



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL
CENTRO DE LA REPÚBLICA (PROPAC)

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**PRODUCCIÓN DE XILANASAS DE
Trichoderma longibrachiatum IMI 061758
EN CULTIVO AGITADO Y
CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DE LOS
CALDOS DE FERMENTACIÓN**

T E S I S

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
**MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
DE ALIMENTOS**

Presenta:

IBQ. ULISES MORA ALVAREZ

CENTRO UNIVERSITARIO

Querétaro, Qro.; Marzo de 1999.

No Adq. M59638
No. Título _____
Clas. 660.634
M827p



LIBRARY OF THE
UNIVERSITY OF CALIFORNIA
BERKELEY
CALIFORNIA 94720-1500
TEL: (415) 845-5100
FAX: (415) 845-5100
WWW: WWW.LIBRARY.UCB.EDU

1 2 3 4 5

IBO. ULISES MORA ALVAREZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

“PRODUCCIÓN DE XILANASAS DE *Trichoderma longibrachiatum* IMI 061758 EN CULTIVO AGITADO Y CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DE LOS CALDOS DE FERMENTACIÓN”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Presenta:

IBQ. ULISES MORA ALVAREZ

Dirigido por:

DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

SINODALES

DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

Presidente

DR. EDMUNDO BRITO DE LA FUENTE

Secretario

DR. MARIANO GUTIÉRREZ ROJAS

Vocal

MC. BLANCA E. GARCÍA ALMENDÁREZ

Suplente

DR. SERGIO HUERTA OCHOA

Suplente

Q.M.J. MERCEDES ESPARZA GARCÍA

Director de la Facultad de Química

DRA. MA. GUADALUPE BERNAL SANTOS

Directora de Investigación y Pósgrado

A Él, que es el pajar.

A ustedes, que son la paja.

A ti, por ser la aguja.

Agradecimientos:

Agradezco a todas las personas que de una forma o de otra estuvieron involucradas en la realización de este trabajo, especialmente a:

Blanca E. García A., Carlos Regalado G., Edmundo Brito de la Fuente, Mariano Gutiérrez R., Sergio Huerta O., John R. Whitaker, Marco Vinicio Ramírez M., Roberto Parra Saldívar, Flavia Loarca P., Brisia Villalón C., Irma A. Rivera B., Sandra Rodríguez A., Juana Ibarra Silva, Julio Cesar Meza G., Raúl J. Páramo R., Adriana A. Porras C., Salvador Estrada G., Juan Manuel Uribe M., Sara Ruiz Esparza M., Fco. Javier Gallegos D., Evodio Romero R., Enriqueta "Queta" Guevara, Guillermo Hernández, al CONACyT y a todas las demás personas que por mi mala memoria olvidé mencionar.

Mención aparte merecen: Sofía M. Arvizu M., mi esposa; Paula Alvarez A., mi madre; Alejandro M. Alvarez, Yunuen G. M. Alvarez, Juan Pablo M. Alvarez, mis hermanos; Eliseo Pérez A., mi primo; la familia de Sofía, que me adoptó y me dio lugar en su mesa; y la familia Castro Gracia, por ser también mi familia y mi casa... A ustedes mi más grande agradecimiento.

Ulises M. Alvarez

Resumen

Las xilanasas son enzimas que tienen varias aplicaciones en la industria alimentaria. Una de sus aplicaciones más importantes es en la elaboración del pan. Una vez que se agregan a la masa, las xilanasas alteran de forma controlada la absorción de agua e incrementan el volumen del producto. En el presente trabajo se desarrolló un nuevo medio (EL-1) para la producción de xilanasas de *Trichoderma longibrachiatum*. La viscosidad de los caldos de fermentación se estudió utilizando un reómetro modificado con un impulsor helicoidal. La viscosidad se estudió debido al impacto que tiene sobre el desempeño de los fermentadores.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la producción de xilanasas de *Trichoderma longibrachiatum* IMI 061758 en cultivo agitado a escala laboratorio, y estudiar la reología de los caldos de fermentación.

Las fermentaciones se llevaron a cabo a 30 ° C. Se utilizó glucosa y xilano de avena como fuente de carbono. Se determinó actividad de xilanasas, proteína extracelular y biomasa en el extracto crudo. Una unidad (U) de actividad se definió como μmoles de azúcares reductores liberados por minuto. Los datos brutos obtenidos del reómetro (torque y velocidad angular del impulsor) se transformaron a viscosidad de proceso y velocidad efectiva de deformación utilizando teoría de mezclado.

En sales Volgel (SV), se alcanzaron máximos de 68.4 U (a los 3 días) y de 3.39 U (a los 2.5 días) en glucosa y xilano, respectivamente. Se observó que la producción de xilanasas es inductiva por el xilano. La secreción de proteína se asoció con el crecimiento del hongo. En EL-1, se alcanzaron máximos de 487 U (a los 3 días) y de 118 U (a los 2.5 días) en glucosa y xilano, respectivamente. La mayor actividad enzimática observada en EL-1 se asoció al crecimiento del hongo. Tanto en EL-1 como en SV, la actividad enzimática se incrementó rápidamente durante los primeros 3 días, e inmediatamente alcanzado el valor máximo disminuyó con el tiempo.

En la ventana de velocidades de deformación analizada, los caldos de fermentación se comportaron como fluidos no newtonianos dilatantes (con valores de n entre 1.14 y 1.75). Este comportamiento se asoció al crecimiento del hongo y fue independiente del medio y de la fuente de carbono. Se propone una modificación al método de Brito y col. (1998), para calcular la viscosidad de los caldos de fermentación y los resultados así obtenidos se compararon con los que se obtuvieron al utilizar el método clásico de Metzner y Otto (1957), obteniéndose una coincidencia perfecta entre los valores de viscosidad. Se observó que la viscosidad de los caldos de fermentación es independiente del medio y de la fuente de carbono con una excepción: EL-1 con glucosa, donde la viscosidad de los caldos se asoció directamente al crecimiento del hongo.

Palabras clave: xilanasas, *Trichoderma longibrachiatum*, viscosidad de proceso, impulsor helicoidal.

A b s t r a c t

Xylanases are widely used in the food industry. An important application of xylanases is their use in bread making. Once added to bread dough, xylanases are able to change and control water absorption and improve loaf volume. We developed a new medium (EL-1), for production of xylanases from *Trichoderma longibrachiatum*. The viscosity of fermentation broths was investigated using a helical ribbon impeller fitted to a rheometer. Viscosity was investigated due to its importance in the performance of bioreactors.

The aim of this work was to characterize xylanase production and the rheology of fermentation broths from *Trichoderma longibrachiatum* IMI 061758.

Fermentations were carried out at 30 °C. Glucose and oat spelt xylan were used as carbon sources. Xylanase activity, protein and biomass in the crude extract supernatant were determined. One unit (U) of activity was defined as μ moles of reducing sugars released per minute. Raw data (i.e., torque and impeller angular velocity) from rheometer were transformed into process viscosity and effective rate of deformation by using mixing theory.

When growing in Vogel salts (VS), maximums of 68.4 U (after 3 days) and 3.39 U (after 2.5 days) in glucose and xylan, respectively, were achieved. Xylanase production was founded to be inductive by xylan. Protein secretion was growth associated. When growing in EL-1, maximums of 487 U (after 3 days) and 118 U (after 2.5 days) in glucose and xylan, respectively, were achieved. Higher enzyme activities observed in EL-1 were growth associated. In both, EL-1 and VS, enzyme activity increased rapidly during the first 3 days, and soon after reaching maximum decreased with time.

In the range of shear rates here studied, fermentation broths were found to behave as shear thickening fluids (n ranged from 1.14 to 1.75). This observed behavior was growth associated and independent on medium and carbon source. A modification to the method of Brito *et. al.* (1998), is proposed to calculate the viscosity of fermentation broths and the results therefore obtained were compared with those obtained with the classical Metzner and Otto (1957) approach, thus obtaining a perfect match among the viscosity values. The viscosity of fermentation broths was founded to be independent on medium and carbon source with one exception: EL-1 with glucose, where viscosity was growth associated.

Keywords: xylanases, *Trichoderma longibrachiatum*, process viscosity, helical ribbon impeller

Índice general

Resumen.....	i
Abstract.....	ii
Índice general.....	iii
Índice de tablas.....	vi
Índice de figuras.....	vii
Lista de símbolos utilizados.....	ix
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	4
2.1 La biotecnología en la producción de alimentos.....	5
2.1.1 Las enzimas como aditivos en la producción de alimentos.....	5
2.1.2 Usos de las enzimas en la industria alimentaria.....	7
2.1.3 Ventajas y desventajas del uso de enzimas.....	7
2.2 El xilano, fuente renovable de energía.....	10
2.2.1 Distribución y estructura química.....	10
2.2.2 Xilano de angiospermas.....	11
2.2.3 Xilano de gimnospermas.....	11
2.2.4 Función biológica del xilano en las plantas.....	13
2.2.5 El xilano, fuente renovable de materias primas.....	16
2.3 Xilanasas.....	18
2.3.1 Endoxilanasas.....	18
2.3.2 β -xilosidasas.....	20
2.3.3 α -L-arabinofuranosidasas.....	21
2.3.4 Glucuronidasas y esterasas.....	21
2.3.5 Aplicaciones biotecnológicas.....	22
2.4 <i>Trichoderma</i> , un género de hongos filamentosos con potenciales aplicaciones biotecnológicas.....	24
2.4.1 Taxonomía.....	24
2.4.2 Factores que afectan el crecimiento de <i>Trichoderma</i> sp.....	25
2.4.2.1 Factores nutricionales.....	25
2.4.2.2 Factores ambientales.....	25
2.4.3 Producción de enzimas.....	26
2.4.3.1 Enzimas producidas por <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	27
2.5 Reología de fluidos de comportamiento complejo y suspensiones.....	29
3. Objetivos.....	35
3.1 Objetivo general.....	36
3.2 Objetivos específicos.....	36
4. Materiales y Métodos.....	37
4.1 Material biológico.....	38
4.2 Reactivos.....	38
4.3 Confirmación de identidad de la cepa mediante la técnica de microcultivo.....	38
4.4 Medios utilizados.....	38

4.4.1 Sales Vogel.....	38
4.4.2 Medio mínimo.....	39
4.4.3 EL-1.....	39
4.5 Producción de xilanasas en cultivo agitado.....	40
4.6 Detección de biomasa.....	40
4.7 Actividad de xilanasas en el extracto crudo.....	41
4.8 Actividad de proteasas en el extracto crudo.....	41
4.9 Proteína extracelular total en el extracto crudo.....	42
4.10 Tiempo de duración de las fermentaciones.....	42
4.11 Estabilidad del extracto crudo frente a la temperatura.....	42
4.12 Producción de xilanasas en sales Vogel.....	43
4.13 Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de xilanasas.....	43
4.14 Producción de xilanasas en medio mínimo.....	44
4.15 Producción de xilanasas en EL-1.....	44
4.16 Caracterización de la reología de los caldos de fermentación.....	44
4.16.1 Método de Metzner y Otto.....	46
4.16.2 Método modificado de Brito y col.....	47
4.17 Análisis estadístico de los datos.....	48
5. Resultados y discusión.....	49
5.1 Identificación de la cepa.....	50
5.2 Determinación del tiempo de fermentación.....	54
5.3 Evaluación de biomasa mediante la técnica de densidad óptica.....	57
5.4 Estabilidad del extracto crudo frente a la temperatura.....	64
5.5 Producción de xilanasas en sales Vogel.....	67
5.5.1 Puntos destacables y resumen.....	80
5.6 Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de xilanasas	81
5.6.1 Puntos destacables y resumen.....	91
5.7 Crecimiento de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> IMI 061758 en medio mínimo	92
5.8 Producción de xilanasas en EL-1.....	93
5.8.1 Puntos destacables y resumen.....	99
5.9 Caracterización de la reología de los caldos de fermentación.....	101
5.9.1 Estimación del índice de flujo.....	101
5.9.1.1 Evolución del índice de flujo en los caldos con sales Vogel.....	104
5.9.1.2 Evolución del índice de flujo en los caldos con EL-1.....	104
5.9.1.3 Efecto de la concentración de xilanasas en el medio sobre el comportamiento reológico de los caldos de fermentación.....	105
5.9.2 Estimación de la viscosidad de proceso de los caldos de fermentación	110
5.9.2.1 Curvas de flujo obtenidas mediante el método de Metzner y Otto	110
5.9.2.1.1 Curvas de flujo de los caldos con sales Vogel.....	110
5.9.2.1.2 Curvas de flujo de los caldos con EL-1.....	110
5.9.2.2 Curvas de flujo obtenidas mediante el método de Brito y col.....	114
5.9.2.2.1 Modificaciones a la propuesta de Brito y col.....	115

5.9.2.2.2 Curvas de flujo de los caldos de fermentación de <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	118
5.9.3 Puntos destacables y resumen.....	126
6. Conclusiones.....	128
6.1 Conclusiones.....	129
6.2 Principales aportes del trabajo.....	129
6.3 Recomendaciones para trabajos futuros.....	130
7. Referencias.....	131
8. Anexos.....	141
A.1 Curvas de calibración de xilosa con las variantes <i>a</i> y <i>b</i> del reactivo de Sinner y Puls.....	142
A.2 Curva de calibración de BSA con el reactivo de Bio-Rad.....	143
A.3 Calibración del reómetro Haake RV20-M5 modificado con un sensor helicoidal.....	144

Índice tablas

Tabla 2.1 Aportes de la biotecnología a la producción de alimentos.....	6
Tabla 2.2 Usos de algunas enzimas en la industria alimentaria.....	8
Tabla 5.1 Actividad proteolítica en el extracto crudo de dos fermentaciones de <i>T. longibrachiatum</i> IMI 061758 en sales Vogel.....	75
Tabla 5.2 Proteína extracelular total en el extracto crudo y actividad enzimática máxima en dos fermentaciones de <i>T. longibrachiatum</i> IMI 061758 en sales Vogel con glucosa, a dos niveles, como fuente de carbono: 0.55 mM (nivel bajo), y 55.5 mM (nivel alto).....	85
Tabla 5.3 Composición del medio de cultivo, EL-1, formulado para caracterizar la producción de xilanasas de <i>T. longibrachiatum</i> IMI 061758.....	95
Tabla 5.4 Actividad enzimática máxima de las fermentaciones con <i>T. longibrachiatum</i> IMI 061758 durante las distintas etapas de experimentación.....	98
Tabla 5.5 Evaluación de la incorporación del valor de 2π en la constante $A(n)$, y corrección propuesta mediante la ecuación (5.10).....	117
Tabla 5.6 Valores de la función $k_S(n)$ calculados de acuerdo a la ec. (5.1).....	124

Índice de figuras

Figura 2.1 Estructura de los xilanos en: (a) angiospermas, y (b) gimnospermas	12
Figura 2.2 Esquema simplificado de la composición química de la pared celular primaria de los vegetales.....	14
Figura 2.3 (A) Enzimas involucradas en la degradación del xilano. (B) Ataque de la β -xilosidasa a los xilooligosacáridos liberados por las endoxilanasas.....	19
Figura 2.4 Número de potencia contra número de Reynolds para fluidos newtonianos.....	31
Figura 4.1 Impulsor helicoidal utilizado como sensor para el estudio de las propiedades reológicas de los caldos de fermentación y sus principales relaciones geométricas.....	45
Figura 5.1 <i>Trichoderma longibrachiatum</i> IMI 061758 en agar papa-dextrosa.....	51
Figura 5.2 Microfotografías de <i>T. longibrachiatum</i> IMI 061758.....	52
Figura 5.3 Desarrollo de <i>T. longibrachiatum</i> IMI 061758 en sales Volgel con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono.....	55
Figura 5.4 Barrido de sales Volgel con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono.....	58
Figura 5.5 Sensibilidad de la técnica de densidad óptica al desarrollo de biomasa en sales Volgel con glucosa y xilano como fuente de carbono.....	59
Figura 5.6 Evaluación de la técnica de densidad óptica para detectar el desarrollo de biomasa en sales Volgel con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono.....	61
Figura 5.7 Estabilidad frente a la temperatura del extracto crudo de una fermentación de <i>T. longibrachiatum</i> IMI 061758 en sales Volgel.....	65
Figura 5.8 Desarrollo de <i>T. longibrachiatum</i> IMI 061758 en sales Volgel con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono.....	68
Figura 5.9 Actividad enzimática y pH de una fermentación de <i>T. longibrachiatum</i> IMI 061758 en sales Volgel con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono.....	72
Figura 5.10 Actividad enzimática y proteína extracelular total de una fermentación de <i>T. longibrachiatum</i> IMI 061758 en sales Volgel con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono.....	74
Figura 5.11 Desarrollo de <i>T. longibrachiatum</i> IMI 061758 en sales Volgel con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono (2).....	77
Figura 5.12 Consumo de sustrato contra actividad xilanolítica en el extracto crudo de dos fermentaciones de <i>T. longibrachiatum</i> IMI 061758 en sales Volgel con xilano como fuente de carbono.....	79
Figura 5.13 Biomasa y pH de dos fermentaciones de <i>T. longibrachiatum</i> IMI 061758 en sales Volgel con glucosa como fuente de carbono.....	82
Figura 5.14 Desarrollo de <i>T. longibrachiatum</i> IMI 061758 en sales Volgel con glucosa, a dos niveles, como fuente de carbono: 0.55 mM (nivel bajo), y 55.5 mM (nivel alto).....	83

Figura 5.15 Esquema simplificado que ilustra el mecanismo quimiosmótico de generación de ATP.....	89
Figura 5.16 Desarrollo de <i>T. longibrachiatum</i> IMI 061758 en EL-1 con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono.....	96
Figura 5.17 Biomasa, pH y evolución del índice de flujo (n) de los caldos de dos fermentaciones de <i>T. longibrachiatum</i> IMI 061758 en sales Volgel con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono.....	102
Figura 5.18 Biomasa, pH y evolución del índice de flujo (n) de los caldos de dos fermentaciones de <i>T. longibrachiatum</i> IMI 061758 en EL-1 con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono.....	103
Figura 5.19 Curvas de flujo para cuatro soluciones de una xilanasas comercial en una solución amortiguadora de acetatos (10mM, pH 5.0), a 30 ± 0.5 °C.....	106
Figura 5.20 Desarrollo de <i>T. longibrachiatum</i> IMI 061758 en EL-1 con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono.....	108
Figura 5.21 Propuesta del mecanismo por el cual los caldos de fermentación de <i>T. longibrachiatum</i> IMI 061758 se comportan como fluidos no newtonianos dilatantes.....	109
Figura 5.22 Curvas de flujo de los caldos de fermentación de <i>T. longibrachiatum</i> IMI 061758 en sales Volgel con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono.....	111
Figura 5.23 Curvas de flujo de los caldos de fermentación de <i>T. longibrachiatum</i> IMI 061758 en EL-1 con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono.....	112
Figura 5.24 Curvas de flujo de los caldos de fermentación de <i>T. longibrachiatum</i> IMI 061758 en sales Volgel con: (a) glucosa (b) xilano como fuente de carbono.....	120
Figura 5.25 Curvas de flujo de los caldos de fermentación de <i>T. longibrachiatum</i> IMI 061758 en EL-1 con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono.....	121
Figura 5.26 Viscosidad de proceso (η_e) contra velocidad efectiva de deformación (γ_e) de los caldos de fermentación de <i>T. longibrachiatum</i> IMI 061758 en sales Volgel con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono.....	122
Figura 5.27 Viscosidad de proceso (η_e) contra velocidad efectiva de deformación (γ_e) de los caldos de fermentación de <i>T. longibrachiatum</i> IMI 061758 en EL-1 con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono.....	123
Figura 5.28 Datos crudos del reómetro, T contra N , para los caldos de fermentación de <i>T. longibrachiatum</i> IMI 061758.....	125
Figura A.1 Curvas de calibración de D-(+)-xilosa en una solución amortiguadora de acetatos-HCl (50 mM, pH 4.5) con las variantes (a) y (b) del reactivo de Sinner y Puls (1978).....	142
Figura A.2 Curva de calibración de BSA en solución salina con el reactivo de Bio-Rad.....	143
Figura A.3 Curva de potencia newtoniana del impulsor helicoidal.....	146
Figura A.4 Calibración del reómetro Haake RV20-M5, modificado con un sensor helicoidal.....	148

Lista de símbolos utilizados

- g , aceleración debida a la gravedad ($9.81 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$).
- D , diámetro interno del tanque utilizado en los estudios de reología (m).
- d , diámetro del impulsor helicoidal (m).
- h , altura del impulsor helicoidal (m).
- T_{max} , torque máximo del reómetro Haake RV20-M5 ($4.9\cdot 10^{-2} \text{ N}\cdot\text{m}$).
- T , torque registrado por el reómetro Haake RV20-M5 ($\text{N}\cdot\text{m}$).
- N_{max} , velocidad rotacional máxima del reómetro Haake RV20-M5 (500 rpm).
- N , velocidad rotacional del impulsor (rps).
- $\%D$, porcentaje de velocidad de deformación registrada en el reómetro Haake RV20-M5 (por ciento).
- $\%\tau$, porcentaje de esfuerzo registrado en el reómetro Haake RV20-M5 (por ciento).
- P , potencia consumida por el impulsor helicoidal ($\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$).
- Re , número de Reynolds (adimensional).
- N_P , número de potencia (adimensional).
- ρ , densidad del fluido analizado ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$).
- μ , viscosidad newtoniana ($\text{Pa}\cdot\text{s}$).
- η_e , viscosidad efectiva ($\text{Pa}\cdot\text{s}$).
- τ , esfuerzo cortante (Pa).
- n , índice de flujo del modelo de la ley de la potencia (adimensional).
- m , índice de consistencia del modelo de la ley de la potencia ($\text{Pa}\cdot\text{s}^{-1}$).
- $\dot{\gamma}$, velocidad de deformación (s^{-1}).
- $\dot{\gamma}_e$, velocidad de deformación promedio o efectiva en las proximidades del impulsor (s^{-1}).
- k_S , constante de Metzner-Otto, correlaciona la velocidad rotacional del impulsor con la $\dot{\gamma}_e$ (adimensional).
- $k_S(n)$, función que relaciona el índice de flujo y la velocidad rotacional del impulsor con la $\dot{\gamma}_e$ (adimensional).
- k_P , constante de potencia newtoniana (adimensional).
- $k_P(n)$, función que establece la relación entre el N_P y el Re en función de n (adimensional).
- b , constante de la función $k_P(n)$ [24.64 ± 2.76 , adimensional].
- c , constante de la función $k_P(n)$ [0.91 ± 0.02 , adimensional].

1. Introducción

La producción de más y mejores alimentos es una prioridad global. La biotecnología ha desarrollado una multitud de herramientas que nos permiten incrementar la variedad, productividad y eficiencia en la producción de alimentos. En este contexto, la producción de enzimas es una de las principales aportaciones de la biotecnología a la industria alimentaria. A pesar de la importancia de las enzimas como aditivos en el procesamiento de los alimentos, en México no se cuenta con desarrollos propios que permitan el establecimiento de una independencia tecnológica en lo que a producción de enzimas se refiere.

Las xilanasas son enzimas de origen natural que actúan sobre los polímeros de xilano, componente importante de la fracción hemicelulósica de algunos vegetales. El xilano es un heteropolímero ramificado, por lo que su degradación enzimática hasta el monómero, xilosa, es un proceso complejo que involucra a varias enzimas denominadas genéricamente xilanasas. Las aplicaciones comerciales de las xilanasas incluyen su uso como aditivos en la elaboración del pan; la conversión de desechos agroindustriales a xilosa; la clarificación de jugos; la extracción de café, aceites vegetales y almidón; y el blanqueado selectivo de pulpa de papel (Sunna y Antranikian, 1997).

Se ha observado que los hongos filamentosos del género *Trichoderma* son productores de celulasas y hemicelulasas extracelulares. En particular *Trichoderma longibrachiatum* ha probado ser una excelente fuente de xilanasas (Royer y Nakas, 1989). Sin embargo, la producción de enzimas de hongos filamentosos a gran escala plantea problemas técnicos serios. Por un lado, es muy importante conocer en detalle el metabolismo del organismo productor: cuales son sus requerimientos nutricionales, cuando produce el metabolito de interés, y como puede incrementarse esta producción. Por otro lado, los hongos filamentosos son organismos sensibles que esporulan, con la consecuente pérdida de productividad, si se ven sometidos a estrés mecánico. Por tanto, hay que seleccionar cuidadosamente un sistema que permita mantener el medio homogeneizado con un mínimo de estrés para el hongo.

La determinación de las propiedades reológicas de los caldos de fermentación ayuda en la selección objetiva del impulsor que proporcionará la mejor distribución de los nutrientes del medio y por tanto, una mayor producción. Dada la naturaleza heterogénea de los caldos de fermentación, no es posible el uso de reómetros convencionales en la determinación de las propiedades reológicas de los caldos. Una alternativa al uso de reómetros convencionales, es el uso de sistemas de mezclado acoplados a torquímetros de precisión para determinar propiedades reológicas de proceso (Metzner y Otto, 1957). Esta reología de proceso sólo será válida, bajo condiciones de similitud geométrica, para un impulsor y un contenedor dados.

Este estudio reporta la producción de xilanasas de *Trichoderma longibrachiatum* IMI 061758 a escala laboratorio en cultivo agitado, y la caracterización reológica de los caldos de fermentación.

2. Antecedentes

2.1 La biotecnología en la producción de alimentos.

La producción de más y mejores alimentos es una prioridad global. La biotecnología ha desarrollado una multitud de herramientas que permiten incrementar la variedad, productividad y eficiencia en la producción de alimentos (Harlander, 1991). Por biotecnología se puede entender la aplicación de diferentes procesos científicos y tecnológicos a la explotación de sistemas biológicos para beneficio del hombre. Los *sistemas biológicos* son plantas, animales, microorganismos o a cualquier parte de estos seres vivos.

La biotecnología ha permitido superar muchas de las limitaciones de la producción de alimentos. Por ejemplo, la ingeniería genética permite el intercambio de información genética entre, virtualmente, cualquier especie; y el cultivo de células vegetales establece la generación y/o conservación de plantas con características deseables en la agricultura. Algunos de los aportes de la biotecnología a la producción de alimentos se resumen en la tabla 1.

2.1.1 Las enzimas como aditivos en la producción de alimentos

La producción de enzimas es una de las principales aportaciones de la biotecnología a la industria alimentaria. Las enzimas son proteínas que aceleran reacciones químicas que de otra manera se llevarían a cabo muy lentamente o, definitivamente, no se efectuarían. Las enzimas reaccionan formando un complejo enzima-sustrato, que da lugar a la transformación del producto deseado. Después de que la reacción se completa, el complejo se separa liberando por una parte el producto y regenerando la enzima por el otro.

Cualquier planta, animal o microorganismo es una fuente potencial de enzimas, sin embargo se deben de tomar en cuenta los costos de producción asociados. De los muchos factores involucrados, hay dos áreas críticas que son determinantes en costos: rendimientos óptimos y una eficiente recuperación del producto (Penet, 1991).

Tabla 2.1. Aportes de la biotecnología a la producción de alimentos

Agricultura	Ganadería	Desarrollo de productos para el procesamiento de alimentos	Manejo de desechos y desarrollo de productos de valor agregado
Plantas con resistencia natural a plagas.	Producción de hormonas de crecimiento más eficientes.	Mutación y transformación de microorganismos de interés comercial (levaduras, bacterias y mohos).	Tratamiento de aguas residuales.
Variedades resistentes a temperaturas elevadas, altas concentraciones salinas y sequías.	Desarrollo de nuevos antibióticos y mejores vacunas.	Ingeniería de proteínas	Biorremediación de suelos.
Plantas de crecimiento acelerado.	Producción de anticuerpos monoclonales para diagnóstico en ganadería.	Producción de acidulantes, aminoácidos, agentes antimicrobianos (nisina), sabores, espesantes (dextranos, goma xantana), vitaminas, edulcorantes (aspartame) y potenciadores de sabor.	Conversión de desechos celulósicos y hemicelulósicos a azúcares fermentables.
Desarrollo de especies compatibles con herbicidas biodegradables que no contaminan el medio ambiente.	Generación de animales transgénicos productores de sustancias de interés en medicina (ej., hormonas de crecimiento humano en leche de cabra).	Desarrollo de métodos de detección rápida de microorganismos patógenos en los alimentos.	Transformación de subproductos agrícolas sin procesar a combustibles y químicos de interés en el área de alimentos.
Transferencia de los genes bacterianos que permiten la fijación de nitrógeno atmosférico a plantas no leguminosas.		Desarrollo de biosensores para el análisis en línea de los alimentos.	

Fuente: Harlander, 1991

Actualmente, la tecnología del ADN recombinante ha permitido el desarrollo de microorganismos sobreproductores de enzimas; la ingeniería de proteínas ha hecho posible el "diseño" de enzimas de alta especificidad, estabilidad mejorada y actividad catalítica aumentada; y el mejoramiento y desarrollo de nuevas técnicas de separación eficientes y gentiles con el ambiente es otra área que abre nuevas posibilidades (Singh y Singh, 1996).

2.1.2 Usos de las enzimas en la industria alimentaria

El mercado mundial para las enzimas se estimaba en \$625 millones de dólares en 1991, siendo los Estados Unidos el principal productor (Anónimo, 1991). Del total de enzimas producidas, alrededor del 62% se destinan a la industria alimentaria, el 33% a la elaboración de detergentes, y el 5% restante se utiliza en la industria textil (Anónimo, 1991; Gross, 1991). Las enzimas se usan rutinariamente en la industria alimentaria para la producción de quesos, aderezos, jugos, aditivos, edulcorantes, etc. Además, se utilizan como agentes texturizantes y generadores de aromas y sabores deseables (Harlander, 1991). La tabla 2, muestra algunas de las enzimas utilizadas en la industria alimentaria y su aplicación.

2.1.3 Ventajas y desventajas del uso de enzimas

Generalmente se piensa en las enzimas como aditivos caros y exóticos, cuando un análisis costo-beneficio mostraría un balance a favor del productor (Anónimo, 1991; Welser, 1991). La acción de algunas hidrolasas (celulasas, hemicelulasas, amilasas, etc.), puede disminuir la viscosidad de alimentos fluidos o en solución, lo que disminuye costos de bombeo. Además, la mayoría de las enzimas trabajan mejor a temperaturas moderadas (10-80 °C), y en valores de pH cercanos a la neutralidad (entre 4 y 8). Esto no sólo contribuye a disminuir costos, sino que también disminuye el tiempo de producción y permite establecer un mejor control sobre el proceso (Wiseman, 1996). Por otro lado, su uso no implica la adquisición de equipos complicados y costosos, por el contrario, supone el uso del equipo ya establecido en la línea de producción.

Tabla 2.2. Usos de algunas enzimas en la industria alimentaria

Ramo industrial	Enzima	Aplicación
Producción de azúcar y jarabes	Amiloglucosidasa	Obtención de glucosa a partir de almidón
Producción de azúcar y jarabes	Glucosa isomerasa (inmovilizada)	Isomerización de glucosa a fructosa
Producción de azúcar y jarabes	Invertasa	Conversión de sacarosa a glucosa y fructosa
Elaboración de quesos	Renina	Desnaturalización de la caseína
Elaboración de jugos	Pectinasas	Clarificación
Elaboración de jugos	Celulasas y hemicelulasas	Ablandamiento de la fruta
Repostería y lácteos	β -Galactosidasa (inmovilizada)	Degradación de la lactosa
Repostería	Lipasas	Producción de ácidos grasos
Producción de bebidas alcohólicas	α -Amilasa	Hidrólisis parcial de almidón
Producción de bebidas alcohólicas	Amiloglucosidasa	Conversión de dextranos a glucosa
Producción de bebidas alcohólicas	Proteasas	Producción de aminoácidos
Productos cárnicos	Papaína	Ablandamiento de carnes
Panificación	Proteasas	Disminución del tiempo de mezclado
Panificación	Peptidasas	Mejoramiento de sabor
Panificación	α -Amilasas	Producción de bióxido de carbono
Panificación	Xilanasas	Incremento en el volumen de la masa, mejoramiento de textura, mejoramiento de color, retraso de la retrogradación del almidón

Fuente: van Oort y col., 1995; Wiseman, 1996.

Las enzimas mejoran la calidad de los alimentos y alargan la vida de anaquel. Son biodegradables, generan pocos subproductos, y no contaminan el medio ambiente. Adicionalmente, las enzimas son extractos naturales y cuando se obtienen de fuentes inocuas reciben, a su vez, categoría de aditivos seguros (*GRAS*, siglas en inglés de "*Generally Recognized As Safe*", Wiseman, 1996).

La tecnología de inmovilización de enzimas ha incrementado el valor funcional de estos catalizadores. La concentración de una gran cantidad de enzimas en un soporte estable permite el procesamiento continuo de grandes cantidades de alimentos líquidos (leche, jugos, bebidas alcohólicas, jarabes de glucosa, etc.). Una de las dificultades más grandes en el uso de enzimas inmovilizadas es la poca estabilidad de las proteínas en el soporte, sobre todo debido al incremento de temperatura ocasionado por el paso del alimento. La ingeniería de proteínas, mediante ingeniería genética, ha permitido superar este problema diseñando enzimas más estables al calor que las originales. Como en el caso de la glucosa isomerasa, enzima utilizada en la conversión de glucosa a fructosa, en donde se substituyó el residuo de lisina 253 por un residuo de arginina (Wiseman, 1996).

Una traba seria al uso generalizado de enzimas en la industria alimentaria es la oposición de la gente a consumir productos que involucren la palabra biotecnología (Busch, 1991; Nielsen, 1991; Anónimo, 1992; Graham, 1992; Hall, 1992; Miller, 1992; Pariza, 1992; Stewart, 1992). Sin embargo, todos los trabajos mencionados coinciden en señalar que no existen evidencias reportadas que asocien a estos alimentos con un riesgo adicional para el consumidor. También se indica que la falta de difusión del trabajo científico implicado es otro factor que retrasa la aceptación de estos productos.

2.2 El xilano, fuente renovable de energía

2.2.1 Distribución y estructura química

El xilano es uno de los principales componentes de la pared celular de los vegetales y la más abundante de las hemicelulosas (Settlerfield y Bayley, 1961; Whistler y Richards, 1970; Bonner y Galston, 1973; Weinstein y Albersheim, 1979; Joseleau y col., 1992). Como hemicelulosas, se conoce a la fracción soluble en álcali que se extrae del tejido vegetal previamente despectinado (Hall, 1983; Wilkie, 1983). Esta fracción está constituida por un grupo complejo de polímeros que incluye a los xilanos, mananos, glucomananos y galactoglucomananos (Northcote, 1972; Hess, 1975). Los tejidos leñosos, la paja de los cereales, las hojas de las gramíneas, las hojas que cubren el maíz y la cáscara de avena, son buenas fuentes de hemicelulosas (Bonner y Galston, 1973; McCrae y col., 1994).

La mayoría de los xilanos son heteropolisacáridos ramificados, cuyo esqueleto carbonado está compuesto de residuos de D-(+)-xilosa unidos por enlaces β -1,4 (Montgomery y Smith, 1956; Biely, 1985; Puls y Poutanen, 1989; Uffen, 1997). Los xilanos precipitan de soluciones acuosas con alcohol, son hidrolizados por ácidos fuertes (Wilkie, 1983), y pueden agruparse por su solubilidad en agua (Kulp, 1968). Las fracciones insoluble y soluble del xilano son estructuralmente similares, la insolubilidad viene dada por diferencias en el arreglo de las moléculas, grado de polimerización, y por interacción o asociación con otros polímeros de la pared celular (Kulp, 1968).

Las unidades de D-xilosa del esqueleto carbonado presentan substituciones en las posiciones C-2, C-3 y C-5. El grado de substitución depende del tipo de planta y del desarrollo alcanzado al momento de la extracción del xilano (Wong y col., 1988; Joseleau y col., 1992). Los substituyentes más comunes son residuos acetil, arabinosil y glucuronosil (Whistler y Richards, 1970).

2.2.2 Xilano de angiospermas

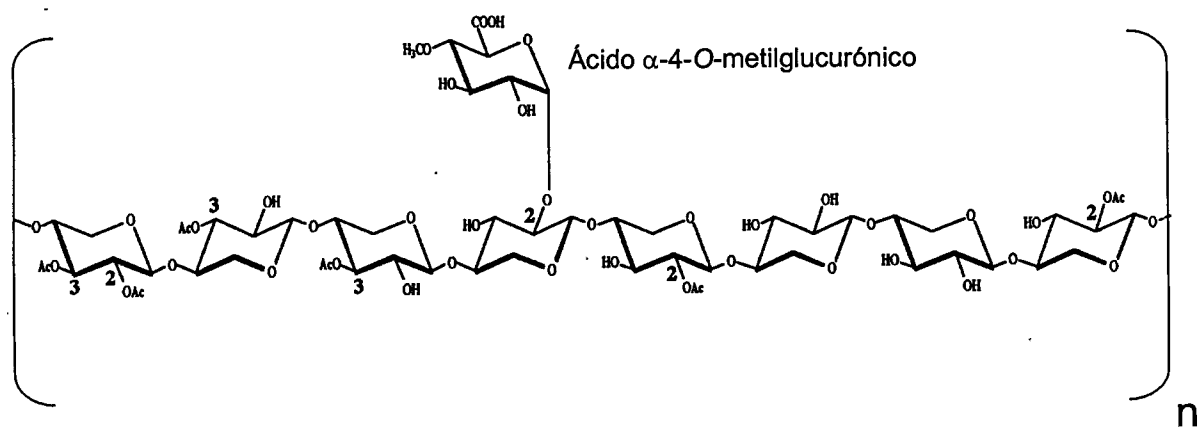
El xilano de las angiospermas (plantas verdaderas con flores, como los nogales, el maple y la cereza), es un O-acetil-4-O-metilglucuronoxilano (fig. 2.1.a). Estos polisacáridos constan de al menos 70 residuos de D-xilosa con un grado medio de polimerización entre 150 y 200 (Timell, 1964; Zinbo y Timell, 1965). Aproximadamente cada diez residuos de xilosa se presenta una substitución, en C-2, de ácido 4-O-metilglucurónico unido por un enlace glucosídico α -1,2 (Lindberg y col., 1973; Woodward, 1984). Los residuos de D-xilosa de estos xilanos pueden estar esterificados con residuos acetil en la posición C-2 y/o en la posición C-3 (Lindberg y col., 1973; Uffen, 1997).

La relación molar promedio entre xilosa : ácido 4-O-metilglucurónico : ácido acético en estos xilanos es de 10:1:7 (Bouveng, 1961). Whistler y Richards (1970), señalan a los grupos acetilo como responsables parciales de la solubilidad del xilano en agua. Estos grupos pueden removerse del esqueleto carbonado mediante una extracción con álcali (Dekker, 1989).

2.2.3 Xilano de gimnospermas

En las gimnospermas (plantas verdaderas sin flores, como el pino, el cedro y el abeto), se encuentran arabino-4-O-metilglucuronoxilanos (fig. 2.1.b). Estos xilanos son más pequeños y menos ramificados que los de las angiospermas: su grado medio de polimerización se encuentra entre 70 y 130 (Zinbo y Timell, 1967). También presentan un mayor contenido de ácido 4-O-metilglucurónico (Sunna y Antranikian, 1997). Estos heteropolisacáridos no presentan acetilaciones en la posición C-2. En su lugar, se encuentran residuos de α -L-arabinofuranosa unidos por enlaces glucosídicos α -1,3 a la posición C-3 de las unidades de D-xilosa (Montgomery y Smith, 1956; Biely, 1985; Puls y Schuseil, 1993; Uffen, 1997).

(a)



(b)

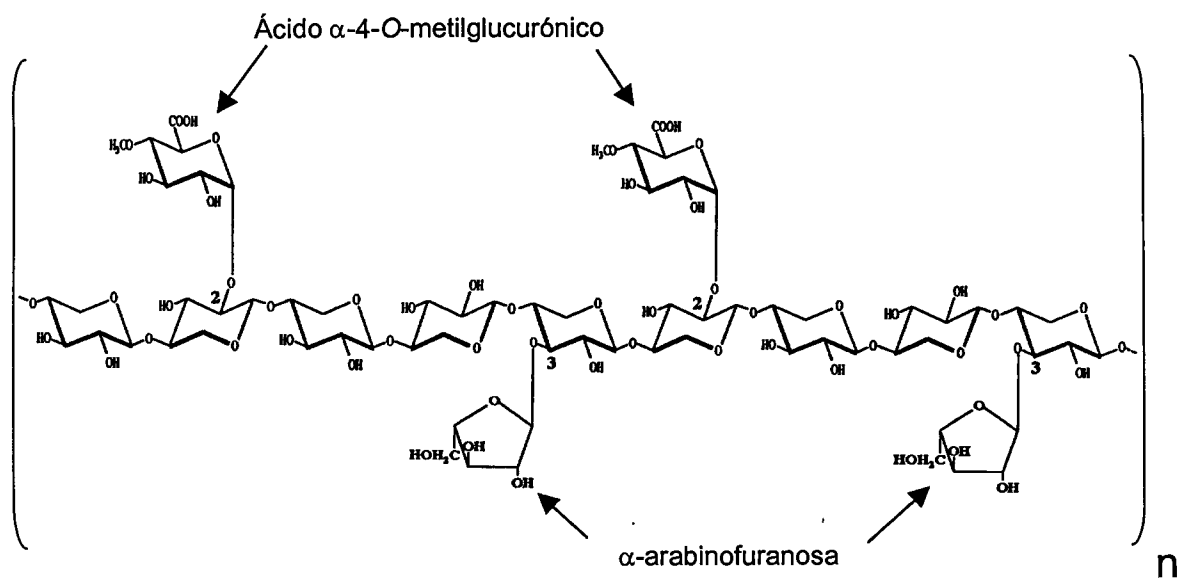


Figura 2.1. Estructura de los xilanos en: (a) angiospermas, y (b) gimnospermas. Los números indican las posiciones donde se llevan a cabo las sustituciones. Ac: Grupo acetil (modificada de Sunna y Antranikian, 1997).

La relación molar promedio entre xilosa : ácido 4-O-metilglucurónico : arabinofuranosa en estos xilanos es de 8:1.6:1 (Zinbo and Timell, 1967). En estos xilanos se pueden encontrar cantidades considerables de compuestos fenólicos, tales como ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico) y ácido *p*-cumárico (ácido 4-hidroxicinámico), esterificando los residuos de α -L-arabinofuranosa en la posición C-5 (Kato y Nevins, 1985; Hartley y Ford, 1989). Hartley y col. (1990), encontraron que estos compuestos fenólicos pueden dimerizar para formar puentes entre moléculas de xilano.

2.2.4 Función biológica del xilano en las plantas

Los estudios sobre la función biológica del xilano en las plantas no son muy abundantes. El xilano es uno de los principales componentes de la pared celular, en donde llega a constituir del 5 al 15% de la pared (porcentaje de peso fresco). Siendo superado sólo por la celulosa, que constituye del 10 al 15% de la pared celular (porcentaje de peso fresco; Settlefield y Bayley, 1961). En la pared celular, las pectinas y el xilano forma un gel amorfo que da soporte a las microfibrillas de celulosa (Meyer y col., 1973; Hess, 1975). Dentro de este gel amorfo, las moléculas de xilano parecen estar orientadas paralelamente a las microfibrillas de celulosa y en contacto muy estrecho con las mismas (Northcote, 1972).

Algunos trabajos indican que los xilanos se encuentran formando una capa intermedia entre las microfibrillas de celulosa y la capa exterior de pectinas y lignina. Uniéndose covalentemente a las pectinas y no covalentemente a la celulosa, como se indica en la figura 2.2 (Baver y col., 1973; Biely, 1985; Jeffries, 1990). Joseleau y col. (1992), observaron que la unión entre los xilanos y la celulosa se da principalmente por puentes de hidrógeno. Mientras que Hartley y col. (1990), sugieren que los residuos de los ácidos, ferúlico y *p*-cumárico, pueden estar involucrados en la unión covalente de las moléculas de xilano a las pectinas.

