

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGIA

**Evaluación de dos hongos filamentosos para la biosíntesis de celulasas a partir de residuos agroindustriales de mora (*Rubus adenotrichos*) mediante fermentación en medio sólido**

Tesis sometida a consideración de la comisión de Trabajos Finales de Graduación de la Escuela de Biología, para optar por el grado académico de Licenciada en Genética y Biotecnología

Vanny Emileth Mora Villalobos

A15302

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

Universidad de Costa Rica

San José, Costa Rica

Abril, 2015

## HOJA DE APROBACIÓN DEL TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Trabajos finales de graduación de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biología con énfasis en Genética y Biotecnología.

### TRIUNAL EXAMINADOR

---

Marcy González Vargas, Lic  
Directora de tesis

---

Marta Valdés, Ph.D  
Representante del decano.  
Facultad de Ciencias

---

Fabrice Vaillant, Ph.D  
Miembro del comité asesor

---

Manuel Campos Rudín, Msc  
Miembro del tribunal.

---

Laura Solís Ramos, Ph.D  
Miembro del comité asesor

---

Vanny Emileth Mora Villalobos  
Postulante

## **DEDICATORIA**

*A Dios, por no dejarme desfallecer, por tenerme aquí viviendo cada una de las cosas de la vida de una manera que solo él puede hacerlo.*

*A mis papás y heman@s porque todos son el ente motivador para hacer lo que hago.*

*A Albin, por compartir conmigo cada detalle de este trabajo y ser mi apoyo siempre.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Le agradezco a Dios por la posibilidad de realizar este estudio, ha sido un camino largo pero la experiencia es invaluable.

A mi familia, por sus constantes muestras de apoyo en momentos difíciles y por su sincera alegría al ver concluido este trabajo.

A Albin, quien ha sabido día a día la experiencia que fue la realización de este trabajo, por haber sufrido conmigo y por sentirse dichoso a mi lado en este punto

A la Universidad de Costa Rica por abrir los espacios para que podamos concluir nuestros estudios

Al CITA, por la posibilidad de desarrollar todo el trabajo en sus instalaciones, por permitirme el tiempo para las pruebas y facilitar todos los insumos.

A los funcionarios de la Escuela de Biología por su paciencia y su apoyo

A la Dra. Lilia Arely Prado de la UAM, por sus valiosas explicaciones

Al Dr. Erick Wong y su mamá, por su valiosísimo tiempo, su paciencia al explicarme y por sus palabras.

A mi comité de tesis por sus aportes, tiempo y consejos.

A la Dra. Ana Mercedes Pérez, por sus aportes para el desarrollo del proyecto.

A mis compañeros de la Planta Piloto y del Laboratorio de Química del CITA y de la ETA, sencillamente sin su ayuda no lo hubiera logrado.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

HOJA DE APROBACIÓN DEL TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO	v
INDICE DE CUADROS	vii
INDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
<b>I INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>II JUSTIFICACIÓN</b>	<b>3</b>
<b>III OBJETIVOS</b>	<b>5</b>
3.1 OBJETIVO GENERAL	5
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
<b>IV MARCO TEORICO</b>	<b>6</b>
4.1 LOS HONGOS FILAMENTOSOS EN LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS CELULASAS	6
4.2 COMPONENTES DE LA BIOMASA LIGNOCELULÓSICA	8
4.3 DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE LA BIOMASA CELULÓSICA Y MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS CELULASAS.	10
4.4 FACTORES QUE DETERMINAN LA PRODUCCIÓN DE CELULASAS EN LA FMS	13
4.5 RESIDUO AGROINDUSTRIAL DE MORA COMO SUSTRATO PARA LA PRODUCCIÓN DE CELULASAS	14
4.6 FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO	16
<b>V MATERIALES Y METODOLOGÍA</b>	<b>19</b>
5.1 LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO	19
5.2 MATERIA PRIMA	19
5.2.1 Descripción de materias primas	19
5.2.2 Preparación inicial del residuo de mora	20
5.3 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS RESIDUOS DE MORA	22
5.4 METODOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DEL MICROORGANISMO PRODUCTOR DE CELULASA A PARTIR DEL DESECHO DE MORA	22
5.4.1 Determinación primaria de la actividad celulítica de microorganismos aislados de residuos de mora	24
5.5 METODOLOGÍA BÁSICA DE LAS FERMENTACIONES EN MEDIO SÓLIDO	25
5.5.1 Preparación del medio de fermentación a partir de residuos de mora	25
5.5.2 Preparación del inóculo utilizado para las fermentaciones	25
5.5.3 Fermentaciones para la producción de celulasas	26
5.5.4 Toma de muestras	26
5.5.5 Tratamiento de las muestras	26

5.5.6 Variables de medición de las fermentaciones	27
5.5.7 Actividad enzimática celulolítica	27
5.5.8 Determinación de proteína	27
5.6 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE pH Y HUMEDAD INICIALES DEL SUSTRATO, SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CELULASAS EN UN MICROORGANISMO AISLADO DE RESIDUOS DE MORA Y <i>TRICHODERMA SP</i>	28
5.6.1 Diseño experimental	28
5.6.2 Análisis estadístico	30
<b>VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>31</b>
6.1 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS RESIDUOS	31
6.2 IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS	36
6.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL pH Y LA HUMEDAD INICIALES DEL SUSTRATO, SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CELULASAS DE <i>PENICILLIUM SP</i> Y <i>TRICHODERMA SP</i> .	39
6.3.1 Otros parámetros asociados a la FMS sobre residuos de mora	47
<b>VII CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>50</b>
<b>VIII INSTITUCIONES INTERESADAS Y FINANCIAMIENTO</b>	<b>52</b>
<b>IX CONFIDENCIALIDAD DEL TRABAJO DE GRADUACIÓN</b>	<b>52</b>
<b>X LITERATURA CITADA</b>	<b>53</b>
<b>XI ANEXOS</b>	<b>64</b>

## INDICE DE CUADROS

CUADRO 1. PRINCIPALES MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE CELULASAS (SUESCA 2012).....	8
CUADRO 2. VARIEDAD DE ALGUNOS SUSTRATOS, PRODUCTOS Y MICROORGANISMOS INVOLUCRADOS EN FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO (HÖLKER <i>ET AL.</i> 2004) .....	17
CUADRO 3. DESCRIPCIÓN DE LAS MATERIAS PRIMAS A UTILIZAR EN EL PROYECTO.....	19
CUADRO 4. DISTINTOS TIPOS DE MUESTRAS Y TRATAMIENTOS UTILIZADOS PARA LA OBTENCIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS CON ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CELULASA.....	23
CUADRO 5. COMPOSICIÓN DEL AGAR CMC .....	24
CUADRO 6. ENSAYOS DE LA MATRIZ DE DOEHLERT PARA LAS FERMENTACIONES SÓLIDAS DE RESIDUOS DE MORA. ....	30
CUADRO 7. CARACTERIZACIÓN DE LAS FIBRAS DE LOS RESIDUOS DE MORA <sup>1</sup> .....	31
CUADRO 8. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL RESIDUO OBTENIDO DEL RESIDUO DE MORA DE LA INDUSTRIA PROTICA, CARTAGO <sup>1</sup> .....	32
CUADRO 9. CARACTERIZACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS RESIDUOS DE MORA DE LA INDUSTRIA PROTICA, CARTAGO <sup>1</sup> .....	33
CUADRO 10. CONTENIDO MINERAL DE LOS RESIDUOS GRUESO Y FINO DE MORA <sup>1</sup> .....	34
CUADRO 11. DIÁMETRO DEL HALO (MM) DE 5 HONGOS AISLADOS DE RESIDUOS DE MORA Y UN CONTROL POSITIVO (C+) DESPUÉS DE INCUBACIÓN POR 48 H A 30 °C SOBRE AGAR CMC <sup>1</sup> .....	36
CUADRO 12. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ENDOGLUCANASA (CX) PARA <i>PENICILLIUM</i> SEGÚN DIFERENTES TRATAMIENTOS. ....	39

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. COMPONENTES ESTRUCTURALES DE LA BIOMASA CELULÓSICA (RUBIN 2008).....	9
FIGURA 2. MECANISMO DE DEGRADACIÓN DE LA CELULOSA (WAN YOON <i>ET AL.</i> 2014) .....	12
FIGURA 3. FLUJO DE PROCESO PARA LA ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA A BASE DE MORA A NIVEL INDUSTRIAL (ADAPTADO DE GANCEL <i>ET AL.</i> 2011).....	15
FIGURA 4. ASPECTO DE LOS RESIDUOS FINOS (IZQUIERDA) Y GRUESOS (DERECHA) UTILIZADOS EN LA FMS EN EL ESTUDIO. ....	20
FIGURA 5. FLUJO DE PROCESO PARA LA PREPARACIÓN DE RESIDUOS DE MORA UTILIZADO COMO SUSTRATO PARA LA FERMENTACIÓN SÓLIDA. ....	21
FIGURA 6. DISEÑO DOEHLERT PARA 2 FACTORES (DEJAEGHER Y VANDER HEYDEN 2009).....	29
FIGURA 7. CURVA DE RESPUESTAS (A) Y SUPERFICIE DE RESPUESTA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ENDOGLUCANASA DE <i>PENICILLIUM</i> PARA LOS DIFERENTES TIEMPOS DE MUESTREO, (B) 48 H, (C) 72 H, (D) 96 H Y (E) 120 H. ....	40
FIGURA 8 CURVAS DE ISORESUESTA Y SUPERFICIES DE RESPUESTA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA ENDOGLUCANASA DE <i>PENICILLIUM SP</i> PARA LOS DIFERENTES TIEMPOS DE MUESTREO, (A) 48 H, (B) 72 H, (C) 96 H Y (D) 120 H.....	41
FIGURA 9 CURVAS DE ISORESUESTAS Y SUPERFICIE DE RESPUESTA PARA UN ANÁLISIS FACTORIAL CON 3 FACTORES SOBRE LA RESPUESTA DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Cx DE <i>PENICILLIUM SP.</i> ....	42
FIGURA 10. COMPORTAMIENTOS DE LA ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA DE <i>PENICILLIUM</i> PARA LOS DIFERENTES TIEMPOS DE MUESTREO DURANTE LA FERMENTACIÓN SOBRE SUBPRODUCTOS DE MORA.....	43
FIGURA 11. CRECIMIENTO A LAS 72 H DE LOS HONGOS <i>PENICILLIUM</i> (IZQUIERDA) Y <i>TRICHODERMA</i> (DERECHA) SOBRE RESIDUOS DE MORA. ....	45
FIGURA 12. COMPORTAMIENTO DEL PH DURANTE LA FERMENTACIÓN GENERADAS POR <i>PENICILLIUM</i> (A) Y <i>TRICHODERMA</i> (B) SOBRE RESIDUOS DE MORA.....	47
FIGURA 13. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA DURANTE LA FERMENTACIÓN DE <i>PENICILLIUM SP</i> (A) Y <i>TRICHODERMA SP</i> (B) SOBRE RESIDUOS DE MORA.....	48

## RESUMEN

**Palabras clave:** *Trichoderma*, *Penicillium*, celulasas, fermentación en medio sólido, residuos agroindustriales de mora (*Rubus adenotrichos*).

Actualmente se produce una gran cantidad de residuos agroindustriales, los cuales en la mayoría de los casos se convierten en un problema para las empresas que deben encontrar una forma de deshacerse de ellos y en un problema ambiental ya que no se les da el tratamiento adecuado y terminan siendo contaminantes. En busca de aprovechar los desechos y convertirlos en sub productos valorizados, se han planteado estrategias biotecnológicas. En el caso de los residuos de mora (proveniente de la empresa Protica SA de Cartago) se planteó utilizarlos como un sustrato para la Fermentación en Medio Sólido (FMS). Para este proceso se usan hongos filamentosos capaces de crecer en el residuo y que como parte de su metabolismo secreten sustancias de interés como las celulasas.

Con el fin de evaluar los residuos de mora como sustrato para la FMS se caracterizó químicamente los dos tipos de sub productos utilizados (fino y grueso), además se aislaron los hongos con capacidad celulósica que se encontraron como flora natural en los residuos y se evaluaron en la fermentación diferentes condiciones de pH y humedad iniciales para la producción de celulasas. Se utilizaron dos microorganismos, *Trichoderma sp* y *Penicillium sp*. (este último aislado de los sub productos) para determinar su capacidad enzimática celulasa sobre los residuos de mora.

Se determinó que los residuos de mora cuentan con los minerales y carbohidratos necesarios para el crecimiento de los hongos, además de polifenoles remanentes después de su procesamiento industrial. Tienen además, un porcentaje alto de celulosa (65 % el residuo grueso y 39 % el fino), adecuado cuando se desea producir celulasas ya que es un inductor de la actividad celulasa y el sustrato para la hidrólisis enzimática.

Del aislamiento de los microorganismos se obtuvieron 5 hongos, todos con capacidad celulasa, sin embargo fue *Penicillium sp* quien obtuvo una mejor capacidad enzimática determinada sobre agar CMC.

El diseño experimental de las fermentaciones fue una superficie de respuesta de 2 factores (pH y porcentaje de humedad), tomando como respuesta las actividades endo y exo glucanasas para cada uno de los dos microorganismos. Se determinó que la actividad endoglucanasa de *Penicillium* fue muy baja (en el orden de nmol/mg de proteína) y no se pudo determinar mediante el análisis estadístico un máximo de actividad dentro del rango de los valores ensayados. La actividad exoglucanasa de *Penicillium* se considera ausente ya que no fue posible cuantificarla con el método analítico utilizado. En el caso de *Trichoderma* ambas actividades están ausentes. Estos valores tan bajos o ausentes de la actividad en ambos hongos pueden relacionarse con el hecho de que la síntesis de celulasas y su actividad se ven inhibidas por la presencia de altas concentraciones de azúcar en el medio y por la presencia de polifenoles, los cuales también se ha demostrado que son fuertes inhibidores de la actividad celulasa. Con estos resultados se puede concluir que los residuos de mora pueden ser un sustrato promisorio para la obtención de celulasas por FMS, sin embargo se debe realizar un tratamiento previo de los residuos que permita reducir la concentración inicial de carbohidratos y de polifenoles y optimizar la adición de sales, con lo cual se pueda evaluar la actividad enzimática celulasa de *Penicillium sp* y *Trichoderma sp*.

## I INTRODUCCION

El crecimiento de la industria biotecnológica se ha basado de manera importante en el uso de hongos filamentosos para la producción de enzimas y gran variedad de metabolitos (Corkidi *et al.* 2008). Estos microorganismos crecen formando redes tridimensionales, capaces de penetrar la matriz porosa de los sustratos (Roussos y Perraud-Gaime 1996) y se destacan por su capacidad enzimática celulítica los géneros *Trichoderma* (Basso *et al.* 2010; Weber y Agblevor 2010), *Aspergillus* (de Vries y Viser 2001), *Claviceps*, *Penicillium*, *Rhizopus* (Roussos y Perraud-Gaime 1996) y *Sclerotium* (Gautam *et al.* 2010).

La producción de enzimas es un campo creciente de la biotecnología (Viniegra-González *et al.* 2003), particularmente las celulasas son utilizadas a nivel industrial, debido a su potencial en el área textil, en lavandería, pulpa, papel y alimentos, entre otras (Sukumaran *et al.* 2005, Gamarra *et al.* 2010, Sun *et al.* 2010). Su aplicación inició cerca de 1980, primero en alimentos para animales y posteriormente en alimentos de consumo humano (Bhat 2000), empleadas para favorecer la extracción y filtración de jugos de frutas o verduras, filtración de mostos, extracción de aceites comestibles, etc (Ponce & Pérez 2002). Estas enzimas son sintetizadas a partir de materias primas de bajo costo, impulsando la investigación en el mejoramiento de cepas productoras de celulasas y en la optimización de los procesos de producción (Corkidi *et al.* 2008).

La importancia de la producción de celulasas utilizando hongos con capacidad de degradar celulosa se basa en que esta constituye una de las moléculas orgánicas renovables más importantes del planeta (de Vries y Vise 2001, Shiahmorteza *et al.* 2003, Sukumaran *et al.* 2005, Martínez-Anaya *et al.* 2008, Wada *et al.* 2010). Las enzimas celulíticas involucran un complejo de al menos, tres actividades diferentes, que además se combinan de manera sinérgica para llevar a cabo la hidrólisis total de la celulosa (Nidetzky *et al.* 1994, Basso *et al.* 2010). Dichas enzimas se pueden obtener por la acción de los mohos sobre una matriz rica en celulosa mediante un proceso fermentativo (Cen y Xia 2009). Una de esas matrices puede ser los residuos de mora.

El cultivo de mora es de importancia ecológica y económica (CUC sf), se encuentra distribuido a nivel mundial y su producción comercial está ubicada en las zonas templadas (Alvarado 2002); se estima que unas 300 especies de importancia se ubican en tierras altas del trópico (Murillo y Arias 2005). La producción de mora local continua siendo un sistema de cultivo familiar, de forma orgánica y silvestre (Mora 2007) y en Costa Rica es característica de lugares como Zarcero en Alajuela, la zona del Guarco y Los Santos en Cartago (Strik *et al.* 2007). De manera comercial es procesada por las industrias locales y su uso principal es la obtención de pulpas y jugos. Esto es similar en otros países que se consideran altos productores de la fruta como Colombia y Ecuador donde las bebidas a base de mora tienen alta demanda (Gancel *et al.* 2011).

Por su parte, la fermentación en medio sólido (FMS) ha permitido el aprovechamiento de residuos agrícolas como salvado de trigo; bagazo de caña, harina de yuca, cáscara de remolacha, entre otros, para la obtención de diversos bioproductos de interés (Roussos y Perraud-Gaime 1996) lo cual anima a utilizar otros subproductos para el mismo fin, por ejemplo residuos de mora. El bioproceso de FMS presenta enormes ventajas que incluyen, concentración relativamente alta de los productos, lo cual facilita y disminuye los costos de purificación (Aguilar *et al.* 2008), alta productividad volumétrica, menor generación de residuos de fermentación y además requiere un equipo relativamente sencillo (Pandey *et al.* 1999). Además, este bioproceso tiene a su favor el uso de medios de cultivo simples, donde muchas veces se puede utilizar directamente un sustrato agroindustrial como medio de cultivo. Además condiciones de trabajo comunes como gran concentración del inóculo y baja humedad del sustrato, disminuyen la posibilidad de contaminación (Aguilar *et al.* 2008). Es importante considerar para la producción bajo este sistema, parámetros tales como humedad inicial y actividad de agua (aw) del sustrato, pH inicial, concentración del inóculo y temperatura de fermentación (Raghavarao *et al.* 2003).

## II JUSTIFICACIÓN

Entre los microorganismos productores de celulasas, los hongos filamentosos se consideran los más adaptados para el crecimiento y biosíntesis sobre sustratos sólidos (Roussos y Perraud-Gaime 1996). Su forma de crecimiento en redes y su característica de liberación de enzimas extracelularmente, los faculta para la colonización de sustratos sólidos y para la conversión de materia como la celulosa, siendo esta una enorme ventaja para su uso en FMS (Pérez-Guerra *et al.* 2003). Según Roussos y Perraud-Gaime (1996) en FMS se pueden usar dos tipos de inoculantes, la microflora natural del sustrato y microorganismos controlados, de los cuales se conoce su capacidad de síntesis de un compuesto determinado. En el caso particular de la producción de celulasas, *Trichoderma* es el género de hongos más utilizado (Chahal 1985, Maurya *et al* 2012).

Como lo mencionan Roussos y Perraud-Gaime (1996), el cultivo de microorganismos sobre diferentes sustratos sólidos depende de diferentes parámetros tales como pH, humedad, temperatura, entre otros. Los hongos filamentosos crecen en medios ácidos y pueden tolerar importantes cambios del pH. Por su parte la humedad es importante ya que el agua sirve como vehículo para las enzimas y los nutrientes y facilita los intercambios gaseosos. Una humedad elevada en el sustrato causa una disminución de la porosidad, una baja difusión de oxígeno y una alta contaminación. En cambio, una baja humedad conduce a un crecimiento limitado y disminuye la disponibilidad del sustrato. En el caso de la temperatura, los hongos filamentosos que se utilizan en los procesos de FMS son por lo general mesófilos y crecen a temperaturas óptimas entre 29 y 35 °C.

Del procesamiento de la mora para la producción de pulpa se obtienen cerca de un 26 % de residuos (Gancel *et al.* 2011) los cuales en su mayoría no son aprovechados y eventualmente se convertirán en contaminantes para el ambiente si no se les trata adecuadamente o si les da un uso como materia prima de otros compuestos, por lo tanto podrían ser utilizados en diversos procesos como la biosíntesis enzimática mediante FMS.

Al igual que muchos otros residuos, los de la mora presentan gran cantidad de compuestos que no son aprovechados y siguen siendo una fuente rica de sustancias biodegradables y energía para microorganismos (Seiboth *et al.* 1997, Berradre *et al.* 2009). De estudios sobre el aprovechamiento de residuos de mora se reporta su uso para obtener compuestos fenólicos (Balasundram *et al.* 2006) y para evaluar la actividad antimicrobiana como alternativa de sustitución de conservantes sintéticos en alimentos (Krisch, *et al.* 2009). Además han realizado estudios para aprovecharlos como ingrediente en la elaboración de repostería, dado su alto contenido de grasa. Sin embargo no se reporta el uso de estos subproductos para la producción de enzimas, por lo cual resulta interesante aprovechar este desecho agroindustrial con el fin de darle un valor agregado.

