

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Proyecto Final de Graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos
para optar por el grado de Licenciada en Ingeniería de Alimentos.

Evaluación de la producción de celulasas mediante un proceso de fermentación en
medio sólido, empleando como sustrato residuos de zanahoria (*Daucus carota*) y de
maíz (*Zea mays*)

Elaborado por:
María Esther Koschny Castro
Carné: B23580

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

2020

TRIBUNAL EXAMINADOR

Trabajo Final de Graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos.

Aprobado por:

PhD. Eric Wong González
Presidente del Tribunal

Licda. Marcy González Vargas
Directora del proyecto

M.Sc. Carolina Cortés Herrera
Asesora del proyecto

Dra. Natalia Barboza Vargas
Asesora del proyecto

Licda. Vanny Mora Villalobos
Profesora designada

DEDICATORIA

*A mi abuela Olga, a mis padres,
a Daniel, Sánchez y Trini*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi mamá y mi papá por apoyarme siempre y creer en mí más que yo misma. A mis hermanos de siempre Daniel, Marvin y Cecilia, y a los dos que llegaron después Griselda y Johan, por quererme en mis momentos de estrés y saber cómo empujarme hacia adelante. A mis pequeñas Kicxy, Moni y Diana, por iluminarme los días con sus sonrisas y darme fuerza con sus abrazos. Si ustedes familia no habría logrado culminar la meta y más aún alcanzado el aprendizaje que me llegó en el camino.

Gracias a mis amigas Caro, Fio, Megan, Steph y Vivi, y a Ronald, por darme tantas risas y momentos lindos durante la etapa universitaria y después de ella. Cada uno me aportó apoyo en diferentes pruebas, Steph casi que hizo conmigo el tercer objetivo, pero sobre todo me dio cariño y confianza cuando más la necesité. Esa deuda se las iré pagando con amor en los días que vengan, porque sé que serán amigos de toda la vida. Y a Mar por ser la amiga que llegó después, pero para quedarse mientras existamos, por ser mi soporte y mi confidente, y también por dejarme ser la suya.

Agradezco a mi comité asesor: Marcy, Carolina y Natalia, por estar siempre disponibles para recibirme, por toda la ayuda, los consejos y la motivación. Gracias a Vanny, por ser mi cuarta asesora, por apoyarme y aconsejarme siempre, por ser una amiga.

También quiero agradecer a Giova, Camacho, Alonso, Luis, Randall, Eduardo, Liz, Laura, doña Marjorie, por su disposición a colaborarme y el cariño que me brindaron. Así como todo el personal del CITA y de la ETA, por su trato y su aporte a mi formación profesional.

Gracias Milagro por escucharme hablar de cajitas, tubitos, hongos y sustratos, por intentar entenderme y darme guía.

ÍNDICE GENERAL

TRIBUNAL EXAMINADOR	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE GENERAL.....	iv
ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN	xi
1. JUSTIFICACIÓN	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo general.....	4
2.2 Objetivos específicos	4
3. MARCO TEÓRICO	5
3.1 Producción de enzimas celulasas.....	5
3.1.1. Biomasa vegetal	5
3.1.2. Composición de la celulosa	6
3.1.3. Degradación enzimática de celulosa	6
3.1.4. Uso de enzimas celulasas	8
3.1.5. Cuantificación de la actividad celulolítica.....	8
3.1.6. Microorganismos productores de enzimas celulasas	9
3.2 Proceso de fermentación en medio sólido (FMS)	10
3.2.1. Aspectos generales de una fermentación en medio sólido.....	10
3.2.2. Factores que influyen en la FMS	11
3.2.3.1. Microorganismo.....	11
3.2.3.2. Sustrato	11
3.2.3.3. Condiciones del proceso de fermentación	12

3.3 Residuos zanahoria y maíz.....	13
3.3.1. Generación de residuos.....	13
3.3.2. Composición de la zanahoria y maíz.....	14
3.3.3. Posible uso de residuos de zanahoria y maíz como sustrato en una FMS	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1 Localización del proyecto.....	16
4.2 Selección del microorganismo productor de enzimas celulasas	16
4.2.1. Pruebas preliminares.....	16
4.2.2. Método de selección.....	17
4.2.3. Análisis estadístico	19
4.3 Caracterización de sustrato.....	19
4.3.1. Pruebas preliminares.....	19
4.3.1.1. Lavados de residuos zanahoria.....	19
4.3.1.2. Ajustes de pH en los residuos	20
4.3.2. Preparación del sustrato.....	21
4.3.3. Tamaño de partícula.....	22
4.3.4. Capacidad de retención de agua.....	23
4.3.5. Punto crítico de humedad.....	23
4.3.6. Densidad de empaque.....	23
4.3.7. pH.....	23
4.3.8. Humedad	24
4.3.9. Análisis estadístico	24
4.4 Fermentación en medio sólido (FMS)	24
4.4.1. Preparación del inóculo	24
4.4.2. Proceso de fermentación para producción de enzimas celulasas	24

4.4.3.	Condiciones a evaluar en FMS: pH y humedad inicial del sustrato	25
4.4.4.	Toma y tratamiento de muestras	27
4.4.5.	Análisis estadístico	27
4.5	Métodos de análisis	28
4.5.1.	Cuantificación de proteína	28
4.5.2.	Cuantificación de la actividad enzimática	29
4.5.3.	Determinación de azúcares reductores (Método DNS)	29
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
5.1	Determinación de la capacidad de producción de celulasas de diferentes mohos, analizando la actividad enzimática en placa	31
5.2	Caracterización físico-químicas de los residuos de zanahoria y maíz	33
5.3	Determinación de las condiciones de pH y humedad iniciales del sustrato que permiten la mayor producción de celulasas mediante un proceso de FMS	37
6.	CONCLUSIONES	43
7.	RECOMENDACIONES	44
8.	BIBLIOGRAFÍA	45
8.1.	Bibliografía citada.....	45
8.2.	Bibliografía consultada	53
9.	ANEXOS	55
9.1.	Datos tomados en pruebas preliminares.....	55
9.2.	Datos de pruebas definitivas	57

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro I. Formulación para la preparación del medio de cultivo carboximetilcelulosa. (Reactivos poner casa comercial y país).....	17
Cuadro II. Formulación para la preparación del medio CMC con sacarosa y los medios de cultivo a base de residuos de zanahoria y de maíz. (Reactivos poner casa comercial y país).	18
Cuadro III. Condiciones iniciales de pH y humedad del sustrato establecidas para los diferentes tratamientos de fermentación en medio sólido.	27
Cuadro IV. Relación del diámetro del halo de hidrólisis, sobre el medio carboximetilcelulosa, y el diámetro de crecimiento (DH/DC), para diferentes mohos a tres tiempos de incubación, 48, 72 y 96 horas.	31
Cuadro V. Relación del diámetro del halo de hidrólisis, sobre los medios de carboximetilcelulosa (CMC), de residuos de zanahoria y de residuos de maíz, ajustados a diferentes concentraciones de azúcares, y el diámetro de crecimiento (DH/DC), para cinco mohos a las 96 horas de incubación.....	31
Cuadro VI. Análisis elemental para los residuos de zanahoria y de maíz.	33
Continuación. Cuadro VI. Análisis elemental para los residuos de zanahoria y de maíz.	34
Cuadro VII. Contenido de componentes celulósicos y de azúcares reductores presentes en los residuos de zanahoria y de maíz.	35
Cuadro VIII. Caracterización de los residuos de zanahoria y de maíz, para evaluar su capacidad como sustrato en un proceso de fermentación sólida.	36
Cuadro IX. Niveles reales de humedad y pH iniciales del sustrato, empleados para el estudio de su efecto sobre la producción de enzimas celulasas mediante un el proceso de FMS.....	37
Cuadro IA. Mohos aislados de residuos de piña, clasificados según si logran o no hidrolizar celulasa en medio de cultivo carboximetilcelulosa (CMC).	55

Cuadro IIA. Valores de pH a lo largo del tiempo para mezcla de residuos de zanahoria y maíz al adicionar 0,120 mL de NaOH 0,1 M y 0,025 mL de HCl 0,1 M.	56
Cuadro IIIA. Datos tomados en pruebas de caracterización para los tres lotes de residuos de zanahoria y de maíz, analizados como sustratos para un proceso de fermentación sólida.	57
Cuadro IVA. Niveles humedad y pH iniciales del sustrato, empleados en las dos repeticiones del proceso fermentación en medio sólido.	58
Cuadro VA. Actividad exoglucanasa cuantificada para los tres niveles de humedad a los diferentes tiempos de muestreo en el proceso de fermentación en medio sólido.	58
Cuadro VIA. Actividad exoglucanasa cuantificada para los tres niveles de pH a los diferentes tiempos de muestreo en el proceso de fermentación en medio sólido.	59
Cuadro VIIA. Actividad endoglucanasa cuantificada para los tres niveles de humedad a los diferentes tiempos de muestreo en el proceso de fermentación en medio sólido. ..	59
Cuadro VIIIA. Actividad endoglucanasa cuantificada para los tres niveles de pH a los diferentes tiempos de muestreo en el proceso de fermentación en medio sólido.	60
Cuadro IXA. Actividad endoglucanasa cuantificada para los tres niveles de pH en cada uno de los niveles de humedad, a los diferentes tiempos de muestreo en el proceso de fermentación en medio sólido.	60
Cuadro XA. Análisis de varianza para la evaluación del efecto simple y combinado de tres condiciones del proceso de fermentación sólida, sobre producción de exoglucanasas y endoglucanasa.	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Composición estructural de la lignocelulosa. Tomada de Srivastava <i>et al.</i> , (2018).....	6
Figura 2. Estructura del polímero de celulosa y representación de la hidrólisis que experimenta debido a la acción de las enzimas celulasas. Tomada de Juturu & Chuan (2014).....	7
Figura 3. Diagrama de flujo para la preparación de los residuos de zanahoria (A) y los residuos de maíz (B).	22
Figura 4. Sistema empleado para llevar a cabo el proceso FMS, cajas plásticas con el sustrato para los diferentes tratamientos y sus respectivos controles (A) y acomodo de las muestras dentro de la incubadora (B).....	25
Figura 5. Comportamiento de la actividad endoglucanasa cuantificada a los tres diferentes niveles de humedad, respecto a los ocho tiempos de muestreo durante la fermentación.	40
Figura 6. Comportamiento de la actividad endoglucanasa cuantificada a los tres diferentes niveles de pH, respecto a los ocho tiempos de muestreo durante la fermentación.	41
Figura 1A. A) Extracto de cáscaras inicial y los extractos posteriores a los diferentes lavados (L1, L2, L3). B) Tubos correspondiente para la determinación cualitativa de azúcares reductores (método DNS).....	56

ABREVIATURAS

CITA: Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.

CMC: Carboximetilcelulosa.

CRA: Capacidad de retención de agua.

DE: Densidad de empaque.

DH/DC: Diámetro de halo de hidrólisis respecto a diámetro de crecimiento.

DNS: ácido 3,5-dinitrosalicílico o método de análisis de azúcares reductores mediante reacción de color con ácido 3,5-dinitrosalicílico.

ETA: Escuela de Tecnología de Alimentos.

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

FMS: Fermentación en medio sólido.

g/L: Gramos por cada litro.

g/mL: Gramos por cada mililitro.

h: Horas.

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia.

mg/mL: Miligramos por cada mililitro.

mL: Mililitros.

mm: Milímetros.

M: Molaridad, moles de soluto por cada litro de disolución.

NA: No analizado, no se realizó la cuantificación.

ND: No determinado, porque los datos no lo permiten.

NR: No hay referencia.

µg/mL: Microgramos por cada mililitro.

U/mg: cantidad de enzima que produce un micromol de azúcar reductor por minuto, por cada miligramo.

UI/mg: cantidad de enzima que produce un nanomol de azúcar reductor por minuto, por cada miligramo.

INEC: Instituto Nacional de Estadística y Censos.

PCH: Punto crítico de humedad.

RESUMEN

Koschny Castro, María Esther

Evaluación de la producción de celulasas mediante un proceso de fermentación en medio sólido, empleando como sustrato residuos de zanahoria (*Daucus carota*) y de maíz (*Zea mays*).

Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos – San José, Costa Rica.

En esta investigación se evaluó la producción de enzimas celulasas, exoglucanasas y endoglucanasas, mediante un proceso de fermentación en medio sólido (FMS), se empleó como sustrato residuos de zanahoria y de maíz. Para ello, primero, se determinó la capacidad de producción de celulasas de once diferentes mohos aislados de residuos agroindustriales, mediante un análisis en placa, sobre medio carboximetilcelulosa (CMC). Se seleccionó los mohos V3, V13, V15 y V16, para ampliar su estudio sobre un medio CMC azucarado y otros dos medios preparados a partir de residuos de zanahoria y de maíz. Debido a que se obtuvo diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los valores de hidrólisis encontrados para V3, respecto a los otros mohos, se seleccionó como el microorganismo fermentador.

Posteriormente se evaluó las características físico-químicas de los residuos de zanahoria y de maíz, para ser empleados como sustrato en una FMS. En estos análisis se determinó que ambos residuos mostraron una composición apta para su uso como sustrato en un proceso de producción de celulasas y que sus características de punto crítico de humedad (PCH), capacidad de retención de agua (CRA), densidad de empaque (DE) y tamaño de partícula son adecuadas para su empleo como sustrato en una FMS. Los valores de dichos parámetros para zanahoria y maíz fueron: PCH de 6,31

%; CRA de 11,85 y de 10,34; DE de 0,327 g/mL y de 0,163 g/mL; tamaño de 1,93 mm y de 1,02 mm; respectivamente.

Finalmente, se determinó si la influencia de diferentes niveles de humedad y pH iniciales del sustrato, permitieron al microorganismo seleccionado una mayor producción de celulasas mediante un proceso de FMS, empleando una mezcla 50:50 de residuos de zanahoria y maíz como sustrato. No fue posible determinar que existiese actividad exoglucanasa cuantificable y que la producción de ésta se vea influenciada por la humedad y pH iniciales del sustrato, así como el tiempo de fermentación. Además, de manera exploratoria, se identificó que, al trabajar con humedades altas y valores de pH ácidos en el sustrato de fermentación, se favorece los rendimientos de producción de enzimas endoglucanasas.

PALABRAS CLAVE: ACTIVIDAD ENZIMÁTICA- CARACTERIZACIÓN- HIDRÓLISIS DE CELULOSA- MOHOS- SUSTRATO. Directora: Lic. Marcy González Vargas. Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica.

1. JUSTIFICACIÓN

La celulosa es un biopolímero lineal compuesto por moléculas de D-glucosa unidas entre sí por enlaces glucosídicos tipo β -1,4 su utilidad está estrechamente relacionada con su hidrólisis a cadenas más pequeñas o moléculas libres de glucosa (Malik *et al.*, 2010). La degradación con ácido y/o alta temperatura son insatisfactorias porque los azúcares resultantes se descomponen, la degradación enzimática utilizando celulasas es el medio más eficaz para su descomposición (Worthington Biochemical Corporation, 2017).

Las celulasas representan el 8 % de las demandas mundiales de enzimas industriales, pero se espera que el mercado se expanda hasta US\$ 400 millones por año, el principal obstáculo en el camino del éxito es su alto costo. Por ello surge la necesidad de desarrollar procesos económicamente rentables que implican la reutilización de las enzimas o la reducción de los costos de producción de estas (Sharma *et al.*, 2016).

El interés por emplear enzimas en usos industriales ha generado una búsqueda por la obtención de estas mediante fermentación de diferentes microorganismos, los cuales han sido estudiados en varios sustratos como residuos de yuca, caña de azúcar, arroz y trigo para la producción de celulasas (Escudero *et al.*, 2013; León *et al.*, 2017; Lin-Hui *et al.*, 2017; Singhania *et al.*, 2006; Srivastava *et al.*, 2017). La economía de la producción de estas enzimas podría mejorarse mediante el uso de sustratos celulósicos más baratos (Singhania *et al.*, 2006). Los subproductos de la industria de frutas y verduras son particularmente interesantes para este fin, porque permiten disminuir el costo de la producción de enzimas, reducir la cantidad de desechos sólidos e impulsar el manejo ecológico de los desechos agrícolas, industriales y domésticos, y están disponibles en grandes cantidades (Vodnar *et al.*, 2017; Bansal *et al.*, 2012).

En los últimos años ha habido un incremento en el consumo de frutas y vegetales procesados, lo que se asocia con un estilo de vida de las personas más dinámico y con menor tiempo para la preparación de sus alimentos. Gráficas de las ventas de estos productos en Costa Rica y Estados Unidos de América (USA) lo respaldan y evidencian ligeras variaciones año tras año, pero siempre manteniendo el crecimiento. En el país,

del 2016 al 2017 se presentó un aumento de las ventas del 8,4 %, mientras que en USA para ese mismo periodo fue de 4,8% (Euromonitor International, 2018).

La globalización y la industrialización exigen más sistemas complejos de distribución de alimentos, lo que conduce a periodos de transporte y almacenamiento más prolongados, en los cuales los productos alimenticios son susceptibles al deterioro microbiano, sensoriales y nutricionales (Otoni *et al.*, 2018). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) se estima que un tercio de los alimentos producidos a nivel mundial para consumo humano se pierden o desperdician (De Laurentiis *et al.*, 2018). Esto corresponde a una generación anual de aproximadamente 1300 millones de toneladas de desperdicios de alimentos (Tonini *et al.*, 2018).

Para contrarrestar esta problemática surgen los alimentos procesados o mínimamente procesados, dentro de esta categoría entran los diferentes productos elaborados a partir de zanahoria y maíz, como picadillos, ensaladas, conservas de vegetales, entre otros. Los residuos obtenidos del procesamiento de zanahoria y maíz, debido a su contenido de fibra, pueden ser considerados para la producción de celulosas como se ha realizado antes con diversos residuos agrícolas, industriales y de cocina; evaluados en cuanto a su capacidad para la producción de enzimas mediante FMS (Bansal *et al.*, 2012).

