

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA**

**FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**DEPARTAMENTO ACADEMICO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA E**

**INGENIERIA DE ALIMENTOS**



**“PRODUCCIÓN DE CELULOSA POR FERMENTACIÓN SUMERGIDA  
UTILIZANDO *Trichoderma reesei* y FIBRA DE PALMA ACEITERA (*Elaeis  
guineensis*)”**

**TESIS**

**Para Optar el Título de:**

**INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**Presentado por:**

**GUILLERMO CONDOR PAUCAR**

**TINGO MARIA – PERÚ**

**2004**

664.024C6

Cóndor Paucar, G.

Producción de celulasa por fermentación sumergida utilizando *Trichoderma reesei* y fibra de palma aceitera (*Elaeis guineensis*) – Tingo María, 2004.

76h.; Fig.; 30cm.; 61 ref., Resumen (En, Es)

Tesis (Ing. Ind. Alimentarias)

Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María (Huánuco, Perú).

CELULASA/FERMENTACIÓN SUMERGIDA/PROPIEDADES  
FISICOQUÍMICAS/FIBRA/ELAEIS GUINEENSIS/ACTIVIDAD  
ENZIMÁTICA/CONSUMO OXÍGENO/pH/GLUCOSA/FERMENTACIÓN/  
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS.

AGRIS Q02



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

Tingo Maria

FACULTAD DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado que suscriben, reunidos en acto público el 05 de marzo del 2004, a horas 05:00 p.m. en el Auditorium de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en la ciudad de Tingo Maria, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco, para calificar la tesis presentado por el Bachiller en Ciencias Industrias Alimentarias: **Guillermo CONDOR PAUCAR**.

**"PRODUCCIÓN DE CELULOSA POR FERMENTACIÓN SUMERGIDA UTILIZANDO *Trichoderma reesei* Y FIBRA DE PALMA ACEITERA (*Elaeis guineensis*)"**

Después de haber escuchado la sustentación, las respuestas a las preguntas formuladas, lo declaran aprobado con el calificativo de **MUY BUENO**, en consecuencia el Bachiller: **Guillermo CONDOR PAUCAR**, queda apto para recibir el título de **Ingeniero en Industrias Alimentarias** del Consejo Universitario, de conformidad con el Art. 22° de la Ley Universitaria 23733; los artículos 44° y 45° del Estatuto y los artículos 95° y 96° del Reglamento General de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo Maria, 03 de mayo del 2004

  
Ing. M. Sc. Raul Natividad Ferrer  
Presidente



  
Dr. Wilson Castillo Soto  
Vocal

  
Ing. Manuel Nogue Alvarez  
Vocal

  
Ing. M. Sc. Pedro F. Pelaez Sánchez  
Asesor

## DEDICATORIA

A Dios

*Autor y consumador de nuestra fé, que en su sublime amor y gracia infinita nos protege a lo largo de nuestro caminar por este mundo y nos dá la fortaleza necesaria para seguir adelante.*

*A El le pido que acreciente cada día en mí la vocación de servicio e ilumine mi entendimiento para comprender y hacer comprender que El es la luz y la vida.*

Con eterna gratitud y profundo amor a

mis padres:

Antonio y Bertha (+)

De quién siempre estaré orgulloso, porque de

ellos recibí amor, comprensión, confianza y

apoyo económico para la culminación del

presente trabajo.

Porque ellos caminaron conmigo durante

Años de mis estudios, con la perseverancia

resistencia y sin doblegar a las dificultades

hasta lograr el objetivo trazado.

Con inmenso cariño a mis hermanos:

Benigno, Marcelino, Juan, Matilde y

Delia por su estímulo de superación,

apoyo económico y comprensión en todo

momento.

Con profundo amor a:

Kety y Katsumy

Por su cariño, comprensión, apoyo

Incondicional para la culminación

del presente trabajo.

Para que este trabajo constituya una  
fuente de inspiración en ascender  
gradualmente las montañas de la  
naturaleza de la vida.

## AGRADECIMIENTOS

Al Mtblgo. M.Sc. César López López, Co – asesor de la presente tesis por su continuo asesoramiento en la realización del presente trabajo de investigación.

Al Ing. M.Sc. Pedro Peláez Sánchez, Asesor de esta tesis por la orientación profesional durante la ejecución del presente trabajo de investigación.

A la Empresa de Palmas del Espino S. A., por la proporción de fibra de palma aceitera para el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A la Universidad de Valencia (España) por la proporción del material biológico para el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Al Dr. Wilson Castillo Soto, por la orientación profesional durante la ejecución del presente trabajo de investigación.

A mis padres: Antonio, Bertha y hermanos, por el apoyo económico para el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A mis amigos que me colaboraron de una y otra manera para la culminación del presente trabajo de investigación, dándome su apoyo: Ing. Carlos Albornoz, Ing Juan Villanueva Tiburcio, Ing M.Sc. Elizabeth Ordóñez, y a la familia Travezaño Rivera

## INDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN -----	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA -----	3
A. ANTECEDENTES SOBRE TRABAJOS REALIZADOS EN LA OBTENCIÓN DE CELULASA -----	3
B. COSECHA Y POSCOSECHA DE LA PALMA ACEITERA -----	4
1. Composición química del fruto de palma aceitera -----	4
C. RESIDUOS -----	6
1. Residuos inorgánicos -----	6
2. Residuos orgánicos -----	7
D. CELULOSA -----	7
E. MICROORGANISMOS INDUSTRIALES -----	8
F. ORIGEN DE LAS CEPAS INDUSTRIALES -----	9
G. FERMENTACIÓN -----	10
1. Requerimientos para una fermentación rentable -----	10
H. BIORREACTORES -----	11
1. Biorreactores discontinuos -----	11
2. Biorreactores continuos -----	12
3. Biorreactores semicontinuos -----	12
I. APLICACIONES Y VENTAJAS -----	12
J. METABOLISMO MICROBIANO -----	13
1. Metabolitos primarios -----	13

2.	Metabolitos secundarios -----	13
K.	ENZIMAS -----	14
1.	Celulasas -----	14
2.	Factores que afectan la actividad enzimática -----	15
3.	Cinética enzimática -----	15
4.	Actividad enzimática -----	16
III.	MATERIALES Y METODOS -----	17
A.	LUGAR DE JECUCIÓN -----	17
B.	MATERIA PRIMA E INSUMOS -----	17
C.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL -----	17
1.	Caracterización de la fibra de palma aceitera -----	17
2.	Acondicionamiento de fibra de palma aceitera -----	18
3.	Estudio de fermentación -----	19
4.	Evaluación de la actividad enzimática de la celulasa -----	22
D.	DISEÑO EXPERIMENTAL -----	24
E.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO -----	25
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES -----	26
A.	CARACTERIZACION DE LA MATERIA PRIMA -----	26
B.	PROCESO DE FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE CELULASA -----	27
1.	Consumo de oxígeno respecto a la actividad enzimática -----	27
2.	Evaluación de pH en el proceso de fermentación -----	29

3. Evaluación de glucosa durante el proceso de fermentación -----	31
C. CUANTIFICACIONDE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA -----	33
V. CONCLUSIONES -----	40
VI. RECOMENDACIONES -----	41
VII. BIBLIOGRAFÍA -----	42
VIII. ANEXO -----	51

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadros</b>	<b>Página</b>
1. Composición química de la pulpa y nuez de la palma aceitera -----	5
2. Composición del racimo y de los frutos de palma aceitera -----	5
3. Composición química de la fibra de palma aceitera -----	26
4. Actividad enzimática por el sustrato e inóculo -----	34
5. Optimización de las concentración de los factores sustrato e inóculo ----	37

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figuras</b>	<b>Página</b>
1. Diagrama para el acondicionamiento de la fibra de palma aceitera -----	19
2. Flujograma para la producción biotecnológica de la celulasa -----	20
3. Flujograma para la evaluación de la actividad celulolítica -----	23
4. Diseño experimental para la determinación de la actividad enzimática -----	25
5. Relación de la curva de la actividad enzimática con oxígeno -----	28
6. Relación de las curvas de la actividad enzimática con pH -----	30
7. Relación de las curvas de la act. enz. con variación de glucosa -----	32
8. Curva de interacción de los sustratos en los diferentes niveles de inóculo--	36
9. Curva de interacción de los inóculos en los diferentes niveles de sustrato--	36
10. Superficie de respuesta para la máxima actividad enzimática -----	38
11. Contorno de la estimación de la actividad enzimática -----	39

## RESUMEN

El presente trabajo se desarrolló en los ambientes de la Universidad Nacional Agraria de la Selva en la ciudad de Tingo María situado a 650 m.s.n.m., con una humedad relativa promedio de 80% y a una temperatura promedio de 25°C, consistió en la producción de celulasa empleando como material biológico *Trichoderma reesei*, de la Colección Española de Cultivo Tipo (CECT), y la fibra de palma aceitera (*Elaeis guineensis*) como sustrato procedente de Santa Lucía Uchiza, de la Empresa Palmas del Espino S. A., la cual es un deshecho después de la extracción de aceite.

Los objetivos establecidos fueron: caracterizar fisicoquímicamente la fibra de palma aceitera así como evaluar la fibra de la palma aceitera como sustrato para la producción de celulasa a partir del *Trichoderma reesei*, utilizando biorreactores tipo air lift.

Para desarrollar el estudio se consideraron las siguientes etapas: caracterización y acondicionamiento de la fibra; estudio de la fermentación, evaluación de la actividad enzimática de la celulasa, las variaciones de los parámetros durante el proceso de fermentación sumergida fueron: oxígeno disuelto, pH y consumo de glucosa.

Como resultado de la investigación se logró caracterizar la fibra de palma aceitera obteniéndose una humedad de 10,14 %; ceniza 5,22 %; grasa 4,57 %; proteína 2,51 %; fibra 40,18 %; carbohidratos 37,38 %; y pH 5,6.

Los resultados de las evaluaciones de cada experimento, durante el proceso de fermentación sumergida se analizaron con Diseño Completo al Azar con arreglo factorial. utilizándose la prueba de Duncan ( $p < 0.05$ ).

La fibra usada sirve como sustrato para la producción de celulasa, donde la concentración óptima fue de 10 % (v/v) de inóculo; 50g/L de fibra de palma aceitera, obteniéndose actividad enzimática de 0,0587 IU/ml; presentando al final de la fermentación un pH de 4,3; oxígeno 4,9 mg/L y glucosa 0,079 mg/ml, a los 120 horas de proceso de fermentación a una temperatura promedio de  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ .

## SUMMARY

The present research is accomplished at the university: Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María, Perú, situated at 650 meter of high sea level, with average humidity relative of 80% and temperature average of 25°C, this work consisted to produce cellulase with biology material *Trichoderma reesei* of Spanish Collection Type Cult, and palm tree fiber (*Elaeis guineensis*) as sustrate from Santa Lucia, Uchiza, Factory Palmas del Espino S. A. which is the last material after the oil extraction.

The objectives were characterizing physiochemical the fiber of palm tree as sustrate for cellulase production with *Trichoderma reesei* with reactor type air lift.

For develop the study is was considere the following stages: characterization and conditioning of fiber; fermentation study, evaluation of enzyme activity of celullase, variation of parameters during the processing of submerge fermentation were: oxygen dissolving, pH and glucose consumption as result of the research was achieve characterization of palm tree fiber with the following results: humidity 10,14%; ash 5,22%; fat 4,57%; protein 2,51%; carbohydrates 37,38% and pH 5,6.

The results of evaluations of each experiments during the processing of sumerge fermentation were analyzed with randomized complete block design with factorial experiments with Duncan test ( $p < 0.05$ ), the fiber be used as sustrate for cellulase production with optime concentration of 10% (v/v) of inocule 50 g/L of fiber of palm tree enzyme activity of 0,0587 IU/mL, with pH of 4,3 at the end of fermentation,

oxygen 4,9 mg/L and glucose 0.079 mg/mL at 120 heures of fermentation processing with average temperature  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ .

## I. INTRODUCCIÓN

La Palma Aceitera, (*Elaeis guineensis*), es un cultivo tropical perenne que es cultivado por su contenido en aceite, se ha estimado que anualmente el déficit de aceite y grasas en el país es de 200 mil TM, esto quiere decir que hay una demanda insatisfecha, por lo tanto se está promoviendo el cultivo en la Amazonía peruana.

De acuerdo a la composición del fruto de la palma aceitera el 37 % del fruto es aceite, el 8 % palmiste y el 31,40 % del peso total del fruto es deshecho, constituido por cáscara y fibra, estos residuo no tiene ningún aprovechamiento. Considerando entonces que nuestro país no está exento de la acumulación y pérdida de los desechos celulolíticos generados anualmente a causa de las actividades agrícolas, forestales industriales (madereras, papeleras) y municipales, lo que constituye una constante contaminación ambiental, la hidrólisis enzimática mediante el uso de celulasa o la degradación por microorganismos celulolíticos sería una alternativa para convertir estos residuos de tal forma que podamos obtener provecho de ellos.

La hidrólisis enzimática por microorganismos, especialmente por *Trichoderma reesei*, es una alternativa para el rehúso de la fibra; se consideró necesario, probarla como sustrato, para la producción de celulasa, con el fin de definir sus perspectivas en la degradación de sustratos celulolíticos para la producción de metabolitos de interés industrial.

En el presente trabajo se planteó la hipótesis de que la fibra de palma aceitera puede servir como fuente de carbono para el crecimiento de *Trichoderma*

*reesei*, entonces es posible la producción de celulasa por fermentación sumergida. Por lo tanto se consideraron los siguientes objetivos:

- ◆ Caracterizar fisicoquímicamente la fibra de palma aceitera (*Elaeis guineensis*).
- ◆ Evaluar la fibra de la palma aceitera como sustrato para la producción de celulasa a partir del *Trichoderma reesei*.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### A. ANTECEDENTES SOBRE TRABAJOS REALIZADOS EN LA OBTENCIÓN DE CELULASA

Levin y Forchiassin (1995), investigaron la capacidad celuiolítica de *Trichoderma* sp. en relación con la variación de las fuentes carbonadas y nitrogenadas presentes en el medio de cultivo. Entre las fuentes de carbono, la celulosa cristalina, la celobiosa y una mezcla de CMC y celobiosa resultaron en la mayor producción enzimática.

Abrha & Gashe (1992), investigaron los efectos de carbono, nitrógeno y surfactante que tuvieron sobre la producción del complejo celulasa, de la misma forma reportaron los efectos de pH y temperatura en la producción de celulasa.

Ali & Sayed (1992), estudiaron la regulación de la síntesis del complejo celulasa de *Aspergillus terreus* GTP 826, que fue inducido por glucosa, xilosa y celobiosa hasta 5 mg/ml, encontrado que por encima de ésta concentración reprime la síntesis enzimática.