En la mayoría de estudios de producción de enzimas mediante FMS se utilizan sustratos baratos (Sun *et al.* 2010), además al utilizar este bioproceso se estaría haciendo uso de una tecnología con la que se pueden reducir los costos de operación con respecto a las utilizadas convencionalmente como la fermentación sumergida. También conlleva un valor agregado al hacer menor uso de recursos como agua y disminución en los costos de purificación del producto final (Hölker *et al.* 2004).

Por lo tanto, los residuos de mora se perfilan como una alternativa interesante como sustrato para la obtención de enzimas mediante la acción de hongos celulósicos, ya que son una materia prima accesible, un sustrato apto para un proceso de FMS y además se puede obtener la microflora nativa que presente actividad celulósica y sea capaz de crecer con condiciones particulares de este residuo, como pH relativamente bajo.

### **III OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General**

Evaluar el uso de dos hongos filamentosos (*Trichoderma* sp y cepa con capacidad celulósica aislada del residuo de mora) para la biosíntesis de celulasas a partir de residuos agroindustriales de mora (*Rubus adenotrichos*) mediante fermentación en medio sólido.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

1. Caracterizar químicamente los residuos agroindustriales de mora utilizados como sustrato en la fermentación sólida.
2. Obtener un microorganismo productor de celulasa a partir de la microflora de desechos agroindustriales de mora.
3. Evaluar el efecto del pH y la humedad iniciales del sustrato, sobre la producción de celulasas por parte del microorganismo aislado y de *Trichoderma* sp.

## IV MARCO TEORICO

### 4.1 Los hongos filamentosos en la producción de enzimas celulasas

Los hongos filamentosos son un grupo diverso que usualmente se conoce con el nombre de “mohos”, Es común observarlos en alimentos en descomposición y sobre detritus. Su estructura está descrita como un agregado de hilos ramificados (hifas) las cuales se organizan para dar soporte a los procesos de producción y diseminación de esporas (Kavanagh 2005). Las hifas aéreas se extienden sobre el sustrato formando una red denominada micelio, el cual crece para encontrar nutrientes disponibles para procesos metabólicos y fisiológicos del moho. La mayoría de las especies de hongos prosperan en condiciones cálidas con valores cercanos a los 25 °C, ambientes dulces con presencia de azúcares en el medio, condiciones ácidas prefiriendo valores entre 4 y 6 y atmósferas aeróbicas (Walker y White 2005).

Estos organismos son utilizados en una gran cantidad de procesos industriales, como producción de enzimas, vitaminas, polisacáridos, pigmentos, lípidos, entre otros. Algunos de estos productos ya se producen de manera comercial y otros son promisorios para la producción biotecnológica (Adrio y Demain 2003). Muchos de estos hongos son capaces de degradar material lignocelulósico y secretar enzimas y otros metabolitos de interés (Percival Zhang *et al.* 2006), lo cual los coloca como microorganismos útiles para los procesos biotecnológicos en términos de recuperación de sustancias, que por lo tanto inciden directamente en los costos de purificación (Narra *et al.* 2012). Por otra parte, los metabolitos secundarios también son muy importantes para la salud y nutrición humana y tienen además un gran impacto económico; por lo tanto estos organismos son considerados muy exitosos para procesos fermentativos y principalmente son capaces de llevar a cabo procesos importantes mediante tecnologías de biotransformación (Adrio y Demain 2003)

El uso de hongos filamentosos para la producción industrial de importantes metabolitos ha aumentado rápidamente en los últimos años (Papagianni *et al.* 2001), principalmente el uso de hongos filamentosos se destaca en la producción de enzimas por el potencial

de secreción de enzimas hidrolíticas, se caracterizan por la formación de hifas que les permiten ser más eficientes y competitivos al colonizar matrices sólidas, tolerar baja actividad de agua (aw) y resistencia a condiciones de alta presión osmótica (Escudero *et al.* 2013) y pH (Lynd *et al.* 2002).

Distintos tipos de hongos mesófilos o termófilos, pueden producir enzimas celulasas para la hidrólisis de material lignocelulósico. Dentro de los diferentes géneros y especies de hongos productores de celulasas se encuentran *Trichoderma*, *Phanerochaeta*, *Sporotrix*, *Alternaria*, *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Neurospora crassa*, incluyendo además algunos hongos comestibles como: *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea*, *Pleurotus sp.*, (Lynd *et al.* 2002, Medina *et al.* 2010). Estos organismos están ampliamente distribuidos y crecen de manera típica sobre o dentro de materiales sólidos como plantas, granos y animales. Son eficientes en la producción de enzimas que utilizan para la degradación de los sustratos que les sirven como medio de soporte y fuente de alimento para la sobrevivencia (Kazunari *et al.* 2011).

Los procesos biotecnológicos para la obtención de celulasas hacen uso de un microorganismo capaz de sintetizar fácilmente las enzimas y secretarlas al medio exterior, además de requerir un sustrato inductor que propicie la formación del complejo enzimático. En el Cuadro 1 se resumen algunos de los microorganismos utilizados para la producción de celulasas (Suesca 2012).

**Cuadro 1. Principales microorganismos productores de celulasas (Suesca 2012)**

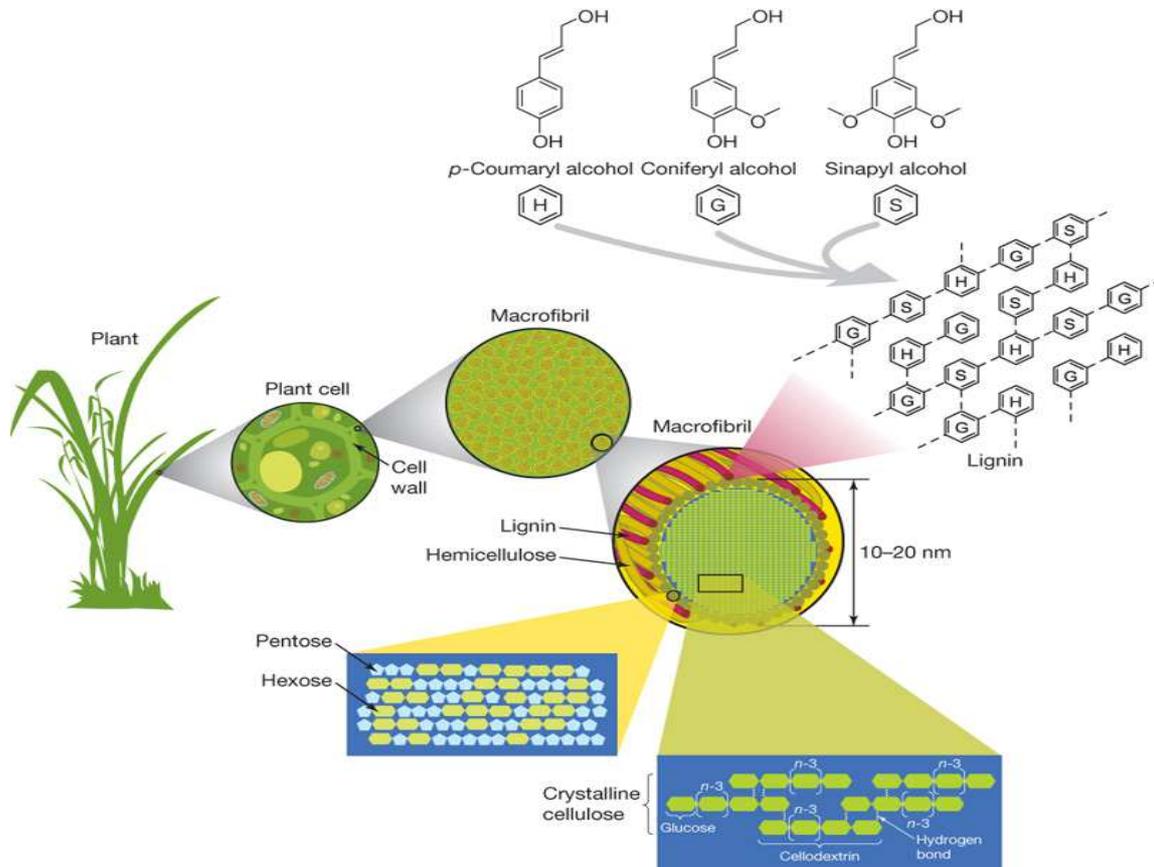
Microorganismo	Sustratos	Escala	Productividad	Referencia
<i>Cellulomonas biazotea</i>	Bagazo, tallo de algodón, paja de trigo, celobiosa, CMC y papel de filtro	1 L	37.5 IU/L/h en CMC, 17.5 IU/L/h FPAsa	Ibrahim M. y Malik K., 1996
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Paja de trigo, bagazo, paja de arroz	Fermentación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

Se considera que el género *Trichoderma* es el más utilizado para los estudios de producción de enzimas celulósicas (Pandey *et al.* 1999, Singh *et al.* 2011) y es mencionado como el más eficiente productor de celulasas y hemicelulasas a nivel industrial (Valkonen *et al.* 2014).

#### 4.2 Componentes de la biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica vegetal es el producto principal del proceso de fotosíntesis en ambientes terrestres y la fuente renovable más abundante producida en la biosfera (cerca de 100 billones de toneladas de biomasa seca/año) (Percival *et al.* 2006, Pereira

Andrade *et al.* 2011). Según Rubin (2008), esta biomasa está constituida por celulosa, hemicelulosa y lignina formando una capa protectora para la célula vegetal (Fig. 1).



**Figura 1. Componentes estructurales de la biomasa celulósica (Rubin 2008)**

Particularmente la celulosa es el componente más abundante; a pesar de las grandes diferencias en la composición de la estructura anatómica de paredes celulares de diferentes taxos. Se puede decir de manera general, que el contenido de celulosa se encuentra entre un (35 a 50) % del peso seco de la planta (Lynd *et al.* 2002). Así, la celulosa es el principal componente de la pared celular, la hemicelulosa el segundo más abundante que une las fibras de celulosa en las microfibrillas y las enlaza con la lignina, creando una red compleja que brinda una estructura resistente de la planta, por último la lignina se considera que provee tanto a los tejidos de las plantas como a las fibras individuales, resistencia a la compresión (Rubin 2008). La celulosa y hemicelulosa son

carbohidratos complejos formados por cadenas largas de moléculas de azúcar de 5 y 6 carbonos y la lignina es un polímero complejo no carbohidrato con estructura aromática (NSF 2008).

Una característica importante de la celulosa es su estructura cristalina. Este biopolímero es sintetizado en la naturaleza como moléculas individuales (cadenas lineales de residuos glucosílicos) los cuales se auto ensamblan. Cerca de 30 moléculas individuales de celulosa se unen para formar unidades más largas (protofibrillas) las cuales a su vez se empaquetan dentro de unidades mayores (microfibrillas) las cuales terminan ensamblándose para formar las fibras de celulosa (Lynd *et al.* 2002).

#### **4.3 Degradación enzimática de la biomasa celulósica y medición de la actividad de enzimas celulasas.**

En la naturaleza el grado de cristalinidad de la celulosa es variable, existiendo regiones desde totalmente cristalinas hasta regiones muy amorfas, con diferentes grados de cristalinidad entre estos dos extremos. Además de estas características las fibras de celulosa contienen varios tipos de irregularidades, tales como torceduras o giros de las microfibrillas o huecos como microporos superficiales, grandes pozos y capilares. El área de superficie total de una fibra de celulosa es por lo tanto mucho mayor que el área de la superficie de una fibra idealmente lisa de la misma dimensión. El efecto neto de la heterogeneidad estructural dentro de la fibra es que las fibras, están al menos parcialmente hidratadas por el agua cuando se sumerge en medios acuosos y algunos microporos y capilares son suficientemente amplios como para permitir la penetración de moléculas relativamente grandes, incluyendo en algunos casos, las enzimas celulósicas (Lynd *et al.* 2002).

La despolimerización enzimática de la celulosa es clave para la conversión de la gran cantidad de biomasa lignocelulósica disponible en el planeta, convirtiéndose en un proceso de importancia para el desarrollo económico (Hernández-Santoyo *et al.* 1999),

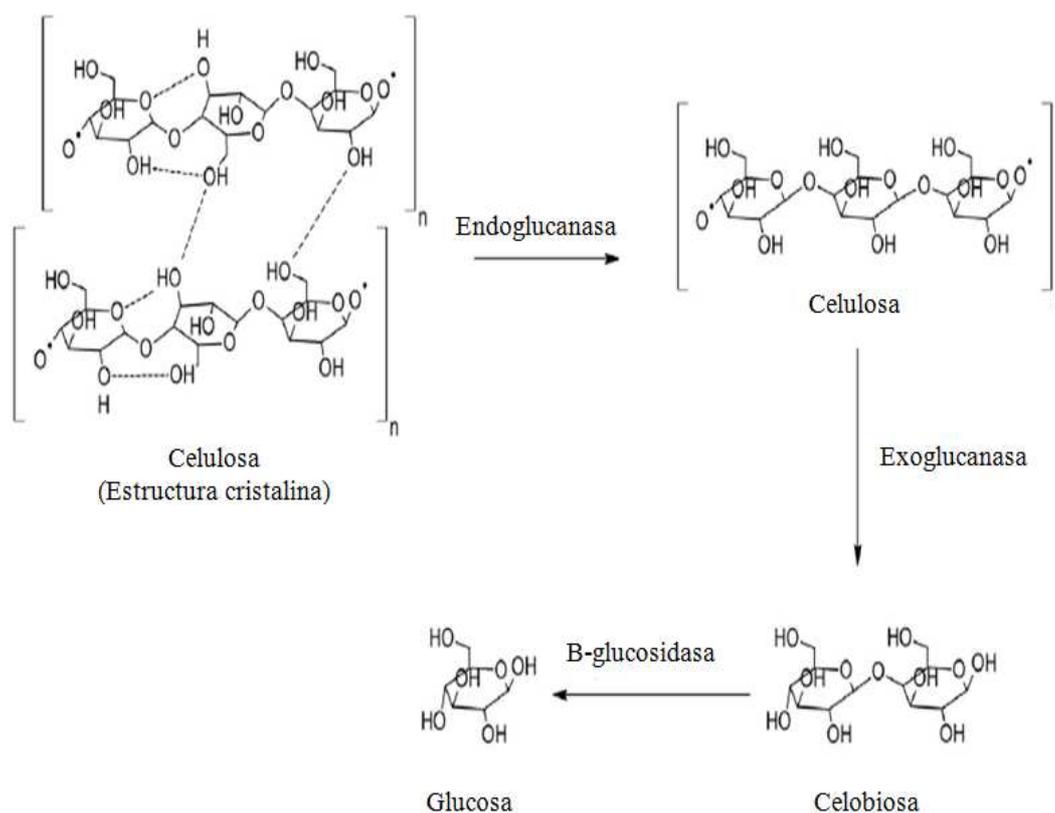
principalmente porque es una manera relativamente simple de aprovechamiento de los residuos vegetales y convertir el material celulósico disponible en azúcares monoméricos que sirven como materia prima para una gran cantidad de procesos productivos biotecnológicos (Juha'sz *et al.* 2005).

Las celulasas se consideran el tercer grupo más importante de enzimas con un 20 % del mercado total de enzimas a nivel mundial (Wan Yoon *et al.* 2014), centrando las investigaciones en todo el mundo por el potencial comercial para la conversión de los materiales celulósicos agrícolas (Singh Nigam, 2013). Esto significa una alta demanda y un importante impacto ecológico para el planeta, además de ser una fuente económica para diversas industrias tal como la relacionada a la producción de bioetanol, industria textil, de pulpa y papel, formulación de alimentos para animales, extracción de jugo de frutas y hortalizas (Singh Dhillon *et al.*, 2011 y 2012 Wan Yoon *et al.* 2014) y compuestos orgánicos de valor agregado a partir de residuos agrícolas renovables, entre otros (Singh Nigam, 2013).

Las celulasas son glicoproteínas que no requieren cofactor para realizar la actividad enzimática, además comprenden un complejo de tres enzimas importantes que actúan de forma conjunta debido a la compleja estructura, cristalina y amorfa, de la celulosa, hidrolizándola en celobiosa, glucosa y oligosacáridos. Estas tres enzimas son: 1) 1,4- $\beta$ -D-glucano glucanohidrolasas (endoglucanasas, EC 3.2.1.4); 2) 1,4- $\beta$ -D-glucano celobiohidrolasas y 1,4-b-D-glucano glucohidrolasas (exoglucanasas, EC 3.2.1.91 y 3.2.1.74) y 3)  $\beta$ -D-glucosida glucohidrolasas (b-glucosidasas, EC 3.2.1.21) (Dave *et al.* 2012, Narra *et al.* 2012).

El mecanismo ampliamente aceptado para explicar la hidrólisis enzimática de la celulosa involucra la sinergia de las tres enzimas (Fig. 2), el cual inicia con las endoglucanasas (E.C. 3.2.1.4) que rompen al azar los enlaces internos de la molécula en las regiones amorfas, producen una disminución en la longitud de la cadena y un lento incremento de los grupos reductores libres (Wan Yoon *et al.* 2014). Las exoglucanasas (E.C. 3.2.1.91 y 3.2.1.74) remueven unidades de glucosa o celobiosa a partir del extremo libre no reductor de la cadena de celulosa, dando como resultado un incremento

rápido en los azúcares o grupos reductores y poco cambio en el tamaño del polímero. Finalmente la  $\beta$ -glucosidasa (E.C. 3.2.1.21) hidroliza la celobiosa producida por las actividades anteriores, dando como producto final la glucosa (Ponce & Pérez 2002, Liu *et al.* 2009, Brijwani *et al.* 2010, Chander *et al.* 2011).



**Figura 2. Mecanismo de degradación de la celulosa (Wan Yoon *et al.* 2014)**

Un análisis experimental ampliamente utilizado para medir la velocidad de una reacción catalizada por una enzima, consiste en mezclar soluciones de sustrato y enzima pura apropiada, tiempo cero, en condiciones isotérmicas, con una solución amortiguadora (buffer) para controlar el pH. Las concentraciones de sustrato y producto son registradas en diversos momentos, mediante técnicas espectrofotométricas, manométricas, polarimétricas entre otras (Duarte 1993). La actividad enzimática específica se suele expresar de diferentes maneras, en unidades enzimáticas arbitrarias por mg, donde la unidad enzimática está relacionada con la descomposición o formación de cierto

sustrato o producto en cierto tiempo, en términos de la velocidad constante de reacción por mg de enzima, o como los  $\mu$ moles de un sustrato reaccionando por minuto, por mg de enzima. Una unidad (U) de una enzima es definida como la cantidad que catalizará la transformación de 1  $\mu$ mol de sustrato por minuto (Suesca 2012).

#### **4.4 Factores que determinan la producción de celulasas en la FMS**

El proceso de FMS para producción de celulasas implica una serie de parámetros que deben ser considerados y que influyen de manera importante en los rendimientos que se obtienen. Dentro de estos se incluyen, (a) composición del medio de fermentación, donde los medios más utilizados tienen dentro de sus componentes una fuente de carbono, nitrógeno, fósforo y solución de elementos traza, entre otros, (b) pH, es uno de los parámetros más difíciles de monitorear, (c) temperatura, donde el valor que se utilice en el proceso es dependiente del microorganismo utilizado y (d) humedad del sustrato, afectando tanto en niveles bajos, por la limitación de solubilidad de nutrientes y niveles altos ya que dificulta la difusión del aire en la matriz y eleva la posibilidad de contaminación (Wan Yoon *et al.* 2014).

Folakemi *et al.* (2008) evaluaron el efecto de varios parámetros, entre ellos pH y temperatura, sobre la producción de celulasas por parte de tres microorganismos, usando como sustrato residuos de piña, determinaron que para los microorganismos utilizados el pH óptimo es 4 y la mejor temperatura se encontró en un rango de (30-45) °C obteniendo valores de actividad en condiciones óptimas entre 0,297 mg de glucosa producida/0,5 mL de sustrato y 0,565 mg de glucosa producida/0,5 mL de sustrato. El estudio de Latifian *et al.* (2007) también demostró la significancia de estos parámetros, donde encontraron que las mejores condiciones para la producción de celulasas en dos cepas de *T. reesei* estaban influenciadas por temperatura y humedad mientras que el pH no tuvo un efecto sobre la actividad enzimática.