Como bien establece Soto (2011), los residuos orgánicos provenientes de la agricultura, agroindustria, áreas verdes y domicilios tienen, por sus características, un importante valor, debido a su potencial de aprovechamiento energético y transformación en abono. Un manejo inadecuado de estos residuos incide en una mayor emisión de grandes cantidades de gases de efecto invernadero; en consecuencia, se deben fomentar tecnologías apropiadas, con el fin de aportar al ambiente y contribuir significativamente a la meta de Costa Rica de ser un país “C-neutral” (Programa Competitividad y Medio Ambiente, 2008). Tomando en cuenta que en el país existe una producción y consumo importante de vegetales y frutas, frescas y procesadas (INEC, 2014), y más sobre todo en productos como la zanahoria y el maíz, es necesario evaluar alternativas para disponer de los residuos que se generan y provechar que su contenido de celulosa puede favorecer su uso en una FMS.

Además de la selección del sustrato, para un proceso de FMS es necesario definir el microorganismo a utilizar y las condiciones de fermentación. Es común el empleo de hongos para metabolizar la celulosa, pero solo algunas cepas son capaces de secretar un complejo de enzimas con una aplicación práctica en la hidrólisis de materiales celulósicos (Sukumaran, 2005); de ahí surge la necesidad de estudios previos. Por otro lado, dos de las variables más estudiadas en la FMS son el pH y la humedad iniciales del sustrato, dado que ambos parámetros influyen en el crecimiento, la biosíntesis y la secreción de la enzima (Mrudula y Murugammal, 2011); son variables que se ajustan previo a la fermentación y no requieren controlarse durante el proceso.

Esta investigación propone el uso de residuos de cáscaras de zanahoria y maíz obtenidos durante su procesamiento, debido a la necesidad existente de brindar un valor agregado a los subproductos agroindustriales. Una alternativa interesante de profundizar es evaluar su potencial como sustrato en una FMS, utilizando un moho aislado de residuos agroindustriales para la obtención de celulasas, y a la vez lograr establecer condiciones de humedad y pH pueden favorecer la producción de las enzimas a un menor costo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar la producción de celulasas mediante un proceso de fermentación en medio sólido, empleando como sustrato residuos de zanahoria (*Daucus carota*) y de maíz (*Zea mays*), generados en la industria de alimentos, para su valorización.

2.2 Objetivos específicos

1. Determinar la capacidad de producción de celulasas de diferentes mohos, analizando la actividad enzimática en placa, para su empleo en un proceso de fermentación en medio sólido.
2. Evaluar las características físico-químicas de los residuos de zanahoria y de maíz, para ser empleados como sustrato en una fermentación en medio sólido (FMS).
3. Determinar las condiciones de pH y humedad iniciales del sustrato, que permiten al microorganismo seleccionado la mayor producción de celulasas mediante un proceso de FMS.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Producción de enzimas celulasas

3.1.1. Biomasa vegetal

Al hablar de biomasa vegetal, se hace referencia al producto principal del proceso de fotosíntesis, constituye el recurso renovable más abundante y se encuentra distribuido alrededor de la superficie de los continentes (Mora, 2015; Schwarz, 2002). Se considera que se producen cerca de 100 mil millones de toneladas secas de biomasa celulósica en la biosfera por año (Srivastava *et al.*, 2018).

Los recursos primarios de la biomasa incluyen cultivos leñosos y cultivos herbáceos, semillas de cultivos oleaginosos y residuos resultantes de la cosecha de cultivos agrícolas y árboles forestales (Sandouqa *et al.*, 2019; Mart & Base, 2017). Dentro de este material lignocelulósico se contempla también los residuos vegetales de la industria de procesamiento de alimentos (Mart & Base, 2017). El aprovechamiento de estos residuos es muy beneficioso para los países, ya que pueden obtener casi sin ningún costo y representan una carga negativa en el ambiente (Schwarz, 2002). Una estrategia prometedora para su utilización eficiente es la hidrólisis microbiana y la fermentación de los azúcares reductores resultantes para la producción de metabolitos o biocombustibles (Sukumaran *et al.*, 2005).

La biomasa está formada por tres componentes principales que son: celulosa, hemicelulosa y lignina, y su contenido es bajo en cenizas, proteínas, grasas y ceras (Da Silva *et al.*, 2018; Paredes *et al.*, 2010), la forma en la que está estructurada se puede apreciar en la figura 1.

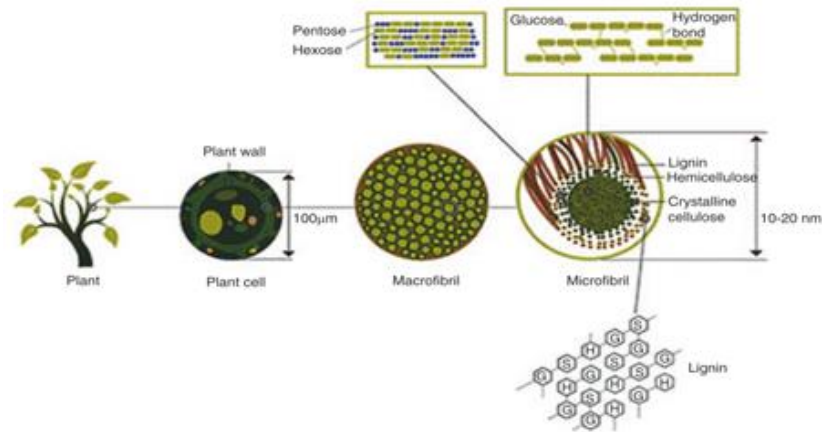


Figura 1. Composición estructural de la lignocelulosa. Tomada de Srivastava *et al.*, (2018)

3.1.2. Composición de la celulosa

La celulosa es el biopolímero más abundante en la naturaleza, representa al menos a un tercio de toda la materia vegetal de la tierra y es una fuente de energía de bajo costo (Zhang, X. & Zhang, Y., 2013; Manjarrés *et al.*, 2011; Vilches, 2002). Está compuesta por unidades repetidas de glucosa entrelazadas por enlaces glicosídicos β -1,4 (Juturu & Chuan, 2014; Malik *et al.*, 2010). Esta configuración le permite formar cadenas largas y lineales, las cuales están unidas entre sí mediante enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, que se traducen en una estructura cristalina altamente ordenada y resistente a la hidrólisis (Sharma *et al.*, 2016; Ovando & Waliszewski, 2005).

3.1.3. Degradación enzimática de celulosa

Los materiales lignocelulósicos no se aprovechan ampliamente en la producción de bioenergía, debido a los fuertes enlaces químicos entre la celulosa, hemicelulosa y la lignina, que dificultan su hidrólisis (Silva *et al.*, 2018). Es posible eliminar la lignina mediante un tratamiento previo, mientras que para la hemicelulosa y celulosa es necesaria la acción sinérgica de un complejo de enzimas específico (Srivastava *et al.*, 2018). La transformación biotecnológica de la biomasa celulósica abre paso a diversos estudios sobre enzimas celulolíticas empleadas en diferentes áreas, para el desarrollo de nuevos bioprocesos y productos (Kuhad *et al.*, 2011).

Se conoce como celulasas al complejo de enzimas capaces de degradar la celulosa, que está conformado principalmente por tres componentes: endo-1,4- β -glucanasas (EC 3.2.1.4), exo-1,4- β -glucanasas (EC 3.2.1.91) y β -glucosidasas (EC 3.2.1.21) (Singhania et al., 2017; Costa, *et al.* 2012). El mecanismo completo de acción del conjunto de enzimas celulasas se ilustra en la figura 3, donde las endoglucanasas atacan aleatoriamente los sitios internos de la cadena de celulosa generando nuevos extremos en la cadena y oligosacáridos con longitudes variadas (Sharma *et al.*, 2016). Por su parte, las exoglucanasas o celobiohidrolasas actúan gradualmente sobre los extremos no reductores de la molécula de celulosa liberando subunidades de celobiosa (Vilches, 2002). Mientras que las β -glucosidasas completan el proceso de degradación al hidrolizar celobiosa y otras celodextrinas con un bajo grado de polimerización a unidades de glucosa (Mohapatra *et al.*, 2018).

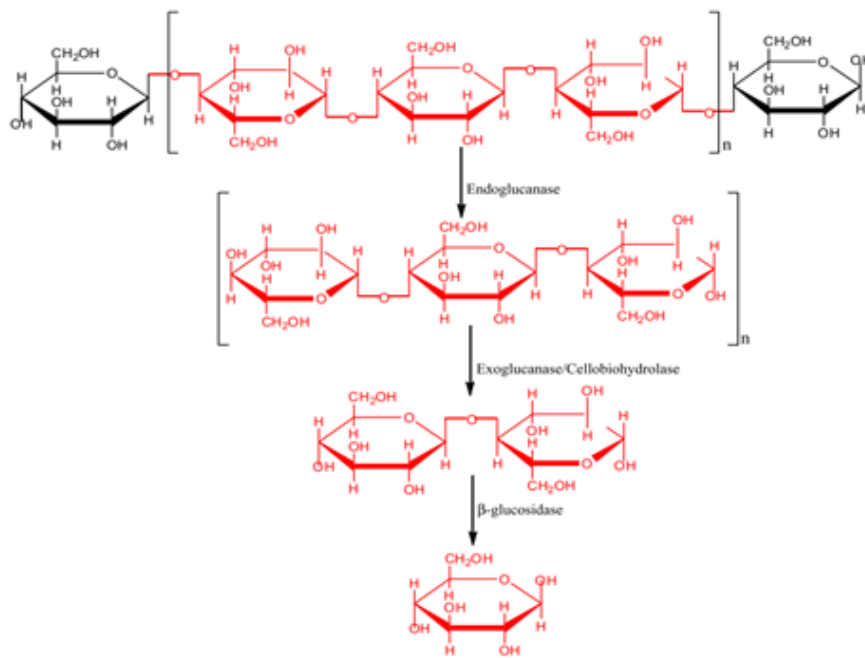


Figura 2. Estructura del polímero de celulosa y representación de la hidrólisis que experimenta debido a la acción de las enzimas celulasas. Tomada de Juturu & Chuan (2014).

3.1.4. Uso de enzimas celulasas

Las celulasas se usan en todo el mundo debido a su potencial útil y prometedor para ser explotado en varios procesos y técnicas involucradas en la tecnología alimentaria, como la clarificación de jugos de frutas y la reducción de la viscosidad de néctares (Ramadan, 2018). Permiten incrementar el rendimiento del proceso sin inversión de capital adicional; además, se mejora la estabilidad de la nube, la textura, facilita la concentración de néctares y purés y disminuye su viscosidad rápidamente (Bhat, 2000).

En general, el uso de celulasas en la obtención de alimento para animales, procesamiento de frutas, procesamiento de textiles, preparación de vegetales deshidratados, productos alimenticios, aceites esenciales, sabores, procesamiento de almidón, extractos botánicos, producción de pulpa y papel, mermeladas, jugos, producción de vino, transformación farmacéutica y la biomasa (Malik *et al.*, 2010). La importancia de estas enzimas en diferentes áreas industriales y el aumento expansivo de su demanda, han llevado a la búsqueda de procesos económicamente más rentables de producción (Sharma *et al.*, 2016).

3.1.5. Cuantificación de la actividad celulolítica

La cuantificación de la actividad de celulasa se puede realizar empleando ensayos de velocidad inicial o ensayos de punto final (Zhang, X & Zhang, Y., 2013), y midiendo la actividad individual de cada celulasa (endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas) o midiendo la actividad total (Gaitán & Pérez, 2007). Para la detección de la endoglucanasa se emplea derivados de celulosa con un grado variable de polimerización, como la carboximetilcelulosa (CMC) (Sharma *et al.*, 2016; Montoya *et al.*, 2014); mientras que para la detección de exoglucanasas o celobiohidrolasas, se utiliza celulosa microcristalina, comercialmente Avicel (Sharma *et al.*, 2016; Eveleigh *et al.*, 2009).

La glucosa obtenida debido a la actividad de celulasa se mide utilizando diferentes métodos de detección de azúcares reductores, como ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), glucosa oxidasa o cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Juturu & Chuan,

2014). El método DNS es el más recomendado ya que tiene una alta sensibilidad para la detección de azúcares reductores y una baja interferencia de proteínas (Sharma *et al.*, 2016; Bello *et al.*, 2006).

La actividad enzimática se expresa como U/mL y la actividad específica como U/mg de proteína, donde una unidad (U) de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 micromol de azúcar reductor por minuto (Prajapati *et al.*, 2018). La cuantificación de proteína se realiza mediante el método de Lowry, para reportar la actividad de la enzima respecto al crecimiento celular (Mohapatra *et al.*, 2018; Charles *et al.*, 2007).

3.1.6. Microorganismos productores de enzimas celulasas

El material celulósico es particularmente atractivo como fuente de carbono y energía debido a su bajo costo y su gran abundancia; sin embargo, debido a su carácter recalcitrante solamente ciertos organismos, como bacterias y hongos, producen las enzimas necesarias para utilizarlo (Martínez *et al.*, 2008). Los microorganismos celulolíticos son principalmente degradadores de carbohidratos, ya que generalmente no pueden utilizar lípidos o proteínas como fuente de energía para su crecimiento, y pueden ser aeróbicos o *anaeróbicos*, mesofílicos o termofílicos (Singhania *et al.*, 2017; Kuhad *et al.*, 2011).

Bacterias, hongos y actinomicetos pueden producir enzimas celulasas, para liberar azúcares necesarios en el crecimiento celular y la formación de productos en ciertas condiciones ambientales (Malik *et al.*, 2010). Aunque, cabe destacar que sólo algunos de ellos producen las enzimas celulasas de forma extracelular (Ovando & Waliszewski, 2005). El mecanismo de degradación de la celulosa por las bacterias aeróbicas es similar al de los hongos aeróbicos; mientras que las bacterias anaeróbicas operan mediante un sistema diferente y solo algunas pueden producir celulasas libres (Zhang, X. & Zhang, Y., 2013; Kuhad *et al.*, 2011).

Los hongos son los microorganismos más estudiados para la producción de celulasas debido a su capacidad de segregar grandes cantidades de proteína extracelular, a lo que se asocia su alto rendimiento en la producción de enzimas y su capacidad para secretar

el complejo completo de celulasa de forma extracelular (Singhania *et al.*, 2017; Sukumaran *et al.*, 2005). El género *Trichoderma* es el más utilizado en estudios de producción de enzimas y es considerado como el más eficiente productor de celulasas y hemicelulasas a nivel industrial (Mora, 2015).

3.2 Proceso de fermentación en medio sólido (FMS)

3.2.1. Aspectos generales de una fermentación en medio sólido

En los últimos años, se ha evidenciado un incremento en el interés por procesos de fermentación en medio sólido (FMS) empleados en la biodegradación de compuestos peligrosos, descomposición de madera, enriquecimiento de residuos de cosecha, producción de enzimas, ácidos orgánicos y metabolitos secundarios biológicamente activos, entre muchos otros (Costa *et al.*, 2012). Consiste en el crecimiento de microorganismos, y la formación de productos en la superficie y en el interior de una matriz sólida porosa (Flores *et al.*, 2014); humedecida generalmente utilizando un medio líquido a base de sales minerales para el enriquecimiento (Vaishnav *et al.*, 2018).

La FMS es un proceso favorable para el cultivo de hongos filamentosos debido a las similitudes de las condiciones de fermentación con el hábitat natural de los hongos (Su *et al.*, 2017). Además, surge como un método más atractivo en comparación con la fermentación sumergida, por permitir el uso de residuos agroindustriales como sustratos, un fácil manejo y montaje, bajo costo de inversión y la baja liberación de efluentes líquidos contaminantes (León *et al.*, 2017). El uso de una FMS en respecto a un proceso sumergido, presenta un costo de producción cerca de 3 veces menor y una eficiencia del 99.6% (Yazid *et al.*, 2017).

Otro aspecto positivo de este proceso de fermentación es la alta calidad y actividad de los extractos enzimáticos obtenidos, sin necesidad de utilizar disolventes orgánicos (Socol *et al.*, 2017). Para la extracción se utiliza una disolución tampón o agua destilada con un porcentaje apropiado de Tween 80, se homogeniza y se centrifuga para eliminar la biomasa y los residuos celulares, y se recupera el sobrenadante que contiene el producto de interés (Singhania *et al.*, 2017).

Sin embargo, este sistema requiere tiempos de cultivo más extensos que la fermentación en medio líquido, debido a la menor tasa de crecimiento de los microorganismos, y es susceptible al contenido de agua, el pH, el gradiente de oxígeno y la acumulación de calor metabólico. Lo anterior aunado a la naturaleza sólida del sustrato causa problemas en el monitoreo de los parámetros del proceso, por lo que el control efectivo de parámetros durante la etapa de fermentación se dificulta (Sindhu *et al.*, 2015). Es por ello que, se considera que para analizar este proceso lo más viable es evaluar las condiciones iniciales del sustrato y estandarizar en la medida de lo posible las demás variables.

3.2.2. Factores que influyen en la FMS

Los aspectos importantes por considerar durante un proceso de FMS para mejorar su eficiencia son la selección del microorganismo, un sustrato adecuado y los parámetros a controlar en la etapa de fermentación (Yazid *et al.*, 2017; Pandey *et al.*, 2000).

3.2.3.1. Microorganismo

Al llevar a cabo un proceso de FMS para la producción de enzimas y metabolitos secundarios, es necesario tomar en cuenta el tipo microorganismo, el tamaño del inóculo utilizado (Yazid *et al.*, 2017), y que la síntesis de dichos productos solo ocurre durante la fase estacionaria de crecimiento (Paredes *et al.*, 2010; Robinson *et al.*, 2002). Debido a esto se requiere un tiempo de adaptación antes de iniciar la producción de la enzima y a lo largo de la fermentación pueden identificarse diferentes picos y valles de producción.