Stutzenberger (1972) estudió la actividad celuiolítica de *Thermomonospora curvata* y sus requerimientos nutricionales para la producción de celulasa. Obtuvo que el uso de un medio mínimo de sales minerales para la producción de celulasa incrementó 11 veces la actividad extracelular en comparación con un medio previamente usado con extracto de levadura. Además obtuvo que con las fibras de algodón se logró la más alta producción de celulasas, en comparación con otras fuentes solubles e insolubles de carbohidratos.

Madamwar & Patel (1992), investigaron un sistema celulasa con alta actividad hidrolítica y  $\beta$  – glucosidasa obtenido por *Trichoderma reesei* QM 9414 y *Aspergillus Níger*. El cultivo fue desarrollado en medios con bagazo, mazorcas de maíz y aserrín como sustrato celulósicos, resultando el cultivo con bagazo con la mayor actividad y el cultivo con aserrín el de menor actividad.

## **B. COSECHA Y POSCOSECHA DE LA PALMA ACEITERA**

Según Cenipalma (1998), COCEPU (1996), Robles (1991) y Hartley (1983), la cosecha se efectúa con el objeto de obtener la calidad máxima de aceite de palma, que juzgada por el contenido de ácidos grasos libres sea aceptada para el comprador. Los frutos aun no maduros contienen menos aceite que los frutos maduros; los frutos sobre maduros proporcionan aceite con un contenido mas alto de ácidos grasos libres.

Hartley (1983), Canche (1981), mencionan que el control de los racimos es uno de los mas rigurosos ya que la cantidad y la calidad del aceite y palmiste se hace en el campo y no en la fábrica, esto constituye una ley natural, para tener eficiencia en la extracción, no importa de que modo se procese en la fábrica, la calidad del aceite no puede mejorar si la fruta no es de buena calidad.

### **1. Composición química del fruto de palma aceitera.**

En el siguiente cuadro se muestran los resultados de composición química de la pulpa y núez del fruto de palma.

Asimismo en el cuadro 1, se indica la composición química de la palma aceitera (*Elaeis guineensis*).

**Cuadro 1. Composición química de la pulpa y nuez de la palma aceitera.**

<b>Componentes</b>	<b>Pulpa (%)</b>	<b>Nuez (%)</b>
Humedad	5,43	6,08
Extracto graso	76,59	7,30
Proteínas totales	01,13	47,14
Azúcares totales	13,13	14,10
Fibras	01,88	03,37
Cenizas	00,61	2,79
Cáscaras	---	17,40

Fuente: Vélez de Villa (1991).

**Cuadro 2. Composición del racimo y los frutos de la palma aceitera**

<b>Componente</b>	<b>Racimo (%)</b>	<b>Fruto (%)</b>
♦ Racimo fresco	100	---
♦ Escobajo	36	---
♦ Frutos	64	---
▪ Aceite	---	37,0
▪ Palmiste	---	8,0
▪ Cáscaras	---	14,2
▪ Fibras	---	17,2
▪ Agua	---	23,6

Fuente: Vélez de Villa (1991).

La composición de los racimos y frutos de la palma aceitera. El conocimiento de las cantidades porcentuales de la composición de un racimo con frutos frescos, permite determinar los volúmenes de sus productos y los desechos obtenidos como resultados del procesamiento y los resultados se muestra en el Cuadro 2. (Vélez de Villa, 1991).

### **C. RESIDUOS**

Según el Organismo Panamericana de la Salud (1999), los residuos son partes que quedan de un todo, de un cuerpo, luego que han sufrido un proceso de transformación natural o artificial que puede modificar o no sus características físico – químicas y estructurales iniciales. En términos estrictamente físicos, los residuos son consecuencia de la transformación de la materia.

Grundey (1982), menciona en el caso específico de los residuos agrícolas, los define como todo aquel material sobrante o desperdiable generado en un establecimiento agropecuario. La clasificación permite establecer dos categorías de residuos: inorgánicos o abiógenos y orgánicos o biógenos.

#### **1. Residuos inorgánicos**

Según OPS (1999), incluye todos aquellos residuos de origen mineral y sustancias o compuestos sintetizados por el hombre. Dentro de esta categoría se incluyen habitualmente metales, plásticos, vidrios, etc. Desechos provenientes de agro tóxicos, agroquímicos,

fitosanitarios y agro veterinarios, son en su mayoría de origen sintético y con un gran efecto residual.

## **2. Residuos orgánicos**

Según OPS (1999), que son todos aquellos que tienen su origen en los seres vivos, animales o vegetales. Incluye una gran diversidad de residuos que se originan naturalmente durante el "ciclo vital", como consecuencia de las funciones fisiológicas de mantenimiento y perpetuación o son producto de la explotación por el hombre de los recursos bióticos.

- **Industria aceitera y granos oleaginosos**

Según OPS (1999), los residuos generados son diversos: cáscara, fibras, efluentes líquidos, en general son residuos que contienen 30 a 50% de proteína, 15 a 30% de celulosa y bajo contenido en agua. El residuo más conocido en esta industria es la "torta", generado por la extracción de aceite a la que se someten los granos en la prensa hidráulica.

## **D. CELULOSA**

Atlas & Bartha (1980); Fan *et al.* (1980); Ladisch *et al.* (1983); Pourquie & Vandecasteele (1985), mencionan que la celulosa es un hidrato de carbono consistente en su forma nativa de una cadena lineal de unidades de glucosa con enlaces glucosídicos  $\beta$ , 1 – 4. Se ha calculado que el peso molecular mínima varía de 50000 D a 25000000 D, que es el equivalente de 300 a 15000 restos de glucosa. El análisis por difracción de rayos X indica que la celulosa presenta una estructura cristalina altamente

ordenada, constituyendo fibras elementales o micro fibras de 500 a 1000 angstroms de longitud.

Según Quinteros (1993), la celulosa es el material orgánico más abundante en la tierra, renovable por naturaleza y de la cual se pueden obtener muy diversos productos, como compuestos primarios de la naturaleza y en muchos casos considerados desperdicios, su utilización presenta ventajas económicas y ecológicas.

#### **E. MICROORGANISMOS INDUSTRIALES**

Según Godia (1998), los microorganismos industriales son especialistas metabólicos capaces de producir específicamente determinados metabolitos y con gran rendimiento. Con el fin de lograr esta elevada especialización, las cepas industriales están modificadas genéticamente, por mutación o por recombinación. -

Prescott *et al.* (1999), mencionan que éstos microorganismos pueden presentar muchas propiedades celulares y bioquímicas alteradas. Aunque las cepas industriales pueden crecer satisfactoriamente bajo las condiciones altamente especializadas de un fermentador, pueden mostrar un crecimiento pobre en ambientes naturales competitivos, que ha continuación mencionamos: hongos filamentosos, levaduras, bacterias, algas, virus.

## F. ORIGÉN DE LAS CEPAS INDUSTRIALES

Glazer, *et al.* (1995), mencionan que la fuente de las cepas de microorganismos industriales es el ambiente natural. Con los años además se han ido depositando en las colecciones de cultivos un cierto número de cepas industriales. Son una fuente rápida y fácil de cultivos, pero muchas compañías no depositan sus mejores cultivos. Además estas colecciones tienen genes clonados.

A continuación se menciona las propiedades de un microorganismo industrial: Debe producir la sustancia de interés. Es preciso disponer del organismo en cultivo axénico (puro). Debe ser genéticamente estable. Debe crecer en cultivo a gran escala. Debe ser posible mantener cultivos del microorganismo durante un período de tiempo largo. Crezca rápidamente y produzca el compuesto deseado en un tiempo relativamente corto. Debe ser capaz de crecer en un medio de cultivo líquido y barato, que se pueda obtener en grandes cantidades. No debe ser dañino para las personas ni para los animales y plantas. Sea posible eliminar las células microbianas del medio de cultivo con facilidad. Debe ser de fácil manipulación genética porque en microbiología industrial el incremento del rendimiento se ha obtenido sobretodo por mutación y selección.

## G. FERMENTACIÓN

Waites *et al.* (2001), mencionan que la fermentación es una opción metabólica alternativa a la respiración, y es una oxidación incompleta de un compuesto orgánico que produce una pequeña cantidad de energía metabólica y genera productos orgánicos de estado de oxidación intermedia derivados del compuesto de partida.

Según Crueger (1993), tradicionalmente la fermentación significa la producción de alcohol a partir de los carbohidratos. Sin embargo, la fermentación es la aplicación del metabolismo microbiano para transformar una materia orgánica simple en productos de valor.

Wang *et al.* (1979); Vogel (1983), mencionan que la casi totalidad de las enzimas producidas en mundo occidental, proviene de procesos de fermentación en cultivo sumergido, por que los nutrientes y microorganismos se encuentran en fase acuosa. Su gran ventaja sobre el cultivo semisólido estriba en la homogeneidad que es posible establecer en el cultivo, de tal forma que no existen gradientes de temperatura, de pH o de concentración de nutrientes en el sistema.

### 1. Requerimientos para una fermentación rentable.

Waites *et al.* (2001), mencionan que los requerimientos necesarios para una fermentación económicamente rentable de materias primas orgánicas a partir de carbohidratos de plantas son los siguientes: Bajo coste de transporte de las materias primas. Bajo coste para convertir los polímeros (madera, celulosa, hemicelulosa, almidón) a

mono y disacáridos utilizables. El uso de cultivos mixtos, a fin de catabolizar substratos diferentes y convertirlos en los metabolitos deseados. El uso de cepas termófilas para ahorrar costes en el enfriamiento, para conseguir velocidades más altas de conversión y para reducir los riesgos de contaminación. Que el proceso sea adaptable a cultivo continuo. Bajos costes de recuperación y concentración.

## H. BIORREACTORES

Meneil *et al.* (1990), mencionan que son contenedores usados para sintetizar productos a escala comercial por medio de reacciones químicas, en la mayoría de los casos el metabolismo de las células es explotado para convertir los substratos en productos deseados.

### 1. Birreactores discontinuos

Según Pérez (2002), el biorreactor es un recipiente en el cual cantidades de medios y catalizadores biológicos son mezclados y luego se les provee de un ambiente óptimo en el cual llevan a cabo la fermentación. Al final del período, el cultivo "batch" es drenado del recipiente para que el producto de la reacción pueda ser aislado y purificado. A continuación mencionamos biorreactores discontinuos: fermentador de agitación, fermentador air lift, fermentador de estado sólido, fermentador de soporte fijo, fermentador de soporte fluido.

## **2. Biorreactores continuos**

Pérez (2002), menciona que continuamente son cargados con material o nutrientes; a la vez los productos son descargados constantemente. El sistema es mantenido con provisiones de nutrientes y remoción de desechos.

## **3. Biorreactores semicontínuos**

Pérez (2002), menciona que constan de una entrada de materiales continua pero la salida es discontinua. Esto es que se interrumpe la fermentación para obtener tanto el producto como los deshechos.

# **I. APLICACIONES Y VENTAJAS**

Wackett *et al.* (2001), afirman algunas aplicaciones y ventajas que presenta los biorreactores, a continuación citamos: En los fermentadores, el crecimiento celular es promovido o mantenido para permitir la formación de productos que pueden ser metabolitos. Producción de sustratos transformados como los esteroides o solventes purificados como es el caso del mejoramiento de aguas. Mediante el uso de birreactores se cultiva microorganismos como *Penicillium chrysogenum* en cultivos sumergidos para producir antibióticos como la penicilina, la tetraciclina y la eritromicina. La ventaja más importante de los birreactores es que se reducen grandemente la pérdida del catalizador biológico. Los birreactores proveen unas buenas condiciones estériles.

## **J. METABOLISMO MICROBIANO**

Mateos (2002), menciona que el metabolismo son todos los procesos químicos que tienen lugar dentro de una célula. Los elementos químicos básicos (nutrientes) que utiliza una célula provienen del medio ambiente. Estos elementos químicos son transformados por la célula en los constituyentes característicos que componen dicha célula a través de un proceso denominado anabolismo.

### **1. Metabolitos primarios**

Según Mateos (2002), los metabolitos primarios son moléculas de bajo peso molecular que intervienen, bien como productos finales o intermediarios, en las distintas rutas anabólicas y catabólicas. Los más importantes desde el punto de vista industrial son los aminoácidos, nucleótidos, vitaminas, ácidos orgánicos y alcoholes.

### **2. Metabolismo secundarios**

Según Mateos (2002), los metabolitos secundarios son moléculas sintetizadas por determinados microorganismos, normalmente en una fase tardía de su ciclo de crecimiento, cuyas características son: No son necesarios para el crecimiento del microorganismo que los produce. Cada uno de estos productos es producido por un grupo muy reducido de organismos. La producción puede perderse fácilmente por mutación espontánea (degeneración de la raza), por lo que son muy importantes las técnicas de conservación de estos microorganismos.

## K. ENZIMAS

Peláez (1998), menciona que las enzimas son catalizadores de los organismos vivos de naturaleza protídica, producto directos de la expresión genética, que intervienen en todas las reacciones metabólicas energéticamente posibles, que ellas aceleran por activación específica.

### 1. Celulasas

Crueger (1993); Wiseman (1991), mencionan que la producción de Celulasas comerciales provienen de *Aspergillus niger*, *Trichoderma viridei* y *Trichoderma reesei*, atacan a la celulosa produciendo celulodextrinas y glucosa. La hidrólisis de los enlaces  $\beta - 1 - 4$  glucosídicos de la celulosa está catalizada por la celulasa que es una mezcla compleja de varios enzimas con diversas actividades hidrolíticas, preparada mediante fermentación en fase semisólida o sumergida.

Ladisich *et al.* (1983); Pourquoi & Vandecasteele (1985), mencionan que la celulasa es un complejo enzimático que consiste de al menos tres enzimas: Endo -  $\beta - 1,4 -$  glucanasa, también denominada endocelulasa, carboximetilcelulasa o  $C_x$  celulasa. Exo -  $\beta - 1,4 -$  glucanasa, también denominada celobiohidrolasa, avicelasa o  $C_1$  celulasa. La celulasa  $C_1$  comprende el 80% del complejo de celulasa durante la fermentación con *Trichoderma viridei* y *Trichoderma reesei*.  $\beta - 1,4$  glucosidasa, o celobiasa.

La concentración extra celular de estas enzimas que rompen celobiosa a glucosas.

## 2. Factores que afectan la actividad enzimática

Según Furia (1972), menciona que hay factores que afectan la actividad enzimática, estos tienen que ver con el uso de las enzimas.

Entre los más importantes tenemos: Concentración del sustrato, tiempo, temperatura, pH y presencia o ausencia de los activadores o inhibidores.