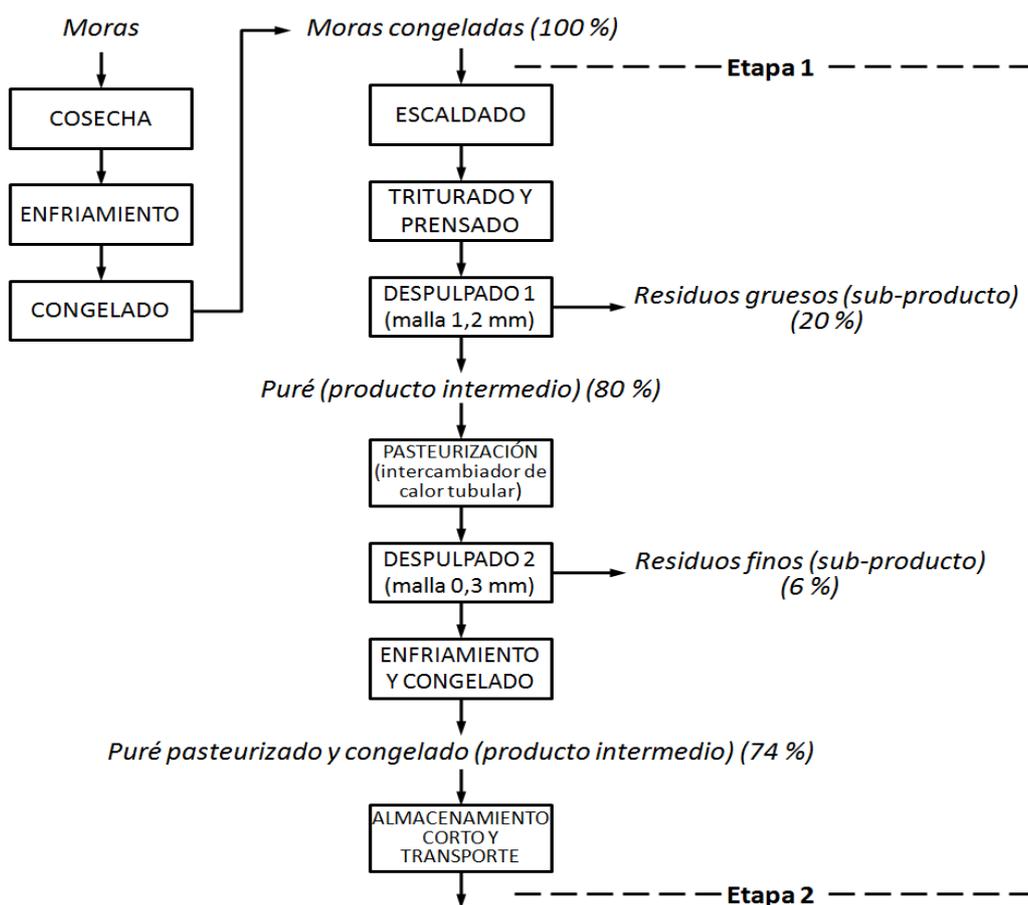
#### **4.5 Residuo agroindustrial de mora como sustrato para la producción de celulasas**

La mora es un cultivo de importancia ecológica y económica (CUC sf) que se encuentra distribuida a nivel mundial, su producción comercial está ubicada en las zonas templadas (Alvarado 2002) y se estima que unas 300 especies de importancia se ubican en tierras altas del trópico (Murillo & Arias 2005). La producción de mora local continúa siendo un cultivo familiar de forma orgánica y silvestre (Mora 2007) y es característica de lugares como Zarcerero en Alajuela, y la zona del Guarco y Los Santos en Cartago (Strik *et al.* 2007) y Pérez Zeledón (Castro y Cerdas 2005). Según Castro y Cerdas (2005) el crecimiento del cultivo se ha visto influenciado por varios factores como, aumento de la demanda, disposición de tecnología apropiada, al alcance de los productores de escasos recursos y facilidades de acceder a capital de trabajo mediante créditos con tasas de interés bajo, además de que los lugares mencionados anteriormente reúnen las condiciones agroclimatológicas aptas para el cultivo de esta fruta.

Según datos de la FAO, la producción mundial de Bayas (frambuesa, mora y zarzamora) alcanzó las 363 000 toneladas en el 2001. Vale la pena indicar que la mora se agrupa con la frambuesa y la zarzamora en las mismas partidas arancelarias, por lo que no se cuenta con información cuantitativa desagregada para mora. En el 2001, Costa Rica exportó 753,52 toneladas de mora por un valor de US\$ 3,8 millones; principalmente dirigidas a Estados Unidos (79,8 %) después a Holanda (Alvarado 2002); en el 2006 Guatemala se convirtió en el segundo destino para las exportaciones de mora (Mora, 2007). Para el 2007 casi la totalidad de las exportaciones (96 %) se dirigieron al mercado norteamericano (Arias 2008).

La mora, es considerada una fruta muy perecedera, presenta con un alto contenido de agua (Alvarado 2002), vitaminas C, A y E, buena fuente de fibra y calcio (Castro y Cerdas 2005). Además es rica en polifenoles (antocianinas y elagitaninas), compuestos que son de interés debido a su actividad antioxidante y las posibles funciones beneficiosas en la salud humana (García *et al.* 2003, Acosta-Montoya *et al.* 2010).

Cerca del 90 % del consumo mundial se destina al procesamiento para la producción de mermeladas, jugos y vinos y sólo el 10 % se consume como fruta de fresca. (Arias 2008). En los principales países productores de mora (Colombia, Ecuador y Costa Rica), la mora es procesada para la producción de bebidas (CUC sf). Murillo y Arias (2005) estimaron que el consumo de mora por parte de la industria de los jugos y demás procesados crecería un 10% anual, con lo cual también aumentarían los residuos. Del procesamiento industrial de la fruta para la producción de jugos se obtiene aproximadamente un 26 % de residuos (Fig. 3), constituidos por semillas y restos de pulpa (García *et al.* 2003), los cuales generalmente no son aprovechados, aunque siguen siendo una fuente rica de compuestos biodegradables y energía para microorganismos (Berradre *et al.* 2009).



**Figura 3. Flujo de proceso para la elaboración de una bebida a base de mora a nivel industrial (adaptado de Gancel *et al.* 2011).**

Actualmente muchos grupos de investigación trabajan en la obtención de subproductos a partir de fuentes renovables, especialmente residuos agroindustriales como pulpa de manzana, residuos de mandarina, cascarilla de soja, bagazo de caña y arroz (Singh Dhillon *et al.* 2012) que pueden ayudar a reducir costos de producción, además del uso de tecnologías más baratas. Por otra parte el uso de estos residuos tiene un importante componente de valor agregado al utilizar material que normalmente sería un contaminante al medio ambiente (Singh Dhillon *et al.* 2011).

#### **4.6 Fermentación en medio sólido**

La FMS se define como el cultivo microbiano sobre la superficie y el interior de una matriz sólida en ausencia de agua libre, pero con suficiente humedad para permitir el crecimiento de los microorganismos (Hölker *et al.* 2004; Hölker and Jürgen 2005; Rodríguez y Sanromán, 2006; Singhanian *et al.* 2009). Esta técnica ha sido utilizada desde tiempos ancestrales para fermentar alimentos como pan, queso, salsa de soya y miso (Glasse y Ward 2015) y más recientemente metabolitos de interés y enzimas (Rodríguez y Sanromán, 2006). Diversos autores indican que la FMS puede dividirse en dos grandes tipos, basándose en el hecho de que se puede usar un sustrato natural como matriz que provea los nutrientes al microorganismo o un soporte inerte suplementado (como espuma de poliuretano o perlas de Amberlita), en ambos casos el agua libre debe estar ausente, usualmente este proceso involucra sustratos que proporcionan espacios intersticiales gaseosos que permiten el libre acceso al oxígeno (Viniestra-González 2014, Glasse y Ward 2015).

El proceso de FMS está condicionado a varios factores, los cuales inciden directamente en una fermentación exitosa, dentro de los cuales se pueden incluir, selección de los microorganismos, selección del sustrato y costo de purificación del producto terminado (Singhanian *et al.* 2009) además del pretratamiento del sustrato cuando se requiera, tamaño de partícula, espacio interpartícula y área de superficie, humedad relativa, tamaño de inóculo, entre otros (Viniestra-González 2014).

Por la naturaleza de las condiciones del proceso, principalmente relacionados al concepto de actividad de agua en el sustrato, los hongos y levaduras son los más aptos para los procesos de FMS y las bacterias han sido consideradas inadecuadas en la mayoría de los estudios (Rodríguez y Sanromán, 2006). Existen diversos estudios en FMS con una gran variedad de sustratos y microorganismos para la obtención de distintos metabolitos (Hölker *et al.* 2004) (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Variedad de algunos sustratos, productos y microorganismos involucrados en fermentación en estado sólido (Hölker *et al.* 2004)**

Sustrato	Producto	Microorganismo	Referencia
Harina de almendra	Lipasas	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Ul-Haq <i>et al.</i> (2002)
Orujo de manzana, mazorca de maíz, cáscara de cebada	Degradación de tintes	Hongos de pudrición blanca	Robinson <i>et al.</i> (2002)
Residuos del plátano	Enzimas lignolíticas	<i>Pleurotus sp.</i>	Reddy <i>et al.</i> (2003)
Materia de engorde	Agente de biocontrol	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Adams <i>et al.</i> (2002)
Jalea de cacao	Endo-poligalacturonasa	<i>Peecilomyces clavissporus</i>	Souza <i>et al.</i> (2003)
Mandioca, soja, grano de amaranto	Aroma	<i>Rhizopus oryzae</i>	Christen <i>et al.</i> (2000)
Torta de coco	Lipasas	<i>Candida rugosa</i>	Benjamin and Pandey (1997)
Residuos de café	Seta comestible	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Fan <i>et al.</i> (2000)
Rastrojo de maíz	Enzimas celulolíticas	<i>Fusarium oxysporum</i>	Panagiotou <i>et al.</i> (2003)
Pulpa de eucalipto	Xilanasa	<i>Streptomyces sp.</i>	Beg <i>et al.</i> (2000)
Garbanzo	Tempeh	<i>Aspergillus sp.</i>	Reyes-Moreno <i>et al.</i> (2000)
Lignito	Carbón solubilizado	<i>Trichoderma atroviride</i>	Hölker and Höfer (2002)
Bagazo naranja	Pectinasa	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Martins <i>et al.</i> (2002)
Piña, fruta mezclada, residuos maosmi	Ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	Kumar <i>et al.</i> (2003)
Caucho	Reciclaje	<i>Gordonia sp.</i>	Arenskötter <i>et al.</i> (2003)
Torta de soja	Proteasas	<i>Penicillium sp.</i>	Germano <i>et al.</i> (2003)
Tahití	Pectinasas	<i>Aspergillus sp.</i>	Dartora <i>et al.</i> (2002)
Trigo con polvo de semilla de frambuesa	Neomicina	<i>Streptomyces marinensis</i>	Ellaiah <i>et al.</i> (2003)

La FMS se ha convertido desde hace varias décadas en un proceso biotecnológico con un impacto ecológico y económico muy importante, el cual ha permitido la obtención de sub productos valiosos, con un alto valor agregado a partir de material que se considera de desecho a nivel agroindustrial y que se convierte en una fuente de contaminación (Rodríguez y Sanromán 2006, Ang *et al.* 2013). Estos residuos agroindustriales son una rica fuente de carbohidratos y otros nutrientes importantes para el crecimiento y generación de bioproductos (Singh Dhillon *et al.* 2012). Con esto, la obtención de productos químicos a granel y productos de alto valor agregado como etanol, proteínas, enzimas, ácidos orgánicos, aminoácidos, metabolitos secundarios biológicamente activos, saborizantes, etc, se han convertido en muchos casos en un negocio emergente (Papagianni *et al.* 2001, Rodríguez y Sanromán 2006), sobre todo si se considera que el uso de estos residuos reduce los costos de producción entre un 40 % y 60 % (Singh Dhillon *et al.* 2012). Dentro de las principales ventajas del proceso de FMS se citan que presenta altas productividades volumétricas, alta estabilidad del producto, riesgo de contaminación bajo y bajos costos instrumentales (Garces 2004; Ang *et al.* 2013).

## V MATERIALES Y METODOLOGÍA

### 5.1 Localización del estudio

El estudio se llevó a cabo en el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) de la Universidad de Costa Rica (UCR), ubicada en San Pedro de Montes de Oca. Específicamente, en el Laboratorio de Microbiología se llevaron a cabo las fermentaciones; los análisis químicos se realizaron en los Laboratorios de Química de la Escuela de Tecnología de Alimentos y del CITA.

### 5.2 Materia prima

#### 5.2.1 Descripción de materias primas

En el cuadro 3 se detallan las materias primas así como las fuentes de donde se obtuvieron, en la figura 4 es posible detallar el aspecto de los dos tipos de residuos utilizados en las FMS

**Cuadro 3. Descripción de las materias primas a utilizar en el proyecto.**

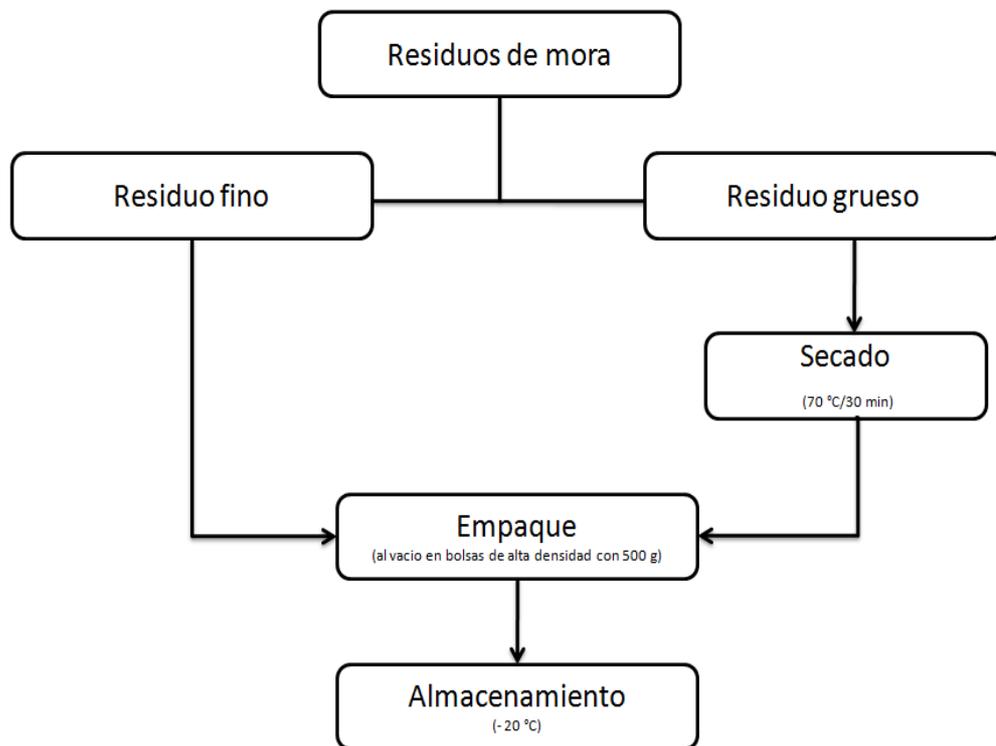
<b>Materia Prima</b>	<b>Descripción</b>
<b>Residuos de mora</b> <i>(Rubus adenotrichos)</i>	Residuos finos y gruesos (Fig 4.), obtenidos de un proceso de producción de pulpa de mora de la empresa Protica S.A. Cartago.
<b>Microorganismo</b>	Cepa de hongo filamentoso con actividad celulítica, aislada de la microflora de los residuos agroindustriales de mora provenientes de Protica S.A. Cepa de <i>Trichoderma</i> sp obtenida de la cepoteca de la facultad de Microbiología, UCR.



**Figura 4. Aspecto de los residuos finos (izquierda) y gruesos (derecha) utilizados en la FMS en el estudio.**

### **5.2.2 Preparación inicial del residuo de mora**

Los residuos que posteriormente se utilizaron para el proceso de FMS fueron obtenidos después del procesamiento industrial de la mora para la obtención de pulpa, tal como se detalló en la figura 3. El tratamiento previo de los residuos para posteriormente ser usados en la FMS se detalla en la Fig. 5.



**Figura 5. Flujo de proceso para la preparación de residuos de mora utilizado como sustrato para la fermentación sólida.**

La descripción de dicho proceso se detalla a continuación:

1. Secado: el residuo grueso se colocó en bandejas con una altura no mayor a 1 cm. Las bandejas fueron colocadas en un horno “National” con temperatura de secado de 70 °C, se monitoreó la apariencia de los residuos cada 15 min hasta que se observó un residuo seco de color uniforme sin evidencia visual de humedad. Una vez seco se tomaron tres muestras y se enviaron al laboratorio de química del CITA para determinar su humedad.
2. Empaque: el empaque se realizó en bolsas de alta densidad con aproximadamente 500 g de sustrato, selladas al vacío.
3. Almacenamiento: Las bolsas con los residuos de mora se almacenaron en un congelador a –20 °C.

### **5.3 Caracterización química de los residuos de mora**

El desecho de mora obtenido se sometió a análisis químicos con el fin de caracterizar el sustrato para la fermentación, principalmente por tratarse de un residuo agroindustrial. Se tomaron tres muestras del lote de residuos gruesos y tres muestras del lote de residuos finos para realizar los análisis de celulosa y hemicelulosa (Van Soest y Robertson 1981) y lignina (Effand 1977)

Adicionalmente tres muestras de cada tipo de residuos se enviaron a los laboratorios del Centro de Investigaciones en Agronomía y al CITA ambos de la Universidad de Costa Rica para determinar el contenido de minerales y la composición bromatológica respectivamente (los métodos de análisis se detallan en el Anexo 1).

### **5.4 Metodología para la obtención del microorganismo productor de celulosa a partir del desecho de mora**

Todas las muestras se analizaron en el laboratorio de microbiología del CITA. Los tres tipos de muestras analizadas y los tratamientos usados para obtener la microflora de mora se detallan en el Cuadro 4

**Cuadro 4. Distintos tipos de muestras y tratamientos utilizados para la obtención de hongos filamentosos con actividad enzimática celulasa**

<b>Tipo de muestra</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Condiciones de incubación</b>
<b>Cinco muestras de cada tipo de residuo de 100 g, tomadas después del procesamiento de la mora en Protica S.A.</b>	De manera aséptica se transfirieron 25 g de cada una de las muestras a frascos que contienen 225 mL de caldo infusión cerebro corazón marca Oxoid, esterilizado a 121 °C por 15 min.	Se incubaron por un periodo de $(48 \pm 2)$ h a $(35 \pm 2)$ °C, posteriormente se transfirieron mediante la técnica de esparcimiento, 100 µL del medio a placas con “agar mora” (Anexo 4) que se incubaron de 5 a 7 días
<b>Cinco muestras de fruta de 100 g directamente del campo, específicamente de una finca productora de mora de la zona de San Martín de Dota, Cartago.</b>	Se colocaron en un frasco de licuadora estéril y se procesaron. Luego de manera aséptica se transfirieron 25 g de cada una de las muestras a frascos que contienen 225 mL de caldo infusión cerebro corazón marca Oxoid, esterilizado a 121 °C por 15 min.	Se incubaron por un periodo de $(48 \pm 2)$ h a $(35 \pm 2)$ °C, posteriormente se transfirieron mediante la técnica de esparcimiento, 100 µL del medio a placas con “agar mora” que se incubaron de 5 a 7 días
<b>Cinco muestras de 100 g aproximadamente de cada tipo de residuo obtenidos directamente de Protica S.A</b>	Se colocaron los 100 g de las muestras, asépticamente en frascos estériles adecuados	Se incubaron las muestras en condiciones de oscuridad y temperatura ambiente por un periodo mayor a 5 días, las porciones de residuos con evidencia de crecimiento de microorganismos después de la incubación se transfirieron a placas de petri que contienen “agar mora” que se incubaron de 5 a 7 días.

En el anexo 4 se detalla la composición del agar mora utilizado para el aislamiento de los mohos obtenidos de los residuos de mora (González 2012).

Alternativamente con un asa bacteriológica, se transfirieron a placas con “agar mora” las colonias que se formaron en la superficie del caldo de cultivo procedente de los primeros tipos de muestra presentados en el cuadro 4

Las placas de agar mora con las distintas muestras se incubaron 5 días a  $(23 \pm 1)$  °C. Una vez pasado el periodo de incubación se procedió a aislar los microorganismos encontrados para lo cual se transfirieron porciones de los mohos o colonias de bacterias y levaduras que crecieron en las placas con agar mora a placas de agar papa dextrosa

(APD) acidificado a un pH de 3,5 con ácido tartárico al 10 %. Se descartaron para este estudio de la actividad celulasa las levaduras y bacterias al tratarse de un proceso de fermentación sólida (Pérez-Guerra *et al.* 2003).

Una vez aislados los microorganismos se procedió a su identificación, para lo cual se enviaron al Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, la identificación se realizó según el método de Pouch 2003, creciendo el microorganismo en agar papa dextrosa y mediante la observación de su morfología.

Los microorganismos aislados se mantuvieron a 4 °C en placas de petri con APD para realizar los subcultivos necesarios con el fin de obtener las esporas para las fermentaciones y su uso en análisis posteriores.

#### **5.4.1 Determinación primaria de la actividad celulítica de microorganismos aislados de residuos de mora**

Para determinar la actividad celulítica y seleccionar el microorganismo que se usó en las fermentaciones, se utilizó la técnica cualitativa descrita por Chand *et al.* (2008), con agar carboximetil celulosa (CMC) cuya formulación se describe en el Cuadro 5 y una solución de color KI/I (solución de Gram).

**Cuadro 5. Composición del agar CMC**

<b>Nutriente</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
NaNO <sub>3</sub>	2,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0
MgSO <sub>4</sub>	0,5
KCl	0,5
CMC sódica	2,0
Peptona	0,2
Agar	17.0

Para la prueba se preparó una suspensión de esporas de los cultivos incubados por 3 a 5 días en APD con concentración de  $1,0 \times 10^6$  esporas por mL, se inocularon 10  $\mu$ L de la suspensión en el centro de placas de agar CMC. Las placas se incubaron de por 48 h a 30 °C y se siguió el procedimiento de selección de las cepas productoras de celulasas. Las cepas se identificaron debido a que la solución de gram forma un complejo negro azulado con la celulosa, pero no con la celulosa hidrolizada, dando como resultado una zona clara y definida alrededor de las colonias productoras de celulasas, la coloración ocurre en un tiempo de 3 a 5 minutos. Como control positivo se utilizó una suspensión de esporas de *Trichoderma sp.*

El microorganismo aislado con el mayor diámetro promedio de halo fue utilizado para las pruebas de FMS.

## **5.5 Metodología básica de las fermentaciones en medio sólido**

A continuación se describe el procedimiento general que se llevó a cabo en las fermentaciones en medio sólido.