3.2.3.2. Sustrato

Para la producción de celulasas se utiliza como soporte un medio que contienen celulosa, pero se debe considerar que el proceso está controlado por una dinámica de inducción y represión; una inducción debida a concentraciones adecuadas de celulosa, en bajas cantidades la hidrólisis puede ser demasiado lenta para satisfacer las necesidades metabólicas del microorganismo (Sukumaran *et al.*, 2005). Por otro lado, la síntesis de la enzima se puede detener mediante la represión de la glucosa, cuando esta se genera muy rápido y ocurre una acumulación (Singhania *et al.*, 2017).

El material vegetal no es solo un soporte para la absorción de nutrientes y el crecimiento de biomasa, también actúa como fuente de carbono y otros nutrientes; en caso de ser necesaria una suplementación para un crecimiento óptimo se puede adicionar fósforo, azufre, potasio, magnesio, calcio, zinc, manganeso, cobre, hierro, cobalto, yodo, entre otros (Soccol *et al.*, 2017).

Para evaluar el carácter como sustrato en una FMS de un material lignocelulósico se emplean generalmente tres parámetros: la capacidad de retención de agua (CRA), el punto crítico de humedad (PCH) y la densidad de empaque. El primero indica la capacidad de la muestra para absorber agua, depende de la disponibilidad de grupos hidrófilos presentes y de la capacidad de formación de gel de las macromoléculas, se prefieren los materiales con valores altos de CRA para facilitar el crecimiento y desarrollo de microorganismos. El PCH representa la cantidad de agua vinculada al soporte, que no está disponible para las funciones metabólicas de los microorganismos, se busca soportes con baja humedad crítica. En cuanto a la densidad de empaque, un aumento provoca una reducción en el espacio vacío entre las partículas y en el área de intercambio con la atmósfera circundante. (Flores *et al.*, 2014).

3.2.3.3. Condiciones del proceso de fermentación

La producción de celulasas a través de la fermentación en estado sólido está asociada con varios factores del medio ambiente, como el contenido de nitrógeno, la temperatura, aireación, humedad, pH y la presencia de otros carbohidratos (Gaitán & Pérez, 2007). Una producción a gran escala requiere la comprensión y el control de estos parámetros durante la fermentación (Singhania *et al.*, 2017). Dentro de los más estudiados para la síntesis de celulasas están la temperatura, y la humedad y pH iniciales del sustrato (Díaz, 2009; León *et al.*, 2017; Mora, 2015; Mrudula & Murugammal, 2011; Neagu *et al.*, 2012; Singhania *et al.*, 2006).

La temperatura de incubación juega un papel importante en las actividades metabólicas del microorganismo productor de la enzima, se ha identificado temperaturas entre 24 °C y 30 °C como las óptimas para la producción máxima de enzimas mediante fermentación en medio sólido y sumergido (Mrudula & Murugammal, 2011). Debido a la dificultad para monitorear la temperatura a lo largo de la etapa de fermentación mantener una

temperatura fija en el ambiente circundante es una alternativa atractiva para reducir la variabilidad del proceso.

El contenido óptimo de humedad en un sustrato sólido, éste está estrechamente relacionado con la difusión correcta de nutrientes y oxígeno durante la fermentación; un alto contenido de humedad disminuye la porosidad e interfiere en la difusión de oxígeno (Yazid *et al.*, 2017). Por otro lado, se debe mantener una humedad suficiente para que no se vea limitado el crecimiento microbiano (Sindhu *et al.*, 2015). El contenido óptimo de humedad para el crecimiento de los microorganismos se encuentra entre el 40 % y 70 %, pero depende del microorganismo y sustrato empleado (Díaz, 2009).

El intervalo de pH para el crecimiento de hongos filamentosos es muy amplio y frecuentemente se reporta en entre 3 y 7. Sin embargo, es un factor para analizar debido a que un pH más elevado de lo ideal podría aumentar la producción de proteínas extracelular, teniendo un efecto negativo sobre la actividad específica de las celulasas; mientras que su disminución provoca una inhibición del crecimiento fúngico (León *et al.*, 2017).

3.3 Residuos zanahoria y maíz

3.3.1. Generación de residuos

Los residuos de frutas y verduras comprenden las partes no comestibles que se desechan durante la recolección, manipulación, transporte y procesamiento (Jahanbakhshi *et al.*, 2018; Plazzotta *et al.*, 2017). El desperdicio anual per cápita para países desarrollados y en desarrollo se estima en 95-115 kg y 6-11 kg, respectivamente; incurriendo en enormes costos ambientales, sociales y económicos (1055 millones de dólares USA/año) (Das *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2018).

Se ha identificado que diferentes desechos vegetales resultan ricos en energía, incluyendo maíz, zanahoria, coliflor, pepino, arándanos, guisantes, papa, tomate y hojas de rábano, entre otros; sin embargo, no se han explotado completamente hasta la fecha (Das *et al.*, 2018). Estos pueden recuperarse y convertirse en productos de alto valor

agregado, como ocurre cuando se emplean en procesos de fermentación en estado sólido, para disminuir el costo de la producción de enzimas (Bermúdez *et al.*, 2014; Bansal *et al.*, 2012).

Para subsanar un estilo de vida más dinámico y con menor tiempo para la preparación de alimentos, así como las tendencias de consumo de alimentos más saludables, las personas han incrementado su consumo de frutas y vegetales mínimamente procesados, los cuales mantienen los atributos de calidad similares a los productos frescos, involucrando procedimientos que causen los menores cambios posibles (Siddiqui *et al.*, 2015). Dentro de esta categoría entran diferentes productos elaborados a partir de zanahoria y maíz, ya sean picadillos, ensaladas, preparados para sopas, entre otros.

Según la encuesta nacional de ingresos y gastos en los hogares de Costa Rica para el año 2013, entre los cuatro principales subgrupos de gasto en alimentos y bebidas no alcohólicas se encuentran las legumbres y hortalizas, representado con un 11 %. Del total de este subgrupo de productos, los alimentos relacionados con zanahoria y maíz como el vegetal fresco, en conserva, vegetales mixtos troceados o minivegetales, en conjunto representan 8,0 % del gasto asociado a cada hogar y un 4,7 % del gasto en general de todos los hogares (INEC, 2014). Para la elaboración de la mayoría de estos productos es necesario realizar el pelado, lo que incurre en la generación de residuos de los cuales se puede disponer para brindarle un valor agregado.

3.3.2. Composición de la zanahoria y maíz

La zanahoria (*Daucus carota* L.) es una hortaliza no estacional que presenta un sabor agradable y es rica en compuestos fenólicos, carotenoides (por ejemplo, β -caroteno), vitaminas, minerales y fibra dietética (Otoni *et al.*, 2018; Vodnar *et al.*, 2017). Según estudios su constitución química consiste en un 88-86 % de humedad, 0,9-0,7 % de proteína, 0,5-0,2 % de grasa, entre 10-6 % de carbohidratos, 2,4-1,2 % de fibra cruda, y 1,1 % de cenizas totales; respecto a los contenidos de azúcares se ha reportado entre 1,67-3,35 % de azúcares reductores, 1,02-1,18 % de azúcares no reductores y entre 2,71-4,53 % de azúcares totales, para 6 cultivares de zanahoria (Sharma *et al.*, 2012).

Por su parte, el maíz (*Zea mays*) es uno de los cultivos más comunes en el mundo, durante la última década, su producción a nivel mundial aumentó en un 40 % (Wojcieszak *et al.*, 2020). Se puede separar el producto en diferentes partes: granos, tusa, tallo y hojas; cada una con una composición distinta. La parte descartable del maíz al realizar su pelado, conocida como tusa, presenta cantidades de celulosa y hemicelulosa similares que el tallo y las hojas, pero menores concentraciones de lignina; esto lo hace material más apto para emplear en procesos de hidrólisis microbiana. Su composición en base seca muestra 7,32 % de humedad, 82 % de holocelulosa, 7 % de lignina y 25 % de cenizas (Wojcieszak *et al.*, 2020; Zawawi *et al.*, 2014).

3.3.3. Posible uso de residuos de zanahoria y maíz como sustrato en una FMS

Los residuos de procesamiento mínimo de zanahoria, que a menudo se tiran o se utilizan como alimento para animales, contienen un alto contenido de materia orgánica que dificulta su eliminación (Otoni *et al.*, 2018). Estos residuos permiten el desarrollo de todas las especies microbianas involucradas en la degradación de carbohidratos, proteínas y lípidos (Liotta *et al.*, 2014).

Respecto al maíz, la principal limitación de la utilización los desechos como alimento es el bajo valor de nutrientes, especialmente el alto contenido de fibra y el bajo contenido de proteínas (Yanti *et al.*, 2019). Los residuos han sido considerados como biomasa residual y fuente de energía renovable debido a su naturaleza lignocelulósica, obtenida del proceso de fotosíntesis (León *et al.*, 2011).

Por tanto, la utilización de estos subproductos con alto contenido celulósico plantea la posibilidad de reemplazar sustratos como el arroz y el trigo, los cuales tienen una limitación importante debido a sus altos costos (Agamez *et al.*, 2008).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Localización del proyecto

La selección del microorganismo productor de celulasas se realizó en el Laboratorio de Microbiología del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA), de la Universidad de Costa Rica. Las pruebas de preparación y análisis para la caracterización del sustrato se realizaron tanto en la Planta Piloto como en el Laboratorio de Química del CITA y el Laboratorio de Química de la Escuela de Tecnología de Alimentos (ETA). Por su parte el proceso de fermentación sólida y el análisis de la producción de la enzima se llevaron a cabo de manera compartida entre los Laboratorios de Microbiología y Química del CITA.

4.2 Selección del microorganismo productor de enzimas celulasas

4.2.1. Pruebas preliminares

Se realizaron pruebas con 24 mohos aislados de residuos de piña, en placas con medio carboximetilcelulosa (CMC, MERCK, Estados Unidos). Luego de 48 h se adicionó a las placas una solución indicadora de yodo-yoduro (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) para identificar de manera cualitativa los mohos que presentaron algún tipo de halo de hidrólisis a partir de su punto de crecimiento. La prueba se realizó por triplicado. Los residuos de piña y microorganismos se obtuvieron del proyecto: biotransformación de los subproductos generados por la industria procesadora de frutas y vegetales en bioproductos con valor agregado.

Los datos recolectados se detallan en el cuadro IA, que se muestra en anexos, los códigos de identificación de los diferentes mohos se establecieron según coloraciones y conforme a la secuencia en la que se aislaron. Se seleccionaron de manera cualitativa los microorganismos que mostraron un halo de hidrólisis de celulosa notable para continuar su estudio y seleccionar a partir de estos el más apto para producción de enzimas celulasas mediante un proceso de FMS.

4.2.2. Método de selección

Se trabajó con los 11 microorganismos aislados de cáscaras de piña, seleccionados según lo descrito en la sección 4.2.1 al evidenciar actividad celulasa. Para seleccionar entre los mohos escogidos se realizó una evaluación en placa de la actividad enzimática de manera cuantitativa, realizando la prueba por triplicado para cada microorganismo. Se siguió el procedimiento planteado por Chand *et al*, (2008), por lo que se utilizó como medio de cultivo CMC, cuya formulación se detalla en el cuadro I. El centro de cada placa se inoculó con una suspensión de $1,0 \times 10^7$ esporas/mL para cada moho a analizar. Las placas se incubaron durante 48 h a 24 °C.

Cuadro I. Formulación para la preparación del medio de cultivo carboximetilcelulosa (CMC).

Nutriente	Concentración (g/L)
Nitrato de sodio (NaNO ₃) ¹	2,0
Fosfato de potasio (K ₂ HPO ₄) ²	1,0
Sulfato de magnesio (MgSO ₄) ¹	0,5
Cloruro de potasio (KCl) ¹	0,5
Carboximetilcelulosa (CMC) sódica	2,0
Peptona ³	0,2
Agar ²	17,0

¹MERCK, Alemania; ²Sigma-Aldrich, Estados Unidos; ³Fluka Chemie Ag, Suiza.

Para realizar las observaciones de la actividad celulolítica, se tiñeron las placas con una solución de color, yodo/yoduro, durante 3 min. Como indicador de actividad enzimática se evaluó la formación de una zona no teñida por el colorante, así como su respectivo tamaño; se midió el diámetro de la zona de hidrólisis y se relacionó con el diámetro de la zona de crecimiento del moho. Se empleó como control positivo una suspensión de esporas de *Trichoderma* sp.

Para evaluar si el incremento del contenido de azúcares en el medio de crecimiento ejerció algún efecto sobre la actividad celulasa de los microorganismos durante el análisis, se seleccionaron los cuatro mohos con mejores resultados sobre el medio de

cultivo CMC formulado en el cuadro I y se hicieron crecer sobre el mismo medio con incorporación de sacarosa. Se evaluó también la influencia de la composición propia de los residuos de zanahoria y maíz, sobre la actividad hidrolítica. Para estas pruebas se elaboraron los tres medios de crecimiento descritos en el cuadro II, con la misma base del medio CMC, sumando azúcares o sustituyendo la fuente de celulosa por residuos de zanahoria o maíz, en cantidades que permitieran mantener las mismas concentraciones de azúcares. La cantidad de zanahoria o maíz a incorporar en los medios se determinó según el contenido de azúcares reductores de los residuos, cuantificados mediante el método DNS (ver sección 4.5.3).

Cuadro II. Formulación para la preparación del medio carboximetilcelulosa (CMC) con sacarosa y los medios de cultivo a base de residuos de zanahoria y de maíz.

Nutriente	Concentración (g/L)		
	Medio CMC	Medio zanahoria	Medio maíz
Nitrato de sodio (NaNO ₃) ¹	2,0	2,0	2,0
Fosfato de potasio (K ₂ HPO ₄) ²	1,0	1,0	1,0
Sulfato de magnesio (MgSO ₄) ¹	0,5	0,5	0,5
Cloruro de potasio (KCl) ¹	0,5	0,5	0,5
Carboximetilcelulosa (CMC) sódica ³	2,0	2,0	2,0
Peptona ²	0,2	0,2	0,2
Agar ²	17,0	-	-
Sacarosa ¹	0,09 - 0,45	-	-
Cáscara zanahoria seca molida y liofilizada	-	0,64 - 3,48	-
Tusa maíz seca molida y liofilizada	-	-	0,84 - 4,28

¹MERCK, Alemania; ²Sigma-Aldrich, Estados Unidos; ³Fluka Chemie Ag, Suiza.

Se trabajó con cinco concentraciones diferentes de azúcares: 0,09 g/L, 0,18 g/L, 0,27 g/L, 0,36 g/L y 0,45 g/L; realizando pruebas por duplicado para cada moho en cada uno de los tres medios de crecimiento. Al igual que en la prueba anterior, se evaluó la

formación de la zona no teñida por el colorante en las placas, así como su respectivo tamaño, se midió el diámetro de la zona de hidrólisis y se relacionó con el diámetro de la zona de crecimiento del moho. Se empleó como control positivo una suspensión de esporas de *Trichoderma* sp.

Es importante mencionar, que los mohos aislados en el proyecto se encuentran en proceso de identificación mediante marcadores moleculares y secuenciación por parte del Laboratorio de Microbiología del CITA, para asegurarse de que no son microorganismos con capacidad de producir micotoxinas.

4.2.3. Análisis estadístico

Para seleccionar los microorganismos con criterio, tanto en la prueba de hidrólisis sobre CMC sin azúcar, como en las pruebas con los tres medios a cinco concentraciones de azúcares diferentes, se realizó una comparación de medias mediante un análisis de varianza (ANDEVA). Para esta la prueba con CMC sin azúcar se comparó los promedios de relación DH/ DC de los microorganismos por separado para cada tiempo de incubación; mientras que para la segunda prueba se comparó la relación DH/DC de los microorganismos por separado para cada concentración de azúcares y para cada tipo de medio de cultivo. Se utilizó el paquete estadístico JMP® 7.0 con un límite de confianza del 95%. Al encontrarse diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las relaciones de los halos de hidrólisis y los halos de crecimiento generados por los diferentes mohos, se aplicó una prueba Tukey.

4.3 Caracterización de sustrato

4.3.1. Pruebas preliminares

4.3.1.1. Lavados de residuos zanahoria

Una elevada concentración de azúcares reductores genera un ambiente desfavorable para la producción de las enzimas hidrolíticas de interés, por parte del microorganismo, lo que conduciría a bajas actividades durante la fermentación (Díaz, 2009). Por esta razón, tomando en cuenta que los residuos de zanahoria presentan un porcentaje de

azúcares reductores entre 1,67 % – 3,35 % dentro de su composición húmeda (Datt, *et al.* 2012), es necesario realizar lavados con agua como pretratamiento.

Para la prueba de lavado se tomó una muestra de 200 g de cáscaras de zanahoria y se realizó un lavado adicionando 2 L de agua y se colocó en agitación por 30 min. Luego se eliminó el agua, se sacó una muestra de 10 g. Se realizó al residuo restante un segundo lavado con 2 L de agua en agitación por 30 min; luego de eliminar el agua de lavado, se tomó otra muestra de 10 g. Con lo que quedó de residuos se procedió a un tercer lavado con 500 mL de agua y agitación por 30 min, y se tomó otra muestra de 10 g. Posteriormente, a cada muestra de 10 g obtenida de los lavados y a una cuarta tomada del residuo inicial, se les realizó una extracción con agua y Tween 80 (MERCK, Estados Unidos) colocando en agitación durante 20 min. Finalmente, se tomó una muestra de cada extracto y se realizó una reacción con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS; Sigma-Aldrich Estados Unidos).

En la figura 1A, en los anexos, se presentan los extractos obtenidos a partir de las cáscaras de zanahoria, al inicio y posterior a cada lavado; así como los tubos de la reacción con el reactivo DNS. A partir de la prueba se determinó de manera cualitativa el nivel de lavado requerido en los residuos de zanahoria para una reducción importante de los azúcares reductores presentes, sin eliminarlos por completo.