## 3. Cinética enzimática

Scriban (1985), menciona que el objeto de la cinética enzimática es el estudio de las enzimas en su funcionamiento. Se propone en particular, establecer las reacciones que existen entre la velocidad de la reacción enzimática y las concentraciones del sustrato  $[S]$  y de la enzima  $[E]$ , así como la influencia de algunos factores: pH, temperatura, presencia de efectores eventualmente actividad de agua.

Atkinson (1985), menciona que a una concentración de enzima constante  $[E]$ , la velocidad de la reacción catalizada por la enzima se incrementa conforme aumenta la concentración de sustrato  $[S]$ , hasta llegar a una velocidad máxima  $(V_m)$ . Esto es debido a la saturación del sitio activo de la enzima con la formación de un complejo enzima – sustrato  $[ES]$ , la cual es una etapa esencial en la formación del producto  $[P]$ .

#### 4. **Actividad enzimática**

Furia (1972), menciona que el problema para los enzimólogos es cuantificar la actividad o concentración de una enzima, la única manera para detectar la actividad enzimática, es evaluando lo que hace sobre su sustrato específico. Por tanto la única forma de medición de la actividad o cantidad de una enzima, es por determinación de los cambios en su sustrato bajo condiciones controladas

Scriban (1985), menciona que hay numerosas formas de expresar los resultados de los ensayos enzimáticos. La comisión sobre enzimas a definido una unidad internacional de actividad enzimático, el Katal, cantidad de enzima que transforma una mol de sustrato por segundo bajo las condiciones experimentales Standard.

### III. MATERIALES Y METODOS

#### A. LUGAR DE EJECUCION

El presente trabajo se desarrolló en los ambiente de la Universidad Nacional Agraria de la Selva en los laboratorios de: Biotecnología, Microbiología General, laboratorio de Química; en la ciudad de Tingo María situado a 650 m.s.n.m, y con una humedad relativa promedio de 80% y a una temperatura promedio de 25°C.

#### B. MATERIA PRIMA E INSUMOS

Se utilizó como materia prima.

- ◆ Fibra de Palma Aceitera procedente de la localidad de Santa Lucia, Uchiza , de la empresa Palmas del Espino S.A.
- ◆ Cepa de *Trichoderma reesei* del CECT 214 (ESPAÑA), obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España).

#### C. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

El desarrollo del trabajo de investigación se dividió en etapas que a continuación se presentan:

##### 1. Caracterización de la fibra de palma aceitera

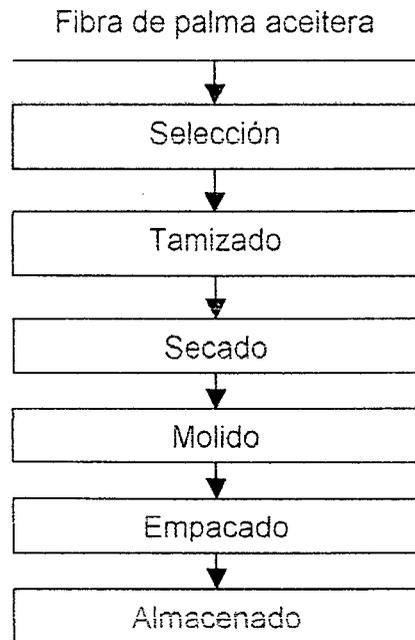
Se realizó los siguientes análisis con tres repeticiones:

- a. Humedad, basado en el método N° 930.04 (AOAC,1997).
- b. Proteínas totales, semi y micro Kjendhal, utilizando como factor de conversación de nitrógeno proteína 6.25, método N° 930.07 (AOAC, 1997).
- c. Grasa (Soxhlet), basado en el método N° 930.09 (AOAC 1997).

- d. Fibra, basado en el método N° 962.0.9E (AOAC, 1997).
- e. Ceniza, basado en el método N° 930.05 (AOAC 1995).
- f. Carbohidratos totales, por diferencia (Hart Fisher, 1991).
- g. pH, método N° 11.032 (AOAC 1996).
- h. Sólidos totales, por diferencia de porcentaje de humedad (Hart y Fisher, 1994).

## **2. Acondicionamiento de fibra de palma aceitera**

Para realizar el proceso de acondicionamiento de la fibra de palma aceitera se realizaron las operaciones, que se aprecia en la Figura 1. Fibra de palma aceitera, fue obtenido del proceso de prensado en la obtención de aceite, procedente de la Empresa de Palma del Espino, Santa Lucía. Se seleccionó de las impurezas existentes, luego se tamizó con la finalidad de eliminar partículas extrañas existentes, se secó con la finalidad de eliminar la humedad a una temperatura de 50°C por una hora y media en un secador con ventilación, el molido, se realizó con la finalidad de estandarizar el tamaño de la fibra para realizar con facilidad la manipulación, luego se realiza el empacado para evitar que adquiera humedad y que se contamine con otros agentes contaminantes, por último se almacena con la finalidad de controlar la humedad para que no se deteriore y sea atacada por microorganismos.

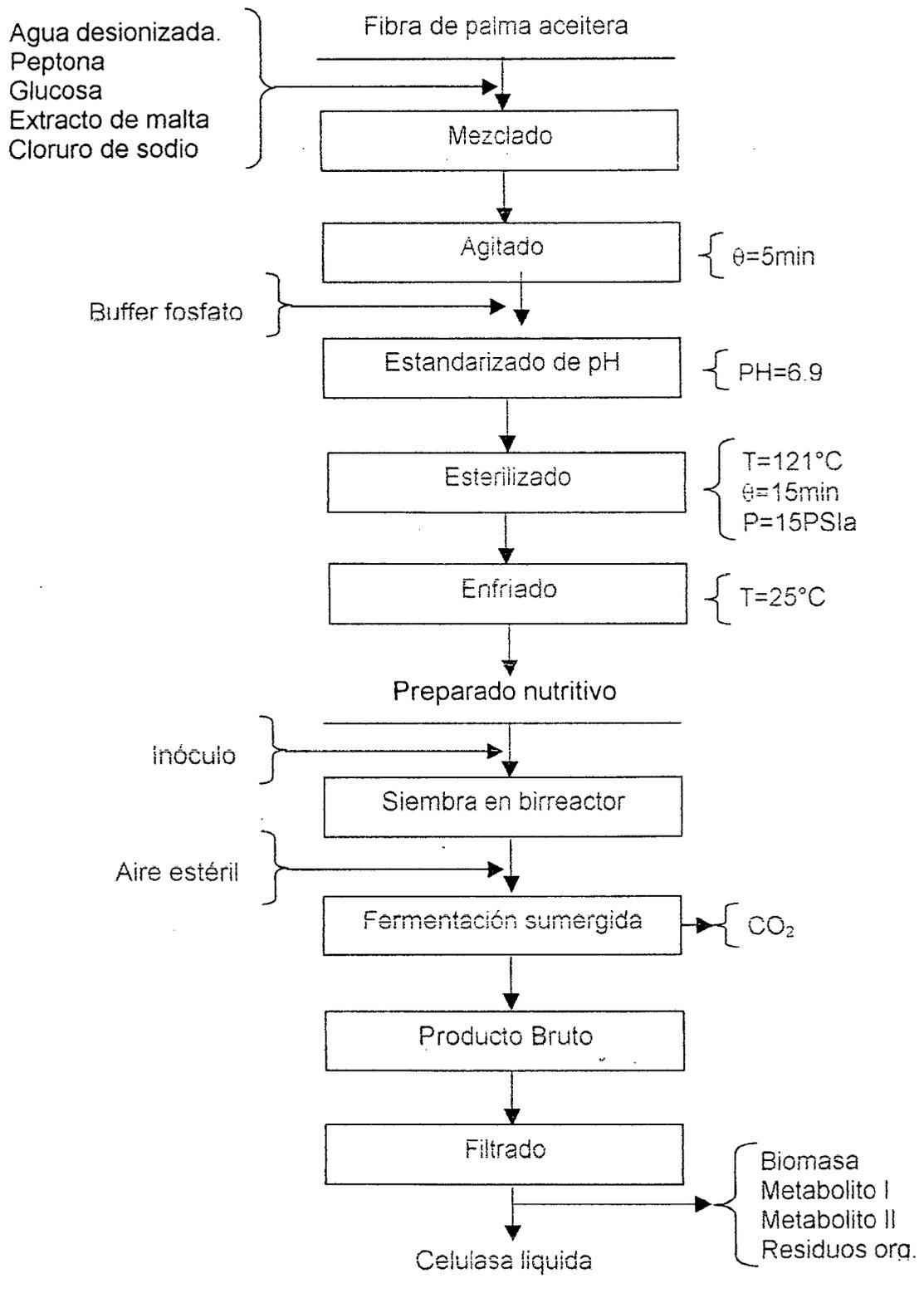


**Figura 1. Diagrama para el acondicionamiento de la fibra de palma aceitera**

### **3. Estudio de la fermentación**

El proceso de fermentación se muestra en la Figura 2, a continuación se describen las diversas operaciones:

Fibra molida, es el compuesto resultante del acondicionamiento que a partir de ella, el *Trichoderma reesei* va a producir el metabolito de interés. Se mezcló de acuerdo a las concentraciones establecidas en el diseño experimental, con el medio básico; luego se agitó por un tiempo de cinco minutos, obteniéndose así mezcla homogénea; el pH, se estandarizó hasta alcanzar un pH de 6.900.



**Figura 2. Flujograma para la producción biotecnológica de la celulasa**

El medio de cultivo, se esterilizó a una temperatura de 121°C, 15 minutos y a 15 PSla, en esta operación los microorganismos contaminantes son eliminados; el medio de cultivo esterilizado se enfrió hasta alcanzar temperatura del ambiente aproximadamente 25°C; el medio de cultivo estéril que se obtiene al finalizar todas las operaciones realizadas anteriormente se le denomina preparado nutritivo; el preparado nutritivo de cada tratamiento y el inoculo, de acuerdo a cada concentración se vertieron en los birreactores para ser mezclado ambos componentes; se inicia la fermentación sumergida a una temperatura de 28°C por un tiempo de 120 horas con un pH inicial de 6,9, dicha operación es de mayor importancia debido a que se produce el metabolito secundario por acción del *trichoderma reesei*; al finalizar la fermentación se realizó la obtención del producto bruto que esta compuesto por celulasa, biomasa compuestos orgánicos y residuos de la fibra; el filtrado se realizó con la finalidad de separar algunas impurezas del efluente que se extrae del birreactor, por diferencia de diámetro se separa las impuraza existentes en el efluente.

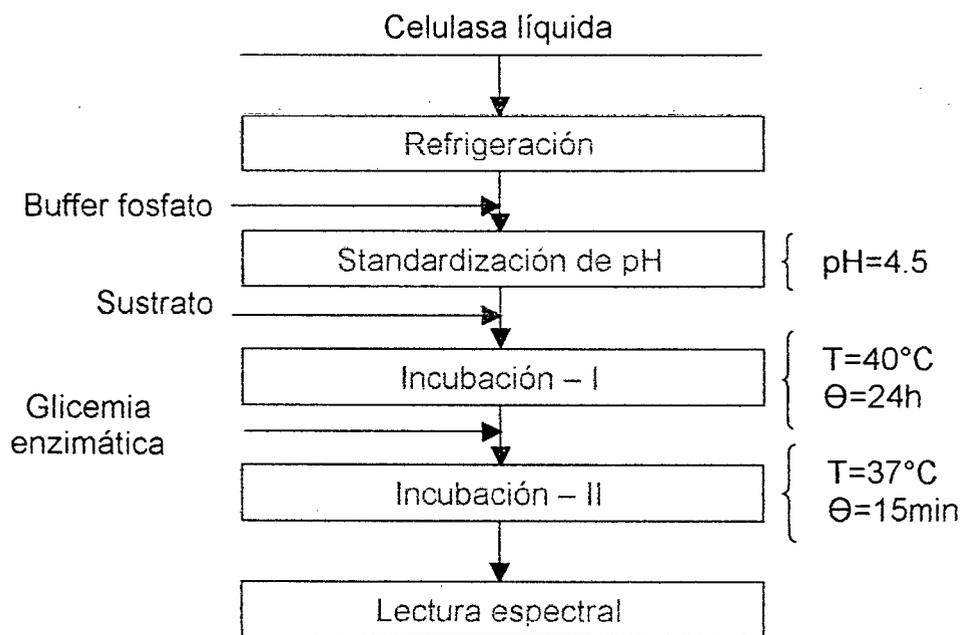
Una vez concluida las operaciones se considera celulasa liquida, exento de residuos orgánicos, biomasa y residuos de fibra, luego es depositado en refrigeración para su conservación a una temperatura de 5°C.

#### **4. Evaluación de la actividad enzimático de la celulasa**

Para la evaluación de la actividad enzimática se tomo el método descrito en Analytical Chemistry, 31, 427, 1959, la cual al final se evalúa el producto de la reacción que es la concentración de glucosa por método fotocolorimétrico, a una longitud de honda de 513 nm.

A continuación se presenta la metodología de la actividad enzimática en la Figura 3.

Refrigeración, se realiza con la finalidad de conservar la actividad enzimática de la celulasa por un tiempo de 30 minutos a una temperatura de 5°C. La standardización de pH se realizó con buffer fosfato hasta alcanzar el óptimo de 4,5, (a este valor trabaja mejor la celulasa), como sustrato se adiciona papel de filtro numero 04; la incubación se realiza a 40°C por un tiempo de 24 horas para que pueda actuar la enzima con el sustrato, por acción de la enzima, se produce glucosa.



**Figura 3. Flujograma para la evaluación de la actividad celulolítica**

La incubación II, se realizó con la finalidad de que reaccione la glicemia enzimático con la glucosa producido por la acción de la celulasa, para esto se incuba a una temperatura de 37°C por 15 minutos; luego se realiza la lectura con espectrofotómetro GENESYS 8. con una longitud de onda a 513 nm.

## D. DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental se presenta en la Figura 4, el cual nos permitió evaluar la acción del inóculo y del sustrato.

### 1. Variables independientes

Las variables independientes fueron las concentraciones de inóculo (I) en % (v/v) y sustrato (S) en g/L.