### **5.5.1 Preparación del medio de fermentación a partir de residuos de mora**

Para preparar el sustrato, se descongeló el residuo de mora, colocando las bolsas con residuos en un recipiente con agua a temperatura ambiente hasta que estuvo totalmente descongelado.

La mezcla de los tipos de sustrato se hizo en proporciones de 50 % de residuo grueso y 50 % de residuo fino. Se mezclaron en recipientes autoclavables y se homogenizaron manualmente y posteriormente se esterilizaron en autoclave por 15 min a 121 °C.

### **5.5.2 Preparación del inóculo utilizado para las fermentaciones**

A partir del microorganismo seleccionado en el punto 5.4.1 se obtuvieron las esporas para las fermentaciones. El inóculo se preparó cultivando el microorganismo en APD acidificado e incubándolo por 5 días a 30 °C. Una vez terminado el tiempo de

incubación se obtuvieron las esporas las cuales se extrajeron agregando una solución estéril de agua destilada con tween 80 al 0,1 % (v/v). El inóculo se utilizó en una concentración de  $1 \times 10^7$  esporas por g de materia seca. El conteo de las esporas se realizó con una cámara de Neubauer.

### **5.5.3 Fermentaciones para la producción de celulasas**

Las fermentaciones se llevaron a cabo en erlenmeyers (frascos) de 250 mL, los cuales se colocaron en una incubadora con temperatura de 27°C, la cual se encuentra dentro del rango óptimo de crecimiento de hongos filamentosos (Roussos y Perraud-Gaime 1996), durante el tiempo de la fermentación, por la naturaleza del proceso de fermentación y el diseño del experimento se considera una sola temperatura para los ensayos.

En cada frasco se colocaron 10 g de sustrato, previamente autoclavado e inoculado. La inoculación se realizó mediante un micro goteo del inóculo sobre el sustrato el cual se mezcló con ayuda de una espátula estéril. Cada muestra de 10 g del sustrato se pesó aseptícamente directamente en los frascos de fermentación estériles.

### **5.5.4 Toma de muestras**

Cada 24 horas a partir de las 48 h y hasta las 120 h de fermentación se tomó una muestra (la cual representa el total del contenido de un frasco) con el fin de monitorear el avance de la fermentación para la producción de celulasas.

### **5.5.5 Tratamiento de las muestras**

A cada matraz de fermentación se le adicionaron 15 mL de agua destilada con tween 80 (0,1 % v/v). Se agitaron a 150 rpm por 15 min a temperatura ambiente. La suspensión resultante después de la extracción se filtró en un embudo buchner y papel Watman # 1 y el líquido obtenido se centrifugó (4000 rpm, 15 min y temperatura ambiente),

posteriormente el sobrenadante se almacenó a -20 °C hasta su uso en la determinación de actividad enzimática y contenido de proteína (Díaz *et al.* 2007).

La medición del pH se realizó sobre la suspensión enzimática después de centrifugar, según el método CITA: P-SA-Q-012, que refiere el método 981.12 AOAC (2006).

#### **5.5.6 Variables de medición de las fermentaciones**

Se determinó en cada fermentación la actividad de dos celulasas: exo- $\beta$ -1,4-glucanasa y endo- $\beta$ -1,4-glucanasa y la determinación de proteína como se describe en los puntos 5.5.7 y 5.5.8.

#### **5.5.7 Actividad enzimática celulolítica**

La actividad celulítica exo- $\beta$ -1,4-glucanasa y endo- $\beta$ -1,4-glucanasa en las muestras tomadas durante las fermentaciones se realizó con celulosa microcristalina (Avicel®) y CMC como sustrato respectivamente. Una unidad de actividad exo- $\beta$ -1,4-glucanasa y endo- $\beta$ -1,4-glucanasa se expresan como nano moles de glucosa liberados por minuto por miligramo de proteína (UI/mg de prot). Los azúcares reductores (glucosa) liberados como producto de la hidrólisis de la celulosa, se estimaron mediante el método de ácido dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959).

#### **5.5.8 Determinación de proteína**

La determinación de la proteína se realizó según el método de Lowry *et al.* (1951), usando albúmina bovina como sustrato

## **5.6 Evaluación del efecto del pH y la humedad iniciales del sustrato, sobre la producción de celulasas por un microorganismo aislado de residuos de mora y *Trichoderma sp***

Para evaluar el efecto del pH y la humedad iniciales sobre la producción de celulasas en ambos microorganismos, se llevaron a cabo estudios de las cinéticas de fermentación utilizando el sustrato de los residuos de mora.

Los valores de pH y porcentaje de humedad para los ensayos se detallan en el diseño experimental. Los ajustes en el pH se realizaron con una solución de NaOH 4 M. Para lo cual se consideró el volumen de la solución adicionado para el cálculo del porcentaje de humedad inicial del sustrato. El porcentaje de humedad se ajustó con agua destilada, la fórmula para calcular la cantidad de agua que se requiere agregar para realizar el ajuste a las diferentes humedades fue:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{g \text{ de agua agregados} + g \text{ de agua contenidos en la muestra}}{g \text{ agua agregados} + g \text{ de sólido húmedo}} \times 100$$

Se consideró dentro de los gramos de agua agregada el volumen de inóculo y la cantidad de NaOH necesaria para ajustar el pH. Ambos tratamientos (ajuste de humedad y pH) se realizaron antes del proceso de autoclavado del sustrato.

Después de estos ajustes la fermentación se realiza según se detalló en el punto 5.5.3

### **5.6.1 Diseño experimental**

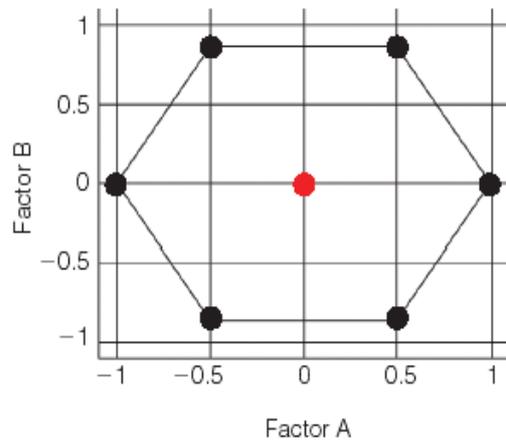
Para determinar las mejores condiciones de humedad y pH iniciales para cada uno de los microorganismos, se llevó a cabo un diseño Doehlert para dos factores.

El diseño Doehlert se caracteriza por la uniformidad en el llenado de espacio, es decir, las distancias entre todos los experimentos vecinos son iguales. El diseño de dos

factores consiste en un hexágono centrado (Fig. 6). Para el diseño de dos factores Doehlert, uno de los factores se examina en tres y el otro en cinco niveles. En este diseño se requiere un escaso número de determinaciones experimentales, se utiliza para factores continuos y de relación no lineal lo que representa la principal ventaja de este diseño con respecto a otros métodos de amplia aplicación.

El número de experimentos es generados a partir de la ecuación;  $N = k^2 + k + pc$ . Donde  $k$  es el número de factores y  $pc$  las repeticiones en el punto central (Dejaegher y Vander Heyden 2009).

Experiment	Factors	
	A	B
1	1	0
2	-1	0
3	0.5	0.866
4	-0.5	0.866
5	0.5	-0.866
6	-0.5	-0.866
7 etc.	0	0



**Figura 6. Diseño Doehlert para 2 factores (Dejaegher y Vander Heyden 2009).**

En este diseño se desarrollaron nueve ensayos para cada microorganismo descritos en el cuadro 6, con  $k=2$  y  $pc=3$ . Donde  $X1=$  humedad (%) y  $X2=$  pH.

**Cuadro 6. Ensayos de la matriz de Doehlert para las fermentaciones sólidas de residuos de mora.**

Tratamiento	Unidades codificadas		Unidades normalizadas	
	X1	X2	Humedad (%)	pH
1	1	0	80	5
2	-1	0	60	5
3	0,5	0,866	75	6,73
4	-0,5	-0,866	65	3,27
5	0,5	-0,866	75	3,27
6	-0,5	0,866	65	6,73
7	0	0	70	5
8	0	0	70	5
9	0	0	70	5

### 5.6.2 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico JMP® 7.0 (SAS Institut Inc., EUA) con el fin de determinar si existieron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las diferentes condiciones de humedad (%) y pH iniciales evaluadas para cada microorganismo, se realizó un análisis de superficie de respuesta utilizando la actividad enzimática como variable respuesta y evaluando los dos factores de porcentaje de humedad y pH para cada tiempo de fermentación.

Cuando no fue posible identificar el efecto sobre la actividad en cada una de los tiempos, se analizó la actividad de toda la fermentación para evaluar el efecto “global” de las condiciones ensayadas sobre la actividad enzimática mediante un análisis factorial de 3 factores, incluyendo el tiempo como factor, además de humedad (%) y pH.

## VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Caracterización química de los residuos

En el cuadro 7 se presentan los valores correspondientes al contenido de fibras en ambos tipos de residuos de mora.

**Cuadro 7. Caracterización de las fibras de los residuos de mora<sup>1</sup>**

ANÁLISIS	RESIDUO GRUESO	RESIDUO FINO
Lignina (%)	1,02 ± 0,2	nd
Celulosa (%)	64,87 ± 5,47	38,97 ± 2,18
Hemicelulosa (%)	9,16 ± 0,70	13,33 ± 0,54

<sup>1</sup> Datos expresados como promedio ± desviación estándar, n= 3; nd: no detectado

Como se observa en el cuadro 7, el principal componente en ambos residuos es la celulosa. La hemicelulosa se presenta en mayor porcentaje en el residuo fino y en ambos tipos de residuos el contenido de lignina es sumamente bajo, lo cual concuerda con la literatura donde se indica que generalmente la lignina es el componente que se encuentra en menor fracción en la biomasa, con valores generalizados que pueden variar entre el 10% y 25% dependiendo del material analizado (Shahzadi *et al.* 2014). Los residuos ricos en celulosa y hemicelulosa son utilizados para la producción de enzimas celulasas debido a que estos componentes funcionan como inductores de la actividad enzimática, algunos sustratos como paja de maíz con paja de trigo contienen cerca de 26% y 33% de celulosa y hemicelulosa respectivamente al inicio de la fermentación (Yang *et al.* 2001), valores que están por debajo de los encontrados en los residuos de este estudio, otros sustratos como el bagazo de caña puede contener hasta un 42 % de celulosa y valores cercanos al 20 % tanto de lignina como de hemicelulosa (Shahzadi *et al.* 2014), considerando el alto contenido de celulosa y hemicelulosa en los residuos de mora estos parecen ser un sustrato promisorio para la producción de enzimas celulasas por FMS.

En el cuadro 8 se presentan los resultados de la composición química de los dos tipos de residuos de mora utilizados.

**Cuadro 8. Caracterización físico-química del residuo obtenido del residuo de mora de la industria Protica, Cartago<sup>1</sup>**

ANALISIS	RESIDUO GRUESO	RESIDUO FINO
Humedad (%)	40,59 ± 0,35	80,37 ± 1,12
Ceniza (%)	0,82 ± 0,09	0,58 ± 0,04
Proteína (%) (N X 6.25)	4,31 ± 0,41	2,06 ± 0,09
Grasa (%)	9,05 ± 0,64	0,16 ± 0,01
Fibra dietética (%)	35,93 ± 1,41	9,24 ± 0,60
Carbohidratos totales (%)	44,37 ± 0,97	14,89 ± 0,95
Calorías (kcal / 100 g)	135,06 ± 8,66	38,11 ± 2,00
pH	3,03 ± 0,00	3,04 ± 0,04
° Brix	0,79 ± 0,01	6,92 ± 0,29
Almidón (%)	0,15 ± 0,05	0,21 ± 0,02
Fructosa (%)	0,19 ± 0,10	0,83 ± 0,11
Glucosa (%)	0,16 ± 0,11	0,79 ± 0,07
Sacarosa (%)	0,45 ± 0,04	0,04 ± 0,00

<sup>1</sup> Datos expresados como promedio ± desviación estándar, n=2

A pesar de ser residuos sólidos sometidos a procesos de extracción de pulpa y jugo durante el procesamiento industrial (Gancel *et al.* 2011), ambos subproductos conservan un gran contenido de humedad. Por lo tanto para desarrollar los procesos de fermentación de este estudio fue necesario secar uno de los residuos con el fin de lograr las humedades propuestas para el diseño experimental de fermentación. Otro de los componentes importantes es la presencia de proteína, la cual se convierte durante el proceso de crecimiento del hongo en una fuente valiosa de aminoácidos (Walker y White, 2005). Un dato interesante es el porcentaje de grasa presente en los residuos gruesos, considerablemente más alto que lo reportado para los residuos finos, la cual podría ser utilizado por ciertos microorganismos como una fuente alternativa de carbono (Walker y White, 2005).

Del total de los carbohidratos, la suma de los azúcares fructosa, glucosa y sacarosa corresponden tan solo a un 1,8 % para los residuos gruesos y un 3,7% para los residuos finos. Es importante destacar que tanto la glucosa como la fructosa se presentan en

cantidades similares en cada tipo de residuos, no así la sacarosa que se encuentra en mayor porcentaje en el residuo grueso respecto a los demás azúcares y por el contrario en el residuo fino está prácticamente ausente (cuadro 8). Estos valores son muy adecuados para los procesos fermentativos si se considera que los microorganismos consumen principalmente azúcares simples como fuente de carbono (Walker y White, 2005). No se han encontrado reportes previos que permitan comparar los valores obtenidos con otros tipos de residuos de moras, sin embargo se puede observar que gran parte de los componentes de la fruta se conservan y están disponibles en los subproductos. Un ejemplo son los azúcares, donde la fruta madura tiene 1,7 % de glucosa y un 1,5 % de fructosa (Cozzano 2007), lo que según los valores reportados en el cuadro 8 equivale a un 9,4 % de glucosa y 12,7 % de fructosa remanentes en el residuo fino y un 46,5 % y 55,3 % respectivamente en el grueso. Lo importante del contenido inicial de los azucares es que sirven como fuente primaria de alimento para el desarrollo del hongo durante la FMS

Otro componente importante que ha sido ampliamente documentado es el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de la mora (Gancel *et al.*, 2011). Un resumen de estos compuestos en los residuos de mora se detalla en la cuadro 9. En muchos casos estos compuestos son sintetizados por las plantas para utilizarlos como mecanismo de defensa contra fitopatógenos, que usan celulasas para lograr ingresar a las células vegetales (Ximenes *et al.* 2010).

**Cuadro 9. Caracterización del contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de los residuos de mora de la industria Protica, Cartago<sup>1</sup>**

ANÁLISIS	RESIDUO GRUESO	RESIDUO FINO
Polifenoles (mg ác. gálico / g muestra)	10,20 ± 1,66	8,68 ± 0,40
Conc. Antocianina HPLC (mg cianidin / g muestra)	0,54 ± 0,04	2,22 ± 0,07

<sup>1</sup> Datos expresados como promedio ± desviación estándar, n=2.

Los macro y micro elementos contenidos en el sustrato de fermentación son un punto importante para el buen crecimiento de los hongos y la producción de las enzimas celulósicas, en el cuadro 10 se indican los minerales contenidos en los residuos utilizados en este estudio.

**Cuadro 10. Contenido mineral de los residuos grueso y fino de mora<sup>1</sup>**

MINERAL	RESIDUO GRUESO	RESIDUO FINO
N (%)	1,27 ± 0,06	1,88 ± 0,09
P (%)	0,20 ± 0,01	0,09 ± 0,01
Ca (%)	0,21 ± 0,01	0,36 ± 0,02
Mg (%)	0,14 ± 0,01	0,08 ± 0,00
K (%)	0,25 ± 0,03	0,80 ± 0,02
S (%)	0,08 ± 0,01	0,14 ± 0,01
Fe (mg/kg)	17,00 ± 2,00	157,67 ± 42,00
Cu (mg/kg)	9,00 ± 1,00	12,67 ± 3,79
Zn (mg/kg)	15,33 ± 0,58	9,00 ± 0,00
Mn (mg/kg)	75,00 ± 5,57	67,33 ± 2,08
B (mg/kg)	4,33 ± 0,58	12,00 ± 0,00

<sup>1</sup> Datos expresados como promedio ± desviación estándar, n=2.

La suplementación con soluciones de sales es común en los estudios de fermentación sólida, principalmente en sustratos que funcionan únicamente como soporte para la producción enzimática (Roussos & Perraud-Gaime, 1996), una de las soluciones de sales comúnmente utilizadas es la de Mandels (Mandels y Weber 1969, Esterbauer *et al.* 2001, Szijártó *et al.* 2004, Singh Oberoi *et al.* 2010) que contiene dos fuentes de nitrógeno inorgánicas (urea y sulfato de amonio) y una orgánica (peptona), además  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  para la acción buffer, una fuente de calcio, magnesio, microelementos (sulfatos de hierro, manganeso y zinc además de cloruro de cobalto) y un surfactante.

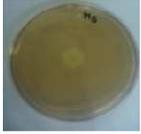
La composición mineral de los residuos de mora permite observar que este sustrato provee la mayoría de los componentes necesarios para el crecimiento de los hongos y la producción de enzimas (Walker y White, 2005), sin embargo la presencia de estos componentes en la matriz no asegura que los microorganismos puedan utilizarlos ya que no todos se encuentran de formas disponibles (Kavanagh 2005). Uno de los elementos

más importantes relacionados a la producción enzimática es el nitrógeno, el cual se puede adicionar al medio de forma inorgánica, orgánica, en las formas presentadas por Mandels y Weber (1969) o aprovechar el que se encuentra presente en el sustrato. La fuente de la que proviene este nutriente, determina en gran parte la producción de celulasas demostrándose que cuando se suplementa con nitrógeno orgánico se obtiene una mayor producción de enzimas (Kim *et al.* 2014); por lo tanto es importante evaluar si es necesaria la adición de una fuente orgánica de nitrógeno para que se dé la producción de enzimas. Dato que también concuerda con lo reportado por Sun *et al.* (2010) quienes obtuvieron mayores valores de actividad celulasa al adicionar distintas fuentes de nitrógeno a sus fermentaciones de residuos de manzana, aumentado de 4,2 (U/gramo de materia seca) en el control sin adición de nitrógeno a 6,7 (U/gramo de materia seca) al adicionar peptona y 7,6 (U/gramo de materia seca) al suplementar con residuos de maíz.

## 6.2 Identificación de microorganismos

Los residuos de mora sometidos a un primer tratamiento con caldo infusión cerebro corazón (tratamiento 1 y 2 del cuadro 4) no permitieron el aislamiento de hongos. El total de microflora aislada a partir de estos tratamientos estaba compuesta por levaduras y algunas bacterias, las cuales no son consideradas en este estudio para la producción de enzimas celulósicas. Por otra parte a partir de los residuos que se colocaron directamente en un frasco de incubación sin adición de caldo cerebro corazón (tratamiento 3) si se lograron aislar 5 tipos de hongos de los cuales se detalla su capacidad celulolítica en el cuadro 11.

**Cuadro 11. Diámetro del halo (mm) de 5 hongos aislados de residuos de mora y un control positivo (C+) después de incubación por 48 h a 30 °C sobre agar CMC<sup>1</sup>**

MICROORGANISMO	DIÁMETRO DEL HALO (mm)
 (C+) <i>Trichoderma</i>	20,5 ± 3,5
 <i>Penicillium sp*</i>	14,5 ± 0,7
 Cepa A**	6,0 ± 1,4
 Cepa B**	9,0 ± 0
 Cepa C**	4,0 ± 0
 Cepa D**	4,0 ± 0

<sup>1</sup> Datos expresados como promedio ± desviación estándar, n=2. \* cepa aislada e identificada, \*\* cepas sin identificar

En este caso se obtuvieron muestras con crecimiento en 3 de los 10 frascos que se incubaron inicialmente, todos correspondieron a muestras de residuos finos. Posiblemente los hongos encontrados en el residuo prefieren para su desarrollo un ambiente con menor humedad, además estos microorganismos pueden no necesariamente encontrarse en el sustrato, sino que pueden ser esporas que se encontraban en el ambiente o en los recipientes de almacenamiento de los subproductos en la planta procesadora, que al encontrar condiciones favorables para crecer iniciaron el proceso de desarrollo del hongo y por esto fue posible encontrarlos en la porción de sustrato analizada. Este comportamiento de crecimiento de distintos microorganismos según el tratamiento utilizado para el crecimiento puede deberse a que los hongos requieren de algunas condiciones que permitan su crecimiento, como un pH de neutro a ácido, un buen ambiente oxigenado y un sustrato que permita la elongación de las hifas (Kavanagh 2005).

La capacidad celulolítica sobre agar CMC fue determinada por la formación de halos de hidrólisis, en todos los casos el diámetro del halo corresponde a la medida en milímetros (mm) de la zona clara menos el diámetro de la zona de crecimiento de micelio del microorganismo. En las 6 cepas analizadas (5 aisladas del subproducto mas el control) se obtuvieron halos de hidrólisis, siendo la cepa control la de mayor tamaño, seguida de la muestra que se envió a análisis para la respectiva identificación, de la cual se concluyó que se trataba de un representante del género *Penicillium*.