4.3.1.2. Ajustes de pH en los residuos

Se considera recomendable que el valor de pH inicial del medio sólido esté dentro del rango de 4,5-6,5; sin embargo, al trabajar con sustratos celulósicos estos pueden presentar un efecto amortiguador para el cambio del pH (Cen & Xia, 1999; Díaz, 2006; Su *et al.* 2017). Por esta razón, se realizó una prueba de ajuste de pH sobre los residuos de zanahoria y maíz empleando 0,120 mL de hidróxido de sodio (NaOH; MERCK, Alemania) 0,1 M y 0,025 mL de ácido clorhídrico (HCl; J.T. Baker, Estados Unidos) 0,1 M, y realizando mediciones de pH hasta alcanzar un valor estable. Se trabajó por triplicado cada ajuste y empleando una mezcla de 5 g de residuos de zanahoria y maíz para cada muestra. Se realizó mediciones de pH cada 10 minutos, hasta los 30 minutos, y luego cada 30 minutos, hasta los 90 minutos; el equipo de medición fue un pHmetro marca Corning (modelo 450, Estados Unidos). Los resultados se muestran en el cuadro

IIA de anexos, estos permitieron definir el volumen de las soluciones para el ajuste de pH y el tiempo requerido para alcanzar un valor estable del parámetro; 0,120 mL y 60 min para el uso de NaOH 0,1 M, y 0,030 mL y 20 min para el uso de HCL 0,1 M.

4.3.2. Preparación del sustrato

El sustrato empleado consistió en una mezcla de residuos de zanahoria (cáscaras) y de maíz (tusa). Los residuos de zanahoria inicialmente se redujeron de tamaño utilizando un procesador, luego se trataron con agua para la eliminación de azúcares reductores. Se realizó un lavado empleando por cada 150 g de sustrato 1 L de agua, esto durante un periodo de 30 min aplicando agitación manual lenta cada 10 min. Se realizó en total tres lavados bajo las mismas condiciones. La agitación se realizó de manera manual dado que se trabajó con mayores cantidades de residuo que en la prueba de laboratorio. Finalmente, las cáscaras molidas y con el contenido de azúcares reductores disminuido, se secaron en el secador de cabina con aire caliente de la Planta Piloto del CITA hasta una humedad aproximada de 7 %.

Por su parte, la tusa de maíz se separó en hojas que se colocaron en el secador de cabina con aire caliente de la Planta Piloto del CITA, para llegar hasta una humedad aproximada de 7 %. Luego, se redujo de tamaño empleando un procesador industrial de alta velocidad y un tamizador para separar la fracción de tamaño menor a 2,362 mm (pasa el tamiz N° 8, US Standard ASTM). Los diagramas de flujo con los procesos de preparación ambos residuos se presentan en la figura 3.

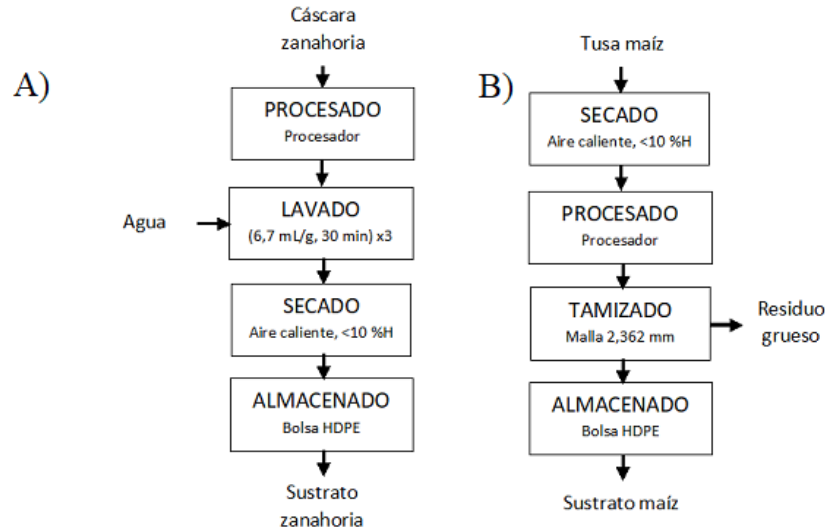


Figura 3. Diagrama de flujo para la preparación de los residuos de zanahoria (A) y los residuos de maíz (B).

Para caracterizar mejor los residuos se solicitó un análisis elemental al Laboratorio de Suelos y Foliar del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA). Además, se realizó por triplicado la cuantificación del contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa mediante el procedimiento establecido por Brillouet *et al.* (2008), y se cuantificó el contenido de azúcares reductores presentes en ambos residuos mediante el método DNS.

Mientras que para evaluar la capacidad de los residuos para ser utilizados como sustratos en un proceso de fermentación en medio sólido y definir posibles ajustes necesarios, se le realizaron los análisis que se describen en los próximos seis apartados.

4.3.3. Tamaño de partícula

A las cáscaras de zanahoria molidas, lavadas y sometidas a un proceso de secado, y a la tusa de maíz seca y molida, se les realizó un análisis granulométrico con la serie de tamices US Standard ASTM del Laboratorio de Química de la Escuela de Tecnología de Alimentos (ASTM International, 2017). Para ello se tamizó, por triplicado, una muestra de cada uno de los lotes hasta alcanzar masa constante. De manera que se caracterizó la variabilidad del tamaño de partícula de los dos residuos empleados.

4.3.4. Capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua (CRA), se determinó según la metodología descrita por Flores *et al* (2014). Para ello, se añadió aproximadamente 1,25 g del residuo a 15 mL de agua destilada, se mezclaron con pastilla de agitación durante 10 min para lograr obtener una suspensión. La muestra se trasladó a un tubo Falcon de 50 mL y se centrifugó en equipo marca Thermo Scientific (modelo ST 16, Alemania), por 10 min a 4000 rpm, el sobrenadante resultante se decantó y se determinó la masa del gel. La capacidad de retención de agua se cuantificó por triplicado para cada lote y se expresa como g gel/g de soporte seco.

4.3.5. Punto crítico de humedad

Para determinar el punto crítico de humedad (PCH) se siguió el procedimiento planteado por Flores *et al.* (2014), modificando la masa de muestra analizada. Se estimó mediante un balance térmico a una temperatura de 120 °C por 60 min, colocando 0,5 g del gel obtenido al realizar el análisis CRA en el analizador termogravimétrico (TGA), marca LECO (modelo 604-100-700, Estados Unidos). La determinación se realizó por triplicado para cada lote de los residuos y el valor se expresa como como un porcentaje.

4.3.6. Densidad de empaque

La densidad de empaque se analizó para conocer el grado de compactación del material, el cual se relaciona con el espacio disponible para la transferencia de masa y energía en el mismo (Flores *et al.* 2014). Se determinó colocando entre 1,0 g y 2,5 g de los residuos en cilindros graduados (probetas de 10 mL) y aplicando agitación hasta ya no observar cambios en el volumen; para ello se empleó un agitador MultiVortex digital, marca Scientific Industries (modelo SI-M236, Estados Unidos). Los valores de densidad se determinaron por triplicado para cada lote, mediante la relación de masa y volumen.

4.3.7. pH

Se realizó la cuantificación del pH de los residuos para identificar la variabilidad entre lotes y tener en cuenta los valores al ajustar de las condiciones iniciales del sustrato en el proceso de fermentación. Se determinó el pH por triplicado a cada lote, empleando las muestras sobrantes en el análisis de PCH. La determinación se realizó en un pHmetro

marca Metrohm (modelo 827 pH lab, Suiza), mediante el procedimiento “AOAC 981.12” (AOAC, 2016).

4.3.8. Humedad

El porcentaje de humedad al igual que el pH se determinó para analizar la variabilidad del proceso de secado de los residuos y visualizar los ajustes necesarios para el proceso de fermentación. Se cuantificó por triplicado para cada lote de residuo, colocando una muestra entre 0,500-1,000 g en una balanza de humedad marca Sartorius (modelo MA37-1, Alemania); con una presión de la medición de $\pm 0,01$ %.

4.3.9. Análisis estadístico

Para las pruebas antes mencionadas, se trabajó con tres lotes de cada sustrato y se analizó mediante un promedio de los valores obtenidos en cada parámetro, reportándolo junto con la desviación estándar correspondiente para evaluar su variabilidad.

4.4 Fermentación en medio sólido (FMS)

4.4.1. Preparación del inóculo

Para la preparación de inóculo se cultivó el moho a emplear en la fermentación en medio Agar Papa Dextrosa (APD; Sigma Aldrich, Estados Unidos) dentro de un Erlenmeyer, y se incubó durante 5-7 días a 24 °C. Una vez que se logró la esporulación, se preparó una suspensión de esporas en una solución de agua destilada estéril con agregado de Tween 80 estéril al 0,1 %. Se empleó para el recuento de esporas una cámara de Neubauer y se preparó la disolución de manera que el inóculo final se encontrara a una concentración de $1,0 \times 10^7$ esporas/g de materia seca (Castrillo *et al.* 2014).

4.4.2. Proceso de fermentación para producción de enzimas celulasas

Para el proceso de fermentación se realizó una mezcla de los diferentes lotes de residuos de zanahoria y de maíz, previamente caracterizados, en una proporción 50:50. Luego se realizó una esterilización del sustrato, colocando la mezcla en un beaker de 5L en la autoclave marca Yamato Scientific (modelo SQ510C, Estados Unidos) por 15 min a 121 °C. Transcurrido el proceso, se colocó en bandejas de acero inoxidable estériles, recubiertas con papel aluminio y se dejó secando en la incubadora de 45 °C; el traslado

del beaker a las bandejas se realizó dentro de una cámara de bioseguridad (ESCO Labculture, clase II tipo A2, Estados Unidos).

En la preparación de la fermentación se incorporó al sustrato la disolución humectante con contenido mineral, los agentes para ajuste pH (en los casos necesarios), el agua destilada para el ajuste de humedad y el volumen de inóculo correspondiente a la masa inicial de sustrato. La incorporación de la suspensión de esporas del microorganismo seleccionado se realizó mediante microgoteo, acompañada de agitación. El proceso se llevó a cabo en una caja plástica rectangular de 5,0 x 4,5 cm y una altura de 3,5 cm, donde se colocó 5 g del sustrato inoculado. Se preparó por cada tratamiento y para cada tiempo de muestreo una caja sin inóculo como control. Todas las cajas, tratamientos y controles, se colocaron en una incubadora a 24 °C durante el periodo de fermentación (ver figura 4).

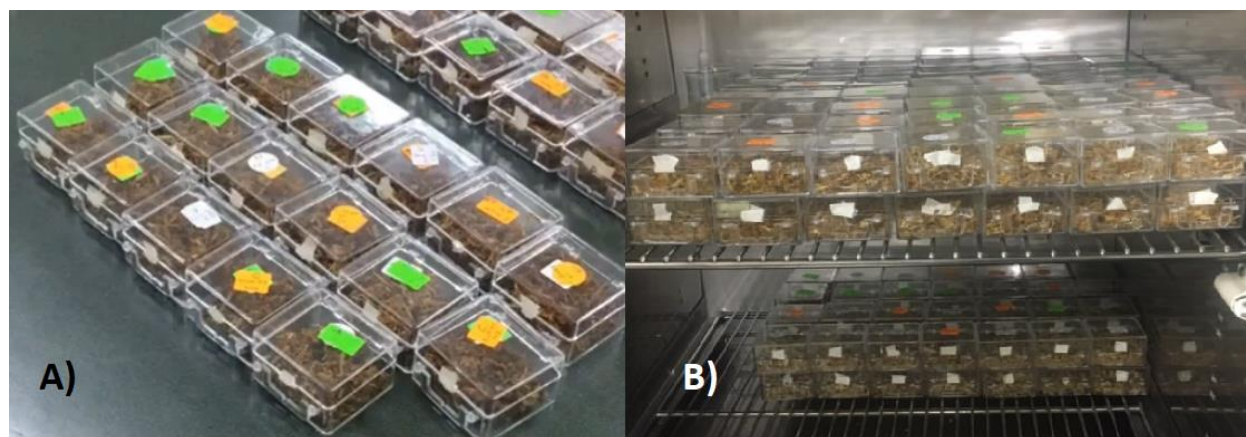


Figura 4. Sistema empleado para llevar a cabo el proceso FMS, cajas plásticas con el sustrato para los diferentes tratamientos y sus respectivos controles (A) y acomodo de las muestras dentro de la incubadora (B).

4.4.3. Condiciones a evaluar en FMS: pH y humedad inicial del sustrato

Se estableció trabajar variando condiciones de pH y humedad iniciales en el sustrato de fermentación y con tres niveles para cada factor, para un total de nueve tratamientos. La variable respuesta correspondió a la actividad celulasa, cuantificada como

endoglucanasa y como exoglucanasa. Se propuso trabajar con tres repeticiones para cada tratamiento preparadas empleando una mezcla de los diferentes lotes de los residuos de zanahoria y de maíz como sustrato, y el microorganismo seleccionando en la primera parte de la investigación. Sin embargo, por un error metodológico solo se tomó en cuenta dos de las repeticiones en el análisis de los resultados.

Para ajustar el pH del sustrato se tomó en cuenta los resultados de la prueba preliminar descritas en la sección 4.3.1.2, y se empleó una dilución de NaOH 0,1 M o una dilución de HCl 0,1 M, según fuese pH deseado. Mientras que para el ajuste de la humedad se utilizó agua destilada; para determinar la cantidad de agua a adicionar para alcanzar la humedad deseada, se empleó la siguiente fórmula:

$$\%Humedad = \frac{g H_2O \text{ añadidos} + g H_2O \text{ contenidos en el sólido}}{g H_2O \text{ añadidos} + g \text{ sólido húmedo}} \times 100$$

La determinación del contenido de humedad del sustrato previo al ajuste de humedad se realizó utilizando una balanza de humedad y analizando la muestra por triplicado. En el cuadro III, se observa los valores de pH y porcentaje de humedad iniciales del sustrato definidos para evaluar en cada tratamiento.

El día del montaje de cada repetición se cuantificó la humedad inicial real del sustrato siguiendo el protocolo de Laboratorio de Química del CITA para la medición de humedad en vegetales mediante el método de la estufa (P-SA-MQ-002, según el procedimiento “AOAC 984.25” (AOAC, 2016). De igual manera se cuantificó el pH inicial real del sustrato, para reportar los valores reales de pH y humedad empleados en el estudio.

Cuadro III. Condiciones iniciales de pH y humedad del sustrato establecidas para los diferentes tratamientos de fermentación en medio sólido (FMS).

Tratamiento	Humedad (%)	pH
1	65	4,50
2	65	5,20
3	65	6,50
4	70	4,50
5	70	5,20
6	70	6,50
7	75	4,50
8	75	5,20
9	75	6,50

Es importante recalcar, que la cantidad real de tratamientos correspondió a la combinación de esos nueve descritos en el Cuadro III, con los ocho tiempos de fermentación, ya que este factor se analizó como un factor continuo dentro del diseño experimental.

4.4.4. Toma y tratamiento de muestras

Se tomó una muestra de los diferentes tratamientos cada 24 h, después de transcurridas las primeras 48 h de fermentación, hasta que se alcanzó las 240 h, también se realizó muestreo al tiempo cero; para un total de ocho tiempos de muestreo. Dicha muestra consistió en contenido líquido total del recipiente de fermentación; para ello, se adicionó 6 mL de agua destilada con Tween 80 estéril al 0,1 % v/v por cada gramo de muestra. Luego se agitó la suspensión a 200 rpm durante 30 min en incubadora marca Lab Companion (modelo SI600, Estados Unidos), y se filtró empleando un embudo büchner con un papel filtro Whatman #1. Posteriormente, el filtrado se centrifugó a 4000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente y el sobrenadante obtenido se almacenó a -20 °C hasta la determinación del contenido de proteína y la actividad celulasa, cuyas metodologías de análisis se presentan en el apartado 4.6.

4.4.5. Análisis estadístico

Se trabajó con un diseño factorial irrestricto al azar para evaluar el efecto de tres factores: el pH y la humedad (%) iniciales del material de soporte, con tres niveles cada uno; así

como el tiempo de fermentación, con ocho niveles. Para determinar si estas condiciones presentaron un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre la producción de enzimas celulasas, se realizó un ANDEVA utilizando el paquete estadístico JMP® 7.0, con un límite de confianza del 95 %. En los casos donde se presentó diferencias se realizó una se realizó la construcción de gráficas para identificar a que se asociaron las diferencias.

4.5 Métodos de análisis

Se realizó la determinación de la actividad enzimática para cada fermentación: exo-1,4-glucanasa y endo-1,4-glucanasa; así como la determinación de proteína. De esta manera fue posible reportar la actividad celulasa como una unidad de actividad, expresada en micro moles de glucosa liberados por minuto, por miligramo de proteína (U/mg de proteína).

4.5.1. Cuantificación de proteína

La determinación del contenido de proteína se realizó a cada muestra tomada, mediante el método de Lowry *et al.* (1951), siguiendo el procedimiento P-SA-MQ-039 del Laboratorio de Química del CITA. Para llevar a cabo la reacción de color se empleó tres disoluciones: carbonato de sodio (MERCK, Alemania) y tartrato de sodio-potasio tetrahidratado (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), en NaOH 1 M; sulfato de cobre pentahidratado (J.T. Baker, Estados Unidos) y tartrato de sodio-potasio tetrahidratado, en NaOH 1 M; Folin-ciocalteu (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) en agua destilada. Finalmente se midió la absorbancia a 650 nm en equipo espectrofotométrico marca BioTek Instruments (modelo SN 208841, Estados Unidos).

Para asociar el color obtenido en cada muestra con un contenido específico de proteína, es necesario la construcción de una curva patrón de albúmina bovina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Se preparó soluciones patrón a las siguientes concentraciones: 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 y 300 $\mu\text{g/mL}$, y la reacción se desarrolló con los reactivos de Lowry, según se mencionó anteriormente.