Sin embargo, McCrae y col. (1994), observaron que el uso de una feruloil esterasa y de una *p*-cumaril esterasa producidas por *Aspergillus awamori* no contribuyeron

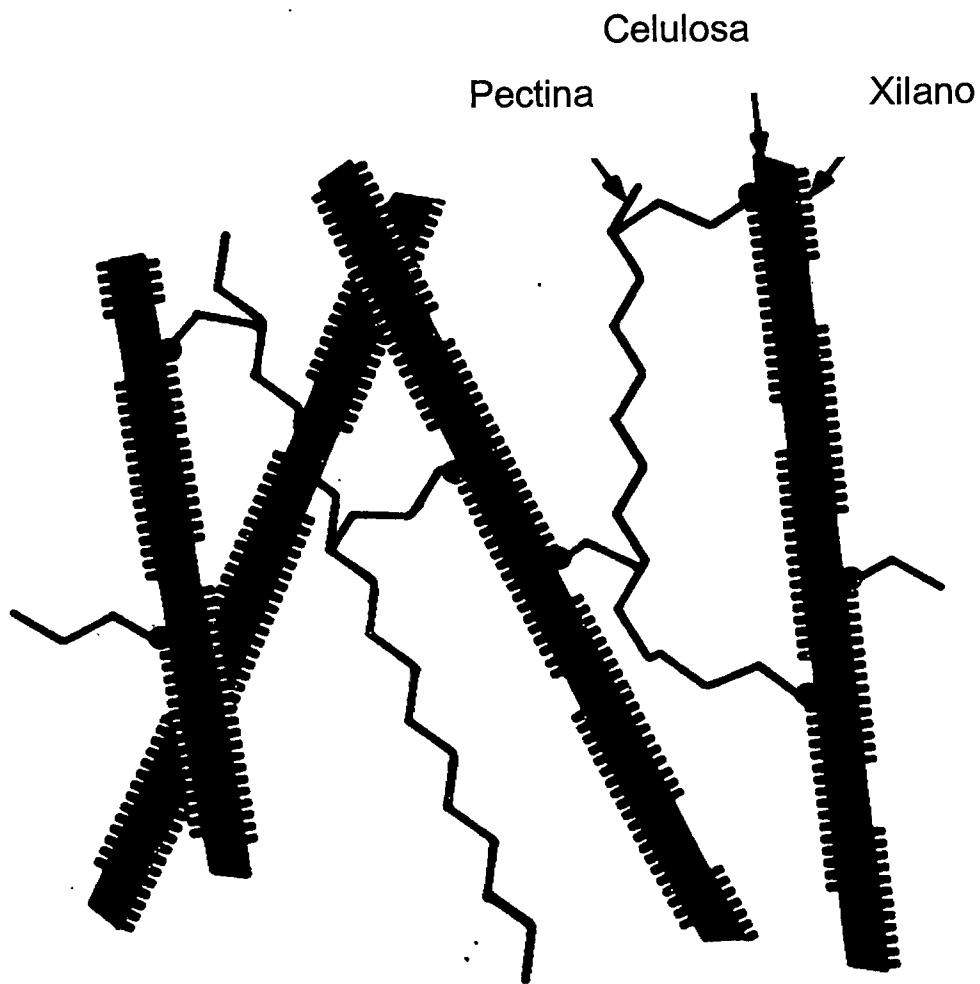


Figura 2.2. Esquema simplificado de la composición química de la pared celular primaria de los vegetales (modificada de Albersheim, 1976)

significativamente a la hidrólisis de la pared celular vegetal cuando se utilizaba una mezcla comercial de enzimas como agente degradante. Estos resultados sugieren que los residuos de los ácidos ferúlico y *p*-cumárico, no contribuyen de manera significativa a la estabilidad de la pared celular. Pero como lo señalan McCrae y col. (1994), esta evidencia debe ser considerada con precaución, debido a que no es posible generalizar las observaciones obtenidas con dos esterases de un solo microorganismo que actúan sobre pared celular aislada de un limitado número de especies vegetales.

Por otra parte, Viikari y col. (1994), aportan evidencia de que los residuos acetil que se encuentran esterificando al xilano tienen un papel importante en la unión del xilano a la lignina. Esto es consistente con la naturaleza del xilano presente en las angiospermas, que presenta sustituciones en los carbonos C-2 y C-3 de la cadena principal con residuos acetil.

Hall (1983), comenta que aunque el modelo estructural de Albersheim (1976, fig. 2.2) no toma en cuenta las proteínas presentes en la pared celular, y a pesar de que el xilano no es el polisacárido predominante en la hemicelulosa de todas las plantas, resulta ser una buena aproximación de la arquitectura de la pared celular primaria de los vegetales.

Perlin y Suzuki (1965), observaron la contaminación de los pentosanos (xilanos) del trigo con celulosa, y señalaron a la asociación íntima que se da entre la hemicelulosa y la celulosa como causa probable de esta contaminación. Los resultados de Perlin y Suzuki permitían suponer que, consecuentemente, las preparaciones de celulosa estaban contaminadas con hemicelulosas. Esta suposición ha sido confirmada en investigaciones posteriores (Hrmová y col., 1989; Senior y col., 1989; Royer y col., 1992), dando soporte al modelo estructural para pared celular vegetal desarrollado por Albersheim (1976).

La interacción del xilano con la celulosa y las capas subsecuentes de lignina en la pared celular primaria proporciona estabilidad mecánica a las células y por tanto, a la planta (Hartley y Ford, 1989, Uffen, 1997). Esta misma interacción, hace que las fibrillas de celulosa y las moléculas de xilano sean prácticamente inaccesibles a enzimas de origen microbiano en el tejido intacto (Stone y col., 1969; Grethlein, 1985; Hartley y Ford, 1989; Viikari y col., 1994; Uffen, 1997). La limitada área específica (Stone y col., 1969), la pobre porosidad de la madera (Wong y col., 1988), y el tamaño promedio de los poros en las fibras (Grethlein, 1985), resultado del arreglo molecular de la pared celular, se señalan como factores responsables de la limitada accesibilidad enzimática de la celulosa y del xilano *in situ*.

2.2.5 El xilano, fuente renovable de materias primas

Después de la celulosa, el xilano es el polímero más abundante sobre la Tierra y una de las principales reservas de carbono reducido (Uffen, 1997). El xilano y la celulosa conforman más del 50% de la biomasa vegetal. Juntos, estos polímeros constituyen la fuente más abundante de carbono orgánico. Y al ser fotosintetizados por las plantas, se convierten en la fuente de energía renovable más abundante (Wilkie, 1983; Coughlan, 1985; Jeffries, 1990; Gilbert y Hazlewood, 1993; Kuhad, 1993).

La abundancia del xilano, lo hace un substrato atractivo para la implementación de procesos en donde, una vez degradado a xilosa, se obtengan materias primas para la industria química y farmacéutica, tales como: acetato, propionato, y succinato (Dahlberg y col., 1993; Nielsen y col., 1993; Marounek y Kopeny, 1994). Otros productos derivados de la degradación del xilano son los xilooligosacáridos. Se ha observado que las bacterias del género *Bifidobacteria*, utilizan selectivamente xilobiosa, xilotriosa y xilotetraosa; por lo que, los xilooligosacáridos pueden utilizarse como aditivos alimenticios (Okasaki y col., 1990). La degradación enzimática de desechos agrícolas e industriales ricos en xilano, puede aprovecharse para la obtención de edulcorantes para consumo animal, o para producción de edulcorantes artificiales (Gilbert y Hazlewood, 1993).

Sin embargo, todos los procesos antes mencionados requieren de organismos, o de sus enzimas, capaces de degradar xilano efectivamente. Es por esto, que en los últimos 15 años se han multiplicado las investigaciones para encontrar microorganismos capaces de degradar xilano y para purificar sus enzimas. En donde la búsqueda y purificación de xilanasas libres de actividad celulolítica son de las líneas de investigación más activas, debido a sus aplicaciones potenciales (Biely, 1991).

2.3 Xilanasas

Debido a la naturaleza química del xilano se requieren de varias enzimas, denominadas genéricamente xilanasas, para degradarlo hasta xilosa (Biely, 1985; Wong y col., 1988; Thomson, 1993). Hasta la fecha se han identificado las siguientes xilanasas: β -1,4-endoxilanasas, β -xilosidasas, α -L-arabinofuranosidasas, α -glucuronidasas y esterasas que atacan a los grupos acetil, cumaril y feruloil (fig. 2.3). Las xilanasas se encuentran presentes en una gran variedad de organismos: bacterias terrestres y marinas, hongos, algas marinas, protozoarios, crustáceos, insectos y en algunas semillas de plantas terrestres (Sunna y Antranikian, 1997).

2.3.1 Endoxilanasas

Las β -1,4-endoxilanasas (EC 3.2.1.8), comúnmente llamadas xilanasas, atacan los enlaces glucosídicos internos de la cadena principal de xilosa. El ataque al sustrato no es aleatorio, sino que depende del grado de ramificación, de la longitud de las ramificaciones y de la naturaleza química de los substituyentes (Reilly, 1981). Durante la hidrólisis primaria del xilano por estas enzimas se producen principalmente xilooligosacáridos de cadena corta: xilobiosa, xilotriosa, xilotetraosa y xilopentanososa (Royer y Nakas, 1991; Chen y col., 1997).

Aparentemente, hay una relación muy estrecha entre el peso molecular (PM) y el punto isoeléctrico (PI) de las endoxilanasas. Por lo tanto, Wong y col. (1988) proponen agrupar a estas enzimas en: xilanasas con alto PI y bajo PM (PI entre 8.5 y 10.0; PM < 30 kDa), y xilanasas con bajo PI y alto PM (PI entre 4.5 y 7.0; PM > 30 kDa). Sin embargo, hay muchas endoxilanasas que tienen un bajo PI y un bajo PM y viceversa (Sunna y Antranikian, 1997). Por ejemplo, una endoxilanasas de *Myrothecium verrucaria* tiene un PI de 4.3 y un PM de 15.9 kDa (Filho y col., 1993), y la endoxilanasas 2 de *Fibrobacter succinogenes* tiene un PI de 8.0 y un PM de 66 kDa (Matte y Forsberg, 1997), o las xilanasas de *T. reesei* con un PM de 19 y 21 kDa y

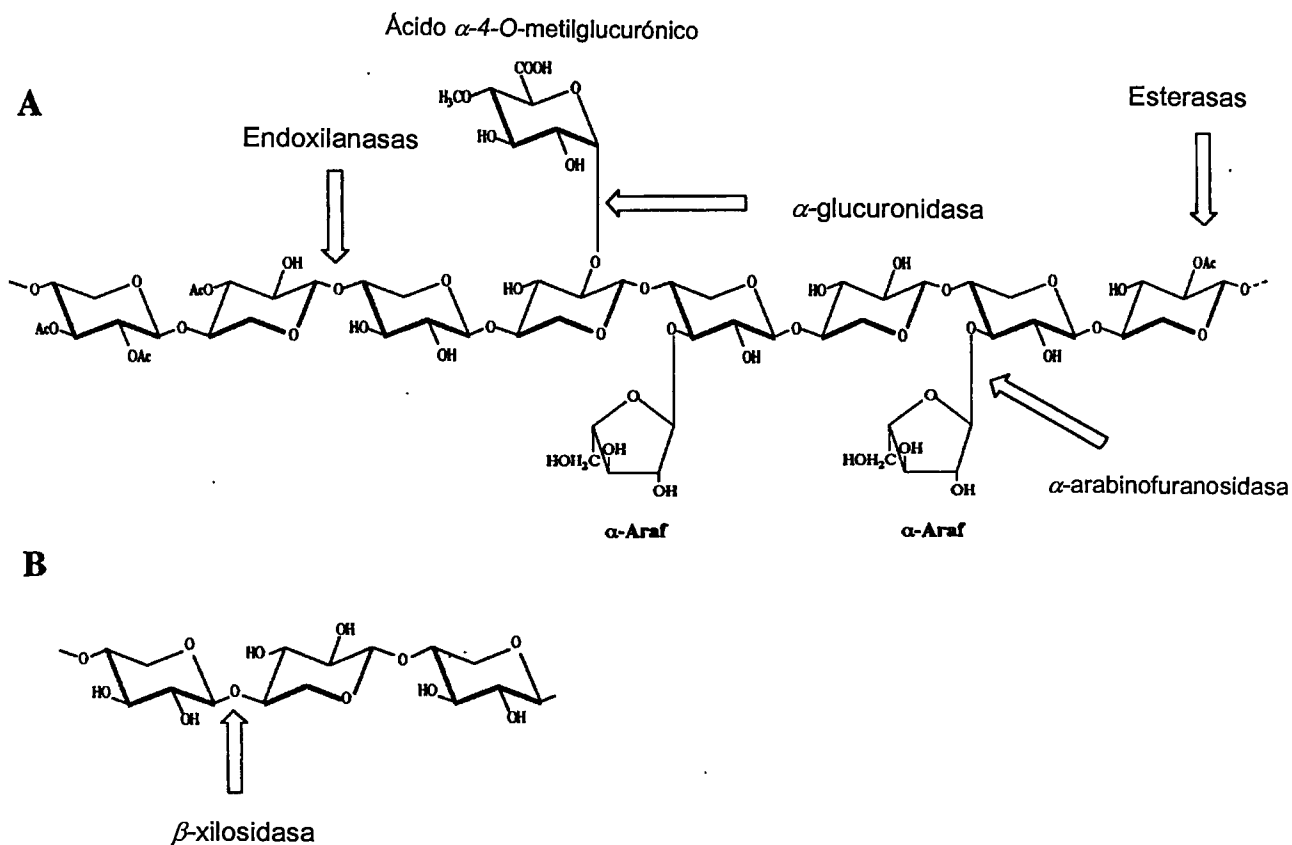


Figura 2.3. (A) Enzimas involucradas en la degradación del xilano. Ac: grupos acetil; α -Araf: α -arabinofuranosa. (B) Ataque de la β -xilosidasa a los xilooligosacáridos liberados por las endoxilanasas (modificada de Sunna y Antranikian, 1997)

con PI de 5.2 y 9.0, respectivamente (Törröen y col., 1992).

La mayoría de las endoxilanasas caracterizadas tienen un rango de temperatura de actividad óptima entre los 45 y los 75 °C, y solamente una pequeña fracción de estas endoxilanasas tienen temperaturas de actividad óptimas arriba de los 80 °C (Sunna y Antranikian, 1997; Uffen, 1997). Destacan por su resistencia a la temperatura las xilanasas producidas por bacterias del género *Thermotoga*, que poseen temperaturas de actividad óptima entre los 80 y los 105 °C (Simpson y col., 1991; Winterhalter y Liebl, 1995; Sunna y col., 1996).

2.3.2 β -xilosidasas

Las β -D-xilosidasas (EC 3.2.1.37), son exoglicosidasas que hidrolizan xilooligosacáridos de cadena corta y xilobiosa formados por la acción de las endoxilanasas. Estas enzimas atacan el extremo no reductor de los xilooligosacáridos, liberando xilosa (Wong y col., 1988). Las β -xilosidasas son enzimas con PM entre 60 y 360 kDa, y pueden encontrarse como monómeros o dímeros (Sunna y Antranikian, 1997). En su mayoría, estas enzimas no atacan al xilano. Aunque Dekker y Richards (1976), mencionan que existen reportes de β -xilosidasas que son capaces de atacar lentamente al xilano liberando xilosa.

Se ha observado que la xilobiosa es el substrato que atacan más rápidamente las xilosidasas, disminuyendo la afinidad por los oligosacáridos conforme se incrementa la longitud de la cadena (Van Doorslaer y col., 1985). Algunas xilosidasas, como las producidas por *A. niger* (Radionova y col., 1983), *T. reesei* (Poutanen y Puls, 1988), *T. ethanolicus* (Shao y Wiegel, 1992) y *Penicillium wortmanni* (Deleyn y col., 1978), también tienen actividad de α -arabinofuranosidasas. Muchas β -xilosidasas presentan actividad de transferasas, especialmente en concentraciones altas de substrato. Como resultado de esta actividad de transferasas, se forman productos con peso molecular mayor al del substrato (Conrad y Noethen, 1984).

2.3.3 α -L-arabinofuranosidasas

Hay dos tipos de arabinasas, las exoarabinasas (EC 3.2.1.55) y las endoarabinasas (EC 3.2.1.99). La mayoría de las arabinasas estudiadas hasta ahora son del tipo exo- (Dekker y Richards, 1976). Las arabinasas en estado nativo alcanzan PM de hasta 495 kDa y se encuentran como monómeros, dímeros, tetrámeros, hexámeros y octámeros (Sunna y Antranikian, 1997). La producción de arabinasas puede inducirse por polímeros de arabinosa y por polisacáridos que contengan residuos de la misma (Mackenzie y col., 1987; Zimmermann y col., 1988).

Poutanen (1988), observó un incremento en la producción de xilosa, xilobiosa y arabinosa cuando utilizó una arabinasa y una endoxilanasas de *T. reesei* para degradar xilano. Estos resultados sugieren que existe sinergismo entre las dos enzimas utilizadas. Sin embargo, Maat y col (1992), no obtuvieron diferencias significativas en la calidad del pan elaborado con harina de trigo cuando utilizaron una endoxilanasas y una arabinasa de *A. niger* var *awamori*. Observando, que se tenían incluso mejores resultados utilizando solamente la fracción con actividad de endoxilanasas.

2.3.4 Glucuronidasas y esterasas

Las glucuronidasas y las esterasas que degradan el xilano se descubrieron recientemente: la primera glucuronidasa se describió en 1986 (Puls y col., 1986), la primera esterasa que ataca grupos acetil en 1985 (Biely y col., 1985), y las primeras esterasas que atacan a grupos cumaril y feruloil en 1987 (Mackenzie y col., 1987). La principal razón para la detección tardía de estas enzimas fue la falta de sustratos apropiados, encontrándose muy pocos reportes de estas enzimas hasta la fecha (Sunna y Antranikian, 1997).

Debido a la estrecha relación que existe entre la celulosa y la hemicelulosa en la pared celular de las plantas, no es sorprendente que los organismos que producen xilanasas produzcan también celulasas. Ambos grupos de enzimas se excretan

frecuentemente como complejos, actuando sobre enlaces glucosídicos β -1,4 utilizando mecanismo de acción similares (Coughlan y Hazlewood, 1993).

La manera en la que se induce la producción de xilanasas aún no se comprende del todo. Debido a que el xilano es demasiado grande para pasar a través de la membrana celular y activar la síntesis de xilanasas, se cree los oligosacáridos producidos por acción de una pequeña cantidad de xilanasas constitutivas inducen la síntesis acelerada de estas enzimas (Biely, 1993; Coughlan y Hazlewood, 1993). Se ha observado que la síntesis de endoglucanasas, como las xilanasas y las celulasas, es reprimida por la aparición de azúcares libres en el medio (Coughlan y Hazlewood, 1993).

2.3.5 Aplicaciones biotecnológicas

Las xilanasas se utilizan en procesos muy diversos. En algunos de estos procesos se requiere el uso de xilanasas purificadas, mientras que en otros se obtienen mejores resultados utilizando extractos crudos. Las aplicaciones comerciales de las xilanasas incluyen la conversión de desechos agroindustriales a xilosa (Biely, 1985), la clarificación de jugos, la extracción de café, aceite vegetal y almidón (Sunna y Antranikian, 1997), y la producción de combustibles y materias primas para la industria química y farmacéutica (Dahlberg y col., 1993; Nielsen y col., 1993; Marounek y Kopeny, 1994).

Las xilanasas se han utilizado experimentalmente para mejorar la digestibilidad de forrajes (Khasin y col., 1992), y alimento para aves de engorda (Sunna y Antranikian, 1997). Recientemente, también se han utilizado xilanasas para blanquear la pulpa de papel. A escala experimental se han utilizado combinaciones de diferentes xilanasas; sin embargo, en procesos comerciales se utilizan sólo endoxilanasas. La mayoría de las investigaciones sobre blanqueado enzimático de pulpa de papel se han realizado con preparaciones enzimáticas obtenidas de hongos del género *Trichoderma*. El uso de enzimas ayuda a disminuir el cloro que se utiliza durante el proceso de blanqueado en un 20 al 30% (Sunna y Antranikian, 1997).

Las xilanasas también se utilizan en la elaboración del pan, observándose que su uso mejora la calidad del producto y alarga la vida de anaquel. Los xilooligosacáridos liberados por acción de las xilanasas, interaccionan con el gluten, provocando por un lado una competencia con las moléculas de almidón por el agua, y por otro, que una mayor cantidad de agua quede atrapada en la masa (van Oort y col., 1995).

Considerando las aplicaciones que se les puede dar a las xilanasas, y sus potenciales aplicaciones, resulta importante estudiar la producción de estas enzimas por microorganismos que las produzcan en grandes cantidades, que se encuentren ampliamente distribuidos, que se propaguen con facilidad, que sean genéticamente estables y cuyas xilanasas sean fácilmente recuperables del medio de cultivo.

2.4 *Trichoderma*, un género de hongos filamentosos con potenciales aplicaciones biotecnológicas.

2.4.1 Taxonomía

El género *Trichoderma*, agrupa a 76 especies de hongos filamentosos saprofitos que pertenecen a la clase de los hipomicetos, subdivisión *Deuteromycotina*. Las especies que comprende el género se recuperan del suelo y se encuentran ampliamente distribuidas (Bissett, 1984; Samuels, 1996). Especies como *T. viride* y *T. harzianum*, son parásitos de otros hongos y pueden utilizarse como agentes de biocontrol (Samuels, 1996).

El género *Trichoderma* se identifica por su crecimiento rápido, hifas blancas o translúcidas y esporas abundantes de color verde (Rifai, 1969; Bissett, 1984, 1991 a-c, 1992; Samuels, 1996). La identificación y aislamiento de los miembros del género es difícil ya que muchas especies comparten características morfológicas comunes (Bissett, 1984; Samuels, 1996). Rifai (1969), agrupó a los hongos pertenecientes al género *Trichoderma* en nueve agregados, señalando que esta división era temporal. Investigaciones posteriores permitieron la promoción de los agregados a secciones, cada una de ellas con especies bien caracterizadas. Como por ejemplo, la sección *Longibrachiatum*, que incluye a: *T. citrinoviride*, *T. parceramosum*, *T. pseudokoningii*, el anamorfo de *Hypocrea schweinitzii*, *T. reesei* y *T. longibrachiatum* (Bissett, 1984, 1991c; Samuels, 1996).

Cuando crecen sobre placas de agar, estos hongos no presentan micelio aéreo y segregan pigmentos de tonos amarillos. La pigmentación amarilla en especial, es característica de algunas especies de la sección *Longibrachiatum* (Samuels, 1996). La presencia de conidias es otra característica que identifica al género *Trichoderma*. Las conidias pueden ser globulares, elipsoidales u oblongas; de color verde, verde amarillo o incoloras. La forma de las conidias ayuda a diferenciar las especies de los

distintos grupos que conforman el género, pero no permite distinguir entre especies del mismo grupo (Samuels, 1996).

2.4.2 Factores que afectan el crecimiento de *Trichoderma* sp.

2.4.2.1 Factores nutricionales

Los hongos del género *Trichoderma* pueden utilizar una gran variedad de fuentes de carbono y nitrógeno. Se ha observado que *Trichoderma* sp. tiene la capacidad de crecer con mono-, di-, y polisacáridos, alcoholes, aldehídos y ácidos orgánicos como fuente de carbono (Danielson y Davey, 1973b; Papavizas, 1985). Las sales de amonio, la urea, nitratos y aminoácidos tales como: alanina, ácido aspártico y ácido glutámico, tienen efectos significativos sobre el crecimiento de *Trichoderma* sp. (Danielson y Davey, 1973b).

2.4.2.2 Factores ambientales

Se ha observado que *Trichoderma* sp. crece mejor a temperaturas que varían desde los 22 hasta los 42 °C. Aunque *T. polysporum*, *T. viride* y *T. harziianum* logran desarrollarse a 7 °C (Danielson y Davey, 1973a). Los hongos de este género se desarrollan mejor a valores de pH entre 3.7 y 4.7, restringiéndose su crecimiento a valores extremos de pH. Aunque *T. longibrachiatum* tiene la capacidad de desarrollarse aceptablemente a valores de pH de 7.0 y superiores (Royer y Nakas, 1989).

La luz tiene un efecto positivo sobre el desarrollo y esporulación de algunas especies como por ejemplo, *T. viride* (Schrufer y Lysek, 1990). La humedad y la concentración de sales también afectan el desarrollo de *Trichoderma* sp., observándose que se presenta un mejor desarrollo a valores de humedad altos y concentraciones salinas por debajo del 5% de NaCl (Danielson y Davey, 1973a). El magnesio también tiene efectos positivos sobre el desarrollo de *Trichoderma* sp. (Papavizas, 1985).

2.4.3 Producción de enzimas

Como muchos otros organismos saprófitos, *Trichoderma* sp. tiene la capacidad de excretar enzimas que actúan sobre sustratos complejos para transformarlos en moléculas simples que utiliza para sobrevivir y desarrollarse. Debido probablemente a su naturaleza saprófita, los hongos del género *Trichoderma* se caracterizan porque producen principalmente celulasas y hemicelulasas. Una característica adicional que ha promovido su estudio, es que los hongos del género *Trichoderma* se consideran microorganismos inocuos. Aunque existe evidencia de que especies como *T. viride*, *T. pseudokoningii* y *T. longibrachiatum* pueden resultar perjudiciales para personas inmunocomprometidas. E incluso, *T. longibrachiatum* y *T. pseudokoningii* Rifai se asociaron a la muerte de personas con S.I.D.A. (Samuels, 1996).

La capacidad de algunas especies del género *Trichoderma* para producir celulasas se ha explotado comercialmente en áreas tan diversas como producción de detergentes, combustibles, forrajes y en el blanqueo de pulpa de papel (Samuels, 1996). A la par de la producción de celulasas, algunos hongos del género *Trichoderma* producen también xilanasas. Destacándose tanto por el rendimiento como por el perfil de xilanasas producidas *T. longibrachiatum* (Royer y Nakas, 1989). Coughlan y Hazlewood (1993), señalan que la producción simultánea de estas enzimas puede deberse a la asociación tan estrecha que existe entre la celulosa y las hemicelulosas, de las cuales el xilano es la más abundante.

Las xilanasas producidas por *Trichoderma* sp. se consideran superiores a muchas otras xilanasas, tanto en términos de calidad como en términos de rendimiento. La principal desventaja de *Trichoderma* sp. es la producción simultánea de celulasas, ya que muchas aplicaciones comerciales requieren de xilanasas libres de actividad celulolítica (Biely, 1991). Sin embargo, esta desventaja puede superarse al manipular fuentes de carbono y condiciones ambientales (Royer y Nakas, 1989) o mediante manipulación genética (Biely, 1991).

Dentro de las enzimas producidas por *Trichoderma* sp. también se pueden mencionar las pectinasas (Sandhu y Kalra, 1982), proteasas y quitinasas (Samuels, 1996). Como puede observarse, el género *Trichoderma* produce una gran variedad de enzimas extracelulares, y la búsqueda de especies sobreproductoras o con perfiles enzimáticos específicos (como por ejemplo, xilanasas libres de actividad celulolítica) con potenciales aplicaciones comerciales es muy intensa (Samuels, 1996).

2.4.3.1. Enzimas producidas por *Trichoderma longibrachiatum*

A pesar de que los trabajos sobre producción de hemicelulasas y celulasas por *Trichoderma* sp. son abundantes, existen muy pocos trabajos que reporten la producción de xilanasas por *T. longibrachiatum*. Sandhu y Kalra (1982), estudiaron la producción de celulasas, pectinasas y xilanasas por *T. longibrachiatum* Rifai (ATCC 44788) creciendo en diferentes sustratos. Thaker y col. (1986), y Royer y Nakas (1989), se enfocaron a optimizar condiciones para la obtención de un máximo de actividad en experimentos a escala laboratorio. Royer y Nakas (1991), reportan la purificación y caracterización de las xilanasas producidas por la cepa de *T. longibrachiatum* Rifai estudiada en 1989. Por último, Chen y col. (1997), reportan la producción, purificación y caracterización de una xilanasas producida por *T. longibrachiatum* CS-185.

T. longibrachiatum tiene la capacidad de producir celulasas, xilanasas y pectinasas cuando crece en: celulosa, xilano, carboximetilcelulosa, pectina, lactosa y glucosa (Sandhu y Kalra, 1982, 1985; Royer y Nakas, 1989; Chen y col., 1997). Se ha observado, que la producción de estas enzimas se puede inducir mediante sustrato. Sin embargo, existe evidencia de que el hongo produce pequeñas cantidades de celulasas y xilanasas de forma constitutiva (Sandhu y Kalra, 1982; Royer y Nakas, 1990).

Existe poca información sobre los factores que contribuyen al crecimiento de *T. longibrachiatum*. Este hongo tiene la capacidad de metabolizar celulosa, xilano,

sacarosa, pectina, carboximetilcelulosa, celobiosa, lactosa y glucosa como fuentes de carbono (Danielson y Davey, 1973b; Sandhu y Kalra, 1982; Royer y Nakas, 1989). Sandhu y Kalra (1982), observaron que la cepa de *T. longibrachiatum* Rifai, (ATCC 44788), creció mejor a 32 °C y valores de pH entre 4.0 y 6.0. Mientras que Royer y Nakas (1989), observaron que con una cepa diferente de *T. longibrachiatum* Rifai la máxima producción de xilanasas y celulasas se presentó a 30 °C y pH de 7.0.

2.5 Reología de fluidos de comportamiento complejo y suspensiones

La producción de enzimas de hongos filamentosos a gran escala plantea problemas técnicos serios. Por un lado, es muy importante conocer en detalle el metabolismo del organismo productor: cuales son sus requerimientos nutricionales, cuando produce el metabolito de interés, y como puede incrementarse esta producción. Por otro lado, los hongos filamentosos son organismos que esporulan, con la consecuente pérdida de productividad, si se ven sometidos a estrés mecánico. Por tanto, hay que seleccionar cuidadosamente un sistema que permita mantener el medio homogeneizado con un mínimo de estrés para el hongo.

La determinación de las propiedades reológicas de los caldos de fermentación ayuda en la selección objetiva del impulsor que proporcionará la mejor distribución de los nutrientes del medio y por tanto, una mayor producción. Sin embargo, las ecuaciones de transferencia de momento, en las cuales están fundamentados los reómetros convencionales, parten de la suposición de que el medio analizado es isotrópico. Es decir, que tiene la misma composición en todos y cada uno de sus puntos. Por lo que dada la naturaleza heterogénea de los caldos de fermentación, no es posible el uso de reómetros convencionales en la determinación de las propiedades reológicas de los caldos. Además, se ha observado que el estudio de suspensiones sedimentables con reómetros convencionales produce una señal inestable que no puede interpretarse (Brito y col., 1998).

Una alternativa al uso de reómetros convencionales, es el uso de sistemas de mezclado acoplados a torquímetros de precisión para determinar propiedades reológicas de proceso. Esta reología de proceso sólo será válida para un impulsor y un contenedor dados, ya que la viscosidad está en función de la velocidad de deformación, y la velocidad de deformación es función del patrón de flujo (axial o radial) impuesto por el impulsor (Metzner y Otto, 1957).

La estimación de la viscosidad utilizando sistemas de mezclado, se basa en el hecho de que en régimen de flujo laminar (generalmente $R_e \leq 10$, en tanques agitados), el consumo de potencia es directamente proporcional a la viscosidad del fluido en agitación. Fuera de la laminaridad, el consumo de potencia es independiente de la viscosidad del fluido (fig. 2.4). Una observación importante es que, en régimen de flujo laminar, la pendiente de la recta que se forma al graficar en escala logarítmica los números adimensionales de potencia (N_p) y el Reynolds (R_e) es igual a -1 .

En base a las observaciones anteriores, Metzner y Otto (1957), desarrollaron un método para medir la viscosidad de fluidos no newtonianos pseudoplásticos inelásticos. La suposición básica de estos investigadores, es que el movimiento de un fluido en la proximidad del impulsor puede caracterizarse por una velocidad de deformación promedio (γ_e , en s^{-1}), que es directamente proporcional a la velocidad rotacional del impulsor:

$$\gamma_e = k_s N \quad (2.1)$$

Donde k_s es una constante que depende solamente de la geometría del impulsor utilizado.

A partir de los datos brutos, torque (T) y velocidad rotacional del impulsor (N), Metzner y Otto (1957) calcularon el N_p y el R_e para un fluido newtoniano utilizando:

$$N_p = \frac{2\pi NT}{d^5 N^3 \rho} \quad (2.2)$$

$$R_e = \frac{d^2 N \rho}{\mu} \quad (2.3)$$

Donde: d , es el diámetro del impulsor; ρ , es la densidad del fluido; y μ , es la viscosidad del fluido newtoniano.

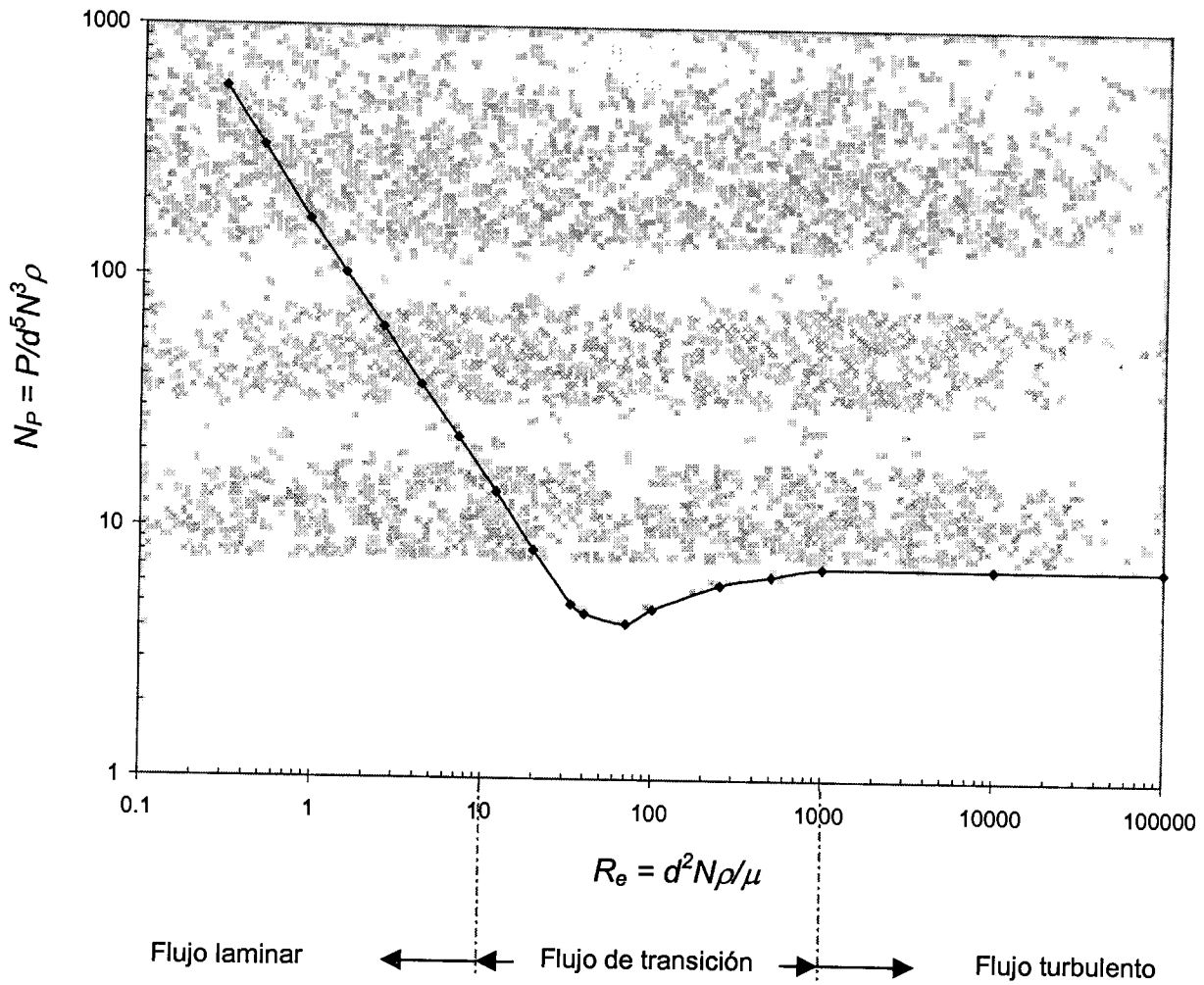


Figura 2.4. Número de potencia contra número de Reynolds para fluidos newtonianos (Modificada de Rushton y col., 1950).

Calcularon después el N_p de fluidos pseudoplásticos (índice de flujo entre 0.2 y 0.4) utilizando la ec. (2.2), y a partir de la curva de potencia del fluido newtoniano calcularon el R_e correspondiente, valiéndose del hecho de que en flujo laminar el N_p y el R_e están relacionados por:

$$N_p = k_p R_e^{-1} \quad (2.4)$$

Donde k_p es una constante, llamada constante de potencia newtoniana.

Una vez obtenido el R_e , se calculó la viscosidad efectiva (η_e) de los fluidos no newtonianos analizados utilizando:

$$\eta_e = \frac{d^2 N_p}{R_e} \quad (2.5)$$

Con estos datos, se procedió a calcular la γ_e correspondiente a esta η_e a partir de la curva de potencia (N_p contra R_e) de los fluidos no newtonianos. Para finalmente calcular k_s utilizando la ec. (2.1).

Una observación importante es que, Metzner y Otto (1957) realizaron su análisis suponiendo que el comportamiento reológico de los fluidos estudiados se podía describir con el modelo Oswald de Waele o modelo de la ley de la potencia:

$$\tau = m \gamma^n \quad (2.6)$$

Donde, τ , es el esfuerzo cortante; m , es el índice de consistencia; γ , es la velocidad de deformación; y n , es el índice de flujo.

El concepto de viscosidad efectiva desarrollado por Metzner y Otto (1957), a permitido la caracterización reológica de sistemas que no pueden analizarse utilizando técnicas convencionales; como por ejemplo, suspensiones sedimentables. El método de Metzner y Otto (1957), se ha utilizado para determinar la reología de caldos de fermentación (Kemblowski y Kristiansen, 1986), alimentos (Mackey y col.,

1987), y jarabes (Kemblowski y col., 1989). Doraiswamy y col. (1994), mencionan que el método de Metzner y Otto es el más utilizado para estudiar la reología de fluidos semisólidos y suspensiones, y que se recomienda como el procedimiento estándar en varias referencias sobre mezclado.

Varios investigadores que utilizaron el método de Metzner y Otto observaron que el índice de flujo (n), de los fluidos analizados afecta significativamente el valor de la constante, k_S (Calderbank y Moo-Young, 1961; Beckner y Smith, 1966; Schilo, 1969; Nagata y col., 1970; Rieger y Novák, 1973; Yap y col., 1979; Nienow y Elson, 1988; Castell-Pérez y Steffe, 1990; Brito y col., 1992). Observándose que el efecto de n sobre k_S es más marcado con fluidos altamente pseudoplásticos (Brito y col., 1997), y con fluidos dilatantes (Nienow y Elson, 1988).

Con base en estas observaciones y en un trabajo reportado anteriormente (Brito y col., 1992), Brito y col. (1998), proponen el uso de un impulsor helicoidal acoplado a un reómetro para determinar la viscosidad de proceso de fluidos no newtonianos y suspensiones. Después del análisis de los datos obtenidos de cuatro fluidos newtonianos y de nueve fluidos pseudoplásticos inelásticos, Brito y col. (1998), proponen el uso de la función:

$$k_S(n) = \left[\frac{k_p(n)}{k_p} \right]^{\frac{1}{n-1}} \quad (2.7)$$

donde:

$$k_p(n) = k_p b^{n-1} c^{\frac{n-1}{n}} \quad (2.8)$$

donde: k_p , es la constante de potencia que se obtiene al calibrar el sensor con los fluidos newtonianos; y b y c , son constantes que se obtienen al analizar el consumo de potencia de los fluidos no newtonianos pseudoplásticos. Esta función permite calcular la γ_e en la proximidad del impulsor.

Con esta γ_e y un R_e generalizado (Hagerdon y Salamone, 1967), que considera la velocidad rotacional del impulsor como velocidad característica, se procede a calcular la viscosidad de proceso utilizando:

$$\eta_e = \frac{mk_p(n)N^{n-1}}{k_p} \quad (2.9)$$

De esta manera, se obtuvo una coincidencia exacta de los valores de η_e con los valores de viscosidad obtenidos con la geometría convencional de cono y plato (Brito y col., 1998). Este método tiene las ventajas de que toma en cuenta el efecto de n y de que utiliza los datos brutos, T contra N , para calcular γ_e , y por lo tanto no se requiere calcular la constante de Metzner-Otto, k_S .

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Caracterizar la producción de xilanasas de *Trichoderma longibrachiatum* IMI 061758 en cultivo agitado a escala laboratorio, y estudiar la reología de los caldos de fermentación

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar la producción de xilanasas en dos medios definidos: sales Vogel y medio mínimo, en cultivo agitado a escala laboratorio
- Diseñar un nuevo medio para la producción de xilanasas de *Trichoderma longibrachiatum* IMI 061758 y comparar resultados con los obtenidos en sales Vogel y medio mínimo
- Determinar la reología de los caldos de fermentación, y su comportamiento con respecto al tiempo

4. Materiales y Métodos

4.1 Material biológico.

Cepa de colección de *Trichoderma longibrachiatum* del International Mycological Institute (IMI), Inglaterra. Número de cepa: 061758

4.2 Reactivos

Salvo donde se indique lo contrario, todos los reactivos utilizados se adquirieron de Sigma.

4.3 Confirmación de identidad de la cepa mediante la técnica de microcultivo

La identidad de la cepa se confirmó mediante observación microscópica directa, utilizando la técnica de microcultivo (Samson y Pitt, 1990). Se colocó un bloque de agar papa-dextrosa de 1×1×0.3 cm (largo, ancho y espesor, respectivamente), sobre un portaobjetos en el interior de una caja Petri. Enseguida, se inoculó la cepa de *T. longibrachiatum* IMI 061758 por picadura en las cuatro caras del bloque de agar y se cubrió éste con un cubreobjetos. Finalmente, se adicionaron 10 ml de una solución acuosa estéril de glicerol al 10% (v/v) y se incubó el sistema a 30±2 °C en una estufa *Shel Lab* 1370 GX.

Cada 24 h se retiró un microcultivo para estudiar la morfología colonial y la morfología de las esporas. Para proceder a la observación, se retiró el bloque de agar, teniendo cuidado de no dañar las estructuras. Las muestras se fijaron con calor húmedo al frotis y se tiñeron con azul de metilo para observación microscópica directa. Para las observaciones, se utilizó un microscopio óptico marca *Olympus*, con filtro de luz azul, acoplado a un sistema de fotografía directa.