### 2. Tratamientos en estudio

Los tratamientos en estudio consistió en la utilización de inóculo y sustrato en diferentes concentraciones que a continuación se detallan:

I1S1: 10 % (v/v) Inóculo – 30 g/L Sustrato

I1S2: 10 % (v/v) Inóculo – 40 g/L Sustrato

I1S3: 10 % (v/v) Inóculo – 50 g/L Sustrato

I2S1: 15 % (v/v) Inóculo – 30 g/L Sustrato

I2S2: 15 % (v/v) Inóculo – 40 g/L Sustrato

I2S3: 15 % (v/v) Inóculo – 50 g/L Sustrato

I3S1: 20 % (v/v) Inóculo – 30 g/L Sustrato

I3S2: 20 % (v/v) Inóculo – 40 g/L Sustrato

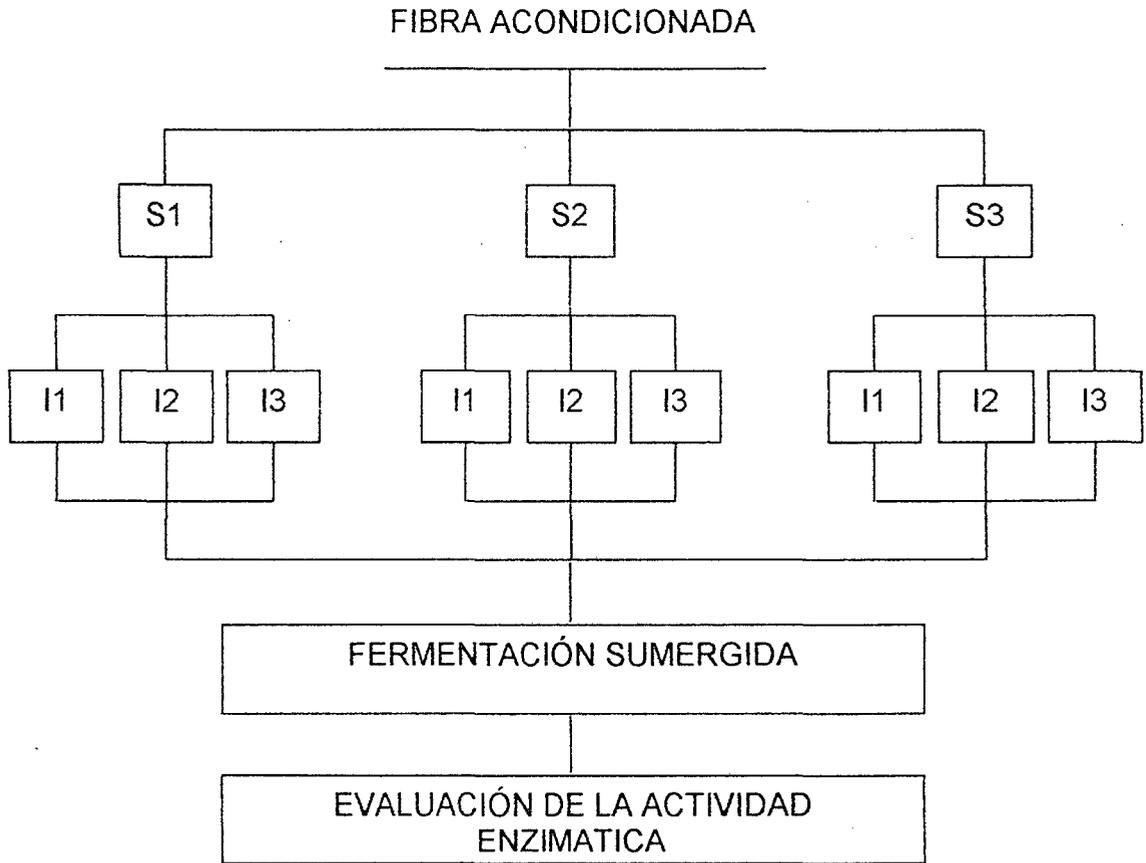
I3S3: 20 % (v/v) Inóculo – 50 g/L Sustrato

### 3. Variable dependiente

Actividad enzimática (IU/ml).

### 4. Parámetros observados

- Consumo de oxígeno (mg/ml), Variación del pH y Consumo de glucosa (mg/ml)



**Figura 4. Diseño experimental para la determinación de la actividad enzimática: donde; S=Sustrato; I=Inóculo.**

#### **E. ANALISIS ESTADISTICO**

El análisis estadístico para el diseño experimental de la Figura 4 se adecua a un diseño completamente al azar (DCA), con arreglo factorial de 3 S x 3 I (tres concentraciones de sustrato y tres concentraciones de inoculo), con tres repeticiones con un total de 27 observaciones, la significancia estadística se evaluó con la prueba de Duncan al 5% de probabilidad seleccionándose el mejor tratamiento (Steel, 1995).

## IV.RESULTADOS Y DISCUSIONES

### A. CARACTERIZACION DE LA MATERIA PRIMA

En el Cuadro 3, se detalla la composición físico – química de la fibra de palma aceitera.

**Cuadro 3. Composición físico - química de la fibra de palma aceitera.**

Componentes	Porcentaje <sup>1</sup>
Humedad	10,14 ± 0,701
Ceniza	5,22 ± 0,054
Grasa	4,57 ± 0,039
Proteína	2,51 ± 0,102
Fibra	40,18± 0,002
Carbohidratos	37,38± 0,210
PH	5,60 ± 0,011

<sup>1</sup>Los valores representan el promedio ± la desviación estándar, de tres repeticiones

En el Cuadro 3, se observa la composición de la fibra de palma aceitera, predominando la fibra con un 40,18 %, seguido por los carbohidratos con 37,38 %, siendo de interés la presencia de carbohidratos para el crecimiento de los microorganismos, ya que éstos desarrollan los procesos de biosíntesis o anabolismo, que le permiten formar constituyentes complejos a partir de elementos mas sencillos, esto es corroborado por Gerard (1993), afirma que los requerimientos de macro nutrientes (carbono, nitrógeno, hidrogeno y oxigeno), micro nutrientes (S, P, K y Mg) y oligoelementos (Zn, Co, Cu, Mn y Fe), son proveídos por las proteínas, grasas y los demás son suplementados por el resto de la

composición de la palma aceitera, todos son elementos imprescindibles para el crecimiento del microorganismo.

Béguin (1990), Singh & Hayashi (1995), mencionan que la celulosa constituye una abundante fuente de carbono que es usada como tal por *Tirchoderma reesei* y otros microorganismos que degradan celulosa. Todos estos microorganismos que degradan celulosa producen un sistema complejo de enzima que es denominado en forma general celulasa.

## **B. PROCESO DE FERMENTACIÓN SUMERGIDA EN LA PRODUCCIÓN DE CELULASA**

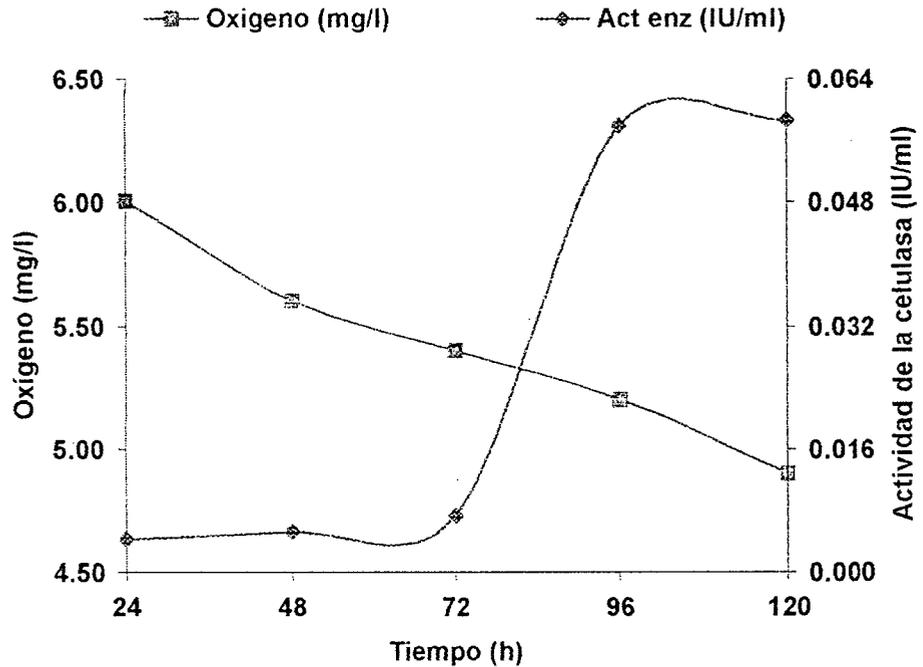
A continuación se presentan los resultados de las evaluaciones realizadas durante el proceso de fermentación del mejor tratamiento que es el **S3I1**, en el cual se realizaron las comparaciones de cada evaluación de los parámetros con respecto a la actividad enzimática.

### **1. Consumo de oxígeno respecto a la actividad enzimática**

En el Anexo II, y IV se detalla el consumo de oxígeno de cada tratamiento durante el proceso de fermentación.

El proceso de fermentación sumergida se realizó aeróbicamente en un biorreactor air - lift; donde el suministro de oxígeno es importante para el desarrollo celular, Pérez (2000), menciona que el proceso de fermentación sumergida se realiza aeróbicamente, donde el nivel de oxígeno y la velocidad de flujo debe ser suficientemente alta para tener oxígeno en exceso entre las células para que este no sea un factor limitante. Bullock (1991), Rivera (2002), mencionan que el

suministro de oxígeno es importante para producir energía e incrementar la oxidación, como también para la multiplicación de células y para que realice una dispersión uniforme de oxígeno y del sustrato.



**Figura 5. Relación de las curvas de la actividad enzimática con oxígeno, obtenida con el S3 e I1**

De acuerdo a la Figura presentada, entre la concentración del oxígeno y la actividad enzimática observamos que la relación existente es inversa, a medida que decrece la concentración del oxígeno se incrementa la concentración de la enzima, este comportamiento es corroborado por Ertola (2000) quién menciona, que la concentración del oxígeno disminuye a medida que se

incremente el número de células, en la fase estacionaria comienza la producción del metabolito secundario en este caso la celulasa.

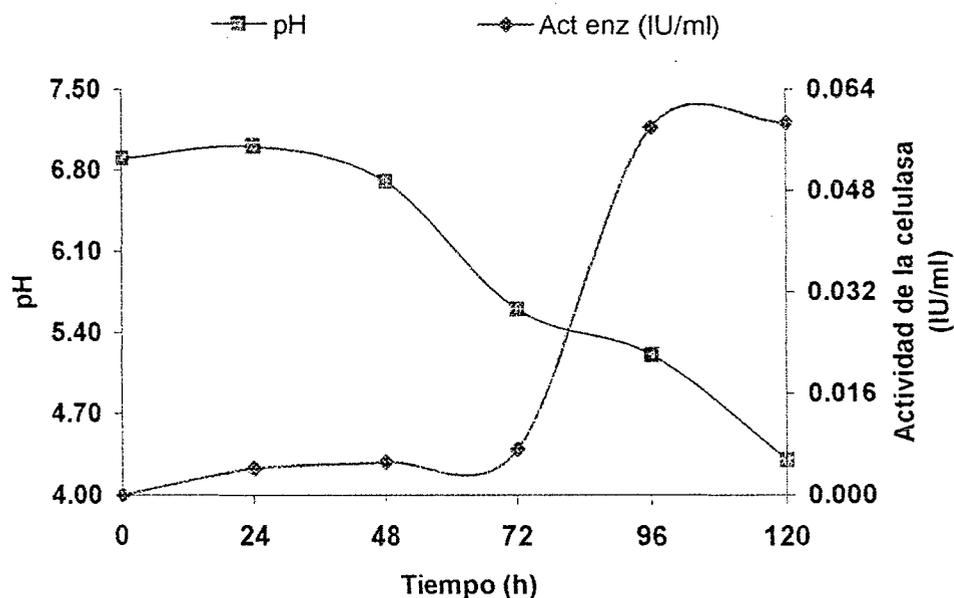
## 2. Evaluación de pH en el proceso de fermentación

En el Anexo II se detalla la variación del pH en el fermentador durante las 120 horas del proceso de fermentación de los tratamientos.

El proceso de fermentación se inicia con un pH de 6,9 para que el *Trichoderma reesei* se desarrolle mejor, durante los 120 horas del proceso de fermentación decrece el pH, el comportamiento de los tratamientos se observa en el Anexo V y del tratamiento S311 en la Figura 6.

En líneas generales, el pH, muestra una disminución en los periodos de crecimiento del *Trichoderma reesei*, este comportamiento es posible al uso de peptona como fuente de nitrógeno y a la hidrólisis de la materia orgánica, según Vilchez (2002) se debe, al comportamiento acídica de la celulasa en especial de  $\beta$  - glucosidasa y a la utilización de peptona como fuente de nitrógeno, esto concuerda con lo que reporta Nakandakari (1988) que el microorganismo al asimilar el amoníaco libera al medio iones hidrógeno y el valor de pH del medio decrece, Ceroni y Gutiérrez (1988), usaron sulfato de amonio luego observaron un ligero incremento inicial del pH para luego recién disminuir, lo que se explica por el uso adicional de la urea que en la primera fase del desarrollo permite la liberación de iones amonio al medio provocando

un aumento del pH, pero luego al asimilarse el amonio se liberan los iones hidrógeno con la subsecuente baja del pH.



**Figura 6. Relación de las curvas de la actividad celulolítica con pH, obtenida del S3I1**

En la Figura 6, se muestra la relación inversa del pH y la producción de la celulasa que es evaluada en función de la actividad enzimática, al inicio, el microorganismo en estudio presenta el proceso de adaptación al medio nutritivo, debido al consumo de nutrientes libera hidrógeno provocando la disminución de pH, esto indica la multiplicación del microorganismo en estudio a las 48 a 120 horas del proceso de fermentación y la producción de celulasa es acelerada, ésta se debe a que el pH es óptimo para la producción de metabolito secundario en estudio.

Ali *et al.* (1991), mencionan que el pH óptimo para la producción de celulasa en mayoría de los casos está en un rango de 3 a 6 de pH, y la producción de los componentes de la celulasa se dá entre 4 a 5,5 de pH.