4.5.2. Cuantificación de la actividad enzimática

Se determinó la capacidad de los extractos obtenidos en la FMS para hidrolizar celulosa mediante endocelulasas sobre celulosa microcristalina (Avicel®) y mediante exocelulasas sobre CMC., Se detalla el procedimiento para dichas determinaciones a continuación.

4.5.2.1. Actividad sobre Avicel®

Para la determinación de la actividad endocelulasa, se tomó el extracto enzimático y se le añadió una disolución de Avicel (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) a 0,02 % m/v, preparada en un buffer de citrato de sodio (Productos Químicos Monterrey, México) y ácido cítrico (MERCK, Alemania) al 0,1 M (pH 5,0). Se incubó la mezcla a 50 °C durante 1 h, trascurrido el tiempo la reacción se detuvo mediante una inmersión en baño de hielo y se centrifugó a 5 000 g durante 10 min (Macarron, 1992). Al sobrenadante obtenido se le determinó la glucosa liberada mediante un método de análisis de azúcares reductores que se describe en el apartado 4.5.3.

4.5.2.2. Actividad sobre CMC

Para la determinación de la actividad exocelulasa, se tomó el extracto enzimático y se mezcló con una disolución de CMC al 1 % m/v y buffer de citrato al 0,1 M (pH 5,0). Se incubó la mezcla a 50 °C durante 30 min, trascurrido el tiempo la reacción se detuvo mediante una inmersión en baño de hielo (Malik *et al.* 2010; Castrillo *et al.* 2014). A la disolución obtenida se le determinó la glucosa liberada mediante un método de análisis de azúcares reductores que se describe en el apartado 4.5.3.

4.5.3. Determinación de azúcares reductores (Método DNS)

Se realizó la cuantificación de azúcares reductores a cada muestra antes y después de realizar la reacción enzimática, para determinar según los azúcares generados la actividad celulasa del extracto. Para llevar a cabo la reacción de color se mezcló 0,5 mL de cada muestra con 0,5 mL del reactivo de DNS, preparado empleando ácido 3,5-dinitrosalicílico, tartrato de sodio-potasio, NaOH y agua (Bello, *et al.* 2006). Los tubos se colocaron en un baño de agua a 100 °C por 5 min, se dejó enfriar hasta temperatura

ambiente. Luego se le adicionó 5 mL de agua destilada y se realizó la lectura de absorbancia en equipo espectrofotométrico BioTek a 540 nm.

Con la finalidad de asociar la absorbancia con una concentración específica de azúcares, se realizó la construcción de una curva patrón de glucosa (MERCK, Alemania). Para lo anterior, se prepararon soluciones patrón de glucosa a las siguientes concentraciones: 0,0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0; 2,4; 2,8 y 3,2 g/L y la reacción se desarrolló con el reactivo DNS según lo antes mencionado.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Determinación de la capacidad de producción de celulasas de diferentes mohos, analizando la actividad enzimática en placa

Se analizaron los valores obtenidos al relacionar el halo de hidrólisis que produce cada moho sobre el medio celulósico, con su diámetro de crecimiento, lo anterior para contar con una medida comparable de la actividad producida por cada microorganismo, sin sumar un sesgo asociado a un crecimiento acelerado. Los resultados muestran que para las 48 h no se presentaron diferencias significativas, a excepción de los mohos V5 y V15 que no evidenciaban crecimiento a ese tiempo. Mientras que, para los otros dos tiempos de incubación se observa una separación entre las relaciones (Cuadro VI), lo que es esperable porque entre los días dos y cuatro se da la formación de nuevas estructuras con micelio e hifas activas, las cuales tienen una mayor capacidad para segregar proteínas celolíticas (Saucea, 2012). Esta evaluación se realizó para los 11 mohos aislados de residuos agroindustriales, que en las pruebas preliminares mostraron de manera cualitativa algún tipo de actividad celulasa (ver anexos, cuadro IA), y *Trichoderma* sp. como microorganismo de referencia.

Cuadro IV. Relación del diámetro del halo de hidrólisis, sobre el medio carboximetilcelulosa (CMC), y el diámetro de crecimiento (DH/DC), para diferentes mohos a tres tiempos de incubación, 48, 72 y 96 horas.

Microorganismo	Relación DH/DC		
	48 h	72 h	96 h
V1	1,20 ($\pm 0,09$) ^{bc}	1,19 ($\pm 0,04$) ^{ef}	1,12 ($\pm 0,03$) ^{ef}
V2	1,48 ($\pm 0,04$) ^{ab}	1,76 ($\pm 0,25$) ^b	1,40 ($\pm 0,08$) ^{bcde}
V3	1,37 ($\pm 0,32$) ^{bc}	1,71 ($\pm 0,15$) ^b	1,76 ($\pm 0,14$) ^a
V5	0 (ND) ^d	1,00 (ND) ^f	1,06 ($\pm 0,10$) ^f
V6	1,27 ($\pm 0,03$) ^{bc}	1,31 ($\pm 0,04$) ^{cde}	1,28 ($\pm 0,02$) ^{cdef}
V7	1,18 ($\pm 0,02$) ^{bc}	1,28 ($\pm 0,05$) ^{def}	1,27 ($\pm 0,03$) ^{cdef}

ND: no determinado. Valores de relación DH/DC = 0, debido a que no se identificó halo de hidrólisis, pero si existió crecimiento del hongo. Datos expresados como promedio \pm desviación estándar, n=3. Las letras distintas indican que se encontraron diferencias significativas entre los promedios, $p < 0,05$.

Continuación. Cuadro IV. Relación del diámetro del halo de hidrólisis, sobre el medio carboximetilcelulosa (CMC), y el diámetro de crecimiento (DH/DC), para diferentes mohos a tres tiempos de incubación, 48, 72 y 96 horas.

Microorganismo	Relación DH/DC		
	48 h	72 h	96 h
V11	1,21 ($\pm 0,02$) ^{bc}	1,26 ($\pm 0,04$) ^{ef}	1,22 ($\pm 0,01$) ^{def}
V12	1,05 (ND) ^c	1,22 ($\pm 0,05$) ^{ef}	1,20 ($\pm 0,01$) ^{ef}
V13	1,25 (ND) ^{bc}	1,59 ($\pm 0,13$) ^{bc}	1,60 ($\pm 0,11$) ^{abc}
V15	0 (ND) ^d	2,07 ($\pm 0,06$) ^a	1,75 ($\pm 0,30$) ^a
V16	1,71 ($\pm 0,13$) ^{ab}	1,71 ($\pm 0,04$) ^b	1,65 ($\pm 0,12$) ^{ab}
<i>Trichoderma</i> sp.	1,30 ($\pm 0,06$) ^{bc}	1,56 ($\pm 0,07$) ^{bcd}	1,56 ($\pm 0,09$) ^{abcd}

ND: no determinado. Valores de relación DH/DC = 0, debido a que no se identificó halo de hidrólisis, pero si existió crecimiento del hongo. Datos expresados como promedio \pm desviación estándar, n=3. Las letras distintas indican que se encontraron diferencias significativas entre los promedios, $p < 0,05$.

Los once mohos analizados no han sido identificados molecularmente, por lo que no se conoce el género y especie a la que pertenecen, por ello se identifican mediante la letra V por ser de color verde y un número que indica el orden en el que fueron aislados. Se utiliza *Trichoderma* sp. como microorganismo de referencia por ser uno de los géneros más estudiados para la producción de enzimas celulasas, sin embargo, se cuenta con una cepa de baja actividad celulasa.

Como se puede apreciar en el cuadro anterior, las mayores relaciones de diámetros evaluados superaron los valores de 1,60 y corresponden a cuatro mohos: V3, V13, V15 y V16. Estos microorganismos junto con el aislamiento de referencia se continuaron analizando, dado que el medio empleado para este primer análisis proporciona condiciones estándar y poco reales de en comparación con un proceso de FMS, se identificó la necesidad de estudiar el comportamiento sobre placas con aporte de glucosa y con contenido de los residuos a emplear como sustrato en la fermentación.

En el cuadro V, se muestran los valores de relación de hidrólisis y crecimiento en placa para cinco mohos sobre tres tipos de medio de cultivo, a diferentes concentraciones de azúcares reductores. Los resultados evidencian que, para los tres medios, las relaciones

de diámetro cuantificadas para los diferentes mohos son muy similares a los valores obtenidos para *Trichoderma* sp. Dado lo anterior, cualquiera de los cuatro mohos podría emplearse en el proceso de fermentación.

Cuadro V. Relación del diámetro del halo de hidrólisis, sobre los medios de carboximetilcelulosa (CMC), de residuos de zanahoria y de residuos de maíz, ajustados a diferentes concentraciones de azúcares, y el diámetro de crecimiento (DH/DC), para cinco mohos a las 96 horas de incubación.

Medio cultivo	Microorganismo	Relación DH/DC según concentración azúcares (g/L)				
		0,09	0,18	0,27	0,36	0,45
CMC	V3	1,73 (ND) ^a	1,78 (± 0,04) ^a	1,73 (± 0,03) ^a	1,85 (ND) ^a	1,75 (± 0,03) ^a
	V13	1,39 (± 0,01) ^c	1,40 (ND) ^c	1,40 (ND) ^d	1,44 (± 0,05) ^d	1,44 (± 0,05) ^b
	V15	1,55 (± 0,04) ^b	1,54 (± 0,02) ^b	1,58 (± 0,01) ^b	1,55 (± 0,03) ^c	1,55 (± 0,02) ^b
	V16	1,55 (ND) ^b	1,63 (ND) ^b	1,66 (± 0,04) ^{ab}	1,71 (± 0,03) ^b	1,71 (± 0,03) ^a
	<i>Trichoderma</i> sp.	1,65 (± 0,02) ^a	1,59 (± 0,02) ^b	1,48 (ND) ^{cd}	1,48 (ND) ^{cd}	1,48 (ND) ^b
Zanahoria	V3	1,62 (± 0,09) ^e	1,51 (± 0,02) ^e	1,51 (± 0,02) ^e	1,36 (± 0,04) ^e	1,30 (± 0,01) ^e
	V13	1,36 (± 0,01) ^f	1,33 (± 0,02) ^{fg}	1,30 (± 0,06) ^f	1,29 (± 0,02) ^{ef}	1,31 (± 0,02) ^e
	V15	1,34 (± 0,05) ^f	1,36 (± 0,02) ^{fg}	1,32 (ND) ^f	1,30 (± 0,04) ^{ef}	1,31 (± 0,01) ^e
	V16	1,14 (± 0,03) ^g	1,13 (ND) ^h	1,16 (± 0,07) ^f	1,17 (± 0,05) ^f	1,35 (± 0,14) ^e
	<i>Trichoderma</i> sp.	1,23 (± 0,04) ^{fg}	1,27 (± 0,02) ^g	1,29 (± 0,01) ^f	1,27 (± 0,02) ^{ef}	1,19 (± 0,02) ^e
Maíz	V3	1,41 (± 0,02) ⁱ	1,38 (± 0,02) ⁱ	1,37 (± 0,02) ⁱ	1,41 (ND) ⁱ	1,47 (± 0,05) ⁱ
	V13	1,19 (± 0,02) ^j	1,18 (± 0,02) ^j	1,20 (± 0,01) ^j	1,16 (± 0,01) ^{jk}	1,21 (± 0,02) ^{jk}
	V15	1,20 (± 0,01) ^j	1,15 (± 0,01) ^j	1,14 (ND) ^k	1,11 (ND) ^{kl}	1,18 (± 0,03) ^{jk}
	V16	1,03 (ND) ^k	1,03 (ND) ^k	1,07 (ND) ^l	1,08 (± 0,03) ^l	1,10 (ND) ^k
	<i>Trichoderma</i> sp.	1,24 (ND) ^j	1,19 (± 0,03) ^j	1,22 (± 0,01) ^j	1,19 (± 0,04) ^j	1,23 (± 0,03) ^j

ND: no determinado. Datos expresados como promedio ± desviación estándar, n=2. Las letras distintas indican que se encontraron diferencias significativas entre los promedios, p < 0,05.

Al trabajar con el medio CMC azucarado se observó poca variación entre las relaciones conforme se incrementó la concentración de glucosa. Se encontraron diferencias significativas entre los microorganismos, donde V3 presentó relaciones superiores a 1,73 y sobresalió respecto a los demás en todas las concentraciones evaluadas. La adición de monosacáridos, como glucosa y fructosa, puede inhibir significativamente la producción de celulasas (Sun *et al.*, 2010); sin embargo, este efecto no se observa en los resultados, se podría suponer que las concentraciones utilizadas aún son bajas y no ejercen un efecto inhibitorio de la actividad.

El medio preparado con residuos de zanahoria evidencia una disminución en los valores de relación DH/DC conforme se incrementó la concentración del residuo, además se encuentran diferencias entre los microorganismos. En las concentraciones de 0.09, 0.18 y 0.27 se encuentran diferencias significativas, además V3 es el moho con mayor capacidad de hidrólisis de celulosa. Cuando se analizan concentraciones superiores, no se observaron diferencias significativas.

De acuerdo con Mora (2015), componentes antioxidantes presentes en los sustratos agroindustriales como compuestos fenólicos pueden ejercer una fuerte inhibición sobre la producción de enzimas celulasas. Esto también es respaldado en un descrito por Tejirian & Xu (2011), donde se establece que los compuestos fenólicos derivados de la lignina y otros componentes de las plantas pueden representar una inhibición significativa en la conversión enzimática de materiales celulósicos, acomplejando las celulasas de manera reversible. Teniendo en cuenta que los residuos de zanahoria cuentan con carotenoides dentro su composición, los cuales por sus largas cadenas y su gran número de enlaces dobles pueden presentar funciones antioxidantes, al igual que los polifenoles (Carranco *et al.*, 2011), se presume que el efecto observado en los resultados se deba a una inhibición ejercida por este tipo de compuestos.

Como se observa en el cuadro V, para la evaluación sobre el medio de residuos de maíz el moho V3 sobresalió respecto a los demás microorganismos en todas las concentraciones. A diferencia de la prueba realizada sobre residuos de zanahoria no se identificaron variaciones importantes entre las concentraciones para cada moho, lo que junto con los resultados sobre CMC permite determinar que un contenido de azúcares

de 0,45 g/L no genera un efecto inhibitorio y que en el caso de la zanahoria la disminución se debe a algo intrínseco del material. Además, fue posible, a partir de la totalidad de los resultados, seleccionar al moho V3 como el microorganismo a utilizar en el proceso de fermentación en medio sólido por presentar los mayores valores de hidrólisis en placa.

5.2 Caracterización físico-químicas de los residuos de zanahoria y maíz

En el cuadro VI, se muestra la composición de nutrientes de los residuos evaluados, todos necesarios para el crecimiento de mohos y la producción de enzimas. Se resalta el alto contenido de carbono, superior a los 40 g/ 100 g para ambos residuos, el cual corresponde a la principal fuente de alimento de los microorganismos durante su desarrollo. Sin embargo, la presencia de estos elementos en la matriz sólida no asegura que estén ampliamente disponibles para las funciones de los mohos, por lo que surge la necesidad de enriquecer el medio sólido con una solución mineral para estimular el crecimiento y la síntesis de enzimas (Escudero, *et al.*, 2013), como se hizo en este estudio.

Cuadro VI. Análisis elemental para los residuos de zanahoria y de maíz.

Elemento	Residuo	
	Zanahoria	Maíz
Relación carbono/nitrógeno	29 (\pm 1)	54 (\pm 14)
Nitrógeno (mg/100 g)	1400 (\pm 60)	837 (\pm 197)
Fósforo (mg/100 g)	180 (\pm 11)	150 (\pm 30)
Calcio (mg/100 g)	477 (\pm 109)	47 (\pm 13)
Magnesio (mg/100 g)	177 (\pm 24)	100 (\pm 1)
Potasio (mg/100 g)	1807 (\pm 255)	990 (\pm 242)
Azúfre (mg/100 g)	107 (\pm 7)	57 (\pm 13)
Hierro (mg/100 g)	4,73 (\pm 0,46)	3,80 (\pm 0,71)
Zinc (mg/100 g)	3,93 (\pm 0,88)	1,57 (\pm 0,07)
Manganeso (mg/100 g)	2,87 (\pm 0,47)	1,80 (\pm 1,11)

Datos expresados como promedio \pm intervalo de confianza, n=3.

Continuación. Cuadro VI. Análisis elemental para los residuos de zanahoria y de maíz.

Elemento	Residuo	
	Zanahoria	Maíz
Boro (mg/100 g)	3,10 (\pm 0,34)	0,57 (\pm 0,33)
Cobre (mg/100 g)	0,43 (\pm 0,07)	0,40 (\pm 0,11)
Carbono (g/100 g)	40,22 (\pm 0,63)	43,70 (\pm 0,57)

Datos expresados como promedio \pm intervalo de confianza, n=3.

El contenido de nitrógeno presenta una alta relevancia en la composición de los sustratos de FMS, debido a que las fuentes de nitrógeno orgánico permiten una mayor producción de celulasas que las fuentes inorgánicas (Kim *et al.* 2014). De manera que lo ideal es que los residuos evidencien un contenido notable de nitrógeno para reducir los requerimientos de nitrógeno mediante una fuente inorgánica. En el caso de los dos residuos analizados, presentan niveles próximos a los 1 000 mg/ 100 g de material.

Se encontró que los residuos presentan un contenido de fibras celulósicas importantes, se identificó un mayor contenido de celulosa, seguido de hemicelulosa y una menor cantidad de lignina en ambos materiales (cuadro VII). Los residuos de maíz mostraron un contenido más elevado tanto de celulosa como de hemicelulosa, al tratarse de un material externo y de protección (tusa); mientras que los residuos de zanahoria corresponden a una mezcla de cáscaras y fragmentos del vegetal, con composición celulósica menor. Por su parte, los contenidos de lignina determinados para ambos residuos fueron 8,24 % para zanahoria y 11,60 % para maíz, que no corresponden a valores muy elevados, pero al ser un componente que restringe el acceso de las enzimas celulasas a la celulosa (Paredes *et al.*, 2010), puede generar interferencia en un posterior proceso de FMS.