En las publicaciones de Bhat (2000) y Singhanian *et al* (2010) se mencionan varios estudios en los que se ha utilizado este género como productor de enzimas celulasas así como a *Trichoderma*, además el hallazgo de *Penicillium* como microorganismo capaz de producir enzimas hidrolíticas celulasas concuerda con los estudios de Kim *et al* (2014) en los que utilizaron cepas de este género en la producción de estas enzimas. Dentro de las ventajas de la producción de celulasas por este género se mencionan que especies como *P. funiculosum* son capaces de secretar enzimas con un mejor balance entre actividades  $\beta$ -glucosidasa y endo y exoglucanasa que las enzimas encontradas comercialmente (Castro *et al.*, 2010), *P. citrinum* produce enzimas tolerantes a pH básicos y además son termotolerantes (Dutta *et al.*, 2008), con estas características se ve

favorecida la degradación total del material celulósico, por lo tanto es posible obtener un mayor rendimiento al aprovechar mas el sustrato de fermentación, además podría contribuir en el mejoramiento del proceso industrial en el cual se use la enzima al permitir por ejemplo trabajar a temperaturas más altas o pH menos ácidos.

### 6.3 Evaluación del efecto del pH y la humedad iniciales del sustrato, sobre la producción de celulasas de *Penicillium sp* y *Trichoderma sp*.

A continuación se detallan los resultados obtenidos a partir del diseño para la evaluación de la producción de enzimas celulasas utilizando *Penicillium sp* y *Trichoderma sp* sobre residuos de mora. El efecto del pH y humedad inicial del sustrato fue estudiado utilizando como variable de respuesta la actividad enzimática (endo y exo glucanasa). Se evaluaron 7 tratamientos, con tres repeticiones en el punto central del diseño para un total de 9 ensayos. En el cuadro 12 se presentan las actividades enzimáticas endoglucanasas para *Penicillium* según las combinaciones de porcentaje de humedad y pH estudiados para cada tiempo de fermentación.

**Cuadro 12. Actividad enzimática endoglucanasa (Cx) para *Penicillium* según diferentes tratamientos.**

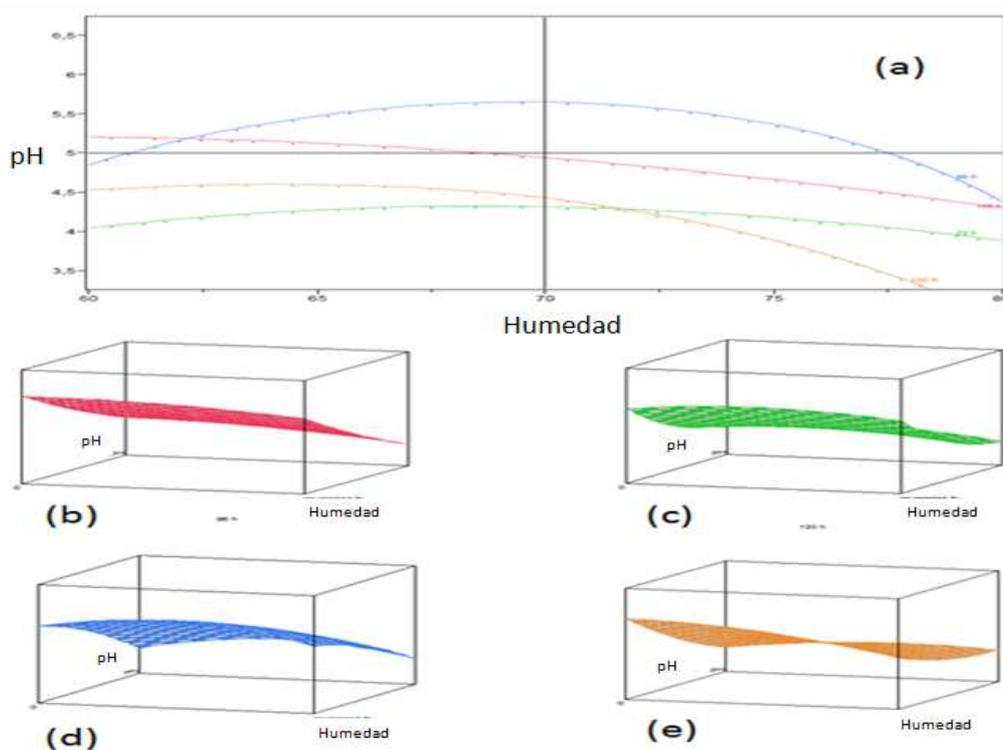
Tratamiento	Humedad (%)	pH	Actividad endoglucanasa (UI/mg de proteína)*			
			48 h	72 h	96 h	120 h
1	80	5	0,30	0,27	0,49	0,59
2	60	5	0,72	0,31	0,48	0,67
3	75	6,73	0,05	0,12	0,16	0,33
4	65	3,27	1,18	1,01	0,99	1,74
5	75	3,27	1,17	0,94	0,84	1,11
6	65	6,73	0,11	0,23	0,23	0,45
7	70	5	0,67	0,41	0,69	0,85
8	70	5	0,55	0,44	0,58	0,89
9	70	5	0,53	0,40	0,83	0,71

\*La actividad UI se refiere a nano moles de glucosa liberados por minuto por miligramo de proteína

La actividad enzimática registrada es muy baja comparada con otros autores, por ejemplo Camassola y Dillon (2007) obtuvieron una actividad de 200 U/g de materia seca para *Penicillium echinulatum* sobre bagaso de caña y salvado de trigo como sustrato fermentando a 28 °C y con humedad del 67 % y Latifian *et al* (2007) reportó una actividad para *T. reesei* sobre salvados de arroz de 1,1635 U/g (U equivale a  $\mu$ moles de glucosa liberada por minuto), utilizando pH de 5, humedad de 70 % y temperatura de 30 °C.

Las mayores actividades se encontraron para los tratamientos 4 y 5 para todos los tiempos de fermentación.

En la Fig 7 se muestra la superficie de respuesta de la actividad enzimática endoglucanasa de *Penicillium sp* para cada uno de los tiempos de fermentación en los que se realizó la toma de muestras. En todos los casos se observa una buena concordancia con los valores experimentales y predichos para la actividad enzimática, donde la distribución de los residuos es aleatoria (Anexo 3) y los valores de los parámetros de validación del diseño son: 48h ( $p < 0,005$ ;  $R^2=0,98$ ; P-lof  $>0,15$ ), 72h ( $p < 0,005$ ;  $R^2=0,99$ ; P-lof  $\geq 0,11$ ), 96h ( $p \leq 0,005$ ;  $R^2=0,94$ ; P-lof  $>0,15$ ) y 120 h ( $p \leq 0,005$ ;  $R^2=0,93$ ; P-lof  $\geq 0,11$ )

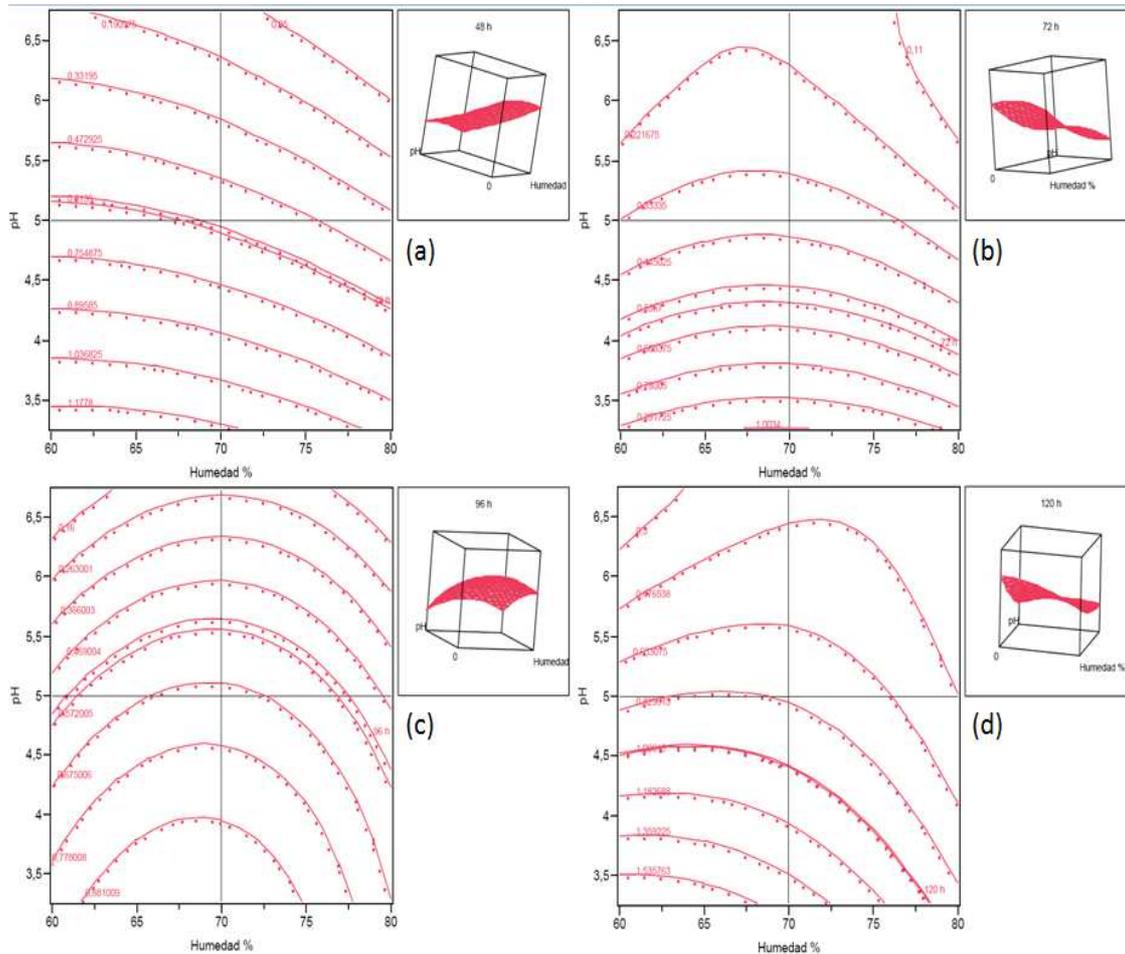


**Figura 7. Curva de respuestas (a) y superficie de respuesta de la actividad enzimática endoglucanasa de *Penicillium* para los diferentes tiempos de muestreo, (b) 48 h, (c) 72 h, (d) 96 h y (e) 120 h.**

En este análisis no fue posible encontrar una asociación entre los resultados obtenidos y los tratamientos estudiados que permita indicar que alguna de las combinaciones de

porcentaje de humedad y pH es significativamente diferente y que favorezca la actividad enzimática endoglucanasa por parte de *Penicillium sp.*

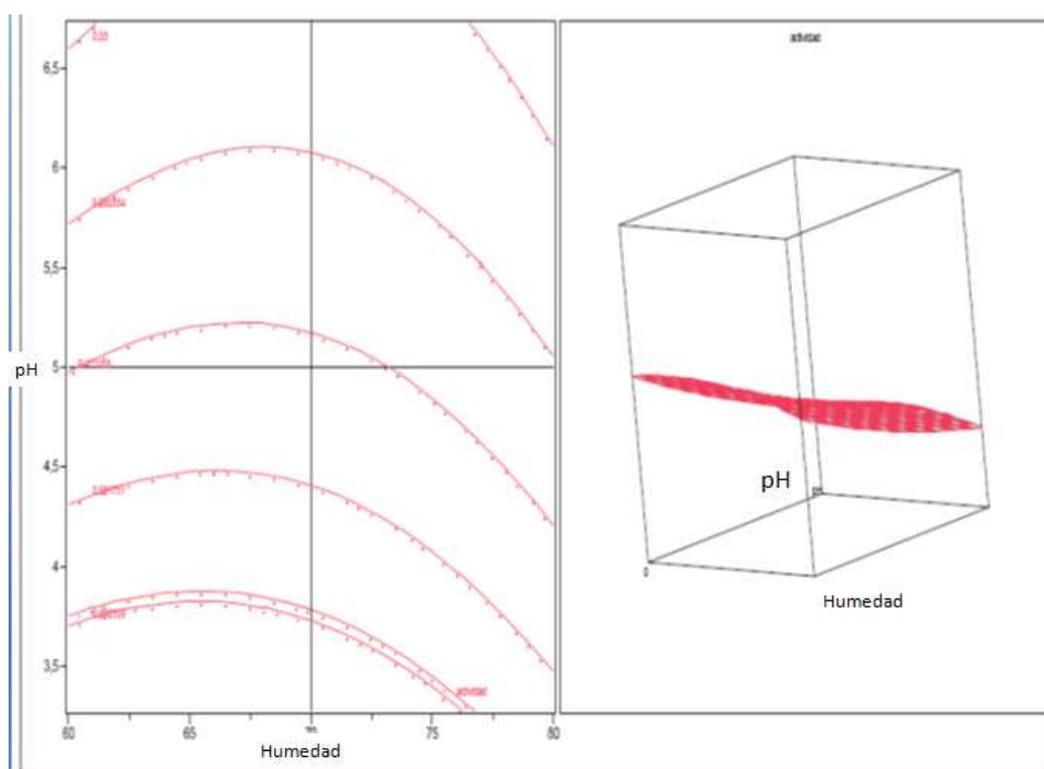
En la figura 8 se detallan las curvas de isorespuesta y su superficie de respuesta para la actividad enzimática para cada uno de los tiempos de muestreo durante la fermentación.



**Figura 8** Curvas de isorespuesta y superficies de respuesta de la actividad enzimática endoglucanasa de *Penicillium sp* para los diferentes tiempos de muestreo, (a) 48 h, (b) 72 h, (c) 96 h y (d) 120 h.

Como se observa en la figura 8, las gráficas de (a), (b) y (d) presentan un punto de silla como punto crítico, este punto es un punto de inflexión entre un máximo relativo y un mínimo relativo, por lo cual para este estudio no se considera al no permitir encontrar

una respuesta máxima óptima de la actividad enzimática con los parámetros de pH y porcentaje de humedad ensayados. En el caso de la figura 8 (c) se observa un punto máximo fuera de la región experimental utilizada en el estudio, por lo tanto sería necesario desplazar esta región para encontrar el valor óptimo de actividad endoglucanasa de *Penicillium sp* según el análisis a las 96 h de fermentación. El detalle del análisis global de la actividad enzimática para *Penicillium sp*, se observa en la Figura 9.

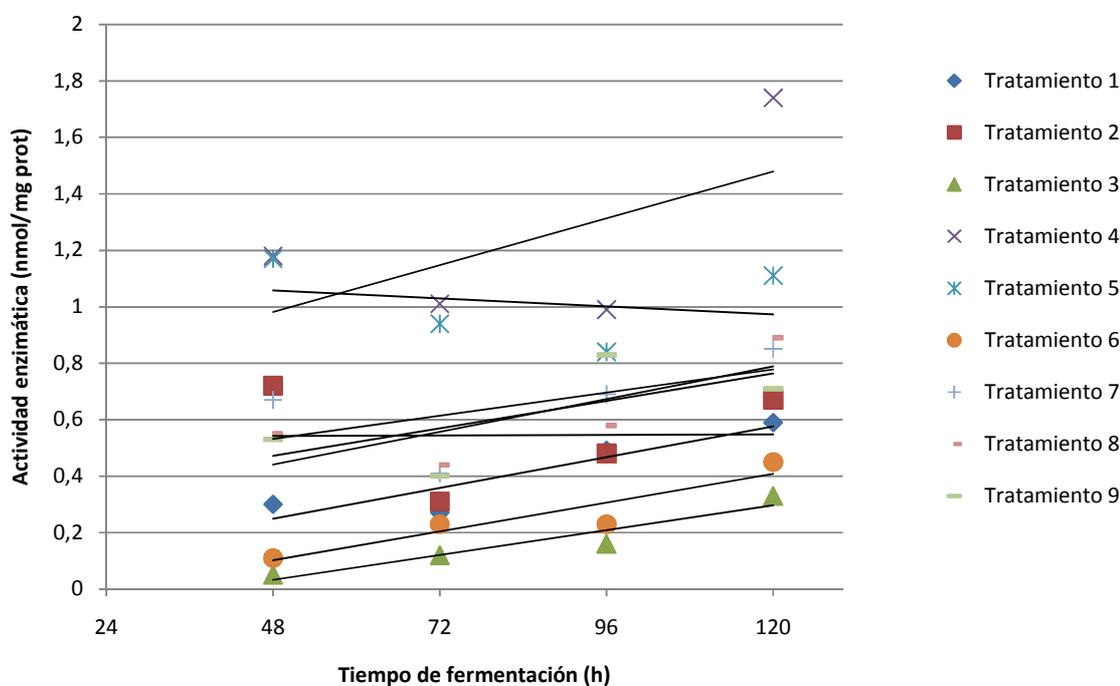


**Figura 9** Curvas de isorespuestas y superficie de respuesta para un análisis factorial con 3 factores sobre la respuesta de actividad enzimática Cx de *Penicillium sp*.

Este análisis también presenta un punto de silla como superficie de respuesta ( $p < 0,05$ ;  $R^2 = 0,90$ ;  $P\text{-lof} \geq 0,05$ ; distribución aleatorio de los residuales) lo que confirma que no es posible determinar que alguno de los tratamientos ensayados muestre un máximo en la actividad endoglucanasa para *Penicillium sp*; se puede indicar según lo que se

observa en la figura de las curvas de isorespuesta, que el posible valor máximo para la actividad enzimática se encuentra fuera de los valores utilizados en el ensayo con humedad (%) y pH menores a los ensayados.

A pesar de que no es posible de manera concluyente confirmar un máximo para la actividad dentro del rango de valores utilizados para el estudio, si se puede indicar que según el análisis hay un efecto sobre la actividad enzimática relacionada a cada uno de los tres factores incluidos en este diseño ( $p < 0,05$ ;  $R^2=0,90$ ;  $P\text{-lof} \geq 0,05$ ; distribución aleatorio de los residuales). Una forma gráfica de notar estos efectos se resume en la Figura 10.



**Figura 10. Comportamientos de la actividad endoglucanasa de *Penicillium* para los diferentes tiempos de muestreo durante la fermentación sobre subproductos de mora.**

En este gráfico se observa que hay una al aumentar el tiempo de fermentación sobre el aumento de la actividad enzimática en la mayoría de los tratamientos, por otra parte los tratamientos 4 y 5, con los valores de pH más bajos, también presentan valores más altos de actividad enzimática. Respecto a la humedad no es posible

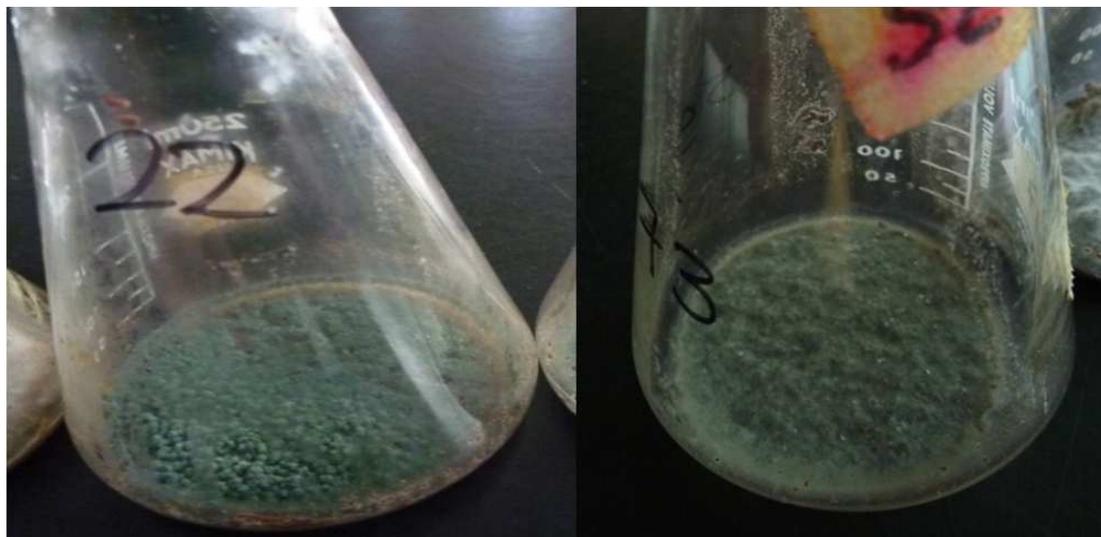
determinar con claridad, al analizar el gráfico, cuál es la posible significancia que indica el modelo.

La actividad exoglucanasa de *Penicillium* no fue posible analizarla debido a que los valores obtenidos son sumamente bajos, menores a 0,006 nmol/mg de proteína. Ocurrió lo mismo con las endoglucanasas y exoglucanasas de *Trichoderma* en la cuales no es posible reportar ningún valor de actividad (datos no mostrados).

Tanto las actividades endo y exoglucanasa para *Penicillium* son muy bajas comparadas con las reportadas por otros autores (Camassola y Dillon 2007; Kim *et al.* 2014; Singh *et al.* 2009) ya que en este estudio se reporta la actividad como nano mol/mg de proteína y no como  $\mu\text{mol}$ /unidad de medida; esto indica que los valores obtenidos están unas 1000 veces por debajo de los reportes de estos autores. Las posibles causas de estos registros (tanto para *Penicillium sp* como para *Trichoderma sp*) se podrían explicar si se considera la naturaleza del sustrato de fermentación empleado, el cual puede ser un inhibidor de la actividad enzimática (Kang *et al.* 2004).