### **3. Evaluación de glucosa durante el proceso de fermentación**

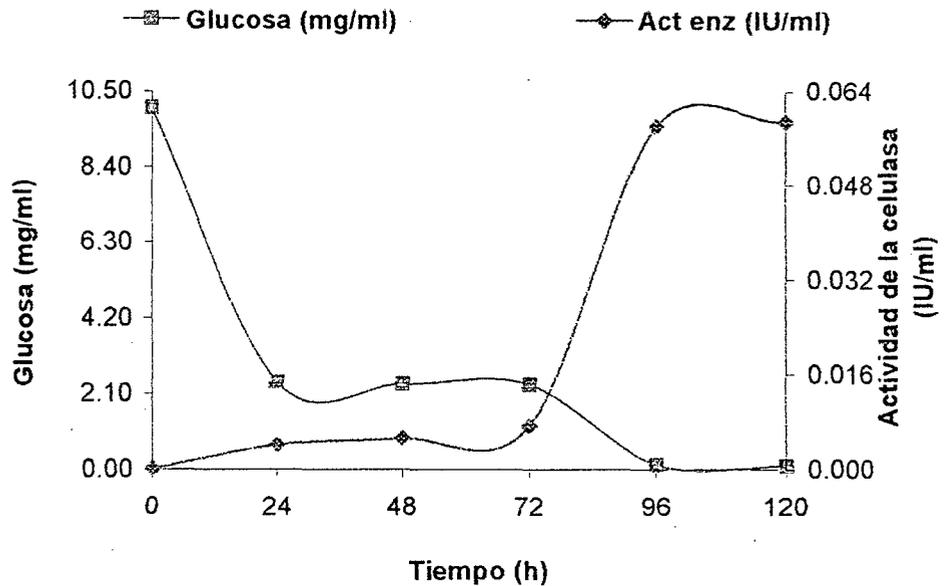
En el Anexo II, se detalla la evaluación de glucosa de cada tratamiento durante el proceso de fermentación.

El proceso de fermentación se inicia con una concentración de 10 mg/ml de glucosa con la finalidad de suministrar energía y fuente de carbono durante el proceso de adaptación al medio nutritivo el microorganismo en estudio, el fuente de carbono principal es la fibra de palma aceitera.

Prescott *et al.* (1999), mencionan que hay que proporcionarles el conjunto de nutrientes necesarios para su crecimiento, se iniciará el incremento del número de individuos de la población de microorganismos, para ello el microorganismo lleva acabo los procesos de biosíntesis o anabolismo, que los permiten formar sus constituyentes complejos a partir de elementos más sencillos.

Una vez iniciada el proceso de fermentación, los microorganismos en estudio consumen aceleradamente la glucosa, se aprecia en el Anexo VI y la Figura 7, que a las 24 horas el tratamiento S3I1 el consumo es relativamente lento, esto se debe a la utilización de fibra de palma aceitera como fuente de carbono, a los 120 horas del

proceso el tratamiento **S311** reporta una concentración de glucosa (0,079 mg/ml).



**Figura 7. Relación de las curvas de la actividad enzimática con variación de glucosa en el proceso de fermentación**

En la Figura 7, se aprecia la relación existente entre la concentración de glucosa con respecto a la producción de celulasa, al tener una mayor concentración de glucosa la producción de celulasa es mínima debido a que el microorganismo en estudio consume la glucosa para el proceso de adaptación al medio, a las 72 horas de fermentación comienza la producción de celulasa, debido al consumo de la fibra de palma aceitera como inductor para la producción de celulasa.

Brock *et al.* (1990), mencionan que la síntesis de celulasa está sometida a una compleja regulación que produce una represión catabólica por la glucosa y los represores catabólicos usuales y una inducción por uno de los productos de hidrólisis de la celulosa.

### C. CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

En el Anexo III, se aprecia en forma general la actividad enzimática y a su vez apreciamos en el Anexo VII que se muestra gráficamente el comportamiento conforme transcurre el tiempo del proceso de fermentación, se incrementa la concentración de la enzima celulasa, este comportamiento es coincidente con la producción de diversos metabolitos secundario (Crueger, 1993).

La producción comienza a partir de las 24 horas del proceso de fermentación alcanzando la máxima producción a los 120 horas, es evaluado en función de la actividad enzimática, ya que no se puede cuantificar la concentración de la enzima, según Furia (1972) menciona que la forma más conveniente de cuantificar está en función de la actividad enzimática, es evaluar lo que hace sobre el sustrato específico en condiciones controladas.

En el Anexo I, se muestran las diferencias significativas ( $P < 0,05$ ), encontradas al aplicar el análisis de varianza (ANVA) con dos factores de variación (la concentración de inóculo y la concentración del sustrato para la producción de celulasa). Todas las variables estudiadas mostraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) para los inóculos y sustrato utilizado y la interacción inóculo por sustrato, por lo tanto al observar la interacción de los factores, dejamos los efectos principales.

La evaluación de la actividad enzimática por sustrato e inóculo expresada en IU/ml, se muestran las medias en el cuadro 4.

**Cuadro 4. Actividad enzimática por el sustrato (S) e inóculo (I)**

Sustrato	Actividad enzimática (IU/ml)		
	Inóculo en diferentes concentraciones		
	I1 (10 % v/v)	I2 (15 % v/v)	I3 (20 % v/v)
S1 (30 g/L)	0,0210±0,0002 <sup>c C</sup>	0,0349±0,0001 <sup>b B</sup>	0,0483±0,0008 <sup>c A</sup>
S2 (40 g/L)	0,0537±0,0008 <sup>b A</sup>	0,0549±0,0001 <sup>a A</sup>	0,0574±0,0004 <sup>b A</sup>
S3 (50 g/L)	0,0587±0,0008 <sup>a A</sup>	0,0588±0,0003 <sup>a A</sup>	0,0593±0,0003 <sup>a A</sup>

Los valores representan (Promedio ± SEM) los datos provienen de los experimentos, cada uno analizado por triplicado por Inóculo y Sustrato en diferentes superíndices minúsculas en una misma columna y superíndices mayúsculas en una misma fila ( $P < 0,05$ ).

Realizado el análisis de varianza (Anexo I), se encontró diferencia estadística por el sustrato e inóculo. Al efectuar la comparación de promedios mediante la prueba de Duncan se observó que entre los tres grupos de inóculo analizado el sustrato (S3), presentó la mayor actividad enzimática (0,0587 IU/ml; 0,0588 IU/ml; 0,0593 IU/ml).

La diferencia con respecto a los demás se debe a la variación del sustrato que es usado como fuente de carbono la fibra de palma aceitera. Esto nos evidencia que la variación del sustrato influye en la producción de la celulasa, esto es corroborado por Abrha & Gashe (1992), Levin y Forchiassin (1995) reportan que cada material celulósico que emplearon como sustrato tuvo una concentración óptima a la que los componentes del complejo fueron producidos en mayor proporción, además esto concuerda con Stutzenberguer (1972), quien menciona que el tipo y concentración de sustrato es crítico para la máxima producción de los componentes del complejo celulósico. La Figura 8, muestra que la variación del sustrato incrementa la producción de celulasa, en el presente

trabajo de investigación la mejor concentración de sustrato es 50 g/L en los diferentes niveles de inóculo.

Al efectuar la comparación de promedios mediante la prueba de Duncan se observó que la mejor actividad enzimática está entre el sustrato (S3) analizando en los diferentes niveles de Inóculo no presentó diferencias estadísticas, esto evidencia que la variación de inóculo no influye en la producción de la celulasa con respecto al mejor sustrato, esto es corroborado por Mateos (2000), quien menciona que cuando la cantidad de células es mínima y que ante la presencia de una sustancia, que suele ser su sustrato, la célula aumenta enormemente su cantidad, esto son los denominados enzimas inducibles, además esto es corroborado por Ertola (2000), quién menciona que la concentración del volumen del inóculo representa generalmente 3 % a 10 % de volumen del fermentador de producción.

La Figura 9, corrobora de que la concentración del inóculo no influye en la producción de la enzima con respecto al sustrato (S3), por lo tanto obtenemos como al mejor tratamiento a la interacción del sustrato S3 con el inóculo I1, ya que para la elaboración del inóculo de acuerdo al volumen el costo se incrementa además ésta decisión es corroborado por la Figura 10 y 11 donde muestra la no influencia del inóculo en la producción de enzima.

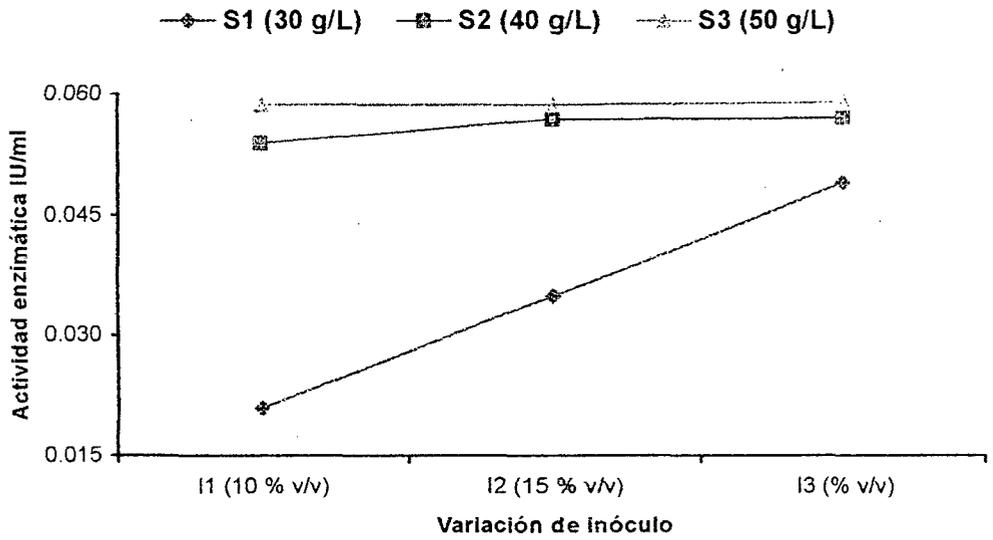


Figura 8. Curva de Interacción del Inóculo en los diferentes niveles de Sustrato

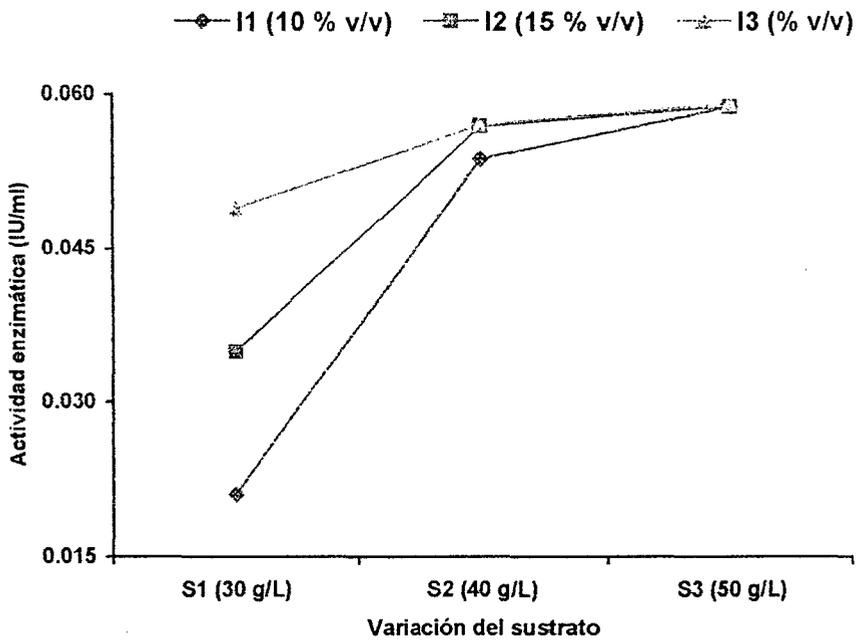


Figura 9. Curva de Interacción de los sustratos en los diferentes niveles de los inóculos

**Cuadro 8. Optimización de las concentraciones de los factores sustrato e inóculo**

Factores	Factores óptimos	Máx Activ Enzim. (IU/ml)
Sustrato (g/l)	43,1924	0,0615372
Inoculo (% v/v)	20,0000	

En el Cuadro 8, la optimización de los factores: sustrato e inóculo para obtener una actividad enzimática de la celulasa a las 120 horas de proceso de fermentación, se obtiene a partir de la ecuación obtenida, haciendo uso del programa STATGRAPHICS Plus 4.0.

$$A.E. = -2.2343 \cdot 10^{-1} + 1.00175 \cdot 10^{-2} \cdot S + 6.15889 \cdot 10^{-3} \cdot I - 8.50556 \cdot 10^{-5} \cdot S^2 - 1.335 \cdot 10^{-4} \cdot S \cdot I + 7.77778 \cdot 10^{-6} \cdot I^2$$

Donde: *A.E.* :Actividad enzimática (IU/ml)

*S* :Sustrato (g/l)

*I* :Inóculo (% v/v)

La ecuación presentada es el resultado del estudio de la superficie de respuesta, Calzada (1976), indica que los efectos principales y los efectos simples relacionados por las interacciones, es representado e interpretado fácilmente a través de la superficie de respuesta.

En la Figura 10, se representa los resultados obtenidos de las combinaciones de los factores sustrato e inóculo, además podemos apreciar el punto de combinación óptimo para la máxima actividad enzimática de la celulasa, obtenida a partir de las 120 horas de proceso de fermentación.