Cuadro VII. Contenido de componentes celulósicos y de azúcares reductores presentes en los residuos de zanahoria y de maíz.

Análisis	Residuo	
	Zanahoria	Maíz
Lignina (%)	8,24 (± 0,61)	11,60 (± 0,12)
Celulosa (%)	23,92 (± 3,84)	49,04 (± 9,96)
Hemicelulosa (%)	17,38 (± 0,92)	36,82 (± 3,89)
Azúcares (%)	13,08 (± 0,70)	17,77 (± 0,20)

Datos expresados como promedio ± intervalo de confianza, n=3.

El contenido de azúcar es importante tenerlo en cuenta en un proceso producción de enzimas celulasas debido a que se trata del producto generado en el proceso y partir de cantidades elevadas de este generaría inhibición. Sin embargo, debe existir una fuente inicial de azúcares que le permitan al microorganismo desarrollarse e ir consumiendo durante el proceso de fermentación (Sauceca, 2012). Se encontró que ambos residuos presentan un contenido inicial de azúcares menor al 20 % (cuadro VII), este es el contenido disponible para que se dé el crecimiento inicial de moho a utilizar. Es importante considerar que, para los residuos de zanahoria, este contenido de azúcares reductores es el resultante posterior a los lavados realizados al material.

Dos propiedades físico-químicas que se utilizan como parámetros para seleccionar residuos que podrían reutilizarse con éxito en una FMS son el PCH y la CRA. Se consideran como valores aceptables rangos de 9,5 a 27,5 % y 3,0 a 12,0, respectivamente (Flores *et al.*, 2014). Se encontró que para los residuos de zanahoria el PCH es de 6,31 %, un valor menor al del sustrato de referencia y dentro del rango deseado (Cuadro VIII). Esto indica que más del 90 % del agua presente en el sustrato se encuentra disponible para el crecimiento de microorganismos. Por su parte, los valores de CRA de ambos residuos fueron superiores al valor del sustrato de referencia, lo que es deseado, ya que muestra que permiten absorber ligeramente más cantidad de agua y favorecer de esta manera el desarrollo metabólico de los microorganismos que se hagan crecer sobre ellos.

Cuadro VIII. Caracterización de los residuos de zanahoria y de maíz, para evaluar su capacidad como sustrato en un proceso de fermentación sólida.

Parámetro	Residuo		Sustrato referencia **
	Zanahoria	Maíz	
Punto crítico de humedad (%)	6,31 (\pm 0,17)	NA	12,50
Capacidad de retención de agua	11,85 (\pm 0,40)	10,34 (\pm 0,51)	9,50
Densidad empaque (g/mL)	0,327 (\pm 0,014) *	0,163 (\pm 0,004)	0,83
Tamaño partícula (mm)	1,93 (\pm 0,03)	1,02 (\pm 0,08)	NR
pH	5,83 (\pm 0,02)	5,88 (\pm 0,01)	NR
Humedad (%)	2,55 (\pm 0,37)	7,85 (\pm 0,36)	NR

NA: no analizado, dato no se cuantificó. NR: no hay referencia. Datos expresados como promedio \pm intervalo de confianza, n=9; *con excepción de la densidad para zanahoria, donde n=6. **Bagazo de caña (Flores *et al.*, 2014).

La densidad de empaque y el tamaño de partícula se espera que presenten una relación indirectamente proporcional, ya que entre menor sea el tamaño de partícula mayor sería la compactación, dando paso a una densidad de empaque mayor. Sin embargo, en esta investigación, los residuos de zanahoria que fueron cerca del doble de tamaño que los residuos de maíz mostraron una densidad dos veces mayor (Cuadro VIII). Lo anterior se asocia con la forma de las partículas, debido a que los residuos de maíz presentaron una forma alargada, tipo agujas finas, dando como resultado un aparente menor tamaño y a la vez disminuyendo el grado de compactación.

Respecto a la influencia que presentan estas dos características sobre la capacidad para uso de ambos residuos como sustrato, es ideal trabajar con partículas pequeñas para proporcionar una mayor área de superficie para el soporte del moho; sin embargo, esto podría afectar la transferencia de oxígeno y retrasar el desarrollo del microorganismo (Yazid *et al.*, 2017). Considerando esto, se cuenta con materiales de densidades bajas y aceptables, que permiten alta aireación, y un tamaño de partícula reducido, que brinda

una alta superficie de contacto, por lo que son buenas alternativas para uso como sustratos.

En cuanto al pH y el porcentaje de humedad, fueron parámetros analizados para caracterizar los residuos, pero sin la intención de emplearlos para evaluar su capacidad como sustratos en un proceso de FMS, ya que son los factores por ajustar en la fermentación para evaluar diferentes niveles de cada uno. Se define trabajar con una mezcla de ambos residuos, en una proporción 50:50, ya que presentaron características similares de composición y de manejo, adecuadas para su empleo como sustrato en una FMS.

5.3 Determinación de las condiciones de pH y humedad iniciales del sustrato que permiten la mayor producción de celulasas mediante un proceso de FMS

Los valores de humedad muestran diferencias entre niveles de aproximadamente 4 %; mientras que para el factor pH, la variación alcanzada entre el pH ajustado hacia arriba (nivel 1) y el pH natural del sustrato (nivel 2) fue cercana al doble de la diferencia entre el nivel 2 y el nivel 3, ajustado a un pH más ácido (Cuadro IX). Tal y como se mencionó en el apartado 4.3.1.1, los residuos celulósicos tienen un carácter amortiguador del pH, lo que dificulta su ajuste a ciertas condiciones. Dado lo anterior, se trabajó con los niveles presentados en el cuadro IX, es importante señalar que para el nivel 2 de pH, donde no se realizó ningún tipo de ajuste, se evidenció variabilidad entre los datos.

Cuadro IX. Niveles reales de humedad y pH iniciales del sustrato, empleados para el estudio de su efecto sobre la producción de enzimas celulasas mediante un el proceso de FMS.

Niveles	Factores	
	Humedad (%)	pH
1	68,38 (± 0,01)	6,939 (± 0,068)
2	73,69 (± 0,25)	5,120 (± 0,155)
3	77,39 (± 0,58)	4,286 (± 0,131)

Datos expresados como promedio ± desviación estándar, n=6.

Cuando se analizó la actividad exoglucanasa obtenida en el proceso de FMS, no se encontró diferencias significativas ($p < 0,05$) sobre la producción de las enzimas influenciadas por los factores de humedad y pH iniciales del sustrato, así como para el tiempo de fermentación (ver anexos, cuadro XA). Distintos autores establecen que, el ensayo para la determinación de la actividad de exogluconasas con Avicel® está sujeto a mayores variaciones que el de actividad sobre CMC, debido a que es un sustrato insoluble, el cual se precipita evitando un contacto adecuado con las enzimas solubles en el medio líquido (Suesca, 2012; Zhang *et al.*, 2009). Esto explicaría, en parte, los bajos valores de actividad exoglucanasa cuantificada tanto al promediar los datos según los niveles de humedad (ver anexos, cuadro VA), como al promediarlos según los niveles de pH (ver anexos, cuadro VIA).

Se asocia el contenido de lignina en el sustrato como otra razón de la baja actividad sobre Avicel®. Se ha encontrado una mayor actividad exoglucanasa trabajando con un sustrato deslignificado, diferenciándose significativamente otros tratamientos (Escudero *et al.*, 2013). Por tanto, aplicar un pretratamiento para reducir los contenidos de lignina presentes en los residuos podría permitir al microorganismo fermentador una mayor interacción con el sustrato y con ello, una mayor producción de exoglucanasas.

Se sometió análisis la hipótesis de no existir diferencia significativa entre las agrupaciones de datos establecidas, según niveles de humedad, niveles pH y los diferentes tiempos de fermentación. Se obtuvo, con un nivel de confianza de 95 %, una potencia de 0,9413 para la prueba de análisis factorial realizada. Esto permite asegurar que no se encontró diferencias significativas influenciadas por las condiciones estudiadas de humedad y pH de la mezcla de residuos de zanahoria y maíz, sobre la producción de enzimas exoglucanasas, empleando V3 como microorganismo fermentador, porque no era posible encontrarlas.

Es importante resaltar que, para dicha determinación se utilizó un $\delta = 5$ UI/mg proteína, a pesar de no encontrarse un valor definido para dicho parámetro, debido a que la heterogeneidad de la celulosa insoluble, la sinergia y competencia entre endoglucanasa y exoglucanasa, y el no contar con un sustrato altamente específico para evaluar la

actividad de exoglucanasa, plantean un desafío en el desarrollo de ensayos de esta actividad enzimática (Dashtban *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2009).

Respecto a la producción de endoglucanasas, se encontraron diferencias significativas, con un 95 % de confianza ($p < 0,05$), debidas al efecto combinado de los tres factores estudiados, humedad y pH inicial del sustrato, y tiempo de fermentación (ver anexos, cuadro XA). Se ha identificado que entre microorganismos del mismo género se pueden presentar diferencias en la relación de endoglucanasas y exoglucanasas que producen, por ejemplo, se ha encontrado que la actividad exoglucanasa es más alta que la endoglucanasa para la cepa *Trichoderma reesei* RUT C-30, pero para la cepa *T. viride* AF93252, la actividad endoglucanasa es un 78% mayor (Suesca, 2012). Esto permite entender porque a pesar de no encontrar actividad exoglucanasa durante la fermentación si se logró cuantificar actividad endoglucanasa, la cual evidenció variaciones según el nivel de humedad y pH del sustrato trabajado.

En la figura 5, se puede apreciar el comportamiento de la actividad endoglucanasa a los diferentes niveles de humedad inicial del sustrato, a lo largo del tiempo de fermentación, con el fin de analizar la influencia de la interacción entre estos dos factores sobre la producción de las enzimas. Los datos empleados para la construcción de la gráfica se encuentran en la sección 9.2 (anexos, ver cuadro VIIA).

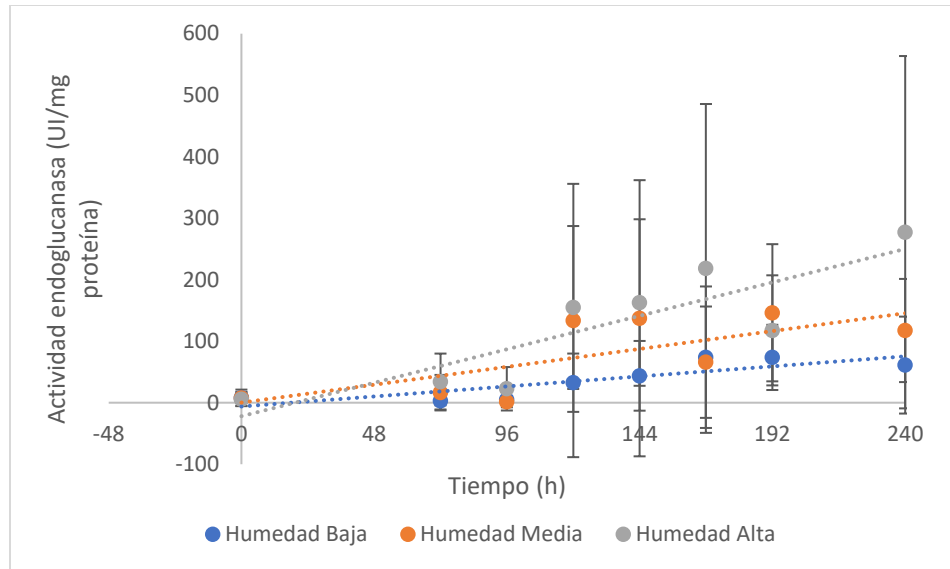


Figura 5. Comportamiento de la actividad endoglucanasa cuantificada a los tres diferentes niveles de humedad, respecto a los ocho tiempos de muestreo durante la fermentación.

Las líneas de tendencia trazadas permiten apreciar que conforme incrementó el tiempo de fermentación, aumentó también la actividad enzimática cuantificada, pero lo hizo de manera diferente para cada humedad. Un bajo contenido de humedad puede limitar la difusión correcta de nutrientes y oxígeno, dificultando el desarrollo de microorganismos (Yazid *et al.*, 2017), y con ello la producción de enzimas durante el proceso de fermentación. Lo anterior se ve reflejado en los resultados, donde al nivel de humedad 1, que corresponde al nivel más bajo, presentó la menor pendiente de aumento, seguida de la humedad 2 y la humedad 3. Sin embargo, al promediar todos los datos según los niveles de humedad, la variabilidad es amplia por lo que se hace difícil concluir tendencias, pero si la existencia de una influencia notoria de la interacción entre los dos factores sobre la actividad endoglucanasa.

En la figura 6, se observan las diferencias entre el nivel de pH 1, con respecto a los pH más ácidos, dado que la variabilidad de los datos así lo permite. Los valores de pH neutro (pH 7), no muestran un aumento en la actividad endoglucanasa al transcurrir el tiempo de fermentación. Cuando se evaluaron los otros dos niveles de pH (pH 2 y pH 3), se observa un incremento en la actividad enzimática, debido también al aumento en el

tiempo de FMS. Esto coincide con lo esperado, distintos autores han demostrado que el pH tiene un efecto sobre la producción de celulasa y hemicelulasa, y que se favorece a valores de pH más bajos (Zhang *et al.*, 2019). Los datos empleados para la construcción de la gráfica se encuentran en la sección 9.2 (anexos, ver cuadro VIIIA).

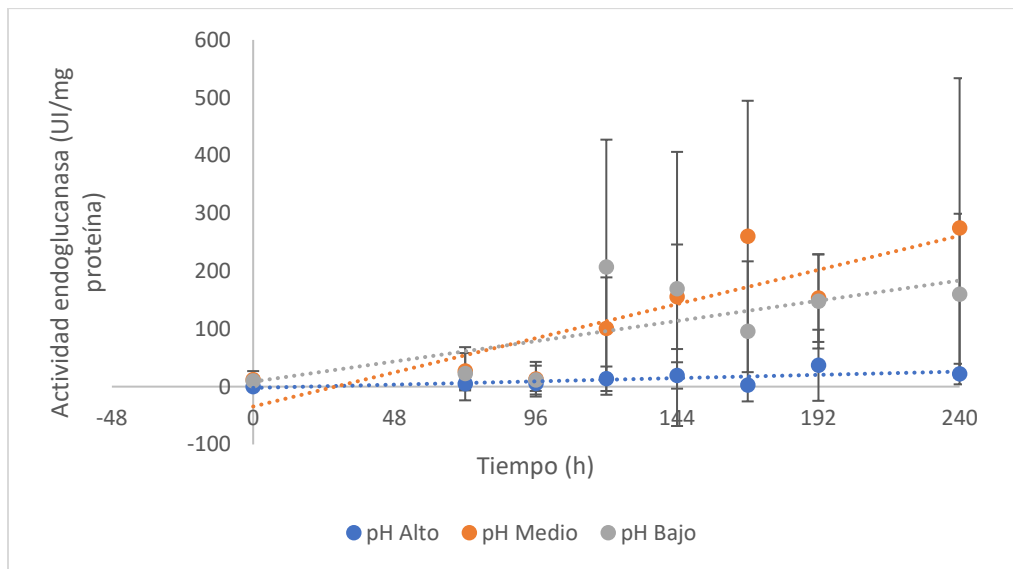


Figura 6. Comportamiento de la actividad endoglucanasa cuantificada a los tres diferentes niveles de pH, respecto a los ocho tiempos de muestreo durante la fermentación.

Cuando se analizaron los niveles de humedad, se observa que para la humedad más baja (humedad 1), la separación entre las líneas de tendencia para cada pH es baja. Por tanto, a una humedad menor a 70 % no se evidencia claramente que trabajar con pH ácidos haya sido más favorable para la producción de endoglucanasas. Para las humedades 2 y 3 se puede observar una separación de los dos pH más ácidos, con respecto al pH neutro. Sin embargo, fue para el caso de la humedad de aproximadamente 77 % donde se logró alcanzar valores de actividad enzimática iguales o superiores a los 300 UI/mg de proteína, en los dos pH más favorables (Figura 7). Díaz (2009), establece que el nivel de humedad que se puede alcanzar antes de que aparezca agua libre varía considerablemente según el sustrato, encontrándose para los sustratos lignocelulósicos valores que rondan el 80 %. Por lo que se puede decir, de manera exploratoria, al contar únicamente con dos repeticiones que lo respalden, que trabajar

cerca de la máxima humedad del sustrato permite apreciar más claramente el efecto que ejerce el pH sobre la producción de endoglucanasa, así como alcanzar mayores rendimientos. Los datos empleados para la construcción de la gráfica se encuentran en la sección 9.2 (anexos, ver cuadro IXA).

