más rápidamente y alcanza su pico máximo al día 2, mientras que al trabajar a 30 °C la velocidad de incremento de la actividad es menor y su pico máximo se alcanza en el día 3.

Los picos de actividad manganeso peroxidásica alcanzados a 30 °C y 35 °C son 7,362 UI/1 000 gss y 13, 876 UI/1 000 gss respectivamente. La relación entre las dos es 1,88. En el caso de la enzima lignino peroxidasa las actividades máximas alcanzadas fueron 12,545 UI/1 000 gss y 24,418 UI/1 000 gss a 30 y 35 °C respectivamente. La relación entre estos dos valores da 1,97.

La relación entre los picos máximos es muy similar para las dos enzimas, esto es lógico si se toma en cuenta que el hongo *Phanerochaete chrysosporium* produce la enzima manganeso peroxidasa al mismo tiempo que la enzima lignino peroxidasa (Almeida, 2012, p. 64).

Además, las dos enzimas poseen condiciones óptimas de generación similares. Por estas razones la diferencia en la velocidad de crecimiento debida a la variación de la temperatura en la fermentación afectaría a la producción de las dos enzimas de manera similar (Asgher et al., 2011, p. 4459).

En la Figura 3.4 se presentan las actividades obtenidas en el fermentador de bandejas de las enzimas lignino y manganeso peroxidasa para una altura de lecho de 5 cm a 30 y 35 °C.

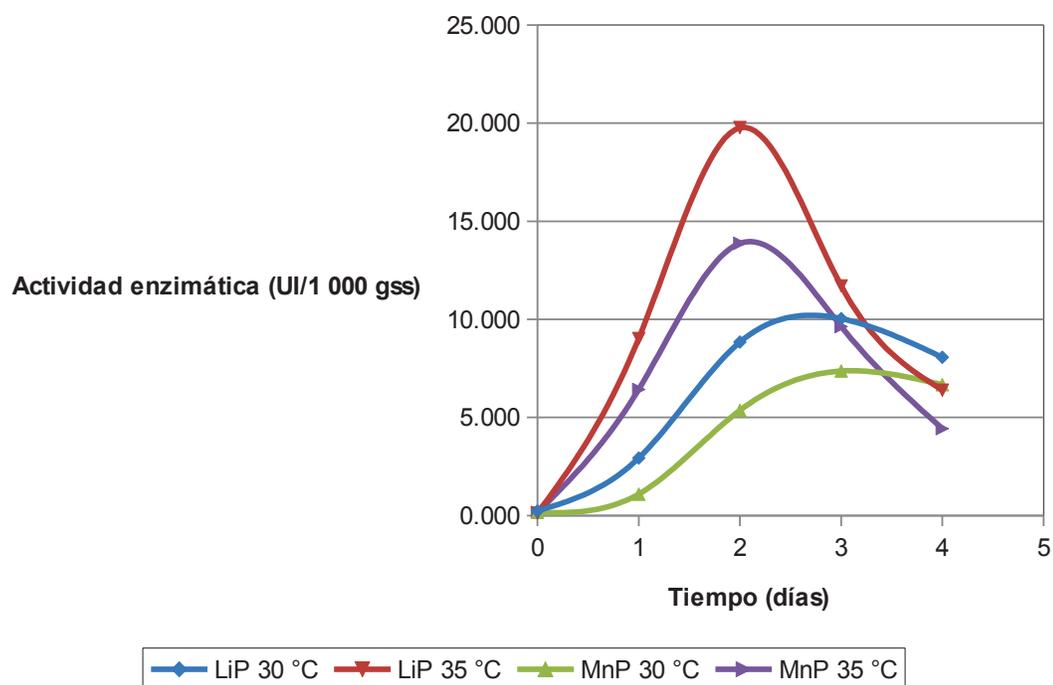


Figura 3.26. Actividades lignino y manganeso peroxidásicas obtenidas en el fermentador de bandejas a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 5 cm

Si se analizan los días en los que se obtuvieron los picos de actividad máxima para la enzima manganeso peroxidasa con los obtenidos para la enzima lignino peroxidasa, se puede observar que estos coinciden tanto para el proceso fermentativo a 30 °C como cuando se lo lleva a cabo a 35 °C.

Este comportamiento se produce al utilizar un sustrato que contiene celulosa como fuente de carbono (D'Souza, Merrit y Reddy, 1999, p.5310) y que posea un

nivel bajo de nitrógeno, como es el caso de la madera de eucalipto utilizada como sustrato (Gil, Pinzon, Castro, y Sandoval, 2012, p. 177).

- **Altura de lecho de 10 cm**

En la Tabla 3.13 se presentan los valores de la actividad enzimática manganeso peroxidásica obtenidos en el fermentador de bandejas al emplear una altura de lecho de 10 cm.

Tabla 3.20. Actividad Manganeso Peroxidásica* promedio en el fermentador de bandejas para una altura de lecho de 10 cm a 30 y 35 °C

Tiempo (días)	Actividad enzimática (UI/1 000 gss)	
	30 °C	35 °C
0	0,057 ± 0,065	0,057 ± 0,024
1	0,255 ± 0,112	1,301 ± 0,234
2	0,552 ± 0,170	1,909 ± 0,153
3	1,301 ± 0,130	2,065 ± 0,107
4	1,994 ± 0,085	1,598 ± 0,200

* Actividad enzimática promedio de las 3 réplicas ± desviación estándar

En la Figura 3.5 se presenta la producción de enzima manganeso peroxidasa durante el proceso fermentativo a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 10 cm en el fermentador de bandejas.

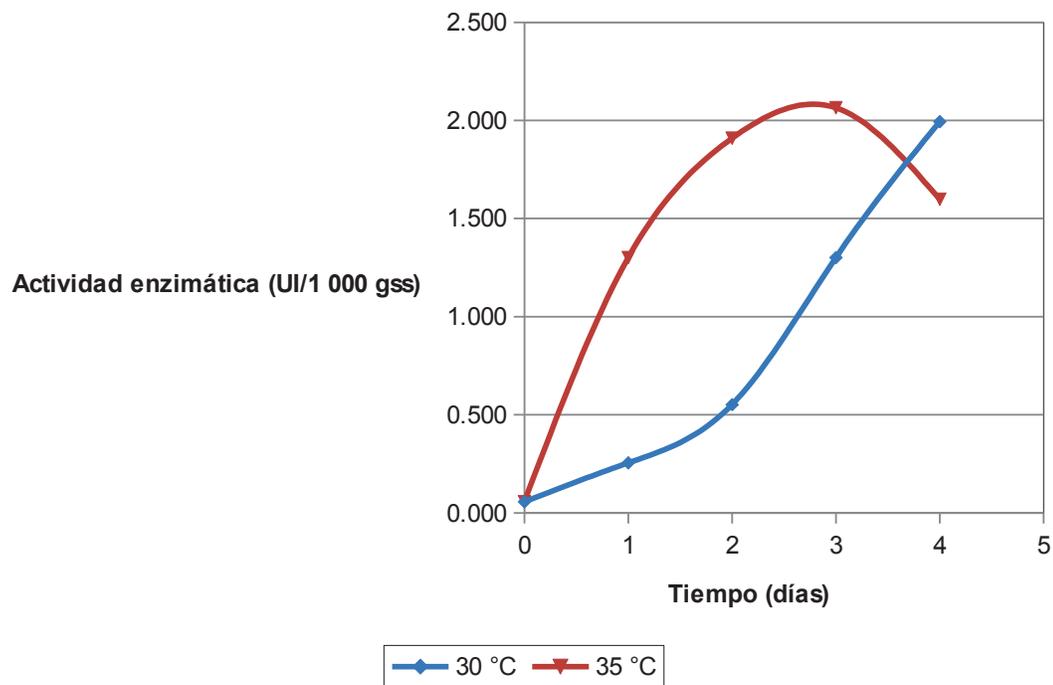


Figura 3.27. Actividades manganeso peroxidásicas obtenidas en el fermentador de bandejas a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 10 cm

Como muestra la Figura 3.5 la temperatura favorece la velocidad de producción de enzima manganeso peroxidasa para una altura de lecho de 10 cm. Se puede observar que a 35 °C la velocidad de aumento de la actividad es mayor y que el pico máximo de actividad (2,065 UI/1 000 gss) aparece al día 3, después de lo cual se produce un descenso en la actividad. Para el proceso fermentativo a 30 °C no se produce un pico máximo, pero existe un incremento hasta el día 4.

Al igual que en el caso de la enzima lignino peroxidasa, al trabajar con un lecho de 10 cm, la actividad enzimática se incrementa más rápidamente a 35 °C; pero a 30 °C se alcanza una mayor actividad el último día del proceso de fermentación.

3.3.3 CAMBIO EN LA LACASA POR LA TEMPERATURA

- **Altura de lecho de 5 cm**

En la Tabla 3.14 se presentan los valores de la actividad lacásica obtenidos en el fermentador de bandejas al emplear una altura de lecho de 5 cm a 30 y 35 °C.

Tabla 3.21. Actividad Lacásica* promedio en el fermentador de bandejas para una altura de lecho de 5 cm a 30 y 35 °C

Tiempo (días)	Actividad enzimática (UI/1 000 gss)	
	30 °C	35 °C
0	0,037 ± 0,064	0,074 ± 0,064
1	0,296 ± 0,231	2,370 ± 0,891
2	1,851 ± 0,280	6,443 ± 0,294
3	2,962 ± 0,257	6,739 ± 0,231
4	3,259 ± 0,357	4,814 ± 0,280

* Actividad enzimática promedio de las 3 réplicas ± desviación estándar

En la Figura 3.6 se presenta la producción de enzima lacasa a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 5 cm en el fermentador de bandejas.

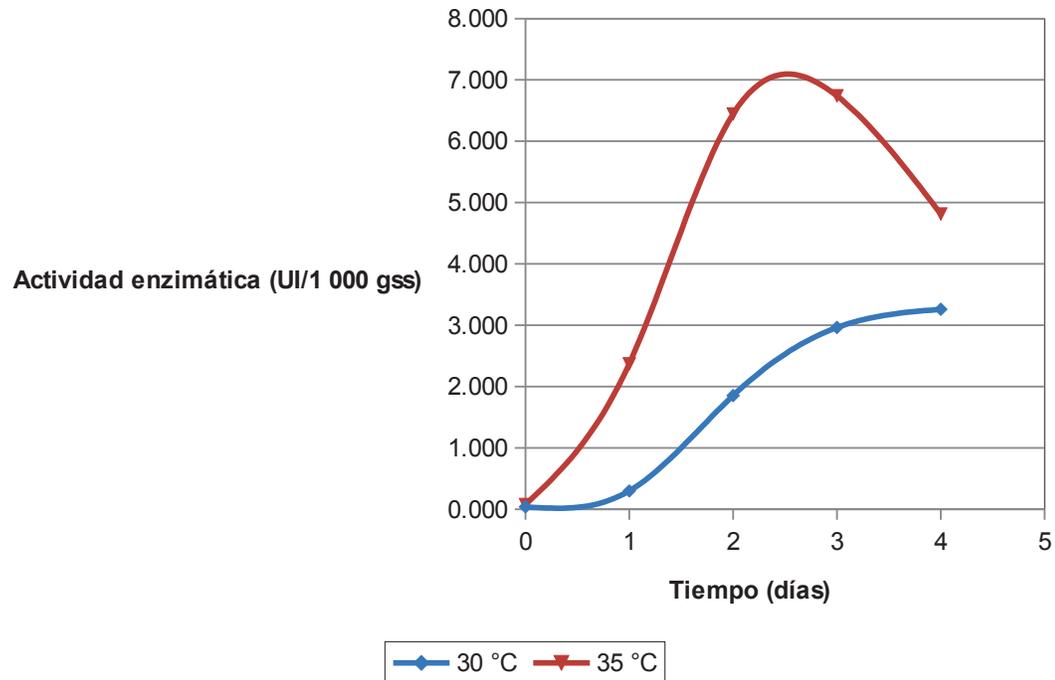


Figura 3.28. Actividades lacásicas obtenidas en el fermentador de bandejas a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 5 cm

La temperatura favorece la producción de enzima lacasa cuando se trabaja con una altura de lecho de 5 cm como se muestra en la Figura 3.6. Al trabajar a una temperatura de 35 °C la actividad aumenta más rápidamente y alcanza su valor máximo al día 3, mientras que al trabajar a 30 °C la actividad máxima alcanzada es menor y se la alcanza al día 4.

La generación temprana de enzima puede deberse a la mayor velocidad de crecimiento que se obtiene a 35 °C, pues esta es directamente proporcional a la temperatura de incubación. La mayor actividad alcanzada a 35 °C (6,739 UI/1 000 gss) es 2,07 veces mayor que la máxima actividad que se obtuvo a 30 °C (3,259 UI/1 000 gss).

Esto concuerda con el trabajo presentado por Irshad, Asgher, Sheikh y Nawaz (2011), quienes encontraron que la producción de enzima lacasa para hongos basidiomicetos de pudrición blanca es mayor cuando se trabaja entre 35 y 40 °C (p. 2868).

Sin embargo, otros estudios indican que el hongo *P. chrysosporium* no produce lacasa. Así Larrondo et al. (2003), después de analizar los genes del hongo *Phanerochaete chrysosporium*, determinaron que no produce la enzima lacasa sino una oxidasa multicobre con actividad ferroxidasa (p. 6257).

De acuerdo a Podgornik, Stegu, Zibert y Perdih (2001) el ABTS puede ser oxidado no solo por la enzima lacasa sino también por la enzima manganeso peroxidasa y por el complejo Mn(III) (p. 408). Esto podría significar que los valores de actividad obtenidos no se deben solamente a la presencia de enzima lacasa o incluso que los únicos responsables de la oxidación del ABTS sean la enzima manganeso peroxidasa y el complejo Mn(III).

Para analizar la probabilidad de que la enzima manganeso peroxidasa sea la responsable de la actividad obtenida en el ensayo de lacasa, se presenta la producción de enzima lacasa y manganeso peroxidasa a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 5 cm en el fermentador de bandejas en la Figura 3.7.

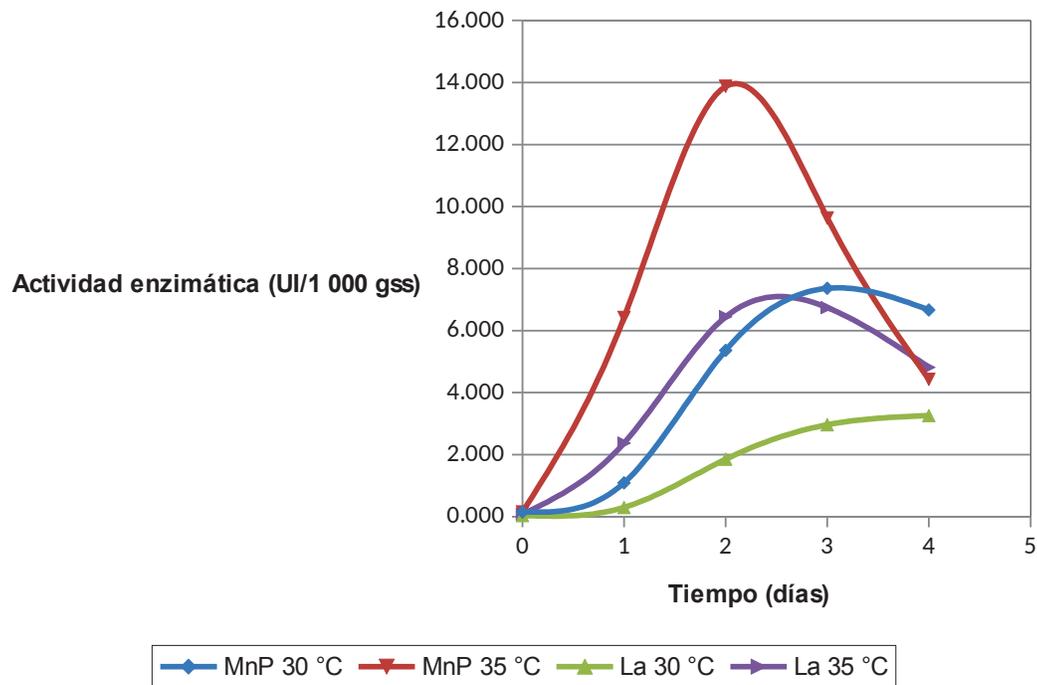


Figura 3.29. Actividades lacásica y manganeso peroxidásica obtenidas en el fermentador de bandejas a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 5 cm

Como se puede observar en la Figura 3.7 los picos máximos de producción de manganeso peroxidasa a 35 y 30 °C se producen los días 2 y 3 respectivamente, y los valores máximos de lacasa se obtienen los días 3 y 4 a 35 y 30 °C respectivamente. Es decir que la posible lacasa presenta su pico máximo al siguiente día que la enzima manganeso peroxidasa.

En la Figura 3.6 las actividades en los días 2 y 3 del proceso fermentativo a 35 °C corresponden a 6,443 y 6,739 UI/1 000 gss respectivamente. El valor máximo de actividad se obtiene al día 3, pero la actividad alcanzada en el día 2 es muy cercana. Al trabajar a 30 °C se encuentra la misma tendencia, las actividades en los días 3 y 4 corresponden a 2,962 y 3,259 UI/1 000 gss respectivamente.

La ausencia de picos de actividad marcados podría deberse a la oxidación del ABTS por parte de la enzima manganeso peroxidasa. Para evitar la interferencia

de esta enzima se puede usar catalasas antes del ensayo y así evitar que oxide el ABTS (Podgornik et al., 2001, p.407).

De acuerdo a Podgornik et al., (2001), el pico de oxidación del ABTS se produce un día después del pico máximo de actividad de la enzima manganeso peroxidasa como se observó en la figura 3.7 (p. 407). Por lo tanto la actividad obtenida en la Figura 3.6 podría corresponder a la enzima lacasa.

De acuerdo a Larrondo et al. (2003) el complejo Mn(III) puede provocar un resultado falso/positivo de presencia de enzima lacasa y al ser producido en el medio por la acción de la enzima manganeso peroxidasa no se puede eliminar por medio de catalasas (p. 6261).

Podgornik et al. (2001) encontraron que al añadir Cu(II) al medio, este debió incrementar la actividad de la enzima lacasa debido a sus 4 átomos de cobre; pero al producir el efecto contrario concluyeron que el responsable de la oxidación es el complejo Mn(III) (p. 409).

Si la oxidación de ABTS es la única prueba que se aplica para medir la actividad lacasa se debería añadir catalasas y realizar una diálisis para evitar la interferencia de la enzima manganeso peroxidasa y del complejo Mn(III) respectivamente.

- **Altura de lecho de 10 cm**

En la Tabla 3.15 se presentan los valores de la actividad enzimática lacásica obtenidos en el fermentador de bandejas al emplear una altura de lecho de 10 cm a 30 y 35 °C.

Tabla 3.22. Actividad Lacásica* promedio en el fermentador de bandejas para una altura de lecho de 10 cm a 30 y 35 °C

Tiempo (días)	Actividad enzimática (UI/1 000 gss)	
	30 °C	35 °C
0	0,035 ± 0,030	0,017 ± 0,030
1	0,207 ± 0,104	0,432 ± 0,060
2	0,294 ± 0,060	1,054 ± 0,150
3	0,398 ± 0,060	3,198 ± 0,079
4	1,072 ± 0,060	3,440 ± 0,108

* Actividad enzimática promedio de las 3 réplicas ± desviación estándar

En la Figura 3.8 se presenta la producción de enzima lacasa durante el proceso fermentativo a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 10 cm en el fermentador de bandejas.