4.4 Medios utilizados

4.4.1 Sales Volgel (Davis y Serres, 1970)

Compuesto	Concentración (g/L)
Citrato trisódico·2H ₂ O	0.625

Fosfato de potasio dibásico·3H ₂ O	0.819
Nitrato de Amonio	0.500
Sulfato de magnesio·7H ₂ O	0.050
Cloruro de calcio·2H ₂ O	0.025
Biotina	5·10 ⁻⁴
Inositol	2·10 ⁻¹
Pantetonato de calcio	2·10 ⁻²
Tiamina	2·10 ⁻²
Sulfato ferroso·7H ₂ O	0.100
Sulfato de manganeso·H ₂ O	0.028
Cloruro de zinc	0.034
Cloruro de cobalto·6H ₂ O	0.073

4.4.2 Medio mínimo (Owens y Keddie, 1969; Owens, 1985)

Compuesto	Concentración (g/L)
Nitrato de sodio	16.998
Cloruro de amonio	10.698
Fosfato de potasio monobásico (Baker)	2.722
Sulfato de magnesio·7H ₂ O	0.493
Cloruro de calcio·2H ₂ O	0.029
Fosfato de sodio dibásico·7H ₂ O (Baker)	134.040
Fosfato de sodio monobásico·H ₂ O (Baker)	138.000
Mezcla de metales traza	6.000 ml
Mezcla de metales traza:	
Sal disódica de EDTA·2H ₂ O (Baker)	6.350
Sulfato de zinc·7H ₂ O	2.200
Sulfato de manganeso·H ₂ O	0.432
Sulfato ferroso·7H ₂ O	0.500
Cloruro de cobalto·6H ₂ O	0.161
Sulfato cuproso·5H ₂ O	0.157
Molibdato de sodio·2H ₂ O (Baker)	0.151
Ácido bórico (Baker)	0.229

4.4.3 EL-1 (este trabajo)

Compuesto	Concentración (g/L)
Citrato trisódico·2H ₂ O	0.625
Fosfato de potasio dibásico·3H ₂ O	0.819
Nitrato de amonio	0.500
Sulfato de magnesio·7H ₂ O	0.050
Cloruro de calcio·2H ₂ O	0.025
Extracto de levadura (Bioxon)	0.6% (p/v)

4.5 Producción de xilanasas en cultivo agitado

Todas las fermentaciones se llevaron a cabo en un agitador rotatorio, en matraces ErlenMeyer de 250 ml que contenían 50 ml de medio con glucosa o xilano como fuente de carbono. Las condiciones de incubación fueron: pH inicial, 7.0; inóculo, $1 \pm 0.2 \cdot 10^5$ esporas/ml; a 30 ± 2 °C y 150 ± 10 rpm. El micelio se removió del extracto crudo centrifugando los cultivos a 12,200 g, por 30 min a 4 ± 1 °C. Los parámetros evaluados fueron: crecimiento del hongo, pH de los caldos, actividad de xilanasas, actividad de proteasas, proteína extracelular total y reología de los caldos.

4.6 Detección de biomasa

La aparición de biomasa se determinó utilizando dos métodos: densidad óptica y una modificación del método de peso seco (Ison y Matthew, 1997). Para determinar el crecimiento del hongo por peso seco, se filtraron los caldos de fermentación a través de papel Wathman número 50, previamente secado y pesado. Después de filtrar los caldos, los papeles filtro se llevaron de nuevo a peso constante poniéndolos en una estufa a 37 ± 1 °C por 48 h. Después de secado los filtros se pesaron nuevamente en balanza analítica. El crecimiento del hongo se definió como la diferencia entre el peso del papel antes y después de filtrar los caldos. El crecimiento se expresó como g de micelio/L de medio (g/L).

Para determinar el crecimiento del hongo por densidad óptica, primero se hizo un barrido de los medios, con y sin crecimiento, entre los 400 y los 700 nm para determinar la longitud de onda donde se tenía la menor interferencia. La longitud de onda donde se presentó la menor interferencia fueron 400 nm. Se cuidó que la absorbencia de los caldos siempre estuviera entre las 0.3 y las 0.5 unidades; y cuando fue necesario, los caldos se diluyeron para que la absorbencia se mantuviera en el rango especificado. La absorbencia se leyó por triplicado en un espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer Lambda 2S. La densidad óptica (*D.O.*) se calculó utilizando la fórmula:

$$D.O. = -\log(1 - A) * f \quad (4.1)$$

Donde: A , es la absorbencia de los caldos; y f , es el factor de dilución

4.7 Actividad de xilanasas en el extracto crudo

El substrato se preparó haciendo una suspensión de xilano de avena al 1% (p/v) en amortiguador de acetatos-HCl (50mM, pH 4.5). La suspensión se agitó por 2 h, a temperatura ambiente. El material insoluble se separó centrifugando la suspensión a 12,200 g, por 30 min a 4 ± 1 °C. La actividad enzimática se determinó incubando 50 μ l del extracto crudo con 50 μ l de substrato por 30 min, a 50 ± 1 °C. La reacción se detuvo enfriando en un baño de hielo por 15 min.

Los azúcares reductores liberados se cuantificaron utilizando una modificación del método de Sinner y Puls (1978): se adicionaron 2 ml del reactivo y se dejó reaccionar el sistema por 10 min a 80 ± 2 °C. La reacción se detuvo enfriando en un baño de hielo por otros 15 min. La absorbencia de las muestras se leyó por triplicado en un espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer Lambda 2S a 560 nm. La transformación de absorbencia a concentración se hizo utilizando D-(-)-xilosa (reactivo analítico de Carlo Ebba), como estándar. Una unidad de actividad enzimática se definió como μ moles de xilosa equivalente liberada por min en el volumen de reacción (μ mol xilosa eq. \cdot min⁻¹ \cdot 100 μ L⁻¹).

El método de detección de azúcares reductores de Sinner y Puls (1978) se basa en la formación de un complejo de cobre con ácido 2,2'-biciconínico, que al ser reducido forma una coloración violeta. El reactivo se formuló de acuerdo a las indicaciones de la referencia original. Las variantes *a* y *b* utilizadas en el presente trabajo, difieren solamente en que: *a*, utiliza ácido aspártico; y *b*, ácido cítrico.

4.8 Actividad de proteasas en el extracto crudo

La actividad proteolítica del extracto crudo se determinó de acuerdo al método de Kunitz (1946): se incubaron 625 μ l de caseína Hammarstein al 1% (p/v) en

amortiguador de fosfatos (5 mM, pH 7.7), a 37 ± 0.5 °C, por 30 min. Enseguida, se agregaron 33 μ l del extracto crudo y se incubó la solución otros 10 min a la misma temperatura. La reacción se detuvo agregando 1 ml de ácido tricloroacético. Para medir actividad, se centrifugó la solución reactiva a 6,100 g por 20 min, a 25 ± 1 °C. La actividad enzimática se determinó como el incremento de absorbencia en el sobrenadante a 280 nm.

4.9 Proteína extracelular total en el extracto crudo

Se utilizó el método de Bradford (1976), y el reactivo de Bio-Rad para cuantificar proteína extracelular total. De acuerdo a las recomendaciones del fabricante, se adicionaron 400 μ l del reactivo a 1600 μ l del extracto crudo. La solución se mezcló con Vórtex, y se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 min. La absorbencia de las muestras se leyó por triplicado en un espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer Lambda 2S a 596 nm. La transformación de absorbencia a concentración se hizo utilizando seroalbúmina bovina como estándar.

4.10 Tiempo de duración de las fermentaciones

Para determinar el tiempo de duración de las fermentaciones se corrió una fermentación en sales Volgel (Davis y Serres, 1970) durante 11 días. La fermentación se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita anteriormente, se utilizaron glucosa (0.55 mM) y xilano al 1% (v/v) como fuente de carbono. Cada 24 h, se retiró un matraz del sistema y se determinó: a) crecimiento, mediante la técnica de peso seco (Ison y Matthew, 1997); b) actividad de xilanasas en el extracto crudo; y c) proteína extracelular total.

4.11 Estabilidad del extracto crudo frente a la temperatura

Para determinar la estabilidad del extracto crudo frente a la temperatura se incubaron 2 ml del extracto a: 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 °C, durante 1 h. Después del tratamiento térmico, las muestras se enfriaron en un baño de hielo. En seguida, se

realizó el ensayo para detectar actividad de xilanasas en el extracto crudo siguiendo la metodología descrita anteriormente. El porcentaje de actividad residual se obtuvo comparando la actividad recuperada después del tratamiento térmico contra la actividad de una muestra control que se mantuvo a temperatura ambiente utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de actividad residual} = \frac{\text{Actividad después del tratamiento térmico}}{\text{Actividad de la muestra control}} \times 100$$

4.12 Producción de xilanasas en sales Volgel

Para caracterizar la producción de xilanasas en este medio, se corrió una fermentación de 6 días. La fermentación se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita anteriormente, se utilizaron glucosa (0.55 mM) y xilano al 1% (v/v) como fuente de carbono. Durante el tiempo que duraron las fermentaciones se registró: crecimiento del hongo como *D.O.*, actividad de xilanasas y de proteasas en el extracto crudo, proteína extracelular total y el pH de los caldos. La cuantificación de azúcares reductores se hizo utilizando las variantes *a* y *b* del reactivo de Sinner y Puls (1978).

4.13 Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de xilanasas

Para determinar el efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de xilanasas, se corrió una fermentación en sales Volgel (Davis y Serres, 1970), siguiendo la metodología descrita anteriormente. En este experimento se utilizó glucosa como única fuente de carbono en dos niveles: 0.55 mM, como nivel bajo; y 55.5 mM, como nivel alto. Con el fin de validar la comparación, se utilizaron esporas del mismo lote y el mismo inóculo: 10^5 esporas/ml de medio. Durante estas fermentaciones se registró: crecimiento del hongo como *D.O.*, actividad de xilanasas en el extracto crudo, proteína extracelular total y el pH de los caldos. La cuantificación de azúcares reductores se hizo utilizando la variante *b* del reactivo de Sinner y Puls (1978).

4.14 Producción de xilanasas en medio mínimo

Para caracterizar la producción de xilanasas en este medio, se corrió una fermentación de 6 días. La fermentación se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita anteriormente, se utilizaron glucosa (0.55 mM) y xilano al 1% (v/v) como fuente de carbono. Durante estas fermentaciones se registró: crecimiento del hongo como *D.O.*, actividad de xilanasas y el pH de los caldos.

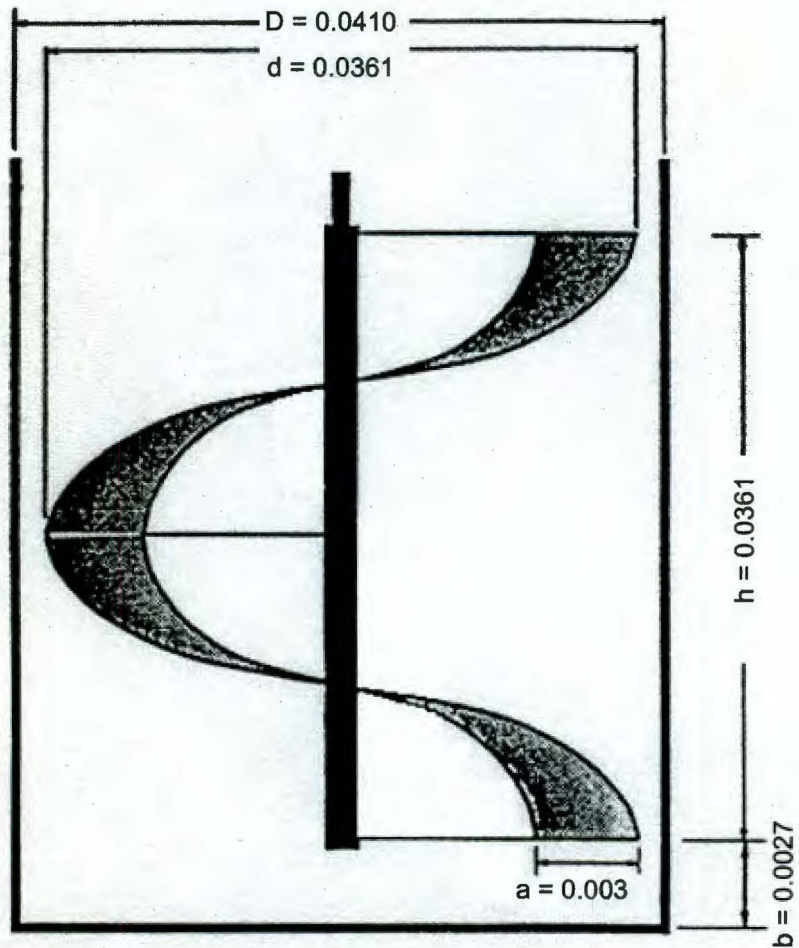
4.15 Producción de xilanasas en EL-1

Para caracterizar la producción de xilanasas en este medio, se corrió una fermentación de 5 días. La fermentación se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita anteriormente, se utilizaron glucosa (55.5 mM) y xilano al 5% (v/v) como fuente de carbono. Durante estas fermentaciones se registró: actividad de xilanasas en el extracto crudo y el pH de los caldos. La cuantificación de azúcares reductores se hizo utilizando la variante *b* del reactivo de Sinner y Puls (1978).

4.16 Caracterización de la reología de los caldos de fermentación

La determinación del comportamiento reológico de los caldos de fermentación se hizo mediante la aplicación de la teoría de mezclado, de acuerdo a la metodología propuesta por Metzner y Otto (1957). Además, se propone una modificación al método de Brito y col., (1998). Con el fin de determinar la bondad del ajuste, los resultados obtenidos se compararon contra los obtenidos mediante el método clásico de Metzner y Otto.

En el presente trabajo, se utilizó un reómetro rotacional Haake RV20-M5 [torque máximo (T_{max}), $4.9 \cdot 10^{-2}$ N·m; velocidad rotacional máxima (N_{max}), 500 rpm], modificado con un sensor helicoidal. Las dimensiones del sensor utilizado y sus principales relaciones geométricas se muestran en la figura 4.1. Los datos de los estudios reológicos se registraron como porcentaje de velocidad de deformación ($\%D$), y como porcentaje de esfuerzo ($\%\tau$).



D/d	h/d	a/d
1.135	1	0.083

Figura 4.1. Impulsor helicoidal utilizado como sensor para el estudio de las propiedades reológicas de los caldos de fermentación y sus principales relaciones geométricas (todas las dimensiones están en m)

Todos los ensayos se realizaron a la temperatura de incubación de los caldos: 30 ± 0.5 °C, por triplicado. Se evaluó el comportamiento de los caldos a las siguientes velocidades: 65, 110, 180 y 300 rpm, se tomaron al menos 20 lecturas en cada uno de los pasos.

Los valores de %D y % τ , se transformaron a velocidad rotacional (N , en rps) y torque (T , en N·m) utilizando:

$$N = \frac{N_{max} \cdot \%D}{6000} \quad (4.3)$$

$$T = \frac{T_{max} \cdot \% \tau}{100} \quad (4.4)$$

Los datos brutos, T contra N , se graficaron en coordenadas logarítmicas, obteniéndose una recta. La pendiente de la recta formada por los datos brutos es igual al índice de flujo de los caldos (n , adimensional).

4.16.1 Método de Metzner y Otto (1957)

La potencia consumida (P , en $J \cdot s^{-1}$), al agitar los caldos se obtuvo usando:

$$P = 2\pi NT \quad (4.5)$$

El número adimensional de potencia (N_p), se definió como:

$$N_p = \frac{P}{d^5 N^3 \rho} \quad (4.6)$$

Donde: ρ , es la densidad del fluido analizado ($kg \cdot m^{-3}$); y d , es el diámetro del impulsor helicoidal (m).

El número adimensional de Reynolds (R_e) se definió como:

$$R_e = \frac{k_p}{N_p} \quad (4.7)$$

Donde: k_p , es la constante de potencia obtenida al calibrar el reómetro modificado con un fluido newtoniano ($k_p = 162.79 \pm 0.77$, para el sensor utilizado en este trabajo).

Finalmente, la viscosidad efectiva de los caldos (η_e , en Pa·s), se calculó utilizando:

$$\eta_e = \frac{d^2 N \rho}{R_e} \quad (4.8)$$

4.16.2 Método modificado de Brito y col., (1998)

El índice de consistencia de los caldos (m , en Pa·s^{*n*}) se calculó utilizando:

$$m = \frac{2\pi T}{k_p(n) d^3 N^n} \quad (4.9)$$

Donde:

$$k_p(n) = k_p b^{n-1} c^{\frac{n-1}{n}} \quad (4.10)$$

En donde: $b = 24.64 \pm 2.76$; y $c = 0.91 \pm 0.02$

La viscosidad efectiva de los caldos (η_e , en Pa·s), se calculó utilizando:

$$\eta_e = \frac{m k_p(n) N^{n-1}}{k_p} \quad (4.11)$$

Finalmente, la velocidad efectiva de deformación resultante sobre los caldos ($\dot{\gamma}_e$, en s⁻¹), se calculó con:

$$\dot{\gamma}_e = k_s(n) \cdot N = \left[\frac{k_p(n)}{k_p} \right]^{\frac{1}{n-1}} \cdot N \quad (4.12)$$

4.17 Análisis estadístico de los datos

A partir de los resultados de las réplicas de los diferentes experimentos, se calculó la media aritmética y la desviación estándar (*D.E.*). Con estos datos, se calculó el coeficiente de variación (*C.V.*) utilizando:

$$C.V. = \frac{\text{Media aritmética}}{D.E.} \times 100 \quad (4.13)$$

5. Resultados y discusión

5.1 Identificación de la cepa

La identidad de la cepa utilizada se confirmó usando dos criterios: a) observación de morfología colonial directa y, b) observación microscópica mediante la técnica de microcultivo (Samson y Pitt, 1990). De acuerdo a varios autores (Rifai, 1969; Bissett, 1984, 1991 a-c, 1992; Samuels, 1996), el género *Trichoderma* se identifica por su crecimiento rápido, hifas abundantes y conidias verdes. Cuando crecen sobre placas de agar, los hongos del género *Trichoderma* prácticamente no presentan micelio aéreo y segregan pigmentos de tonos amarillos. La pigmentación amarilla en especial es característica de algunas especies de la sección *Longibrachiatum* (Samuels, 1996).

En la figura 5.1, se pueden observar una fotografía de la cepa utilizada. El hongo se creció en placas de agar papa-dextrosa, a 30 ± 2 °C por 5 días. La morfología de la cepa utilizada coincide con la morfología descrita para el género *Trichoderma*: crecimiento rápido, hifas abundantes y esporas verdes. En la figura 5.1 no se observa la producción de pigmento; sin embargo, cuando se alargó el tiempo de incubación a 10 días se pudo apreciar la aparición del pigmento amarillo, característico de especies de la sección *Longibrachiatum*.

La morfología microscópica del hongo se presenta en la figura 5.2. El género *Trichoderma* pertenece al grupo de los deuteromicetos, hongos filamentosos septados que se reproducen asexualmente. En las figuras 5.2a) y 5.2b) se puede observar claramente las septas en las hifas. Estas observaciones, junto con las de morfología colonial, confirman que la cepa pertenece al género *Trichoderma*.

La presencia de conidias es otra característica que identifica al género *Trichoderma*. Las conidias pueden ser globulares, elipsoidales u oblongas. La forma de las conidias ayuda a diferenciar los diferentes grupos de especies del género, pero no permiten distinguir entre especies del mismo grupo.

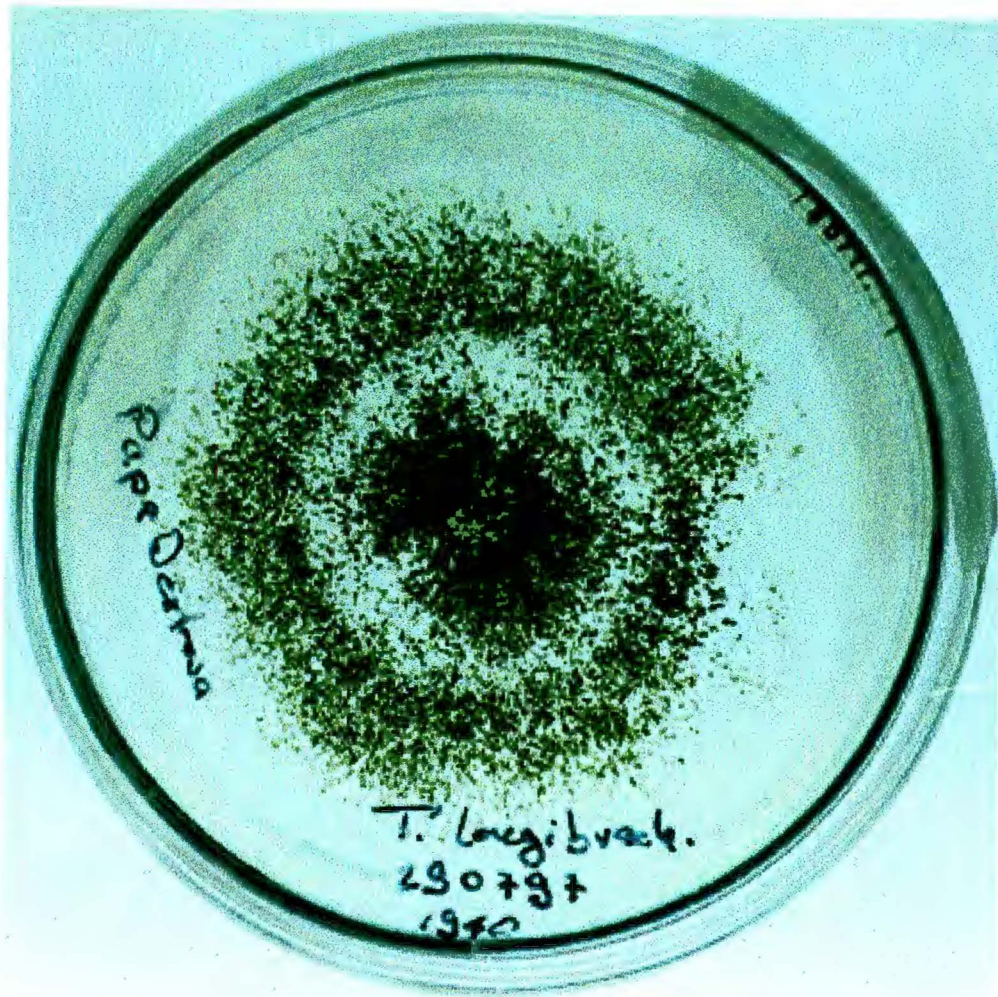


Figura 5.1. *Trichoderma longibrachiatum* IMI 061758 en agar papa-dextrosa

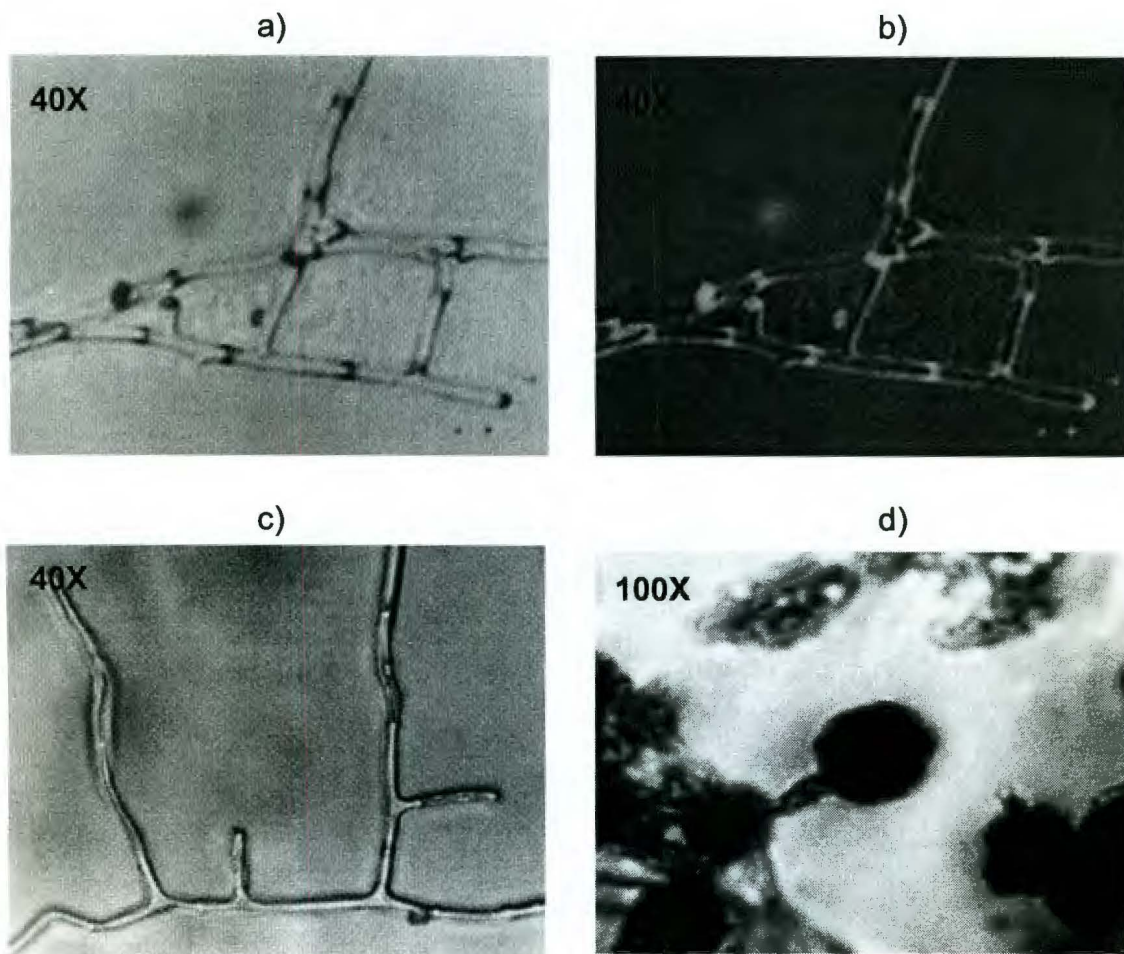


Figura 5.2. Microfotografías de *T. longibrachiatum* IMI 061758: a) campo donde se observan hifas septadas y dos hifas fusionadas; b) negativo del campo anterior, para resaltar las septas; c) campo donde se pueden observar pies de célula; d) acercamiento a un cuerpo fructífero donde se observa un conidióforo. Todas los frotis se prepararon como se describe en la metodología. Las microfotografías se tomaron en microscopio óptico usando un filtro de luz azul. Los aumentos utilizados se indican en la esquina superior izquierda de cada fotografía.

Las conidias pueden ser verdes, verde amarillo o incoloras (Samuels, 1996). La figura 2d) muestra un cuerpo fructífero donde se observa un conidióforo lleno de esporas (conidias). El color de las conidias es verde oscuro, y en observaciones posteriores se vio que las esporas liberadas son elipsoidales.

La identificación de la especie sobre la base de la morfología es especialmente difícil en el género *Trichoderma*, ya que varias especies comparten características morfológicas comunes (Rifai, 1969; Bissett, 1984, 1991a-c, 1992; Samuels, 1996). De hecho; Rifai (1969) afirma que no es válido definir una especie biológica basándose sólo en observaciones morfológicas. Sin embargo, la producción del pigmento amarillo en el medio confirma que la cepa pertenece a la sección *Longibrachiatum*. La sección *Longibrachiatum* incluye las especies *T. citrinoviride*, *T. parceramosum*, *T. pseudokoningii*, el anamorfo de *Hypocrea schweinitzii*, *T. reesei* y *T. longibrachiatum* (Bissett, 1984, 1991c; Samuels, 1996).

En conjunto, las características morfológicas observadas en la cepa utilizada en el presente trabajo nos permiten afirmar que esta pertenece al género *Trichoderma*, y que es muy probable que, efectivamente, sea la especie *T. longibrachiatum*. Sin embargo, para establecer la identidad definitiva de la cepa se requieren pruebas moleculares adicionales. Samuels (1996) menciona que se pueden usar análisis basados en perfiles de isoenzimas producidas y, ensayos moleculares para la identificación genética de diferentes especies. Pero, como lo señalan Castle y col. (1998), a la fecha existen pocos métodos moleculares establecidos que permitan determinar de manera rápida y confiable la identidad de una especie particular de *Trichoderma*.

5.2 Determinación del tiempo de fermentación.

Para determinar el tiempo de duración de las fermentaciones se corrió una fermentación en sales Volgel (Davis y Serres, 1970), durante 11 días, utilizando glucosa y xilano de avena como fuente de carbono. Cada 24 h, se retiró un matraz del sistema y se determinó: a) crecimiento, b) actividad y c) proteína extracelular total. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.3.

La máxima actividad enzimática se obtuvo al tercer día para los dos substratos. Sin embargo, el máximo de actividad en glucosa fue de 11.78 U, y en xilano de 16.00 U (fig. 5.3). Como puede observarse en la figura 5.3, en ambos casos la actividad presenta una caída y, posteriormente, una ligera recuperación a partir del séptimo día. Esta tendencia se mantiene hasta el final de la fermentación.

Cuando el hongo crece en glucosa, la secreción de proteína alcanza un máximo de 3.66 $\mu\text{g/ml}$ al segundo día. El nivel de proteína extracelular se mantiene prácticamente constante hasta el sexto día, presentando después un comportamiento errático. Cuando el substrato es xilano, la proteína secretada alcanza un máximo de 3.00 $\mu\text{g/ml}$ al día seis. Después del alcanzar el máximo, el contenido de proteína extracelular disminuye aproximadamente a 1.5 $\mu\text{g/ml}$ al séptimo día y se mantiene constante hasta el final de la fermentación (fig. 5.3).

El criterio utilizado para determinar el tiempo de duración de la fermentación fue actividad enzimática. Por lo que, debido a que el máximo de actividad se alcanzó en ambos substratos al tercer día y considerando que un mayor tiempo de fermentación implica costos mayores, se decidió fijar el tiempo de fermentación en seis días. Tomando en cuenta que el pico de actividad aparecía a las 24 h y desaparecía a los cuatro días, se fijaron los siguientes tiempos de toma de muestras: 0 (control), 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5 y 6 días.

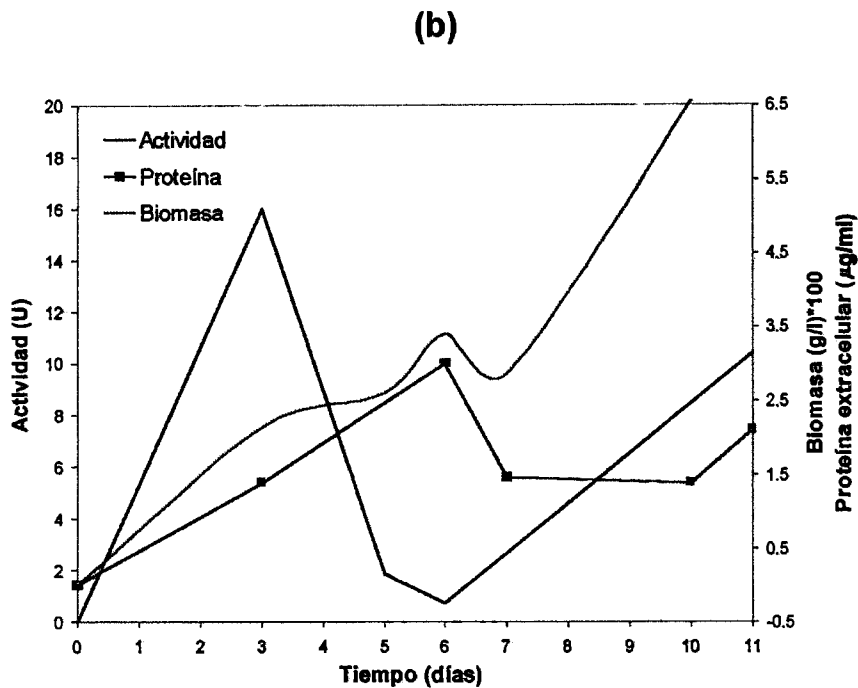
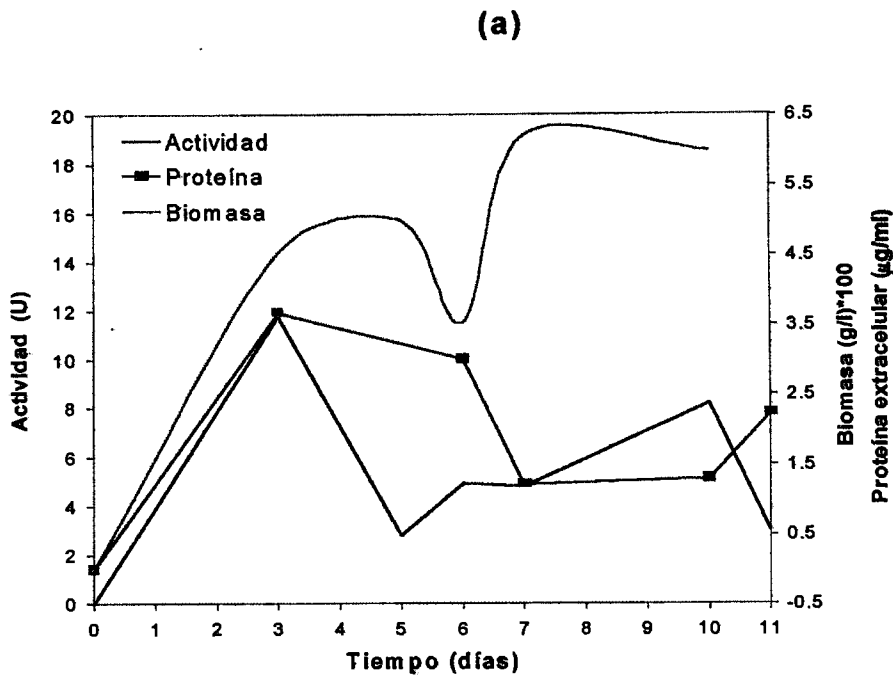


Figura 5.3. Desarrollo de *T. longibrachiatum* IMI 061758 en sales Vogel con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono. Los datos graficados representan la media aritmética de tres lecturas. Coeficiente de variación: actividad y proteína $\leq 10\%$; biomasa $\leq 15\%$

Generalmente, se recomienda el uso de la técnica de determinación del peso seco para evaluar el crecimiento de hongos filamentosos. Básicamente, esta técnica consiste en filtrar los caldos de fermentación a través de una membrana para separar el hongo del medio. El crecimiento del hongo se relaciona con la diferencia de peso de la membrana, antes y después, de la filtración. En nuestra opinión, esta técnica resulta ser efectiva cuando se tiene un crecimiento abundante o cuando se filtran grandes volúmenes de medio, de tal manera que registran diferencias de peso apreciables (del orden de g de micelio/L de medio). Sin embargo, cuando se tiene un crecimiento discreto o se trabaja con volúmenes pequeños, como en el caso del presente trabajo, la técnica pierde confiabilidad y se vuelve prácticamente insensible a los cambios en la biomasa.

La afirmación anterior se basa en el hecho de que en este experimento se registraron diferencias de peso del orden de los 0.02 a los 0.08 g de micelio/L, y el coeficiente de variación fue menor o igual al 15%. El que la desviación estándar represente el quince por ciento de la media obtenida indica que se tiene una dispersión relativamente amplia de los datos, consecuencia probable de las diferencias tan pequeñas de peso registradas. Además, como la diferencia máxima de peso entre la primera y la última lecturas obtenidas fue de aproximadamente 0.06 g, el error debido a la balanza puede representar un porcentaje significativo de este valor de biomasa. Por lo tanto, se decidió evaluar una técnica más sensible a crecimientos discretos del hongo.

5.3. Evaluación de biomasa mediante la técnica de densidad óptica

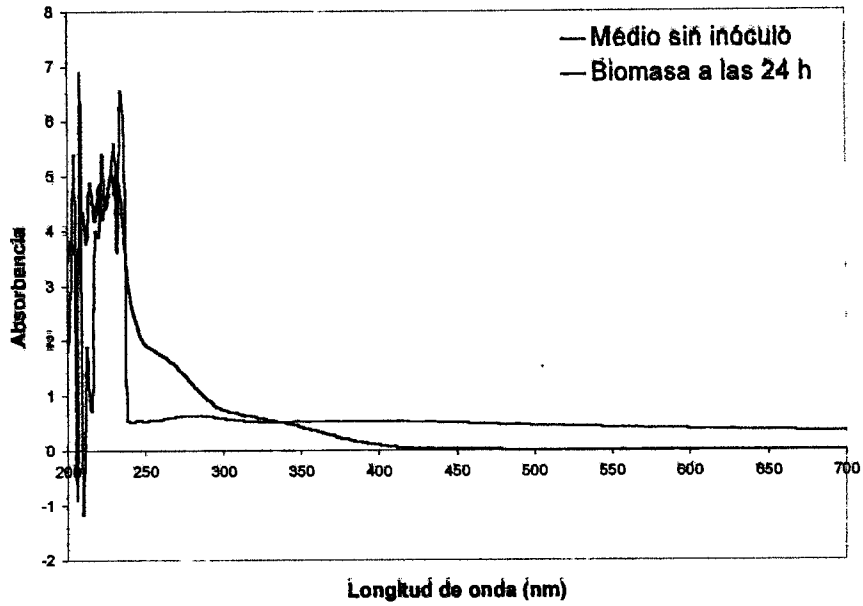
En un experimento diferente, se evaluó la técnica de detección de biomasa mediante el uso de densidad óptica (Ison y Matthew, 1997). Como lo establece la técnica, primero se realizó un barrido: del medio sin inocular y del medio con crecimiento. Esta prueba tiene como objetivo determinar si hay una longitud de onda, entre los 400 y los 700 nm, donde la absorbencia del medio no interfiera con la absorbencia de la biomasa. Los resultados del barrido se muestran en la figura 5.4.

La absorbencia del medio es prácticamente cero entre los 400 y los 700 nm, tanto con glucosa (fig. 5.4a), como con xilano (fig. 5.4b). Y después de analizar los espectros, se determinó que la absorbencia máxima de la biomasa se presentaba a los 400 nm (fig. 5.4). Por lo tanto, se decidió que la longitud de onda a utilizar para detectar el desarrollo de la biomasa fuera 400 nm.

El experimento se dejó correr durante 6 días para evaluar la sensibilidad de la técnica a la aparición de biomasa (fig. 5.5). Esta técnica resultó ser más sensible a la aparición de biomasa que la determinación por peso seco. Como puede observarse en la figura 5.5, desde las 12 h se detectan absorbencias de aproximadamente 0.12 para glucosa y de 0.20 para xilano. Estos valores de absorbencia son relativamente pequeños como para considerarlos confiables. De hecho, la técnica exige que la absorbencia de los caldos se mantenga entre 0.3 y 0.5 unidades de absorbencia. Pero como también puede apreciarse en la figura 5.5, a las 24 h ya se tienen valores de absorbencia de 0.54 U para el crecimiento en glucosa y de 0.37 U para el crecimiento en xilano.

A partir de las 24 h, la absorbencia de los caldos con glucosa excedió los límites señalados por la técnica, por lo que se procedió a hacer diluciones de los caldos para tomar las lecturas. La absorbencia de los caldos con xilano excedió los límites hasta los 2 días y medio.

(a)



(b)

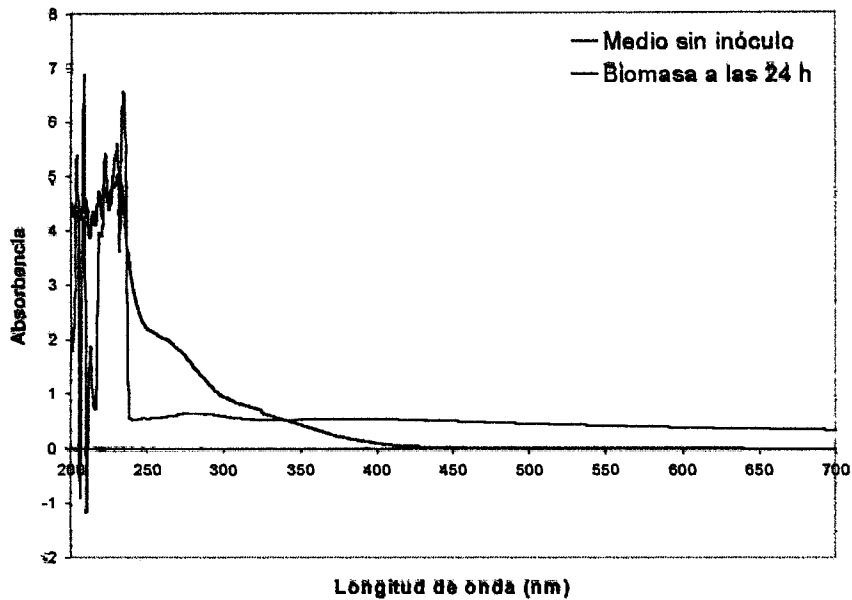


Figura 5.4. Barrido de sales Vogel con: a) glucosa y, b) xilano como fuente de carbono. Se muestran los espectros obtenidos para el medio sin inocular (línea roja), y para los caldos a las 24 h (línea azul).

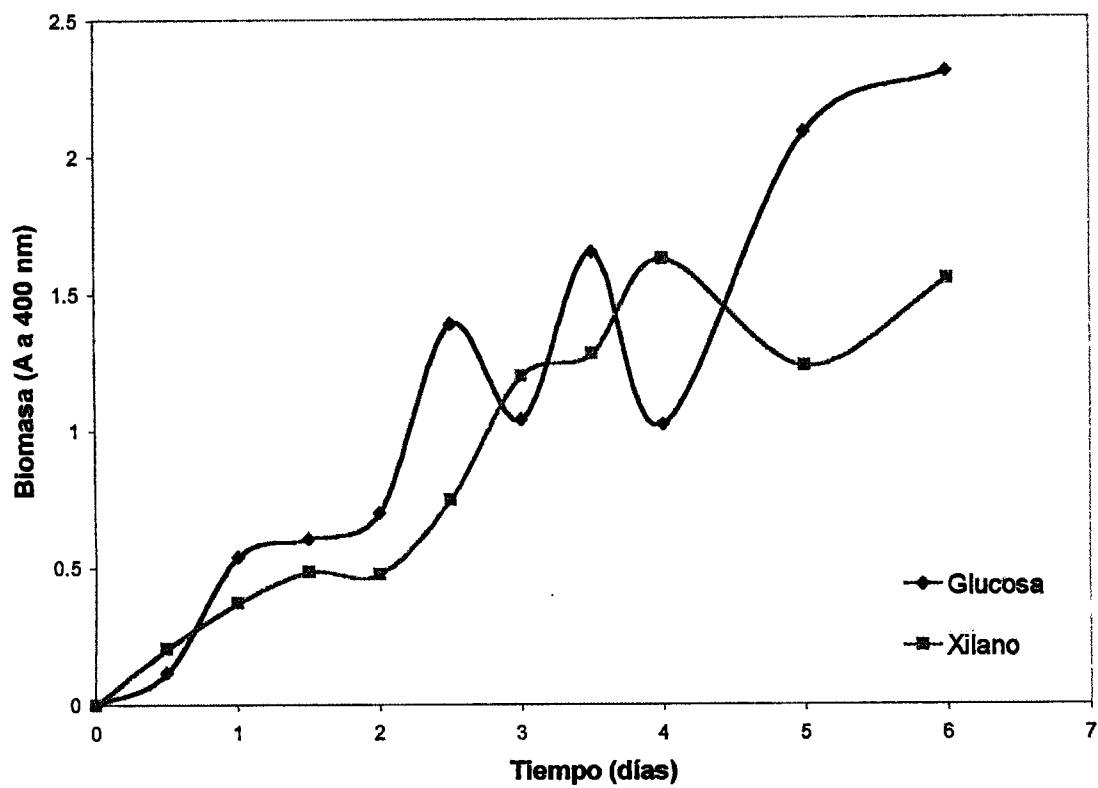


Figura 5.5. Sensibilidad de la técnica de densidad óptica al desarrollo de biomasa en sales Volgel, con glucosa y xilano como fuente de carbono. Cada punto en la gráfica representa la media aritmética de tres lecturas. Coeficiente de variación $\leq 5\%$

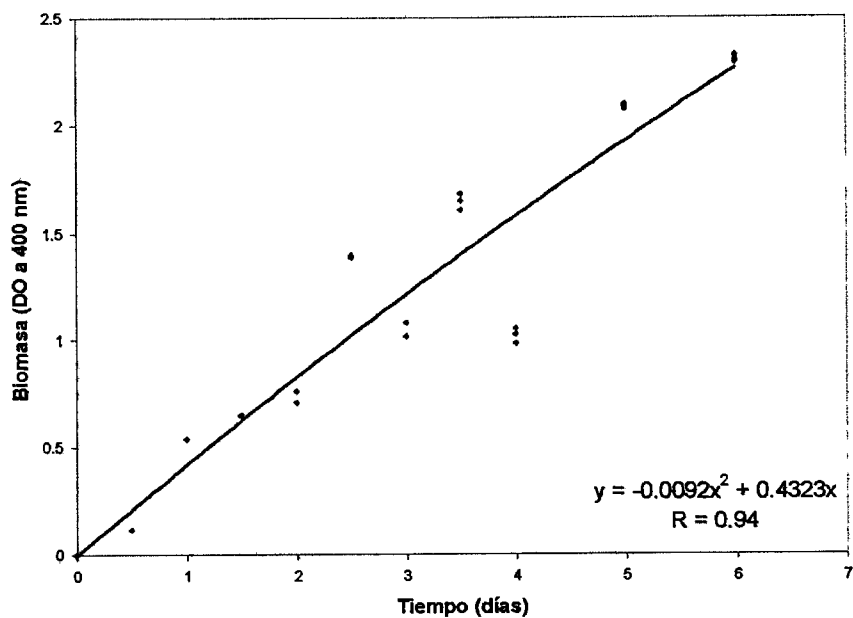
La máxima absorbencia registrada durante el experimento fue de 2.31 U para el hongo creciendo en glucosa, y de 1.55 U para cuando creció en xilano. El coeficiente de variación resultó ser menor o igual a cinco. La diferencia entre el máximo y el mínimo de absorbencia registrada fue de 2.19 U para el crecimiento en glucosa, y de 1.35 U para el crecimiento en xilano. Estas diferencias en absorbencia son lo suficientemente grandes como para considerar la técnica sensible.