Iniciando con la humedad, este es uno de los factores determinante en la FMS la cual tienen un efecto significativo en el crecimiento microbiano, germinación de esporas, biosíntesis y la producción de metabolitos que son secretados al medio (Mamma *et al.* 2008, Cen y Xia 2009). El modelo estadístico para el análisis “global” de los datos indica que el rango de humedad que podría favorecer la producción enzimática, se encuentra a valores más bajos de las utilizadas en el estudio. Díaz (2009) indica que los altos niveles de humedad en la FMS provocan la disminución de la porosidad del sustrato y por lo tanto la difusión de los nutrientes. Además puede provocar un impedimento estérico debido al excesivo crecimiento del hongo, lo cual se traduce en una reducción de la porosidad del sustrato, dificultando así la transferencia de los gases dentro de la matriz (Sun *et al.* 2010); esta reducción de la porosidad incrementa la resistencia a la transferencia de masas del oxígeno y dióxido de carbono aumentando la posibilidad de contaminación en el medio (Cen y Xia 2009). Dentro del rango de humedad utilizado en este estudio, ambos hongos fueron capaces de crecer en el medio durante todo el tiempo de fermentación (Fig. 11) con lo que a nivel macro

podría indicarse que no se presentó un efecto sobre el crecimiento y desarrollo del hongo producto de la humedad pero si es un posible factor que afecta la actividad enzimática.



**Figura 11. Crecimiento a las 72 h de los hongos *Penicillium* (izquierda) y *Trichoderma* (derecha) sobre residuos de mora.**

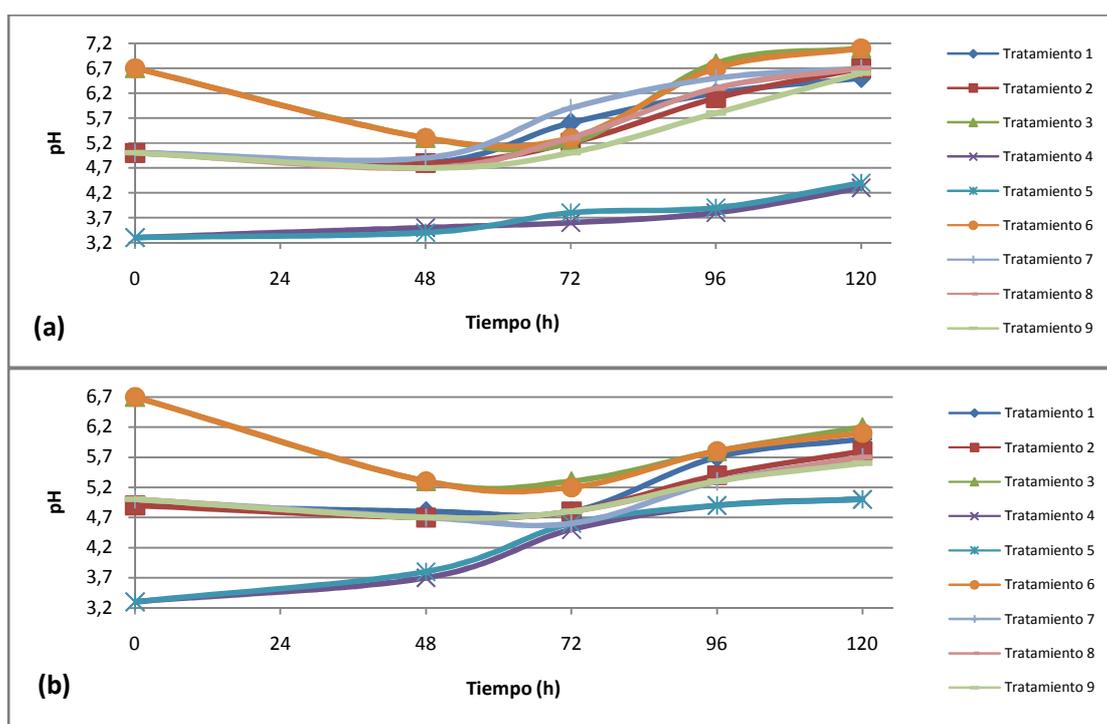
Otra razón para considerar sobre el efecto del sustrato en la síntesis de las enzimas es que los monosacáridos (como la glucosa y fructosa) pueden inhibir significativamente la producción de celulasas, en el estudio de Díaz (2009) se inhibió por completo la actividad enzimática celulasa de *Aspergillus awamori* sobre orujo de uva por la concentración inicial de azúcares reductores (1,00 mmol/g sustrato seco) en un sustrato al compuesto al 100 % por este residuo. Sun *et al.* (2010) comprobaron el mismo efecto de inhibición al adicionar diferentes fuentes de azúcar al sustrato, en este estudio la adición de glucosa disminuyó un 19,0 % la actividad enzimática de *Trichoderma sp* respecto al control, sobre residuos de manzana. Este efecto de inhibición podría explicarse ya que las altas concentraciones de monosacáridos pueden disminuir la movilidad del agua libre (sitio donde ocurre la actividad enzimática) y afectar la hidrólisis del sustrato (Hsieh *et al.* 2014). Los residuos de mora (en proporción 1:1) utilizados en este estudio, presentan concentraciones significativamente más altas de azúcares reductores ( $13,18 \pm 0,58$  g/L) que los que presenta la cascarilla de arroz (0,40

$\pm 0,02$  g/L), uno de los sustratos comúnmente usados para procesos de FMS, esta concentración de azúcares encontrados en los residuos de mora son muy altos si se considera que concentraciones de entre 0,2 a 0,4 g/L pueden inhibir hasta en un 50% la actividad  $\beta$ -glucosidasa de *T. reesei* (Ximenes *et al.* 2010). La alta concentración de glucosa, hace que los hongos no necesiten hidrolizar el sustrato en busca de fuentes de carbono, lo cual también apoya el hecho que estas concentraciones de azúcares en el medio inhiban la síntesis de enzimas, lo que también podría explicar en parte los valores tan bajos de actividad durante la fermentación. Díaz (2009) también sugiere que en caso de existir algo de síntesis de las enzimas en estudio, la concentración de azúcares reductores producidos podría ser tan baja, comparada con la presente en el extracto, que no se pudiera medir, en este caso la actividad se vería incluida como parte de la incertidumbre asociada al método de medición.

Un tercer factor que podría estar involucrado en la baja actividad enzimática de *Penicillium* y *Trichoderma* sobre residuos de mora, es la concentración de polifenoles en los residuos (Cuadro 11). En el estudio de Ximenes *et al.* (2010) se analizaron distintas enzimas comerciales en presencia de compuestos fenólicos, los autores comprobaron que la presencia de estos compuestos es un fuerte inhibidor para las celulasas y que puede afectar tanto la producción enzimática por parte de los microorganismos, como la propia actividad de la enzima sobre un sustrato específico, afectando a celulasas, hemicelulasas y  $\beta$ -glucosidasas.

### 6.3.1 Otros parámetros asociados a la FMS sobre residuos de mora

Durante la fermentación de ambos microorganismos estudiados se midió el pH en el extracto obtenido (Fig. 12 a y b).

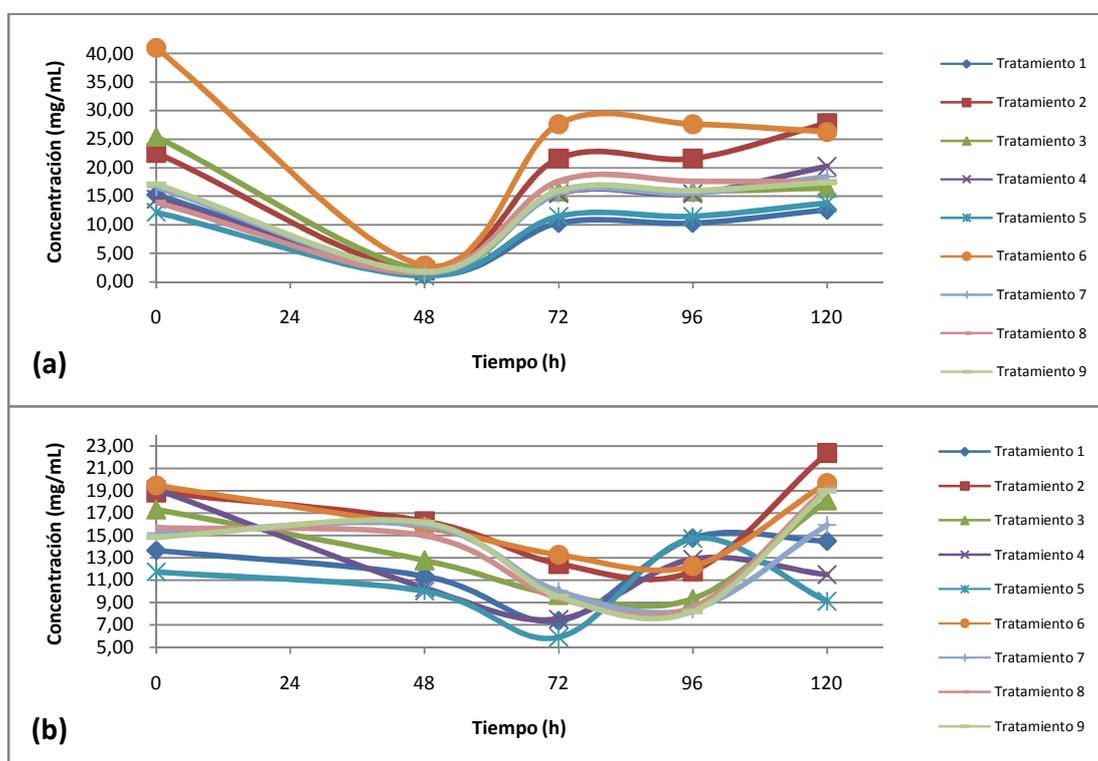


**Figura 12. Comportamiento del pH durante la fermentación generadas por *Penicillium* (a) y *Trichoderma* (b) sobre residuos de mora**

Se observa que los tratamientos que tienen un pH inicial más alto, mostraron una disminución cerca de las 48 h de fermentación hasta un valor cercano a 5 en ambos microorganismos, lo cual podría estar asociado a la acidificación del medio producto del crecimiento del hongo. Después de las 48 h los tratamientos con pH inicial de 5 y de 6,7 presentaron un aumento hasta las 120 h de fermentación, esto puede darse por el consumo de los ácidos orgánicos presentes en el sustrato con lo cual se eleva el pH (Díaz 2009). El aumento paulatino del pH también ocurre en los tratamientos con el pH inicial más bajo (tratamientos 4 y 5), en este caso se observa un incremento menos

considerable para *Penicillium* a partir de las 72 h (Fig. 12 a), posiblemente al haber sido aislado de la mora está más adaptado a este pH, principalmente porque los residuos cuando ocurrió el aislamiento presentaron un pH aproximado de 3.

Por último, la concentración de proteína también se determinó para ambos microorganismos durante el tiempo de fermentación sobre residuos de mora. En la Figura 13 (a y b) se describe el comportamiento de este valor para los dos microorganismos estudiados.



**Figura 13. Concentración de proteína durante la fermentación de *Penicillium sp* (a) y *Trichoderma sp* (b) sobre residuos de mora.**

En el caso de *Penicillium sp*, se observa una clara disminución de la concentración de proteína a las 48 h. Esto puede relacionarse con el hecho de que durante las primeras 48 h el microorganismo se encuentra en la fase de crecimiento y puede degradar el contenido de proteína en el medio con el fin de obtener moléculas como péptidos y

nitrógeno necesarios para el desarrollo (Kavanag 2005), posteriormente inicia la colonización del sustrato y el crecimiento de las hifas, con lo cual también aumenta el contenido de proteína que resulta un indicador de la biomasa presente en el sustrato (Rainbault 1998, Michell *et al.* 1991). Este parámetro también es un indicador de las enzimas que se producen, sin embargo en este estudio no puede relacionarse el contenido de proteína y la actividad enzimática, debido a la baja o ausente actividad encontrada. En el caso de *Trichoderma sp.*, se observa una disminución más lenta de la concentración de proteína en el medio con valores menores a las 72 y 96 h de fermentación que a las 120 h (Fig. 12 b), este comportamiento tardío de *Trichoderma* podría estar relacionado al hecho que los residuos de mora no son el mejor sustrato para el desarrollo de este género de hongo, por el contrario *Penicillium* al ser aislado de los residuos requiere de un menor tiempo de para asimilar el medio.

## VII CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las conclusiones más destacadas de este proyecto son las siguientes:

1. Los residuos de mora se perfilan como un sustrato apto para los procesos de fermentación sólida ya que su composición química indica que cuentan con una serie de compuestos importantes para el desarrollo de los microorganismos y la inducción de la actividad enzimática celulasa.
2. El aislamiento de los hongos con capacidad celulósica se vio favorecido al utilizar el sustrato sin adicionar un caldo de cultivo durante la etapa de incubación. Los hongos aislados de los residuos presentaron algún grado de actividad enzimática sobre placa con CMC.
3. La síntesis de enzimas está inhibida en el sustrato de residuos de mora, por lo tanto debe considerarse la presencia de inhibidores que puedan afectar la síntesis enzimática y su actividad, por ejemplo el contenido de azúcares iniciales y la presencia de polifenoles.
4. No fue posible determinar si existe una diferencia entre los tratamientos utilizados en el estudio que permitiera obtener un máximo de producción de celulasa para *Penicillium* y *Trichoderma*, este último vio inhibida en su totalidad la actividad enzimática.

Las principales recomendaciones a partir de los resultados obtenidos son:

1. Realizar pruebas adicionales que permitan la eliminación de los inhibidores del sustrato, por ejemplo lavados de los residuos, y evaluar el efecto que este tratamiento pueda tener sobre la actividad enzimática, además la optimización de la adición de soluciones que provea los macro y micro elementos que propician la actividad celulasa.
2. Determinar la especie del *Penicillium* aislado de los residuos de mora con el fin de caracterizar mejor los tratamientos y llevarlos a cabo de una manera más específica para el microorganismo.
3. Evaluar la variación del rango de trabajo utilizado en este estudio para las variables de humedad y pH debido a que según el modelo estadístico el posible óptimo de actividad se encuentra cerca de las humedades y pH más bajos utilizados en el estudio.
4. Evaluar otros parámetros asociados a la producción de enzimas como el tamaño de inóculo y de partícula del sustrato, además de otros parámetros muy importantes como las distintas fuentes de azúcar y nitrógeno.

## **VIII INSTITUCIONES INTERESADAS Y FINANCIAMIENTO**

Este trabajo final de graduación cuenta con el apoyo financiero y tecnológico del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), ya que se realiza dentro del marco del proyecto “Desarrollo de productos que generen valor agregado a partir de cultivos frutícolas sub utilizados en América Latina”; el cual se encuentra ante la Vicerrectoría de Investigación bajo el número 735-A5-521.

## **IX CONFIDENCIALIDAD DEL TRABAJO DE GRADUACIÓN**

Este trabajo final de graduación se considera de carácter público.

## X LITERATURA CITADA

- Acosta-Montoya, O., F. Vaillant, S. Cozzano, C. Mertz, A. Pérez & M. Castro. 2010. Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus . adenotrichus* Schltldl.) during three edible maturity stages. Food Chemistry. 119: 1497-1501
- Adrio, J & L. Demain. 2003. Fungal biotechnology. Int Microbiol. 6: 191–199.
- Aguilar, C., G. Gutiérrez-Sánchez, P. Arado-Barragán & R. Rodríguez-Herrera. 2008. Perspectives of Solid State Fermentation for production of food enzymes. Am. J. Biochem. & Biotech. 4: 354-366.
- Ang, S., E. Shaza, Y. Adibah, A. Suraini & M. Madihah. 2013. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. Proc. Biochem. 48: 1293-1302.
- Balasundram, N., K. Sundram & S. Samman. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chem. 99: 191–203
- Basso, T., C. Gallo & L. Basso. 2010. Actividad celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana de acucar e madeira em decomposição. Pesq. Agropec. Bras. 45(11):1282-1289.
- Berradre, M., M. Mejías, J. Ferrer, C. Chandler, G. Páez, Z. Mármol, E. Ramones & V. Fernández. 2009. Fermentación en estado sólido del desecho generado en la industria vinícola. Rev. Fac. Agron. 26: 398-422.
- Bhat, M.K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnol. Adv. 18: 355–383.
- Brijwani, K., HS, Oberoi & PV. Vadlani. 2010. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. Proc. Biochem. 45: 120-128.

- Camassola, M & A. Dillon. 2007. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 103: 2196–2204.
- Castro, AM., M. Carvalho, S. Leite & N. Pereira .2010. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37:151-158.
- Castro, J. & M. Cerdas. 2005. Mora (*Rubus spp.*). Cultivo y Manejo poscosecha. MAG-UCR-CNP. (Consultado 16 abril 2011, [www.mag.go.cr/biblioteca\\_virtual\\_ciencia/manual\\_mora\\_indice.html](http://www.mag.go.cr/biblioteca_virtual_ciencia/manual_mora_indice.html)).
- Cen, P & L. Xia. 2009. Production of Cellulase by Solid-State Fermentation. In T. Scheper (Ed). *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (69-92). New York. Springer.
- Chahal D.S. 1985. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Appl. Env. Microbiol.* 49:205-210.
- Chand, K., R. Salwan, H. Dhar, S. Dutt & A. Gulati. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. *Curr Microbiol.* 57:503–507.
- Chander Kuhad, R., R. Gupta & A. Singh. 2011. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research Article ID 280696*, 10 pages. doi:10.4061/2011/280696
- CITA. 2006. Determinación pH. Emisión N° 1. P-SA-Q-012, 981.12 AOAC. CITA, Laboratorio de Química. San José.
- Corkidi, G., L. Serrano-Carreón & E. 2008. Análisis digital de imágenes para la caracterización microscópica de parámetros críticos en la producción fermentativa de metabolitos secundarios. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 1: 75-93.

- Costa, M., M. Torres, H. Magariños, & A. Reyes. 2010. Producción y purificación parcial de enzimas hidrolíticas de *Aspergillus ficuum* en fermentación sólida sobre residuos agroindustriales. *Rev. Col. Biot.* 12: 163-175
- Cozzano, S. 2007. Impacto del proceso de microfiltración tangencial sobre el valor de la mora (*Rubus spp*) como alimento funcional. Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
- Dave, B., A. Sudhir, M. Pansuriya, D. Raykundaliya & R. Subramanian 2012. Utilization of *Jatropha* deoiled seed cake for production of cellulases under solid-state fermentation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 35:1343-1353.
- de Vries, R. & J. Viser. 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol.* 65: 497-552.
- Díaz, A. 2009. Reciclado del orujo de uva como medio sólido de fermentación para la producción de enzimas hidrolíticas de interés industrial [versión electrónica]. España: Universidad de Cádiz. Recuperada el 09 de octubre de 2014 de: [http://rodin.uca.es/xmlui/bitstream/handle/10498/15774/Tes\\_2010\\_03.pdf?sequence=1](http://rodin.uca.es/xmlui/bitstream/handle/10498/15774/Tes_2010_03.pdf?sequence=1)
- Díaz, A., I. Caro, I. Ory & A. Blandino. 2007. Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolitic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace. *Enzyme Microb. Technol.* 41: 302-306
- Folakemi, O., P. Jilani & S. Ibiyemi. 2008. Cellulase Production by some Fungi Cultured on Pineapple Waste. *Nature and Science*, 6: 1545-0740.
- García, D., A. Vilorio-Matos, D. Belén & M. Moreno-Álvarez. 2003. Características físico-químicas y composición de ácidos grasos del aceite crudo extraído de residuos de mora (*Rubus glaucus Benth*). *Grasas y Aceites.* 54: 259-263.
- González, M. 2012. Comunicación personal. Modificación de la formulación del agar suero de naranja. 24 de enero de 2012.

- Escudero, J., Z. Daza, N. Gil & O. Mora. 2013. Evaluación de las enzimas celulolíticas producidas por hongos nativos mediante fermentación en estado sólido (SSF) utilizando residuos de cosecha de caña de azúcar. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 1: 108-117.
- Esterobauer, H., W. Steiner, I. Labudova, A. Hermann & M. Hayn. 1991. Production of *Trichoderma cellulase* en laboratory and pilot scale. *Bioresource Technology.* 36: 51-65.
- Gamarra, N., G.K. Villena & M. Gutiérrez-Correa. 2010. Cellulase production by *Aspergillus niger* in biofilm, solid-state, and submerged fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol.* 87(2):545-551.
- Gancel A., A. Feneuil, O. Acosta, A. Pérez & F. Vaillant. 2011. Impact of industrial processing and storage on major polyphenols and the antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus*). *Food Res. Inter.* 44: 2243-2251
- Gautam, S., P. Bundela, A. Pandey, M. Awasthi & S. Sarsaiya, 2010. Screening of cellulolytic fungi for management of municipal solid waste. *Appl. Sci. Envir. Sanit.* 5: 391-395.
- Hernández-Santoyo, A., E. García-Hernández & A. Rodríguez-Romero. 1999. Celulosomas: sistemas multienzimáticos. *Revista de la Sociedad Química de México.* 43: 137-142.
- Hölker, U., M. Höfer & J. Lenz. 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 175–186.
- Hsieh, C., D. Cannella, H. Jørgensen, C. Felby & L. Thygesen. 2014. Cellulase inhibition by high concentrations of monosaccharides. *J. Agric. Food Chem.* 62: 3800-3805.