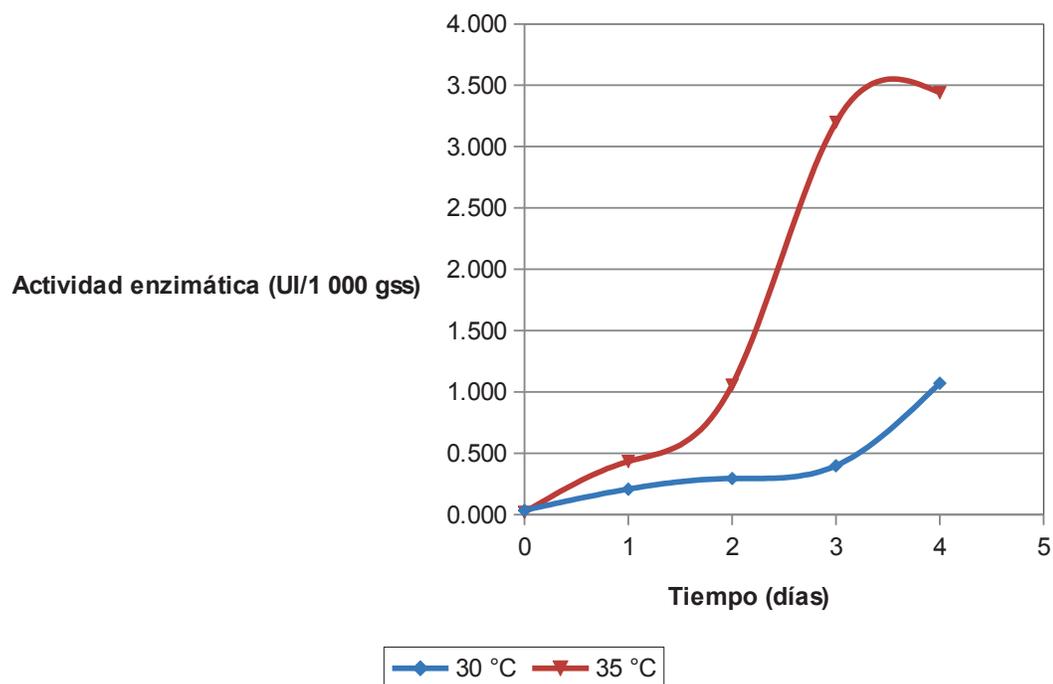


Figura 3.30. Actividades lacasas obtenidas en el fermentador de bandejas a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 10 cm

Como muestra la Figura 3.8, trabajar a una temperatura de 35 °C permite alcanzar una actividad mayor que a 30 °C en menor tiempo. Cuando se usa esta temperatura el incremento en la actividad es casi nula y solamente a partir del día 3 se da un aumento apreciable; esto puede indicar que el tiempo de adaptación del hongo a 30 °C es mayor y por esta razón la generación de enzima lacasa tarda mayor tiempo.

Pero podría tratarse de un falso/positivo producido por la presencia del complejo Mn(III) en el medio como se concluyó al trabajar con un altura de lecho de 5 cm.

3.3.4 CAMBIO EN LA CELULASA POR LA TEMPERATURA

En la Tabla 3.16 se presentan los valores de la actividad enzimática celulasa obtenidos en el fermentador de bandejas al trabajar a 30 y 35 °C con una altura de lecho de 5 y 10 cm.

Tabla 3.23. Actividad Celulásica* promedio en el fermentador de bandejas para una altura de lecho de 5 y 10 cm a 30 y 35 °C

Tiempo (días)	Actividad enzimática (UI/1 000 gss)			
	5 cm		10 cm	
	30 °C	35 °C	30 °C	35 °C
0	0	0	0	0
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0

* Actividad enzimática promedio de las 3 réplicas

La actividad celulásica para todas las corridas realizadas fue nula. Esto podría deberse a que el tiempo de fermentación no fue el suficiente para su apareamiento.

De acuerdo a Martinez et al. (2004) el hongo *Phanerochaete chrysosporium* produce tres clases de celulasas: endoglucanasas, celobiohidrolasas y β -

glucosidasas. Algunas de ellas son extracelulares y por lo tanto se pueden medir a partir del medio de cultivo (p. 697).

Sun y Cheng (2002) encontraron que la aparición de celulasas en el hongo *Phanerochaete chrysosporium* se produjo a partir del día 6 (p. 9). Por lo tanto las enzimas celulasas no pueden ser medidas dentro del período de experimentación de 4 días, pero esto no quiere decir que el hongo no las produzca.

3.4 EFECTO DE LA ALTURA DE LECHO EN LA PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA PARA 30 Y 35 °C

3.4.1 CAMBIO EN LA LIGNINO PEROXIDASA POR LA ALTURA DE LECHO

- **Temperatura de 30 °C**

En la Tabla 3.17 se presentan los valores de la actividad enzimática lignino peroxidásica obtenidos en el fermentador de bandejas al emplear una altura de lecho de 5 y 10 cm a 30 °C.

Tabla 3.24. Actividad Lignino Peroxidásica* promedio en el fermentador de bandejas para una altura de lecho de 5 y 10 cm a 30 °C

Tiempo (días)	Actividad enzimática (UI/1 000 gss)	
	5 cm	10 cm
0	0,239 ± 0,103	0,084 ± 0,000
1	2,927 ± 0,724	0,864 ± 0,193
2	8,839 ± 0,103	1,840 ± 0,365
3	10,034 ± 0,821	3,373 ± 0,476
4	8,063 ± 0,358	3,652 ± 0,048

* Actividad enzimática promedio de las 3 réplicas ± desviación estándar

En la Figura 3.9 se presenta la producción de enzima lignino peroxidasa durante el proceso fermentativo a 30 °C para una altura de lecho de 5 y 10 cm en el fermentador de bandejas.

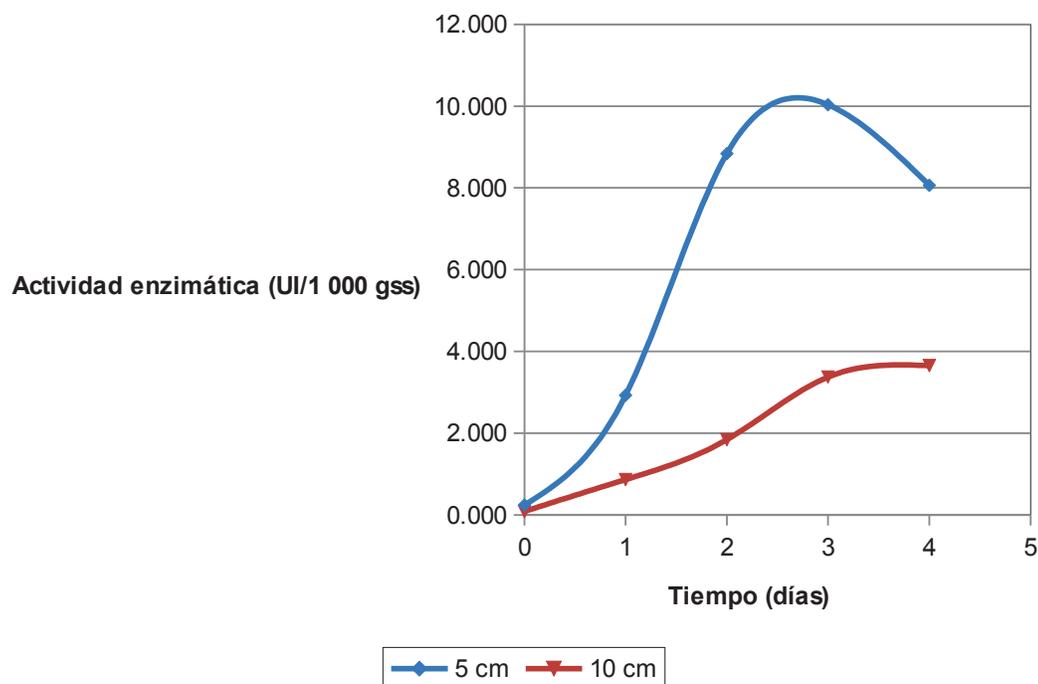


Figura 3.31. Actividades lignino peroxidásicas obtenidas en el fermentador de bandejas a 30 °C para una altura de lecho de 5 y 10 cm

Una menor altura de lecho favorece la producción de la enzima lignino peroxidasa a 30 °C como se muestra en la Figura 3.9. Con una altura de 5 cm se obtiene un incremento más rápido en la actividad y un pico máximo 2,75 veces mayor que el obtenido al trabajar con una altura de lecho de 10 cm.

Smits et al. (1999) señalan que al trabajar con alturas de lecho mayores a 10 cm la difusividad efectiva disminuye y por lo tanto la transferencia de oxígeno se vuelve un factor limitante (p. 401). Esto podría explicar la diferencia entre las actividades alcanzadas a 5 y 10 cm.

Mitchell et al. (2006) encontraron que el incremento de la altura de lecho también afecta la transferencia de calor al dificultar la remoción del calor metabólico producido. Esto podría provocar que la temperatura del lecho se aleje considerablemente de la temperatura óptima y afecte a la producción enzimática (p. 71).

- **Temperatura de 35 °C**

En la Tabla 3.18 se presentan los valores de la actividad enzimática lignino peroxidásica obtenidos al emplear una altura de lecho de 5 y 10 cm a 35 °C.

Tabla 3.25. Actividad Lignino Peroxidásica* promedio en el fermentador de bandejas para una altura de lecho de 5 y 10 cm a 35 °C

Tiempo (días)	Actividad enzimática (UI/1 000 gss)	
	5 cm	10 cm
0	0,119 ± 0,103	0,056 ± 0,048
1	9,019 ± 1,694	2,509 ± 0,145
2	19,769 ± 1,034	2,871 ± 0,193
3	11,706 ± 1,095	3,401 ± 0,210
4	6,391 ± 2,226	2,342 ± 0,418

* Actividad enzimática promedio de las 3 réplicas ± desviación estándar

En la Figura 3.10 se presenta la producción de enzima lignino peroxidasa:

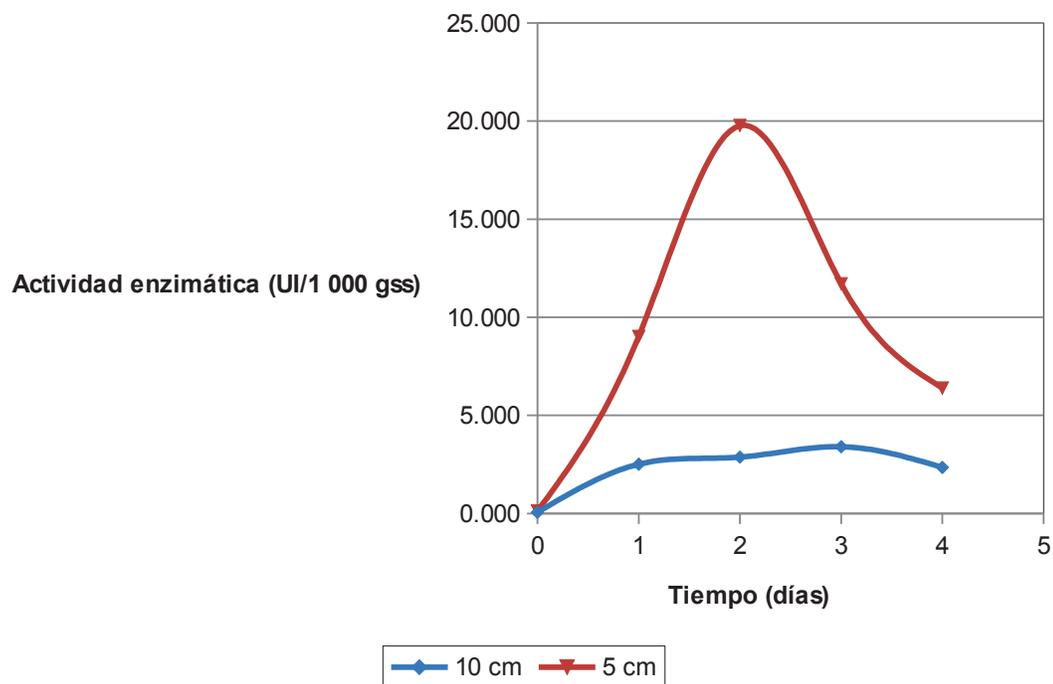


Figura 3.32. Actividades lignino peroxidásicas obtenidas en el fermentador de bandejas a 35 °C para una altura de lecho de 5 y 10 cm

Una altura de 5 cm favorece la producción de enzima lignino peroxidasa a 35 °C. El incremento de la actividad a esta altura de lecho es más rápido y el pico máximo alcanzado es 5,81 veces mayor al obtenido con una altura de 10 cm. Este comportamiento es similar al que se obtuvo al trabajar a una temperatura de 30 °C.

3.4.2 CAMBIO EN LA MANGANESO PEROXIDASA POR ALTURA DE LECHO

- **Temperatura de 30 °C**

En la Tabla 3.19 se presentan los valores de la actividad enzimática manganeso peroxidásica obtenidos en el fermentador de bandejas al emplear una altura de lecho de 5 y 10 cm a 30 °C.

Tabla 3.26. Actividad Manganeso Peroxidásica* promedio en el fermentador de bandejas para una altura de lecho de 5 y 10 cm a 30 °C

Tiempo (días)	Actividad enzimática (UI/1 000 gss)	
	5 cm	10 cm
0	0,151 ± 0,052	0,057 ± 0,065
1	1,091 ± 0,962	0,255 ± 0,112
2	5,363 ± 0,596	0,552 ± 0,170
3	7,362 ± 0,157	1,301 ± 0,130
4	6,665 ± 0,773	1,994 ± 0,085

* Actividad enzimática promedio de las 3 réplicas ± desviación estándar

En la Figura 3.11 se presenta la producción de enzima manganeso peroxidasa durante el proceso fermentativo a 30 °C para una altura de lecho de 5 y 10 cm en el fermentador de bandejas.

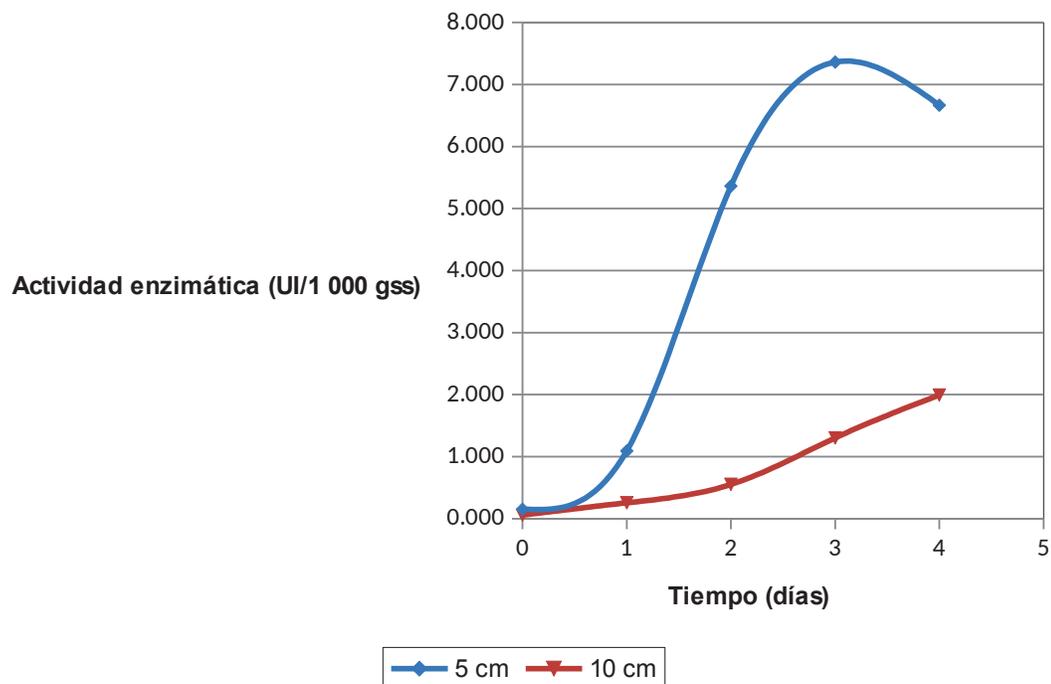


Figura 3.33. Actividades manganeso peroxidásicas obtenidas en el fermentador de bandejas a 30 °C para una altura de lecho de 5 y 10 cm

Para la enzima manganeso peroxidasa se encuentra que la altura de lecho influye del mismo modo que en la producción de enzima lignino peroxidasa. Una menor altura de lecho permite obtener una actividad mayor y el pico de actividad a 5 cm es de 5,66 veces mayor al alcanzado con una altura de lecho de 10 cm.

- **Temperatura de 35 °C**

En la Tabla 3.20 se presentan los valores de la actividad enzimática manganeso peroxidásica obtenidos en el fermentador de bandejas al emplear una altura de lecho de 5 y 10 cm a 35 °C.

Tabla 3.27. Actividad Manganeso Peroxidásica* promedio en el fermentador de bandejas para una altura de lecho de 5 y 10 cm a 35 °C

Tiempo (días)	Actividad enzimática (UI/1 000 gss)	
	5 cm	10 cm
0	0,151 ± 0,052	0,057 ± 0,024
1	6,423 ± 1,013	1,301 ± 0,234
2	13,876 ± 0,555	1,909 ± 0,153
3	9,634 ± 0,962	2,065 ± 0,107
4	4,423 ± 0,910	1,598 ± 0,200

* Actividad enzimática promedio de las 3 réplicas ± desviación estándar

En la Figura 3.12 se presenta la producción de enzima manganeso peroxidasa durante el proceso fermentativo a 35 °C para una altura de lecho de 5 y 10 cm en el fermentador de bandejas.