Como se observa en la figura 5.5, se presentaron variaciones en las lecturas de absorbencia registradas. Estos altibajos pueden atribuirse a una mala homogeneización de los caldos o a la toma individual de matraces para cada lectura. El bajo coeficiente de variación indica que el error asociado a una mala homogeneización de los caldos es muy pequeño. Es más probable que la variabilidad propia del desarrollo del hongo sea el factor involucrado en el comportamiento observado.

Para comprobar que la técnica de detección del desarrollo de biomasa mediante absorbencia da resultados consistentes y que las variaciones observadas no afectan significativamente la tendencia de las lecturas, se hizo una regresión no lineal con los datos obtenidos. El resultado se muestra en la figura 5.6.

En ambos casos, las líneas de tendencia resultantes de la regresión no lineal ajustan satisfactoriamente a un modelo cuadrático. El coeficiente de correlación para el crecimiento en glucosa resulta de 0.94 (fig. 5.6a), y para el crecimiento en xilano de 0.95 (fig. 5.6b). Es importante señalar que el modelo obtenido no es válido para predecir el crecimiento del hongo, ya que no toma en cuenta más que el efecto del tiempo sobre el crecimiento. Este modelo es solamente una ecuación que ajusta a los datos analizados. Los resultados obtenidos indican que la técnica de detección de biomasa por densidad óptica es más sensible que la técnica de detección por peso seco. La poca dispersión de las lecturas y su consistencia permiten afirmar que esta técnica es confiable para evaluar crecimientos discretos de hongos filamentosos.

(a)



(b)

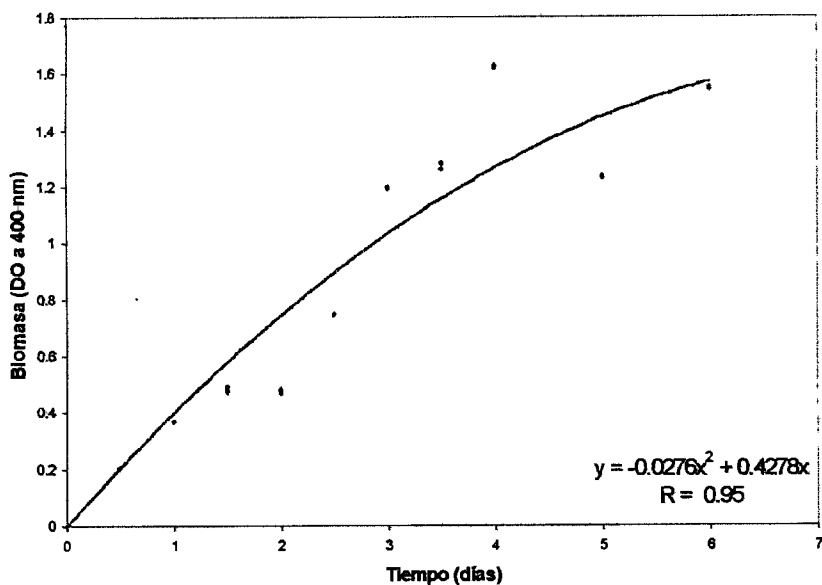


Figura 5.6. Evaluación de la técnica de densidad óptica para detectar el desarrollo de biomasa en sales Volgel con: a) glucosa y, b) xilano como fuente de carbono. Se practicó una regresión no lineal para determinar si las variaciones registradas afectaban significativamente la tendencia de los datos.

Hay varios trabajos sobre la producción de xilanasas y celulasas de *Trichoderma* sp. (Knapp y Legg, 1986; Kalra y col., 1986; Royer y Nakas, 1989; Chen y col., 1997), pero ninguno de estos trabajos reporta la evolución de la biomasa, ni su correlación con la producción de enzimas. Después de revisar algunos trabajos recientes sobre producción de xilanasas por hongos filamentosos (Copa-Patiño y Broda, 1994; Ghosh y Nanda, 1994; McCrae y col., 1994; Jain, 1995; Khanna y col., 1995; Maijala y col., 1995; Sachslehner y col., 1998), se encontró que sólo Maijala y col. (1995), y Sachslehner y col. (1998), reportan determinación de biomasa por la técnica de peso seco.

Maijala y col. (1995), correlacionan actividad enzimática y desarrollo del hongo; encontrando que a mayor desarrollo se obtiene mayor actividad. Sin embargo, en la discusión de los resultados, los autores comentan la dificultad de estandarizar esta técnica al evaluar el desarrollo del hongo, *Heterobasidion annosum*. Los valores reportados de biomasa se encuentran en el rango de los 0.08 g de micelio/L, a los 0.3 g/L. En nuestra opinión, estos valores de biomasa son bajos y susceptibles a errores experimentales significativos.

Sachslehner y col. (1998), no evaluaron crecimiento micelar en el transcurso de las fermentaciones, sino que usaron la técnica de peso seco para determinar la cantidad de micelio inoculada. Se correlacionó actividad enzimática con inóculo utilizado, encontrando que a mayor inóculo se obtiene mayor actividad. La correlación encontrada es predecible, ya que la secreción de proteínas está asociada al crecimiento en hongos filamentosos (Peberdy, 1994). Por lo que resulta obvio que a mayor biomasa inoculada corresponde una mayor secreción de proteína y, como consecuencia, mayor actividad enzimática.

Es importante contar con técnicas sensibles que permitan detectar, de manera confiable, desarrollos discretos de microorganismos filamentosos. Además, estas técnicas deben ser rápidas para poder correlacionar efectivamente el desarrollo del microorganismo con la producción del metabolito de interés. Si se conoce en que

fase de desarrollo se da la mayor producción del metabolito, se pueden diseñar medios que incluyan los nutrimentos necesarios para incrementar la producción de un metabolito en una fase de crecimiento particular.

Es notable que los trabajos que reportan la producción de xilanasas y celulasas por hongos filamentosos analicen solamente la evolución de actividad con respecto al tiempo. Es cierto que, en primera instancia, la máxima obtención de actividad enzimática es el principal objetivo de estos trabajos, pero todos ellos se hicieron a escala laboratorio, en matraces agitados. La producción de enzimas a gran escala plantea problemas técnicos serios, que podrían resolverse más eficientemente si se conoce en detalle el metabolismo del organismo productor. Si se desea caracterizar la producción de un metabolito en particular por un organismo dado, es importante obtener la mayor cantidad de información posible de las fermentaciones en el laboratorio. De esta manera el paso a un fermentador, que es un sistema escalable, será menos brusco y más provechoso.

Desde este punto de vista, el uso y validación de técnicas como la de densidad óptica (Ison y Matthews, 1997), que son rápidas, sensibles y confiables, abre un nuevo panorama al estudio de fermentaciones en el laboratorio. Generalmente, durante estas fermentaciones se trabaja con volúmenes pequeños de medio y se obtienen crecimientos discretos del microorganismo, por lo que el uso de estas técnicas no sólo es deseable, sino conveniente.

5.4 Estabilidad del extracto crudo frente a la temperatura

A pesar de que algunos trabajos de producción de xilanasas por *Trichoderma longibrachiatum* reportan sus ensayos de actividad enzimática entre los 40 y los 50 °C (Royer y Nakas, 1989; Chen y col., 1997), se consideró importante determinar la estabilidad frente a la temperatura de las xilanasas producidas por la cepa de *T. longibrachiatum* utilizada en este trabajo.

Se encontró que el extracto conserva actividad a todos los valores de temperatura evaluados, desde 30 hasta 90 °C, pero conserva una mayor actividad entre los 40 y los 50 °C (fig. 5.7). Se desconoce la razón por la cual se perdió actividad a 30 °C. El extracto conserva aproximadamente el 70 % de actividad hasta los 50 °C, por lo que las xilanasas no deberían perder actividad a temperaturas bajas. Este resultado es más atribuible a un error experimental que a la desnaturalización de las xilanasas. Es importante resaltar que el extracto crudo conserva un 40% de actividad residual hasta los 90 °C (fig. 5.7), esto sugiere la presencia de una fracción de xilanasas termoestables.

Las bajas temperaturas afectan las interacciones hidrofóbicas, estas interacciones ayudan a estabilizar las proteínas. En casos inusuales, algunas enzimas presentan pérdida de actividad cuando se mantienen por debajo de los 20 °C. Un ejemplo de tales enzimas son las mananasas producidas por *Aspergillus oryzae* (Venegas Barrera, 1998), que pierden notoriamente actividad cuando se mantienen entre 4 y 7 °C.

Los hongos del género *Aspergillus* pertenecen a la misma familia que el género *Trichoderma* y las mananasas, al igual que las xilanasas, son hemicelulasas, enzimas que atacan sustratos semejantes y que podrían compartir características estructurales. Pero si las xilanasas producidas por *T. longibrachiatum* IMI 061758 son sensibles a bajas temperaturas, sería extraordinario que perdiera el 60% de actividad

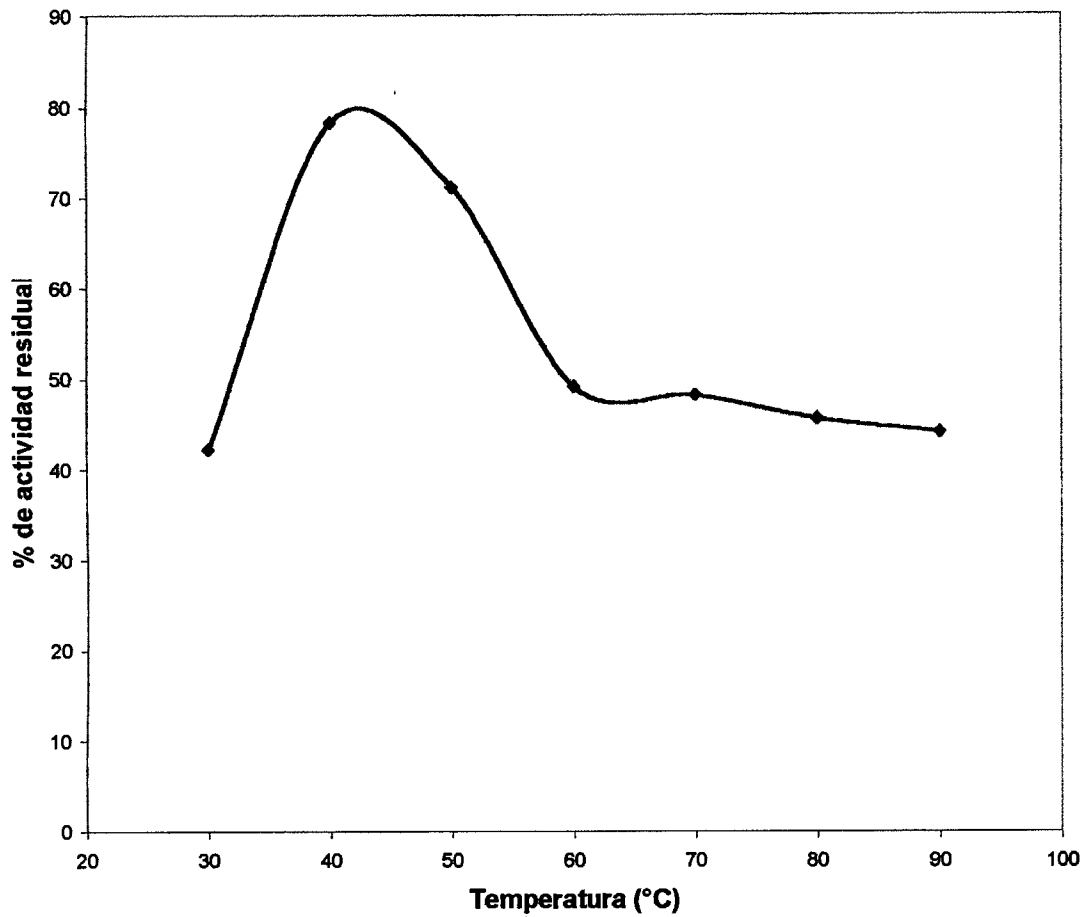


Figura 5.7. Estabilidad frente a la temperatura del extracto crudo de una fermentación de *T. longibrachiatum* IMI 061758 en sales Vogel. Los puntos en la gráfica representan la media aritmética de tres lecturas. Coeficiente de variación $\leq 10\%$

al mantenerlas a 30 °C, ya que esta temperatura no afecta normalmente a las proteínas. Además, los hongos del género *Trichoderma* son mesófilos, crecen a temperaturas cercanas a los 30 °C, por lo que no es probable que sus enzimas pierdan actividad a estas temperaturas.

Las xilanasas producidas por *T. longibrachiatum* son relativamente termolábiles, pero los resultados obtenidos por Royer y Nakas (1989), refuerzan la hipótesis de que la pérdida de actividad en el extracto crudo se debe a un error en la manipulación del extracto más que a su termolabilidad. Estos autores reportan que la actividad de su extracto crudo se incrementó linealmente con la temperatura, entre los 30 y los 55 °C, cuando el tiempo de duración de la prueba de actividad fue de 30 min.

Sin embargo, las generalizaciones deben tomarse con precaución, ya que las enzimas producidas por un microorganismo del mismo género y especie pueden variar dependiendo de la cepa utilizada y de la fuente de aislamiento. Por ejemplo, Chen y col. (1997), reportan la producción y purificación de una xilanasas de *T. longibrachiatum* que difiere, en peso molecular, actividad y modo de acción, de las xilanasas purificadas por Royer y Nakas (1991). Las xilanasas de Royer y Nakas (1991), también se obtuvieron de *T. longibrachiatum*, sólo que de una cepa diferente.

En base a los resultados obtenidos, se fijó la temperatura para las pruebas de actividad en 50 °C. Esta decisión se tomó considerando que el porcentaje de actividad residual es prácticamente el mismo a 40 y a 50 °C. Además, varios trabajos sobre producción y caracterización de xilanasas de diversas fuentes reportan sus pruebas de actividad enzimática a esta temperatura. Por lo tanto, realizar las pruebas de actividad a 50 °C nos permite comparar la actividad de las xilanasas de *T. longibrachiatum* IMI 061758 con las actividades reportadas por otros autores.

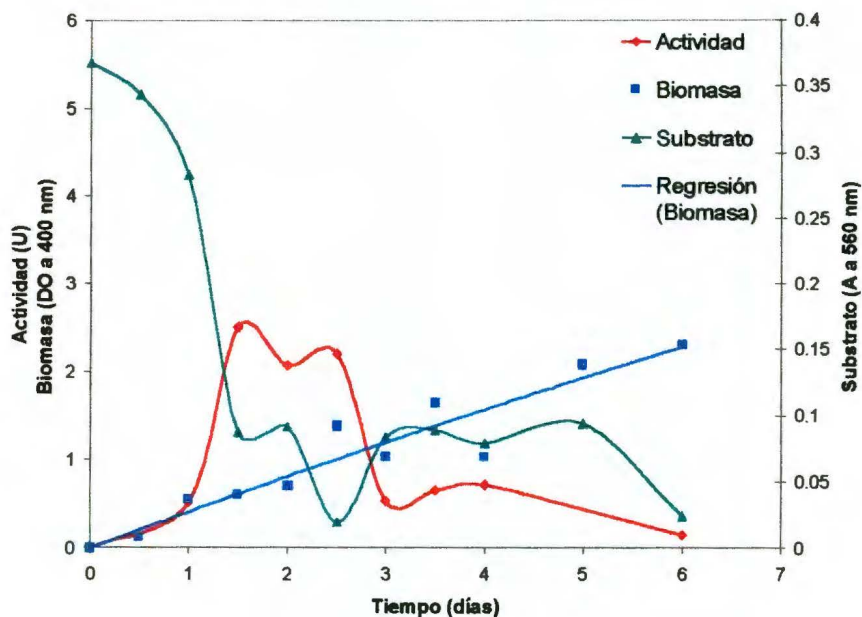
5.5 Producción de xilanasas en sales Vogel

Uno de los principales objetivos de este trabajo fue caracterizar la producción de xilanasas por *T. longibrachiatum* IMI 061758 a escala laboratorio. Una parte importante de esta caracterización, fue el estudio del metabolismo del hongo. Por esta razón, se eligió comenzar las fermentaciones en un medio de cultivo definido: Sales Vogel (Davis y Serres, 1970). El trabajar con este medio presentó algunas ventajas: a) permitió conocer la composición exacta y las cantidades en las que se encontraban cada uno de los componentes; b) fue posible elegir las fuentes de carbono y su concentración; y c) las sales Vogel se reportan en otros trabajos (Sandhu y Kalra, 1982, 1985; Kalra y col., 1986; Royer y Nakas, 1989, 1991), como un medio apropiado para el crecimiento de *T. longibrachiatum*.

Se trabajó con glucosa y xilano de avena (Sigma), como fuentes de carbono. El usar glucosa como única fuente de carbono nos permitía determinar si la producción de xilanasas, en la cepa de *T. longibrachiatum* utilizada, es constitutiva; y si lo era, compararla contra la producción lograda en xilano (fig. 5.8). Durante el tiempo que duraron las fermentaciones, se registró la evolución de biomasa, actividad enzimática en el extracto crudo, la producción de proteína extracelular y el pH de los caldos. El objetivo de estudiar los anteriores parámetros fue tratar de correlacionar la actividad xilanólítica recuperada con el crecimiento y la secreción de proteína extracelular. El pH de los caldos se registró para evaluar su posible efecto sobre la actividad del extracto crudo.

Los cultivos de *T. longibrachiatum* IMI 061758 crecieron mejor en glucosa. Con este sustrato, el hongo alcanza un crecimiento de 2.31 U de densidad óptica (DO) al día seis (fig. 5.8a). En xilano, se tiene un crecimiento de 1.55 U de DO al final de la fermentación (fig. 5.8b).

(a)



(b)

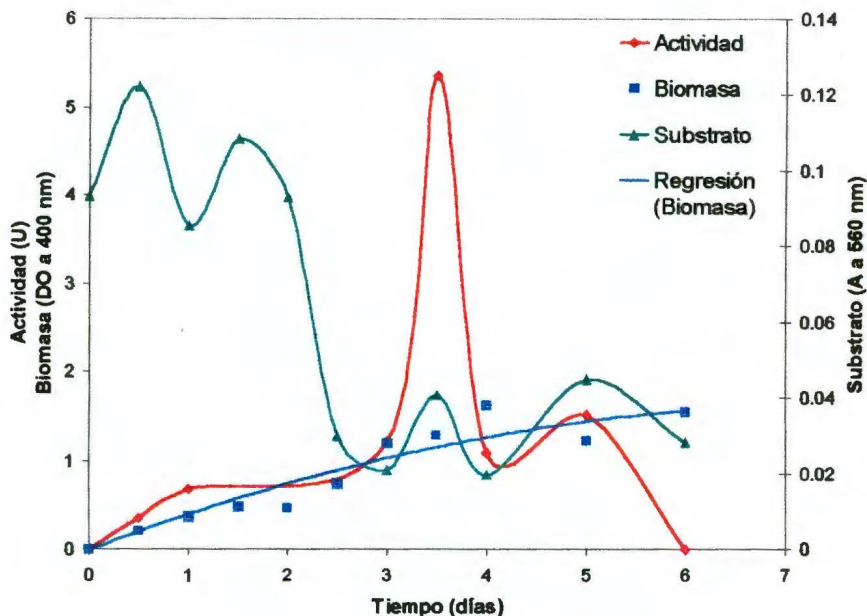


Figura 5.8. Desarrollo de *T. longibrachiatum* IMI 061758 en sales Vogel con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono (1). Los puntos en la gráfica representan la media aritmética de tres lecturas. Coeficientes de variación: actividad $\leq 10\%$; substrato $\leq 10\%$; biomasa $\leq 5\%$. Se presenta la tendencia del comportamiento de la biomasa. La tendencia se obtuvo con una regresión de segundo orden. $R > 0.9$ para ambos substratos.

El hongo crece casi a la misma velocidad en ambos substratos hasta el tercer día de la fermentación; pero a partir del cuarto, la velocidad de crecimiento en xilano empieza a disminuir, mientras que en glucosa conserva la misma tendencia (fig. 5.8).

En glucosa, la actividad xilanólítica alcanza un máximo de 2.51 U al día y medio, y se mantiene prácticamente constante por las siguientes 24 h. A partir del tercer día, la actividad decae y se mantiene así hasta el final de la fermentación (fig. 5.8a). En xilano, la actividad alcanza un máximo de 5.36 U a los tres días y medio. En contraste al comportamiento observado en glucosa, el pico aparece y desaparece en el lapso de tiempo comprendido entre el tercer y el cuarto día (fig. 5.8b).

La aparición del pico de actividad no parece estar relacionada al desarrollo del hongo. En glucosa, el máximo de actividad aparece cuando se tienen 0.60 U de DO; mientras que en xilano, el máximo de actividad se da cuando se tienen 1.28 U de DO. Recíprocamente, la pérdida de actividad no se puede asociar al crecimiento. El pico de actividad en glucosa cae cuando se tienen 1.04 U de DO, y en xilano cuando se tienen 1.62 U de DO. El factor que, aparentemente, puede asociarse a la inducción de actividad es la concentración de sustrato. En ambas fuentes de carbono el incremento de actividad coincide con la caída de sustrato en el medio (fig. 5.8).

Las variaciones observadas en los datos graficados en la figura 5.8, son atribuidas a los errores experimentales propios de cada método de detección y a la variabilidad natural del hongo. Sin embargo, la tendencia observada y el bajo coeficiente de variación hacen los datos confiables. La naturaleza química del xilano, que es más complejo y difícil de degradar, puede explicar el porque se tiene un mejor crecimiento en glucosa.

Como se mencionó anteriormente, la secreción de xilanasas no parece estar asociada a un estado de crecimiento en particular. Andreotti y col. (1977), y Knapp y Legg (1986), estudiaron la producción de xilanasas y celulasas por *Trichoderma* QM

9414 y *T. reesei* QM 9123 (ATCC 24,449), respectivamente, encontrando que tampoco podían relacionar directamente el crecimiento del hongo a la producción de estas enzimas.

De manera similar a los resultados obtenidos en este trabajo, Sachslehner y col. (1998), reportan la obtención de actividades apreciables de mananasas, xilanasas y celulasas después del agotamiento de glucosa en el medio para una fermentación con *Sclerotium rolfsii* CBS 191.62, otro hongo filamentoso. Por lo tanto, es probable que la producción de xilanasas forme parte de la respuesta al estrés inducido por el agotamiento de sustrato.

La síntesis de xilanasas y otras endoglucanasas en hongos filamentosos, está regulada, generalmente, por inducción y/o represión catabólica (Sachslehner y col., 1998). Debido a que sustratos como el xilano son demasiado grandes para pasar a través de la membrana celular y activar la inducción de las endoglucanasas, se postula que los oligosacáridos producidos al principio de la fermentación, por acción de las endoglucanasas constitutivas, inducen la síntesis acelerada de estas enzimas (Biely, 1993).

Los resultados obtenidos en esta fermentación se ajustan al modelo de regulación catabólica propuesto por Biely: Cuando el hongo crece en glucosa, produce xilanasas en pequeñas cantidades (fig. 8a); mientras que cuando crece en xilano, se observa un incremento en la actividad enzimática a los tres días y medio (fig. 8b). La actividad específica de las xilanasas producidas, en el día de máxima actividad, es de 2.98 U de actividad xilanólítica/ μg de proteína extracelular en glucosa, y de 3.71 U/ μg de proteína en xilano.

El que la actividad específica sea mayor en xilano puede tener dos explicaciones: (1) La secreción de proteínas en hongos filamentosos está asociada al crecimiento (Peberdy, 1994), y el crecimiento en glucosa fue más abundante, por lo que el hongo secretó mayores cantidades de proteína que no son xilanasas; (2) los xilo-

oligosacáridos liberados de la hidrólisis parcial del xilano presente en el medio indujeron la síntesis acelerada de xilanasas, por lo que éstas se encontraban presentes en mayor proporción en el medio. Si esto último se demostrara, se estaría aportando evidencia de que el modelo propuesto por Biely es correcto; al menos, para la síntesis de xilanasas en *T. longibrachiatum* IMI 061758.

El incremento, y posterior caída, en actividad enzimática durante el transcurso de la fermentación ya ha sido reportado por otros autores para la producción de xilanasas por *Talaromyces emersonii* (Tuohy y Coughlan, 1992), *Streptomyces cyaneus* (Wang y col., 1993) y *Trichoderma longibrachiatum* CS-185 (Chen y col., 1997). Este comportamiento se ha atribuido a factores tales como el ataque de proteasas (Biely y col., 1988), y la variación del pH de los caldos durante la fermentación (Chen y col., 1997). Ninguno de los trabajos citados aporta evidencias sólidas que demuestren que la pérdida de actividad se debe a alguno de los factores mencionados.

En el presente trabajo se observó que el pH de los caldos subió de 7.53 a 9.04 en glucosa (fig. 5.9a), y de 7.33 a 9.15 en xilano (fig. 5.9b). Como se aprecia en la figura 5.9, no existe una correlación directa entre el pH de los caldos y el incremento y caída en la actividad enzimática. En glucosa, el incremento en actividad xilanolítica se presenta cuando el pH de los caldos es de 7.70; mientras que la caída se da cuando el pH es de 8.55 (fig. 5.9a). En xilano, el pico de actividad enzimática se presenta cuando el pH está entre 8.7 y 8.9, y la caída es a un pH de 9.00 U (fig. 5.9b).

El incremento en el pH del medio durante la producción de enzimas extracelulares por hongos del género *Trichoderma* ya ha sido reportado por otros autores. Knapp y Legg (1986) reportan un incremento en el pH de 3 a 5.3 para *T. reesei* creciendo en medio líquido con paja de trigo como fuente de carbono; y Chen y col. (1997), también reportan un incremento en el pH de 6.00 a 7.00 para *T. longibrachiatum* CS-185 en medio líquido con xilano de avena como sustrato. Esta característica no es

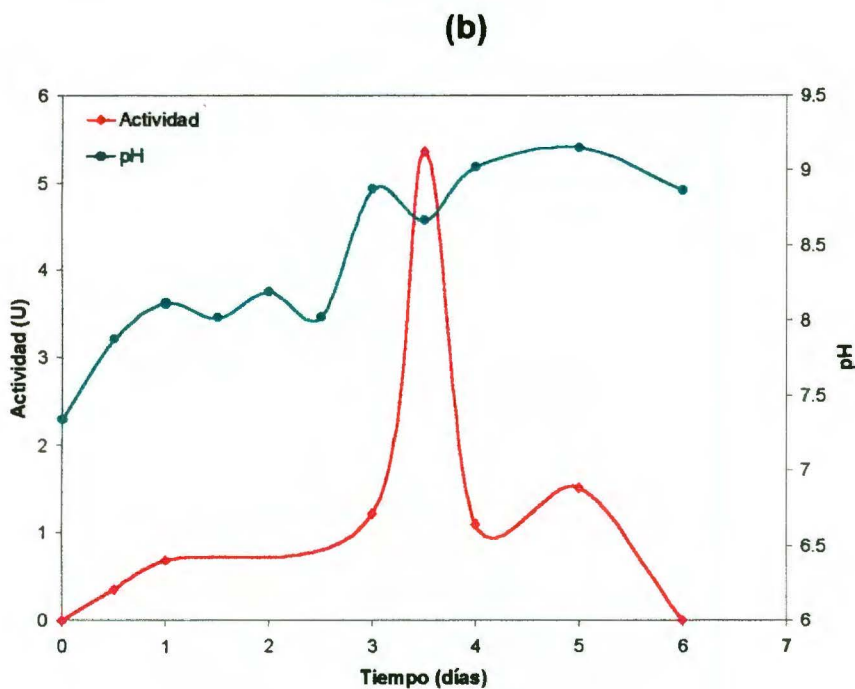
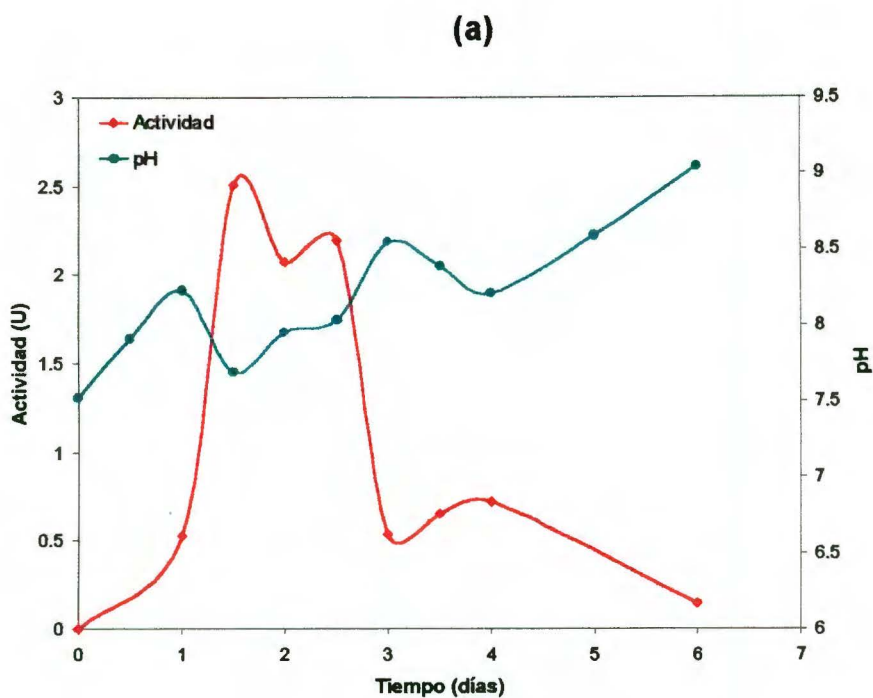


Figura 5.9. Actividad enzimática y pH de una fermentación de *T. longibrachiatum* IMI 061758 en sales Vogel con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono. Los puntos en la gráfica representan la media aritmética de tres lecturas. Coeficientes de variación: Actividad $\leq 10\%$; pH $\leq 1\%$

exclusiva del género, Stewart y col. (1983), reportan un comportamiento similar en *Aspergillus fumigatus*.

Chen y col. (1997), atribuyen la pérdida de funcionalidad de las xilanasas al incremento de pH en el medio. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que esto es poco probable, ya que la caída de actividad enzimática en el medio con glucosa se da a valores de pH donde comienza a aparecer el pico de actividad en el medio con xilano; y no existe una razón para creer que las xilanasas secretadas en un substrato sean diferentes a las producidas en el otro. Sachslehner y col. (1998), hacen un análisis de las isoenzimas producidas por *Sclerotium rolfsii* creciendo en diferentes fuentes de carbono con el mismo medio, encontrando que los perfiles electroforéticos de las xilanasas producidas son similares para todas las fuentes de carbono.

Además, hay trabajos que reportan un incremento en la producción de xilanasas a valores de pH progresivamente mayores: Linko y col. (1977), reportan que la producción, por *T. viride*, es mayor con el hongo creciendo a pH de 4.0 en lugar de 3.0. Knapp y Legg (1986), reportan un máximo de producción, por *T. reesei*, a valores de pH superiores a 5.0. Royer y Nakas (1989), reportan un incremento en la producción, por una cepa *T. longibrachiatum* Rifai, cuando el pH inicial del medio se incrementa de 5.0 a 7.0. Estos trabajos coinciden en señalar que la secreción de xilanasas, en los microorganismos mencionados, depende fuertemente del pH inicial del medio y de la naturaleza del substrato utilizado.

La relación entre la proteína extracelular total y la actividad enzimática se presenta en la figura 5.10. La producción de proteína alcanza un máximo de 4.10 µg/ml en glucosa, y de 2.26 µg/ml en xilano. La aparición de un pico de proteína que coincide con la pérdida de actividad en ambos substratos (fig. 5.10), sugirió la presencia de proteasas en el medio. Por lo que, se hizo la prueba de detección de actividad proteolítica de Kunitz (1946), a los extractos crudos. No se detectó actividad proteolítica a lo largo de la fermentación (tabla 5.1).

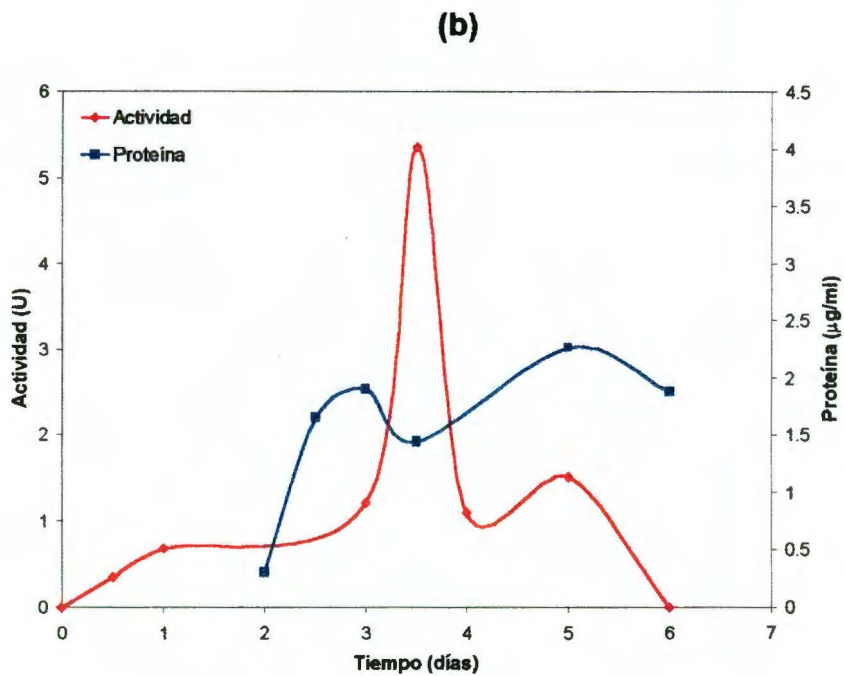
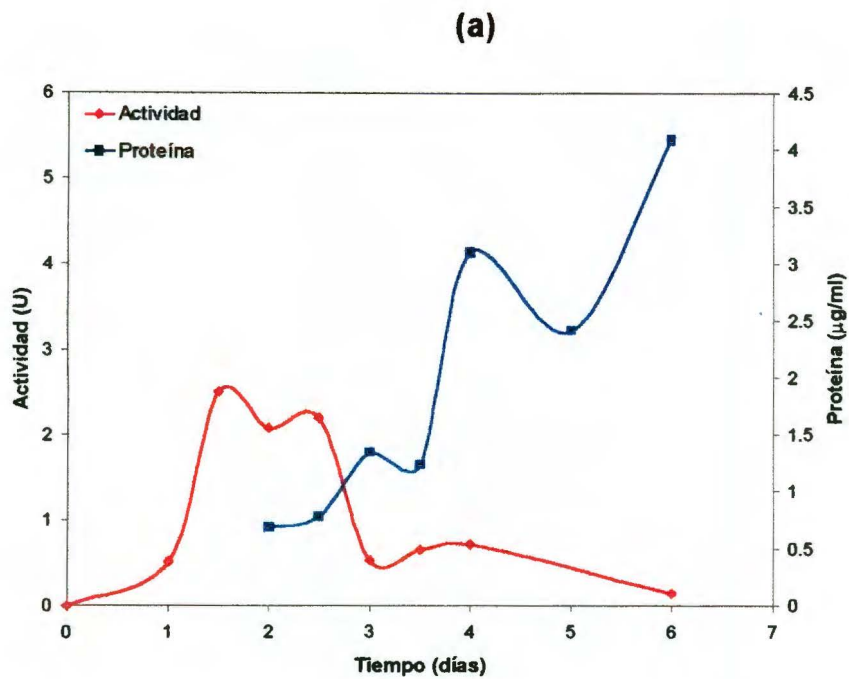


Figura 5.10. Actividad enzimática y proteína extracelular total de una fermentación de *T. longibrachiatum* IMI 061758 en sales Volgel con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono. Los puntos en la gráfica representan la media aritmética de tres lecturas. Límite de detección de proteína: 1 µg/ml. Coeficientes de variación: Actividad ≤ 10%; proteína ≤ 10%

Tabla 5.1. Actividad proteolítica en el extracto crudo de dos fermentaciones de *T. longibrachiatum* IMI 061758 en sales Volgel

Tiempo (días)	Actividad Proteolítica ^a (Incremento en absorbencia a 280 nm)		
	Glucosa	Xilano	α -Quimotripsina
1	N.D. ^b	N.D.	0.85
2	N.D.	N.D.	0.85
3	N.D.	N.D.	0.88
4	N.D.	N.D.	0.92
5	N.D.	N.D.	0.82
6	N.D.	N.D.	0.82

^a Los valores de la tabla son la media aritmética de tres lecturas. Coeficiente de variación ≤ 5

^b No Detectable.

Con esto, se minimiza la posibilidad de que la caída de actividad enzimática se deba al ataque de proteasas. Aunque pudo ocurrir, que hubiera proteasas en el medio que el método de Kunitz (1946) no pudo detectar.

En las réplicas de las fermentaciones se utilizó la variante (b), del método de Sinner y Puls (1978) para detectar azúcares reductores. Se utilizó esta variante debido a la baja concentración de azúcares reductores detectados en las fermentaciones anteriores. Esta variante de la técnica permitió ampliar la sensibilidad de 1 a 0.10 mM de xilosa equivalente.

Esencialmente se obtuvieron los mismos resultados: El hongo crece mejor en glucosa; y de nuevo se observa el incremento y caída en la actividad enzimática, tanto para glucosa como para xilano. El comportamiento de la actividad xilanolítica en glucosa no presenta variaciones significativas (fig. 5.11a); mientras que en xilano, el pico de actividad se presenta 24 h antes, a los dos días y medio (fig. 5.11b). Otra diferencia importante son los valores máximos de actividad enzimática registrados: 1.00 U en glucosa (fig. 5.11a), y 3.39 U en xilano (fig. 5.11b). Los valores de biomasa, proteína extracelular total y la evolución del pH de los caldos son prácticamente los mismos en las dos réplicas (estos resultados no se muestran), los únicos valores diferentes son los de actividad enzimática.

Royer y Nakas (1989), y Chen y col. (1997), reportan diferencias significativas en los valores de actividad xilanolítica dependiendo del método de detección de azúcares reductores utilizado. García y col. (1993), evaluaron tres de las técnicas más utilizadas para la detección de azúcares reductores: El método de Nelson-Somogyi (1952), la técnica del DNS, o ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959) y una variante del método de Sinner y Puls (1978). Estos autores reportan que de los tres métodos evaluados el mejor es el método de Sinner.

Como se obtienen valores semejantes de crecimiento, proteína extracelular y pH de los caldos en las dos fermentaciones, es probable que la diferencia de valores en

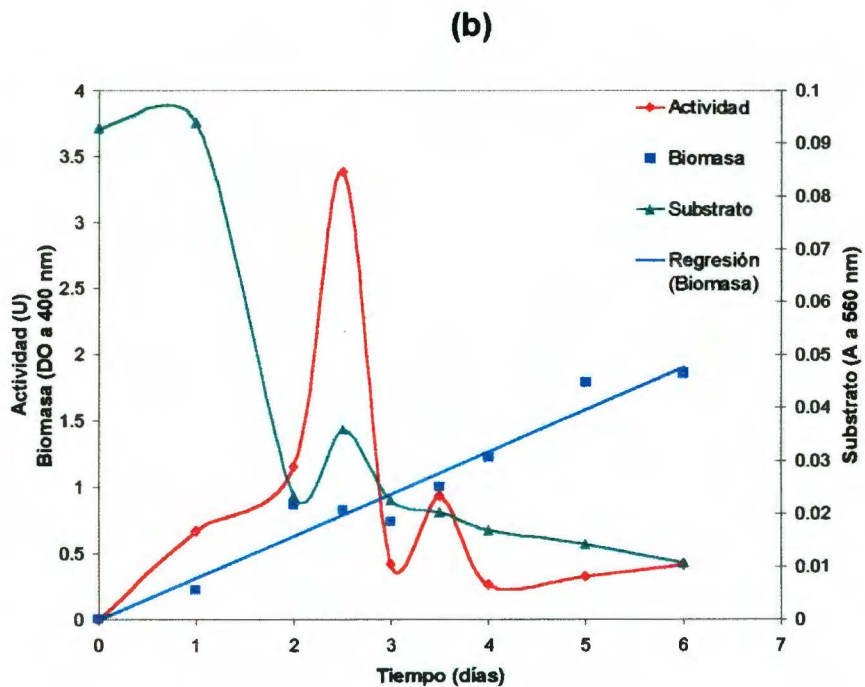
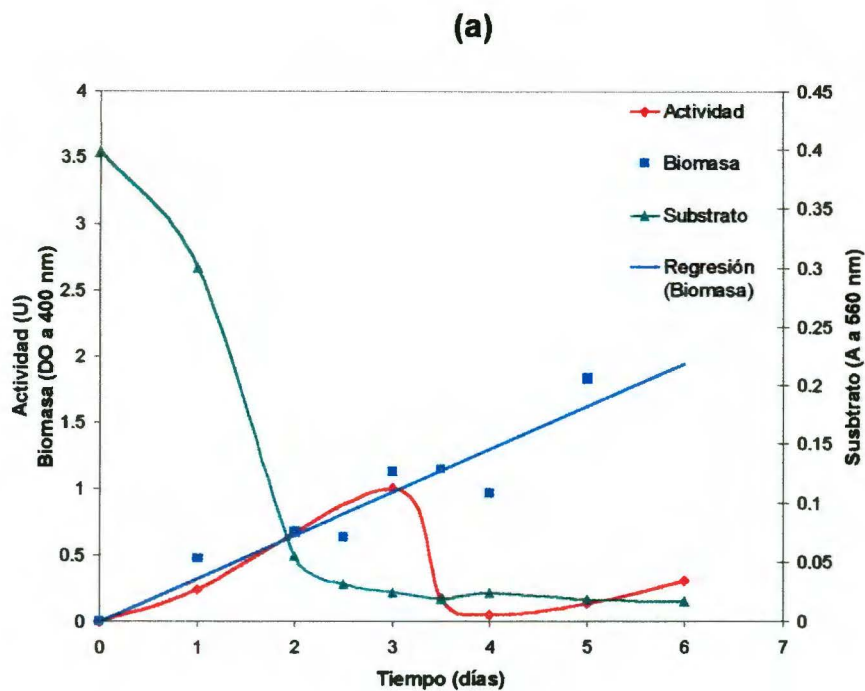
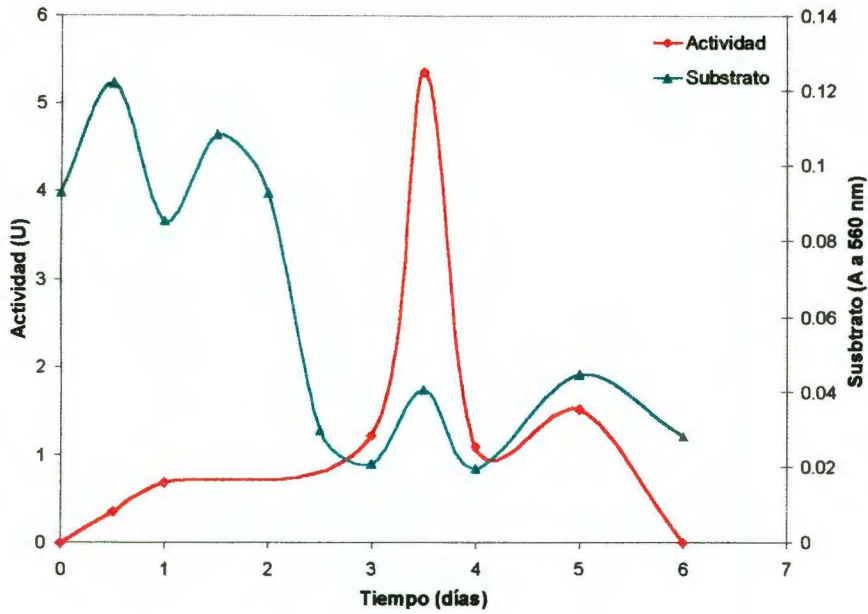


Figura 5.11. Desarrollo de *T. longibrachiatum* IMI 061758 en sales Volgel con: (a) glucosa y (b) xilano como fuente de carbono (2). Los puntos en la gráfica representan la media aritmética de tres lecturas. Coeficientes de variación: Actividad $\leq 5\%$; substrato $\leq 5\%$; biomasa $\leq 5\%$. Se presenta la tendencia del comportamiento de la biomasa. La tendencia se obtuvo con una regresión lineal. $R > 0.9$ para ambos substratos.

actividad enzimática entre las réplicas se deba al uso de dos métodos distintos para la detección de azúcares reductores. El hecho de que se observen perfiles de actividad xilanolítica similares en ambas fermentaciones (figuras 5.8 y 5.11), apoya esta suposición. En esta réplica, tampoco se pudo correlacionar el crecimiento del hongo con la aparición de los picos de actividad xilanolítica. Así mismo, la evolución del pH de los caldos no tiene un efecto significativo aparente sobre la caída de actividad enzimática. De manera similar a los resultados de la primera fermentación, el factor que parece estar asociado a la aparición de los picos de actividad xilanolítica parece ser la concentración de substrato en el medio (fig. 5.12).