- Juha'sz, T., Z. Szengyel, K. Re'czey, M. Siika-Aho & L. Viikari. 2005. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Proc. Bioch.* 40: 3519–3525.
- Kang, S.W., Y.S. Park, J.S. Lee, S.I. Hong & S.W. Kim. 2004. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 91, 153–156.
- Kavanagh, K. 2005. Fungal Fermentation Systems and Products. In K. Kavanagh (Ed). *Fungi Biology and Applications* (89-112). England. John Wiley & Sons Ltd.
- Kazunari, I., T. Kawase, H. Sammoto, K. Gomi, M. Kariyama, & T. Miyake. 2011. Uniform culture in solid-state fermentation with fungi and its efficient enzyme production. *J. of Biosc. and Bioeng.* 111: 300-305.
- Kim, D., E. Cho, J. Kim, Y. Lee & H. Chung. 2014. Production of cellulases by *Penicillium* sp. in a solid-state fermentation of oil palm empty fruit bunch. *African J. of Biotechn.* 13: 145-155.
- Krisch, J., L. Galgóczy, T. Papp & C. Vágvölgyi. 2009. Antimicrobial and antioxidant potential of waste products remaining after juice pressin. *Jour. of Engin.* 3: 131-134.
- Latifian, M., Z. Hamidi-Esfahani & M. Barzegar. 2007. Evaluation of culture conditions for cellulase production by two *Trichoderma reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. *Bioresource Technology* 98: 3634–3637.
- Lowry, O., N. Rosebrough, A. Farr & R. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275
- Lynd, L., P. Weimer, W. Zyl & I. Pretorius. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microb. Molec. Biol. Rev.* 66: 506–577.
- Mandels, M & Weber, J. 1969. Production of cellulases. *Adv. Chem. Ser.* 95: 391-414.

- Mamma, D., E. Kourtoglou & P. Christakopoulos, 2008. Fungal multienzyme production on industrial byproducts of the citrus-processing industry. *Bioresour. Technol.* 99: 2373-2383.
- Martínez-Anaya, C., E. Balcázar-López, E. Dantán-González & J.L. Folch-Mallol. 2008. Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 50: 119-131.
- Maurya, D., D. Singh, D. Pratap & J. Maurya. 2012. Optimization of solid state fermentation conditions for the production of cellulase by *Trichoderma reesei*. *J. Environ. Biol.* 33, 5-8.
- Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31(3): 426-428.
- Mitchell, D., E. Gumbira-Sa'id, P. Greenfield, & H. Doelle. 1991. Protein measurement in solid-state fermentation. *Biotechnology Techniques.* 5. 437-442.
- Murillo, C. & R. Arias. 2005. Estudio de la oferta y la demanda de bienes y servicios basados en recursos biológicos nacionales. Centro Internacional de Política Económica para el Desarrollo Sostenible (CINPE) de la Universidad Nacional. Costa Rica.
- Narra, M., D. Garima, D. Jyoti, M. Madamwar & S. Amita. 2012. Production of cellulases by solid state fermentation with *Aspergillus terreus* and enzymatic hydrolysis of mild alkali-treated rice straw. *Bioresour. Technol.* 121: 355–361.
- Nidetzky, B., W. Steiner, M. Hayn & M. Claeysens. 1994. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. *Biochem. J.* 298: 705-710.
- NSF. 2008. Breaking the Chemical and Engineering Barriers to Lignocellulosic Biofuels: Next Generation Hydrocarbon Biorefineries. Editado por George W. Huber, en Washington D.C., 180 p.

- Pandey, A., P. Selvakumar & P. Nigamp. 1999. Solid state fermentation for the products of industrial enzymes. *Curr. Sci.* 77: 149-162.
- Papagianni, M., S. Nokes & K. Filer. 2001. Submerged and solid-state phytase fermentation by *Aspergillus niger*: effects of agitation and medium viscosity on phytase production, fungal morphology and inoculum performance. *Food Tech. Biot.* 39: 319–326.
- Paredes Medina, D., M. Álvarez Núñez, M. Silva Ordoñez. 2010. Obtención de enzimas celulasas por fermentación sólida de hongos para ser utilizadas en el proceso de obtención de bioalcohol de residuos del cultivo de banano. *Rev. Tecn. ESPOL.* 23: 81-88.
- Percival Zhang, Y., E. Michael Himmel & J. Mielenz. 2006. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotech. Advan.* 24: 452–481.
- Pereira Andrade, J., A. da Rocha Bispo, P. Santos Marbach & R. Pires do Nascimento. 2011. Production and Partial Characterization of Cellulases from *Trichoderma* sp. IS-05 Isolated from Sandy Coastal Plains of Northeast Brazil. *Enz. Res.* Article ID 167248, 7 pages. doi:10.4061/2011/167248.
- Pérez-Guerra, N., A. Torrado-Agrasar, C. López-Macias & L. Pastrana. 2003. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* 2: 343-350.
- Ponce, T & O. Pérez. 2002. Celulasas y xilanasas en la industria. *Avance y Perspectiva* 2: 273-277.
- Raghavarao, K., T. Ranganathan & N. Karanth. 2003. Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochem. Engin. J.* 13: 127–135.
- Raimbault, M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *J. of Biotech.* 1: 1-8

- Raimbault, M. & D. Alazard. 1980. Culture method to study fungal growth in solid state fermentation. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechn.* 9: 199-209.
- Robertson, J.B. & Van Soest, P.J., 1981. The detergent system of analysis. En: James, W.P.T., Theander, O. (Eds.), *The Analysis of Dietary Fibre in Food*. Marcel Dekker, NY, Chapter 9, pp. 123–158
- Rodriguez, I & Y. Piñeros. 2007. Producción de complejos enzimáticos celulíticos mediante el cultivo en fase sólida *Trichoderma* sp. sobre los racimos vacíos de palma de aceite como sustrato. *Revista de la facultad de Química Farmacéutica*. 14: 35-42.
- Rodríguez, S. & M. Sanromán. 2006. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. *J. of Food Engin.* 76: 291–302.
- Roussos, S & I. Perraud-Gaime. 1996. Fisiología y bioquímica de microorganismos utilizados en procesos de fermentación en medio sólido, p. 341-348. In E. Galindo (Ed). *Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería*. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A. C. México.
- Rubin. E. 2008. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*. 454: 841-845.
- Seiboth, B., S. Hakola, R. Mach, P.L. Suominen & C.P. Kubicek. 1997. Role of four major cellulases in triggering of cellulase gene expression by cellulose in *Trichoderma reesei*. *J. Bacteriol.* 179(17): 5318–5320.
- Shahzadi, T., Z. Anwar, Z. Iqbal, A. Anjum, T. Aqil, B. Arroha Afzal, M. Kamran, S. Mehmood & M. Irshad. 2014. Production of exoglucanase, and  $\beta$ -glucosidase from fungal co-culture of *T. viride* and *G. lucidum*. *Adv. in Biosc. and Biotech.* 5: 426-433
- Shiahmorteza, M., R. Yazdanparast & M. Zolnorian. 2003. Cellulase production by *Trichoderma reesei* (CBS383.73) and an isolated *Botrytis* strain using several agricultural wastes. *Iranian Int. J. Sci.* 4: 13-22.

- Singh Dhillona, G., H. Singh Oberoia, S. Kaurb, S. Bansald & S. Kaur Brarb. 2011. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. *Ind. Crops and Prod.* 34: 1160-1167.
- Singh Dhillona, G., S. Kaura, S. Bansald, S. Kaur Brarb & M. Vermac. 2012. Potential of apple pomace as a solid substrate for fungal cellulase and hemicellulase bioproduction through solid-state fermentation. *Ind. Crops and Prod.* 38: 6-13.
- Singh Nigam, P. 2013. Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications. *Biomolecules.* 3: 597–611.
- Singh Oberoi, H., Y. Chavan, S. Bansal & G. Singh Dhillon. 2010. Production of Cellulases through Solid State Fermentation Using Kinnow Pulp as a Major Substrate. *Food Bioproc. Techn.* 3:528-536.
- Singh, R., A. Varma, R. Seeta Laxman & Mala Rao. 2009. Hydrolysis of cellulose derived from steam exploded bagasse by *Penicillium* cellulases: Comparison with commercial cellulase. *Bioresource Technology* 100: 6679–6681.
- Singhania, R., A. Kumar Patel, C. Soccol & A. Pandeya. 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem. Engin. J.* 44: 13-18.
- Singhania, R., R. Sukumaran, A. Kumar, C. Larroche & A. Pandey. 2010. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology* 46: 541–549.
- Strik, B., Ch. Finn, J. Clark, & P. Bañados. 2007. Worldwide Production of Blackberries. *Hortechology.* 17(2): 205-213.
- Suesca, A. 2012. Producción de enzimas celulolíticas a partir de cultivos de *Trichoderma* sp. con biomasa lignocelulósica [versión electrónica] Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Recuperado el 15 de mayo de 2014 de: <http://www.bdigital.unal.edu.co/7843/1/300054.2012.pdf>

- Sukumaran, R., R. Singhanian & A. Pandey. 2005. Microbial cellulases-Production, applications and challenges. *J. Sci. Ind. Res.* 64: 832-834.
- Sun, H., X. Ge, Z. Hao & M. Peng. 2010. Cellulase production by *Trichoderma* sp. on apple pomace under solid state fermentation. *Afr. J. Biotechnol.* 9(2):163-166.
- Szijártó, N., Z. Faiggl, K. Réczey, M. Mezős, & A. Bersényi. 2004. Cellulase fermentation on a novel substrate (waste cardboard) and subsequent utilization of home-produced cellulase and commercial amylase in a rabbit feeding trial. *Ind. Crop and Prod.* 20: 49-57.
- Valkonen, M., M. Penttilä & M. Benčina. 2014. Intracellular pH responses in the industrially important fungus *Trichoderma reesei*. *Fungal Genet. Biol.* 70: 86-93.
- Viniegra-González, G., E. Favela-Torres, C. Aguilar, S. Romero-Gomez, G. Díaz-Godínez & C. Augur. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem. Engin. J.* 13: 157–167.
- Wada, M., I. Masakazu & K. Tokuyasu. 2010. Enzymatic hydrolysis of cellulose I is greatly accelerated via its conversion to the cellulose II hydrate form. *Polym. Degrad. Stab.* 95: 543-548.
- Walker, G & N. White. 2005. Introduction to Fungal Physiology. *In* K. Kavanagh (Ed). *Fungi Biology and Applications* (1-34). England. John Wiley & Sons Ltd.
- Wan Yoon, L., T. Nam Ang, G. Cheng Ngoh & A. May Chua. 2014. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. *Biomass and bioenergy.* 67: 319-338.
- Weber, J & F. Agblevor. 2010. Microbubble fermentation of *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Process Biochem.* 40: 669–676.
- Ximenes, E., Y. Kim, N. Mosier, B. Dien & M. Ladisch. 2010. Inhibition of cellulases by phenols. *Enzyme and Microbial Technology.* 46: 170–176.

Yang, X., H. Chen, H. Gao & Z. Li. 2001. Bioconversion of corn straw coupling ensiling and solid-state fermentation. *Bioresouce Techn.* 78: 277-250.

#### REFERENCIAS DE INTERNET

Alvarado, A. 2002. Mora (*Rubus*). No.19. (Consultado 34 abril 2011, [www.cnp.go.cr/php\\_mysql/admin/KTML/uploads/files/boletines/mora\\_junio\\_2002.pdf](http://www.cnp.go.cr/php_mysql/admin/KTML/uploads/files/boletines/mora_junio_2002.pdf))

Arias, C. 2008. PROCOMER: Perfil producto mora. (Consultado 26 abril 2011, [www.procomer.com/contenido/informaci%C3%B3n-de-mercados-y-sectores-.html](http://www.procomer.com/contenido/informaci%C3%B3n-de-mercados-y-sectores-.html))

CUC (Centre for Underutilised Crops). sf. Andean blackberry (*Rubus* spp). PAVUC Fact Sheet No. 3. (Consultado 18 diciembre 2010, [www.pavuc.soton.ac.uk/fruits/fruits.../Factsheet\\_3\\_rubus\\_final\\_3006.pdf](http://www.pavuc.soton.ac.uk/fruits/fruits.../Factsheet_3_rubus_final_3006.pdf))

Dejaegher, B & Y. Vander Heyden. 2009. Response surface designs. Part 1 - types and properties. LCGC Europe. (Consultado 18 junio 2011, <http://www.chromatographyonline.com/response-surface-designs-part-1-types-and-properties>)

Liu, Y.S., Y. Luo, J.O. Baker, Y. Zeng, M.E. Himmel, S. Smithc & S.Y. Ding. 2009. Single molecule study of cellulase hydrolysis of crystalline cellulose. Conference Paper. NREL/CP-270-47301. (Consultado 12 febrero 2011, [www.nrel.gov/docs/fy10osti/47301.pdf](http://www.nrel.gov/docs/fy10osti/47301.pdf))

Mora, F. 2007. Situación del mercado de la mora. N.2. (Consultado 26 marzo 2011, [www.cnp.go.cr/php\\_mysql/admin/KTML/uploads/files/boletines/bol-2-mora-Ag-2007.pdf](http://www.cnp.go.cr/php_mysql/admin/KTML/uploads/files/boletines/bol-2-mora-Ag-2007.pdf))

## XI ANEXOS

### Anexo 1. Referencias de métodos químicos y bromatológicos para la caracterización de los residuos de mora.

Análisis de minerales.

N	por combustión seca en Autoanalizador de acuerdo a documento CIA-SC09-01-01-P06
P, Ca, Mg, K, S, Na, Fe, Cu, Zn, Mn, B y Al	por digestión húmeda con HNO <sub>3</sub> y determinación por Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma (ICP) de acuerdo a CIA-SC09-01-01-P10.)

Análisis químicos y bromatológicos

Humedad (%)	De acuerdo a 964.22 AOAC 2005, P-SA-MQ-002
Ceniza (%)	De acuerdo a 925.51 AOAC 2005, P-SA-MQ-004
Proteína (%) (N X 6.25)	De acuerdo a 979.29 AOAC 2005, P-SA-MQ-003
Grasa (%)	De acuerdo a Carpenter <i>et al</i> , 1993, P-SA-MQ-005
Fibra dietética (%)	De acuerdo a 958.29 AOAC 2005, P-SA-MQ-007
Carbohidratos totales (%)	Por diferencia 100-%H-%C-%P-%G
Carbohidratos disp. (%)	%CH TOTALES-%FIBRA DIETETICA
Valor energético (kcal / 100 g)	Kcal/100g x 4,189 (4 x %CH DISP+4 x %P+9 x %G)
Valor energético por grasa (kcal / 100 g)	Kcal por grasa/100g x 4,189 (9 x %G)
pH	981.12 AOAC 2005. P-SA-MQ-012
° Brix	932.12 AOAC 1990

Almidón	Método enzimático. P-SA-MQ-018
Acidez (%) (expresada como ác. Málico)	942.15 AOAC 2005, P-SA-MQ-011
Polifenoles (mg ác. gálico / g muestra)	Método espectrofotométrico P-SA-MQ-036
ORAC (ug trolox equivalente / g muestra)	Método Espectrofluorométrico, P-SA-MQ-037
Conc. Antocianina HPLC (mg cianidin / g muestra)	HPLC, Columna C18, Detector de arreglo de Diodos
Conc. ácido elágico HPLC (mg ácido elágico / g muestra)	
Fructosa (%)	HPLC, Columna Supelcosil NH2, P-SA-MQ-006
Glucosa (%)	
Sacarosa (%)	

## Anexo 2. Curvas de calibración

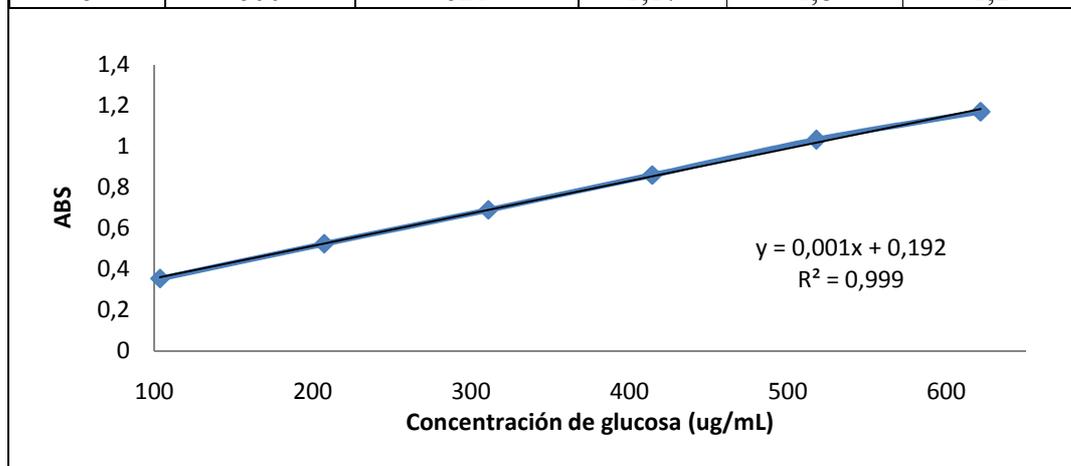
Curva de calibración para la actividad endoglucanasa (Cx)

$$UI = ((Do \text{ muestra} - Do \text{ testigo})(\mu\text{g/mL}) \times \mu\text{mol} \times 0,5 \text{ mL}) / (F \times 180 \mu\text{g} \times 60 \text{ min})$$

$$\text{Actividad} = UI (\mu\text{mol/min}) / \text{mg de proteína}$$

F: factor de la curva de glucosa

Patrón	Concentración teórica en disolución de 0,1 % de glucosa (ug/mL)	Concentración real en disolución de 0,1 % de glucosa (ug/mL)	ABS	volumen del patrón (mL)	Volumen de agua mL
1	100	104	0,353	0,3	2,7
2	200	207	0,523	0,6	2,4
3	300	311	0,689	0,9	2,1
4	400	414	0,859	1,2	1,8
5	500	518	1,032	1,5	1,5
6	600	621	1,17	1,8	1,2



Límite de detección: 0,0266

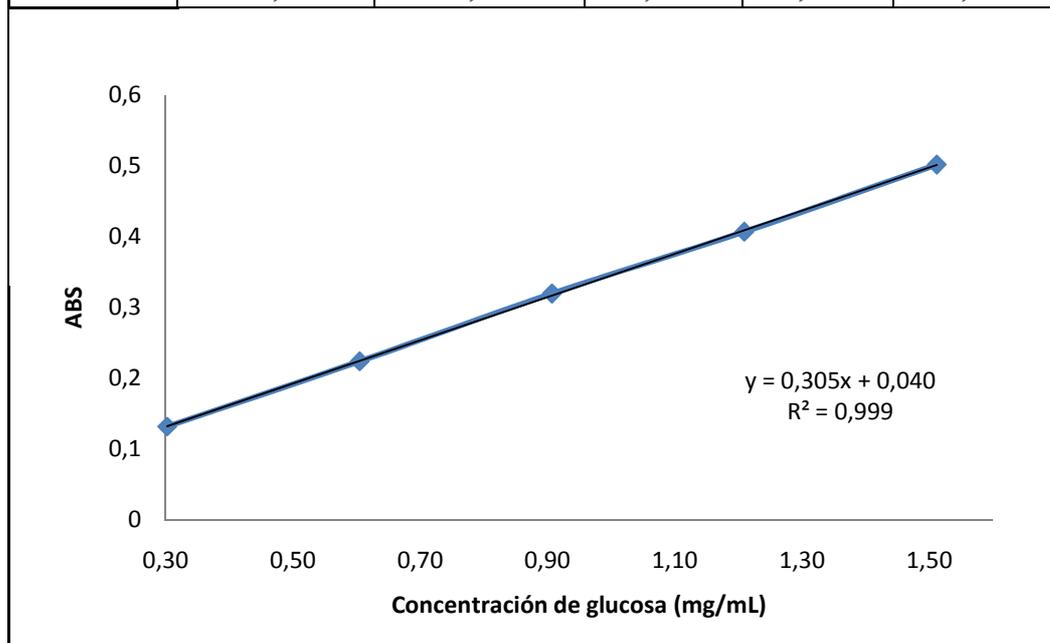
Límite de cuantificación: 0,0360

Curva de calibración para la actividad exoglucanasa (C1)

$$\text{Actividad (UI/mg)} = (\text{Do muestra} - \text{Do blanco}) \times 6 / (\text{F} \times 180 \times 60 \times \text{mg proteína})$$

F= factor de la curva patrón de glucosa

Patrón	Concentración teórica en disolución de 4 mg/mL de glucosa	Concentración real en disolución de 4 mg/mL de glucosa	ABS	volumen del patrón (mL)	Volumen de agua mL
1	0,3	0,30	0,132	0,225	2,775
2	0,6	0,60	0,224	0,450	2,550
3	0,9	0,91	0,320	0,675	2,325
4	1,2	1,21	0,407	0,900	2,100
5	1,5	1,51	0,502	1,125	1,875



Límite de detección: 0,0287

Límite de cuantificación: 0,0495

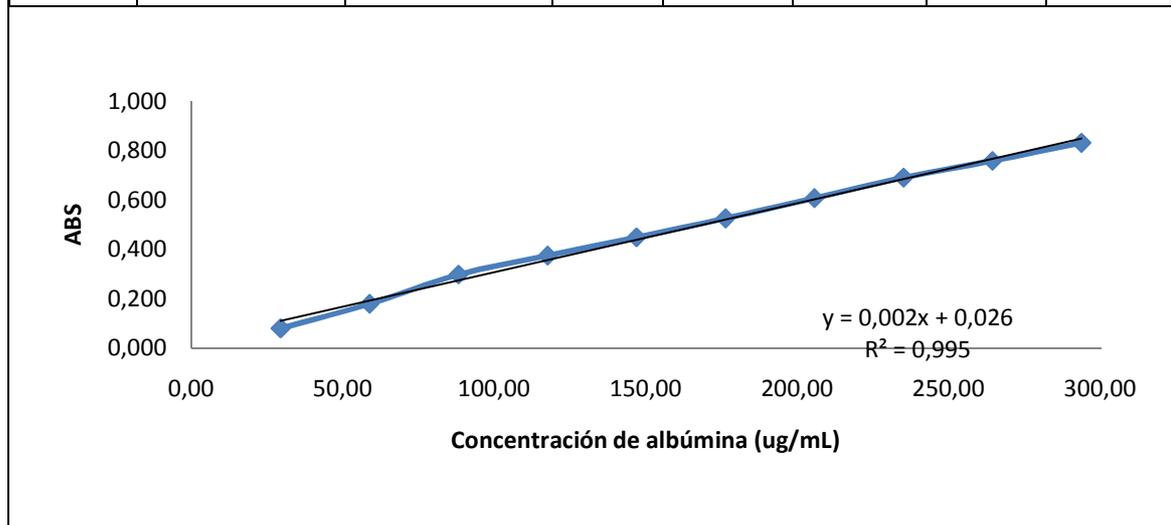
Curva de calibración de proteína

$$Cn \text{ proteína (mg/mL)} = ((Do \text{ muestra} - Do \text{ blanco}) / m) * Fd * (1 \text{ mg}/1000 \text{ ug})$$

m= pendiente de la curva de calibración (mL/ug)