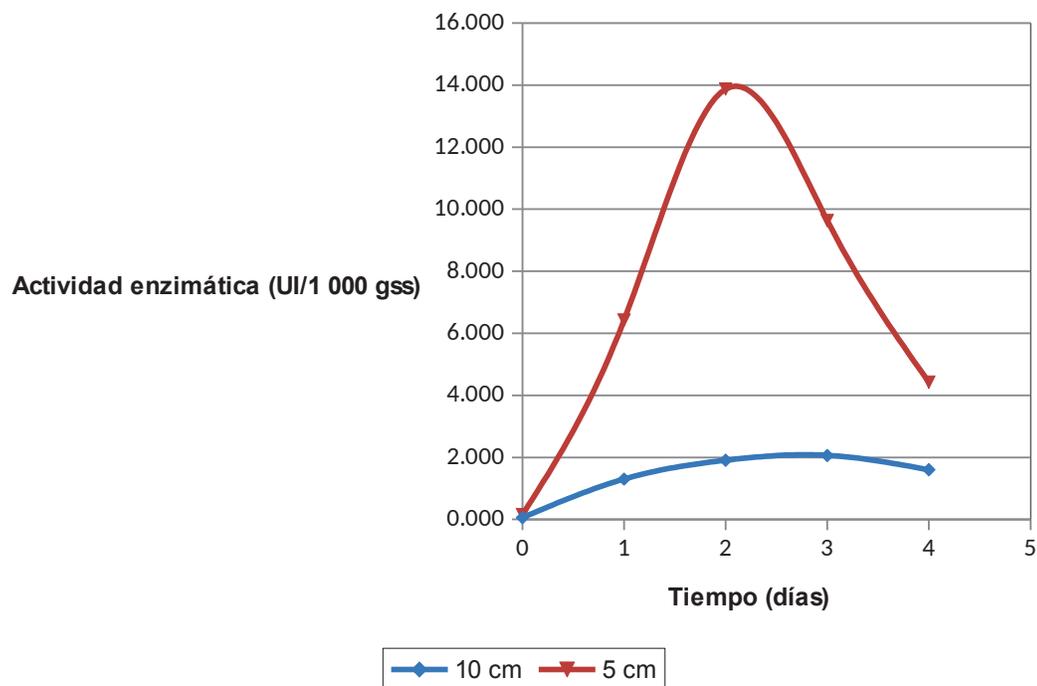


Figura 3.34. Actividades manganeso peroxidásicas obtenidas en el fermentador de bandejas a 35 °C para una altura de lecho de 5 y 10 cm

Al trabajar a una temperatura de 35 °C se encontró que la altura de lecho influyó de igual forma que al usar una temperatura de 30 °C. Una altura de lecho de 5 cm

favoreció la producción enzimática y la actividad máxima alcanzada fue 6,72 veces mayor que al trabajar con un lecho de 10 cm.

3.4.3 CAMBIO EN LA LACASA POR LA ALTURA DE LECHO

- **Temperatura de 30 °C**

En la Tabla 3.21 se presentan los valores de la actividad enzimática lacásica obtenidos en el fermentador de bandejas al emplear una altura de lecho de 5 y 10 cm a 30 °C.

Tabla 3.28. Actividad Lacásica* promedio en el fermentador de bandejas para una altura de lecho de 5 y 10 cm a 30 °C

Tiempo (días)	Actividad enzimática (UI/1 000 gss)	
	5 cm	10 cm
0	0,037 ± 0,064	0,035 ± 0,030
1	0,296 ± 0,231	0,207 ± 0,104
2	1,851 ± 0,280	0,294 ± 0,060
3	2,962 ± 0,257	0,398 ± 0,060
4	3,259 ± 0,357	1,072 ± 0,060

* Actividad enzimática promedio de las 3 réplicas ± desviación estándar

En la Figura 3.13 se presenta la producción de enzima lacasa durante el proceso fermentativo a 30 °C para una altura de lecho de 5 y 10 cm en el fermentador de bandejas.

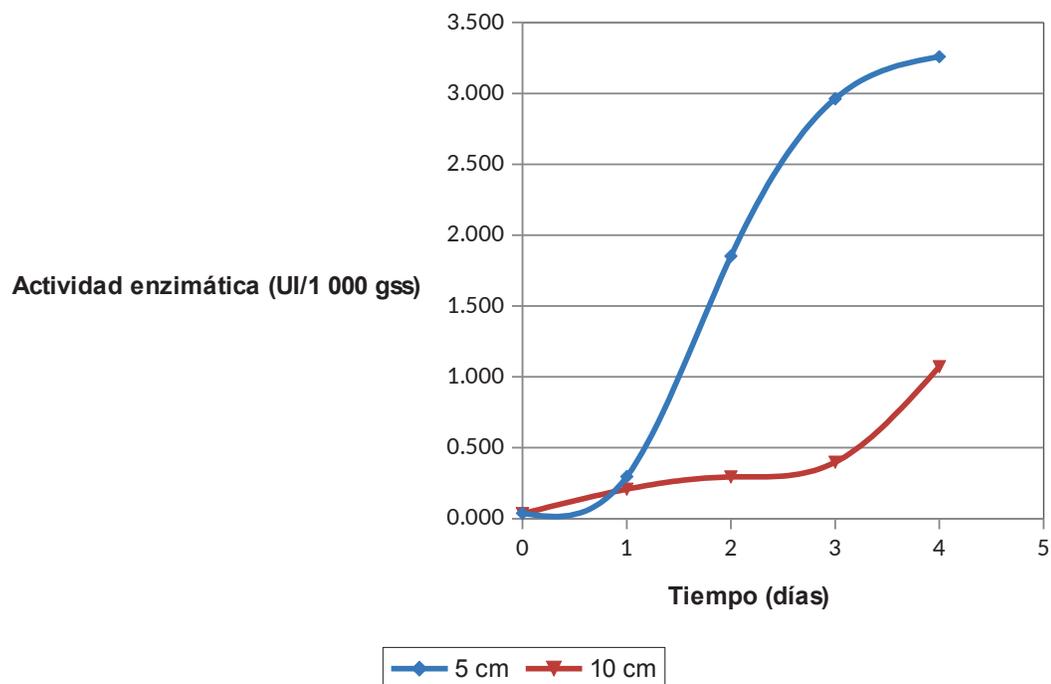


Figura 3.35. Actividades lacásicas obtenidas en el fermentador de bandejas a 30 °C para una altura de lecho de 5 y 10 cm

Se obtuvo una mayor actividad lacásica con una altura de lecho de 5 cm. Los mismos resultados se obtuvieron para la enzima lignino y manganeso peroxidasa. El incremento en la altura del lecho provocaría que disminuya la transferencia de oxígeno y esto podría causar una baja producción enzimática. La actividad máxima con un lecho de 5 cm fue 3,04 veces mayor a la obtenida con un lecho de 10 cm.

- **Temperatura de 35 °C**

En la Tabla 3.22 se presentan los valores de la actividad enzimática lacásica obtenidos en el fermentador de bandejas al emplear una altura de lecho de 5 y 10 cm a 35 °C.

Tabla 3.29. Actividad Lacásica* promedio en el fermentador de bandejas para una altura de lecho de 5 y 10 cm a 35 °C

Tiempo (días)	Actividad enzimática (UI/1 000 gss)	
	5 cm	10 cm
0	0,074 ± 0,064	0,017 ± 0,030
1	2,370 ± 0,891	0,432 ± 0,060
2	6,443 ± 0,294	1,054 ± 0,150
3	6,739 ± 0,231	3,198 ± 0,079
4	4,814 ± 0,280	3,440 ± 0,108

* Actividad enzimática promedio de las 3 réplicas ± desviación estándar

En la Figura 3.14 se presenta la producción de enzima lacasa durante el proceso fermentativo a 35 °C para una altura de lecho de 5 y 10 cm en el fermentador de bandejas.

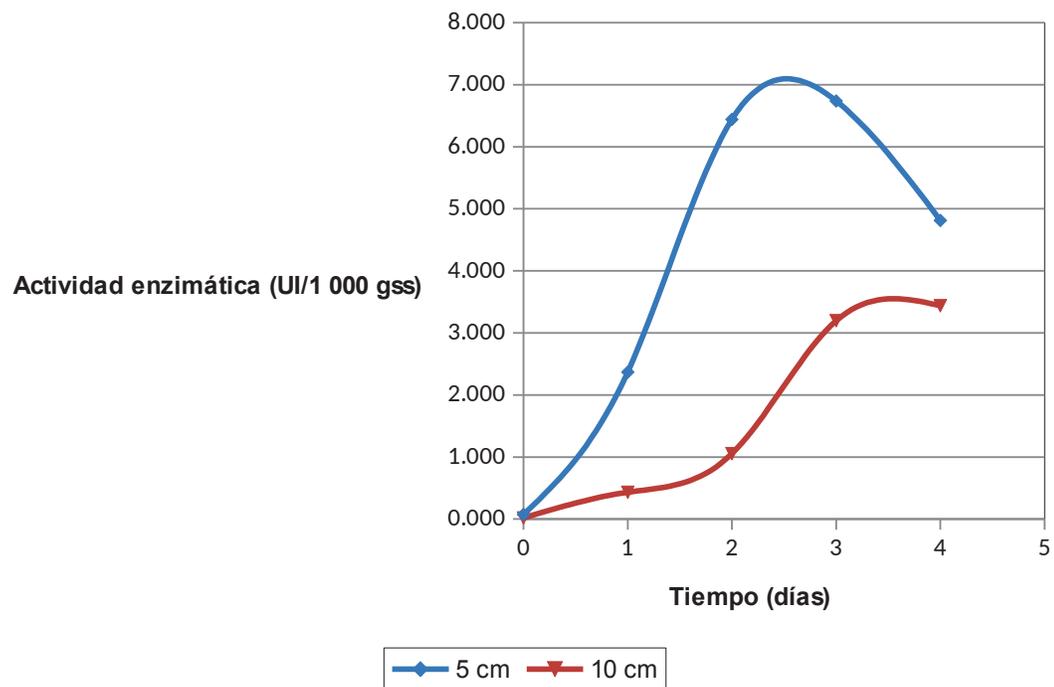


Figura 3.36. Actividades Lacásicas obtenidas en el fermentador de bandejas a 35 °C para una altura de lecho de 5 y 10 cm

Al trabajar a una temperatura de 35 °C se encontró que la altura de lecho influyó de igual forma que al usar una temperatura de 30 °C. Una altura de lecho de 5 cm favoreció la producción enzimática y la actividad máxima obtenida fue 1,96 veces mayor que al trabajar con una altura de 10 cm.

3.5 DETERMINACIÓN DE LA MEJOR TEMPERATURA Y ALTURA DE LECHO PARA LA PRODUCCIÓN ENZIMÁTICA

3.5.1 MEJORES CONDICIONES PARA LA LIGNINO PEROXIDASA

En la Tabla 3.23 se presenta los tratamientos realizados con el objetivo de determinar las mejores condiciones de temperatura y altura de lecho para la producción de enzima lignino peroxidasa, así como la máxima actividad obtenida y el día que se alcanzó.

Tabla 3.30. Actividades* Lignino peroxidásicas máximas obtenidas para los 4 tratamientos realizados

Tratamiento	Altura de lecho (cm)	Temperatura (°C)	Día del pico máximo	Pico máximo de actividad (UI/1 000 gss)
1	5	30	3	10,034
2	5	35	2	19,769
3	10	30	4	3,652
4	10	35	3	3,401

* Actividad enzimática promedio de las 3 réplicas

En la Figura 3.15 se presenta la producción de enzima lignino peroxidasa para los 4 tratamientos a 30 y 35 °C y una altura de lecho de 5 y 10 cm.

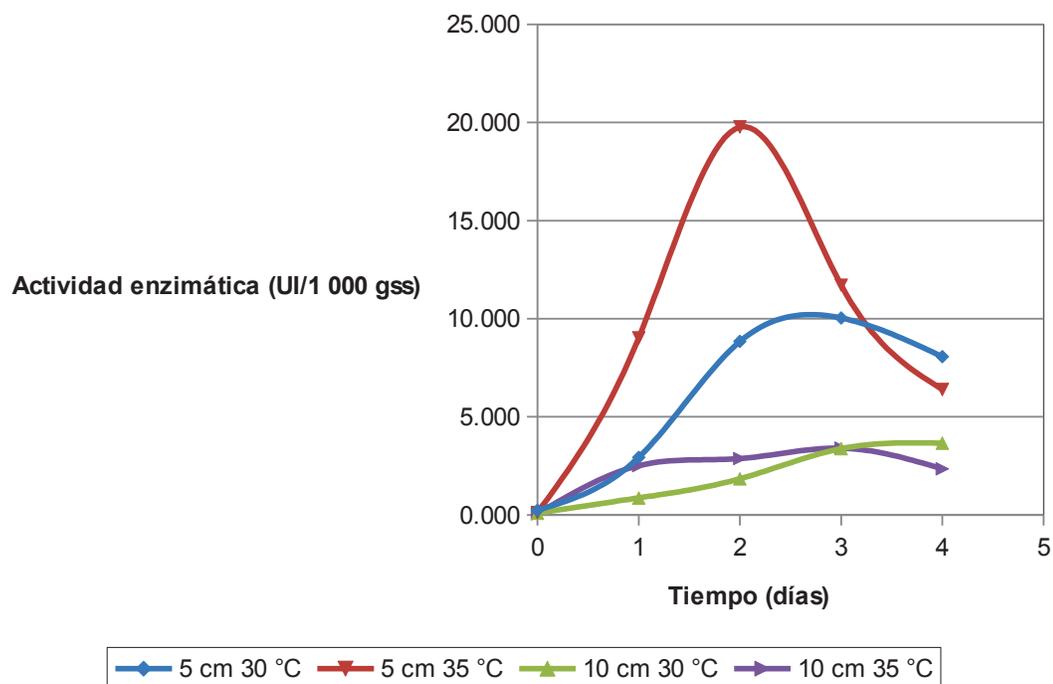


Figura 3.37. Actividades lignino peroxidásicas obtenidas en el fermentador de bandejas a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 5 y 10 cm

Como se puede observar en la Figura 3.15, con el tratamiento 2 se obtuvo el mayor pico y el incremento más rápido de la actividad enzimática en comparación con los tratamientos restantes.

Al comparar el tratamiento 1 y 4 se puede ver que las dos curvas tienen una tendencia similar hasta el día 1. Esto puede ocurrir por la diferencia en la altura de lecho, pues en el caso del tratamiento 1 aunque la temperatura es menor su altura de lecho permitiría que se produzca una mayor transferencia de oxígeno. Mientras que en el tratamiento 4 si bien la temperatura es mayor, el crecimiento que se obtiene es el mismo debido a una baja transferencia de oxígeno causada por un lecho del doble de altura.

A partir del día 2 la actividad en el tratamiento 4 se mantiene casi constante, mientras que para el tratamiento 1 la actividad continúa incrementándose y su pico de actividad (10,034 UI/1 000 gss) es 2,95 veces mayor que el obtenido en el tratamiento 4 (3,401 UI/1 000 gss).

El tratamiento 2 produjo el incremento más rápido de actividad, así como el pico máximo. Su tendencia es diferente a los tratamientos restantes, ya que se produce un descenso muy rápido de la actividad después de haberse alcanzado el pico máximo. Esto puede deberse a la presencia de proteasas que se producen debido a la escasez de nutrientes y que degradan a la enzima lignino peroxidasa (Fujian, Hongzhang y Zuohu, 2001, p. 150)

En la Tabla 3.24 se presenta el análisis estadístico del efecto de la temperatura y altura de lecho en la actividad lignino peroxidásica. Los superíndices fueron colocados con base en los resultados de la prueba de comparación múltiple de Duncan.

Tabla 3.31. Actividad lignino peroxidásica* obtenida en los 4 tratamientos realizados en el fermentador de bandejas los respectivos días de máxima producción

Altura de lecho (cm)	Temperatura (°C)	
	30 ^A	35 ^B
5 ^C	10,034 ± 0,821 ^a	19,769 ± 1,035 ^b
10 ^D	3,652 ± 0,048 ^c	3,401 ± 0,210 ^c

* Pico de actividad enzimática promedio de las 3 réplicas ± desviación estándar
 Temperaturas y alturas de lecho con diferentes superíndices son significativamente diferentes
 Las medias con una letra común no son significativamente diferentes (P>0,05)

La temperatura influyó significativamente en la actividad lignino peroxidásica, pues a 35 °C se obtuvo una actividad 1,97 veces mayor que al trabajar a 30 °C para una altura de lecho de 5 cm. Mientras que una altura de lecho de 10 cm no presentó una diferencia estadísticamente significativa en las actividades alcanzadas a 30 y 35 °C.

La altura de lecho también influyó en la actividad enzimática lignino peroxidásica obtenida. Las actividades alcanzadas con una altura de lecho de 5 cm fueron mayores a las obtenidas al trabajar con una altura de 10 cm. La mayor actividad se alcanzó a 35 °C con una altura de lecho de 5 cm y fue 5,81 veces mayor a la conseguida al trabajar con una altura de lecho de 10 cm y la misma temperatura.

El análisis de varianza del diseño experimental se presenta en la Tabla 3.25:

Tabla 3.32. Análisis de varianza del diseño experimental para la producción de enzima lignino peroxidasa

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Razón-F	Valor-P
Temperatura	71,492	1	71,492	141,89	0,0000
Altura de lecho	397,763	1	397,763	789,42	0,0000
Temperatura *Altura de lecho	70,6742	1	70,6742	140,26	0,0000
Error	4,03093	8	0,503866		
Total	543,96	11			

De acuerdo a la Razón F, la altura de lecho fue el factor que más influyó en la actividad enzimática obtenida. Pero como el Valor P de la temperatura, la altura de lecho y su interacción es menor a 0,05, los dos factores así como su interacción produjeron una diferencia estadísticamente significativa en la actividad obtenida con un nivel de confianza del 95 %.

3.5.2 MEJORES CONDICIONES PARA LA MANGANESO PEROXIDASA

En la Tabla 3.26 se presentan los tratamientos realizados con el objetivo de determinar las mejores condiciones de temperatura y altura de lecho para la producción de enzima manganeso peroxidasa, así como la máxima actividad obtenida y el día que se la alcanzó.

Tabla 3.33. Actividades Manganeso Peroxidásicas* máximas obtenidas para los 4 tratamientos realizados

Tratamiento	Altura de lecho (cm)	Temperatura (°C)	Día del pico máximo	Pico máximo de actividad (UI/1 000 gss)
1	5	30	3	7,362
2	5	35	2	13,876
3	10	30	4	1,994
4	10	35	3	2,065

* Actividad enzimática promedio de las 3 réplicas

En la Figura 3.16 se presenta la producción de enzima manganeso peroxidasa para los 4 tratamientos a 30 y 35 °C y una altura de lecho de 5 y 10 cm.

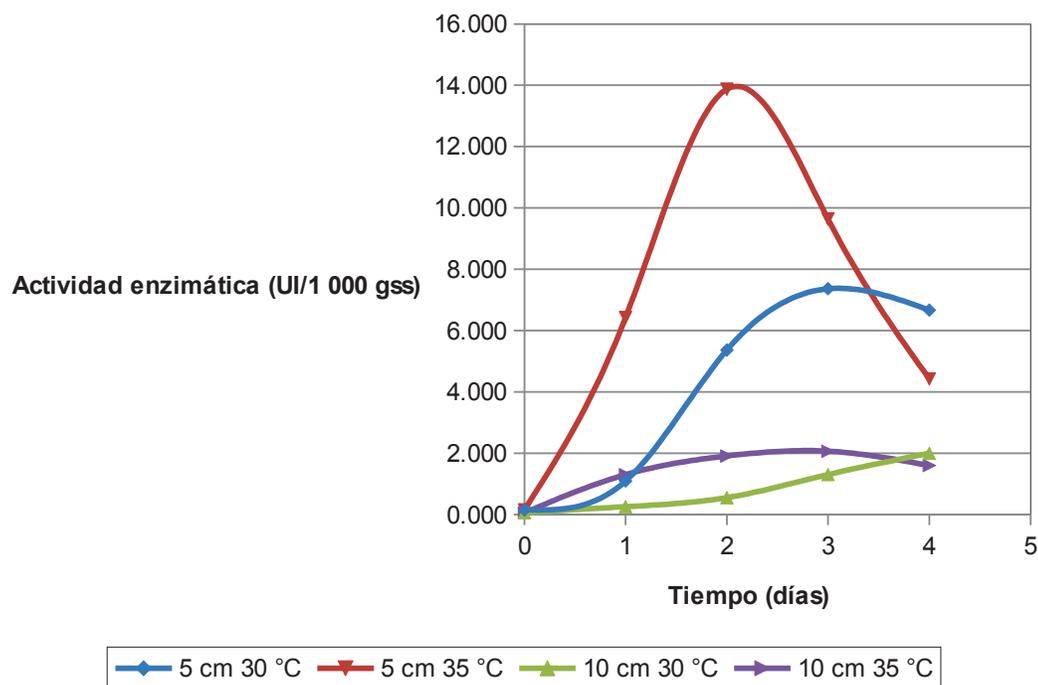


Figura 3.38. Actividades manganeso peroxidásicas obtenidas en el fermentador de bandejas a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 5 y 10 cm

El tratamiento con el cual se alcanzó mayor actividad corresponde a una temperatura de 35 °C y una altura de lecho de 5 cm. Al compararlo con el tratamiento que se realizó a 10 cm y 30 °C, que fue con el que se obtuvo menor actividad, se puede ver que una mayor temperatura favorece la producción de enzima manganeso peroxidasa así como una menor altura de lecho.