Si se comparan los resultados de las réplicas, se observa claramente que se obtuvo el mismo perfil de actividad enzimática, independientemente del método de detección de azúcares reductores utilizado. También se pudo observar que el pico de actividad xilanolítica aparece inmediatamente después de la caída de concentración de substrato en el medio (fig. 5.12), con lo que se aporta evidencia de que la síntesis de xilanasas en *T. longibrachiatum* IMI 061758 parece formar parte de la respuesta al estrés inducido por el agotamiento de la fuente de carbono.

(1)



(2)

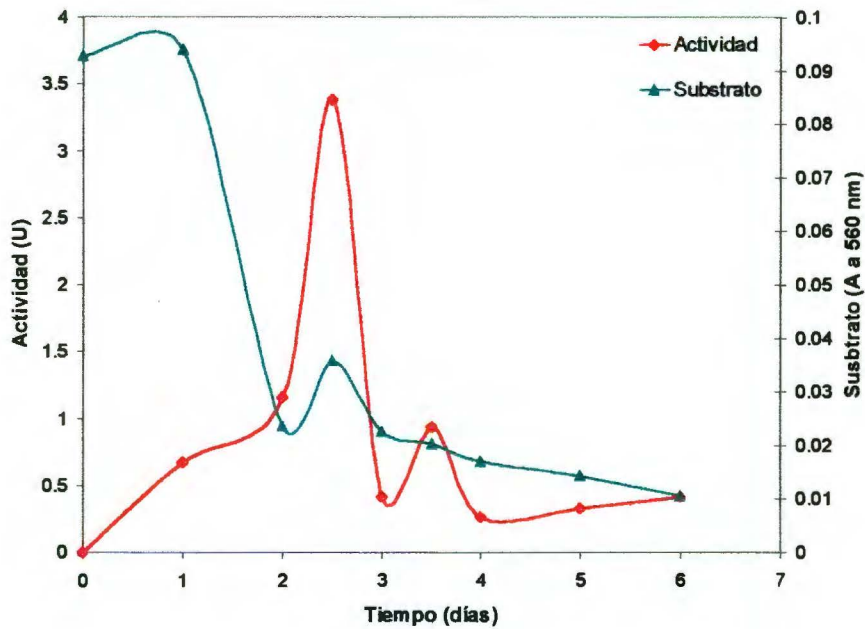


Figura 5.12. Consumo de sustrato contra actividad xilanolítica en el extracto crudo de dos fermentaciones de *T. longibrachiatum* IMI 061758 en sales Vogel con xilano como fuente de carbono. Se muestran los resultados de las réplicas (1) y (2). Cada punto en la gráfica representa la media aritmética de tres lecturas. Coeficientes de variación: (1) Actividad $\leq 10\%$; sustrato $\leq 10\%$; (2) actividad $\leq 5\%$; sustrato $\leq 5\%$.

5.5.1 Puntos destacables y resumen

Las sales Volgel (Davis y Serres, 1970), son un buen medio para el crecimiento de *T. longibrachiatum*. La cepa utilizada en este trabajo produce xilanasas en pequeñas cantidades cuando crece en un medio que contenía exclusivamente glucosa como fuente de carbono. Se encontró evidencia parcial que indica que la síntesis de xilanasas es inductiva por sustrato, como lo sugiere el recuperar aproximadamente tres veces más actividad en el medio que contenía xilano de avena como única fuente de carbono.

La actividad de las xilanasas en el extracto crudo no se detecta al mismo nivel durante el tiempo de fermentación, se observó que la actividad se presenta como picos que aparecen y desaparecen en un lapso de tiempo limitado. El nivel máximo de actividad xilanólítica alcanzado y el tiempo de duración del pico depende de la fuente de carbono utilizada. No se pudo correlacionar el comportamiento de la actividad enzimática al crecimiento del hongo. El pH no parece afectar la funcionalidad de las xilanasas y tampoco se detectó la presencia de proteasas en el medio que pudieran estar atacando a las enzimas producidas. En glucosa, se obtuvo una mayor producción de proteína extracelular total. Sin embargo, la actividad específica en xilano es un tercio mayor que la actividad específica en glucosa. Esto sugiere que en presencia del sustrato apropiado, se induce una síntesis acelerada de xilanasas.

Las réplicas de las fermentaciones en sales Volgel, no arrojaron diferencias significativas en el comportamiento del hongo. Sobre todo, se obtiene el mismo perfil de actividad enzimática independientemente del método utilizado para detectar azúcares reductores, producto de la actividad enzimática. Los resultados obtenidos sugieren que el factor asociado a la producción de xilanasas es la concentración de la fuente de carbono en el medio: aparentemente, la producción de estas endoglucanasas también es parte de la respuesta al estrés inducido por el agotamiento del sustrato.

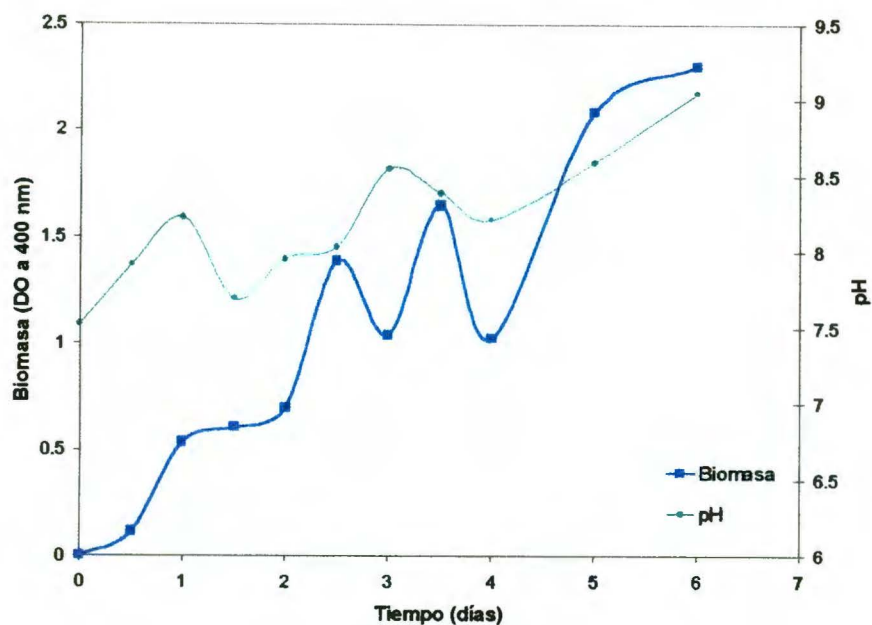
5.6 Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de xilanasas

Una de las características más sobresalientes de las fermentaciones fue la evolución del pH de los caldos. Al contrario de lo que sucede en la mayoría de las fermentaciones, el pH presentó una tendencia a incrementarse conforme transcurría la fermentación. Esta tendencia se obtuvo tanto para los medios con xilano (estos resultados no se muestran), como para los medios con glucosa (fig. 5.13). Con ambas fuentes de carbono el pH de los caldos se incrementó de 7.4, a un valor final entre 8.5 y 9.0. Aparentemente, el factor asociado al incremento del pH de los caldos fue el crecimiento. Al comparar el comportamiento de la biomasa contra la evolución del pH, se observó que ambas curvas son prácticamente paralelas (fig. 5.13).

Algunos de los factores que pudieron contribuir al incremento del pH del medio son: a) Las sales Volgel contienen compuestos que al disociarse pudieron ocasionar el incremento del pH; b) algunos microorganismos tienen la capacidad de utilizar compuestos químicos inorgánicos reducidos (por ejemplo, iones amonio), para generar energía cuando se encuentran sometidos a estrés por una baja concentración de carbono en el medio.

Con la finalidad de determinar si el hongo estaba creciendo en condiciones limitadoras de carbono, se diseñó un experimento donde se utilizó glucosa a dos niveles como fuente de carbono: 0.55 mM, que era la concentración original utilizada en las fermentaciones anteriores; y 55.5 mM como nivel alto para observar el comportamiento del hongo y comparar: a) Crecimiento, b) evolución del pH, c) actividad xilanolítica, y d) producción de proteína extracelular. Con el fin de validar la comparación, se utilizaron esporas del mismo lote y el mismo nivel de inóculo: 10^5 esporas/ml de medio. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.14.

(1)



(2)

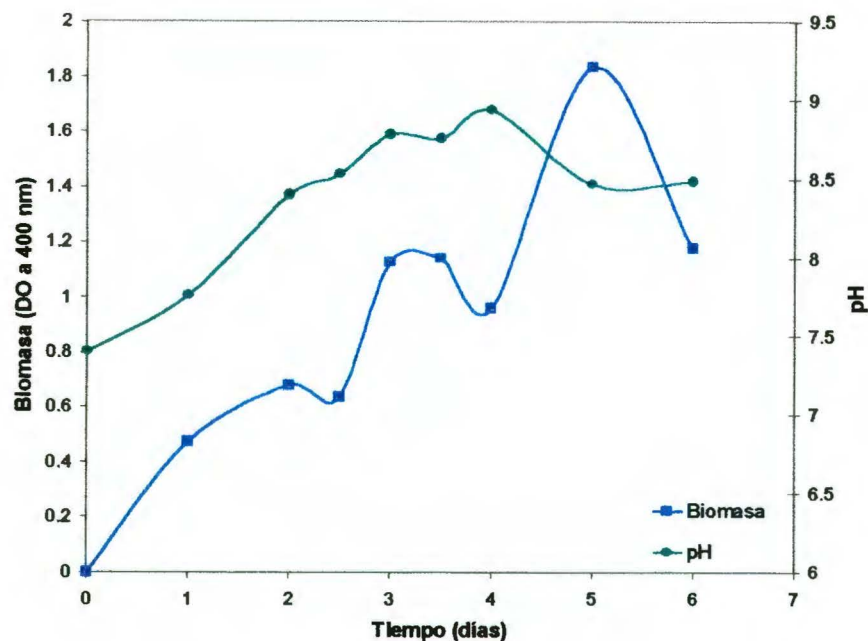
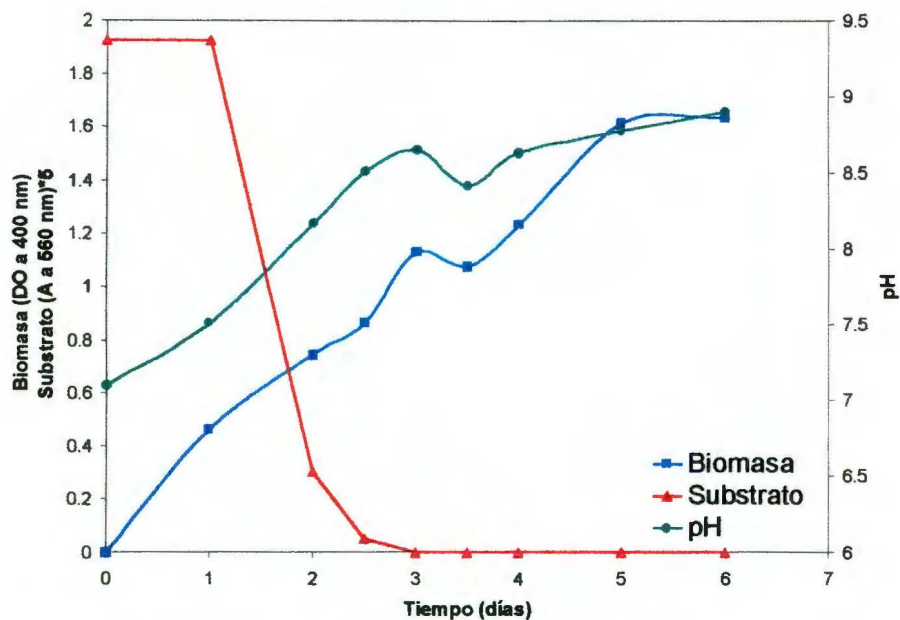


Figura 5.13. Biomasa contra pH de dos fermentaciones de *T. longibrachiatum* IMI 061758 en sales Volgel con glucosa como fuente de carbono. Se muestran los resultados de las réplicas (1) y (2). Cada punto en la gráfica representa la media aritmética de tres lecturas. Coeficientes de variación para ambas réplicas: biomasa $\leq 5\%$; pH $\leq 1\%$.

Nivel bajo



Nivel alto

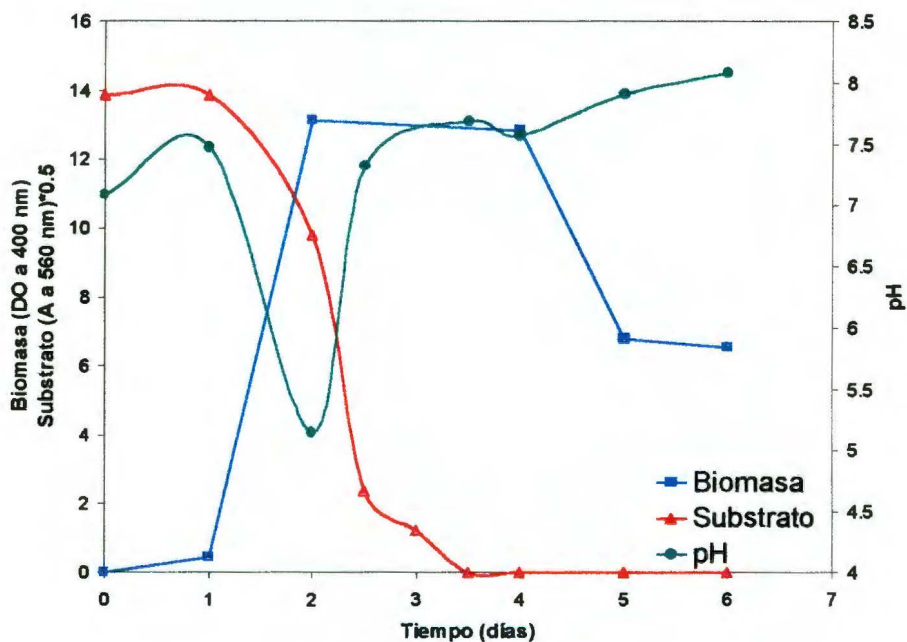


Figura 5.14. Desarrollo de *T. longibrachiatum* IMI 061758 en sales Volgel con glucosa, a dos niveles, como fuente de carbono: 0.55 mM (nivel bajo), y 55.5 mM (nivel alto). Cada punto en la gráfica representa la media aritmética de tres lecturas. Coeficientes de variación para ambas réplicas: Biomasa $\leq 5\%$; substrato $\leq 5\%$; pH $\leq 1\%$

La concentración de glucosa influye drásticamente sobre el crecimiento de *T. longibrachiatum* IMI 061758. El crecimiento en el nivel alto es 8 veces mayor que en el nivel bajo (fig. 5.14), a pesar de que se utilizó el mismo nivel de inóculo: 10^5 esporas/ml. A diferencia de las fermentaciones anteriores, en el medio con nivel alto de glucosa se pudieron observar claramente las fases, exponencial y estacionaria, de crecimiento del hongo.

La secreción de proteína en el medio con el nivel alto de glucosa también se vio favorecida; con excepción del primer día, se observó una mayor producción de proteína durante toda la fermentación (tabla 5.2). Este hecho se reflejó directamente sobre la producción de xilanasas: En el medio con nivel bajo de glucosa la actividad máxima es de 1.00 U, al tercer día; mientras que en el medio con el nivel alto la actividad máxima registrada fue de 68.45 U, también al tercer día. Una observación importante es que, al igual que en las fermentaciones anteriores, el máximo de actividad enzimática se presentó en coincidencia con la caída de concentración de sustrato en el medio (fig. 5.14).

El comportamiento del pH, en el medio con nivel bajo de glucosa, es similar al observado en las fermentaciones anteriores: Inicia en un valor cercano a 7.0 y termina en 9.0. En el medio con nivel alto el comportamiento del pH es diferente: Al inicio de la fermentación disminuye hasta alcanzar un valor de 5.1 al segundo día, durante la fase exponencial de crecimiento. A partir de este día, en coincidencia con la caída de concentración de glucosa y con el comienzo de la fase estacionaria de desarrollo, el pH de los caldos presentó de nuevo la tendencia a incrementarse, de modo que alcanzó un valor de 8.1, al final de la fermentación (fig. 5.14). Las réplicas no presentaron variaciones significativas (estos resultados no se muestran).

El comportamiento del pH cuando la fermentación se lleva a cabo en condiciones limitadoras de glucosa puede deberse a que el hongo está utilizando un mecanismo alternativo de obtención de energía, lo que provocaría la aparición de compuestos de

Tabla 5.2. Proteína extracelular total en el extracto crudo y actividad enzimática máxima en dos fermentaciones de *T. longibrachiatum* IMI 061758 en sales Volgel con glucosa, a dos niveles, como fuente de carbono: 0.55 mM (nivel bajo), y 55.5 mM (nivel alto)

Día	Proteína extracelular ^a (µg/ml)	
	Nivel bajo	Nivel alto
1	N.D. ^b	N.D.
2	0.92	4.09
3 ^c	0.82	4.89
4	0.63	3.78
5	2.29	6.09
6	0.99	3.89
Actividad máxima registrada (U)^d	1.00	68.45

^a Los valores de la tabla son la media aritmética de tres lecturas. Coeficiente de variación $\leq 5\%$

^b No Detectable

^c Día en el que se registro la máxima actividad enzimática

^d Media aritmética de tres lecturas. Coeficiente de variación $\leq 5\%$

carácter básico en el medio y, por lo tanto, el incremento de pH. Esto se reafirma al observar la evolución del pH en la fermentación con nivel alto de glucosa.

La caída de pH y de concentración de sustrato que coinciden con la fase exponencial de crecimiento del hongo, sugieren la utilización del carbono como fuente de energía. Más cuando el sustrato se agota, el hongo podría activar el mecanismo alternativo de obtención de energía, como lo sugiere el rebote en el valor de pH (fig. 5.14).

La concentración de carbono en el medio vuelve a aparecer como un factor que induce la producción de xilanasas: El pico de actividad, en ambos niveles de glucosa, aparece hasta que se consume el sustrato del medio. Los resultados obtenidos en el presente experimento refuerzan la hipótesis de que la producción de xilanasas, en *T. longibrachiatum* IMI 061758, es parte de la respuesta al estrés inducido por el agotamiento del sustrato. El que se recupere casi 70 veces más actividad en el medio con el nivel alto de glucosa, parece ser sólo consecuencia del mayor crecimiento alcanzado (8 veces mayor que en el nivel bajo).

Royer y Nakas (1989), sugieren que condiciones que limiten la velocidad de crecimiento de *T. longibrachiatum* Rifai pueden incrementar la producción de enzimas extracelulares. Las observaciones hechas en el presente trabajo se contraponen a las de Royer y Nakas (1989), ya que se recupera mucho más actividad (casi 70 veces más), en el medio con el nivel alto de glucosa que en el bajo. Y como se mencionó anteriormente, el crecimiento en el medio con glucosa al 55 mM fue 8 veces mayor que en el nivel bajo. Además, también se recuperó una mayor cantidad de proteína extracelular (tabla 5.2).

El incremento en el pH del medio durante la fermentación se ha observado en otros trabajos con hongos del género *Trichoderma* (Knapp y Legg, 1986; Royer y Nakas, 1989; Chen y col., 1997), así como en fermentaciones con hongos de otros géneros (Stewart y col., 1983; Johansson, 1988; Haltrich y col., 1993; Bonnarne y col., 1993;

Lestan y col., 1994; Maijala y col., 1995). Estos trabajos coinciden en que reportan la producción de celulasas, hemicelulasas y/o pectinasas, enzimas que degradan tejidos lignocelulósicos. Además, también coinciden en el uso de sustratos difíciles de degradar, como por ejemplo: xilanos, de diferentes fuentes; tejidos leñosos y paja molida de algunos cereales.

Maijala y col. (1995), no pudieron discernir si el incremento en el pH se debió al crecimiento del hongo, a la activación del metabolismo secundario o a una combinación de ambos factores. La dificultad para seguir el desarrollo del hongo, *Heterobasidion annosum*, impidió discernir cual de los factores mencionados ocasionaba el incremento del pH. Ninguno de los otros trabajos citados aporta evidencia experimental que explique el comportamiento del pH.

Durante las primeras fermentaciones que se hicieron en el presente trabajo, el incremento del pH del medio parecía estar asociado al crecimiento del hongo. Los resultados observados con el hongo creciendo a una concentración 100 veces mayor de glucosa arrojaron resultados diferentes: durante la fase exponencial de crecimiento se presentó una drástica disminución en la concentración de sustrato, esta disminución fue acompañada de la caída del pH del medio. Una vez que se consume el sustrato y que el hongo entra en fase estacionaria, el pH de los caldos comienza a subir; esta tendencia en el comportamiento del pH se conservó hasta el final de la fermentación.

Algunas bacterias tienen la capacidad de oxidar compuestos inorgánicos reducidos (por ejemplo, H_2S , Fe^{2+} , NH_4^+), y utilizar la energía obtenida para crecer y reproducirse. Los microorganismos que exhiben esta capacidad reciben el nombre de *quimolitotróficos* (Atlas, 1989). El mecanismo que utilizan estos microorganismos para generar energía se denomina *mecanismo quimiosmótico*. El mecanismo quimiosmótico para síntesis del trifosfato de adenosina (ATP) es similar al mecanismo de generación de ATP mediante la fosforilación oxidativa, que utilizan los

microorganismos heterotróficos (microorganismos que oxidan compuestos orgánicos para obtener energía).

La diferencia básica entre los dos diferentes mecanismos de obtención de ATP, es que la oxidación de los compuestos inorgánicos reducidos no altera el potencial de óxido-reducción lo suficiente como para reducir el NAD^+ a NADH^1 . Por lo que los electrones obtenidos de la oxidación de estos compuestos entran a la cadena de transporte de electrones a través de los citocromos, que se encuentran en un estado energético menor que el NADH . Una vez incorporados a la cadena de transporte, algunos electrones fluyen hacia el aceptor final, normalmente oxígeno, generando a su paso un gradiente de protones a través de la membrana. Este gradiente es utilizado para generar ATP (Atlas, 1989). Algunos electrones fluyen en dirección reversa para producir el NADH necesario para procesos de biosíntesis (fig. 5.15).

Este proceso de obtención de energía, mediante el mecanismo quimiosmótico, es menos eficiente que el mecanismo de la fosforilación oxidativa. Consecuentemente, los microorganismos quimolitotróficos deben oxidar grandes cantidades de compuestos inorgánicos reducidos para obtener la energía suficiente para crecer y reproducirse (Atlas, 1989).

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el incremento de pH observado en las primeras fermentaciones, tanto en glucosa como en xilano, fue consecuencia de la baja concentración de carbono en los medios. Cuando el hongo creció con una concentración mayor de glucosa la utilizó como principal fuente de energía para su crecimiento, mediante el mecanismo de la fosforilación oxidativa. Durante la fase exponencial de crecimiento, el hongo consumió rápidamente la glucosa, produciendo ácidos, que bajaron el pH del medio. Cuando la concentración de glucosa disminuyó de manera considerable, el hongo entra en fase estacionaria de crecimiento y el pH del medio comienza a subir.

¹ NAD^+ Nicotinamin-Adenin Dinucleótido
 NADH Nicotinamin-adenin dinucleótido reducido

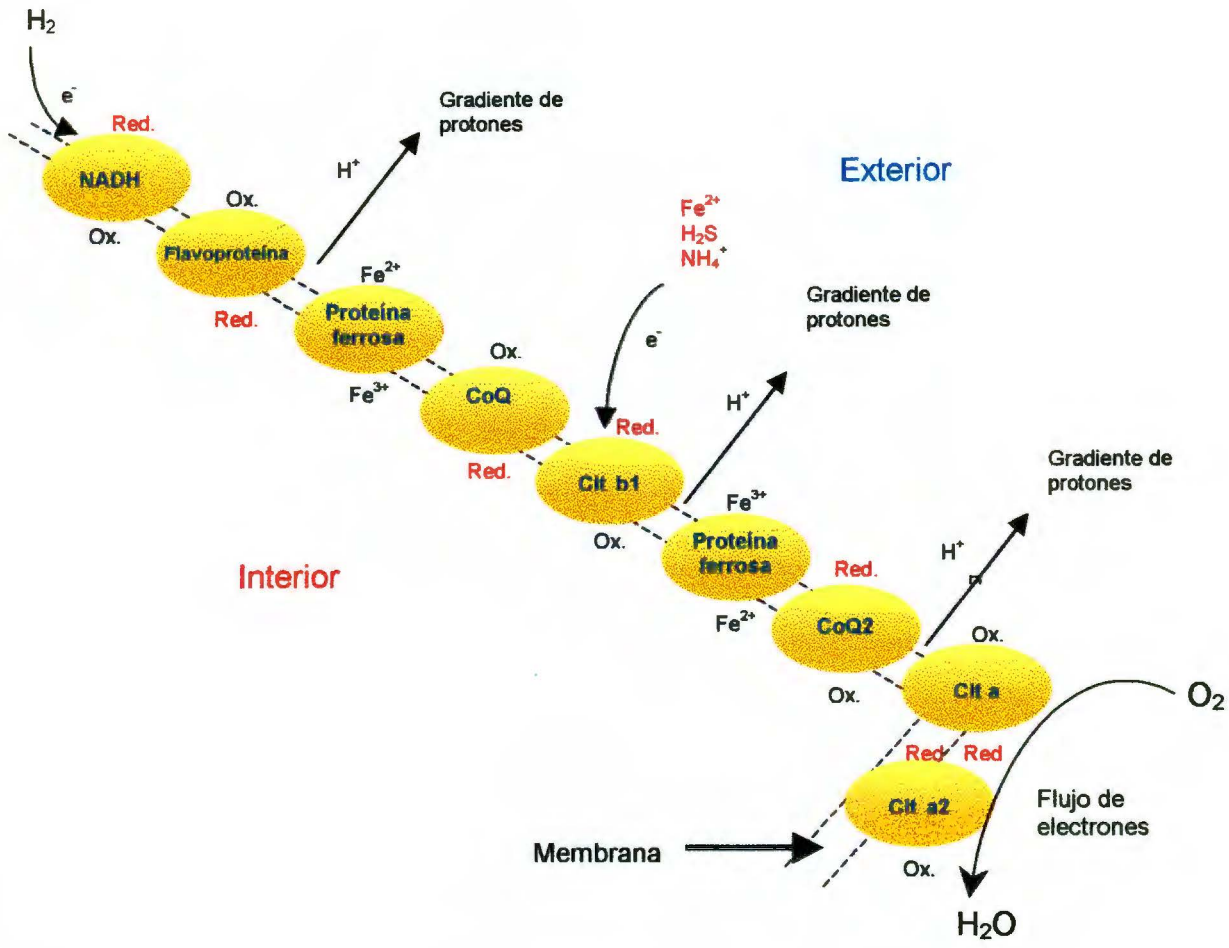


Figura 5.15. Esquema simplificado que ilustra el mecanismo quimiosmótico de generación de ATP. Los electrones provenientes de la oxidación de compuestos inorgánicos reducidos, Fe²⁺, H₂S, NH₄⁺, se acoplan a la cadena de transporte de electrones a través de los citocromos, que requieren de un potencial de óxido-reducción menor que el NAD⁺. El flujo de electrones resultante produce un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial, que se usa para generar ATP. En algunos microorganismo quimolitotróficos, como en las bacterias nitrificantes, se puede presentar un flujo de electrones en ambos sentidos de la cadena de transporte. Los electrones que van en sentido inverso se utilizan para reducir NAD⁺ a NADH, compuesto indispensable en algunas reacciones de biosíntesis. El mecanismo quimiosmótico utilizado por *T longibrachiatum* IMI 061758 no es necesariamente el que aquí se ilustra. (Modificada de Atlas, 1989).

Probablemente, en respuesta a la baja concentración de carbono y en un intento de sobrevivir, el hongo empieza a utilizar compuestos inorgánicos reducidos, presentes en el medio, para producir energía mediante el mecanismo quimiosmótico. Como resultado de la oxidación de estos iones, aparecerían en el medio compuestos con la capacidad de aceptar protones (H^+), provocando un incremento de pH en el medio. La evolución del pH observada a bajas concentraciones de carbono, probablemente se deba a que el hongo utiliza desde un principio la energía química obtenida de la oxidación de los compuestos reducidos. Es por eso, que en las primeras fermentaciones las curvas de crecimiento y de pH se comportan de forma paralela.

Este mecanismo alternativo de obtención de energía, mediante un mecanismo quimiosmótico, no se ha observado antes en hongos, sólo en bacterias. Sin embargo, ayuda a explicar la evolución del pH observada en el transcurso de las fermentaciones, tanto a bajas como a altas concentraciones de carbono. El proceso de obtención de energía a partir de la oxidación de compuestos orgánicos, mediante el mecanismo de la fosforilación oxidativa, es más eficiente que el mecanismo quimiosmótico. Esto explicaría también porque el crecimiento en el nivel alto de glucosa fue ocho veces mayor que en el nivel bajo, si el inóculo utilizado fue el mismo. Hay que señalar que haría falta más experimentación para determinar si *T. longibrachiatum* IMI 061758, tiene la capacidad de obtener energía mediante los dos mecanismos mencionados. Y de comprobarse, se tendría una visión más amplia del metabolismo y potencial de los hongos filamentosos.

5.6.1 Puntos destacables y resumen

La concentración de glucosa influyó drásticamente sobre el crecimiento de *T. longibrachiatum* IMI 061758: el crecimiento en el nivel alto fue 8 veces mayor que en el nivel bajo. La secreción de proteína en el nivel alto de glucosa fue hasta 6 veces mayor que en el nivel bajo. El mayor crecimiento y producción de proteína extracelular total se reflejaron directamente sobre la actividad enzimática: se recuperaron 68 veces más actividad en el medio con glucosa al nivel alto.

El comportamiento del pH cuando la fermentación se lleva a cabo en condiciones limitadoras de glucosa puede deberse a que el hongo está utilizando algún compuesto inorgánico reducido (por ejemplo, iones NH_4^+), como fuente de energía. Esto provocaría la aparición de compuestos de carácter básico en el medio y, por lo tanto, el incremento de pH. Esto se reafirmó al observar la evolución del pH en la fermentación con el nivel alto de glucosa: la caída de pH y de sustrato coinciden con la fase exponencial de crecimiento; mientras que la fase estacionaria de crecimiento coincide con el agotamiento del sustrato y con la tendencia del pH a incrementarse.

El crecimiento alcanzado en el medio con nivel alto de glucosa (55.5 mM), indica que con la concentración de glucosa utilizada originalmente (0.55 mM), limitaba el crecimiento del hongo. Al limitarse el crecimiento, se limitaba también la secreción de proteína. Los resultados obtenidos en este experimento sugieren que si se desea obtener una mayor producción de xilanasas, es deseable proporcionar al hongo condiciones que favorezcan su crecimiento.

5.7 Crecimiento de *Trichoderma longibrachiatum* IMI 061758 en medio mínimo

Los resultados obtenidos en el experimento anterior sugieren que el hongo no requiere de un medio complejo, como las sales Vogel, que contiene vitaminas y metales traza, para crecer apropiadamente. Con la finalidad de determinar si efectivamente no se requería de un medio complejo para el crecimiento de *T. longibrachiatum* IMI 061758, se llevó a cabo una fermentación en otro medio de cultivo definido: medio mínimo (Owens y Keddie, 1969; Owens, 1985). Como se detalla en la metodología, el medio mínimo contiene solamente sales y metales traza. Se utilizaron glucosa y xilano de avena como fuentes de carbono. Se decidió trabajar con el mismo nivel de fuente de carbono utilizado durante las primeras fermentaciones con sales Vogel, para poder comparar los resultados.

El crecimiento observado fue relativamente pequeño, comparado con el crecimiento en sales Vogel (estos resultados no se muestran). Debido a esto, y a que los experimentos anteriores sugerían que si se deseaba incrementar la producción de xilanasas se requería proporcionar al hongo condiciones que propiciaran su crecimiento, se decidió no caracterizar el desarrollo y producción de xilanasas de *T. longibrachiatum* IMI 061758 en medio mínimo. Sin embargo, el recuperar crecimiento en este medio nos sirvió para establecer que el hongo no requería, forzosamente, de las vitaminas presentes en las sales Vogel.

5.8 Producción de xilanasas en EL-1

Las sales Volgel (Davis y Serres, 1970) y el medio mínimo (Owens y Keddie, 1969; Owens, 1985), son medios de cultivo definidos que incluyen en su formulación algunos compuestos termolábiles que deben de esterilizarse en frío, filtrándolos a través de una membrana de 0.45 μm . Si se desea trabajar con grandes volúmenes de medio, para la producción de enzimas a gran escala, esto representa una desventaja grave. Para la producción de enzimas a escala industrial, normalmente se manejan medios cuya formulación permite esterilizarlos por medio de calor. Esto permite manejar grandes volúmenes de medio de manera continua.

Hay varios estudios que reportan la producción de celulasas y xilanasas por *T. longibrachiatum*, a escala laboratorio (Sandhu y Kalra, 1982; Thaker y col., 1986; Royer y Nakas, 1989, 1991; Chen y col., 1997). Todos estos estudios utilizan medios que incluyen en su formulación compuestos termolábiles, ya sean vitaminas o metales traza, y con excepción de Chen y col. (1997), ninguno de ellos justifica el uso de la formulación utilizada.

Los resultados obtenidos hasta este momento, indicaban que: a) la concentración de glucosa y xilano utilizadas durante las primeras fermentaciones limitaban el crecimiento del hongo; b) si se deseaba mejorar la producción de xilanasas, había que incrementar el crecimiento; c) el crecimiento observado en sales Volgel fue mejor que en medio mínimo, y la diferencia significativa entre las dos formulaciones era la inclusión de vitaminas en el primer medio. Con esta información, se procedió a diseñar un medio de cultivo que permitiera, por una parte un buen crecimiento del hongo y por otra, poder esterilizarlo con calor húmedo (103 kPa, 15 min).

El extracto de levadura, es un componente de medios de cultivo ampliamente utilizado en microbiología; ya que contiene vitaminas, aminoácidos, carbohidratos simples y algunos otros factores de crecimiento (Atlas, 1989). Este componente es

muy valioso, no sólo por su contenido de nutrientes, sino porque se puede esterilizar con calor húmedo sin perder su funcionalidad. Además, Ostrikova y Konovalov (1983), observaron que la adición de extracto de levadura al medio resultaba en un incremento en la producción de celulasas de *Trichoderma viride*.

Con estos antecedentes, se procedió a diseñar un medio de cultivo semidefinido, al que se llamó EL-1, para caracterizar el desarrollo y producción de xilanasas de *T. longibrachiatum* IMI 061758, y comparar contra la producción en sales Volgel. La formulación utilizada se detalla en la tabla 5.3. Los resultados obtenidos se dan en la figura 5.16.

El crecimiento del hongo fue muy abundante, tanto que ya no fue posible registrar el crecimiento mediante la técnica de densidad óptica. En los caldos con glucosa al 1% (p/v), se observó un comportamiento similar al observado en sales Volgel, sólo que ahora se registró una actividad máxima de 487 U, al tercer día; el pico de actividad coincide con la desaparición de substrato en el medio. El pH de los caldos también tiene un comportamiento similar: Al inicio de la fermentación disminuye de 7.21 a 5.86, en el segundo día; esta disminución en el valor de pH coincide con la caída de concentración de glucosa. A partir de este día, y hasta el final de la fermentación, el pH tiende de nuevo a subir hasta alcanzar un valor de 8.7 al final de la fermentación (fig. 5.16a).

En el medio con xilano, se observa de nuevo un incremento y caída en la actividad enzimática, sólo que esta vez el pico es más amplio y se recupera mayor actividad que en los estudios anteriores con una concentración menor de xilano. A partir del segundo día, se recuperan 95 U de actividad xilanólítica, y se alcanza un máximo de 118 U, a los dos días y medio. Al contrario de lo observado en las fermentaciones con sales Volgel (sección 5), la actividad enzimática no desciende bruscamente sino que cae gradualmente, de tal manera que se recuperan 82 U a los cuatro días (fig. 5.16b).

Tabla 5.3. Composición del medio de cultivo EL-1, formulado para caracterizar la producción de xilanasas de *T. longibrachiatum* IMI 061758.

Reactivo	Concentración (g/lit)
Citrato trisódico•2H ₂ O	0.625
Fosfato de potasio dibásico•3H ₂ O	0.819
Nitrato de amonio	0.500
Sulfato de magnesio•7H ₂ O	0.050
Cloruro de calcio•2H ₂ O	0.025
Extracto de levadura	0.6% (p/v)
Fuente de carbono:	
Glucosa	1.0% (p/v)
Xilano de avena	5.0% (v/v)

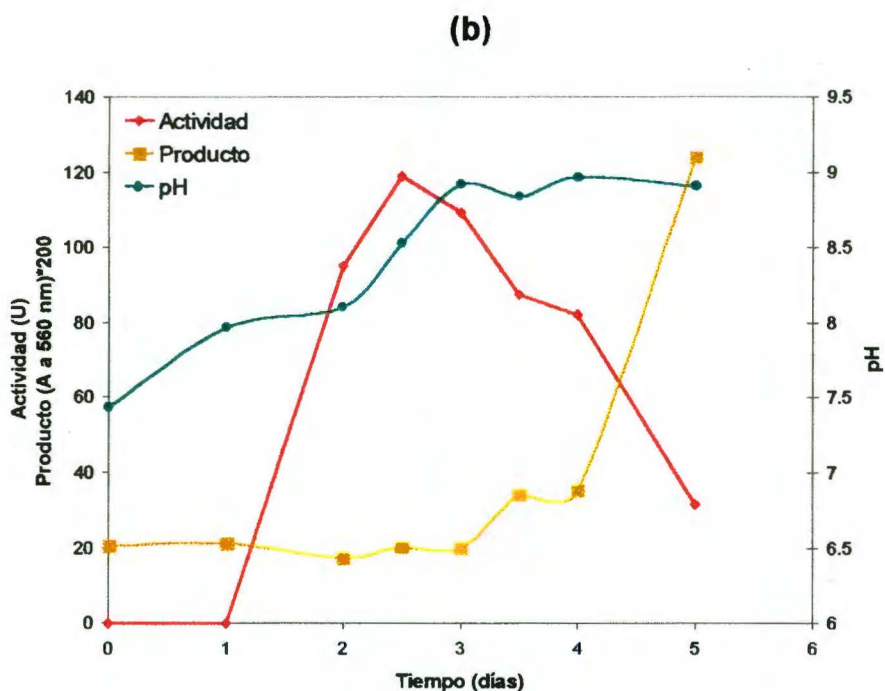
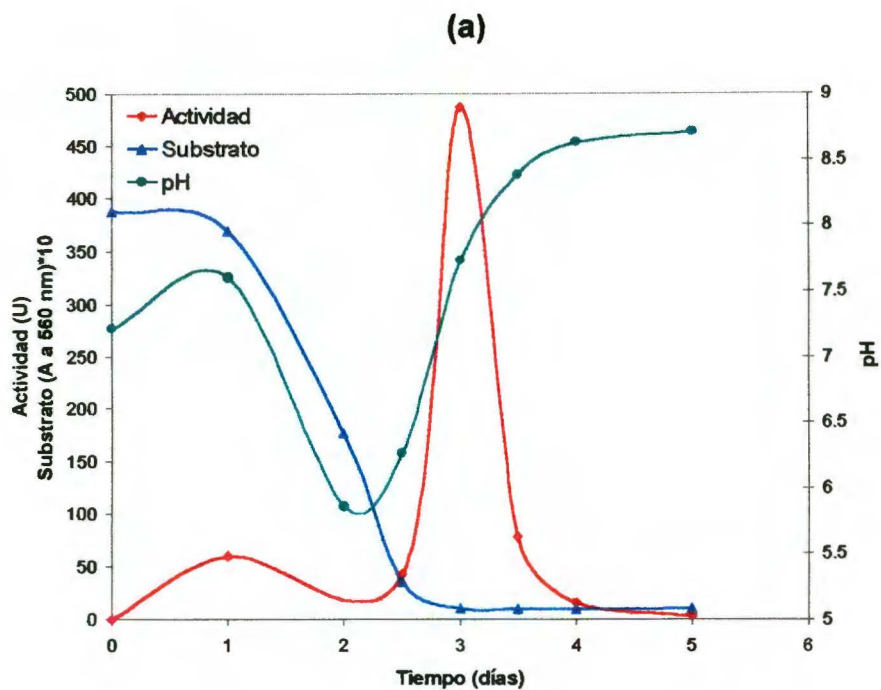


Figura 5.16. Desarrollo de *T. longibrachiatum* IMI 061758 en EL-1 con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono. Los puntos en la gráfica representan la media aritmética de tres lecturas. El producto en (b), son azúcares reductores, principalmente xilosa y xilooligosacáridos de cadena corta. Coeficiente de variación: Substrato $\leq 5\%$; actividad $\leq 5\%$; producto $\leq 5\%$; pH $\leq 1\%$.

De manera similar a lo observado en sales Volgel (fig. 5.9, sección 5.5), el pH del medio tiende a incrementarse, de un valor inicial de 7.4 a un valor final de 8.9, al final de la fermentación. Otra observación importante, es que por primera vez se pudo apreciar la aparición de azúcares reductores en el medio. Las xilanasas liberan estos azúcares al hidrolizar el xilano (fig. 5.16b).