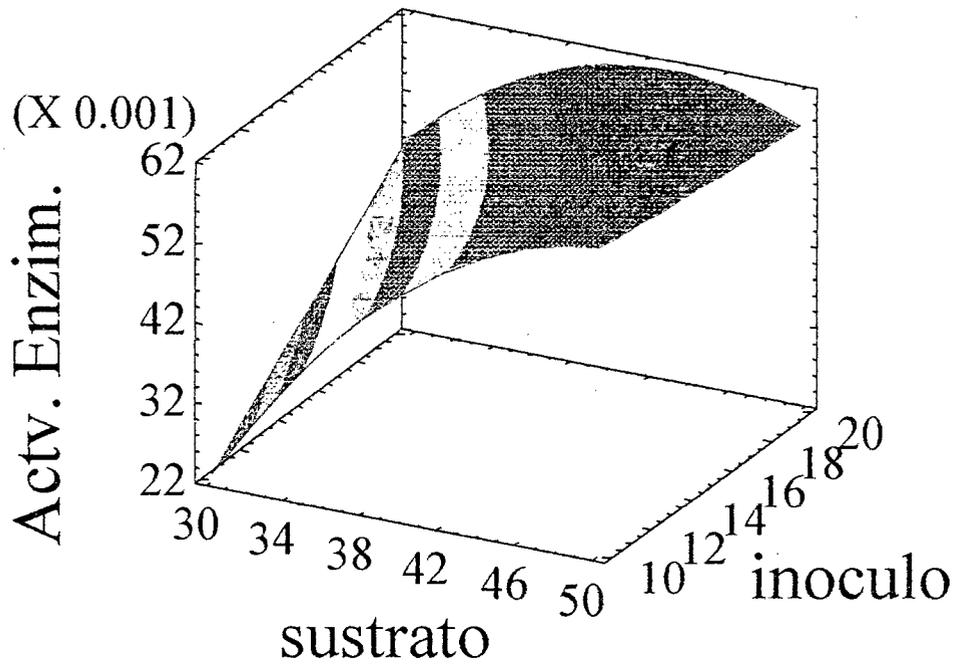
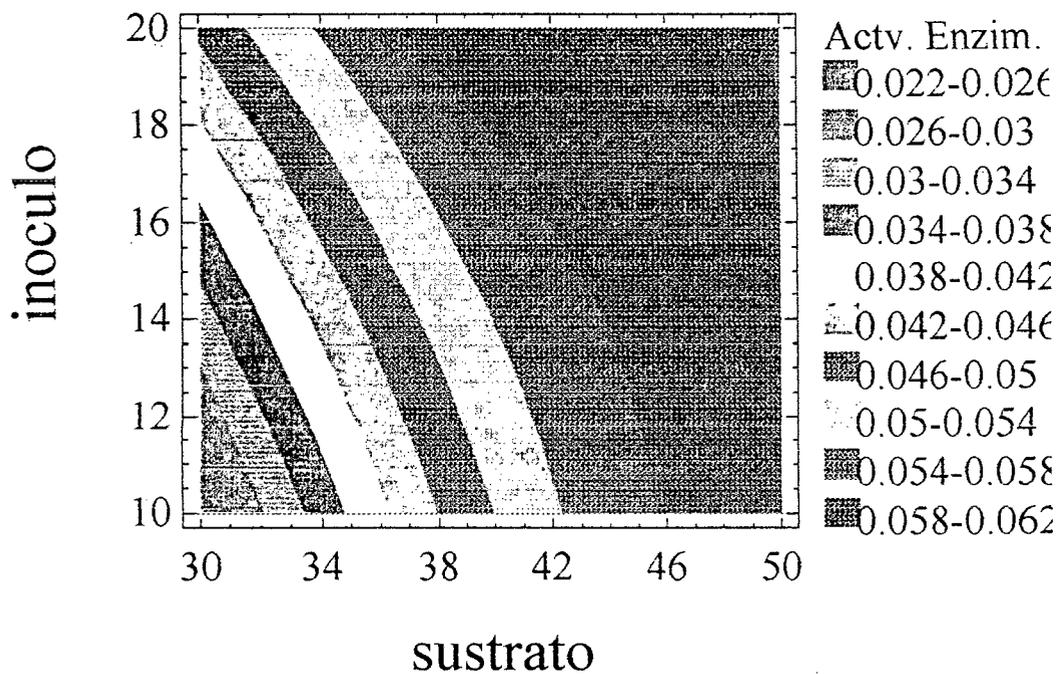


Figura 10. Superficie de respuesta para la máxima actividad enzimática en función de la concentración del sustrato e inóculo.

En la Figura 11, se aprecia la proyección de la vista superior de la Figura 10, en el cual se observa con mayor detalle los contornos de las combinaciones de las concentraciones del sustrato e inóculo.



**Figura 11. Contorno de la estimación de la actividad enzimática de la celulasa en función de las concentraciones del sustrato e inóculo**

## V. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación nos permiten indicar las siguientes conclusiones.

1. Se determinó mediante la caracterización fisicoquímica de la fibra de palma aceitera una humedad de 10,140 %; ceniza 5,221 %; grasa 4,572 %; proteína 2,510 %; fibra 40,181 %; carbohidratos 37,382 %; pH 5,60.
2. Se evaluó que la fibra de palma aceitera sirve como sustrato para la producción de celulasa donde la concentración óptima de los factores estudiados fueron 10 % (v/v) de inóculo; 50g/L de fibra de palma aceitera, obteniéndose actividad enzimática de 0,0587 IU/ml; presentando al final de la fermentación un pH de 4,3; oxígeno 4,9 mg/L y glucosa 0,079 mg/ml, a los 120 horas de proceso de fermentación a una temperatura promedio de  $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

## VI. RECOMENDACIONES

1. Aplicar la celulasa producida aplicar en la almendra de palma para la extracción de aceite.
2. Realizar estudios por fermentación sólida para la producción de celulasa usando como sustrato fibra de palma aceitera.
3. Realizar estudios para el aislamiento e identificación de microorganismos nativos productores de celulasa.
4. Realizar estudios con otros desechos agroindustriales para la producción de la celulasa.
5. Realizar estudios de optimización en la producción de celulasa con microorganismos nativos e importados.
6. Determinar los parámetros óptimos para la producción de celulasa por procesos biotecnológicos para posible escalamiento tecnológico.

## VII. BIBLIOGRAFIA

- AGUILAR, C.L. 2001.** Biodegradation of the cellulose from sugarcane bagase by fungal cellulase, Pp 115 – 125, State of Campinas (UNICAMP), College of Food Engineering, Laboratory of Biochemistry, Campinas, SP – Brasil. <http://www.unicamp.go.br.com>
- ATLAS, R & BARTHA, R. 1980.** The carbon cycle. In: microbial Ecology: Fundamentals and applications. Addison – Wesley Publishing Company. Pp 107 – 115.
- AGRONOTICIAS. 1988.** La Palma de aceite. Edición nº 106. Lima – Perú. 23 p.
- ALI, S. & SAYED, A. 1992.** Regulation of cellulase biosynthesis in *Aspergillus terreus*. World J. Microbial. and Biotech.v – 8, Pp 73 –75.
- ALI, S.; SAYED, A.; SARKER, R.I. & ALAM, R. 1991.** Factors affecting cellulase production by *Aspergillus terreus* using water hyacinth. World J. Microbial. and Biotech.v – 6, Pp 62 – 70.
- ABRHA, B. y GASHE, B. 1992.** Cellulase production and activity in a species of *Cladosporium*. World J. Microbiol. And Biotech. Pp 73 –75.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). 1997.** Official methods of analysis of A.O.A.C. 16 Ed. 3 revision. Washington D.C. USA. AOAC. International. Vol II. Ed. By Patricia Cunniff. 2815 p.
- ATKINSON B.; MAVITUNA, F. 1985.** Biochemical engineering and biotechnology hanbook. Ed The Nature Press. EE.UU. y Canada Pp 460 – 470
- BADUI DERGAL, S. 1994.** Química0 de los alimentos, Editorial Alambra Mexicana, Impreso en México. 648 p.

- BEGUIN, P. 1990.** Molecular Biology of cellulose degradation. Annu. Rev microbiol, Pp 219 – 248, Satate University of Campinas, College of Food Engineering, Laboratory of Biochemistry, Campinas, SP – Brasil.  
<http://www.bpcam@fca.unicamp.com.br>
- BELITZ, H. D. 1988.** Química de los alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España. 805 p.
- BOURGEOIS, C. M. y LARPENT, J. P. 1995.** Microbiología alimentaria. Vol. II Fermentaciones alimentarias. Editorial Acribia S. A. Zaragoza
- BU'LOCK, J. 1991.** Biotecnología básica. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza (España) 557 p.
- BRUNETON, J. 1991.** Elementos de fotoquímica y de farmacología. Edición Acribia, S.A., Zaragoza (España) 594 p.
- BU'LOCK, J; KRISTIANSEN, B. 1991.** Biotecnología básica, Editorial Acribia S.A. Zaragoza España, Impreso en España. 555 pg
- CARRIZALES, V. 1983.** Produccion de Enzimas Extra Celulares en Cultivos Semisolidos, Biotecnologia de enzimas, Carlos Huitron (comp.), Universidad Nacional Autonoma de México. Pp 145 –155.
- CASTELLANOS, P.; LANCHO, A.; VILCHEZ, L. y HUERTA, L. 2000.** Aislamiento, identificación y selección de cepas productoras de celulasas de dos regiones del Peru. IX Reunion Científica del ICBAR. Lima 118 p.
- CENIPALMA. 1998.** Aspectos generales de la Palma aceitera  
<http://www.cenipalma@openway.com.co>

- CERONI. A y GUTIERREZ CORREA, M. 1988.** Producción de celulasas por hongos: estudios cinéticos en hongos silvestres. Boletín de Lima 55, Pp. 13 - 20.
- CERONI. A. H. 1988.** detección y Evaluación de germoplasma celulolítico en 1326 cepas de hongos de suelo. Tesis para optar el título de biólogo Universidad nacional Agraria la Molina.
- COCEPU. 1996.** Palma aceitera. Sistema de producción de Ucayali. Ucayali – Perú. 50 p.
- COUITATE, T.P. 1998.** Manual de química y bioquímica de los alimentos. 2 Edición. Editorial Acribia. Zaragoza (España) 366 p.
- CRUEGER, W.; CRUGER, A. 1989.** biotecnología: Manual de microbiología industrial. Editorial Acribia. Madrid.
- CRUEGER, W. 1993.** Biotecnología: Manual de microbiología industrial. Editorial Acribia S.A. Zaragoza (España) 413 p.
- DREYER, A.; MOTIEL, E; COELLO, N. 2000.** Utilización de la metodología de superficie de respuesta en la optimización de un medio de cultivo para la producción de L – lisina por *Corynebacterium glutamicum*. Agronomía Trop. 50(2): Pp 167 – 188.
- ERTOLA, R. 1994.** Microbiología industrial. Editado por la Organización de Estados Americanos, Secretaria General. Washington. Pp 23 – 46.
- FENNEMA, O. R. 1993.** Química de los alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza (España). 1095 p.

- FAN, L.; LEE, Y. & BEARDMORE, D. 1980.** Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*. Pp 177 – 199.
- FURIA, T. 1972.** CRC Handbook of food additives. Segunda edición/n. Ed. CRC Press Inc. Vol. I. New York. EE. UU. Pp 22 – 50.
- GARCIA LOPEZ, M. D. URUBURU FERNANDEZ, F. 2002.** COLECCIÓN Española de Cultivo Tipo (CECT). Universidad de Valencia. 46100 Burjassot (Valencia): <http://www.uv.es/cect>
- GLAZER, A. N. & H. NIKAIDO. 1995.** *Microbial Biotechnology. Fundamentals and Applied Microbiology*. W.H. Freeman and Company, New York, 256 p.
- HARTLEY, C. 1986.** *La Palma de aceite*. New York, Mac Graw – Hill. 958 p.
- JAGNOW, J. 1991.** *Biología introducción con experimentos modelo*. Editorial Acribia S. A. Zaragoza (España) 251 p.
- LADISCH, M.; LIN, K.; VOLOCH, M. & TSAO, G. 1983.** Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme Microb. Technol.* 5. Pp 82 – 102.
- LEVIN, L. y FORCHIASSIN, F. 1995.** Influencia de Fuentes de carbonadas y nitrogenadas sobre la actividad celulolítica de *Trametes trogii*. *Revista Argentina de microbiología*. Pp 11 – 20.
- LAURA V. 1990.** Determinación de la actividad de exoglucanasas de fungus nativas. Tesis para optar el título profesional de Blgo con mencion en Microbiología y Parasitología, UPCH Lima 85 p.

- LEON, J. 1987.** botánica de los cultivos tropicales. Edición IICA. San José, Costa Rica. Pp 50 – 58.
- MADAMWAR, D. & PATEL, S. 1992.** Formation of cellulases by co – culturing of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* on cellulosic waste. World J. Microbiol. and Biotech. Pp 183 –186.
- MANCHE, D. 1981.** La cosecha industrial de la Palma aceitera.
- MENEIL, B., HARVEY L.M. 1990.** Fermentetion a practical aproach, Laboratory Fermenters, Chapter 2, IRL press, Oxford university. Pp 17 – 38.
- MILLER, D. 2001.** Química de los alimentos manual de laboratorio, Edición Limusa Wiley, S.A. 173 p.
- NAKANDAKARI, J. 1988.** Aislamiento, selección y estudios preliminares de hongos secretor de celulasas. Tesis para optar el grado de bachiller en Biología UPCH. Lima.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICA DE LA SALUD 1999.** Manual para la Elaboración de Compost Bases Conceptuales y Procedimientos. Intendencia municipal de Maldonado, España. 67 p.
- PELAEZ, P. 1998.** Estudio del tratamiento enzimático y viscosidad de la pulpa de banano (*Musa sp.*) tipo seda, en la obtención de jarabe, Tesis para optar el Grado de Magíster Scientiae en tecnología de Alimentos. Universidad Nacional Agraria de la Molina. Lima – Perú. 136 p.
- PEREZ, R. y JUAREZ, A. 1997.** Bioquímica de los microorganismos. Editorial Reverte, S.A. Barcelona. 358 p.
- PRESCOTT, L., HARLEY, J. & KLEIN, D. 1999.** Microbiology, 4tk edition. McGraw – Dill Companies/Ed. Española 1999. Pp 115 – 175.

- POURQUIE, J. & VANDECASTEELE, J. 1985.** Conversión de compuestos lignocelulósicos por hidrólisis enzimática y fermentación acetona – butanol. Biotecnología. 2<sup>a</sup>. ed. Pp 583 – 601.
- RIVERA, H. 2002.** Producción de xilitol a partir de cáscara de camu camu (*Myrciaria dubia* HBK Mc Vugh) por fermentación sumergida. Tesis para optar el título de Ingeniero en Industrias Alimentaria. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo Maria – Perú.
- ROBINSON, D. 1991.** Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Edición Acribia, S.A. Zaragoza (España). 516 p.
- SCRIBAN, R. 1985.** Biotecnología. Trad. De la segunda edición/n. por Dra. Ma. Del Consuelo Hidalgo y Mondrag/n. Ed. El Manual Moderno. México, D.F. Pp 365 – 366.
- SCRAGG, A. 1996.** Biotecnología para ingenieros, sistemas biológicos en procesos tecnológicos. Ed. Limusa S.A., España Zaragoza. Pp 172 – 180.
- SING., A. & HAYASHI, K. 1995.** Microbial celulasas: Protein architecture, molecular properties and biosynthesis. Adv in Appl. Microbiol. v – 40 Pp 10 – 44.
- SANCHEZ, S. y A. FARRES. 1987.** Regulación de Enzimas microbianas, Tecnología Enzimática, Lopez – Munguia C.A. y R. Quinteros (Comps). Universidad Nacional Autónoma de México. Pp 63 – 69.
- STUTZENBERGER, F. 1972.** Cellulolytic activity of *thermomonospora curvata*. Nutritional requirements for cellulase production. Appl. Microbiol 1:24, Pp 77 – 82.