En la Tabla 3.27 se presenta el análisis estadístico del efecto de la temperatura y altura de lecho en la actividad manganeso peroxidasa. Los superíndices fueron colocados con base en los resultados de la prueba de comparación múltiple de Duncan.

Tabla 3.34. Actividad manganeso peroxidásica* obtenida en los 4 tratamientos realizados en el fermentador de bandejas los respectivos días de máxima producción

Altura de lecho (cm)	Temperatura (°C)	
	30 ^A	35 ^B
5 ^C	7,362 ± 0,158 ^a	13,876 ± 0,555 ^b
10 ^D	1,994 ± 0,085 ^c	2,065 ± 0,107 ^c

* Pico de actividad enzimática promedio de las 3 réplicas ± desviación estándar
 Temperaturas y alturas de lecho con diferentes superíndices son significativamente diferentes
 Las medias con una letra común no son significativamente diferentes (P>0,05)

La temperatura afectó significativamente la actividad manganeso peroxidasa, pues a 35 °C se obtuvo una actividad 1,88 veces mayor que al trabajar a 30 °C con una altura de lecho de 5 cm. Mientras que para una altura de lecho de 10 cm, las actividades alcanzadas a 30 y 35 °C no presentaron una diferencia significativa.

La altura de lecho también influyó en la actividad enzimática manganeso peroxidásica obtenida. Las actividades alcanzadas con una altura de lecho de 5 cm fueron mayores a las obtenidas al trabajar con una altura de 10 cm. La mayor actividad se alcanzó a 35 °C con una altura de lecho de 5 cm y fue 6,72 veces mayor a la conseguida al trabajar con una altura de lecho de 10 cm y la misma temperatura.

El análisis de varianza del diseño experimental se presenta en la Tabla 3.28:

Tabla 3.35. Análisis de varianza del diseño experimental para la producción de enzima manganeso peroxidasa

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Razón-F	Valor-P
Temperatura	32,5217	1	32,5217	369,56	0,0000
Altura de lecho	221,319	1	221,319	2515,20	0,0000
Temperatura* Altura de lecho	31,1342	1	31,1342	353,80	0,0000
Error	0,704004	8	0,0880005		
Total	285,698	11			

De acuerdo a la Razón F, la altura de lecho fue el factor que más influyó en la actividad manganeso peroxidasa obtenida. Pero el Valor P de la temperatura, la altura de lecho y su interacción es menor a 0,05; lo cual indica que los dos

factores, así como su interacción produjeron una diferencia estadísticamente significativa en la actividad obtenida con un nivel de confianza del 95 %.

3.5.3 MEJORES CONDICIONES PARA LA LACASA

En la Tabla 3.29 se presentan las actividades máximas alcanzadas y los días correspondientes a ellas, para todos los tratamientos realizados.

Tabla 3.36. Actividades* Lacásicas máximas obtenidas para los 4 tratamientos realizados

Tratamiento	Altura de lecho (cm)	Temperatura (°C)	Día del pico máximo	Pico máximo de actividad (UI/1 000 gss)
1	5	30	4	3,259
2	5	35	3	6,739
3	10	30	4	1,072
4	10	35	4	3,440

* Actividad enzimática promedio de las 3 réplicas

En la Figura 3.17 se presenta la producción de enzima lacasa para los 4 tratamientos a 30 y 35 °C y una altura de lecho de 5 y 10 cm.

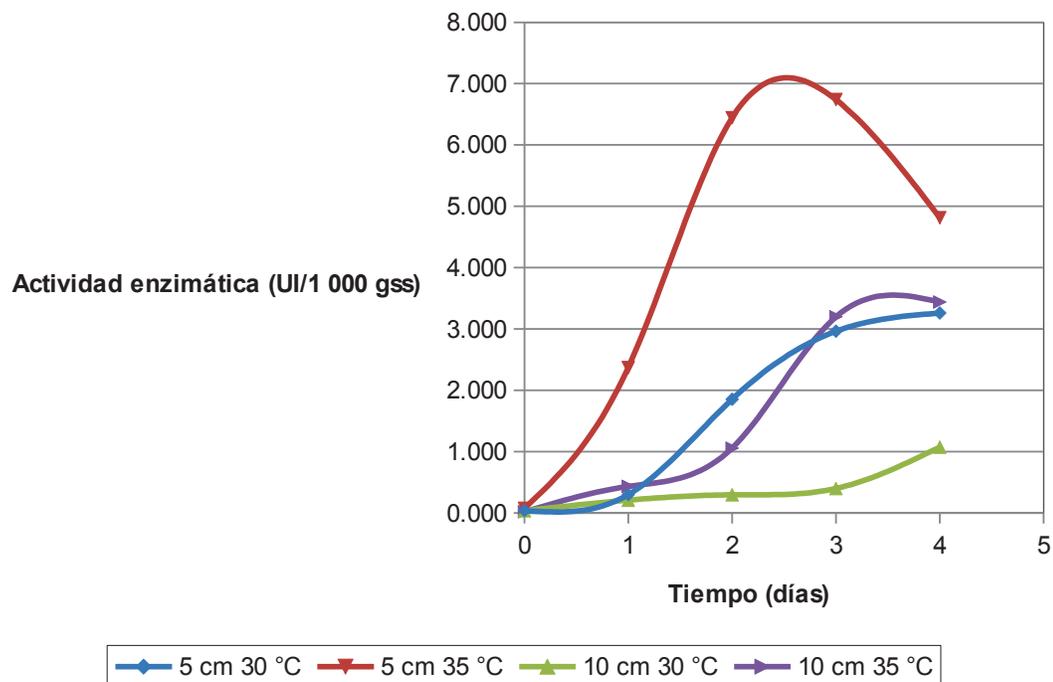


Figura 3.39. Actividades lacásicas obtenidas en el fermentador de bandejas a 30 y 35 °C para una altura de lecho de 5 y 10 cm

La mayor actividad se obtuvo al trabajar a 35 °C y con una altura de lecho de 5 cm. Estas condiciones permiten obtener una mayor velocidad de incremento en la actividad y un pico máximo al día 3.

Al analizar los tratamientos 1 y 4, y se observa que presentan una tendencia similar en el incremento de la actividad lacásica. Hasta el día 1 se puede ver que el tratamiento 4 produce una mayor actividad, esto podría deberse a la mayor temperatura inicial (35 °C), la cual le permite al hongo un crecimiento más rápido y de esta manera una producción enzimática más temprana.

En el día 2 se observa que la actividad obtenida con el tratamiento 1 aumenta y supera a la actividad alcanzada por el tratamiento 4. Este cambio podría deberse a la diferencia en las alturas de lecho utilizadas en ambos tratamientos, pues en el tratamiento 4 una altura de 10 cm podría provocar una menor transferencia de oxígeno y de ésta forma perjudicar el metabolismo normal del hongo.

Finalmente, en el día 3 y 4 se observa que nuevamente el tratamiento 4 produce una mayor actividad que el tratamiento 1, lo cual podría ocurrir debido al rango de temperatura óptimo para la producción de enzima lacasa, pues de acuerdo a Irshad et al. (2011), este se encuentra entre 35 y 40 °C (p. 2868).

En la Tabla 3.30 se presenta el análisis estadístico del efecto de la temperatura y altura de lecho en la actividad lacasa. Los superíndices fueron colocados con base en los resultados de la prueba de comparación múltiple de Duncan.

Tabla 3.37. Actividad lacásica* obtenida en los 4 tratamientos realizados en el fermentador de bandejas los respectivos días de máxima producción

Altura de lecho (cm)	Temperatura (°C)	
	30 ^A	35 ^B
5 ^C	3,258 ± 0,358 ^a	6,739 ± 0,232 ^b
10 ^D	1,072 ± 0,060 ^c	3,440 ± 0,108 ^a

* Pico de actividad enzimática promedio de las 3 réplicas ± desviación estándar
 Temperaturas y alturas de lecho con diferentes superíndices son significativamente diferentes
 Las medias con una letra común no son significativamente diferentes (P>0,05)

La temperatura tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la actividad lacasa alcanzada. A 35 °C se obtuvo mayores actividades que al trabajar a 30 °C tanto al emplear una altura de lecho de 5 cm como para una altura de 10 cm.

La altura de lecho también influyó significativamente en la producción de enzima lacasa. Al trabajar con una mayor altura de lecho y a la misma temperatura se obtuvieron menores valores de actividad. El tratamiento a 30 °C y 5 cm de altura de lecho no tuvo diferencia significativa con el tratamiento a 35 °C y 10 cm de altura de lecho.

El análisis de varianza del diseño experimental se presenta en la Tabla 3.31:

Tabla 3.38. Análisis de varianza del diseño experimental para la producción de enzima lacasa

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Razón-F	Valor-P
Temperatura	25,6581	1	25,6581	522,10	0,0000
Altura de lecho	22,5749	1	22,5749	459,36	0,0000
Temperatura* Altura de lecho	0,929077	1	0,929077	18,91	0,0025
Error	0,393153	8	0,0491441		
Total	49,5552	11			

De acuerdo a la Razón F, la temperatura fue el factor que más influyó en la actividad lacasa obtenida. El Valor P de la temperatura, la altura de lecho y su interacción es menor a 0,05; lo cual indica que los dos factores, así como su interacción produjeron una diferencia estadísticamente significativa en la actividad obtenida con un nivel de confianza del 95 %.

3.6 DISEÑO DEL FERMENTADOR DE BANDEJAS A ESCALA PILOTO

En la Tabla 3.32 se muestra la mejor temperatura y altura de lecho para la producción enzimática y el día que se obtuvo la mayor producción:

Tabla 3.39. Mejor temperatura y altura de lecho para la producción de enzima lignino peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa por el hongo *Phanerochaete chrysosporium* en un fermentador de bandejas

Enzima	Altura de Lecho (cm)	Temperatura (°C)	Día del pico de producción
Lignino Peroxidasa	5	35	2
Manganeso Peroxidasa	5	35	2
Lacasa	5	35	3

La máxima actividad para la enzima lignino y manganeso peroxidasa se alcanzó el día 2 del proceso de fermentación, mientras que la enzima lacasa alcanzó su actividad máxima al día 3. Para determinar el día en el que se debería realizar la

extracción y para la fermentación se presenta la disminución de actividad para cada enzima en la Tabla 3.33.

Tabla 3.40. Actividad* lignino peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa alcanzada en los días 2 y 3 de la fermentación a 35 °C y 5 cm de altura de lecho

Enzima	Actividad enzimática (UI/1 000 gss)		Disminución (%)
	Día 2	Día 3	
Lignino Peroxidasa	19,769	11,706	40,8
Manganeso peroxidasa	13,876	9,634	30,6
Lacasa	6,443	6,739	4,4

* Actividad enzimática promedio de las 3 réplicas

Si se analiza la disminución que sufre la actividad lignino peroxidásica y manganeso peroxidasa en el día 3 del proceso de fermentación con respecto a su pico de producción en el día 2, se puede observar en la Tabla 3.33 que la disminución para la actividad lacasa es menor. Y por lo tanto el proceso de extracción se debería llevar a cabo el día 2.

3.6.1 PARÁMETROS DE LA ECUACIÓN DEL NÚMERO MODIFICADO DE DAMKÖHLER

3.6.1.1 Densidad de lecho (ρ_b)

En la Tabla 3.34 se presenta la densidad de lecho obtenida para una altura de 5 y 10 cm.

Tabla 3.41. Densidad de lecho para una altura de 5 cm y 10 cm

Altura (cm)	Densidad (kg/m ³)
5	68,50
10	87,86

Los resultados muestran que al usar una altura de 10 cm, la densidad del lecho es 1,3 veces mayor que al llenar la bandeja hasta una altura de 5 cm. Esto indica

que se requiere más del doble de la cantidad de aserrín para llenar un volumen exactamente 2 veces mayor.

Una mayor densidad demuestra que el espacio entre partículas, necesariamente, se reduce para contener una mayor cantidad de sustrato en un mismo volumen. Esto podría producir que tanto la transferencia de oxígeno así como la transferencia de calor disminuyan e interfieran con el crecimiento del hongo y con la producción enzimática.

3.6.1.2 Coeficiente de rendimiento para el calor producido por el metabolismo (Y)

En la Tabla 3.35 se muestra el coeficiente de rendimiento para el calor producido por el metabolismo en los 4 tratamientos llevados a cabo en el fermentador de bandejas.

Tabla 3.42. Coeficiente de rendimiento para el calor producido por el metabolismo* del hongo *Phanerochaete chrysosporium* de los 4 tratamientos llevados a cabo en el fermentador de bandejas

Tratamiento	Altura de lecho (cm)	Temperatura de entrada (°C)	Temperatura de salida (°C)	Y×10 ⁵ (J/kg biomasa seca)
1	5	30	33	2,604
2	5	35	38	2,604
3	10	30	32	1,786 ^a
4	10	35	37	1,786 ^a

* Promedio de las 3 réplicas para cada uno de los tratamientos

^a Para determinar el coeficiente de rendimiento para el calor producido por el metabolismo se utilizó la temperatura final alcanzada en la fermentación y no el promedio de todo el proceso.

El coeficiente de rendimiento para el calor producido por el metabolismo es propio de cada organismo y no depende de la temperatura o la altura de lecho de la fermentación. Pero como se puede observar este coeficiente varió de acuerdo a la altura de lecho empleada.

Esto podría deberse al método que se empleó para determinar el coeficiente. Se consideró que la temperatura de salida del aire es igual a la temperatura del sustrato para un lecho de 10 cm.

La efectividad de la transferencia de calor por conducción desde el centro del lecho hacia las superficies en contacto con el aire circundante disminuye en proporción al cuadrado de esta distancia (Mitchell et al., 2006, p. 61). Entonces para una altura de lecho de 10 cm la transferencia de calor por conducción es 6,25 veces menor que al usar una altura de 5 cm.

Por esta razón, al utilizar una altura de 10 cm la temperatura de salida del aire alcanzada no reflejaría la temperatura real del sustrato, que sería mayor.

Los coeficientes de rendimiento para el calor producido por el metabolismo para diferentes hongos como el *Aspergillus niger*, el *Rhizopus oligosporus* o el *Gibberella fujikuroi* están en el orden de 10^5 a 10^7 (Mitchell et al., 1999, p. 169; Mitchell et al., 2006, p. 237). Por lo tanto los coeficientes encontrados para el hongo *Phanerochaete chrysosporium* se encuentran dentro de los valores esperados.

3.6.1.3 Velocidad de crecimiento específica a la mejor temperatura (μ_{opt})

En la Figura 3.18 se presenta la curva de crecimiento del hongo para una temperatura de 35 °C y una altura de lecho de 5 cm.

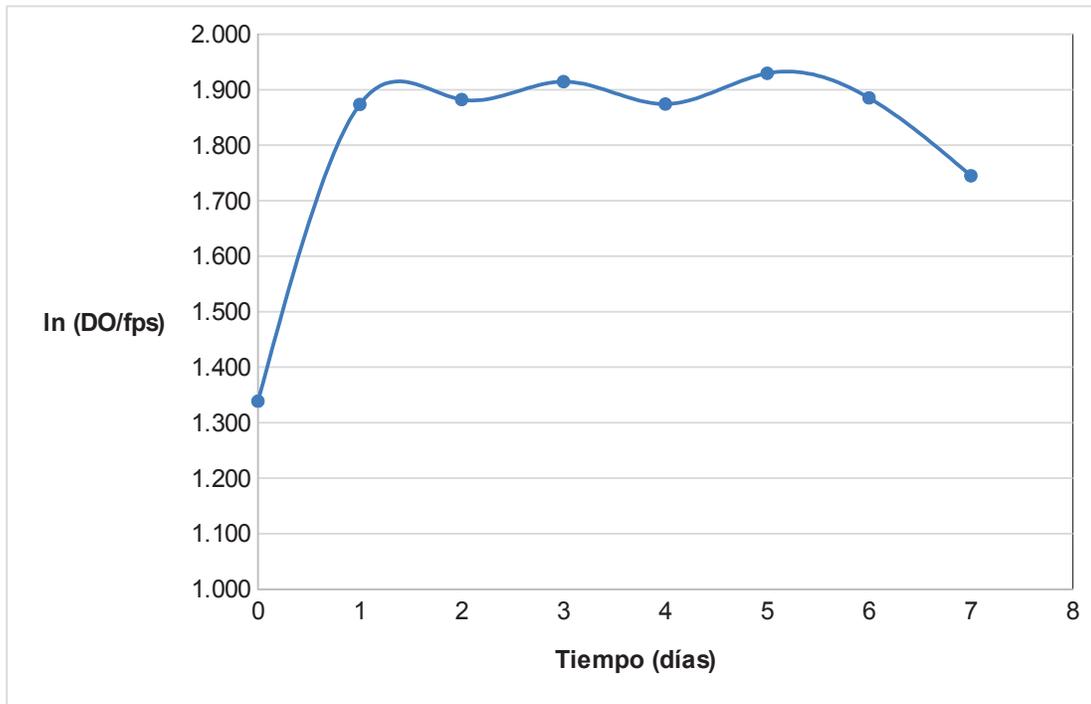


Figura 3.40. Curva de crecimiento del hongo *Phanerochaete chrysosporium* en función de la densidad óptica para una temperatura de 35 °C y una altura de lecho de 5 cm en el fermentador de bandejas

La fase de crecimiento exponencial del hongo se produce hasta el día 1, desde aquí hasta el día 6 se tiene la fase estacionaria como se puede observar en la Figura 3.18.

El inicio temprano de la fase estacionaria podría deberse al agotamiento de la fuente de nitrógeno, ya que de acuerdo a Baldock y Smernik (2002) esto es común cuando se experimenta con el hongo *Phanerochaete chrysosporium* en madera, debido a su bajo contenido de nitrógeno (p.1100).

Si se observa la curva de actividad lignino peroxidásica y manganeso peroxidasa a 35 °C y con una altura de lecho de 5 cm en la Figura 3.1 y 3.3 respectivamente, se puede destacar que la generación enzimática inicia el día 1, lo cual coincide con el inicio de la fase estacionaria en la curva de crecimiento como se muestra en la Figura 3.10.