Fd= Factor de dilución de la muestra (5 mL/1 mL)

Patrón	Concentración teórica en disolución (300 ug/mL)	Concentración real en disolución de albumina (ug/mL)	ABS 1	ABS 2	Promedio ABS	volumen del patrón (uL)	Volumen de agua (uL)
1	30	29,38	0,0804	0,0793	0,0799	100	900
2	60	58,75	0,1748	0,1821	0,1785	200	800
3	90	88,13	0,3237	0,2714	0,2976	300	700
4	120	117,50	0,3881	0,3599	0,3740	400	600
5	150	146,88	0,4539	0,4438	0,4489	500	500
6	180	176,26	0,5299	0,5203	0,5251	600	400
7	210	205,63	0,6079	0,6069	0,6074	700	300
8	240	235,01	0,6986	0,6829	0,6908	800	200
9	270	264,38	0,757	0,7609	0,7590	900	100
10	300	293,76	0,8293	0,8336	0,8315	1000	0

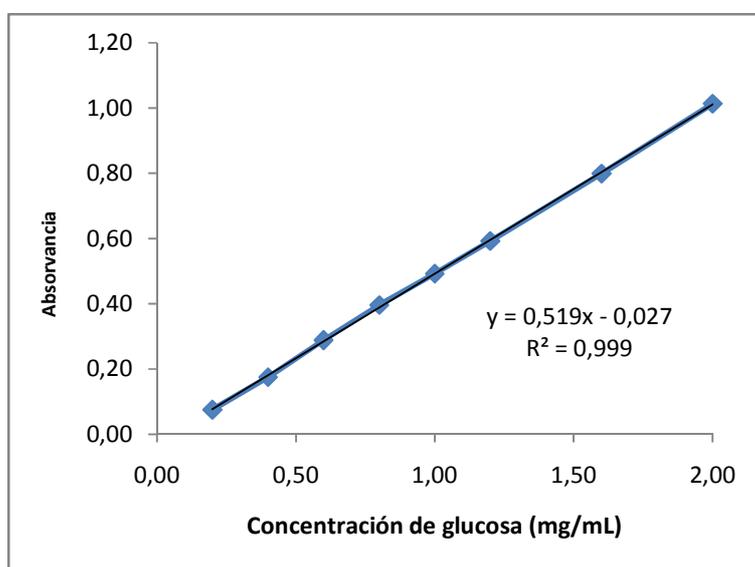


Límite de detección: 0,0628

Límite de cuantificación: 0,0873

Curva de calibración de azúcares reductores

Patrón	Concentración teórica de glucosa (mg/mL)	Concentración real en disolución de glucosa (mg/mL)	ABS promedio
1	0,20	0,11	0,07
2	0,40	0,31	0,18
3	0,60	0,53	0,29
4	0,80	0,74	0,40
5	1,00	0,93	0,49
6	1,20	1,12	0,59
7	1,60	1,52	0,80
8	2,00	1,94	1,01



Límite de detección: 0,0438

Límite de cuantificación: 0,1459

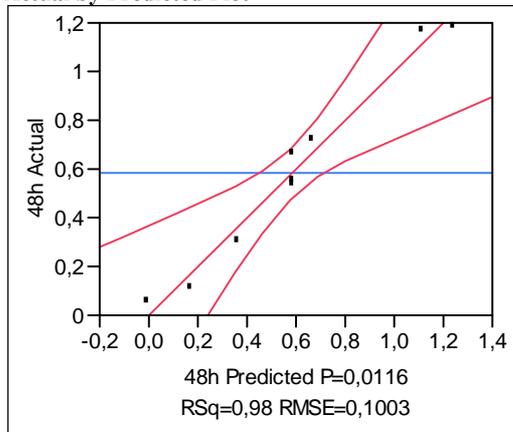
### Anexo 3. Análisis de superficies de respuesta.

Análisis de la actividad endoglucanasa (Cx) de *Penicillium sp* sobre residuos de mora.

1. Tiempo: 48h

**Response 48h**

**Actual by Predicted Plot**



**Analysis of Variance**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	5	1,2802255	0,256045	25,4566
Error	3	0,0301743	0,010058	<b>Prob &gt; F</b>
C. Total	8	1,3103998		0,0116

**Lack Of Fit**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	1	0,01993652	0,019937	3,8947
Pure Error	2	0,01023774	0,005119	<b>Prob &gt; F</b>
Total Error	3	0,03017426		0,1872
				<b>Max RSq</b>
				0,9922

**Response Surface**

Coef	humedad	pH	48h
humedad	-0,000711	-0,001339	-0,015045
pH	.	0,020851	-0,315792

**Solution**

Variable	Critical Value
humedad	52,800063
pH	12,020184

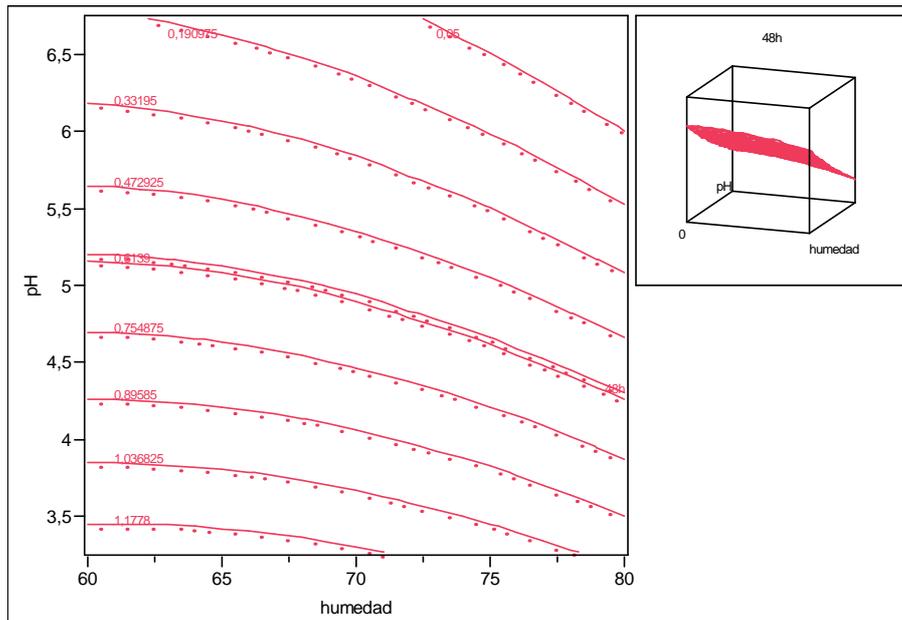
Solution is a SaddlePoint

Critical values outside data range

Predicted Value at Solution -0,395318

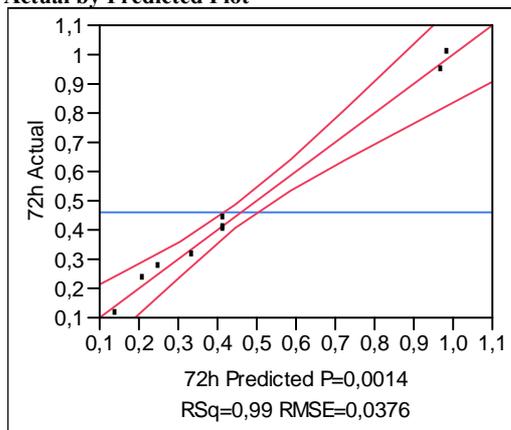
**Contour Profiler**

Horiz	Vert	Factor	Current X	Response	Contour	Current Y	Lo Limit	Hi Limit
⊙	⊙	humedad	70	48h	0,6	0,5837567	.	.
⊙	⊙	pH	5					



## 2. Tiempo: 72h

**Response 72h**  
**Actual by Predicted Plot**



### Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	5	0,76606779	0,153214	108,1907
Error	3	0,00424843	0,001416	<b>Prob &gt; F</b>
C. Total	8	0,77031621		0,0014

### Lack Of Fit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	1	0,00332244	0,003322	7,1759
Pure Error	2	0,00092599	0,000463	<b>Prob &gt; F</b>
Total Error	3	0,00424843		0,1157
				<b>Max RSq</b>
				0,9988

**Response Surface**

Coef	humedad	pH	72h
humedad	-0,001224	-0,001517	-0,004369
pH	.	0,063819	-0,23198

**Solution**

Variable	Critical Value
humedad	67,111311
pH	6,783143

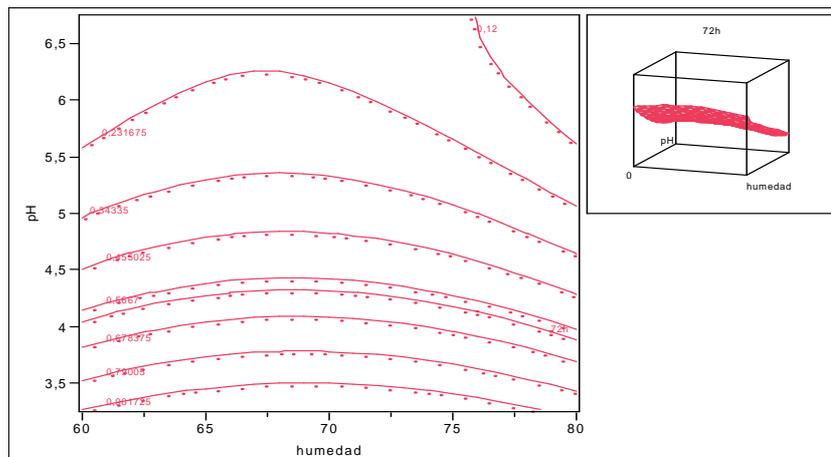
Solution is a SaddlePoint

Critical values outside data range

Predicted Value at Solution  
0,2145866

**Contour Profiler**

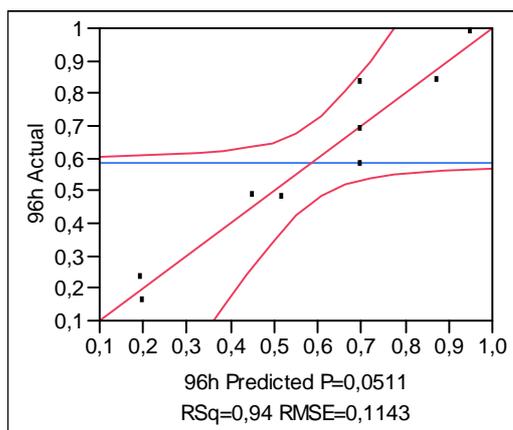
Horiz	Vert	Factor	Current X			
⊗	○	humedad	70			
○	⊗	pH	5			
		Response	Contour	Current Y	Lo Limit	Hi Limit
		72h	0,6	0,4151033	.	.



3. Tiempo: 96h

**Response 96h**

**Actual by Predicted Plot**



#### Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	5	0,57889788	0,115780	8,8645
Error	3	0,03918329	0,013061	<b>Prob &gt; F</b>
C. Total	8	0,61808117		0,0511

#### Lack Of Fit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	1	0,00850062	0,008501	0,5541
Pure Error	2	0,03068268	0,015341	<b>Prob &gt; F</b>
Total Error	3	0,03918329		0,5342
				<b>Max RSq</b>
				0,9504

#### Response Surface

Coef	humedad	pH	96h
humedad	-0,002156	0,0022572	-0,003408
pH	.	-0,030055	-0,206546

#### Solution

Variable	Critical Value
humedad	67,359226
pH	1,464732

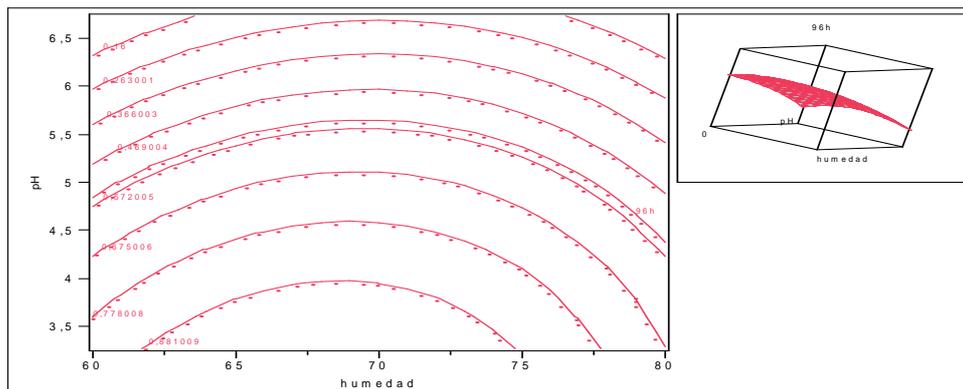
Solution is a Maximum

Critical values outside data range

Predicted Value at Solution 1,0685247

#### Contour Profiler

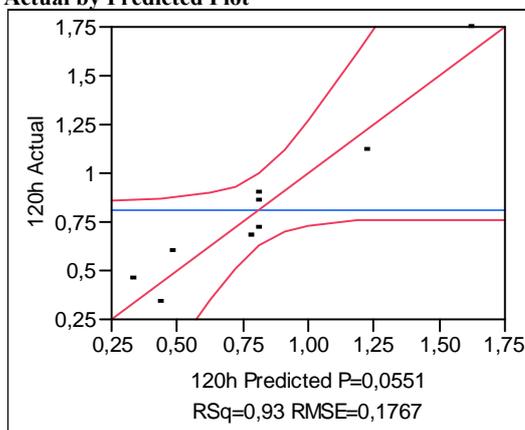
Horiz	Vert	Factor	Current X	Response	Contour	Current Y	Lo Limit	Hi Limit
⊙	⊙	humedad	70	96h	0,55	0,6989267	.	.
⊙	⊙	pH	5					



#### 4. Tiempo: 120h

##### Response 120h

##### Actual by Predicted Plot



##### Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	5	1,3098352	0,261967	8,3882
Error	3	0,0936918	0,031231	<b>Prob &gt; F</b>
C. Total	8	1,4035270		0,0551

##### Lack Of Fit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	1	0,07501109	0,075011	8,0309
Pure Error	2	0,01868067	0,009340	<b>Prob &gt; F</b>
Total Error	3	0,09369176		0,1052
				<b>Max RSq</b>
				0,9867

##### Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	3,3674314	0,765329	4,40	0,0218
humedad	-0,015019	0,010203	-1,47	0,2374
pH	-0,300142	0,051076	-5,88	0,0098
(humedad-70)*(humedad-70)	-0,001843	0,001613	-1,14	0,3363
(humedad-70)*(pH-5)	0,014526	0,010215	1,42	0,2502

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
(pH-5)*(pH-5)	0,0455833	0,040427	1,13	0,3415

**Response Surface**

Coef	humedad	pH	120h
humedad	-0,001843	0,014526	-0,015019
pH	.	0,0455833	-0,300142

**Solution**

Variable	Critical Value
humedad	75,467816
pH	7,421019

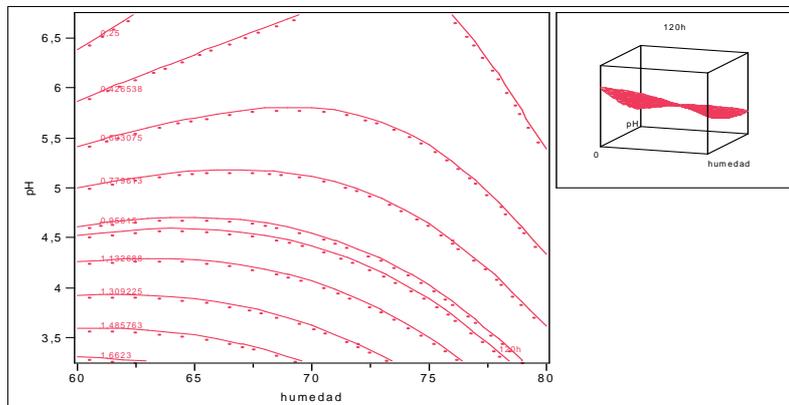
Solution is a SaddlePoint

Critical values outside data range

Predicted Value at Solution 0,4110327

**Contour Profiler**

HorizVert Factor	Current X	Response	Contour	Current Y	Lo Limit	Hi Limit
⊗	○ humedad			70		
○	⊗ pH			5		
—		120h	1	0,8154167	.	.

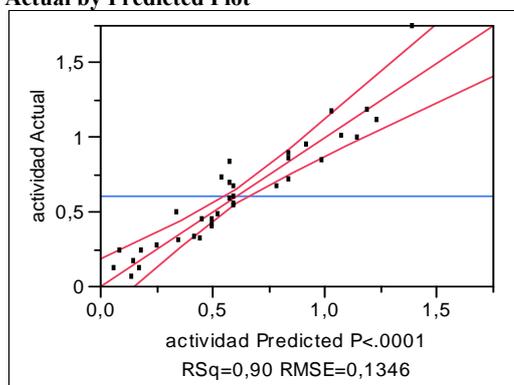


5. Análisis global (con 3 factores)

**Response actividad**

**Whole Model**

**Actual by Predicted Plot**



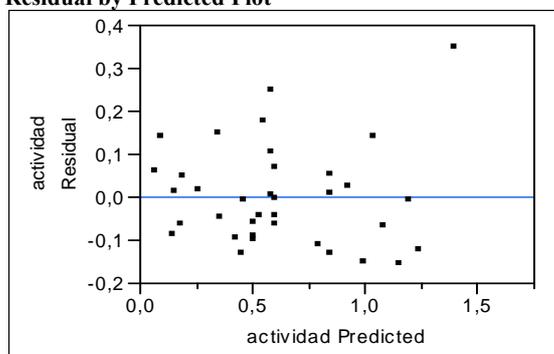
**Analysis of Variance**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	9	4,2219860	0,469110	25,8994
Error	26	0,4709315	0,018113	<b>Prob &gt; F</b>
C. Total	35	4,6929175		<.0001

**Lack Of Fit**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	18	0,41040446	0,022800	3,0136
Pure Error	8	0,06052708	0,007566	<b>Prob &gt; F</b>
Total Error	26	0,47093153		0,0576
				<b>Max RSq</b>
				0,9871

**Residual by Predicted Plot**



**Response Surface**

Coef	humedad	pH	tiempo	actividad
humedad	-0,001483	0,0034816	0,0001039	-0,00946
pH	.	0,0250495	0,0072384	-0,263615
tiempo	.	.	0,0890458	0,0808388

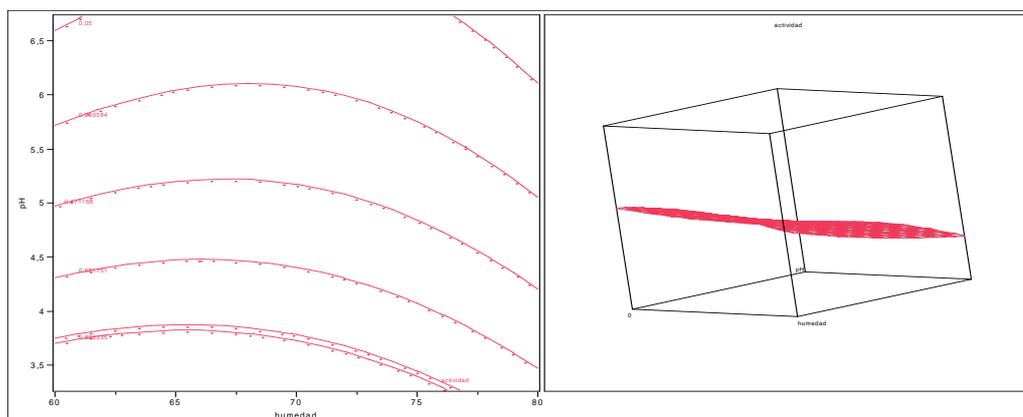
**Solution**

Variable	Critical Value
humedad	72,843859
pH	10,160372
tiempo	1,8346842

Solution is a SaddlePoint  
 Critical values outside data range  
 Predicted Value at Solution  
 -0,203525

**Contour Profiler**

Horiz	Vert	Factor	Current X	Response	Contour	Current Y	Lo Limit	Hi Limit
●	○	humedad	70	actividad	0,875	0,5169935	.	.
○	●	pH	5					
○	○	tiempo	2,5					



**Anexo 4. Composición del agar mora.**

Nutriente	Concentración (g/L)
Triptona	10,0
Extracto de levadura	3,0
Sólidos liofilizados de mora	3,5
Glucosa	4,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5
Agar	14,0

Nota: se toma como base el agar suero de naranja marca Oxoid, sustituyendo con sólidos liofilizados de mora los sólidos liofilizados de naranja. El pH se ajusta a 3,5 con ácido cítrico al 15 % (González 2014)