- VELEZ DE VILLA. 1991.** Alternativas para incrementar la producción y calidad del aceite crudo de Palma en ENDEPALMA S.A. Tocache, Tesis para optar el título de Ingeniero en Industrias Alimentaria. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo Maria – Perú. 103 p.
- VOGEL, H. 1988.** Fermentation and Biochemical Engineering Handbook, Noyes Publications, Nueva Jersey. Pp 86 – 97.
- WARD, O. 1991.** Biotecnología de la fermentación, Editorial Acribia S. A. Zaragoza (España). 274 p.
- WAITES, M. y MORGAS, N. 2001.** Industrial microbiología. An introduction. Blackwell Science. 350 p.
- WACKETT, L. and HERSHBERGER, C. 2001.** Biocatalysis and Biodegradation: Microbial Transformation of Organic Compounds. AMS Press. Pp 155 – 170.
- WAITES, M., MORGAN N., ROCKEY, J. and HINGTON, 2001.** Industrial Microbiology. An Introduction. Blackwell Science. Pp 66 – 75.
- WANG, D. 1979.** Fermentation and Enzyme Technology, John Wiley & Sons, Nueva York. Pp 125 – 133.
- WISEMAN, A. 1986.** Principio de biotecnología. Edición Acribia S.A. Zaragoza (España). 252 p.
- ZEGARRA, R. 2000.** Obtención de zumo de membrillo (*Cydonia vulgaris*) mediante el tratamiento enzimático con poligalacturonasa y biopectinase LM. Tesis para optar el título de Ingeniero en Industrias Alimentaria. Universidad Nacional Agraria de la Selva. Tingo Maria – Perú. 85 p.

## VIII. ANEXO

### Anexo I.

Análisis de varianza para la actividad enzimática de la celulasa a los 120 horas de proceso de fermentación por sustrato [S] e inóculo [I]

Fuente	GL	SC	CM	Fc	Sig.
Sustrato. [S]	2	0,00307785	0,00153892	731,14	**
Inóculo [I]	2	0,00049851	0,00024925	118,42	**
[S] X [I]	4	0,00063918	0,00015979	75,92	**
Error	18	0,00003789	0,00000210		
Total	26	0,00425342			

**R<sup>2</sup>=0,9911 C.V.= 2,9211 Root MSE=0,0015 Resp. Med.=0.0497**

## Anexo II.

### Oxígeno disuelto (mg/L) durante el proceso de fermentación de los tratamientos en estudio

Tiem. (h)	S1I1	S1I2	S1I3	S2I1	S2I2	S2I3	S3I1	S3I2	S3I3
24	6,40	6,20	6,10	6,20	6,10	6,20	6,00	6,10	6,10
48	6,30	6,00	6,10	6,10	5,80	6,20	5,60	6,10	5,90
72	6,30	5,70	6,00	6,00	5,70	6,00	5,40	5,90	5,80
96	6,20	5,40	5,90	6,00	5,70	5,90	5,20	5,80	5,60
120	5,80	5,40	5,60	5,50	5,60	5,80	4,90	5,50	5,20

### Evaluación de pH durante el proceso de fermentación de los tratamientos en estudio.

Tiempo. (h.)	S1I1	S1I2	S1I3	S2I1	S2I2	S2I3	S3I1	S3I2	S3I3
0	6,900	6,900	6,900	6,900	6,900	6,900	6,900	6,900	6,900
24	5,500	6,900	6,600	5,700	6,100	4,700	7,000	4,700	4,500
48	5,500	5,400	6,500	4,500	5,700	4,600	6,700	4,600	4,500
72	5,300	4,600	6,300	4,400	5,500	4,500	5,600	4,400	4,600
96	5,100	4,600	4,700	4,400	4,600	4,400	5,200	4,200	4,500
120	4,600	4,500	4,600	4,400	4,600	4,300	4,300	4,000	4,400

### Evaluación de glucosa (mg/ml) durante los 120 horas del proceso de fermentación.

Tiemp (h)	S1I1	S1I2	S1I3	S2I1	S2I2	S2I3	S3I1	S3I2	S3I3
0	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000
24	2,390	2,274	2,384	2,376	2,175	2,408	2,392	2,392	2,390
48	2,268	2,240	2,353	2,337	2,177	0,819	2,364	0,652	2,205
72	0,889	1,272	0,108	2,326	0,140	0,875	2,342	0,360	0,737
96	0,555	0,058	0,058	0,096	0,058	0,332	0,116	0,130	0,105
120	0,071	0,046	0,042	0,258	0,049	0,240	0,079	0,088	0,103

### Anexo III.

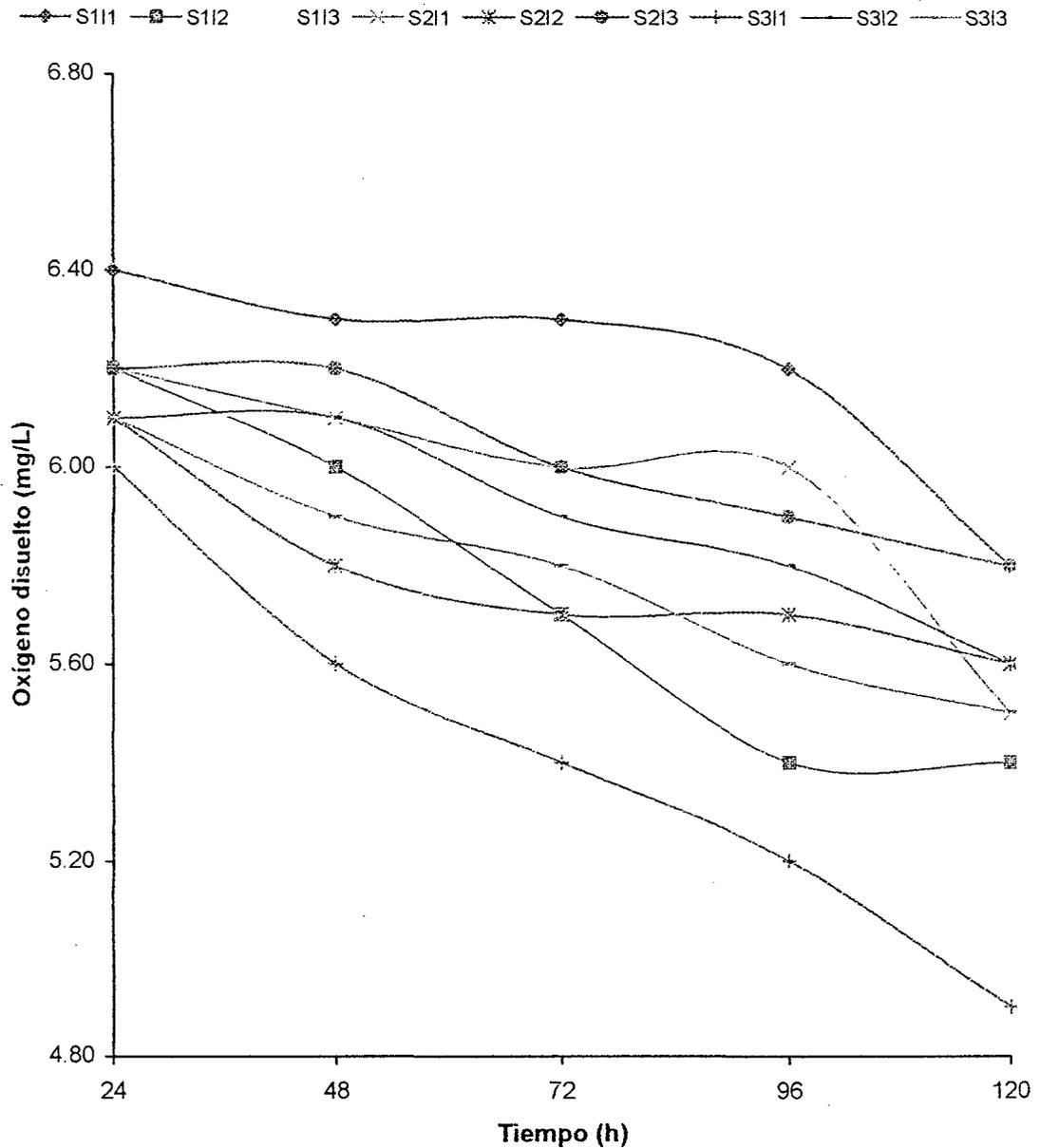
**Cuadro 10: Evaluación de la actividad de la celulasa (IU/ml) durante los 120 horas de proceso de fermentación.**

Tratamiento	24 horas		48 horas		72 horas		96 horas		120 horas	
	Media	±S.D. <sup>1</sup>	Media	±S.D. <sup>1</sup>						
S1I1	0,0048	0,0003	0,0058	0,0001	0,0134	0,0001	0,0197	0,0003	0,0210	0,0003
S1I2	0,0040	0,0003	0,0063	0,0005	0,0084	0,0001	0,0342	0,0002	0,0349	0,0001
S1I3	0,0071	0,0003	0,0112	0,0003	0,0157	0,0006	0,0457	0,0030	0,0483	0,0010
S2I1	0,0060	0,0002	0,0065	0,0003	0,0075	0,0003	0,0523	0,0020	0,0537	0,0010
S2I2	0,0073	0,0001	0,0053	0,0002	0,0058	0,0005	0,0572	0,0010	0,0549	0,0004
S2I3	0,0293	0,0014	0,0322	0,0020	0,0481	0,0090	0,0571	0,0060	0,0574	0,0040
S3I1	0,0041	0,0001	0,0052	0,0001	0,0072	0,0003	0,0580	0,0002	0,0587	0,0010
S3I2	0,0121	0,0001	0,0234	0,0020	0,0327	0,0006	0,0570	0,0010	0,0588	0,0006
S3I3	0,0042	0,0001	0,0089	0,0003	0,0102	0,0010	0,0569	0,0002	0,0593	0,0005

<sup>1</sup>Los valores representan el promedio ± la desviación estándar, de tres repeticiones, S1I1=30 g/L Sustrato - 10 % (v/v) Inóculo; S1I2=30 g/L Sustrato - 15 % (v/v) Inóculo; S1I3=30 g/L Sustrato - 15 % (v/v) Inóculo; S2I1=40 g/L Sustrato - 10 % (v/v) Inóculo; S2I2=40 g/L Sustrato - 15 % (v/v) Inóculo; S2I3=40 g/L Sustrato - 20 % (v/v) Inóculo; S3I1=50 g/L Sustrato - 10 % (v/v) Inóculo; S3I2=50 g/L Sustrato - 15 % (v/v) Inóculo; S3I3=50 g/L Sustrato - 20 % (v/v) Inóculo.

## Anexo IV

### Comportamiento del oxígeno durante los 120 horas del proceso de fermentación

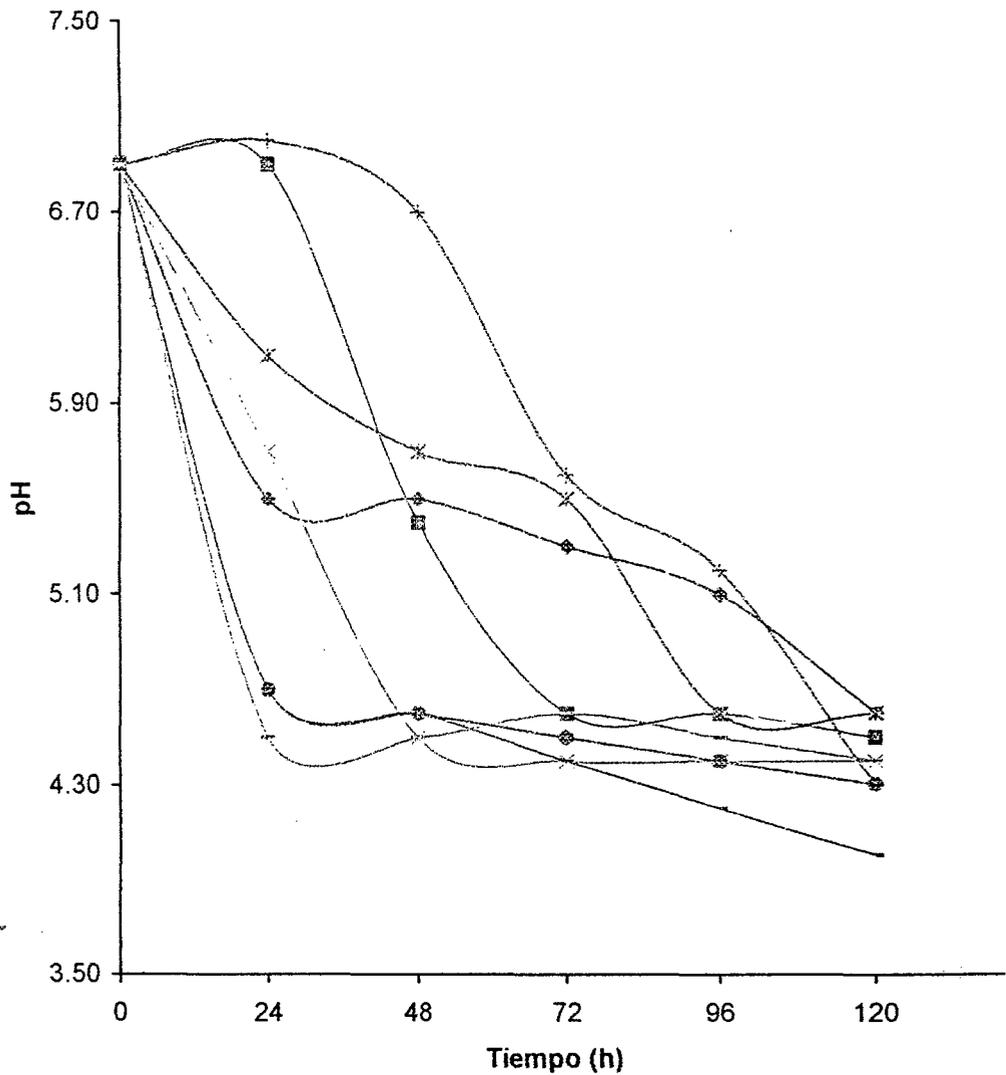


S111=30 g/L Sustrato - 10 % (v/v) Inóculo; S112=30 g/L Sustrato - 15 % (v/v) Inóculo; S113=30 g/L Sustrato - 15 % (v/v) Inóculo; S211=40 g/L Sustrato - 10 % (v/v) Inóculo; S212=40 g/L Sustrato - 15 % (v/v) Inóculo; S213=40 g/L Sustrato - 20 % (v/v) Inóculo; S311=50 g/L Sustrato - 10 % (v/v) Inóculo; S312=50 g/L Sustrato - 15 % (v/v) Inóculo; S313=50 g/L Sustrato - 20 % (v/v) Inóculo.

## Anexo V

Curva de evaluación del pH durante las 120 horas del proceso de fermentación.