Debido a que el proceso de degradación de la lignina se lleva a cabo únicamente durante el metabolismo secundario, que corresponde a la fase estacionaria del crecimiento del hongo, es lógico que la producción enzimática coincida con el inicio de esta fase.

3.6.1.4 Coeficiente superficial de transferencia de calor entre el lecho estacionario y el aire circundante (h_A)

En la Tabla 3.36 se presentan los coeficientes superficiales de transferencia de calor entre el lecho estacionario y el aire circundante para diferentes flujos de aire:

Tabla 3.43. Coeficientes superficiales de transferencia de calor entre el lecho estacionario y el aire circundante para flujos de aire de 13, 20 y 30 L/min en el fermentador de bandejas a 35 °C

Flujo de aire (L/min)	h_A (J/h m ² °C)
13	710,9
20	1003,4
30	1387,8

El coeficiente superficial de transferencia de calor entre el lecho estacionario y el aire circundante aumenta con el flujo de aire como muestra la Tabla 3.36. Esto se debe a que este coeficiente depende del flujo de aire que ingresa al fermentador y al área perpendicular a dicho flujo de acuerdo a la Ecuación 2.4. Un mayor flujo de aire incrementa la remoción de calor, entonces es lógico que el coeficiente de transferencia de calor se incremente también.

3.6.2 DIMENSIONES, NÚMERO DE BANDEJAS Y PARÁMETROS DE OPERACIÓN DEL FERMENTADOR DE BANDEJAS A ESCALA PILOTO

3.6.2.1 Influencia del flujo de aire y de la temperatura crítica en el número de bandejas del fermentador

En la Tabla 3.37 se presenta el número de bandejas obtenidas en el fermentador para diferentes flujos de aire y tres temperaturas críticas a las mejores condiciones de temperatura y altura de lecho determinadas.

Tabla 3.44. Número de bandejas máximas del fermentador para diferentes flujos de aire y temperaturas críticas de 36, 37 y 38 °C, para una altura de lecho de 5 cm y una temperatura de 35 °C

Flujo de aire (L/min)	Número de bandejas		
	36 °C	37 °C	38 °C
13	1.8	3.7	5.5
20	2.6	5.2	7.8
25	3.1	6.2	9.3
30	3.6	7.2	10.7
35	4.0	8.1	12.1
40	4.5	9.0	13.5
45	4.9	9.9	14.8
50	5.4	10.8	16.2

En la Figura 3.19 se presenta el efecto del flujo de aire y la temperatura crítica sobre el número de bandejas máximo que se puede obtener en el fermentador de bandejas a las mejores condiciones de temperatura y altura de lecho.

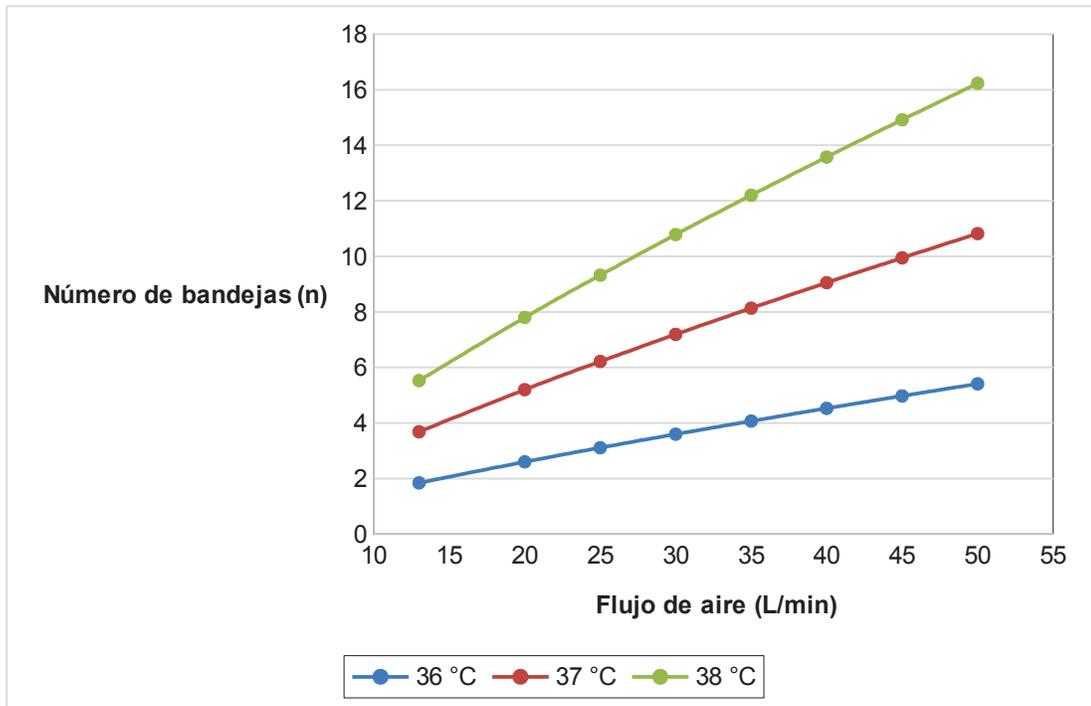


Figura 3.41. Efecto del flujo de aire y la temperatura crítica en el número de bandejas máximas obtenidas para el fermentador para una altura de lecho de 5 cm y una temperatura de 35 °C

Para un determinado flujo de aire, el número de bandejas que se puede alcanzar es mayor para una temperatura crítica más elevada como se puede observar en la Figura 3.11. Esto se debe a que el aire se calienta mientras asciende y pasa por las bandejas, entonces un mayor número de bandejas significa una mayor temperatura a la salida del fermentador.

El número de bandejas es directamente proporcional al flujo de aire, pero su pendiente depende de la temperatura crítica. Para 36 °C el número de bandejas aumenta en 1,9 para un incremento en el flujo de aire de 20 a 40 L/min. Sin embargo, para una temperatura crítica de 38 °C, el número de bandejas aumenta en 5,7 para el mismo incremento en el flujo de aire.

3.6.2.2 Parámetros de operación del fermentador de bandejas a escala piloto

Los parámetros utilizados en la ecuación del número de Damköhler modificado para determinar el número de bandejas del fermentador a escala piloto a la mejor temperatura y altura de lecho se presentan en la Tabla 3.38:

Tabla 3.45. Parámetros utilizados en la ecuación del número Damköhler modificado a 35 °C y una altura de lecho de 5 cm

Parámetro	Valor	Unidad
ρ_b	68,5	kg/m ³
Y	$2,604 \times 10^5$	J/kg biomasa seca
μ_{opt}	0,022	h ⁻¹
h_A	1387,81	J/h °C m ²
X_m^*	0,353	kg biomasa seca/kg sustrato húmedo
T_{crit}	38	°C
T_a	35	°C
H	0,05	m

* Viccini et al., (2001), p. 278

La temperatura crítica corresponde al valor máximo del rango de temperatura óptimo para la producción de enzimas ligninolíticas por el hongo *Phanerochaete chrysosporium* (Asgher et al., 2011, p. 4459).

Cualquier incremento en la temperatura provoca una variación en la producción enzimática del hongo, pero una temperatura mayor a 38 °C beneficiaría la producción de biomasa y no la generación en enzimas (Shukla et al., 2011, p.715).

En la Tabla 3.39 se presentan los parámetros de operación del fermentador de bandejas a escala piloto.

Tabla 3.46. Parámetros de funcionamiento del fermentador de bandejas a escala piloto

Parámetro	Valor	Unidades
Flujo de aire	30	L/min
Temperatura de entrada del flujo de aire	35	°C
Altura de lecho	0,05	m

La altura de lecho y la temperatura del flujo de aire que ingresa al fermentador corresponden a la mejor temperatura y altura de lecho con las que se obtuvieron mayores actividades enzimáticas lignino peroxidasa, manganeso peroxidasa y lacasa en el fermentador de bandejas a escala de laboratorio.

El flujo de aire para el fermentador a escala piloto en comparación al utilizado a escala de laboratorio de 13 L/min es 2,3 veces mayor. Pero el incremento del flujo de aire no afecta significativamente la transferencia de oxígeno, y por lo tanto la actividad enzimática; sino que permite mantener una temperatura máxima de 38 °C a la salida del fermentador (Thibault et al., 2000, p.13).

3.6.2.3 Dimensiones del fermentador de bandejas a escala piloto

Tabla 3.47. Dimensiones del fermentador de bandejas a escala piloto, de las bandejas y número de deflectores para una carga de 7 kg

Parámetros	Valor	Unidades
Número de bandejas	10	
Altura de la bandeja	5	cm
Ancho de la bandeja	40	cm
Largo de la bandeja	56	cm
Número de deflectores	10	
Altura del fermentador	160	cm
Ancho del fermentador	60	cm
Largo del fermentador	60	cm

El número de bandejas para el fermentador a escala piloto es 10, como se muestra en la Tabla 3.40, y corresponde a una carga de 7 kg. Como se puede observar en la Figura 3.11, al utilizar un flujo de 30 L/min y en un fermentador de

10 bandejas se alcanza una temperatura de 38 °C a la salida del fermentador. Y teóricamente se alcanzarían los mismos valores de actividad enzimática que a escala de laboratorio.

Se puede observar que las dimensiones de las bandejas son las mismas utilizadas en el fermentador a escala de laboratorio. De acuerdo a Mitchell et al. (2006) para escalar un fermentador de bandejas es recomendable mantener constante las “distancias de conducción”, es decir las dimensiones de las bandejas, e incrementar el número de bandejas en su lugar (p. 61).

El largo y el ancho del fermentador permanecen constantes debido a que las dimensiones de las bandejas también lo hacen. La altura y el número total de deflectores del fermentador a escala piloto corresponden al incremento de bandejas respecto al fermentador a escala de laboratorio. En las Figuras 3.20, 3.21, 3.22 y 3.23 se presentan las dimensiones del armazón, el soporte interno y los deflectores del fermentador de bandejas a escala piloto.

Figura 3.42. Vista isométrica del fermentador de bandejas a escala piloto. (Todas las dimensiones se encuentran en centímetros)

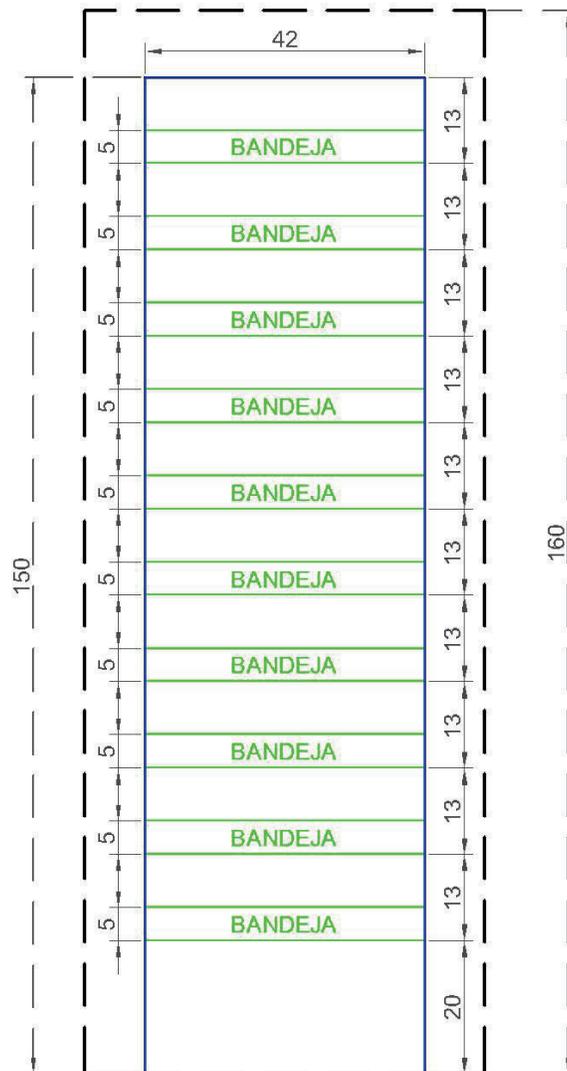


Figura 3.43. Vista frontal del fermentador (en negro), del soporte interno (en azul) y bandejas (en verde). (Todas las dimensiones se encuentran en centímetros)

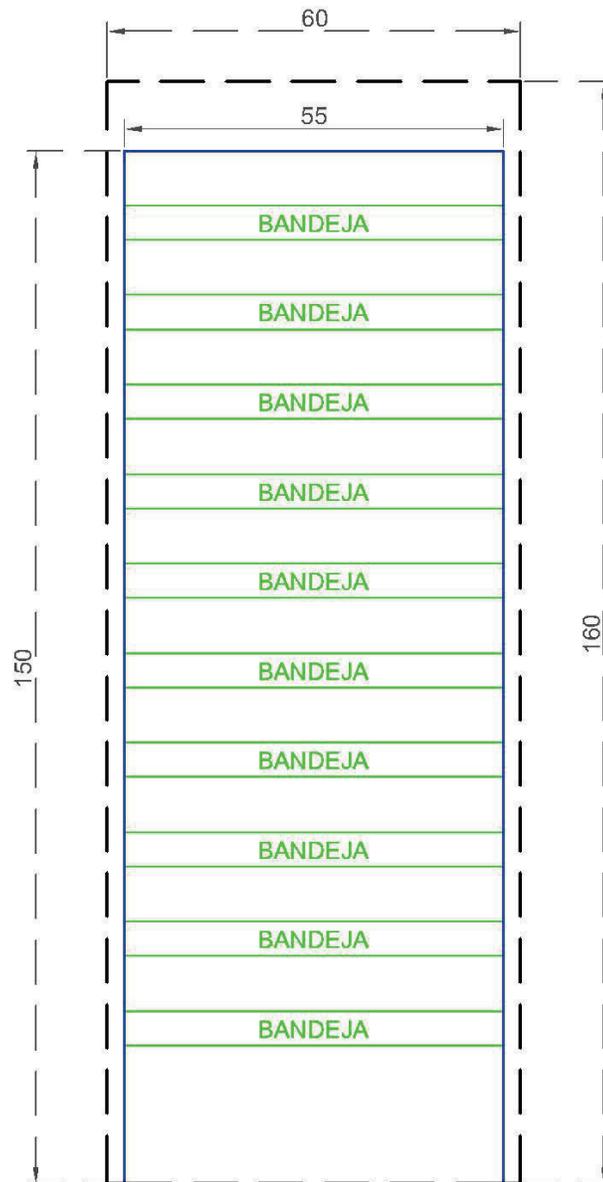


Figura 3.44. Vista lateral del fermentador (en negro), del soporte interno (en azul) y las bandejas (en verde). (Todas las dimensiones se encuentran en centímetros)

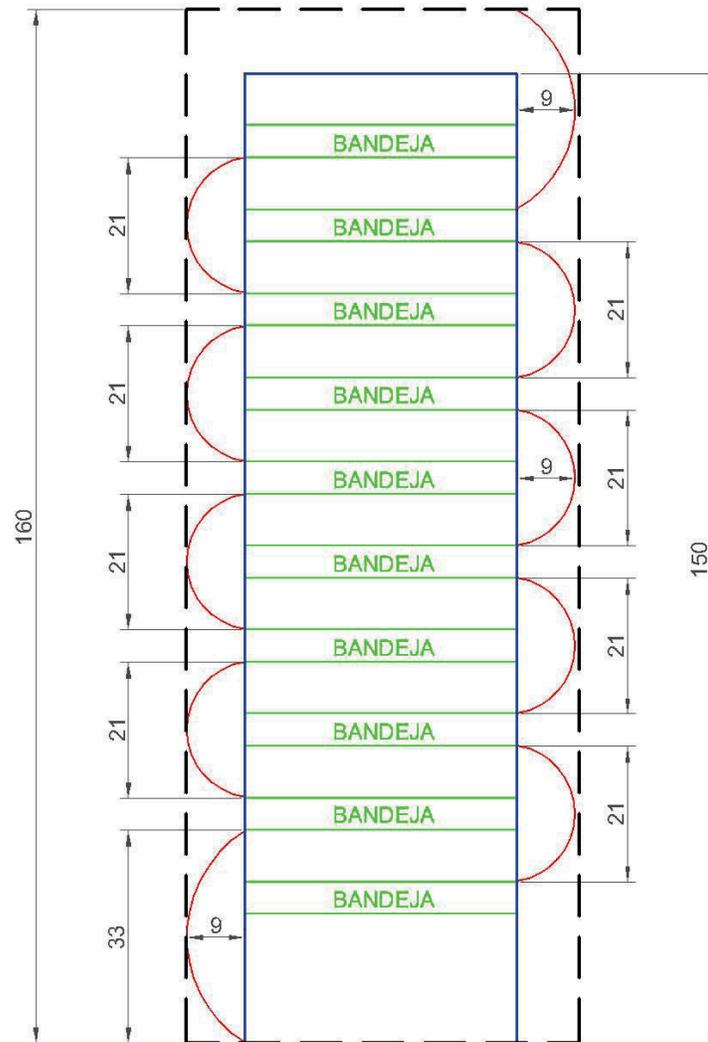


Figura 3.45. Vista frontal del fermentador (en negro), del soporte interno (en azul), de las bandejas (en verde) y los deflectores acoplados (en rojo). (Todas las dimensiones se encuentran en centímetros)

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

- La temperatura y la humedad del sustrato en cada bandeja fue constante al trabajar con un flujo de aire de 13 y 20 L/min.
- La actividad lignino peroxidasa máxima fue de 19,769 U/1 000 gss, se la alcanzó en el día 2 del proceso de fermentación al trabajar a 35 °C y con una altura de lecho de 5 cm.
- La actividad manganeso peroxidasa máxima fue de 13,876 U/1 000 gss, se la alcanzó en el día 2 del proceso de fermentación al trabajar a 35 °C y con una altura de lecho de 5 cm.
- La actividad lacásica podría realmente corresponder a la acción del complejo Mn (III). Su valor máximo fue de 6,739 U/1 000 gss, se la alcanzó en el día 3 del proceso de fermentación al trabajar a 35 °C y con una altura de lecho de 5 cm.
- La variable que influyó más significativamente sobre la producción enzimática fue la altura del lecho. Una altura de lecho de 5 cm permitió alcanzar actividades mayores a 30 y 35 °C.
- No hubo presencia de actividad celulásica dentro del período de fermentación de 5 días.
- Las dimensiones del fermentador de bandejas a escala piloto para una carga total de 7 kg son 60x60x160 cm (ancho, largo y altura), tiene 10 bandejas y se usará un flujo de aire de 30 L/min.