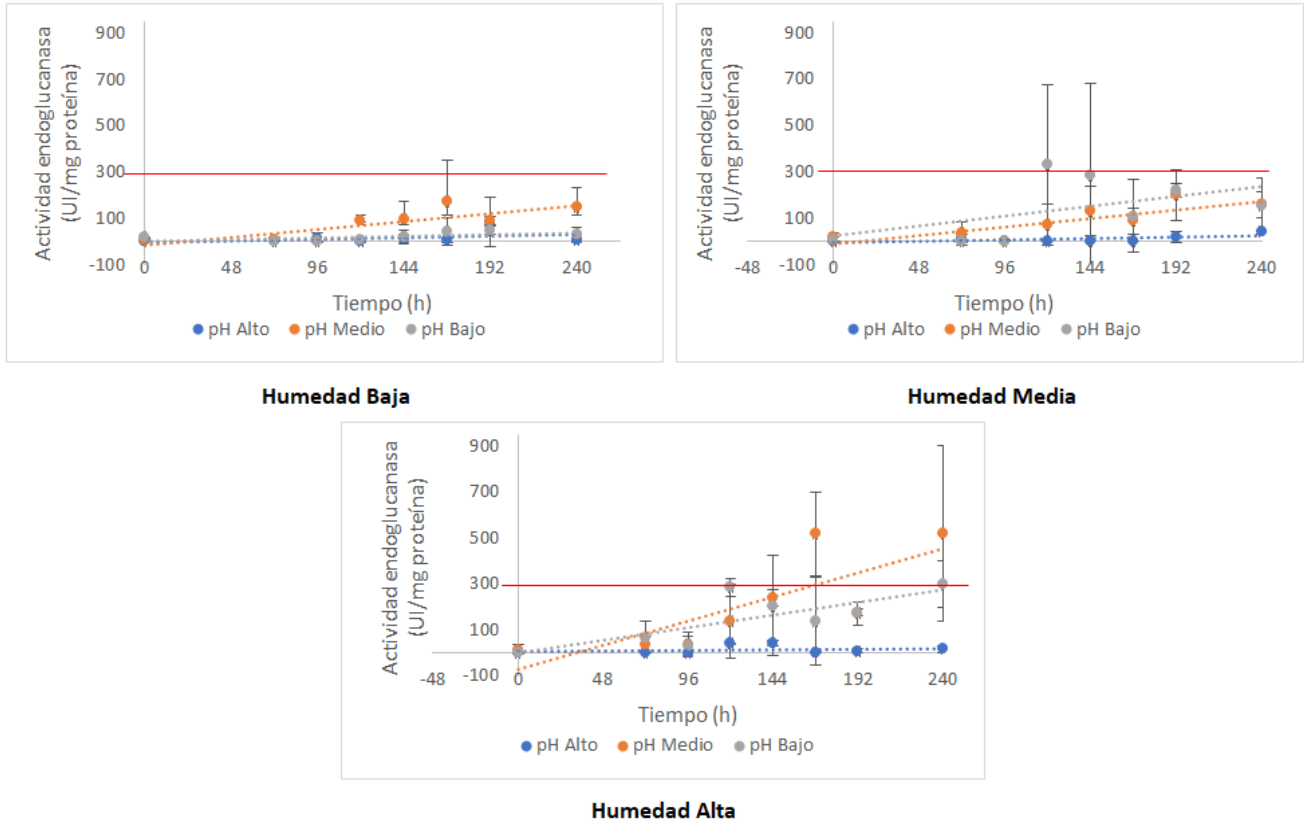


Figura 7. Comportamiento de la actividad endoglucanasa cuantificada a los tres diferentes niveles de pH, respecto a ocho tiempos de muestreo durante la fermentación, para cada nivel de humedad.

6. CONCLUSIONES

- De los once mohos analizados respecto a su capacidad para hidrolizar celulosa en placa, se seleccionó el moho V3 para emplearlo en un proceso de fermentación en medio sólido para la producción de enzimas celulasas.
- Se determinó que tanto los residuos de zanahoria como los residuos de maíz presentaron características de composición y físicas adecuadas para su empleo como sustrato en una fermentación en medio sólido, para la producción de enzimas celulasas.
- Se determinó que al llevar a cabo un proceso de fermentación sólida empleando una mezcla 50:50 de residuos de zanahoria y maíz, y el moho V3 como microorganismo fermentador, que no existe gran actividad exoglucanasa cuantificable y que la producción de esta no se ve influenciada por la humedad y pH iniciales del sustrato, así como el tiempo de fermentación.
- Se identificó que la humedad y el pH iniciales del sustrato presentaron un efecto significativo sobre la producción de enzimas endoglucanasas a lo largo del tiempo de fermentación, empleando una mezcla 50:50 de residuos de zanahoria y maíz como sustrato y el moho V3 como microorganismo fermentador.
- Al trabajar con una humedad del sustrato cercana a la máxima aceptable, fue posible evidenciar en mayor medida el efecto ejercido por el pH del medio de fermentación, sobre la producción de enzimas endoglucanasas.
- Se determinó de manera exploratoria, tomando en cuenta que solo se realizó dos repeticiones del estudio, que trabajar con humedades altas en combinación con valores de pH ácidos en el sustrato de fermentación, favorece los rendimientos de producción de enzimas endoglucanasas.

7. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar la identificación molecular del microorganismo seleccionado para utilizar en el proceso de fermentación en medio sólido, así determinar si se trata de un microorganismo sin un efecto patogénico asociado.
- Es recomendable realizar estudios a profundidad con los residuos de zanahoria como medio de evaluación de la actividad celulasa en placa, para identificar que característica intrínseca del material podría generar efecto negativo sobre la actividad enzimática.
- Al trabajar con combinaciones de residuos es recomendable analizar la composición y las características físicas de la mezcla para evaluar su carácter como sustrato en un proceso de fermentación en medio sólido.
- Se aconseja realizar pruebas empleando un pretratamiento para reducir el contenido de lignina en el sustrato de la fermentación en medio sólido, para identificar si se mejora los rendimientos de producción de exoglucanasas.
- Debido a la alta variabilidad que implica el realizar ensayos con microorganismos, así como las cuantificaciones realizadas mediante pruebas de espectrofotometría, se considera necesario trabajar una investigación similar que cuente con más repeticiones para establecer observaciones concluyentes.
- Es recomendable realizar un estudio bajo condiciones de humedad máxima del sustrato y ajustando el pH a valores más cercanos al pH natural, acidificando y basificando, para evaluar si se potencia los rendimientos de la actividad endoglucanasa.

8. BIBLIOGRAFÍA

8.1. Bibliografía citada

AGAMEZ, E., ZAPATA, R., OVIEDO, L., & BARRERA, J. 2008. Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. Revista Colombiana de Biotecnología. 10 (2): 23–34.

AOAC. 2016. Official methods of analysis of AOAC international – 20th Edition. AOAC International. Estados Unidos.

BANSAL, N., TEWARI, R., SONI, R., & SONI, S. K. 2012. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. Waste Management. 32: 1341–1346.

BHAT, M. K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnology Advances. 18: 355-383.

BELLO, D., CARRERA, E., & DÍAZ, Y. 2006. Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar. 40 (2): 45–50.

BERMÚDEZ, R. C., GARCÍA, N., SERRANO, M., RODRÍGUEZ, M. I., & MUSTELIER, I. 2014. Conversión de residuales agroindustriales en productos de valor agregado por fermentación en estado sólido. Tecnología Química. 34 (3): 263–274.

CARRANCO, M. E., CALVO, M. C. & PÉREZ-GIL, F. 2011. Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 61 (3): 233-241.

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 Current Microbiology. 57: 503–507.

CHARLES, A. V., MAURICIO, J. E., ROBLES, N., & GARZA, Y. 2007. Prospectiva biotecnológica de microorganismos extremos aislados del valle de Cuatrociénegas y zonas aledañas. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería 2007, Morelia Michoacán.

COSTA, M., TORRES, M., & REYES, A. 2012. Caracterización de enzimas hidrolíticas de *Aspergillus ficuum* producidas en fermentación sólida sobre torta de canola. Revista Colombiana de Biotecnología. 14 (1): 208–215.

DA SILVA, D. M. A., DA ROCHAE SILVA, N. M. P., DOS SANTOS, L. B., SARUBBO, L. A., & DOS SANTOS, V. A. 2017. Utilization of plaster waste for reducing the fouling caused by direct burning of vegetable biomass. Chemical Engineering Transactions. 57: 157–162.

DAS, N. G., HUQUE, K. S., AMANULLAH, S. M., DHARMAPURI, S., & MAKKAR, H. P. S. 2018. Study of chemical composition and nutritional values of vegetable wastes in Bangladesh. Veterinary and Animal Science. 5: 31–37.

DASHTBAN, M., MAKI, M., LEUNG, K. T., MAO, C. & QIN, W. 2010. Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. Critical Reviews in Biotechnology. 30 (4): 302-309.

DE LAURENTIIS, V., CORRADO, S., & SALA, S. 2018. Quantifying household waste of fresh fruit and vegetables in the EU. Waste Management. 77: 238–251.

DIAZ, A. B. 2009. Reciclado del orujo de uva como medio sólido de fermentación para la producción de enzimas hidrolíticas de interés industrial. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz, España.

ESCUADERO, J., DAZA, Z. T., GIL, N. J. & MORA, O. Y. 2013. Evaluación de las enzimas celulolíticas producidas por hongos nativos mediante fermentación en estado sólido (SSF) utilizando residuos de cosecha de caña de azúcar. Revista Colombiana de Biotecnología. 15 (1): 108-117.

EUROMONITOR INTERNATIONAL. 2018. Processed fruit and vegetables. INTERNET. Consultado el 27 de abril del 2018, en: <http://www.portal.euromonitor.com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr:2048/portal/analysis/tab>

EVELEIGH, D. E., MANDELS, M., ANDREOTTI, R., & ROCHE, C. 2009. Biotechnology for Biofuels: Measurement of saccharifying cellulase. Biotechnology for Biofuels. 2 (21): 1–8.

FLORES, D. A., MUSSATTO, S. I., CONTRERAS, J. C., BUENROSTRO, J. J., RODRÍGUEZ, R., TEIXEIRA, J. A., & AGUILAR, C. N. 2014. Typical mexican agroindustrial residues as supports for solid-state fermentation. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*. 9 (3): 289–293.

GAITÁN, M. D., & PÉREZ, L. I. 2007. Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Tesis de grado en Microbiología Industrial, Facultad de Ciencia, Pontificia Universidad Javeriana.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y CENSOS (INEC). 2014. Encuesta Nacional de ingresos y gastos de los hogares, 2013. San José, Costa Rica.

JAHANBAKHSHI, A., ABBASPOUR-GILANDEH, Y., & GUNDOSHMIAN, T. M. 2018. Determination of physical and mechanical properties of carrot in order to reduce waste during harvesting and post-harvesting. *Food Science & Nutrition*. 6: 1898–1903.

JUTURU, V., & CHUAN, J. 2014. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 33: 188–203.

KIM, D.-M., CHO, E. J., KIM, J. W., LEE, Y.-W. & CHUNG, H.-J. 2014. Production of cellulases by *Penicillium* sp. in a solid-state fermentation of oil palm empty fruit bunch. *African Journal of Biotechnology*. 13 (1): 145-155.

KUHAD, R. C., GUPTA, R., & SINGH, A. 2011. Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research*. 2: 1–10.

LEÓN, G., CUJILEMA, M. C., BARYOLO, L., ROSERO, E., CÓRDOVA, J., & RAMOS, L. B. 2017. Efecto del pH en la producción de celulasas *Aspergillus Niger* en fermentación sólida. *Revista Centro Azúcar*. 44 (2): 27–38.

LEÓN, C., FLORIÁN, P., MOSTACERO, J., ARELLANO, J., BARDALES, C., MARTIN, E., RODRIGUEZ, L., VILLANUEVA, F. 2011. Extracción de Azúcares Reductores Totales “ART” de “coronta” de *Zea mays* “maíz amarillo duro”. *UCV-Scientia*. 3 (2): 214-218.

LIOTTA, F., D’ANTONIO, G., ESPOSITO, G., FABBRICINO, M., FRUNZO, L., HULLEBUSCH, E. D. VAN, PIROZZI, F. 2014. Effect of moisture on disintegration

kinetics during anaerobic digestion of complex organic substrates. *Waste Management & Research*. 32 (1): 40–48.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.D., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*. 193: 265-275.

MACARRON, R. 1992. Purificación y caracterización de endoglucanasa III de *Trichoderma reesei* QM9414. Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid.

MALIK, S. K., MUKHTAR, H., FAROOQI, A. A., & IKRAM-UL-HAQ. 2010. Optimization of process parameters for the biosynthesis of cellulases by *Trichoderma viride*. *Pakistan Journal of Botany*. 42 (6): 4243–4251.

MANJARRÉS, K., PIÑEROS, Y., & RODRÍGUEZ, E. 2011. Evaluación del complejo enzimático producido mediante el cocultivo de *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp. en fase sólida sobre residuos de palma. *Bioagro*. 23 (1): 19–26.

MART, S., & BASE, A. 2017. Energy generation from vegetable biomass. *Agribase*.

MARTÍNEZ, C., BALCÁZAR, E., DANTÁN, E., & FOLCH, J. L. 2008. Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 50 (3): 119–131.

MOHAPATRA, S., PADHY, S., DAS MOHAPATRA, P. K., & THATOI, H. N. 2018. Enhanced reducing sugar production by saccharification of lignocellulosic biomass, *Pennisetum* species through cellulase from a newly isolated *Aspergillus fumigatus*. *Bioresource Technology*. 253: 262–272.

MONTOYA, S., SÁNCHEZ, Ó., & LEVIN, L. 2014. Evaluación de actividades endoglucanasa, exoglucanasa, lacasa y lignina peroxidasa en diez hongos de pudrición blanca. *Biotechnología En El Sector Agropecuario y Agroindustria*. 12 (2): 115–124.

MORA, V. 2015. Evaluación de dos hongos filamentosos para la biosíntesis de celulasas a partir de residuos agroindustriales de mora (*Rubus adenotrichos*) mediante fermentación en medio sólido. Tesis Licenciatura en Genética y Biotecnología, Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Costa Rica.

- MRUDULA, S., & MURUGAMMAL, R. 2011. Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid-state fermentation using coir waste as a substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42: 1119–1127.
- NEAGU, D. A., DESTAIN, J., THONART, P., & SOCACIU, C. 2012. *Trichoderma reesei* cellulase produced by submerged versus solid state fermentations. *Bulletin UASVM Agriculture*. 69 (2): 320–326.
- OTONI, C. G., LODI, B. D., LOREVICE, M. V., LEITÃO, R. C., FERREIRA, M. D., MOURA, M. R. D., & MATTOSO, L. H. C. 2018. Optimized and scaled-up production of cellulose-reinforced biodegradable composite films made up of carrot processing waste. *Industrial Crops and Products*. 121: 66–72.
- OVANDO, S. L., & WALISZEWSKI, K. N. 2005. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*. 21 (42): 113–122.
- PANDEY, A., SOCCOL, C. R., & MITCHELL, D. 2000. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*. 35: 1153–1169.
- PAREDES, D., ÁLVAREZ, M., & SILVA, M. 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. *Revista Tecnológica ESPOL*. 23 (1): 81–88.
- PLAZZOTTA, S., MANZOCCO, L., & NICOLI, M. C. 2017. Fruit and vegetable waste management and the challenge of fresh-cut salad. *Trends in Food Science and Technology*. 63: 51–59.
- PRAJAPATI, B. P., SURYAWANSHI, R. K., AGRAWAL, S., GHOSH, M., & KANGO, N. 2018. Characterization of cellulase from *Aspergillus tubingensis* NKBP-55 for generation of fermentable sugars from agricultural residues. *Bioresource Technology*. 250: 733–740.
- PROGRAMA COMPETITIVIDAD Y MEDIO AMBIENTE. 2008. Plan de Residuos Sólidos Costa Rica (PRESOL). Plan de Acción. San José, CYMA.

- RAMADAN, M. F. 2018. Enzymes in Fruit Juice Processing. In Kuddus, S. (Ed.), *Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects* (pp. 45-59). Londres, Reino Unido: Elsevier.
- ROBINSON, T., SINGH, D., & NIGAM, P. 2002. Fermentación en estado sólido: una tecnología microbiana promisorio para la producción de metabolitos secundarios. *Vitae*. 9 (2): 27–36.
- SANDOUQA, A., AL-HAMAMRE, Z., & ASFAR, J. 2019. Preparation and performance investigation of a lignin-based solid acid catalyst manufactured from olive cake for biodiesel production. *Renewable Energy*. 132: 667–682.
- SAUCEA, A. 2012. Producción de enzimas celulolíticas a partir de cultivos de *Trichoderma* sp. con biomasa lignocelulósica. Tesis de maestría. Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia.
- SCHWARZ, W. H. 2002. The cellulases and their application in degrading agro-industrial waste. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 4 (1): 6–13.
- SHARMA, A., TEWARI, R., RANA, S. S., SONI, R., & SONI, S. K. 2016. Cellulases: classification, methods of determination and industrial applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 179 (8): 1346–1380.
- SHARMA, K. D., KARKI, S., THAKUR, N. S., & ATTRI, S. 2012. Chemical composition, functional properties and processing of carrot-a review. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 49 (1): 22–32.
- SIDDIQUI, M. W., & RAHMAN, M. S. 2015. *Minimally Processed Foods: Technologies for Safety, Quality, and Convenience*. Nueva York: Springer.
- SILVA, D. F., HERGESEL, L. M., CAMPIONI, T. S., CARVALHO, A. F. A., & OLIVANETO, P. 2018. Evaluation of different biological and chemical treatments in agroindustrial residues for the production of fungal glucanases and xylanases. *Process Biochemistry*. 67: 29–37.

SINDHU, R., PANDEY, A., & BINOD, P. 2015. Solid-state Fermentation for the Production of Poly (hydroxyalkanoates). *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. 29 (2): 173–181.

SINGHANIA, R. R., ADSUL, M., PANDEY, A., & PATEL, A. K. 2017. Cellulases. In A. Pandey, S. Negi, & C. R. Soccol (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products* (pp. 73–101). Amsterdam, Países Bajos: Elsevier.

SOTO, S. 2011. Undécimo Informe sobre el Estado de la Nación en Desarrollo Humano Sostenible. Situación del Manejo de los Desechos Sólidos en Costa Rica. San José, Estado de la Nación.

SOCOL, C. R., SCOPEL, E., LETTI, L. A., KARP, S. G., WOICIECHOWSKI, A. L., & PORTO DE SOUZA, L. 2017. Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*. 1: 52–71.