La cepa de *T. longibrachiatum* utilizada en el presente trabajo, resultó ser un excelente productor de xilanasas extracelulares (tabla 5.4). Y conforme se fue avanzando en la investigación se logró incrementar la producción de xilanasas en: 711% para glucosa, y en 3480% para xilano (porcentajes calculados comparando la producción del medio semidefinido contra la producción en sales Volgel, tabla 5.4).

Los valores de actividad xilanolítica registrados son comparables a los observados por Royer y Nakas (1989), y Chen y col. (1997), que estudiaron la producción de xilanasas de cepas distintas de *T. longibrachiatum*; aunque hay que considerar que los autores mencionados utilizaron un método diferente de detección de azúcares reductores (tabla 5.4). Otra consideración importante, es que los estudios mencionados reportan actividad como μM de xilosa equivalente liberados por minuto por ml de extracto crudo; mientras que en el presente trabajo se definió una unidad de actividad enzimática como los μM de xilosa equivalente liberados por minuto por 100 μl de extracto crudo.

Otra observación importante, es que la máxima actividad enzimática siempre se registró a los tres días en los medios con glucosa, y a los dos y medio días en los medios con xilano (tabla 5.4). Invariablemente, la aparición del pico de actividad xilanolítica coincidió con el agotamiento de la fuente de carbono en el medio. Nuestros resultados contrastan con los observados por Royer y Nakas (1989), que reportan el máximo de actividad enzimática después de seis días de fermentación; y con las observaciones de Chen y col., (1997), que recuperan la máxima actividad en el extracto crudo después de 5 días. Sachslehner y col., (1998) observaron, en una fermentación a escala laboratorio con *Sclerotium rolfsii*, que la máxima actividad

Tabla 5.4. Actividad enzimática máxima de las fermentaciones con *T. longibrachiatum* IMI 061758 durante las distintas etapas de experimentación. Se incluyen dos estudios externos como referencia.

Referencia	Microorganismo	Medio / Fuente de carbono	Método de detección de azúcares reductores ^b	Actividad máxima registrada ^a	Día ^c
Este trabajo:	<i>T. longibrachiatum</i> IMI 061758	Volgel / Glucosa 0.55 mM	Sinner y Puls (1978)	1.00 U/0.1 ml	3
		Volgel / Glucosa 55.5 mM	Sinner y Puls (1978)	68.4 U/0.1 ml	3
		Volgel / Xilano 1% (v/v)	Sinner y Puls (1978)	3.39 U/0.1 ml	2.5
		EL-1 / Glucosa 55.5 mM	Sinner y Puls (1978)	487 U/0.1 ml	3
		EL-1 / Xilano 5 % (v/v)	Sinner y Puls (1978)	118 U/0.1 ml	2.5
Royer y Nakas, (1989) ^d	<i>T. longibrachiatum</i> Rifai	Volgel / Desecho de la ind. papelera	DNS (Miller, 1959)	272.4 U/ml	6
Chen y col., (1997) ^e	<i>T. longibrachiatum</i> CS-185	Medio semidefinido / Xilano de avena	DNS (Miller, 1959)	20 U/ml	5

^a Los datos de la tabla son la media aritmética de tres lecturas. Coeficiente de variación ≤ 5 . Substrato para el ensayo de actividad: Xilano de avena

^b En este trabajo se utilizó la variante (b) del reactivo de Sinner y Puls (1978)

^c Día de la fermentación en el que se registró la actividad enzimática máxima

^d Actividad enzimática en el extracto crudo sin diluir. Substrato para el ensayo de actividad: xilano de álamo temblón

^e Actividad de la β -endoxilanasas en el extracto crudo sin diluir. Substrato para el ensayo de actividad: xilano de avena

xilanolítica se presentaba a los 13 días. En este trabajo se reporta una actividad de xilanasas de 228 U/ml (ensayo de detección de azúcares reductores: DNS; substrato para el ensayo de actividad: xilano de gimnosperma). Por lo que se puede afirmar, que la producción de xilanasas observada en el presente trabajo es también comparable a la producción observada con *S. rolfsii*.

5.8.1 Puntos destacables y resumen

Aunque no fue posible cuantificar el crecimiento del hongo en ninguna de las dos fuentes de carbono, esto fue porque con el medio semidefinido diseñado en este trabajo se observó un mayor crecimiento que con las sales Vogel. Los resultados obtenidos en esta fermentación refuerzan las observaciones hechas anteriormente: si se desea incrementar la producción de xilanasas, hay que proporcionar al hongo condiciones que favorezcan su crecimiento. El consumo de glucosa aparentemente está asociado a la disminución del pH de los caldos; mientras que la tendencia del pH a incrementarse parece estar asociada a un bajo nivel de glucosa en el medio. El pico de actividad en glucosa se presenta una vez que se agota el substrato, aparentemente, como parte de la respuesta al estrés inducido por la baja concentración de carbono en el medio.

El incremento del pH en el medio con xilano sugiere que la concentración de carbono sigue siendo baja, por lo que el hongo se ve obligado a utilizar el mecanismo alternativo de generación de energía. En esta ocasión no fue posible correlacionar la concentración de substrato en el medio con la producción de xilanasas, debido a la aparición de azúcares reductores en el medio. Pero, se recuperan casi 35 veces más actividad que cuando se utilizaron las sales Vogel. Es importante señalar, que en este experimento se utilizó una concentración 5 veces mayor de xilano, por lo que no se puede comparar directamente la producción de enzimas. Sin embargo, la actividad recuperada en el medio con glucosa fue siete veces mayor que su contraparte en sales Vogel.

El medio semidefinido formulado, demostró ser un excelente medio para el crecimiento de *T. longibrachiatum* IMI 061758. Este medio, al contrario de las sales Vogel y del medio mínimo, no incluye componentes termolábiles en su fórmula, por lo que se puede esterilizar en un autoclave. Esta característica resulta ventajosa, sobre todo si se piensa en la producción a gran escala de xilanasas. Además, la sencillez de la formulación (tabla 5.3), representa también ventajas económicas. El tiempo de producción es otro de los factores que repercuten sobre los costos de producción de enzimas, y otros metabolitos, de origen microbiano. Los resultados obtenidos en este trabajo representan, por lo tanto, otra ventaja económica; ya que se recupera la máxima actividad en, máximo, tres días.

5.9. Caracterización de la reológica de los caldos de fermentación

Otro de los principales objetivos del presente trabajo, fue estudiar la reología de los caldos de fermentación y su comportamiento con respecto al tiempo. Si se piensa en la producción de metabolitos microbianos en sistemas susceptibles de escalamiento (fermentadores), es importante estudiar la reología de los medios ya que ésta afecta fuertemente el desempeño del fermentador (Pedersen y col., 1993). Además, la determinación de las propiedades reológicas ayuda en la selección objetiva del impulsor que proporcionará la mejor distribución de los nutrientes del medio y por tanto, una mayor producción.

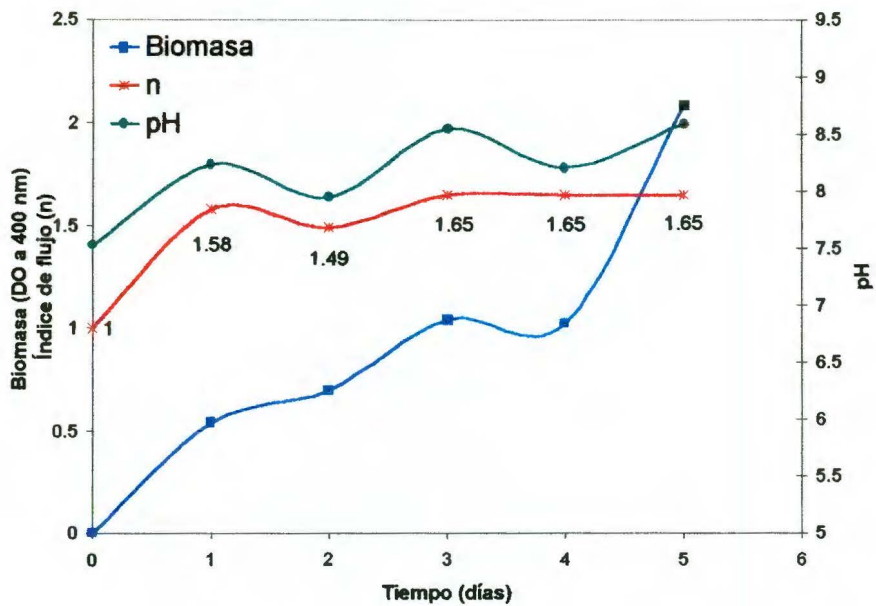
En el presente trabajo se utilizaron dos métodos: a) el método clásico de Metzner y Otto (1957), para la estimación de viscosidades de proceso utilizando teoría de mezclado; y b) la propuesta de Brito y col. (1998), para la estimación de viscosidades de proceso de fluidos complejos y suspensiones con impulsores helicoidales.

5.9.1 Estimación del índice de flujo

Tanto el método de Metzner y Otto (1957), como el de Brito y col., (1998), utilizan los datos brutos obtenidos del reómetro: torque (T , N·m) y velocidad de rotación del impulsor (N , rps), para estimar el índice de flujo (n) de los fluidos analizados. Las figuras 5.17 y 5.18, muestra la evolución de n con respecto al tiempo para sales Volgel y EL-1, respectivamente. Cabe mencionar, que la única suposición que se hace es que el comportamiento reológico de los caldos sigue el modelo de la ley de la potencia ($\tau = m\dot{\gamma}^n$).

Debido a que los ensayos para estimar las propiedades reológicas se hicieron con todo el volumen inoculado (50 ml), no se registró la evolución de la actividad enzimática. En su lugar, y debido a que resultaron ser indicadores de la

(a)



(b)

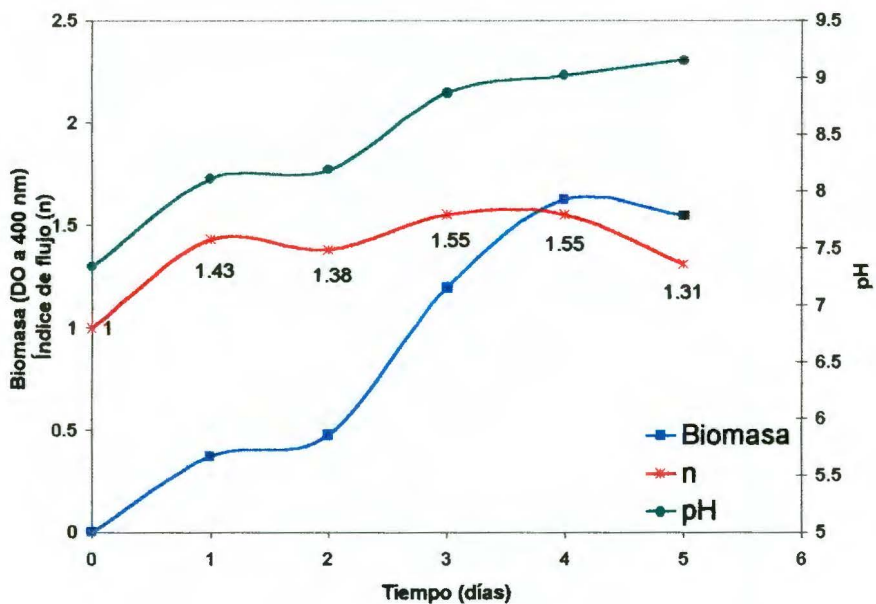


Figura 5.17. Biomasa, pH y evolución del índice de flujo (n) de los caldos de dos fermentaciones de *T. longibrachiatum* IMI 061758 en sales Vogel con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono. Cada punto en la gráfica representa la media aritmética de tres repeticiones. Coeficiente de variación: Biomasa \leq 5%, pH \leq 1% n \leq 10%.

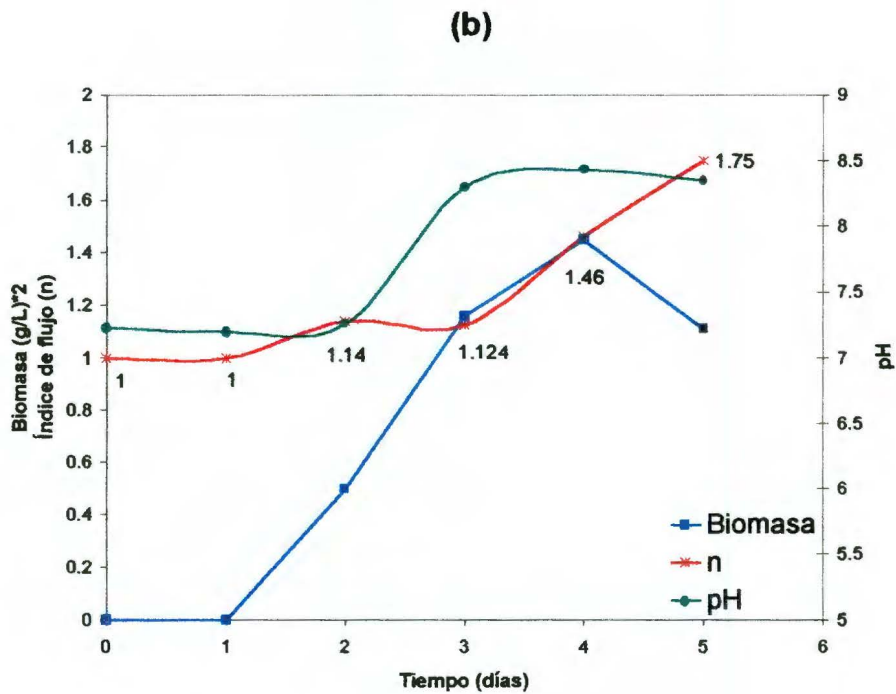
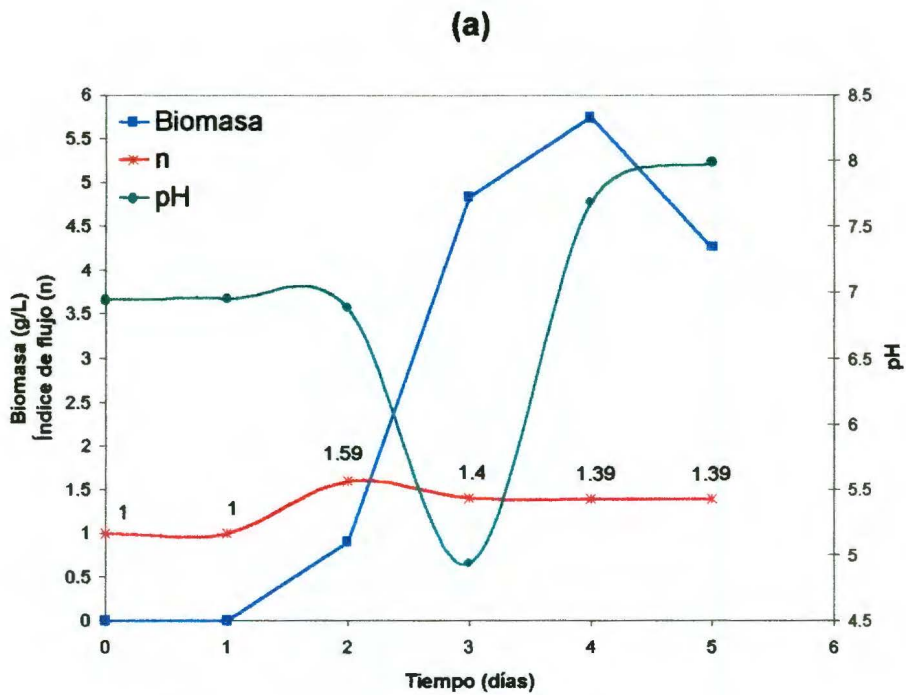


Figura 5.18. Biomasa, pH y evolución del índice de flujo (n) de los caldos de dos fermentaciones de *T. longibrachiatum* IMI 061758 en EL-1 con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono. Cada punto en la gráfica representa la media aritmética de tres repeticiones. Coeficiente de variación: Biomasa \leq 5%, pH \leq 1%, $n \leq$ 10%.

reproducibilidad de las fermentaciones, se registró la evolución de la biomasa y del pH de los caldos. Los resultados se muestran también en las figuras 5.17 y 5.18, para sales Volgel y EL-1, respectivamente.

5.9.1.1 Evolución del índice de flujo en los caldos con sales Volgel

Independientemente de la fuente de carbono, en la ventana de deformación analizada los caldos de fermentación se comportaron como fluidos dilatantes. El índice de flujo varió entre 1.49 y 1.65 para los caldos con glucosa (fig. 5.17a); y entre 1.31 y 1.55 para los caldos con xilano (fig. 5.17b). El medio sin crecimiento se comporta como un fluido newtoniano ($\mu = 3.9 \pm 0.17 \text{ mPa}\cdot\text{s}$), con propiedades semejantes a las del agua. Una vez que aparece el crecimiento, la reología de los caldos cambia, por lo que este comportamiento se puede asociar al crecimiento.

El pH de los caldos y el crecimiento se comportaron de manera similar a lo observado en las fermentaciones anteriores (fig. 5.8 y 5.9, sec. 5.5): se presentó un mayor crecimiento en glucosa que en xilano; y el pH presentó una tendencia a incrementarse, conforme transcurrió la fermentación, de un valor inicial de alrededor de 7.4 a un valor final aproximado de 8.9 (fig. 5.17).

5.9.1.2 Evolución del índice de flujo en los caldos con EL-1

Independientemente de la fuente de carbono, en la ventana de deformación analizada los caldos de fermentación se comportaron nuevamente como fluidos dilatantes. El índice de flujo varió entre 1.39 y 1.59 para los caldos con glucosa (fig. 5.18a); y entre 1.12 y 1.75 para los caldos con xilano (fig. 5.18b). El medio sin crecimiento se comporta como un fluido newtoniano ($\mu = 3.9 \pm 0.17 \text{ mPa}\cdot\text{s}$) con propiedades semejantes a las del agua. En este medio, el cambio de las propiedades reológicas también se puede asociar al crecimiento del hongo.

Si se le compara con los resultados obtenidos en las fermentaciones con nivel alto de glucosa en sales Volgel (fig. 5.14, sec. 5.6), y con la caracterización de producción

de xilanasas en EL-1 (fig. 5.16, sec. 5.8), en esta ocasión se presentó un retraso de 24 h en la aparición de biomasa. Sin embargo, el comportamiento del pH es similar al observado en estas fermentaciones: en glucosa, la fase exponencial de crecimiento coincide con una caída en el pH de 7.0 a 5.0. Una vez que el hongo entra en fase estacionaria, el pH rebota hasta alcanzar un valor final alrededor de 8.0. En xilano, el pH tiende a incrementarse del valor inicial de 7.0 a un valor final alrededor de 8.5. Este comportamiento es similar al observado anteriormente en el mismo medio (fig. 5.16b, sec. 5.8).

Durante el desarrollo del presente trabajo, se hicieron dos cosechas de esporas que se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, con un surfactante (tween 20) como crioprotector. Para el momento en que se hicieron las fermentaciones para caracterizar la reología de los caldos, las esporas tenían 6 meses en congelación. Por lo que es probable, que el retraso observado en el crecimiento se deba al estrés inducido por la conservación en congelación de las esporas.

5.9.1.3 Efecto de la concentración de xilanasas en el medio sobre el comportamiento reológico de los caldos de fermentación

Conforme el hongo crece, secreta proteínas al medio. Las proteínas son polímeros cuyas unidades constitutivas son los aminoácidos. Se ha observado, que generalmente las soluciones de polímeros se comportan como fluidos no newtonianos. Debido a esta característica de los polímeros, se diseñó un experimento adicional donde se evaluó la reología de las siguientes soluciones de la xilanasas comercial "Amano 90": 1, 10, 100 y 1000 μg de proteína/ml (fig. 5.19). Este experimento se hizo con la finalidad de discriminar el efecto de la biomasa y el efecto de las proteínas secretadas sobre el comportamiento reológico de los caldos.

A pesar de que el hongo no sólo excreta xilanasas, se utilizó la xilanasas comercial como proteína representativa. Las soluciones de proteína se comportaron como fluidos newtonianos ($\mu = 4.1 \pm 0.18\text{ mPa}\cdot\text{s}$), con propiedades semejantes a las del agua. En las concentraciones probadas, la viscosidad de las soluciones mostró ser

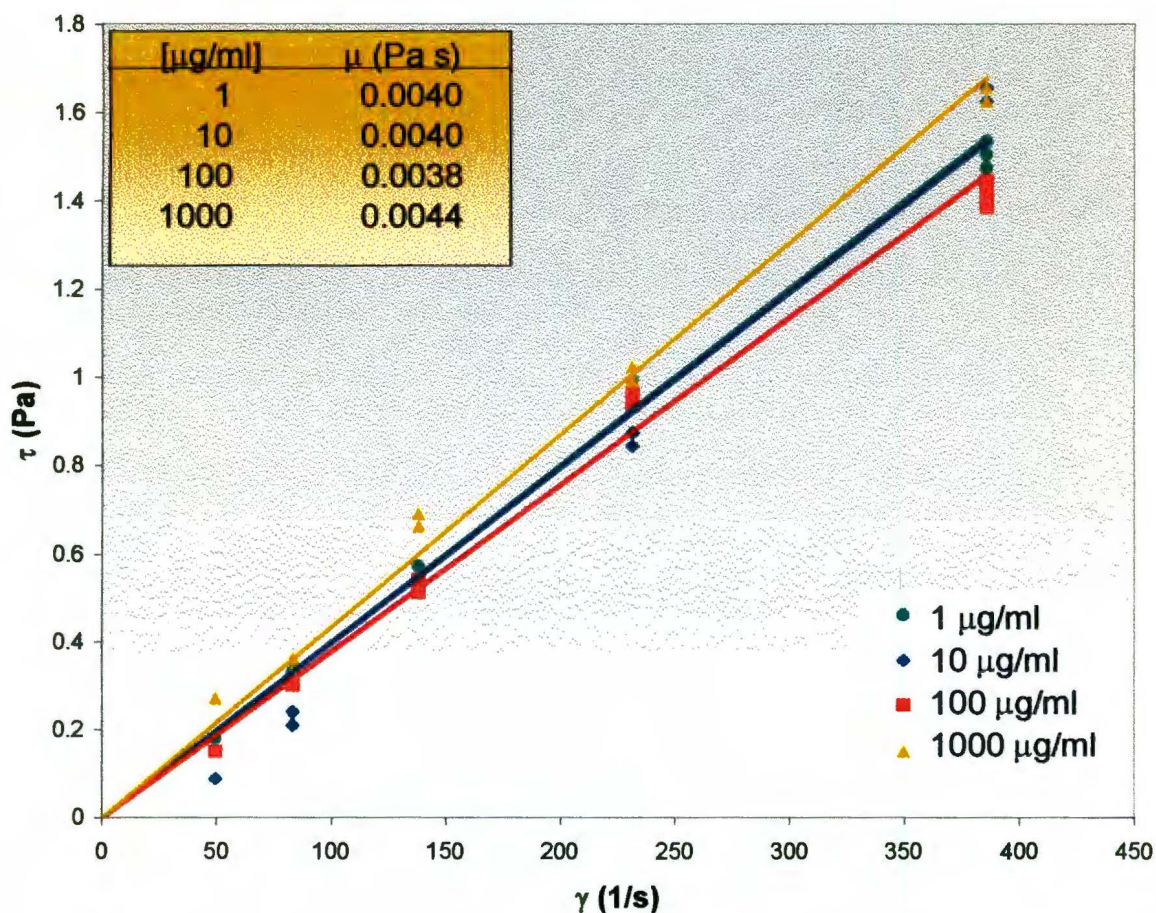


Figura 5.19. Curvas de flujo para cuatro soluciones de una xilanasa comercial en una solución amortiguadora de acetatos (10mM, pH 5.0), a 30 °C. Las concentraciones probadas fueron: 1, 10, 100 y 1000 μg de xilanasa/ml. La reología de las soluciones se evaluó con un sistema de cilindros concéntricos (Haake, MV-DIN). El valor de la viscosidad newtoniana (μ), es igual al valor de la pendiente de la recta que se obtiene mediante una regresión lineal de los datos obtenidos en el reómetro. $R^2 \geq 0.98$

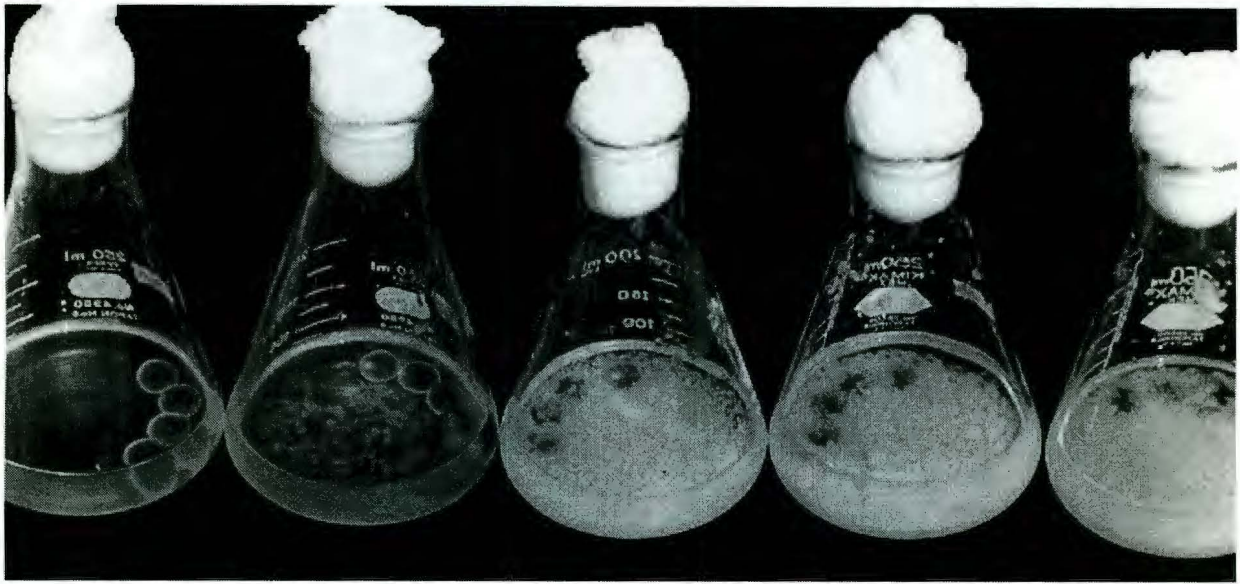
independiente de la concentración de proteína (fig. 5.19). Por lo tanto, el comportamiento dilatante de los caldos se puede atribuir al crecimiento del hongo.

Cabe mencionar que tanto para la evaluación de la reología de las soluciones de xilanasas, como para la evaluación de la reología del medio sin crecimiento, se utilizó un sistema de cilindros concéntricos (Haake, MV-DIN), en lugar del sensor helicoidal. La razón por la cual se utilizó el sistema de cilindros concéntricos, es que las lecturas que se obtuvieron con el sensor helicoidal indicaban que las soluciones y los caldos se comportaban como fluidos no newtonianos dilatantes, con un índice de flujo, $n = 1.46 \pm 0.51$ (estas curvas no se muestran). La desviación estándar representa el 34% de la media, y los valores mínimo y máximo de n registrados fueron 1.21 y 2.11, respectivamente. La dispersión de los datos puede atribuirse a condiciones no laminares de flujo en el sensor (Klein y col., 1995), que condujeron a lecturas erróneas.

Bajo las condiciones de fermentación utilizadas, el hongo creció formando pequeños pellets (fig. 5.20). Durante la determinación de las propiedades reológicas de los caldos, los cultivos se mantuvieron en suspensión homogeneizados por el sensor helicoidal. Por lo que al incrementarse la velocidad de agitación, probablemente se provocó una interacción, a nivel físico, cada vez mayor. Esta interacción física pudo ocasionar que los caldos tendieran a comportarse, conforme se incrementaba la velocidad de agitación, como una sustancia semisólida que demandaba cada vez mayor potencia para ser homogeneizada. De tal manera, que esta interacción física tuvo como consecuencia que los caldos se comportaran como fluidos dilatantes en la ventana de deformación analizada (fig. 5.21).

Considerando además la variabilidad de los datos, una vez que aparece el crecimiento y los caldos se comportan como fluidos dilatantes, el índice de flujo es mayor a la unidad y prácticamente independiente del tiempo y del crecimiento del microorganismo (fig. 5.17 y 5.18). Esto representa una ventaja, ya que implica que el consumo de potencia será el mismo a lo largo de toda la fermentación. Además los

(a)



(b)

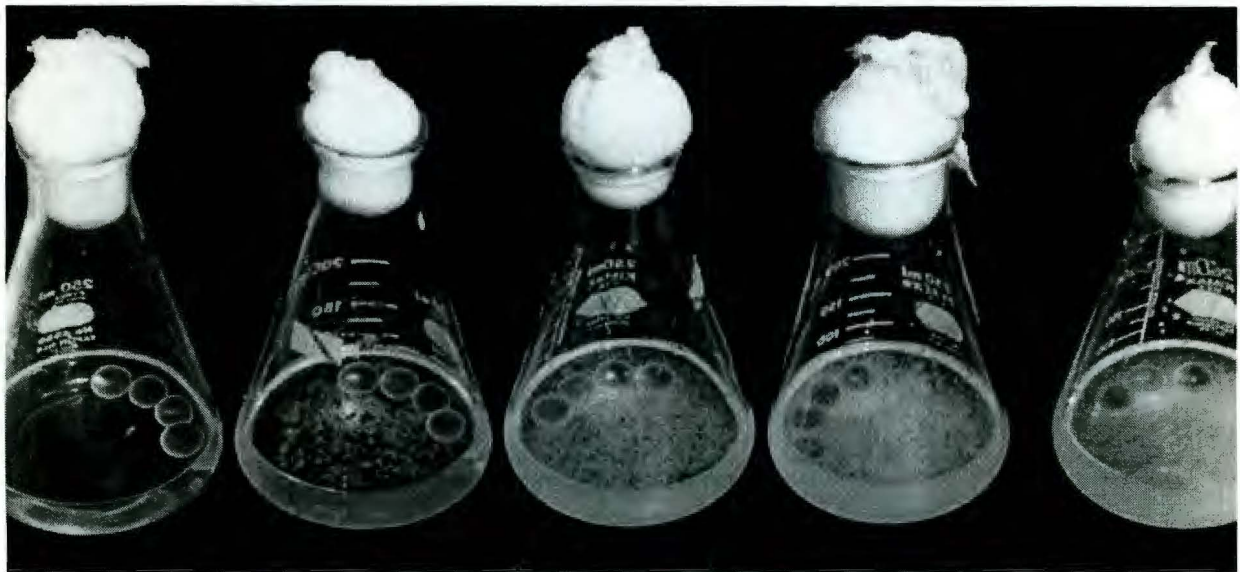


Figura 5.20. Desarrollo de *T. longibrachiatum* IMI 061758 en EL-1 con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono. Los matraces corresponden, de izquierda a derecha, a los días 1, 2, 3, 4 y 5.

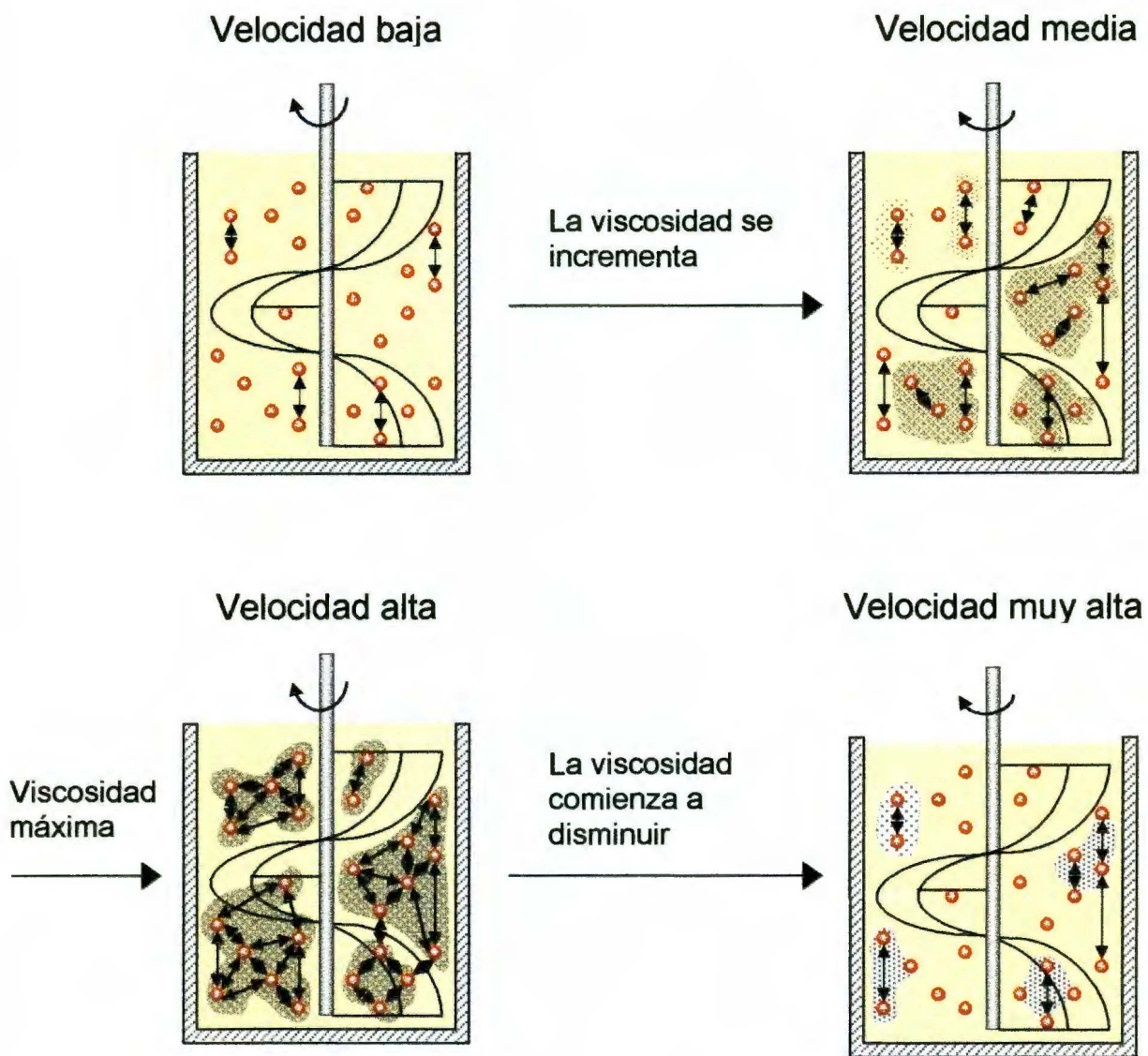


Figura 5.21. Propuesta del mecanismo por el cual los caldos de fermentación de *T. longibrachiatum* IMI 061758 se comportan como fluidos no newtonianos dilatantes. El modelo propuesto implica interacciones a nivel físico entre los pellets formados por el hongo al crecer. A bajas velocidades del impulsor, la interacción entre los pellets es baja. A velocidades medias, comienza a darse una mayor interacción entre los pellets, de tal manera que se comienzan a formar zonas donde los pellets forman zonas semi-sólidas. A velocidades altas, la interacción entre los pellets es máxima y las zonas donde se forman regiones semi-sólidas también, por lo que se alcanza una viscosidad máxima. A velocidades muy altas, tal vez donde comienza a darse un cambio de régimen de flujo laminar a flujo de transición, el cambio en los patrones de flujo podría hacer que disminuya de nuevo la interacción entre los pellets y que la viscosidad disminuya nuevamente.

resultados obtenidos sugieren que el mismo impulsor homogeneizará eficientemente los caldos durante el transcurso de la fermentación. Sin embargo, estos resultados deben tomarse con precaución y deberán de ser validados durante fermentaciones que se lleven a cabo en un reactor.

5.9.2 Estimación de la viscosidad de proceso de los caldos de fermentación

5.9.2.1 Curvas de flujo obtenidas mediante el método de Metzner y Otto

Como se discutió previamente (sec. 2.5), el enfoque de Metzner y Otto (1957) es ampliamente aceptado para estimar viscosidades de proceso utilizando sistemas de mezclado. Las figuras 5.22 y 5.23 muestran las curvas de flujo obtenidas mediante este enfoque para los caldos con sales Volgel y EL-1, respectivamente.

5.9.2.1.1 Curvas de flujo de los caldos con sales Volgel

La viscosidad de los caldos de *T. longibrachiatum* IMI 061758 en sales Volgel, no varió significativamente durante el transcurso de la fermentación en ninguna de las dos fuentes de carbono (fig. 5.22). Esto coincide con la observación de que, una vez que aparece el crecimiento y los caldos se comportan como fluidos dilatantes, el índice de flujo es prácticamente independiente del tiempo y de la concentración de biomasa.

5.9.2.1.2 Curvas de flujo de los caldos con EL-1

En el medio con glucosa, hasta el cuarto día se observó que la viscosidad de los caldos tiende a incrementarse conforme transcurre la fermentación. En el quinto día, la viscosidad de los caldos disminuye ligeramente para alcanzar valores semejantes a los del tercer día de la fermentación (fig. 5.23a). Este comportamiento contrasta con el hecho de que, una vez que aparece el crecimiento y se presenta el comportamiento dilatante, el índice de flujo de los caldos se mantuvo prácticamente constante (fig. 5.18a). Este comportamiento también contrasta con el observado en

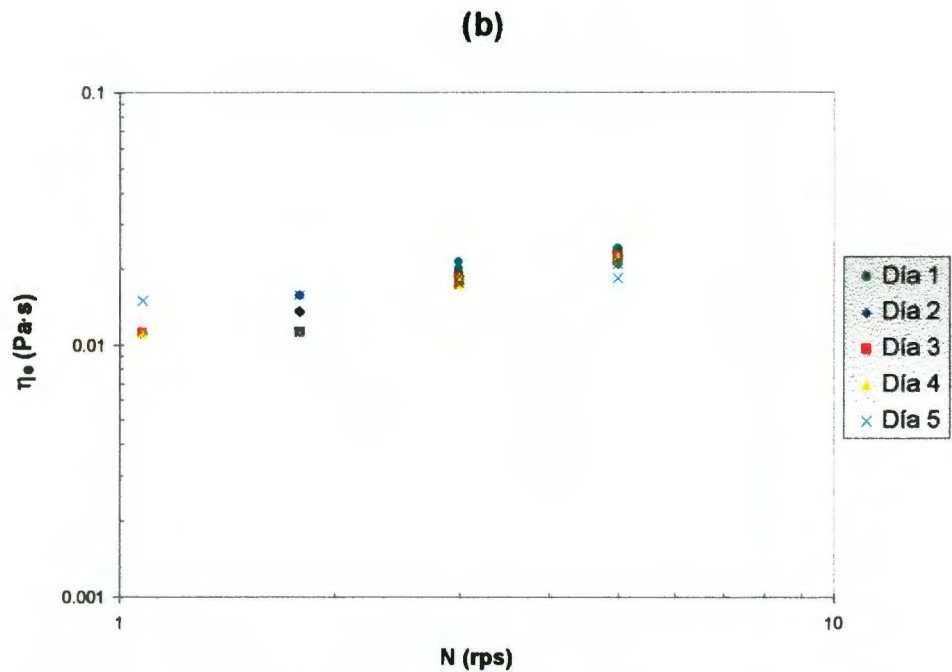
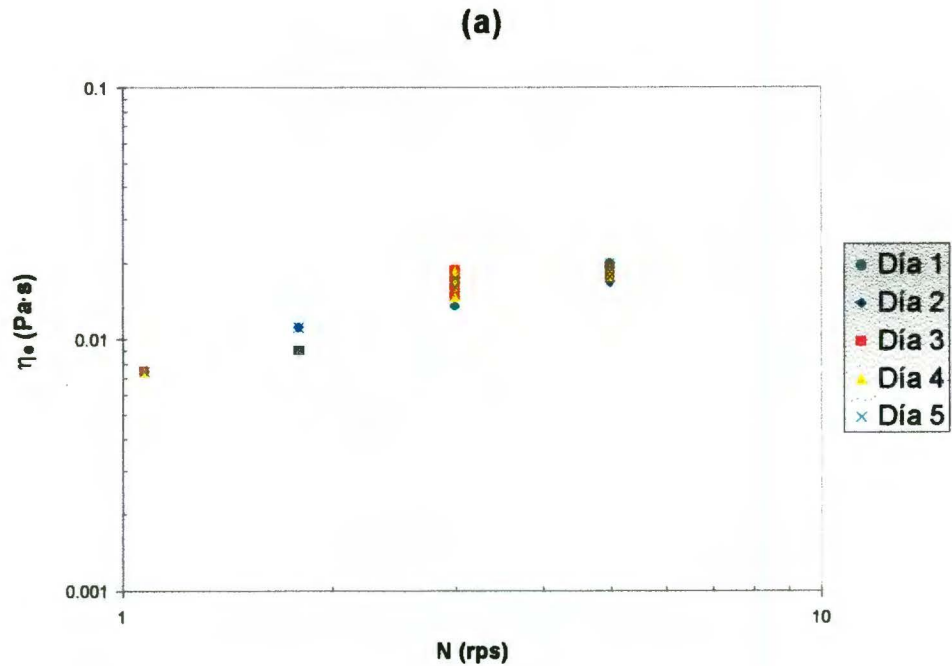


Figura 5.22. Curvas de flujo de los caldos de fermentación de *T. longibrachiatum* IMI 061758 en sales Vogel con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono. Las curvas se obtuvieron a partir de los datos brutos, T contra N , obtenidos con un reómetro rotacional (Haake RV20-M5) modificado con un sensor helicoidal, utilizando el método clásico de Metzner y Otto (1957). Los puntos en la gráfica representan la media aritmética de tres repeticiones. Coeficiente de variación $\leq 10\%$.

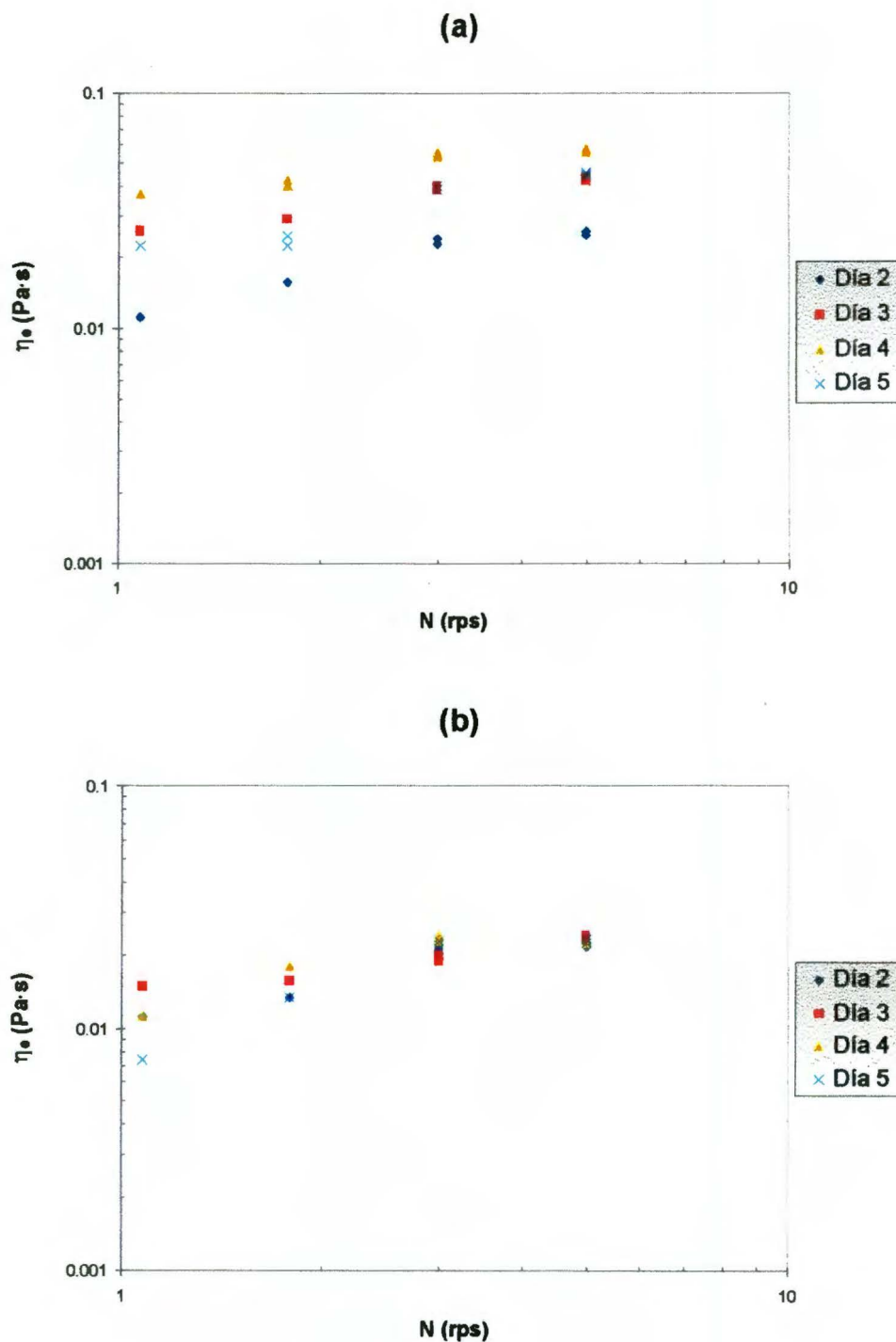


Figura 5.23. Curvas de flujo de los caldos de fermentación de *T. longibrachiatum* IMI 061758 en EL-1 con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono. Las curvas se obtuvieron a partir de los datos brutos, T contra N , obtenidos con un reómetro rotacional (Haake RV20-M5) modificado con un sensor helicoidal, utilizando el método clásico de Metzner y Otto (1957). Los puntos en la gráfica representan la media aritmética de tres repeticiones. Coeficiente de variación $\leq 10\%$.

sales Volgel, donde la viscosidad se mantiene constante (fig. 5.22). En los caldos con xilano, se observa un comportamiento similar al observado en sales Volgel: la viscosidad se mantiene prácticamente constante durante el transcurso de la fermentación (fig. 5.23b).