4.2 RECOMENDACIONES

- Añadir catalasas al extracto enzimático previamente para la medición de la actividad lacásica para evitar la oxidación del ABTS por la enzima manganoso peroxidasa.
- Aplicar el proceso de diálisis al extracto enzimático previo a la medición de la actividad lacásica para eliminar la influencia del complejo Mn (III).
- Medir la temperatura del sustrato en cada bandeja a lo largo del proceso de fermentación para analizar el control de temperatura obtenido con el flujo de aire.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ali, H. y Zulkali, M. (2011). Design Aspects of Bioreactors for Solid-state Fermentation: A Review. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 25(2), 255-266.
2. Almeida, E. (2012). *Estudio de la generación de extractos con actividad ligninolítica a partir del hongo Phanerochaete chrysosporium en un fermentador de bandejas*. (Proyecto de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero Químico no publicado). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
3. Alonso, A. (2007). *Cellulose Degradation and Biofilm Formation in the Developmental Life Cycle of the Cellulolytic Actinomycete Thermobifida fusca*. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=GfGheYfXWsC&pg=PA4&dq=cellulose++degradation&hl=es-419&sa=X&ei=z c6OVLfPGoGVNo-AgogP&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q=cellulose%20%20degradation&f=false> (Noviembre 2014)
4. Asgher, M., Ahmed, N. y Nasir, H. (2011). Hyperproductivity of extracellular enzymes from indigenous white rot fungi (*P. chrysosporium* IBL-03) by utilizing agro-wastes. *BioResources*, 6(4), 4454-4467.
5. Baldock, J. y Smernik, R. (2002). Chemical composition and bioavailability of thermally altered *Pinus resinosa* (Red Pine) wood. *Organic Geochemistry*, 33(9), 1093-1109. doi: 10.1016/S0146-6380(02)00062-1
6. Brambl, R. y Marzluf, G.A. (2004). *The Mycota: Biochemistry and Molecular Biology*. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=IGycDL oFaFwC&pg=PA53&lp=PA53&dq=4.%09Brambl,+R.+y+Marzluf,+G.A.+%282004%29.+The+Mycota:+Biochemistry+and+Molecular+Biology&source=bl&ots=oa-5_8h6jf&sig=1qHF8TMeuH59PXtriU4iW6DFvls&hl=es-419&sa=X&ei=awsDVfauEYL_sATX9oKoAQ&ved=0CB4Q6AEwAA#v=onepage&q=4.%09Brambl%2C%20R.%20y%20Marzluf%2C

%20G.A.%20%282004%29.%20The%20Mycota%3A%20Biochemistry
%20and%20Molecular%20Biology&f=false (Noviembre 2014)

7. Cameron, M. D., Timofeevski, S. y Aust, S. D. (2000). Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. *Applied Microbiology Biotechnology*, 54(6), 751-758.
8. Chen, H. (2013). *Modern Solid State Fermentation: Theory and Practice*. Recuperado de http://books.google.com.ec/books?id=UVw_AAAAQBAJ&pg=PA138&lpg=PA138&dq=Heat+and+mass+transfer+simulation+studies+for+solid-state+fermentation+processes&source=bl&ots=hgEUIK0ELP&sig=hb19gGT2cvcg-fktqKVL7qRcq4&hl=es&sa=X&ei=uK5uVMOIKYWhgwTQtoCgAg&redir_esc=y#v=onepage&q=Heat%20and%20mass%20transfer%20simulation%20studies%20for%20solid-state%20fermentation%20processes&f=false (Noviembre 2014)
9. Chen, J. y Zhu, Y. (2013). *Solid State Fermentation for Food and Beverages*. Recuperado de http://books.google.com.ec/books?id=HUTBAQAAQBAJ&pg=PA71&lpg=PA71&dq=Rajagopalan+and+Modak+1994&source=bl&ots=d4qPXPbJg3&sig=HFgC9aOj2PDxOJlwaNmgaenCngs&hl=es&sa=X&ei=dKhuVJPbG4jYggTP9ICIDw&redir_esc=y#v=onepage&q=Rajagopalan%20and%20Modak%201994&f=false (Noviembre 2014)
10. Cho, S. (2001). *Handbook of Dietary Fiber*. Recuperado de https://books.google.es/books?id=_XEqLhqtqxEC&pg=PA321&dq=lignin+structure&hl=es&sa=X&ei=CAQHVe9Ica0ggS7tYPQDQ&ved=0CFoQ6AEwCA#v=onepage&q=lignin%20structure&f=false (Noviembre, 2014)
11. Del Río, J., Rencoret, J., Gutierrez, A. y Martinez, A. (2011). Recent advances in eucalyptus wood chemistry. *5th International Colloquium on Eucalyptus Pulp*. Recuperado de: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/86342/1/5th-ICEP-delRio-paper.pdf> (Julio, 2014).

12. D'Souza, T., Merrit, C. y Reddy, C. (1999). Lignin-Modifying Enzymes of the White Rot Basidiomycete *Ganoderma lucidum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), 5307-5313.

13. Durand, A., Renaud, R., Maratray, J. y Almanza, S. (1997). The INRA-Dijon reactors: Designs and applications. En Roussos, S., Lonsane, B., Raimbault, M. y Viniegra-Gonzalez, G. (Ed.). *Advances in Solid State Fermentation*. (pp. 71-92). London, England: Kluwer Academic Publishers.

14. Evtuguin, D. y Neto, P. (2007). Recent Advances in eucalyptus Wood chemistry: Structural features through the prism of technological response. *3th International Colloquium on eucalyptus pulp*. Recuperado de: <http://www.eucalyptus.com.br/icep03/20Evtuguin.text.pdf> (Julio, 2014).

15. Faraco, V. (2013). *Lignocellulose Conversion: Enzymatic and Microbial Tools for Bioethanol Production*. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=PehEAAAQBAJ&pg=PA197&lpg=PA197&dq=12.%09Faraco,+V.+%282013%29.+Lignocellulose+Conversion:+Enzymatic+and+Microbial+Tools+for+Bioethanol+Production&source=bl&ots=B8ZgZt0CmZ&sig=qHfZyAeXPQcxYFOXmbj5Xq120vl&hl=es-419&sa=X&ei=rw0DVa2HGJPIsASW9YEI&ved=0CCcQ6AEwAQ#v=onepage&q=12.%09Faraco%2C%20V.%20%282013%29.%20Lignocellulose%20Conversion%3A%20Enzymatic%20and%20Microbial%20Tools%20for%20Bioethanol%20Production&f=false> (Noviembre, 2014)

16. Fujian, X., Hongzhang, C. y Zuohu, L. (2001). Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exploded straw as substrate. *Bioresource Technology*, 80(2), 149-151. doi: 10.1016/S0960-8524(01)00082-7

17. Gelbrich, J. (2009). *Bacterial Wood Degradation: A Study of Chemical Changes in Wood and Growth Conditions of Bacteria*. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=MeqHSLu8mS4C&pg=PA30&dq=hemicellulose+wood&hl=es-419&sa=X&ei=jFKOVMfGEsaeNpiigegO&ved=0CGAQ6AEwCA#v=onepage&q=hemicellulose%20wood&f=false> (Noviembre 2014)

18. Gil, M., Pinzon, K., Castro, Y. y Sandoval, E. (2012). Influencia de la adición de una fuente de nitrógeno en la producción de ligninasas. *Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10(1), 173-181.

19. Grunwald, P. (2015). *Industrial Biocatalysis*. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=FG_vBQAAQBAJ&pg=PA380&dq=lignocellulosic+agrowastes+sources&hl=es-419&sa=X&ei=lxUDVa-VOseBsQS8soLIDA&ved=0CB0Q6AEwAA#v=onepage&q=lignocellulosic%20agrowastes%20sources&f=false (Marzo, 2015)

20. Hames, B. y Hooper, N. (2005). *Biochemistry*. Recuperado de <https://books.google.es/books?id=dmkdDMRaR3UC&pg=PA87&dq=enzyme+activity+absorbance&hl=es&sa=X&ei=52GoVPamCsvnASHjYKwAg&ved=0CCcQ6AEwAQ#v=onepage&q=enzyme%20activity%20absorbance&f=false> (Noviembre, 2014)

21. Hamilton, G. (2006). *Kingdoms of life: Fungi*. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=eG8-RLSgfZwC&printsec=frontcover&dq=Hamilton,+G.+%282006%29.+Kingdoms+of+life:+Fungi.&hl=es-419&sa=X&ei=bg4DVYTuCuTLsATTj4D4AQ&ved=0CB4Q6AEwAA#v=onepage&q=Hamilton%2C%20G.%20%282006%29.%20Kingdoms%20of%20life%3A%20Fungi.&f=false> (Noviembre, 2014)

22. Heitner, C., Dimmel, D. y Schmidt, J. (2011). *Lignin and Lignins: Advances in Chemistry*. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=tgqRsAJwk6oC&printsec=frontcover&dq=lignin&hl=es-419&sa=X&ei=fUKOVM-qHoqYNp_PgsgO&ved=0CDsQ6AEwBA#v=onepage&q=lignin&f=false (Noviembre 2014)
23. Howard, R., Abotsi, E., Jansen Van Rensburg, E. y Howard, S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), 602-619.
24. INIAP. (2012). *Situación de los recursos genéticos forestales en Ecuador*. Recuperado de: http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/stories/descargas/informe_pas_rgf_ecuador_final_.pdf (Julio, 2014).
25. Irshad, M., Asgher, M., Sheikh, M. y Nawaz, H. (2011). Purification and characterization of laccase produced by *Schizophyllum commune* IBL-06 in solid state culture of banana stalks. *Bioresources*, 6(3), 2861-2873.
26. Jouanin, L. y Lapierre, C. (2012). *Lignins: Biosynthesis, Biodegradation and Bioengineering*. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=zjUVMC&printsec=frontcover&dq=lignin&hl=es-19&sa=X&ei=fUKOVM-qHoqYNp_PgsgO&ved=0CC0Q6AEwAg#v=onepage&q=lignin&f=false (Noviembre, 2014)
27. Kubicek, C.P. (2012). *Fungi and Lignocellulosic Biomass*. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=uqInsG4voRoC&printsec=frontcover&dq=kubicek,+C.P.+%282012%29.+Fungi+and+Lignocellulosic+Biomass&hl=es-419&sa=X&ei=phADVbeaBujfsATMroKAAg&ved=0CBwQ6AEwAA#v=onepage&q=kubicek%2C%20C.P.%20%282012%29.%20Fungi%20and%20Lignocellulosic%20Biomass&f=false> (Noviembre, 2014)

28. Kuhad, R. C. y Singh, A. (2013). *Biotechnology for Environmental Management and Resource Recovery*. Recuperado de http://books.google.es/books?id=rYJEAAAQBAJ&pg=PA9&dq=soft+rot+fungi&hl=es&sa=X&ei=wROHVPzEJIWygT1_4HwDg&ved=0CDAQ6AEwAg#v=onepage&q=soft%20rot%20fungi&f=false (Noviembre, 2014)
29. Larrondo, L., Salas, L., Melo, F., Vicuña, R. y Cullen, D. (2003). A Novel Extracellular Multicopper Oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* with Ferroxidase Activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10), 6257-6263. doi: 10.1128/AEM.69.10.6257-6263.2003
30. Lima, C., Barbosa, L., Marcelo, C., Silvério, F. y Colodette, J. (2008). Comparison between analytical pyrolysis and nitrobenzene oxidation for determination of syringyl/guaiacyl ratio in *Eucalyptus* spp. lignin. *Bioresources*, 3(3), 701-712.
31. Martinez, D., Larrondo, L., Putnam, N., Gelpke, M., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K., Ramaiya, P., Detter, J., Larimer, F., Coutinho, P., Henrissat, B., Berka, R., Cullen, D. y Rokhsar, D. (2004). Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78. *Nature Biotechnology*, 22(6), 695-700. doi: 10.1038/nbt967
32. Mitchell, D., Krieger, N. y Berovic, M. (2006). *Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation*. (Primera Edición). Berlin, Germany: Springer.
33. Mitchell, D., Pandey, A., Sangsurasak, P. y Krieger, N. (1999). Scale-up strategies for packed-bed bioreactors for solid-state fermentation. *Process biochemistry*, 35(1-2), 167-178.
34. Nigam, P. S. y Pandey, A. (2009). *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation: Utilisation of Agro-Residues*. Recuperado de <https://books.g>

oogle.com.ec/books?
 id=35i0LKOBTVoC&printsec=frontcover&dq=Biotechnology+for+Agro-
 Industrial+Residues+Utilisation:+Utilisation+of+Agro -Residues&hl=es-
 419&sa=X&ei=zBgDVceYPOOHsQTz0IDgAQ&ved=0
 CBsQ6AEwAA#v=onepage&q=Biotechnology%20for%20Agro-Industria
 l%20Residues%20Utilisation%3A%20Utilisation%20of%20Agro-Residu
 es&f=false (Noviembre, 2014)

35. Nobel, P. (2012). *Physicochemical and Environmental Plant Phisiology*. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=C_RQdOSZ4bUC&pg=PA230&dq=lambert+beer+law&hl=es-419&sa=X&ei=eXuoVPvJHc_qgwTkt4HgCQ&sqj=2&ved=0CDwQ6AEwBQ#v=onepage&q=lambert%20beer%20law&f=false (Noviembre, 2014)

36. Pallardy, S. (2010). *Physiology of Woody Plants*. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=IErfWWicYb4C&pg=PA203&dq=hemicellulose+function+in+plant&hl=es-419&sa=X&ei=RFmOVK7N8WmNumghOgN&ved=0CCYQ6AEwAA#v=onepage&q=hemicellulose%20function%20in%20plant&f=false> (Noviembre, 2014)

37. Picard, A., Davis, R., Gläser, M. y Fujii, K. (2008). Revised formula for the density of moist air (CIPM-2007). *Metrologia*, 45, 149-155. doi: 10.1088/0026-1394/45/2/004

38. Podgornik, H., Stegu, M., Zibert, E. y Perdih, A. (2001). Laccase production by *Phanerochaete chrysosporium* – an artifact caused by Mn(III)?. *Letters in Applied Microbiology*, 32(6), 407-411. doi: 10.1046/j.1472-765X.2001.00932.x

39. Poorna, C. y Prema, P. (2007). Production of cellulase-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling. *Bioresource Technology*, 98(3), 485-490. doi: 10.1016/j.biortech.2006.02.033

40. Rodríguez, S. y Sanromán, A. (2005). Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*, 22, 211-219.
41. Rodríguez, S., Domínguez, A. y Sanromán, A. (2001). Utilisation of lignocellulosic wastes for lignin peroxidase production by semi-solid-state cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biodegradation*, 12(5), 283-289. doi: 10.1023/A:1014392810649
42. Rosales, E., Couto, S. y Sanromán, A. (2002). New uses of food waste: application to lacasse production by *Trametes hirsute*. *Biotechnology Letters*, 24(9), 701-704.
43. Schmidt, O. (2006). *Wood and Tree Fungi: Biology, Damage, Protection and Use*. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=IMXYJaWbO2YC&printsec=frontcover&dq=Schmidt,+O.+%282006%29.+Wood+and+Tree+Fungi:+Biology,+Damage,+Protection+and+Use&hl=es-419&sa=X&ei=UxQDVce1EY38sASbtoAo&ved=0CBwQ6AEwAA#v=onepage&q=Schmidt%2C%20O.%20%282006%29.%20Wood%20and%20Tree%20Fungi%3A%20Biology%2C%20Damage%2C%20Protection%20and%20Use&f=false> (Noviembre, 2014)
44. Shukla, A. (2009). *Chemistry of Enzymes*. Recuperado de <https://books.google.es/books?id=FutjePS3u5kC&pg=PA30&dq=enzyme+activity+katal&hl=es&sa=X&ei=5FCoVLDcO4mggwTSqISoCg&ved=0CCAQ6AEwAA#v=onepage&q=enzyme%20activity%20katal&f=false> (Noviembre, 2014)
45. Shukla, D., Patel, B., Modi, H. y Vyas, B. (2011). Size exclusion chromatography for the removal of pigments from extracellular ligninolytic enzyme extracts from decayed wheat straw. *Journal Environmental Biology*, 32, 713-717.

46. Smits, J., Sonsbeek, H., Tramper, J., Knol, W., Geelhoed, W., Peeters, M. y Rinzema, A. (1999). Modelling fungal solid-state fermentation: the role of inactivation kinetics. *Bioprocess Engineering*, 20(5), 391-404.
47. Sun, Y. y Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1-11. doi: 10.1016/S0960-8524(01)00212-7
48. Thibault, J., Pouliot, K., Agosin, E. y Pérez, R. (2000). Reassessment of the estimation of dissolved oxygen concentration profile and K_{La} in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 36(1), 9-18. doi: 10.1016/S0032-9592(00)00156-4
49. United Nations Environment Programme. (2011). *Waste Agricultural Biomass to Energy*. Recuperado de http://www.unep.org/gpwm/Portals/24123/images/Work%20Plans/GPWM%20WAB%20work%20Plan%202012-2013_finalnew.pdf (Diciembre, 2014)
50. Viccini, G., Mitchell, D., Boit, S., Gern, J., da Rosa, A., Costa, R., Dalsenter, F., von Meien, O. y Krieger, N. (2001). Analysis of Growth Kinetic Profiles in Solid-State Fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, 39(4), 271-294.
51. Viniegra-Gonzalez, G. (1997). Solid state fermentation: Definition, Characteridtics, Limitatios and Monitoring. En Roussos, S., Lonsane, B., Raimbault, M. y Viniegra-Gonzalez, G. (Ed.). *Advances in Solid State Fermentation*. (pp. 5-22). London, England: Kluwer Academic Publishers.
52. Volk, T. (1997). *Tom Volk's Fungus of the Month for May 1997*. Recuperado de http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/may97.html (Noviembre, 2014)

53. Znameroski, E. y Glass, N. L. (2013). Using a model of filamentous fungus to unravel mechanisms of lignocellulose deconstruction. *Biotechnology for Biofuels*, 6(6), 1-7.

ANEXOS

ANEXO I

DETERMINACIÓN DE RESINAS, CERAS Y GRASAS

La determinación de resinas, ceras y grasas se realizó con la norma TAPPI-T-6-os_59, que se fundamenta en la cuantificación de compuestos solubles en una mezcla alcohol-benceno.

Reactivos

- Mezcla 2:1 alcohol-benceno, que se obtuvo al mezclar un volumen de etanol (95 %) con dos volúmenes de benceno

Equipo

- Balanza analítica
- Desecador
- Estufa
- Extractor soxhlet con un recipiente de sifonamiento de 250 mL
- Rotavapor

Muestra para análisis

Se utiliza una fracción completamente seca del aserrín que queda retenida entre dos mallas N° 40 y 60, es decir, su tamaño de partícula queda entre 0,25 y 0,4 mm de diámetro.

Método

Para determinar tanto lignina como celulosa es necesario realizar, en primera instancia, una extracción de las ceras, grasas y resinas, para lo cual, se pesa inicialmente el balón del soxhlet, limpio y seco; el valor se registra incluido hasta el cuarto decimal. Se pesan 5 g de muestra tamizada, la cual se coloca en un thimble o capuchón previamente tarado (secado en la estufa durante 5 h a 105 °C

y pesado). Se coloca 400 mL de la mezcla benceno alcohol en el balón de extracción previamente tarado. Se arma el aparato y se coloca el equipo armado en un baño María a, aproximadamente, 80 °C. Se deja el sistema en reflujo durante 15 h, se debe evitar mover el equipo una vez que empieza la ebullición de la mezcla alcohol-benceno.