SRIVASTAVA, N., SRIVASTAVA, M., MANIKANTA, A., RAMTEKE, P. W., SINGH, R. L., MISHRA, P. K., & UPADHYAY, S. N. 2018. Fungal cellulases production for biodegradation of agriculture waste. In D. Panpatte, Y. Jhala, H. Shelat, & R. Vyas (Eds.), *Microorganisms for Green Revolution. Microorganisms for Sustainability* (Vol. 7, pp. 75–89). Singapore: Springer.

SU, H.-L., ZHAO, S., JIANG, S.-X., LIAO, Z.-X., DUAN, C.-J., & FENG, J.-X. 2017. Cellulase with high β -glucosidase activity by *Penicillium oxalicum* under solid state fermentation and its use in hydrolysis of cassava residue. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 33 (37): 1–11.

SUKUMARAN, R. K., SINGHANIA, R. R., & PANDEY, A. 2005. Microbial cellulases-production, applications and challenges. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 64 (11): 832–844.

SUN, H., GE, X., HAO, Z. & PENG, M. 2010. Cellulase production by *Trichoderma* sp. on apple pomace under solid state fermentation. *African Journal of Biotechnology*. 9 (2): 163-166.

- TEJIRIAN, A. & XU, F. 2011. Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds. *Enzyme and Microbial Technology*. 48 (3): 239-247.
- TONINI, D., ALBIZZATI, P. F., & ASTRUP, T. F. 2018. Environmental impacts of food waste: Learnings and challenges from a case study on UK. *Waste Management*. 76: 744–766.
- VAISHNAV, N., SINGH, A., ADSUL, M., DIXIT, P., SANDHU, S. K., MATHUR, A., SINGHANIA, R. R. 2018. *Penicillium*: The next emerging champion for cellulase production. *Bioresource Technology Reports*. 2: 131–140.
- VILCHES, L. 2002. Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz. Tesis de grado en Biología con mención en Microbiología y Patología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- VODNAR, D. C., CĂLINOIU, L. F., DULF, F. V., ȘTEFĂNESCU, B. E., CRIȘAN, G., & SOCACIU, C. 2017. Identification of the bioactive compounds and antioxidant, antimutagenic and antimicrobial activities of thermally processed agro-industrial waste. *Food Chemistry*. 231: 131–140.
- WOJCIESZAK, D., PRZYBYŁ, J., RATAJCZAK, I., GOLIŃSKI, P., JANCZAK, D., WAŚKIEWICZ, A., SZENTNER, K., & WOŹNIAK, M. 2020. Chemical composition of maize stover fraction versus methane yield and energy value in fermentation process. *Energy*. 198: 1-7.
- WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION. 2017. Celullase. INTERNET. Consultado el 23 de setiembre del 2017, en: <http://www.worthington-biochem.com/cel/default.html>.
- YAZID, N. A., BARRENA, R., KOMILIS, D., & SÁNCHEZ, A. 2017. Solid-state fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: a review. *Sustainability*. 9 (224): 1–28.
- YANTI, E. S., HENUK, Y. L., GINTING, J., TAFSIN, M. & HAMDAN. 2018. Content of fibre fraction complete feed silage-based waste corn (*Zea mays*) in the fermentation

process with local microorganism "Probiotic MOIYL". *Earth and Environmental Science*. 260: 1-7.

ZHANG, F., BUNTERNGSOOK, B., LI, J.-X., ZHAO, X.-Q., CHAMPRED, V., LIU, C.-G. & BAI, F.-W. 2019. Regulation and production of lignocellulolytic enzymes from *Trichoderma reesei* for biofuels production. *Advances in Bioenergy*. 4: 79-119.

ZHANG, X., & ZHANG, Y. P. 2013. Cellulases: Characteristics, sources, production, and application. In S. Yang, H. A. El-Enshasy, & N. Thongchul (Eds.), *Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers* (pp. 131–146). Nueva Jersey, Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc.

ZHANG, Y.-H. P., HONG, J. & YE, X. 2009. Cellulase Assays. *Methods in molecular biology*. 581: 213-231.

ZHAO, C., MU, H., ZHAO, Y., WANG, L., & ZUO, B. 2018. Microbial characteristics analysis and kinetic studies on substrate composition to methane after microbial and nutritional regulation of fruit and vegetable wastes anaerobic digestion. *Bioresource Technology*. 249: 315–321.

ZAWAWI, D., MOHD, Z., ANGZZAS, S., HALIZAH, A. & ASHUVILA, M. 2014. Exploring of agro waste (pineapple leaf, corn stalk and napier grass) by chemical composition and morphological study. *Bioresources*. 9 (1): 872-880.

8.2. Bibliografía consultada

CHRISTIAENS, S., UWIBAMBE, D., UYTTEBROEK, M., VAN DROOGENBROECK, B., VAN LOEY, A. M. & HENDRICKX, M. E. 2015. Pectin characterization in vegetable waste streams: A starting point for waste valorization in the food industry. *LWT - Food Science and Technology*. 61: 275-282.























COTO, O. 2013. *Uso de los residuos agrícolas orgánicos como fuente de energía: aprovechamiento de recursos y reducción de gases de efecto invernadero en Costa Rica*. FITTACORI, San José.

- GARBANZO, G. & VARGAS, M. 2014. Determinación fisicoquímica de diez mezclas de sustratos para producción de almácigos, Guanacaste, Costa Rica. *Revista de las Sedes Regionales*. 15 (30): 151-168.
- HÖLKER, U. HÖFER, M. & LENZ, J. 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64: 175–186.
- KANG, S. W., PARK, Y. S., LEE, J. S., HONG, S. I. & KIM, S. W. 2004. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 91: 153-156.
- MORALES, H. 2006. Aislamiento, selección y evaluación de la actividad celulolítica de cuatro cepas de hongos nativos de Costa Rica. Tesis de grado en Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago.
- PENSUPA, N., JIN, M.K.M., ARCHER, D.B., & DU, C., A solid state fungal fermentation-based strategy for the hydrolysis of wheat straw., *Bioresource Technology*. 149: 261-267.
- WOOD, T. M. & BHAT, K. M. 1988. Methods for measuring cellulase activities. *Methods in Enzymology*. 160: 87-112.

9. ANEXOS

9.1. Datos tomados en pruebas preliminares

Cuadro IA. Mohos aislados de residuos de piña, clasificados según si logran o no hidrolizar celulasa en medio de cultivo carboximetilcelulosa (CMC).

Moho	Seleccionado	Fotografía	Moho	Seleccionado	Fotografía
A1	No		V5	Si	
N1	No		V6	Si	
N2	No		V7	Si	
N3	No		V8	No	
B1	No		V9	No	
B2	No		V10	No	No hay imagen
B3	No		V11	Si	
B4	No		V12	Si	
V1	Si		V13	Si	
V2	Si		V14	No	
V3	Si		V15	Si	
V4	No		V16	Si	

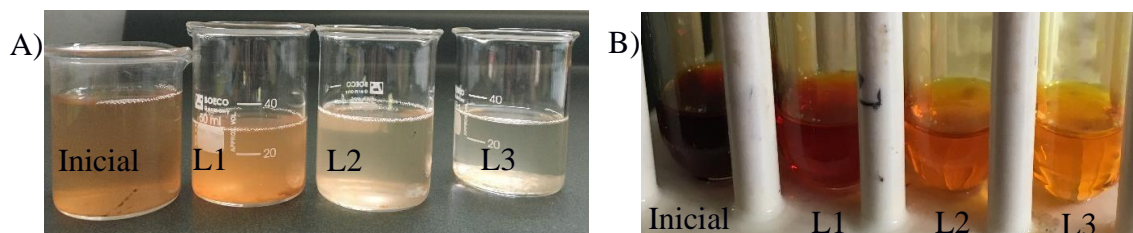


Figura 1A. A) Extracto de cáscaras inicial y los extractos posteriores a los diferentes lavados (L1, L2, L3). B) Tubos correspondiente para la determinación cualitativa de azúcares reductores (método DNS).

Cuadro IIA. Valores de pH a lo largo del tiempo para mezcla de residuos de zanahoria y maíz al adicionar 0,120 mL de NaOH 0,1 M y 0,025 mL de HCl 0,1 M.

Tiempo	pH al adicionar NaOH			pH al adicionar HCl		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	7,494	7,645	7,534	4,477	4,551	4,563
10	7,177	7,173	7,178	4,704	4,688	4,678
20	6,998	6,992	7,003	4,717	4,719	4,683
30	6,949	6,919	6,951	4,734	4,728	4,707
60	6,834	6,794	6,783	4,725	4,726	4,698
90	6,828	6,770	6,763	NA	NA	NA

NA: no analizado, dato no se cuantificó.

9.2. Datos de pruebas definitivas

Cuadro IIIA. Datos tomados en pruebas de caracterización para los tres lotes de residuos de zanahoria y de maíz, analizados como sustratos para un proceso de fermentación sólida.

Residuo	Lote	Repetición	PCH (%)	CRA	DE (g/mL)	pH	Humedad (%)	Tamaño partícula (mm)
Zanahoria	1	1	6,41	11,12	0,304	5,84	2,23	1,88
		2	6,70	11,25	0,309	5,82	2,01	1,95
		3	6,59	10,92	NA	5,83	1,93	1,88
	2	1	6,43	12,10	0,335	5,89	2,24	1,99
		2	6,35	12,28	0,333	5,84	2,33	1,94
		3	6,30	12,72	NA	5,79	2,36	1,94
	3	1	6,04	12,17	0,345	5,83	3,10	1,97
		2	6,09	12,13	0,339	5,83	3,31	1,96
		3	5,88	12,00	NA	5,80	3,41	1,87
Maíz	1	1	NA	9,64	0,159	5,86	7,66	0,87
		2	NA	9,18	0,159	5,87	7,63	0,88
		3	NA	10,29	0,163	5,86	7,53	0,86
	2	1	NA	11,25	0,159	5,89	7,23	1,10
		2	NA	10,40	0,161	5,87	7,78	1,04
		3	NA	11,79	0,162	5,89	7,34	1,09
	3	1	NA	10,19	0,164	5,90	8,88	1,11
		2	NA	10,01	0,174	5,90	8,56	1,10
		3	NA	10,26	0,169	5,88	8,06	1,18

NA: no analizado, dato no se cuantificó. PCH: punto crítico de humedad; CRA: capacidad de retención de agua; DE: densidad de empaque.

Cuadro IVA. Niveles humedad y pH iniciales del sustrato, empleados en las dos repeticiones del proceso fermentación en medio sólido.

Nivel	Réplica	Humedad (%) ¹		pH ²	
		Repetición 1	Repetición 3	Repetición 1	Repetición 3
1	1	67,15	68,45	6,923	6,954
	2	70,50	68,31	6,957	6,842
	3	67,49	68,38	7,047	6,908
2	1	75,35	74,00	4,972	5,159
	2	73,21	73,95	4,980	5,302
	3	72,01	73,64	5,008	5,299
3	1	75,68	76,88	4,382	4,060
	2	77,72	77,80	4,386	4,248
	3	77,52	78,72	4,396	4,244

¹El nivel 1 aplica para los tratamientos 1, 2 y 3; el nivel 2 para los tratamientos 4, 5 y 6; el nivel 3 para los tratamientos 7, 8 y 9. ²Cada réplica corresponde a un tratamiento diferentes.

Cuadro VA. Actividad exoglucanasa cuantificada para los tres niveles de humedad a los diferentes tiempos de muestreo en el proceso de fermentación en medio sólido.

Tiempo (h)	Actividad exoglucanasa (UI/mg proteína)		
	Humedad 1	Humedad 3	Humedad 3
0	6 (± 4)	5 (± 4)	4 (± 2)
72	0 (ND)	0 (ND)	0 (ND)
96	0 (ND)	0 (ND)	0 (ND)
120	0 (ND)	2 (± 3)	1 (± 1)
144	1 (± 1)	1 (± 2)	0 (ND)
168	20 (± 34)	1 (± 2)	20 (± 35)
192	5 (± 7)	23 (± 18)	8 (± 14)
240	1 (± 1)	0 (ND)	0 (ND)

ND: no determinado. Datos expresados como promedio ± desviación estándar, n=6.

Cuadro VIA. Actividad exoglucanasa cuantificada para los tres niveles de pH a los diferentes tiempos de muestreo en el proceso de fermentación en medio sólido.

Tiempo (h)	Actividad exoglucanasa (UI/mg proteína)		
	pH 1	pH 2	pH 3
0	7 (\pm 3)	5 (\pm 4)	3 (\pm 2)
72	0 (ND)	0 (ND)	0 (ND)
96	0 (ND)	0 (ND)	0 (ND)
120	0 (ND)	1 (\pm 1)	3 (\pm 3)
144	1 (\pm 1)	1 (\pm 2)	0 (ND)
168	0 (ND)	21 (\pm 33)	20 (\pm 35)
192	9 (\pm 13)	13 (\pm 21)	14 (\pm 15)
240	0 (ND)	0 (ND)	1 (\pm 1)

ND: no determinado. Datos expresados como promedio \pm desviación estándar, n=6.

Cuadro VIIA. Actividad endoglucanasa cuantificada para los tres niveles de humedad a los diferentes tiempos de muestreo en el proceso de fermentación en medio sólido.

Tiempo (h)	Actividad endoglucanasa (UI/mg proteína)		
	Humedad 1	Humedad 2	Humedad 3
0	8 (\pm 9)	8 (\pm 13)	6 (\pm 11)
72	3 (\pm 7)	16 (\pm 29)	34 (\pm 45)
96	5 (\pm 13)	2 (\pm 3)	23 (\pm 35)
120	33 (\pm 47)	134 (\pm 222)	155 (\pm 132)
144	44 (\pm 57)	137 (\pm 225)	163 (\pm 135)
168	74 (\pm 115)	66 (\pm 91)	218 (\pm 267)
192	74 (\pm 53)	146 (\pm 112)	118 (\pm 89)
240	61 (\pm 79)	117 (\pm 84)	277 (\pm 286)

ND: no determinado. Datos expresados como promedio \pm desviación estándar, n=6.

Cuadro VIII.A. Actividad endoglucanasa cuantificada para los tres niveles de pH a los diferentes tiempos de muestreo en el proceso de fermentación en medio sólido.

Tiempo (h)	Actividad endoglucanasa (UI/mg proteína)		
	pH 1	pH 2	pH 3
0	0 (ND)	12 (\pm 15)	10 (\pm 9)
72	5 (\pm 11)	27 (\pm 31)	22 (\pm 46)
96	5 (\pm 13)	13 (\pm 30)	11 (\pm 25)
120	14 (\pm 21)	101 (\pm 88)	207 (\pm 221)
144	19 (\pm 23)	156 (\pm 90)	169 (\pm 237)
168	3 (\pm 5)	260 (\pm 235)	96 (\pm 121)
192	37 (\pm 61)	153 (\pm 76)	148 (\pm 82)
240	22 (\pm 18)	275 (\pm 259)	160 (\pm 140)

ND: no determinado. Datos expresados como promedio \pm desviación estándar, n=6.

Cuadro IX.A. Actividad endoglucanasa cuantificada para los tres niveles de pH en cada uno de los niveles de humedad, a los diferentes tiempos de muestreo en el proceso de fermentación en medio sólido.

Tiempo	Actividad endoglucanasa (UI/mg proteína)								
	Humedad 1			Humedad 2			Humedad 3		
	pH 1	pH 2	pH 3	pH 1	pH 2	pH 3	pH 1	pH 2	pH 3
0	0 (ND)	7 (\pm 9)	18 (\pm 2)	0 (ND)	16 (\pm 23)	8 (\pm 11)	0 (ND)	14 (\pm 20)	3 (\pm 4)
72	0 (ND)	9 (\pm 13)	0 (ND)	14 (\pm 19)	36 (\pm 50)	0 (ND)	0 (ND)	36 (\pm 35)	67 (\pm 68)
96	15 (\pm 22)	0 (ND)	0 (ND)	0 (ND)	2 (\pm 2)	3 (\pm 4)	0 (ND)	37 (\pm 52)	31 (\pm 44)
120	0 (ND)	92 (\pm 23)	6 (\pm 8)	0 (ND)	72 (\pm 90)	330 (\pm 344)	41 (\pm 3)	139 (\pm 161)	285 (\pm 40)
144	14 (\pm 19)	98 (\pm 78)	20 (\pm 28)	0 (ND)	129 (\pm 107)	283 (\pm 400)	45 (\pm 12)	240 (\pm 35)	205 (\pm 217)
168	6 (\pm 8)	174 (\pm 177)	42 (\pm 59)	0 (ND)	88 (\pm 57)	110 (\pm 156)	2 (\pm 3)	518 (\pm 184)	135 (\pm 191)
192	85 (\pm 106)	88 (\pm 21)	48 (\pm 19)	19 (\pm 22)	200 (\pm 110)	220 (\pm 28)	6 (\pm 9)	171 (\pm 51)	176 (\pm 16)
240	8 (\pm 7)	147 (\pm 87)	29 (\pm 34)	41 (\pm 8)	158 (\pm 57)	153 (\pm 120)	16 (\pm 17)	519 (\pm 382)	297 (\pm 101)

ND: no determinado. Datos expresados como promedio \pm desviación estándar, n=2.

Cuadro XA. Análisis de varianza para la evaluación del efecto simple y combinado de tres condiciones del proceso de fermentación sólida, sobre producción de exoglucanasas y endoglucanasa.

Fuente de variación	Exoglucanasas		Endoglucanasas	
	F Ratio	Prob > F	F Ratio	Prob > F
Humedad	0,0154	0,9014	15,9483	0,0001 ¹
pH	1,0236	0,3134	19,5296	<,0001 ¹
Tiempo	0,6928	0,4067	28,5704	<,0001 ¹
Humedad*tiempo	0,1056	0,7457	6,5535	0,0116 ¹
pH*tiempo	0,9052	0,3431	5,4943	0,0205 ¹
Humedad*pH	0,0893	0,7656	6,4082	0,0125 ¹

¹Se encontraron diferencias significativas al evaluar el efecto simple o combinado de los factores, $p < 0,05$.