Durante el transcurso de las pruebas de viscosimetría rotacional, no se observó que los caldos de fermentación subieran por el eje del impulsor (efecto Weissenberg). Esto sugiere que los caldos no tienen una componente elástica significativa; estas observaciones coinciden con las de Allen y Robinson (1990). Por otro lado, el crecimiento del hongo en sales Volgel fue pobre si se le compara con el crecimiento alcanzado en EL-1 (sec. 5.8). Y a pesar del crecimiento que se logra al crecer el hongo en EL-1 con xilano (fig. 5.18b y 5.20b), este no se compara con el crecimiento que alcanza el hongo en el mismo medio pero con glucosa como fuente de carbono (fig. 5.18a y 5.20a).

En el medio con glucosa, se observa que la biomasa se incrementa desde un valor inicial de 0.90 g/L (día 2), hasta 5.75 g/L (día 4). Para posteriormente disminuir a 4.26 g/L (día 5), que es un valor semejante al registrado el tercer día (4.83 g/L, fig. 5.18a). El comportamiento de la biomasa es semejante al comportamiento de la viscosidad. Por lo que, con el crecimiento alcanzado en las fermentaciones en EL-1 con glucosa, la viscosidad de los caldos se puede asociar directamente a la concentración de biomasa. Por el contrario, en el resto de las fermentaciones la viscosidad de los caldos es independiente de la concentración de biomasa, y se mantiene prácticamente constante durante toda la fermentación.

Estas observaciones coinciden con las hechas por Allen y Robinson (1990), que estudiaron la reología de diferentes caldos de fermentación con: *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* y *Streptomyces levoris*. Estos autores observaron que la viscosidad de los caldos está directamente relacionada a la concentración de biomasa. Pedersen y col., (1993), también observaron la misma relación entre la

viscosidad de los caldos de una fermentación de *Penicillium chrysogenum* y la concentración de biomasa.

Galindo y col., (1989), también encontraron la misma relación entre viscosidad y concentración de biomasa para una fermentación con *Xanthomonas campestris*. Sólo que a diferencia del presente trabajo, y de los otros citados anteriormente, donde el comportamiento reológico de los caldos se puede atribuir al crecimiento del hongo, el comportamiento de los caldos de fermentación de *Xanthomonas campestris* puede atribuirse a la secreción de goma xantana al medio.

Como se observa en las fig. 5.22 y 5.23, no se calculó la velocidad efectiva de deformación (γ_e) de los caldos de fermentación. De acuerdo al enfoque de Metzner y Otto (1957), la γ_e se puede relacionar directamente con la velocidad de rotación del impulsor (N) mediante una constante (k_S , o constante de Metzner-Otto) que depende únicamente de la geometría utilizada ($\gamma_e = k_S N$). Sin embargo, varios investigadores han observado que la constante de Metzner-Otto también depende fuertemente de la reología del fluido bajo estudio (Calderbank y Moo-Young, 1961; Beckner y Smith, 1966; Schilo, 1969; Nagata y col., 1970; Rieger y Novák, 1973; Yap y col., 1979; Nienow y Elson, 1988; Castell-Pérez y Steffe, 1990; Brito y col., 1992). Esta dependencia es más fuerte para fluidos altamente pseudoplásticos (Brilo y col., 1997), y para fluidos dilatantes (Nienow y Elson, 1988).

5.9.2.2 Curvas de flujo obtenidas mediante el método de Brito y col.

Brilo y col., (1998), en base a un trabajo anterior (Brilo y col., 1992), incorporan los efectos de la reología del fluido a la estimación de la constante de Metzner-Otto en la función:

$$\gamma_e = k_S(n) \cdot N = \left[\frac{k_p(n)}{k_p} \right]^{\frac{1}{n-1}} \cdot N \quad (5.1)$$

Donde:

$$k_p(n) = k_p b^{n-1} c^{\frac{n-1}{n}} \quad (5.2)$$

En donde: $b = 24.64 \pm 2.76$; $c = 0.91 \pm 0.02$; y k_p es la constante de potencia obtenida al calibrar el sensor helicoidal con un fluido newtoniano ($k_p = 162.79 \pm 0.77$ para el sensor utilizado en este trabajo).

Es importante mencionar, que las funciones (5.1) y (5.2) se obtuvieron del análisis de fluidos newtonianos y pseudoplásticos homogéneos. En el estudio de Brito y col., (1998), se utilizó un sensor con las mismas relaciones geométricas al que se utilizó en el presente trabajo, sin embargo cabe la pregunta de si estas ecuaciones se pueden aplicar al sensor aquí utilizado y de si la función (5.2) es válida también para fluidos no newtonianos dilatantes, como resultaron ser los caldos de fermentación de *T. longibrachiatum* IMI 061758. Por lo tanto, se hizo un análisis de la propuesta de Brito y col. (1998).

5.9.2.2.1 Modificaciones a la propuesta de Brito y col.

En condiciones de flujo laminar un fluido no newtoniano, cuyo comportamiento se pueda describir con el modelo de la ley de la potencia, va a seguir la siguiente relación:

$$T = A(n)N^n \quad (5.3)$$

Por lo que al graficar en coordenadas logarítmicas los datos brutos obtenidos del reómetro, T contra N , se obtendrá una recta cuya pendiente es el valor de n y cuyo intercepto con T será el logaritmo del valor de la constante $A(n)$.

Brito y col. (1998), proponen combinar la ec. (5.3) con:

$$N_p = k_p(n)R_e^{-1} \quad (5.4)$$

Donde:

$$N_p = \frac{2\pi T}{\rho d^5 N^2} \quad (5.5)$$

Y:

$$R_e = \frac{\rho d^2 N^{2-n}}{m} \quad (5.6)$$

Igualando (5.4) y (5.5), y substituyendo (5.6) en (5.4) queda:

$$\frac{2\pi T}{N^2} = \frac{k_p(n)md^3}{N^{2-n}} \quad (5.7)$$

Substituyendo (5.3) en (5.7), queda:

$$2\pi A(n) = k_p(n)md^3 \quad (5.8)$$

Donde integrando el valor de 2π a la constante $A(n)$, se llega a la propuesta de Brito y col. (ec. 9,1998):

$$A(n) = k_p(n)md^3 \quad (5.9)$$

Debido a que (5.9), al combinarse con (5.3), se utiliza posteriormente para calcular el índice de consistencia (m), se consideró importante estudiar el efecto de incorporar el valor de 2π a la constante $A(n)$. Con esta finalidad, se analizaron los datos obtenidos de la deformación del glicerol, que es un fluido newtoniano. De la gráfica en coordenadas logarítmicas de los datos brutos, T contra N , se obtuvo el valor de n y el de $A(n)$.

Si se analiza (5.9), se desprende que para un fluido newtoniano ($n = 1$), el valor de m es igual a la viscosidad newtoniana (μ). Por lo que, suponiendo que la función (5.2) es válida para el sensor utilizado en este trabajo, al substituir los valores de $k_p(n)$ y de $\mu = m$ en (5.9), deberá obtenerse un valor para la constante $A(n)$ muy semejante al obtenido de los datos brutos. Los resultados se muestran en la tabla 5.5.

Al calcular el valor de $A(n)$ utilizando (5.9), el valor que se obtiene difiere del que se obtiene directamente de la gráfica de los datos brutos, T contra N . Analizando los valores de $A(n)$ obtenidos utilizando (5.9), se observa que al dividirlos por 2π se obtiene una coincidencia casi exacta para el valor de $A(n)$ obtenido directamente (tabla 5.5). Por lo tanto se propone no incorporar el valor de 2π a $A(n)$, de tal manera que se tiene la siguiente relación:

Tabla 5.5. Evaluación de la incorporación del valor de 2π en la constante $A(n)$, y corrección propuesta mediante la ecuación (5.10). Se muestran los datos obtenidos de la deformación controlada de glicerol a 30 ± 0.5 °C, en un reómetro rotacional Haake RV20-M5 modificado con un sensor helicoidal, utilizando velocidades de cizalla desde 5 hasta 645 s^{-1}

Réplica	K_P newtoniano	Índice de flujo (n)	$A(n)$ directo	$A(n)$ calculado utilizando (5.9)	$A(n)$ calculado utilizando (5.10)
1	164 ± 8	1.03	0.000508	0.00324	0.000516
2	163 ± 6	1.01	0.000503	0.00316	0.000502
3	162 ± 4	1.00	0.000502	0.00315	0.000502

$$A(n) = \frac{k_p(n)md^3}{2\pi} \quad (5.11)$$

Y substituyendo (5.3) en (5.10), calcular el valor de m :

$$m = \frac{2\pi T}{k_p(n)d^3 N^n} \quad (5.10)$$

Para finalmente, calcular la viscosidad de proceso de los caldos utilizando la ec. (6) de Brito y col., (1998):

$$\eta_e = \frac{mk_p(n)N^{n-1}}{k_p} \quad (5.12)$$

El análisis de la propuesta de Brito y col., (1998), arroja como resultados importantes que el incorporar el valor de 2π a la constante $A(n)$ puede tener efectos significativos sobre los cálculos posteriores que involucran el valor de esta constante. Por lo que, se recomienda utilizar (5.11) para, posteriormente, estimar la viscosidad efectiva mediante (5.12). Por otra parte, el que se tenga una coincidencia casi exacta del valor de $A(n)$ obtenido directamente de los datos brutos, T contra N , y del valor calculado utilizando la ec. (5.10), indica que es válido usar la función (5.2) con el sensor utilizado en el presente trabajo.

Hasta este punto, no se contaba con evidencia experimental que indicara que la función (5.2), también es válida para fluidos no newtonianos dilatantes. Por lo que suponiendo que es válido utilizarla para estimar la viscosidad de proceso (η_e) de este tipo de fluidos, se obtuvieron las curvas de flujo para los mismos datos analizados previamente utilizando el método de Metzner y Otto (1957).

5.9.2.2.2 Curvas de flujo de los caldos de fermentación de *T. longibrachiatum*

Al estimar la viscosidad de los caldos de fermentación mediante la modificación propuesta (ecs. 5.10 y 5.11), se observa una coincidencia exacta entre las curvas de

flujo así obtenidas (figs. 5.24 y 5.25 para sales Volgel y EL-1, respectivamente), y las curvas de flujo obtenidas mediante el método clásico de Metzner y Otto (figs. 5.22 y 5.23). Estos resultados indican que la función (5.2), desarrollada a partir del análisis de fluidos newtonianos y pseudoplásticos, es válida también para fluidos dilatantes; al menos, en el rango de n donde se situaron los caldos de fermentación (n entre 1.12 y 1.75).

Ya con esta evidencia de que la función (5.2) también es válida para estimar viscosidades de proceso de fluidos dilatantes, se procedió a utilizar la función (5.1) para calcular la velocidad de deformación efectiva (γ_e) resultante sobre los caldos de fermentación (figs. 5.26 y 5.27 para sales Volgel y EL-1, respectivamente). La única suposición que se hizo al estimar la γ_e , es que las funciones (5.1) y (5.2), que se obtuvieron del análisis de fluidos homogéneos, se pueden utilizar para el análisis de fluidos heterogéneos.

Los valores de $k_S(n)$ que se obtuvieron se muestran en la tabla 5.6. Estos valores se encuentran muy cercanos a los valores de k_S que se utilizan normalmente para este tipo de impulsores [$25 \leq k_S \leq 30$, (Brito y col., 1998)]; y difieren del valor de $k_S = 14$, utilizado por Brito y col. (1998), con fluidos altamente pseudoplásticos ($n = 0.12$). Al contrario de lo observado por Nienow y Elson (1998), los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el comportamiento dilatante no tiene un efecto muy drástico sobre el valor de k_S .

Finalmente, se muestra una comparación entre los datos crudos, T contra N , obtenidos con el sensor helicoidal y con un sistema de cono y plato (fig. 5.28). La señal que se obtuvo con la geometría convencional (cono y plato), fue inestable a velocidades bajas y se estabilizó gradualmente conforme se fue incrementando la velocidad. La inestabilidad de la señal en el reómetro puede atribuirse a interacciones de los pellets con el espacio libre entre el cono y el plato. En contraste, la señal que se obtuvo con el sensor helicoidal fue estable en el rango de velocidades analizadas, y a lo largo de toda la fermentación (fig. 5.28).

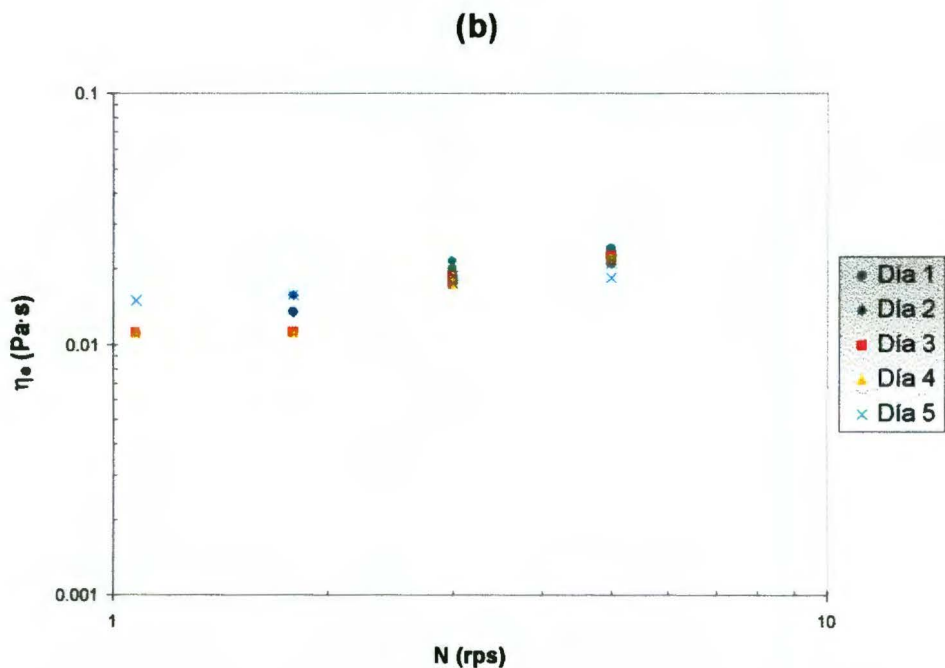
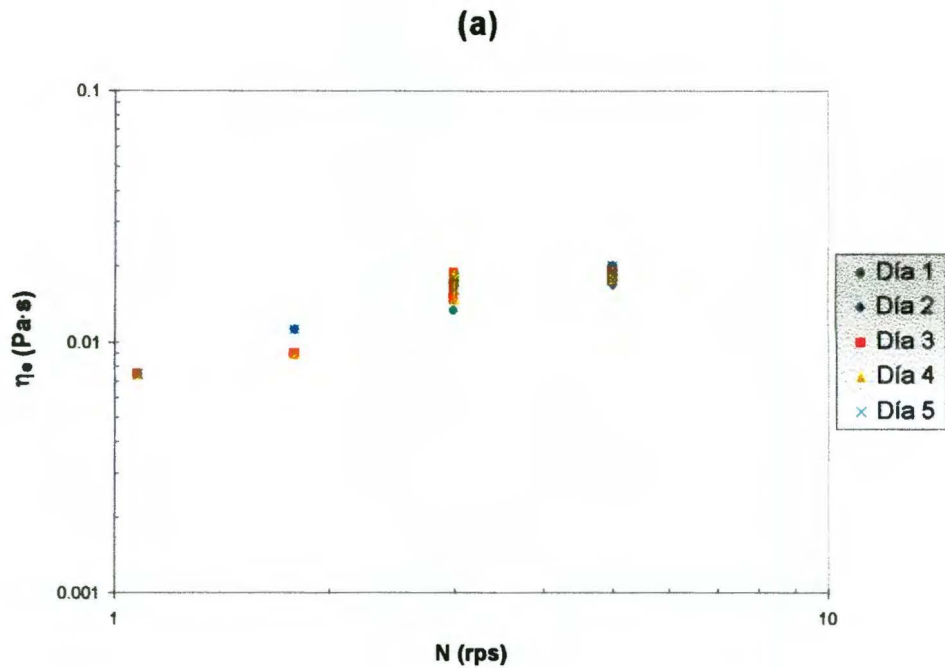


Figura 5.24. Curvas de flujo de los caldos de fermentación de *T. longibrachiatum* IMI 061758 en sales Volgel con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono. Las curvas se obtuvieron a partir de los datos brutos, T contra N , obtenidos con un reómetro rotacional (Haake RV20-M5) modificado con un sensor helicoidal, utilizando una modificación del método de Brito y col., (1998). Los puntos en la gráfica representan la media aritmética de tres repeticiones. Coeficiente de variación $\leq 10\%$.

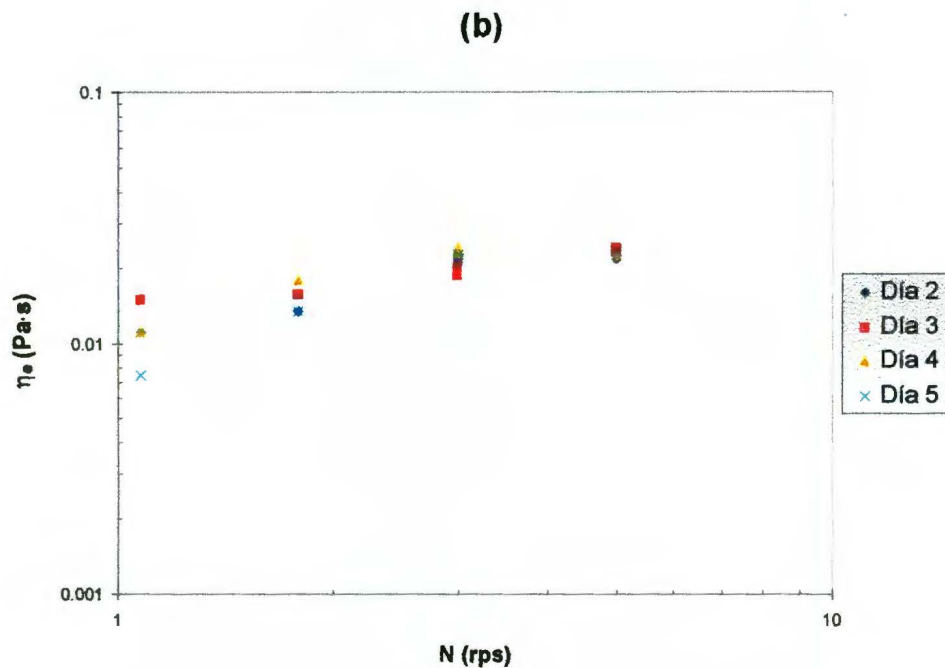
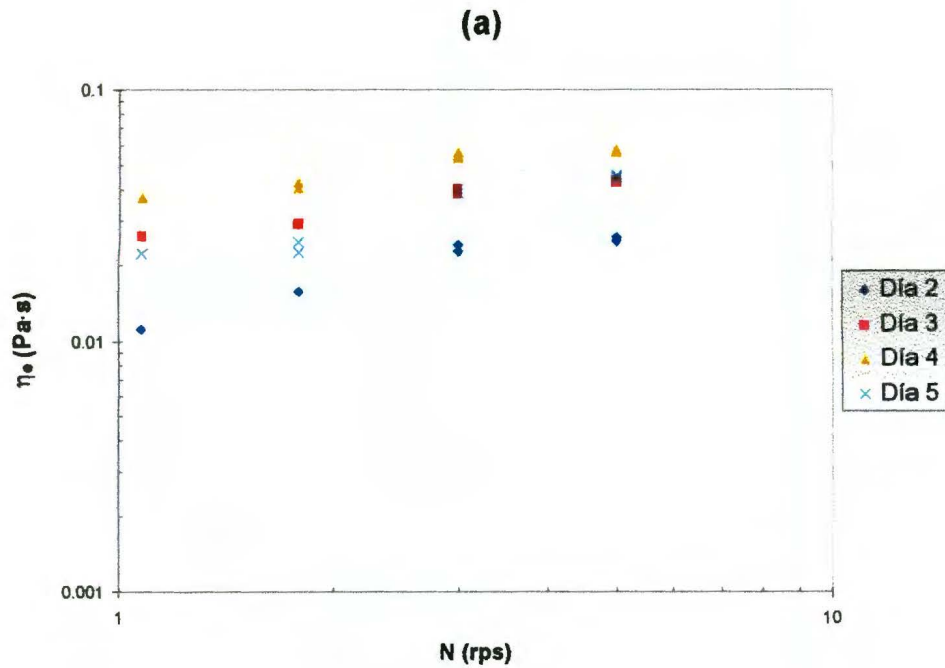


Figura 5.25. Curvas de flujo de los caldos de fermentación de *T. longibrachiatum* IMI 061758 en EL-1 con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono. Las curvas se obtuvieron a partir de los datos brutos, T contra N , obtenidos con un reómetro rotacional (Haake RV20-M5) modificado con un sensor helicoidal, utilizando una modificación del método de Brito y col., (1998). Los puntos en la gráfica representan la media aritmética de tres repeticiones. Coeficiente de variación $\leq 10\%$.

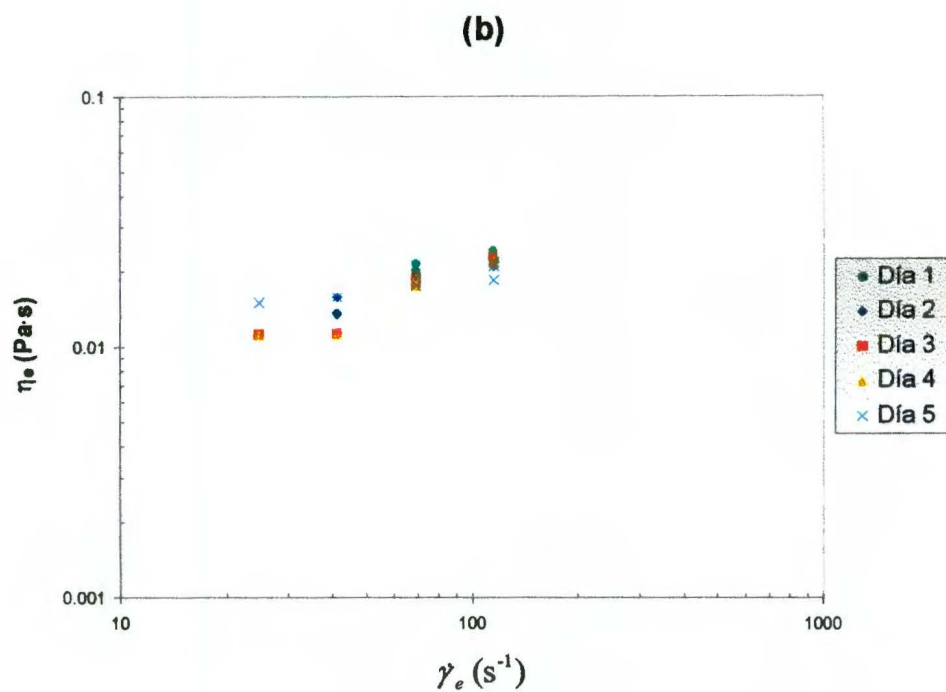
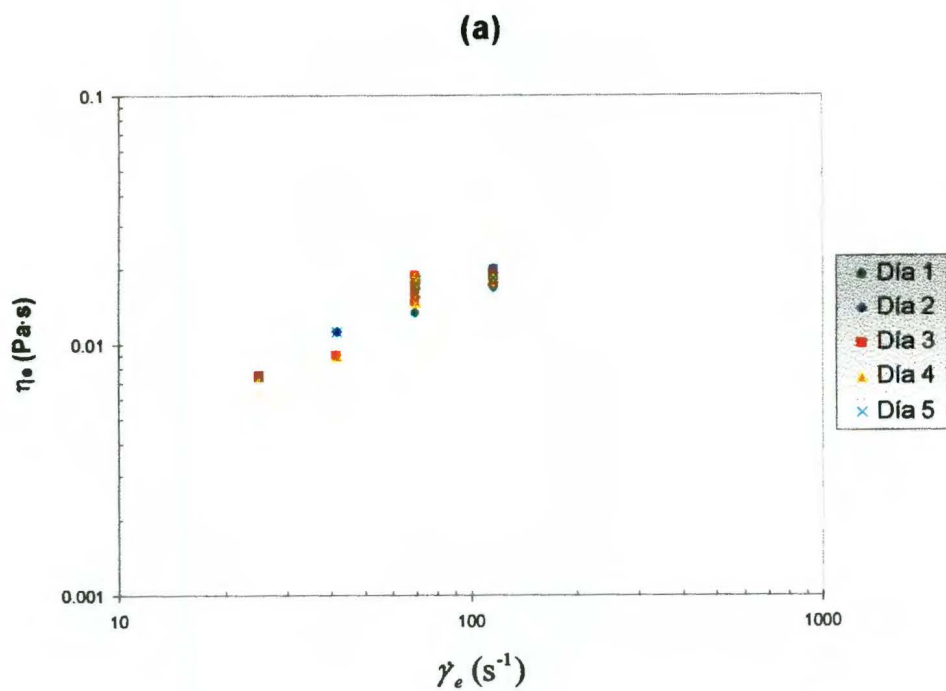


Figura 5.26. Viscosidad de proceso (η_e) contra velocidad efectiva de deformación (γ_e) de los caldos de fermentación de *T. longibrachiatum* IMI 061758 en sales Volgel con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono. La γ_e se obtuvo utilizando el método de Brito y col., (1998).

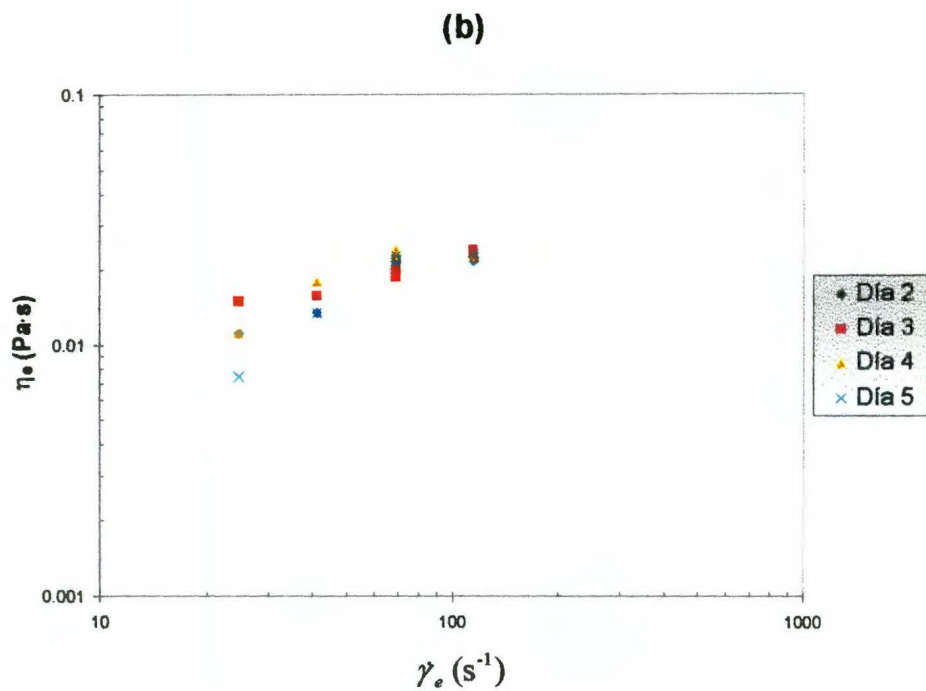
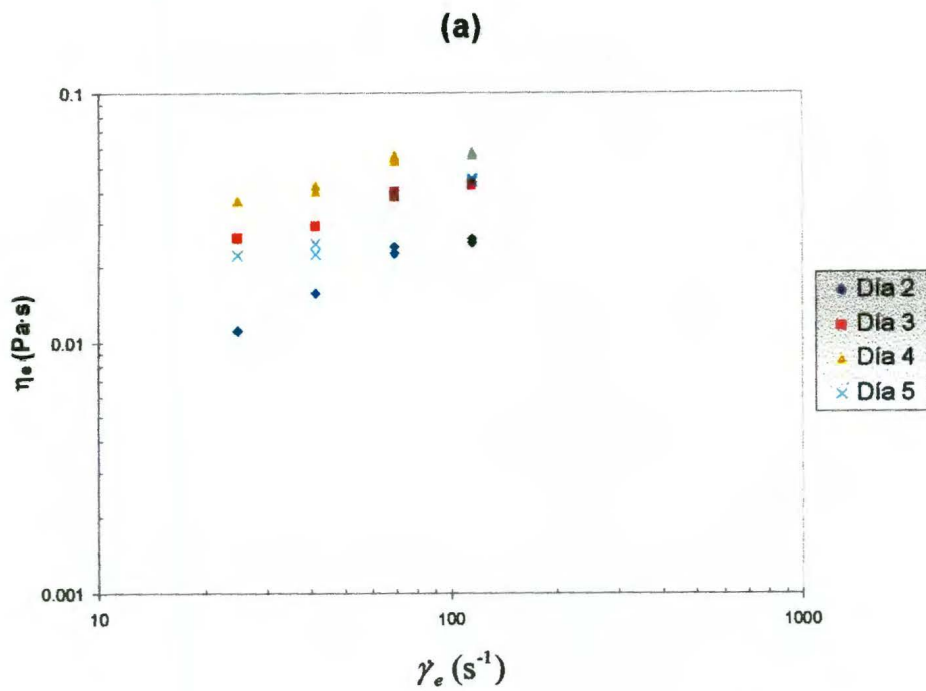


Figura 5.27. Viscosidad de proceso (η_e) contra velocidad efectiva de deformación (γ_e) de los caldos de fermentación de *T. longibrachiatum* IMI 061758 en EL-1 con: (a) glucosa, y (b) xilano como fuente de carbono. La γ_e se obtuvo utilizando el método de Brito y col., (1998).

Tabla 5.6. Valores de la función $k_s(n)$ calculados de acuerdo a la ec. (5.1). Los datos en la tabla representan la media aritmética de tres repeticiones. Coeficiente de variación $\leq 10\%$.

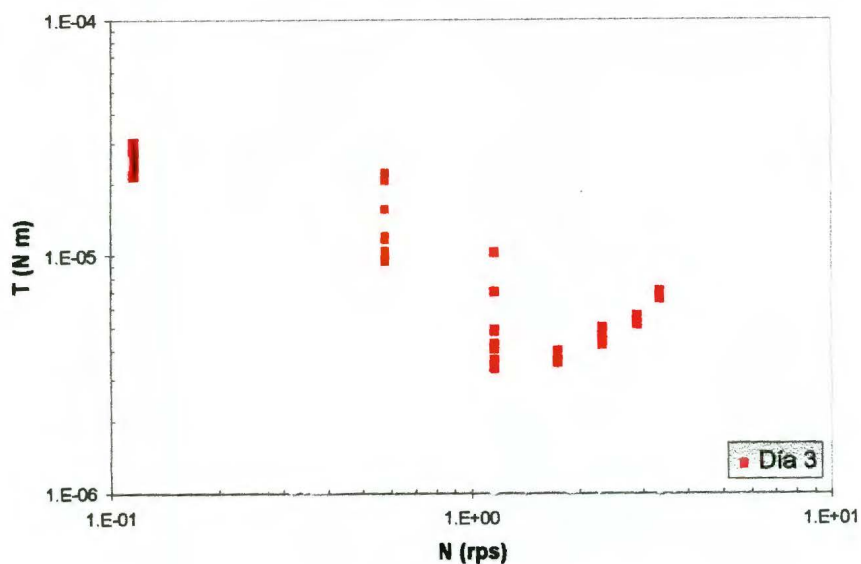
Día	Sales Vogel		EL-1	
	Índice de flujo (n) ^a		Índice de flujo (n) ^a	
	Glucosa	Xilano	Glucosa	Xilano
0	1 ^b	1 ^b	1 ^b	1 ^b
1	1.58	1.43	1 ^b	1 ^b
2	1.49	1.38	1.59	1.14
3	1.65	1.55	1.4	1.12
4	1.65	1.55	1.39	1.46
5	1.65	1.31	1.39	1.75
	$k_s(n)$		$k_s(n)$	
	Glucosa	Xilano	Glucosa	Xilano
0	N.C. ^c	N.C.	N.C.	N.C.
1	23.21	23.07	N.C.	N.C.
2	23.13	23.01	23.22	22.68
3	23.27	23.19	23.03	22.65
4	23.27	23.19	23.02	23.10
5	23.27	22.93	23.02	23.35

^a El índice de flujo se estimó a partir de los datos brutos, T contra N , obtenidos del reómetro rotacional Haake.

^b Caldos sin crecimiento.

^c No Calculado.

Cono y plato



Helicoidal

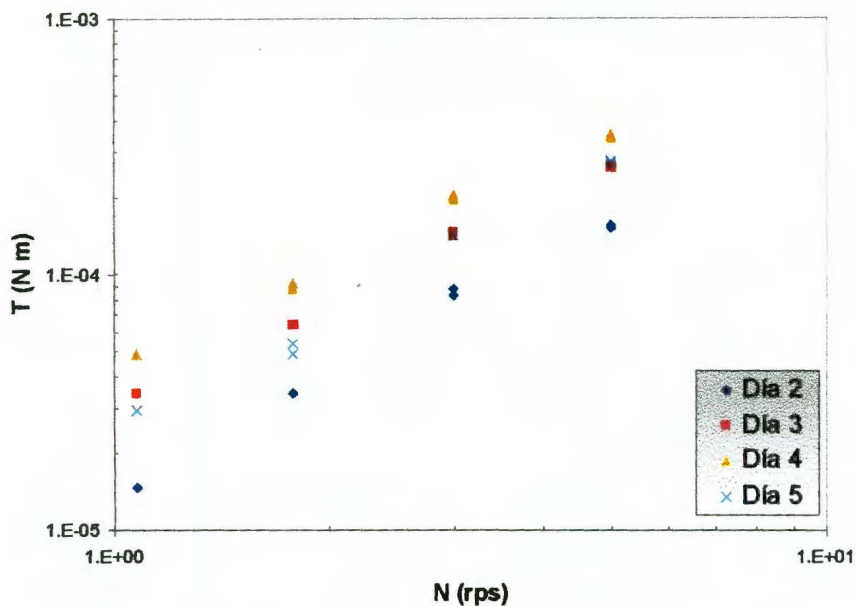


Figura 5.28. Datos crudos del reómetro, torque (T) y velocidad rotacional (N), para los caldos de fermentación de *T. longibrachiatum* IMI 061758. Con la geometría de cono y plato, se muestra la curva de un experimento preliminar en sales Vogel con glucosa (0.55 mM) como fuente de carbono, a los tres días de fermentación. Con el sensor helicoidal, se muestran las curvas de los caldos en EL-1 con glucosa (55.5 mM) como fuente de carbono.

En el rango de velocidades donde los datos son comparables, se observa que las lecturas obtenidas con el sensor helicoidal son mayores a las que se obtienen con la geometría convencional (fig. 5.28). Estas lecturas pueden atribuirse a una mejor homogeneización de los caldos de fermentación. Otros investigadores también han observado la misma tendencia al utilizar dispositivos de mezclado para la estimación de viscosidades de proceso de suspensiones (Jomha y col., 1990; Brito y col., 1998).

5.9.3 Puntos destacables y resumen

Independientemente del medio y de la fuente de carbono, en la ventana de velocidades de deformación analizada, una vez que aparece la biomasa los caldos de fermentación se comportaron como fluidos dilatantes (n entre 1.12 y 1.75). Debido a que soluciones, con concentraciones tan altas como 1000 $\mu\text{g/ml}$, de una xilanasa comercial no mostraron desviaciones del comportamiento newtoniano, el comportamiento de los caldos de fermentación se atribuyó al crecimiento del hongo.

Una vez que se da el crecimiento y que los caldos se comportan como fluidos dilatantes, el índice de flujo de los caldos resultó ser prácticamente independiente del tiempo y del crecimiento. El sensor helicoidal no pudo ser utilizado para estimar la viscosidad de proceso de las soluciones de xilanasa ni de los medios sin crecimiento, debido probablemente a la baja viscosidad de dichas soluciones. En su lugar, se utilizó una geometría convencional de cilindros concéntricos (Haake, MV-DIN).

Al estimar la viscosidad de proceso de los caldos de fermentación mediante el método de Metzner y Otto (1957), se encontró que la viscosidad de los caldos fue independiente de la concentración de biomasa y del tiempo en todos los medios con excepción de uno: EL-1 con glucosa como fuente de carbono. En este último medio, la viscosidad de los caldos se relacionó directamente a la concentración de biomasa. Esta diferencia en el comportamiento de la viscosidad se atribuyó al grado de crecimiento alcanzado por el hongo.

En base al análisis de los datos brutos, T contra N , obtenidos de la deformación controlada de glicerol, se propone una modificación (ecs. 5.10 y 5.11), al método de Brito y col., (1998). Al estimar la viscosidad de proceso de los caldos mediante esta modificación, se obtiene una coincidencia exacta con los valores de viscosidad de proceso obtenidos mediante el método de Metzner y Otto. Con esta evidencia experimental que validó el uso de las funciones (5.1) y (5.2), se calculó la velocidad de deformación efectiva resultante sobre los caldos de fermentación. Los valores obtenidos de $k_S(n)$ fueron prácticamente independientes del índice de flujo de los caldos de fermentación (tabla 5.6).

6. Conclusiones

6.1 Conclusiones

Cuando *Trichoderma longibrachiatum* IMI 0617568 crece en un medio con glucosa, la producción de xilanasas parece ser parte de la respuesta del hongo al estrés ocasionado por el agotamiento de un substrato asimilable. Se tiene evidencia parcial de que cuando el hongo crece en xilano, se obtiene una síntesis acelerada de xilanasas. Por lo que, aparentemente la producción de xilanasas en *Trichoderma longibrachiatum* IMI 061758 es inductiva.

La secreción de proteínas se asoció directamente con el desarrollo, por lo que si se desea obtener una mayor producción de xilanasas es deseable proporcionar al hongo condiciones que favorezcan su crecimiento. Aparentemente, *T. longibrachiatum* IMI 061758 tiene la capacidad de generar energía a partir de compuestos inorgánicos reducidos.

En la ventana de velocidades de deformación analizada, los caldos de fermentación se comportan como fluidos no newtonianos inelásticos dilatantes. Este comportamiento reológico depende de la de biomasa. Una vez que aparece la biomasa, en todos los medios la viscosidad de los caldos resultó independiente del tiempo y del desarrollo alcanzado por *T. longibrachiatum* IMI 061758, con excepción del medio EL-1 con glucosa: en este medio la viscosidad de los caldos fue directamente proporcional a la concentración de biomasa. Este comportamiento diferente se debe al grado de desarrollo alcanzado por el hongo en este medio.

6.2 Principales aportes del trabajo

Los principales aportes del presente trabajo son: el diseño de un medio, relativamente simple que se puede esterilizar en autoclave, para la producción de xilanasas de *T. longibrachiatum* IMI 061758. Y la validación de un método para

estimar la viscosidad de suspensiones sedimentables, incluidos caldos de fermentación.

6.3 Recomendaciones para trabajos futuros

Se recomienda caracterizar y purificar las xilanasas producidas por *Trichoderma longibrachiatum* IMI 061758. Continuar las fermentaciones en un reactor pequeño, a escala laboratorio, donde se estudie la producción de xilanasas en función de la velocidad de aireación, del sistema impulsor, la velocidad de agitación y sus posibles correlaciones. Se recomienda también estudiar el comportamiento reológico de los caldos de fermentación *in situ*, acoplado un torquímetro de precisión al sistema impulsor. De esta manera, se tendrá una base más sólida que permitirá establecer la producción de xilanasas de *Trichoderma longibrachiatum* IMI 061758 a gran escala.