Una vez terminado en proceso de extracción, se dejan los capuchones secar al ambiente. Se extrae la mezcla alcohol-benceno del balón de extracción para lo cual se utiliza un rotavapor hasta que quede la grasa adherida a las paredes del balón. Se recupera la mezcla alcohol-benceno. Se coloca el balón en la estufa a 105 °C por un período de 3 h, para luego dejarlo enfriar en el desecador. Se pesa el balón y se halla el contenido de ceras, grasas y resinas por medio de la Ecuación I.1.

$$\% \text{Resinas, ceras y grasas} = \frac{\text{Masa balón}_{\text{inicial}} - \text{Masa balón}_{\text{final}}}{\text{Masa thimble}_{\text{inicial}}} \times 100$$

[I. 1]

ANEXO II

DETERMINACIÓN DE CELULOSA

Se sigue el método descrito por la norma TAPPI T 17 m-55. Este método se basa en el hecho de que por clorinación de una muestra de madera, se aísla la fracción de celulosa.

Reactivos

- Solución de hipoclorito de sodio, 10 %
- Solución de bióxido de azufre, 3 %
- Solución de sulfito de sodio, 2 %

Equipos

- Vasos de precipitación
- Crisoles filtrantes
- Embudos
- Baño termostatzado
- Bomba de vacío
- Lunas de reloj

Método

Se pesa 2 g de muestra previamente tratada con alcohol-benceno, donde se han eliminado las resinas, ceras y grasas, como se explica en el Anexo III. Se coloca la muestra en un Erlenmeyer de 125 mL y se añade 50 mL de hipoclorito de sodio al 10 % y se deja que la solución digiera la muestra de madera durante 8 h. Para eliminar el exceso de lignina se filtra el material en un crisol poroso previamente tarado, luego se lava con 50 mL de agua, 50 mL de bióxido de azufre al 3 %; nuevamente, se lava con 50 mL de agua y con 50 mL de sulfito de sodio al 2 %.

Se transfiere el material del crisol a un vaso de precipitación y se añade 115 mL de sulfito de sodio al 2 %. Se lo introduce en un baño de agua caliente por un

período de 30 min. Se vuelve a filtrar la solución en el mismo crisol y se lava el material filtrado con 250 mL de agua. Se seca la muestra a 105 °C en la estufa por un periodo de 3 h. Se coloca el crisol en el desecador hasta que la muestra se enfríe. Se pesa el crisol junto con el material obtenido al final del proceso. El contenido de celulosa se determina con la Ecuación II.1.

$$\% \text{Celulosa} = \frac{\text{Masa crisol}_{\text{inicial}} - \text{Masa crisol}_{\text{final}}}{\text{Masa muestra}_{\text{inicial}}} \times 100$$

[II. 1]

ANEXO III

DETERMINACIÓN DE LIGNINA

Esta determinación se realizó siguiendo el método descrito por la norma TAPPI T13 os-54, que se fundamenta en el hecho de que al someter los materiales celulósicos al ataque de ácidos fuertes, los carbohidratos se hidrolizan, y dejan la lignina como un residuo insoluble.

Reactivos

- Solución de ácido sulfúrico, 72 %

Equipo

- Balones de destilación
- Refrigerantes
- Vasos de precipitación
- Lunas de reloj
- Baño termostatzado
- Crisoles filtrantes
- Bomba de vacío
- Balones

Método

Se pesa 1 g de muestra libre de resinas, ceras y grasas. Se coloca la muestra en un Erlenmeyer de 125 mL y se añade 15 mL de una solución de ácido sulfúrico al 72 %. Se agita continuamente durante 2 h, durante este tiempo mantiene la muestra a una temperatura entre 18 y 20 °C.

Se transfiere la muestra a un balón de 1 000 mL y se añade 560 mL de agua, cantidad necesaria, para que la solución nueva tenga una concentración de ácido sulfúrico del 3 %. Se mantiene en ebullición la muestra con reflujo por un período de 4 h. Se deja enfriar y sedimentar la muestra contenida en el balón.

Finalmente se filtra la solución en un crisol poroso previamente tarado, y se lavan los carbohidratos que pudieren quedar con 500 mL de agua destilada caliente. Se seca la muestra contenida en el crisol filtrante en una estufa durante 3 h a 105 °C. Se coloca el crisol en un desecador hasta que se enfríe y se lo pesa. El contenido de lignina de la muestra se determina con la Ecuación III.1:

$$\%Lignina = \frac{\text{Masa crisol}_{\text{inicial}} - \text{Masa crisol}_{\text{final}}}{\text{Masa muestra}_{\text{inicial}}} \times 100$$

[III. 1]

ANEXO IV

DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD DEL LECHO

La densidad del lecho se determinó con la cantidad de aserrín húmedo colocado en cada bandeja del fermentador más el inóculo. Este peso se dividió para el volumen del lecho, que se calculó con la Ecuación IV.1, tanto para una altura de 5 como para la altura de 10 cm. Se presenta un ejemplo de cálculo para un lecho de 5 cm de altura.

$$V = L \cdot A \cdot H$$

[IV.1]

Donde:

V = volumen del lecho (m³)

L = largo de la bandeja (m)

A = ancho de la bandeja (m)

H = altura del lecho (m)

$$V = 0,56 \cdot 0,40 \cdot 0,05$$

$$V = 0,0112 \text{ m}^3$$

Finalmente, la densidad del lecho se calculó mediante la Ecuación 2.5.

$$\rho = \frac{S+I}{V}$$

Donde:

ρ = densidad del lecho (kg/m^3)

S = masa de sustrato húmedo en cada bandeja (kg)

I = masa de inóculo húmedo en cada bandeja (kg)

$$\rho = \frac{0,7+0,0672}{0,0112}$$

$$\rho = 68,5 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3}$$

ANEXO V

DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE RENDIMIENTO PARA EL CALOR PRODUCIDO POR EL METABOLISMO

Se utilizó el promedio de la temperatura del aire a la salida del fermentador tomada a lo largo de los 5 días de fermentación. Se calculó el coeficiente con la cantidad de inóculo por cada gramo de sustrato y a la humedad del inóculo. Se presenta un ejemplo de cálculo para una temperatura de 35 °C y una altura de lecho de 5 cm.

El calor generado se calculó mediante la Ecuación 2.5.

$$Q = C_p \cdot \Delta T$$

Donde:

Q = calor ganado por el lecho (J/kg sustrato)

C_p = calor específico (J/kg °C), 2500; (Smits et al., 1999, p. 396)

ΔT = variación de temperatura (°C)

Se consideró que la temperatura final del sustrato corresponde a la temperatura máxima del aire a la salida del fermentador.

$$Q = 2500 \cdot (38 - 35)$$

$$Q = 7500 \frac{\text{J}}{\text{kg sustrato}}$$

$$Y=7500 \frac{\text{J}}{\text{kg sustrato}} \times \frac{3,5 \text{ kg sustrato}}{336 \text{ g biomasa húmeda}} \times \frac{100 \text{ g biomasa húmeda}}{30 \text{ g biomasa seca}}$$

$$Y=2,604 \times 10^5 \frac{\text{J}}{\text{kg biomasa seca}}$$

ANEXO VI

DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO ESPECÍFICA A LA MEJOR TEMPERATURA

El incremento de masa celular se determinó utilizando el método de determinación de ácidos nucleicos. Éste método se basa en extraer los ácidos nucleicos de las células con ácido perclórico 0,7 M y medir su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro de luz UV.

Se puede determinar el contenido de proteínas como indicador de crecimiento para sustratos que contengan una cantidad despreciable de proteína, como es el caso de la madera (Mitchell et al., 2006, p. 196).

Reactivos

Ácido perclórico 0,7 M

Procedimiento

Se pesó 5 g de sustrato, tomado uniformemente de toda la carga del fermentador, y se agregó 100 mL de agua destilada. Se mezcló en el tissumizer a 500 rpm durante 1 minuto y se tomó 5 mL del homogenizado. Se centrifugó durante 10 minutos a 3 000 rpm. Se adicionó a la parte insoluble 5 mL de ácido perclórico 0,7 M y se homogenizó. Después se digirió el homogenizado a 70 °C durante 20 minutos y se centrifugó nuevamente 10 minutos a 3 000 rpm. Se midió la

absorbancia del sobrenadante a 260 nm, y se realiza las diluciones necesarias para obtener una lectura menor a 0,6.

Se presenta el ejemplo de cálculo para la muestra tomada el día 0. La absorbancia a 260 nm por la fracción de peso se calculó mediante la Ecuación VI.1.

$$\frac{DO}{fps} = DO \times D1 \times D2 \times \frac{1}{fps}$$

[VI. 1]

Donde:

DO = absorbancia a 260 nm

D1 = dilución de la mezcla inicial

D2 = dilución al momento de leer

fps = fracción de peso seco final

$$\frac{DO}{fps} = 0,018 \times \frac{100}{5} \times \frac{3500}{336}$$

$$\frac{DO}{fps} = 3,750$$

Los resultados de densidad óptica por fracción de peso seco (DO/fps) para la fermentación llevada a cabo a 35 °C y con una altura de lecho de 5 cm se presentan en la Tabla A VI.1. A partir de esto se construyó la curva de crecimiento celular y se determinó la velocidad específica de crecimiento como la pendiente de la fase de crecimiento exponencial.

Tabla AVI.1. Densidad óptica por fracción de peso seco* para la fermentación a 35 °C y 5 cm de altura de lecho

Día	DO/fps
-----	--------

0	3,814
1	6,511
2	6,568
3	6,784
4	6,515
5	6,886
6	6,588
7	5,725

* Densidad óptica por fracción de peso seco promedio de las 2 réplicas

ANEXO VII

DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD DEL AIRE HÚMEDO QUE INGRESA AL FERMENTADOR

El flujo de aire en (kg aire seco/s) se calculó a partir del flujo volumétrico que ingresa al fermentador y la densidad del aire húmedo a 35 °C con una humedad relativa del 98%. Se utilizó la Ecuación VII.1 propuesta por Picard, Davis, Gläser y Fujii (2008) para determinar la densidad del aire húmedo (p. 150).

$$\rho = \frac{P_{sv} M_a}{Z RT} \left[1 - X_v \left(1 - \frac{M_v}{M_a} \right) \right]$$

[VII.1]

Donde:

ρ = densidad del aire húmedo (kg aire seco/m³)

P_{sv} = presión de vapor de saturación a la temperatura del aire (Pa)

M_a = masa molar del aire seco (28,9635×10⁻³ kg/mol)

Z = factor de compresibilidad

R = constante de los gases (8,314510 J mol⁻¹ K⁻¹)

T = temperatura termodinámica (308,15 K)

X_v = fracción molar del vapor de agua

M_v = masa molar del agua ($18,015 \times 10^{-3}$ kg/mol)

La presión de vapor de saturación a la temperatura del aire se calculó con la Ecuación VII.2.

$$P_{sv} = 1 \text{ Pa} \times \exp\left(A T^2 + BT + C + \frac{D}{T}\right)$$

[VII.2]

Donde:

$$A = 1,2378847 \times 10^{-5} \text{ K}^{-2}$$

$$B = -1,9121316 \times 10^{-2} \text{ K}^{-1}$$

$$C = 33,93711047$$

$$D = -6,3431645 \times 10^3 \text{ K}$$

$$T = 308,15 \text{ K}$$

$$P_{sv} = 5628,86 \text{ Pa}$$

Para determinar el factor de mejora se usó la Ecuación VII.3.

$$f = \alpha + \beta P + \gamma t^2$$

[VII. 3]

Donde:

f = factor de mejora

$$\alpha = 1,00062$$

$$\beta = 3,14 \times 10^{-8} \text{ Pa}^{-1}$$

$$\gamma = 5,6 \times 10^{-7} \text{ K}^{-2}$$

t = temperatura en grados Celsius (35 °C)

P = presión atmosférica de Quito ($717,7 \times 10^2$ Pa)

$$f = 1,00287$$

La fracción molar del vapor de agua se calculó con la Ecuación VII.4

$$X_v = h \times f \times \frac{P_{sv}}{P}$$

[VII. 4]

Donde:

h = humedad relativa (0,98)

f = 1,00287

P_{sv} = 5628,86 Pa

P = $717,7 \times 10^2$ Pa

$$X_v = 0,07708$$

El factor de compresibilidad se determinó mediante la ecuación VII.5.

$$Z = 1 - \frac{P}{T} \left[a_0 + a_1 t + a_2 t^2 + (b_0 + b_1 t) X_v + (C_0 + C_1 t) X_v^2 \right] + \frac{P^2}{T^2} (d + e X_v^2)$$

[VII. 5]

Donde:

a_0 = $1,58123 \times 10^{-6}$ K Pa⁻¹

a_1 = $-2,9331 \times 10^{-8}$ Pa⁻¹

b_0 = $5,707 \times 10^{-6}$ K Pa⁻¹

b_1 = $-2,051 \times 10^{-8}$ Pa⁻¹

C_0 = $1,9898 \times 10^{-4}$ K Pa⁻¹

C_1 = $-2,376 \times 10^{-6}$ Pa⁻¹

d = $1,83 \times 10^{-11}$ K² Pa⁻²

$$e = -0,765 \times 10^{-8} \text{ K}^2 \text{ Pa}^{-2}$$

$$P = 7,177 \times 10^4 \text{ Pa}$$

$$t = 35 \text{ }^\circ\text{C}$$

$$T = 308,15 \text{ K}$$

$$Z = 0,999588$$

$$\rho = 0,78801 \frac{\text{kg aire seco}}{\text{m}^3}$$

ANEXO VIII

INFORME DE RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL ASERRÍN DE EUCALIPTO

Los análisis para la determinación del contenido de humedad, resinas, ceras y grasas, celulosa y lignina, en el aserrín de eucalipto utilizado como sustrato para el

crecimiento del hongo *Phanerochaete chrysosporium*, se ejecutaron en el Laboratorio de Pulpa y papel del Departamento de Ciencia de los Alimentos y biotecnología (DECAB) de la Escuela Politécnica Nacional. Una copia del informe de resultados se adjunta en el presente anexo.

La muestra correspondiente al aserrín utilizado como sustrato es Aserrín-ML.



ESCUELA POLITECNICA NACIONAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA (DECAB)
 Campus Politécnico José Rubén Orellana Ricaurte
 Direc.: Pasaje Andalucía E12-A y Alfredo Mena Caamaño . Telf.: 2507 138
 Personas de Contacto: Dra. Irma Paredes. Telf. : 2507 144 ext. 2490 e-mail: irma.paredes@epn.edu.ec
 Tlga. Elisabeth Venegas . Telf.: 2507 144 ext. 2272 . e-mail: elisabeth.venegas@epn.edu.ec
 Quito- Ecuador



INFORME DE RESULTADOS DE ANÁLISIS O TRABAJO

ORDEN: DC-OTI0170-2013

Cliente: PROYECTO DE TITULACIÓN

IDENTIFICACIÓN DE LA(S) MUESTRA(S) Y SERVICIO (S)

No. muestra	Muestra	Servicio/Analito	Laboratorio
1	Aserrín 1- FR	Contenido de Celulosa	Pulpa y papel
2	Aserrín 3- FR	Contenido de Lignina	
3	Aserrín - ML	Solubilidad en alcohol benceno Humedad para análisis	

RESULTADOS

Muestra	Servicio/Analito	Resultado	Unidades	Método
Aserrín 1- FR	Contenido de celulosa	53.86	%	Tappi T-17-m-55
Aserrín 3- FR		55.90	%	
Aserrín - ML		50.65	%	
Aserrín 1- FR	Contenido de lignina	19.27	%	Tappi T-13-os-54
Aserrín 3- FR		18.36	%	
Aserrín - ML		20.38	%	
Aserrín 1- FR	Solubilidad en alcohol benceno	2.60	%	Tappi T-6-os-59
Aserrín 3- FR		2.49	%	
Aserrín - ML		1.60	%	
Aserrín 1- FR	Humedad para análisis	11.09	%	Tappi T-412-m(6)
Aserrín 3- FR		22.21	%	
Aserrín - ML		10.14	%	

COMENTARIOS:

El trabajo fue desarrollado en su totalidad por el Sr. Germán Romo.

PROFESIONAL RESPONSABLE
 DEL ANÁLISIS O TRABAJO

Ing. Elena Coyago

QUEJAS Y SUGERENCIAS

El cliente puede canalizar las quejas sobre los resultados de los análisis, sobre el tiempo de entrega del informe, u otro aspecto, a través del Jefe del DECAB, o de la persona Encargada de Recepción de Muestra y Atención al Cliente, ya sea en forma verbal o en forma escrita hasta 8 días después de la entrega del informe. En el DECAB se mantiene un registro de quejas y sugerencias con el fin de mejorar el Servicio al Cliente.

El laboratorio no se responsabiliza por el muestreo realizado antes de la entrega de las muestras al DECAB, pero si se responsabiliza de las muestras recibidas, tal como se las entrega.

DATOS DE LA VARIACIÓN DE HUMEDAD Y TEMPERATURA DEL SUSTRATO EN CADA UNA DE LAS BANDEJAS

Tabla AIX.1. Variación de la humedad del sustrato con el tiempo para un flujo de aire de 13 L/min a 30 °C

Tiempo (h)	Humedad relativa (%)				
	Bandeja 1	Bandeja 2	Bandeja 3	Bandeja 4	Bandeja 5
0	79,86	79,86	79,87	79,86	79,86
2	79,75	79,95	80,2	80,05	80,17
4	79,89	80,13	80,12	79,95	79,93
18	79,91	79,97	79,97	79,97	79,98
20	79,87	79,92	80,05	80,02	79,94
22	79,95	79,87	80,09	79,94	79,98
24	79,91	79,89	80,15	79,98	80,01
26	79,94	79,9	79,98	79,96	80,1
42	79,95	79,86	79,96	79,91	79,95
44	79,97	79,95	80,01	80,04	79,96
46	79,91	79,97	80,1	80,01	79,91
48	79,87	79,96	79,93	80,06	79,96

Tabla AIX.2. Variación de la temperatura del sustrato con el tiempo para un flujo de aire de 13 L/min a 30 °C

Tiempo (h)	Temperatura (°C)				
	Bandeja 1	Bandeja 2	Bandeja 3	Bandeja 4	Bandeja 5
0	30,0	30,0	30,0	30,0	29,5

2	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
4	30,0	30,0	30,0	29,5	30,0
18	29,5	30,0	29,5	29,5	29,5
20	30,0	29,5	30,0	30,0	29,5
22	30,0	29,0	29,5	30,0	30,0
24	30,0	29,5	29,5	30,0	30,0
26	29,5	30,0	30,0	29,5	30,0
42	30,0	29,0	30,0	30,0	30,0
44	30,0	29,5	30,0	30,0	30,0
46	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
48	30,0	29,5	30,0	30,0	30,0

Tabla AIX.3. Variación de la humedad del sustrato con el tiempo para un flujo de aire de 13 L/min a 35 °C

Tiempo (h)	Temperatura (°C)				
	Bandeja 1	Bandeja 2	Bandeja 3	Bandeja 4	Bandeja 5
0	30,0	30,0	30,0	30,0	29,5
2	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
4	30,0	30,0	30,0	29,5	30,0
18	29,5	30,0	29,5	29,5	29,5
20	30,0	29,5	30,0	30,0	29,5
22	30,0	29,0	29,5	30,0	30,0
24	30,0	29,5	29,5	30,0	30,0
26	29,5	30,0	30,0	29,5	30,0
42	30,0	29,0	30,0	30,0	30,0
44	30,0	29,5	30,0	30,0	30,0
46	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
48	30,0	29,5	30,0	30,0	30,0

Tabla AIX.4. Variación de la temperatura del sustrato con el tiempo para un flujo de aire de 13 L/min a 35 °C

Tiempo (h)	Temperatura (°C)				
	Bandeja 1	Bandeja 2	Bandeja 3	Bandeja 4	Bandeja 5
0	30,0	30,0	30,0	30,0	29,5
2	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
4	30,0	30,0	30,0	29,5	30,0
18	29,5	30,0	29,5	29,5	29,5
20	30,0	29,5	30,0	30,0	29,5
22	30,0	29,0	29,5	30,0	30,0

24	30,0	29,5	29,5	30,0	30,0
26	29,5	30,0	30,0	29,5	30,0
42	30,0	29,0	30,0	30,0	30,0
44	30,0	29,5	30,0	30,0	30,0
46	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
48	30,0	29,5	30,0	30,0	30,0

Tabla AIX.5. Variación de la humedad del sustrato con el tiempo para un flujo de aire de 20 L/min a 30 °C

Tiempo (h)	Temperatura (°C)				
	Bandeja 1	Bandeja 2	Bandeja 3	Bandeja 4	Bandeja 5
0	30,0	30,0	30,0	30,0	29,5
2	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
4	30,0	30,0	30,0	29,5	30,0
18	29,5	30,0	29,5	29,5	29,5
20	30,0	29,5	30,0	30,0	29,5
22	30,0	29,0	29,5	30,0	30,0
24	30,0	29,5	29,5	30,0	30,0
26	29,5	30,0	30,0	29,5	30,0
42	30,0	29,0	30,0	30,0	30,0
44	30,0	29,5	30,0	30,0	30,0
46	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
48	30,0	29,5	30,0	30,0	30,0

Tabla AIX.6. Variación de la temperatura del sustrato con el tiempo para un flujo de aire de 20 L/min a 30 °C

Tiempo (h)	Temperatura (°C)				
	Bandeja 1	Bandeja 2	Bandeja 3	Bandeja 4	Bandeja 5
0	30,0	30,0	30,0	30,0	29,5
2	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
4	30,0	30,0	30,0	29,5	30,0
18	29,5	30,0	29,5	29,5	29,5
20	30,0	29,5	30,0	30,0	29,5
22	30,0	29,0	29,5	30,0	30,0
24	30,0	29,5	29,5	30,0	30,0
26	29,5	30,0	30,0	29,5	30,0
42	30,0	29,0	30,0	30,0	30,0
44	30,0	29,5	30,0	30,0	30,0
46	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0

48	30,0	29,5	30,0	30,0	30,0
----	------	------	------	------	------

Tabla AIX.7. Variación de la humedad del sustrato con el tiempo para un flujo de aire de 20 L/min a 35 °C

Tiempo (h)	Temperatura (°C)				
	Bandeja 1	Bandeja 2	Bandeja 3	Bandeja 4	Bandeja 5
0	30,0	30,0	30,0	30,0	29,5
2	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
4	30,0	30,0	30,0	29,5	30,0
18	29,5	30,0	29,5	29,5	29,5
20	30,0	29,5	30,0	30,0	29,5
22	30,0	29,0	29,5	30,0	30,0
24	30,0	29,5	29,5	30,0	30,0
26	29,5	30,0	30,0	29,5	30,0
42	30,0	29,0	30,0	30,0	30,0
44	30,0	29,5	30,0	30,0	30,0
46	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
48	30,0	29,5	30,0	30,0	30,0

Tabla AIX.8. Variación de la temperatura del sustrato con el tiempo para un flujo de aire de 20 L/min a 35 °C

Tiempo (h)	Temperatura (°C)				
	Bandeja 1	Bandeja 2	Bandeja 3	Bandeja 4	Bandeja 5
0	30,0	30,0	30,0	30,0	29,5
2	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
4	30,0	30,0	30,0	29,5	30,0
18	29,5	30,0	29,5	29,5	29,5
20	30,0	29,5	30,0	30,0	29,5
22	30,0	29,0	29,5	30,0	30,0
24	30,0	29,5	29,5	30,0	30,0
26	29,5	30,0	30,0	29,5	30,0
42	30,0	29,0	30,0	30,0	30,0
44	30,0	29,5	30,0	30,0	30,0
46	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
48	30,0	29,5	30,0	30,0	30,0

ANEXO X

**DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE BANDEJAS DEL
FERMENTADOR A ESCALA PILOTO**

Para determinar el número de bandejas para el fermentador a escala piloto se utilizó el número de Damköhler modificado. A la salida del fermentador se tiene la máxima temperatura, entonces las velocidades de generación de calor y eliminación de calor deben ser iguales y por lo tanto el número de Damköhler es igual a 1. Entonces la Ecuación 2.1 se puede escribir como la Ecuación X.1.

$$Q_x = Q_R$$

[X.1]

$$0,25 \rho_b Y \mu_{opt} X_m = \frac{h_A (T_{crit} - T_a)}{V * n}$$

$$n = \frac{h_A (T_{crit} - T_a) / V}{0,25 \rho_b Y \mu_{opt} X_m}$$

[X.2]

La Ecuación X.2 se utilizó para determinar el número total de bandejas para el fermentador de bandejas a escala piloto.

ANEXO XI

**DATOS DE ABSORBANCIA PARA LA ENZIMA LIGNINO
PEROXIDASA**

Tabla AXI.1. Absorbancia de las 3 réplicas para la enzima lignino peroxidasa a 30 °C y con una altura de lecho de 5 cm

Día	A(1)	A(2)	A(3)
0	0,000	0,001	0,001
1	0,007	0,007	0,011
2	0,025	0,025	0,025
3	0,028	0,026	0,031
4	0,023	0,022	0,024

Tabla AXI.2. Absorbancia de las 3 réplicas para la enzima lignino peroxidasa a 35 °C y con una altura de lecho de 5 cm

Día	A(1)	A(2)	A(3)
0	0,001	0,001	0,000
1	0,022	0,031	0,024
2	0,054	0,054	0,059
3	0,030	0,036	0,032
4	0,014	0,015	0,025

Tabla AXI.3. Absorbancia de las 3 réplicas para la enzima lignino peroxidasa a 30 °C y con una altura de lecho de 10 cm

Día	A(1)	A(2)	A(3)
0	0,000	0,000	0,000
1	0,005	0,006	0,005
2	0,012	0,009	0,013
3	0,021	0,023	0,017
4	0,022	0,022	0,022

Tabla AXI.4. Absorbancia de las 3 réplicas para la enzima lignino peroxidasa a 35 °C y con una altura de lecho de 10 cm

Día	A(1)	A(2)	A(3)
0	0,001	0,000	0,001
1	0,015	0,015	0,016
2	0,017	0,017	0,019
3	0,022	0,019	0,021
4	0,017	0,012	0,014

ANEXO XII

**DATOS DE ABSORBANCIA PARA LA ENZIMA MANGANESO
PEROXIDASA**

Tabla AXII.1. Absorbancia de las 3 réplicas para la enzima manganeso peroxidasa a 30 °C y con una altura de lecho de 5 cm

Día	A(1)	A(2)	A(3)
0	0,001	0,001	0,001
1	0,002	0,012	0,004
2	0,033	0,030	0,026
3	0,041	0,041	0,040
4	0,034	0,035	0,042

Tabla AXII.2. Absorbancia de las 3 réplicas para la enzima manganeso peroxidasa a 35 °C y con una altura de lecho de 5 cm

Día	A(1)	A(2)	A(3)
0	0,001	0,001	0,001
1	0,038	0,040	0,029
2	0,077	0,079	0,073
3	0,049	0,051	0,059
4	0,023	0,021	0,030

Tabla AXII.3. Absorbancia de las 3 réplicas para la enzima manganeso peroxidasa a 30 °C y con una altura de lecho de 10 cm

Día	A(1)	A(2)	A(3)
0	0,002	0,000	0,001
1	0,002	0,005	0,003
2	0,008	0,006	0,005
3	0,014	0,017	0,015
4	0,025	0,023	0,024

Tabla AXII.4. Absorbancia de las 3 réplicas para la enzima manganeso peroxidasa a 35 °C y con una altura de lecho de 10 cm

Día	A(1)	A(2)	A(3)
0	0,000	0,001	0,000
1	0,014	0,019	0,014
2	0,023	0,021	0,024
3	0,023	0,025	0,026
4	0,022	0,018	0,017

ANEXO XIII

DATOS DE ABSORBANCIA PARA LA ENZIMA LACASA

Tabla AXIII.1. Absorbancia de las 3 réplicas para la enzima lacasa a 30 °C y con una altura de lecho de 5 cm

Día	A(1)	A(2)	A(3)
0	0,001	0,000	0,000
1	0,001	0,001	0,003
2	0,007	0,008	0,009
3	0,014	0,014	0,012
4	0,014	0,014	0,017

Tabla AXIII.2. Absorbancia de las 3 réplicas para la enzima lacasa a 35 °C y con una altura de lecho de 5 cm

Día	A(1)	A(2)	A(3)
0	0,001	0,000	0,001
1	0,011	0,015	0,006
2	0,030	0,030	0,028
3	0,032	0,030	0,030
4	0,023	0,021	0,022

Tabla AXIII.3. Absorbancia de las 3 réplicas para la enzima lacasa a 30 °C y con una altura de lecho de 10 cm

Día	A(1)	A(2)	A(3)
0	0,000	0,001	0,000
1	0,002	0,003	0,001
2	0,004	0,003	0,003
3	0,005	0,004	0,004
4	0,011	0,010	0,010

Tabla AXIII.4. Absorbancia de las 3 réplicas para la enzima lacasa a 35 °C y con una altura de lecho de 10 cm

Día	A(1)	A(2)	A(3)
0	0,001	0,000	0,000
1	0,005	0,004	0,005
2	0,011	0,011	0,009
3	0,032	0,031	0,030
4	0,034	0,034	0,032

ANEXO XIV

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIGNINO PEROXIDÁSICA
DE LOS EXTRACTOS**

La concentración molar se determinó mediante la Ley de Lambert-Beer expresada de acuerdo a la Ecuación XIV.1.

$$C = \frac{A}{\epsilon \times b}$$

[XIV.1]

Donde

A = absorbancia de la solución a una longitud de onda determinada

ϵ = coeficiente de absorción a una longitud de onda determinada

b = camino óptico

El valor del coeficiente de extinción molar para la determinación de la actividad lignino peroxidásica es $9\,300\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ y la longitud de onda es de 310 nm.

$$C = \frac{0,07}{9\,300\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1} \times 1\text{ cm}} = 7,53 \times 10^{-7}\text{ M}$$

Finalmente, la actividad enzimática se calculó en Unidades Internacionales:

$$\begin{aligned} \text{UI} &= \frac{7,53 \times 10^{-7}\text{ mol}}{\text{L mezcla de reacción}} \times \frac{10^6\ \mu\text{mol}}{1\text{ mol}} \times \frac{1\text{ L mezcla de reacción}}{1\,000\text{ mL mezcla de reacción}} \\ &\times \frac{10\text{ mL mezcla de reacción}}{0,5\text{ mL extracto}} \times \frac{50\text{ mL extracto}}{16,67\text{ g aserrín húmedo}} \\ &\times \frac{100\text{ g aserrín húmedo}}{30\text{ g aserrín seco}} \times \frac{1}{60\text{ min reacción}} \times 1\,000\text{ g aserrín seco} \end{aligned}$$

$$\text{UI} = 2,508 \frac{\mu\text{mol}}{1\,000\text{ g aserrín seco} \times \text{min}}$$

ANEXO XV

DATOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA LA LIGNINO PEROXIDASA

Tabla AXV.1. Actividad enzimática de las 3 réplicas para la enzima lignino peroxidasa a 30 °C y con una altura de lecho de 5 cm

Día	UI(1)	UI(2)	UI(3)
0	0,179	0,358	0,179
1	2,508	2,508	3,763
2	8,780	8,780	8,959
3	9,855	9,317	10,930
4	8,063	7,705	8,421

Tabla AXV.2. Actividad enzimática de las 3 réplicas para la enzima lignino peroxidasa a 35 °C y con una altura de lecho de 5 cm

Día	UI(1)	UI(2)	UI(3)
0	0,179	0,179	0,000
1	7,705	10,930	8,421
2	19,172	19,172	20,964
3	10,751	12,901	11,467
4	5,017	5,196	8,959

Tabla AXV.3. Actividad enzimática de las 3 réplicas para la enzima lignino peroxidasa a 30 °C y con una altura de lecho de 10 cm

Día	UI(1)	UI(2)	UI(3)
0	0,084	0,084	0,084
1	0,753	1,087	0,753
2	2,007	1,422	2,091
3	3,513	3,763	2,843
4	3,596	3,680	3,680

Tabla AXV.4. Actividad enzimática de las 3 réplicas para la enzima lignino peroxidasa a 35 °C y con una altura de lecho de 10 cm

Día	UI(1)	UI(2)	UI(3)
0	0,084	0,000	0,084
1	2,425	2,425	2,676
2	2,760	2,760	3,094
3	3,596	3,178	3,429

4	2,760	1,924	2,342
---	-------	-------	-------

ANEXO XVI

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD MANGANESO PEROXIDASA DE LOS EXTRACTOS

La concentración molar se determinó mediante la Ley de Lambert-Beer expresada de acuerdo a la Ecuación XIV.1.

$$C = \frac{A}{\epsilon \times l}$$

El valor del coeficiente de extinción molar para la determinación de la actividad lignino peroxidásica es $22\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ y la longitud de onda es de 610 nm .

$$C = \frac{0,002}{22\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1} \times 1\text{ cm}} = 9,09 \times 10^{-8}\text{ M}$$

Finalmente para calcular la actividad enzimática se tiene:

$$\begin{aligned} \text{UI} &= \frac{9,09 \times 10^{-8}\text{ mol}}{\text{L mezcla de reacción}} \times \frac{10^6\ \mu\text{mol}}{1\text{mol}} \times \frac{1\text{L mezcla de reacción}}{1\,000\text{ mL mezcla de reacción}} \\ &\times \frac{2\text{ mL mezcla de reacción}}{0,5\text{ mL extracto}} \times \frac{50\text{ mL extracto}}{16,67\text{ g aserrín húmedo}} \\ &\times \frac{100\text{ g aserrín húmedo}}{30\text{ g aserrín seco}} \times \frac{1}{10\text{ min reacción}} \times 1\,000\text{ g aserrín seco} \end{aligned}$$

$$\text{UI} = 0,364 \frac{\mu\text{mol}}{1\,000\text{ g aserrín seco} \times \text{min}}$$

ANEXO XVII

DATOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA LA MANGANESO PEROXIDASA

Tabla AXVII.1. Actividad enzimática de las 3 réplicas para la enzima manganeso peroxidasa a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y con una altura de lecho de 5 cm

Día	UI(1)	UI(2)	UI(3)
0	0,091	0,182	0,182
1	0,364	2,181	0,727
2	5,908	5,453	4,726
3	7,453	7,453	7,180
4	6,090	6,362	7,544

Tabla AXVII.2. Actividad enzimática de las 3 réplicas para la enzima manganeso peroxidasa a 35 °C y con una altura de lecho de 5 cm

Día	UI(1)	UI(2)	UI(3)
0	0,182	0,182	0,091
1	6,817	7,180	5,272
2	13,997	14,361	13,270
3	8,907	9,271	10,725
4	4,090	3,727	5,453

Tabla AXVII.3. Actividad enzimática de las 3 réplicas para la enzima manganeso peroxidasa a 30 °C y con una altura de lecho de 10 cm

Día	UI(1)	UI(2)	UI(3)
0	0,127	0,000	0,042
1	0,170	0,382	0,212
2	0,721	0,552	0,382
3	1,188	1,442	1,273
4	2,079	1,909	1,994

Tabla AXVII.4. Actividad enzimática de las 3 réplicas para la enzima manganeso peroxidasa a 35 °C y con una altura de lecho de 10 cm

Día	UI(1)	UI(2)	UI(3)
0	0,042	0,085	0,042
1	1,188	1,570	1,145
2	1,952	1,739	2,036
3	1,952	2,079	2,164
4	1,824	1,527	1,442

ANEXO XVIII

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD LACASA DE LOS
EXTRACTOS**

La concentración molar se determinó mediante la Ley de Lambert-Beer expresada de acuerdo a la Ecuación XIV.1.

$$C = \frac{A}{\epsilon \times l}$$

El valor del coeficiente de extinción molar para la determinación de la actividad lignino peroxidásica es $36\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ y la longitud de onda es de 420 nm.

$$C = \frac{0,001}{36\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1} \times 1\text{ cm}} = 2,78 \times 10^{-8}\text{ M}$$

Finalmente para calcular la actividad enzimática se tiene:

$$\begin{aligned} \text{UI} &= \frac{2,78 \times 10^{-8}\text{ mol}}{\text{L mezcla de reacción}} \times \frac{10^6\ \mu\text{mol}}{1\text{ mol}} \times \frac{1\text{ L mezcla de reacción}}{1\,000\text{ mL mezcla de reacción}} \\ &\times \frac{2\text{ mL mezcla de reacción}}{0,5\text{ mL extracto}} \times \frac{50\text{ mL extracto}}{16,67\text{ g aserrín húmedo}} \\ &\times \frac{100\text{ g aserrín húmedo}}{30\text{ g aserrín seco}} \times \frac{1}{5\text{ min reacción}} \times 1\,000\text{ g aserrín seco} \end{aligned}$$

$$\text{UI} = 0,222 \frac{\mu\text{mol}}{1\,000\text{ g aserrín seco} \times \text{min}}$$

ANEXO XIX

DATOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA LA LACASA

Tabla AXIX.1. Actividad enzimática de las 3 réplicas para la enzima lacasa a 30 °C y con una altura de lecho de 5 cm

Día	UI(1)	UI(2)	UI(3)
0	0,111	0,000	0,000
1	0,222	0,111	0,555
2	1,555	1,889	2,111

3	3,110	3,110	2,666
4	3,110	2,999	3,666

Tabla AXIX.2. Actividad enzimática de las 3 réplicas para la enzima lacasa a 35 °C y con una altura de lecho de 5 cm

Día	UI(1)	UI(2)	UI(3)
0	0,111	0,000	0,111
1	2,444	3,222	1,444
2	6,665	6,554	6,110
3	6,999	6,665	6,554
4	5,110	4,555	4,777

Tabla AXIX.3. Actividad enzimática de las 3 réplicas para la enzima lacasa 30 °C y con una altura de lecho de 10 cm

Día	UI(1)	UI(2)	UI(3)
0	0,052	0,052	0,000
1	0,207	0,311	0,104
2	0,363	0,259	0,259
3	0,467	0,363	0,363
4	1,141	1,037	1,037

Tabla AXIX.4. Actividad enzimática de las 3 réplicas para la enzima lacasa a 35 °C y con una altura de lecho de 10 cm

Día	UI(1)	UI(2)	UI(3)
0	0,052	0,000	0,000
1	0,467	0,363	0,467
2	1,141	1,141	0,881
3	3,267	3,215	3,111
4	3,474	3,526	3,319