7. Referencias

- Albersheim, P. 1976. The primary cell wall. **En:** *Plant Biochemistry*. Bonner, J., y Varner, J. E. Eds. Academic Press, New York. pp. 225-274
- Allen, D. G., y Robinson, W. 1990. Measurement of rheological properties of filamentous fermentation broths. *Chem. Eng. Sci.* 45(1): 37-48
- Andreotti, R. E., Mandels, M. H., y Roche, C. 1977. Effect of some fermentation variables on growth and cellulase production by *Trichoderma* QM 9414. **En:** *Proceedings of Bioconversion Symposium*. Ghose, T. K. Ed. Indian Institute of Technology. New Delhi, India. pp: 249-267
- Anonymous. 1991. Enzymes: Catalysts for food processes. *Food Technol.* 45: 78-85
- Anonymous. 1992. Biotechnology applied to foods. *Food Technol.* 46: 30
- Atlas, R. M. 1989. Microbial energetics: The generation of ATP. **En:** *Microbiology: Fundamentals and applications*. 2nd ed. Maxwell Macmillan International Editions. Ontario, Canada. pp: 112-146
- Aynsley, M., Ward, A. C., and Wright A. R. 1990. A mathematical model for the growth of mycelial fungi in submerged culture. *Biotechnol. Bioeng.* 35:820-830
- Baver, W. D., Talmadge, K. W., Keegstra, K., y Albersheim, P. 1973. The structure of plant cell wall. II. The hemicellulose of the walls of suspension-cultured sycamore cells. *Plant Physiol.* 51: 174-187
- Beckner, J. L., y Smith, J. M. 1966. Anchor agitated systems: power input with Newtonian and pseudo-plastic fluids. *Trans. Inst. Chem. Eng.* 44(6): T224
- Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* 3: 286-290
- Biely, P. 1993. Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. **En:** *Hemicellulose and hemicellulases*. Coughlan, M. P., y Hazlewood, G. P. Eds. Portland Press. London, England. pp: 29-51
- Biely, P., MacKenzie, C. R., y Schneider, H. 1988. Production of acetyl xylan esterase by *Trichoderma reesei* and *Schizophyllum commune*. *Can. J. Microbiol.* 34: 767-772
- Biely, P., Puls, J., y Schneider, H. 1985. Acetyl xylan esterases in fungal xylanolytic systems. *FEBS Lett.* 186: 80-84
- Bissett, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. *Can. J. Bot.* 62: 924-931
- Bissett, J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Can. J. Bot.* 69: 2357-2372
- Bissett, J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. *Can. J. Bot.* 69: 2372-2417
- Bissett, J. 1991c. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. *Can. J. Bot.* 69: 2418-2420
- Bissett, J. 1992. *Trichoderma atroviride*. *Can. J. Bot.* 70: 639-641
- Bonnarme, P., Delattre, M., Drouet, H., Corrieu, G., y Asther, M. 1993. Toward a control of lignin and manganese peroxidases hypersecretion by *Phenerochaete chrysosporium* in agitated vessels: Evidence of the superiority of pneumatic bioreactors on mechanically agitated bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* 41: 440-450

- Bonner, J., y Galston, A. W. 1973. Hidratos de carbono. Su naturaleza, funcionamiento e interrelaciones. **En:** *Principios de fisiología vegetal*. Aguilar. Madrid, España. pp. 186-212
- Bouveng, H. O. 1961. Phenylisocyanate derivatives of carbohydrates. II Location of the O-acetyl groups in birch xylan. *Acta Chem. Scand.* 15: 96-100
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Brito-de la Fuente, E., Choplin, L., y Tanguy, P. A. 1997. Mixing with helical ribbon impellers: Effect of highly shear thinning behavior and impeller geometry. *Trans IChemE.* 75(A): 45-52
- Brito-de la Fuente, E., Leuliet, J. C., Choplin, L., y Tanguy, P. A. 1992. On the effect of shear thinning behavior on mixing with a helical ribbon impeller. *AIChE Symp. Ser.* 286(88): 28-32
- Brito-de la Fuente, E., Nava, J. A., Lopez, L. M., Medina, L., Ascanio, G., y Tanguy, P. A. 1998. Process viscometry of complex fluids and suspension with helical ribbon agitators. *Can. J. Chem. Eng.* 76: 689-695
- Bush, L. 1991. Biotechnology: Consumer concerns about risks and values. *Food Technol.* 45: 96-101
- Calderbank, P. H., y Moo-Young, M. B. 1961. The power characteristics of agitators for the mixing of Newtonian and non-Newtonian fluids. *Trans. Inst. Chem. Eng.* 39: 337
- Castell-Pérez, M. E., y Steffe, J. F. Evaluating shear rates for power-law fluids in mixing viscometry. *J. Text. Stud.* 21(4): 439
- Castle, A., Speranzini, D., Rghei, N., Alm, G., Rinker, D., y Bissett, J. 1998. Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates on North American mushroom farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(1): 133-137
- Chen, C., Chen, J. L., and Lin, T. Y. 1997. Purification and characterization of a xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* for xylooligosaccharide production. *Enzyme Microb. Technol.* 21: 91-96
- Conrad, D., y Noethen, W. 1984. Hydrolysis of ciclodextrins (DP 2-6) by xylanolytic enzymes from *Aspergillus niger*. *Proc. 3rd. Eur. Congr. Biotechnol.* 2: 169-177
- Copa-Patiño, J. L., and Broda P. 1994. A *Phanerochaete chrysosporium* β -D-glucosidase/ β -D-xylosidase with specificity for (1-3)- β -D-glucan linkages. *Carbohyd. Res.* 253:265-275
- Coughlan, M. P., y Hazlewood, G. P. 1993. Review β -1,4-D-xylan-degrading enzymes systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 17: 259-289
- Danielson, R. M., y Davey, C. B. 1973a. Non-nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. *Soil Biol. Biochem.* 5: 495-504
- Danielson, R. M., y Davey, C. B. 1973b. Carbon and nitrogen nutrition of *Trichoderma*. *Soil Biol. Biochem.* 5: 505-515
- Davis, R. H., y Serres, F. J. D. 1970. Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. *Methods in Enzymology.* 17(A): 79-143

- Dekker, R. F. H. 1989. Biodegradation of the hetero-1,4-linked xylans. *ACS Symp. Ser.* 399: 619-629
- Dekker, R. F. H., y Richards, G. N. 1976. Hemicellulases: their occurrence, purification, properties, and mode of action. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 32: 277-352
- Deleyn, F., -Claeyssens, M., Van Beelmen, J., y De Bruyne, C. K. 1978. Purification and properties a β -xylosidase from *Penicillium wortmanni*. *Can. J. Microbiol.* 56: 43-50
- Doraiswamy, G., Grenville, R. K., y Etchells, A. W. 1994. Two-score years of the Metzner-Otto correlaction. *Ind. Eng. Chem. Res.* 33(10): 2253-2258
- Filho, E. X. F., Puls, J., y Coughlan, M. P. 1993. Physicochemical and catalytic properties of low molecular weight endo-1,4- β -D-xylanase from *Myrothecium verrucaria*. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 535-540
- Galindo, E., Torrestiana, B., y García-Rejón, A. 1989. Rheological characterization of xanthan fermentation broths and their reconstituted solutions. *Bioprocess Eng.* 4: 113-118
- Garcia, E., Johnston, D., Whitaker, J. R., y Shoemaker, S. P. 1993. Assessment of endo-1,4-beta-D-glucanase activity by a rapid colorimetric assay using disodium 22,2'-bicichoninate. *J. Food Biochem.* 17: 135-145
- Ghosh, M., Nanda, G. 1994. Purification and some properties of a xylanase from *Aspergillus sydowii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4620-4623
- Graham, D. M. 1992. Consumption patterns: Estimating human exposure to specific substances in the American food supply. *Food Technol.* 45: 118-120
- Grethlein, H. E. 1985. The effect of pore size distribution on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates. *Bio/Technol.* 3:155-160
- Gross, A. 1991. Enzymatic catalysis in the production of novel food ingredients. *Food Technol.* 45: 96-100
- Gunning, B. E. S., y Steer, M. W. 1975. **En:** *Ultrastructure and the biology of plant cells*. Arnold. Londres.
- Hagedorn, D., y Salamone, J. J. 1967. Batch heat transfer coefficients for pseudoplastic fluids in agitated vessels. *Ind. Eng. Chem. Proc. Des. Dev.* 6(4): 469-475
- Hall, J. L. 1983. Cells and their organization: Current concepts. **En:** *Plant physiology*. Vol. 7. Steward, F. C., y Bidwell, R. G. S., Eds. Academic Press, New York. pp. 3-156
- Hall, R. L. 1992. Toxicological burdens and the shifting burden of toxicology. *Food Technol.* 45: 108-112
- Haltrich, D., Preiss, M., y Steiner, W. 1993. Optimization of a culture medium for increased xylanase production by a wild strain of *Schizophyllum commune*. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 854-860
- Harlander, S. K. 1991. Biotechnology – A means for improving our food supply. *Food Technol.* 45: 84-95
- Hartley, R. D., Morrinson, W. H., Himmelsbach, D. S., y Borneman, W. S. 1990. *Phytochem.* 12: 3705-3709

- Hartley, R. D., y Ford, C. W. 1989. **En:** *Plant cell wall polymers: Biogenesis and biodegradation*. Lewis, N. G., y Paice, M. G. Eds. American Chemical Society, New York. pp. 137-145
- Hess, D. 1975. *Plant physiology*. Springer-Verlag, New York. 333 pp.
- Hrmová, M., Biely, P., y Vrsanská, M. 1989. Specificity of cellulase and β -xylanase induction in *Trichoderma reesei* QM 9414. *Arch. Microbiol.* 144: 307-311
- Ison, A.P., y Matthew, G.B. 1997. Measurement of biomass. **En:** *Applied Microbial Physiology*. Rhodes, P.M., y Stanbury, P.F., editores. IRL press at Oxford University press. Oxford, Great Britain. pp. 103-129
- Jain, A. 1995. Production of xylanase by thermophilic *Melanocarpus albomyces* IIS-68. *Process Biochem.* 30(8):705-709
- Jeffries, T. W. 1990. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. *Biodegradation.* 1: 163-176
- Johansson, M. 1988. Pectic enzyme activity of spruce (S) and pine (P) strains of *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 33: 333-349
- Jomha, A. I., Edwards, M. F., y Woodcock, L. V. 1990. New method for predicting the power requirements for mixing shear thickening suspensions. *Chem. Eng. Sci.* 45 (5): 1389-1396
- Joseleau, J. P., Comtat, J., y Ruel, K. 1992. Chemical structure of xylans and their interaction in the plant cell walls. **En:** *Xylans and xylanases*. Visser, J., Beldman, G., Kusters-van Someren, M. A., y Voragen, A. G. J., Eds. Elsevier, Amsterdam. pp. 1-15
- Kalra, M. K., Sidhu, M. S., y Sandhu, D. K. 1986. Partial purification, characterization and regulation of cellulolytic enzymes from *Trichoderma longibrachiatum*. *J. Appl. Bacteriol.* 61: 73-80
- Kato, Y., y Nevins, D. J. 1985. Isolation and identification of O-(5-O-feruloyl-alpha-L-arabinofuranosyl)-(1 \rightarrow 4)-D-xylopyranose as a component of Zea shoot cell-wall. *Carbohydr. Res.* 137:139-150
- Kemblowski, Z., Sek, J., y Budzynski, P. 1988. The concept of a rotational rheometer with helical screw impeller. *Rheol. Acta.* 27(1): 82-91
- Khanna, P., Sundari, S. S., and Kumar, J. N. 1995. Production, isolation and partial purification of xylanases from an *Aspergillus* sp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 242-243
- Khasin, A., Alchanati, I., y Shoham, Y. 1992. Purification and characterization of xylanolytic enzymes from *Thermanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(3): 763-771
- Klein, B., Laskowski, J. S., y Partridge, S. J. 1995. A new viscometer for rheological measurements on settling suspensions. *J. Rheol.* 39 (5): 827-840
- Klembowski, Z., y Kristensen, B. 1986. Rheometry of fermentation liquids. *Biotechnol. Bioeng.* 28: 1474
- Knapp, J. S., y Legg, M. 1986. The effect of different cellulosic growth substrates and pH on the productivity of cellulolytic enzymes by *Trichoderma reesei*. *J. Appl. Bacteriol.* 61: 319-329

- Kulp, K. 1968. Enzymolysis of pentosans of wheat flour. *American Institute of Baking*. 45:339-350
- Kunitz, M. 1946. *J. Biol. Chem.* 164: 563
- Lestan, D., Lestan, M., y Perdih, A. 1994. Physiological aspects of biosynthesis of lignin peroxidases by *Phenerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 606-612
- Lindberg, B., Rosell, K-G., y Svensson, S. 1973. Positions of the O-acetyl groups in birch xylan. *Svensk Papperstidn.* 76: 30-32
- Linko, M., Markkanen, P., y Bailey, M. 1977. Production of cellulases and hemicellulases by *Trichoderma viride*. **En: Proceedings of Bioconversion Symposium.** Ghose, T. K. Ed. Indian Institute of Technology. New Delhi, India. pp: 329-350
- Maat, J., Roza, M., Verbakel, J., Stam, H., Santos da Silva, M. J., Bosse, M., Egmond, M. R., Hagemans, M. L. D., Gorcom, R. F. M., Hessing, J. G. M. Hondel, C. A. M. J. J., y Rotterdam, C. 1992. Xylanases an their application in bakery. **En: Xylans and xylanases.** Visser, J., Beldman, G., Kusters-van Someren, M. A., Vcragen, A. G. J. Eds. Prog. Biotechnol. Vol. 7. Elsevier, Amsterdam. Pp. 349-360
- Mackenzie, C. R., Bilous, D., Schneider, H., y Johnson, K. G. 1987. Induction of cellulolytic and xylanolytic enzymes systems in *Streptomyces* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2835-2839
- Mackey, K. L., Morgan, R. G., y Steffe, J. F. 1987. Effects of shear-thinning behavior on mixer viscometry techniques. *J. Text. Stud.* 18: 231
- Maijala, P., Raudaskoski, M., Viikari, L. 1995. Hemicellulolytic enzymes in P- and S-strains or *Heterobasidion annosum*. *Microbiol.* 141:743-750
- Matte, A., y Forsberg, C. W. 1992. Purification, characterization, and mode of action endoxylanases 1 and 2 from *Fibrobacter succinogenes* S85. *Appl. Environ. Microb.* 58: 157-168
- McCrae, S. I., Leith, K. M., Gordon, A. H., and Wood, T. M. 1994. Xylan-degrading enzyme system produced by the fungus *Aspergillus awamori*: isolation and characterization of a feruloyl esterase and a *p*-coumaroyl esterase. *Enzyme Microb. Technol.* 16: 826-834
- Metzner, A. B., y Otto, R. E. 1957. Agitation of non-newtonian fluids. *AICHE J.* 3(1):3-11
- Meyer, B. S., Anderson, D. B., Bohning, R.H., y Fratianne, D.G. 1973. Introduction to plant physiology. 2d. ed. D. Van Nostrand Co. New York. pp. 565
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31: 426-428
- Miller, S. A. 1992. Novel foods: Safety and nutrition. *Food Technol.* 45: 114-117
- Montgomery, R., y Smith, F. 1956. A review of carbohydrates of wheat and other cereals. *J. Agr. Food Chem.* 4:716-720
- Nagata, S., Hisayuki, T., Hirabayashi, H., y Gotoh, S. 1970. Power consumption of mixing impellers in Bingham plastic liquids. *J. Chem. Eng. Japan.* 3: 237-243
- Nielsen, H. K. 1991. Novel bacteriolytic enzymes and cyclodextrin glycosyl transferase for food industry. *Food Technol.* 44: 102-104

- Nienow, A. W., y Elson, T. P. 1988. Aspects of mixing in rheologically complex fluids. *Chem. Eng. Res. Des.* 66(1): 5
- Northcote, D. H. 1972. Chemistry of the plant cell wall. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 23: 113-132
- Ostrikova, N. A., y Konovalov, S. A. 1983. [Effect of nitrogen sources on cellulase biosynthesis by a mutant strain of *Trichoderma viride* 44]. Artículo en ruso. [Medline]. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 19(4):498-502
- Owens, J. D. 1985. Formulation of culture media for conductimetric assay. Theoretical considerations. *J. Gen. Microbiol.* 131: 3055-3076
- Owens, J. D., y Keddie, R. M. 1969. The nitrogen nutrition of soil and herbage coryneform bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 32: 338-347
- Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. *Ann. Rev. Phytopathol.* 23: 23-54
- Pariza, M. W. 1992. Foods of new biotechnology vs. traditional products: Microbiological aspects. *Food Technol.* 45: 100-102
- Peberdy, J. F. 1994. Protein secretion in filamentous fungi – trying to understand a highly productive black box. *TIBTECH.* 12:50-57
- Pedersen, A. G., Bundgaard-Nielsen, M., Nielsen, J., y Villadsen, J. 1993. Rheological characterization of media containing *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.* 41: 162-164
- Penet, C. S. 1991. New applications of industrial food enzymology: Economics and processes. *Food Technol.* 45: 98-100
- Perlin, A. S., y Suzuki, S. A. 1965. A note on the polysaccharides of wheat flour squeegee. *Cereal Chem.* 42: 199-201
- Poutanen, K. 1988. An α -L-arabinofuranosidase of *Trichoderma reesei*. *J. Biotechnol.* 7: 271-282
- Poutanen, K., y Puls, J. 1988. Characteristics of *Trichoderma reesei* β -xylosidase and its use in the hydrolysis of solubilized xylans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28: 425-432
- Puls, J., Poutanen, K., Schmidt, O., y Linko, M. 1986. α -1,2-glucuronidase in the hydrolysis of hemicellulose. **En: Proc. 3rd. Int. Conf. Biotechnol in the pulp and paper industry.** Ericksson, K. E., y Ander, P. Eds. STFI, Stockholm. Pp. 1-27
- Puls, J., y Poutanen, K. 1989. Mechanisms of enzymic hydrolysis of hemicellulases (xylans) and procedures for determination of the enzyme activities involved. **En: Enzyme systems for lignocellulose degradation.** Coughlan, M. P., Ed. Elsevier, Londres. pp. 151-165
- Puls, J., y Schuseil, J. 1993. Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzyme required for hydrolysis. **En: Hemicelluloses and Hemicellulases.** Coughlan, M. P., y Hazlewood, G. P. Eds. Portland Press, Londres. pp. 1-27
- Radionova, N. A., Tavobilov, I. M., y Bezborodov, A. M. 1983. β -xylosidase from *Aspergillus niger* 15: purification and properties. *J. Appl. Biochem.* 5: 300-312

- Reilly, P. J. Xylanases: structure and function. **En: Trends in the biology of fermentations for fuels and chemicals.** Hollaender, A. E. Ed. Plenum Press, New York. pp. 111-129
- Rieger, F., y Novák, V. 1973. Power consumption of agitators in highly viscous non-Newtonian liquids. *Trans. Inst. Chem. Engrs.* 51: 105-111
- Rifai, M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Papers.* 116: 1-56
- Royer, J. C., y Nakas, J. P. 1990. Interrelationships of xylanase and cellulase induction of *Trichoderma longibrachiatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2535-2539
- Royer, J. C., y Nakas, J.P. 1989. Xylanase production by *Trichoderma longibrachiatum*. *Enzyme Microb. Technol.* 11: 405-410
- Royer, J. C., y Nakas, J.P. 1991. Purification and characterization of two xylanases from *Trichoderma longibrachiatum*. *Eur. J. Biochem.* 202: 521-529
- Sachslehner, A., Nidetzky, B., Kulbe, K. D., y Haltrich, D. 1998. Induction of mannanase, xylanase, and endoglucanase activities in *Sclerotium rolfsii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(2): 594-600
- Saho, W., y Wiegel, J. 1992. Purification and characterization of a thermostable β -xylosidase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *J. Bacteriol.* 174: 5848-5853
- Samson, R. A., y Pitt, J. I. 1990. En: *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification.* Plenum Press, New York. pp. 106-108
- Samuels, G. J. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycol. Res.* 100(8): 923-935
- Sandhu, D. K., y Kalra, M. K. 1982. Production of cellulase, xylanase and pectinase by *Trichoderma longibrachiatum* on different substrates. *Trans. British Mycological Soc.* 79: 409-413
- Sandhu, D. K., y Kalra, M. K. 1985. Effect of cultural conditions on the production of cellulases in *Trichoderma longibrachiatum*. *Trans. British Mycological Soc.* 84: 251-258
- Schilo, D. 1969. *Chémie-Ingr-Tech.* 41: 253
- Schrufer, K., y Lyssek, G. 1990. Rhythmic growth and sporulation in *Trichoderma* species: differences within a population of isolates. *Mycol. Res.* 94(1): 124-127
- Senior, D. J., Mayers, P. R., y Saddler, J. N. 1989. Xylanase production by *Trichoderma harzianum* E58. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 137-142
- Setlerfield, G., y Bayley, S. T. 1961. Structure and physiology of cell walls. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 12: 35-62
- Simpson, H. D., Haufler, U. R., y Daniel, R. M. 1991. An extremely thermostable xylanase from the thermophilic eubacterium *Thermotoga*. *Biochem. J.* 277: 413-417
- Singh, P. C., y Singh, R. K. 1996. Choosing an appropriate bioseparation technique. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 49-58
- Sinner, M., y Puls, J. 1978. Non-corrosive dye reagent for detection of reducing sugars in borate complex ion-exchange chromatography. *J. Chromatography.* 156: 197-204
- Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195: 19-23

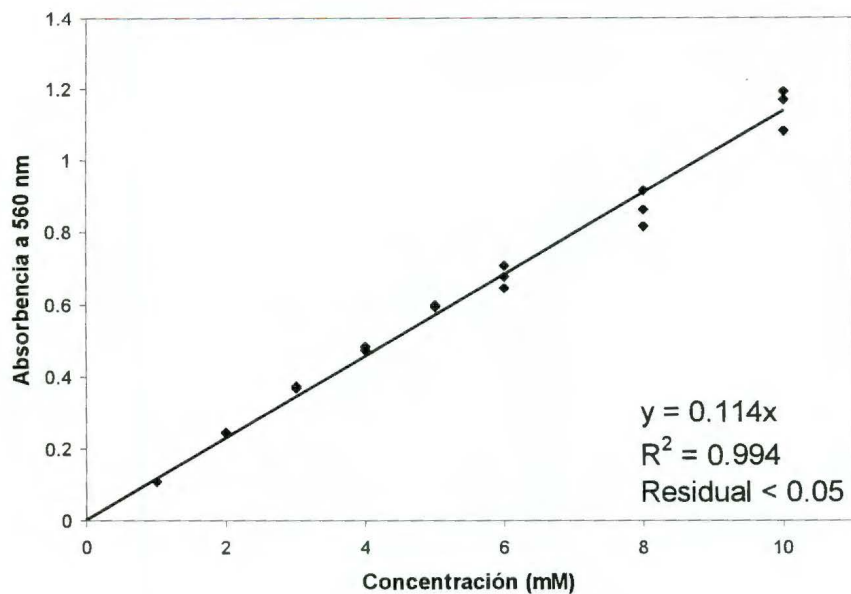
- Srivastava, K. C. 1993. Properties of thermostable hemicellulolytic enzymes from *Thermonospora* strain 29 grown in solid state fermentation on coffee processing solid waste. *Biotech. Adv.* 11: 441-465
- Stewart, J. C., Lester, A., Milburn, B., y Parry, J. B. 1983. Xylanase and cellulase production by *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Biotechnol. Lett.* 5: 543-548
- Stewart, K. K. 1992. Food composition and analysis in the assessment of the safety of food produced by biotechnology. *Food Technol.* 45: 103-107
- Stone, J. E., Scallan, A. M., Donefer, E., y Ahlgren, E. 1969. Digestibility as a simple function of a molecular of a similar size to a cellulase enzyme. *Adv. Chem. Ser.* 95: 219-241
- Sunna, A., Puls, J., y Antranikian, G. 1996. Purification and characterization of two thermostable endo-1,4- β -D-xylanases from *Thermotoga thermarum*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 24: 177-185
- Sunna, A., y Antranikian, G. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 17(1): 39-67
- Thaker, A. J., Ray, R. M., y Patel, H. C. 1986. Xylanase production by the fungus *Trichoderma longibrachiatum* and enhancement in enzymic saccharification of cellulosic wastes. *Ind. J. Exp. Biol.* 24: 659-662
- Timell, T. E. 1964. Wood hemicelluloses. I. *Adv Carbohydr Chem.* 19:247-302
- Törrönen, A., Mach, R. L., Messner, R., Gonzalez, R., Kalkkinen, N., Harkki, A., y Kubicek, C. P. 1992. The two major xylanases from *Trichoderma reesei*: characterization of both enzymes and genes. *Biotechnol.* 10:1461-1465
- Tuohy, M. G., y Coughlan, M. P. 1992. Production of thermostable xylan-degrading enzymes by *Talaromyces emersonii*. *Biores. Technol.* 39: 131-137
- Uffen, RL. 1997. Xylan degradation: a glimpse at microbial diversity. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19: 1-6
- Van Doorslaer, E., Kersters-Hilderson, H., y De Bruyne, C. K. 1985. Hydrolysis of β -D-xylooligosaccharides by β -D-xylosidase from *Bacillus pumilus*. *Carbohydr. Res.* 140: 342-346
- van Oort, M., van Straaten, F., y Laane, C. 1995. Pentosans and pentosanases in bread making. *Internat. Food Ingredients.* 2: 23-27
- Venegas Barrera, L. M. 1998. Producción y purificación de β -mananasas por fermentación sólida de la borra de café y copra con *Aspergillus oryzae*. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Querétaro. Qro., México.
- Viikari, L. Kantelinen, A., Buchert, J., y Puls, J. 1994. Enzymatic accessibility of xylans in lignocellulosic materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42(1): 124-129
- Wang, P., Mason, J. C., y Broda, P. 1993. Xylanases from *Streptomyces cyaneus*: Their production, purification and characterization. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1987-1993
- Weinstein, L., y Albersheim, P. 1979. Structure of plant cell walls. *Plant Physiol.* 63: 425-432

- Welser, J. R. 1991. An industrial perspective on biotechnology issues. *Food Technol.* 45: 102-109
- Whistler, R. L., y Richards, E. L. 1970. Hemicelluloses. **En: The Carbohydrates.** Vol. 2a. Pigman, W. y Horton, D., Eds. Academic Press, New York. pp. 447-469.
- Wilkie, K. C. B. 1983 Hemicellulose. *Chemtech.* 13: 306-319
- Winterhalter, C., y Liebl, W. 1995. Two extremely thermostable xylanases of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1810-1815
- Wiseman, A. 1996. Novel biocatalysts will work even better for industry. *J. Chem. Educ.* 73: 55-59
- Wong, K. K. Y., Deverell, K. F., Mackie, K. L., Clark, T. A., y Donaldson, L. A. 1988. The relationship between fiber porosity and cellulose digestibility in steam-exploded *Pinus radiata*. *Biotechnol Bioeng.* 31:447-456
- Wong, K. K. Y., Tan, L. U. L., y Saddler, J. N. 1988. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol. Rev.* 52: 305-317
- Yap, Y. C., Patterson, W. I., y Carreau, P. J. 1979. Mixing of viscoelastic fluids with helical ribbon impellers. Part III. Non-Newtonian fluids. *AIChE J.* 25(3): 516-521
- Zimmermann, W., Winter, B., y Broda, P. 1988. Xylanolytic enzyme activities produced by mesophilic and thermophilic actinomycetes grown on graminaceous xylan and lignocellulose. *FEMS Microbiol. Lett.* 55: 181-186
- Zinbo, M., y Timell, T. E. 1965. The degree of branching of hardwood xylans. *Svensk Papperstidn.* 68: 647-662
- Zinbo, M., y Timell, T. E. 1967. Studies on a native xylan from Norway spruce (*Picea abies*). I. Isolation and constitution. *Svensk. Papperstid.* 70: 695-701

8. Anexos

A.1 Curvas de calibración de xilosa con las variantes *a* y *b* del reactivo de Sinner y Puls (1978)

(a)



(b)

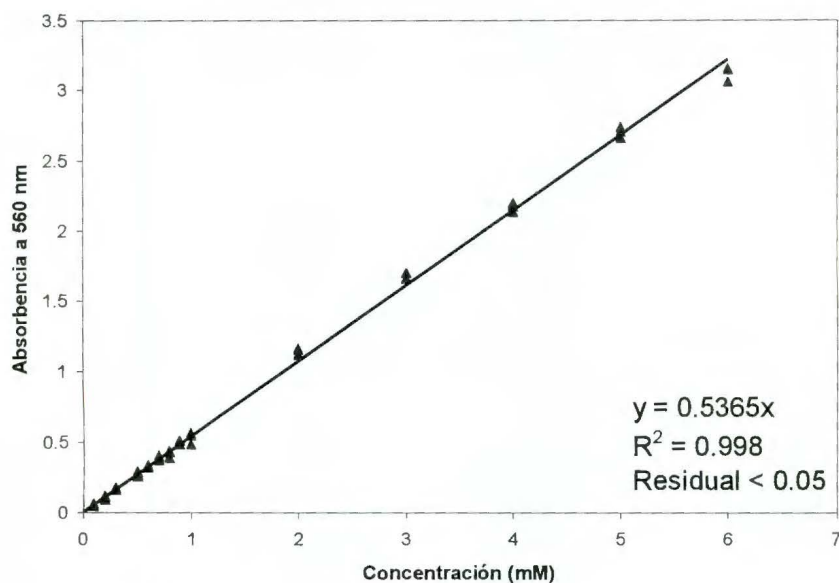


Figura A.1. Curvas de calibración de D-(+)-xilosa en una solución amortiguadora de acetatos-HCl (50mM, pH 4.5) con las variantes (a) y (b) del reactivo de Sinner y Puls (1978). La absorbencia de las muestras se leyó en un espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer Lambda 2S a 560 nm, por triplicado.

A.2 Curva de calibración de BSA con el reactivo de Bio-Rad

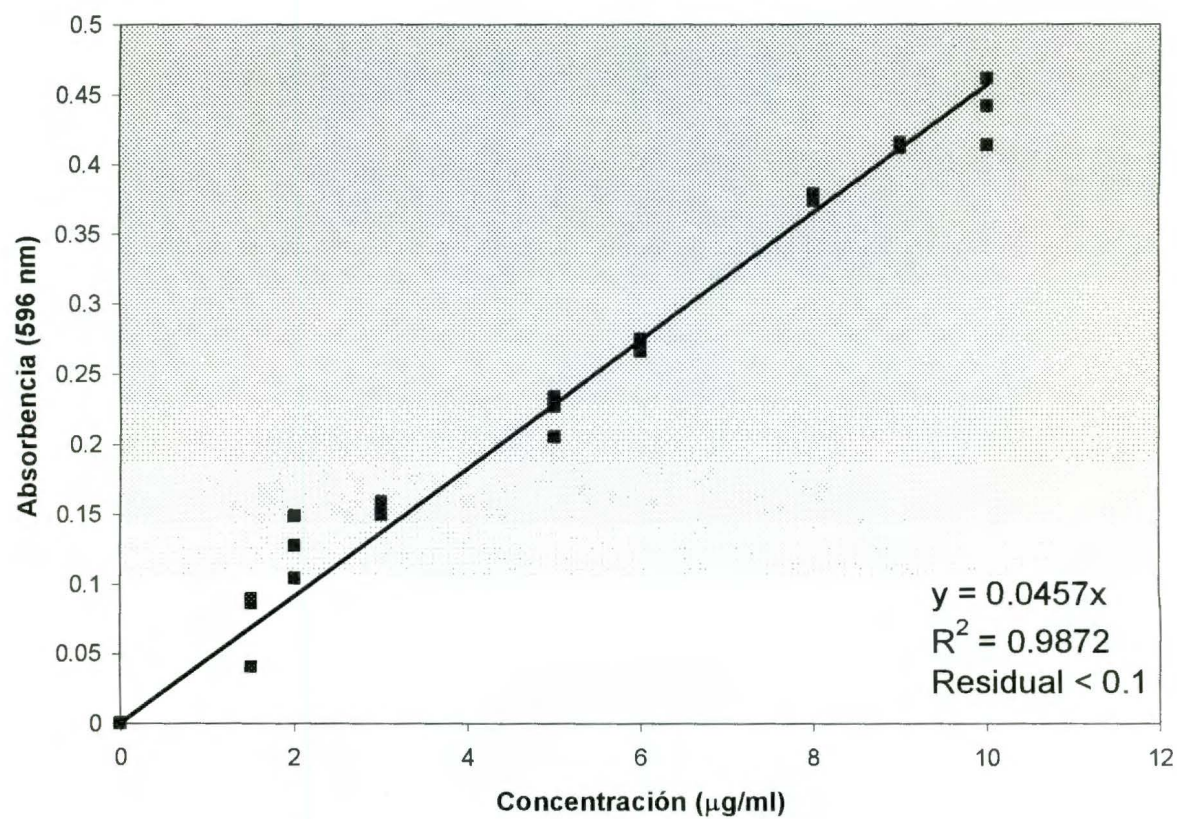


Figura A.2. Curva de calibración de BSA en solución salina con el reactivo de Bio-Rad. Las absorbancias de las muestras se leyó en un espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer Lambda 2S a 596 nm, por triplicado. Límite de detección: 1.5 µg/ml.

A.3 Calibración del reómetro Haake RV20-M5 modificado con un sensor helicoidal

El primer paso en la caracterización del sistema, fue determinar cuales eran los factores de forma a utilizar. Para esto, se corrieron experimentos con glicerol, un fluido newtoniano, y se compararon los resultados obtenidos con el sensor helicoidal y con un sistema de cilindros concéntricos, MV-DIN (Haake), de diámetro semejante ($d_{MV-DIN} = 0.0387$ m), al diámetro equivalente del sensor helicoidal ($d_e = 0.0361$ m). Los datos de la deformación controlada del glicerol se registraron como porcentaje de velocidad de deformación (% D), y como porcentaje de esfuerzo (% τ). Los ensayos se realizaron a 30 ± 0.5 °C, por triplicado. Se evaluó el comportamiento del glicerol a las siguientes velocidades: 5, 8, 14, 23, 40, 65, 107, 180, 300 y 500 rpm, se tomaron al menos 20 lecturas en cada uno de los pasos.

Los valores de % D y % τ , se transformaron a velocidad rotacional (N , en rps) y torque (T , en N·m) utilizando las ecuaciones (4.3) y (4.4), respectivamente. La potencia consumida (P) y el número de potencia (N_p) se calcularon utilizando las ecuaciones (4.5) y (4.6), respectivamente. El número adimensional de Reynolds (R_e) se definió como:

$$R_e = \frac{d^2 N \rho}{\mu} \quad (\text{A.1})$$

Donde: d , es el diámetro equivalente del sensor helicoidal (m); ρ , es la densidad del fluido analizado ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$); y μ , es la viscosidad newtoniana ($\mu = 0.40 \pm 0.01$ Pa·s). La viscosidad del glicerol se determinó utilizando el sistema de cilindros concéntricos (MV-DIN, Haake).

Cuando se utilizan dispositivos de mezclado para estimar viscosidades de proceso, es importante tomar en cuenta que la potencia consumida es directamente proporcional a la velocidad de agitación sólo en régimen de flujo laminar

(normalmente $R_e < 10$). En régimen de flujo laminar, cuando se gráfica en coordenadas logarítmicas el N_p contra el R_e se obtiene una recta con pendiente igual a -1 . Por lo tanto, se procedió a graficar en coordenadas logarítmicas los números adimensionales, N_p y R_e , obtenidos de la deformación del glicerol con el sensor helicoidal (fig. A.3)

Se obtuvo una pendiente igual a -0.99 ± 0.01 , aún cuando el R_e máximo registrado fue de 33 (fig. A.3). Con base en estos resultados, se puede afirmar que en todo momento se trabajó bajo régimen de flujo laminar. Para fluidos newtonianos en estas condiciones, se cumple la siguiente relación:

$$N_p = k_p R_e^{-1} \quad (\text{A.2})$$

Donde: k_p , es una constante adimensional que es igual al producto de N_p por R_e . El valor de k_p , o constante de potencia, depende de la geometría utilizada y de las propiedades reológicas del fluido en estudio. Substituyendo los valores de N_p y R_e en (A.2), se obtiene el valor de la k_p newtoniana del sistema que se utilizó en este trabajo: $k_p = 162.79 \pm 0.77$. Este valor de k_p no presenta diferencias significativas con el valor observado de $k_p = 162.55 \pm 1.54$, para un sistema similar acoplado a un reómetro Haake RV20-CV100 (Brito y col., 1998).

Una vez hecho lo anterior, se procedió a estimar los factores de forma adimensionales para el sensor helicoidal. Para esto, los valores de $\%D$ y $\%\tau$, se transformaron a velocidad de deformación (γ , en s^{-1}) y esfuerzo cortante (τ , en Pa) utilizando los factores de forma del sistema de cilindros concéntricos:

$$\gamma = M \cdot \%D = 6.45 \cdot \%D \quad (\text{A.3})$$

$$\tau = A \cdot \%\tau = 3.01 \cdot \%\tau \quad (\text{A.4})$$

Los valores obtenidos se compararon contra las lecturas obtenidas con el sistema de cilindros concéntricos, observándose que los valores de τ obtenidos con el sensor

Impulsor helicoidal

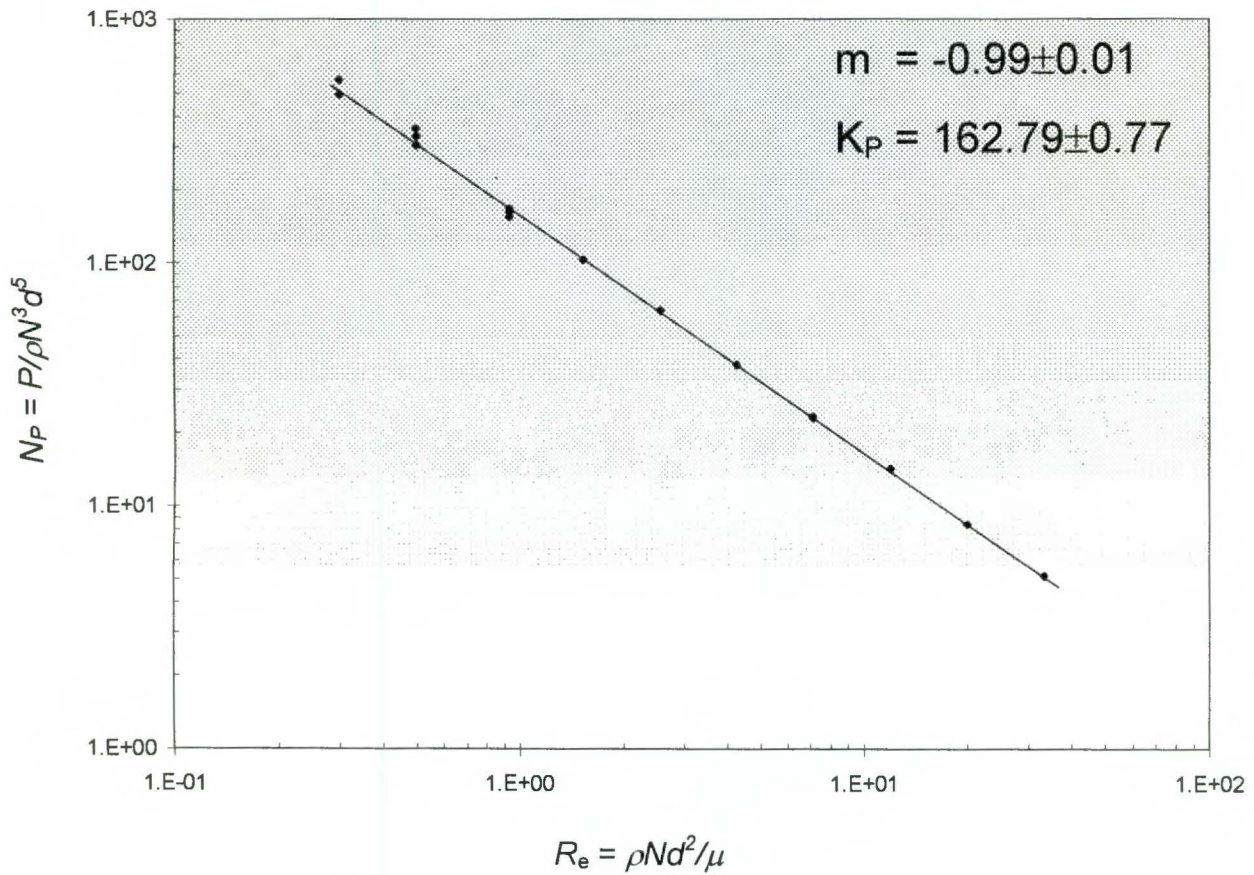


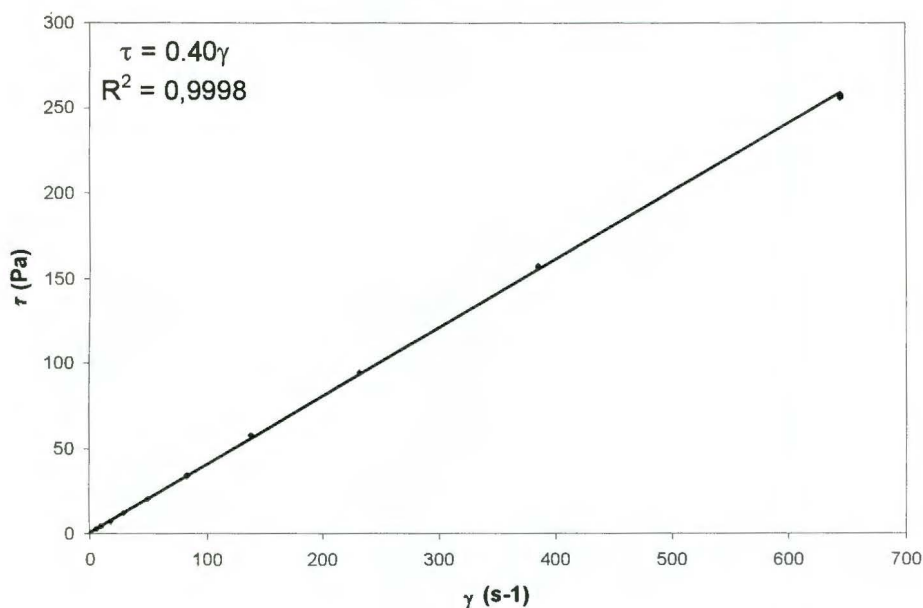
Figura A.3. Curva de potencia newtoniana del impulsor helicoidal. El fluido analizado es glicerol a 30 ± 0.5 °C. Los puntos en la gráfica representan la media aritmética de tres réplicas. Coeficiente de variación $\leq 5\%$.

helicoidal, diferían de los obtenidos con los cilindros por un factor de 10. Por lo que, se hizo la corrección correspondiente a la ec. (A.4), quedando como sigue:

$$\tau = A \cdot \% \tau = 30.1 \cdot \% \tau \quad (\text{A.5})$$

Suponiendo que el impulsor helicoidal se comporta aproximadamente como un cilindro sólido con un diámetro igual a su diámetro equivalente, y que la velocidad de deformación promedio en las proximidades del impulsor es igual a la velocidad de deformación producida por los cilindros concéntricos, se procedió a calcular nuevamente el valor de γ_e utilizando la ec. [A.3], (fig. A.4). Como se observa en la figura A.4, no hay diferencias significativas entre la viscosidades newtonianas obtenidas con el sistema convencional y con el sensor helicoidal.

MV-DIN



Helicoidal

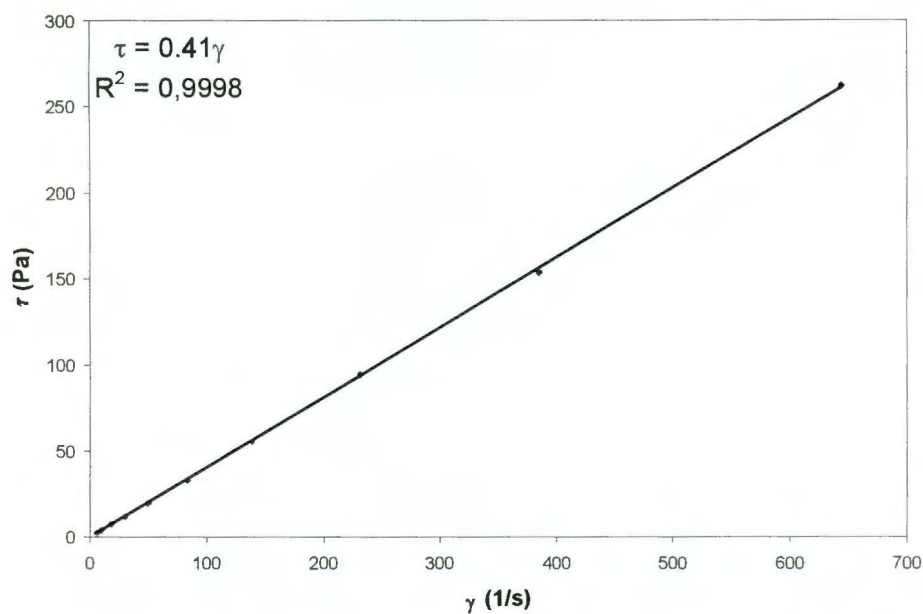


Figura A.4. Calibración del reómetro Haake RV20-M5, modificado con un sensor helicoidal. Se presenta los resultados obtenidos de la deformación de glicerol a 30 ± 0.5 °C, con los factores de forma corregidos [ecs. (A.3) y (A.5)]; y se comparan contra las lecturas de un sistema de cilindros concéntricos (MV-DIN, Haake). El valor de la viscosidad newtoniana (μ , en Pa·s), es igual al valor de la pendiente de la recta que se obtiene mediante una regresión lineal de los datos obtenidos en el reómetro. $R^2 \geq 0.99$. Los puntos en la gráfica representan la media del comportamiento de tres réplicas. Coeficiente de variación para ambos sistemas $\leq 5\%$.