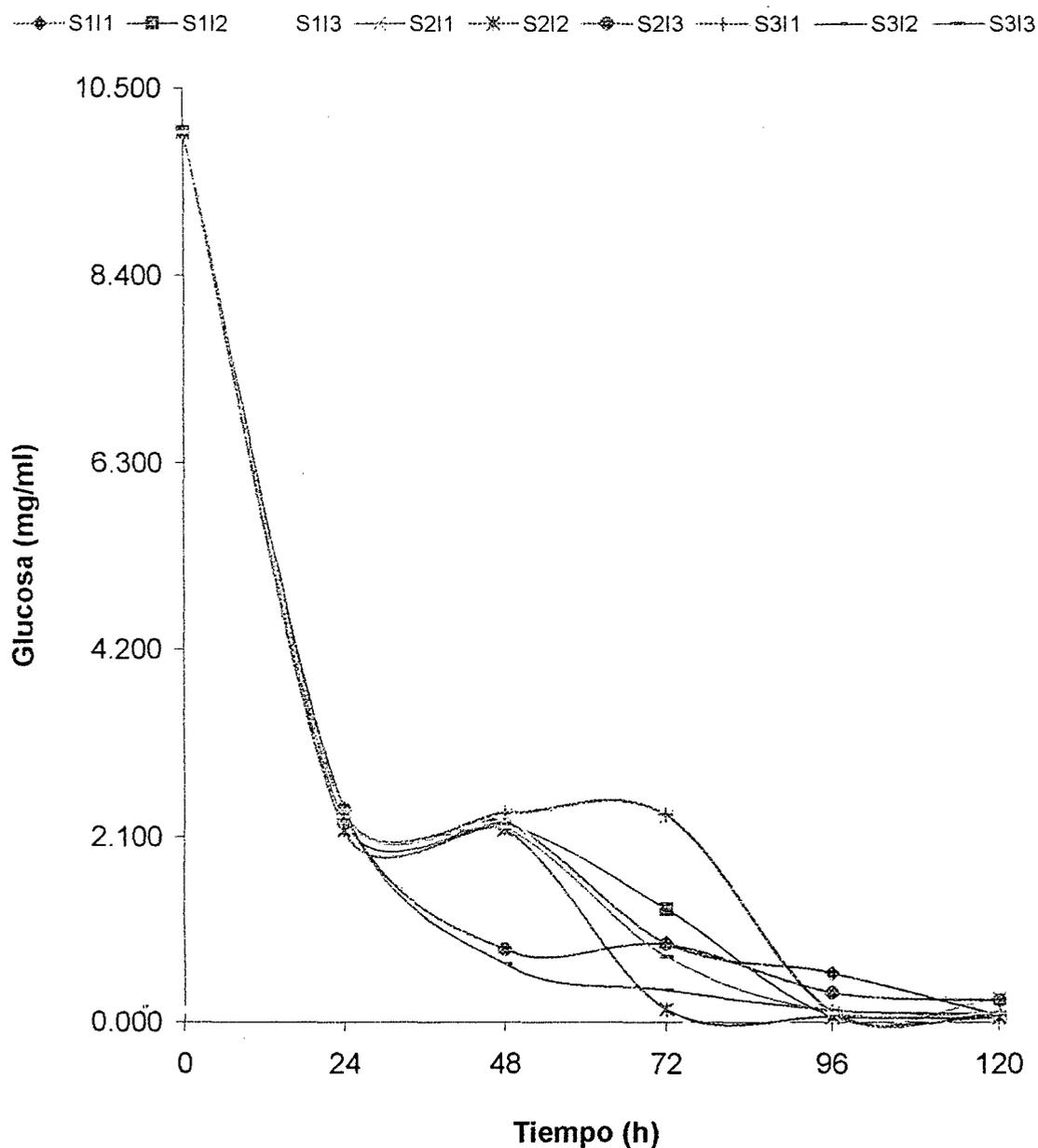
—◆— S111 —■— S112 S113 —×— S211 —\*— S212 —●— S213 —+— S311 —— S312 ——— S313



S111=30 g/L Sustrato - 10 % (v/v) Inóculo; S112=30 g/L Sustrato - 15 % (v/v) Inóculo; S113=30 g/L Sustrato - 15 % (v/v) Inóculo; S211=40 g/L Sustrato - 10 % (v/v) Inóculo; S212=40 g/L Sustrato - 15 % (v/v) Inóculo; S213=40 g/L Sustrato - 20 % (v/v) Inóculo; S311=50 g/L Sustrato - 10 % (v/v) Inóculo; S312=50 g/L Sustrato - 15 % (v/v) Inóculo; S313=50 g/L Sustrato - 20 % (v/v) Inóculo.

## Anexo VI

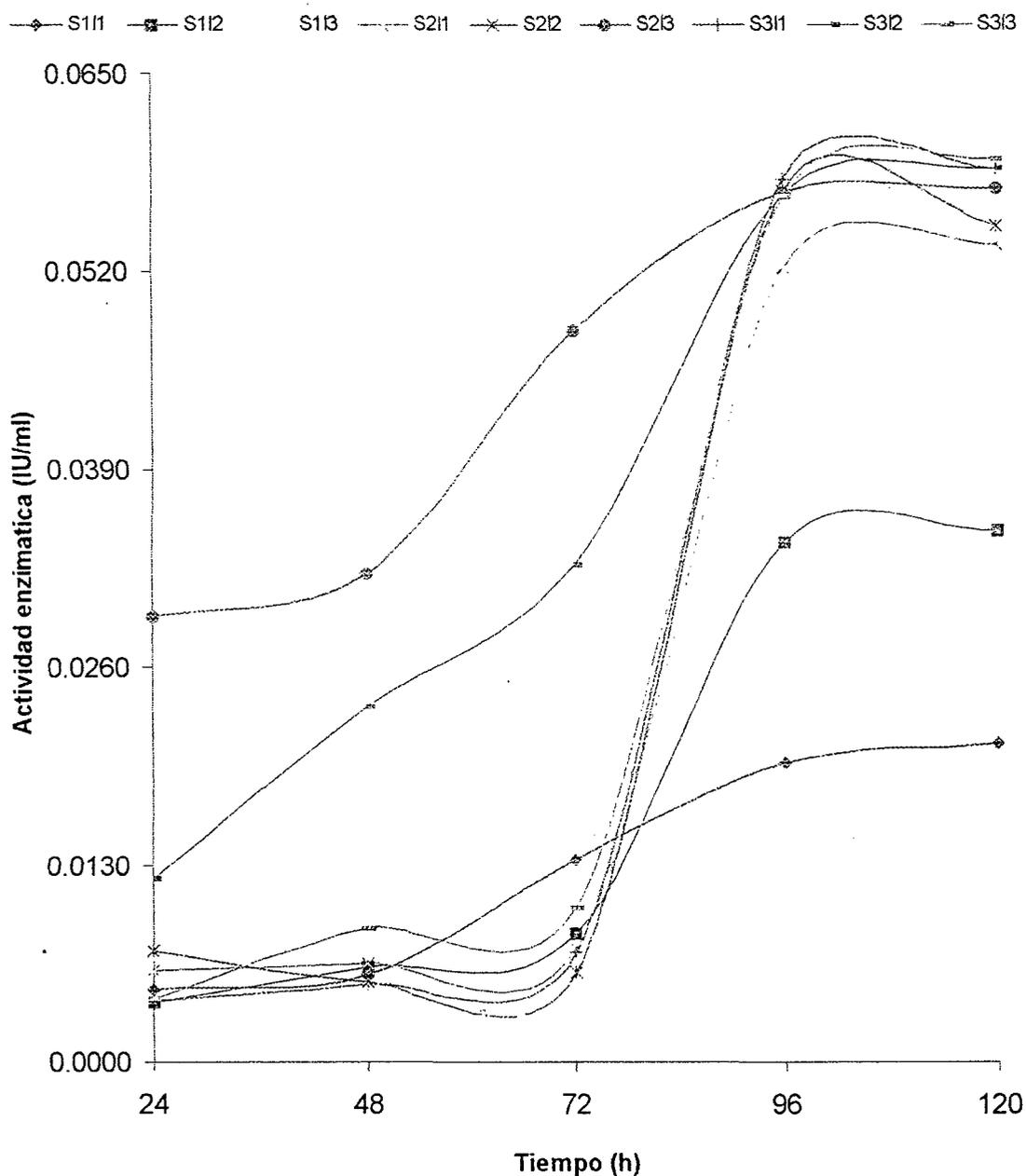
### Curva de evaluación del consumo de glucosa durante las 120 horas del proceso de fermentación



S111=30 g/L Sustrato - 10 % (v/v) Inóculo; S112=30 g/L Sustrato - 15 % (v/v) Inóculo; S113=30 g/L Sustrato - 15 % (v/v) Inóculo; S211=40 g/L Sustrato - 10 % (v/v) Inóculo; S212=40 g/L Sustrato - 15 % (v/v) Inóculo; S213=40 g/L Sustrato - 20 % (v/v) Inóculo; S311=50 g/L Sustrato - 10 % (v/v) Inóculo; S312=50 g/L Sustrato - 15 % (v/v) Inóculo; S313=50 g/L Sustrato - 20 % (v/v) Inóculo.

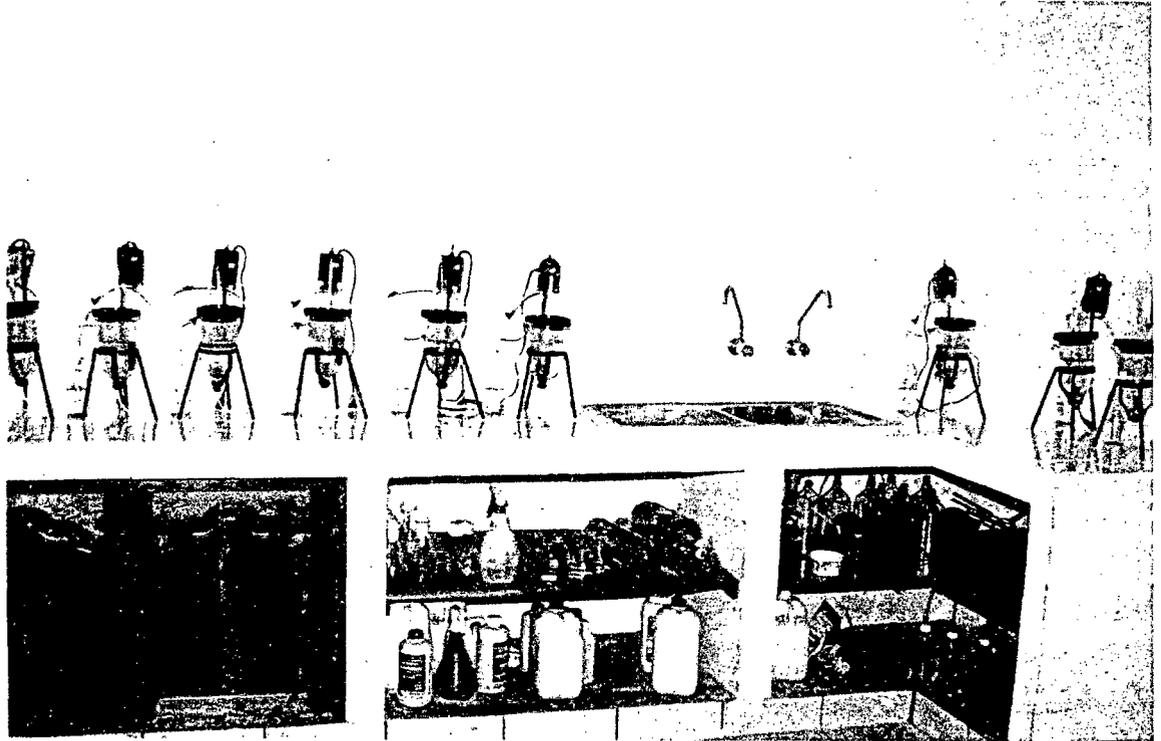
## Anexo VII

### Curva de evaluación de la actividad enzimática, durante 120 horas de proceso de fermentación

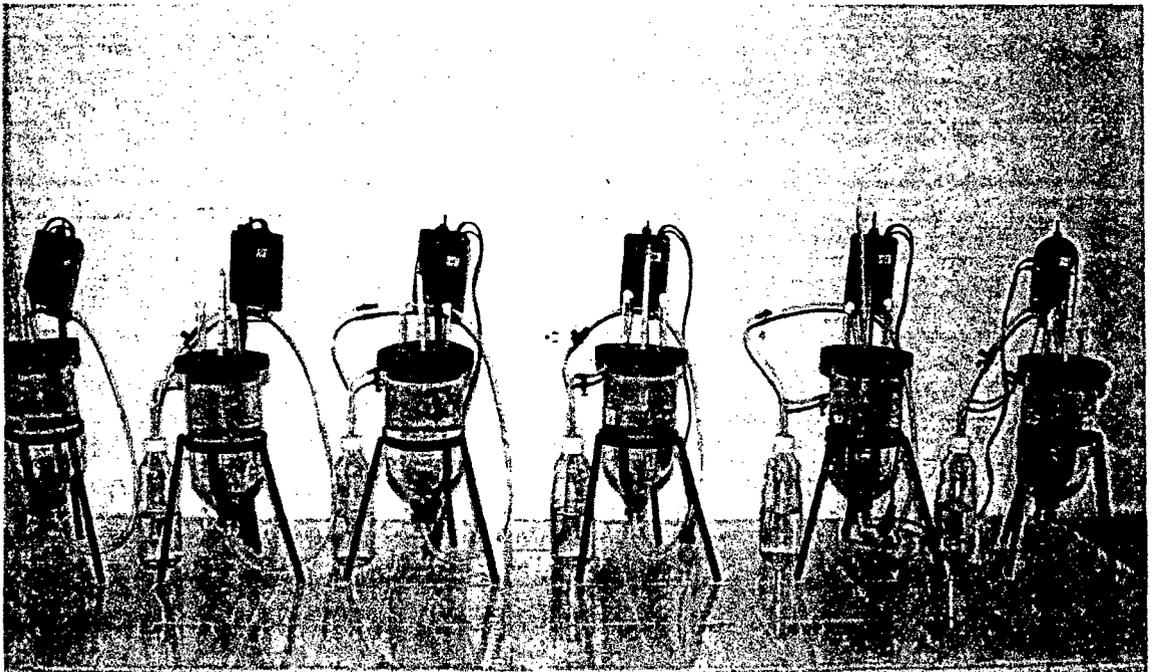


S111=30 g/L Sustrato - 10 % (v/v) Inóculo; S112=30 g/L Sustrato - 15 % (v/v) Inóculo; S113=30 g/L Sustrato - 15 % (v/v) Inóculo; S211=40 g/L Sustrato - 10 % (v/v) Inóculo; S212=40 g/L Sustrato - 15 % (v/v) Inóculo; S213=40 g/L Sustrato - 20 % (v/v) Inóculo; S311=50 g/L Sustrato - 10 % (v/v) Inóculo; S312=50 g/L Sustrato - 15 % (v/v) Inóculo; S313=50 g/L Sustrato - 20 % (v/v) Inóculo.

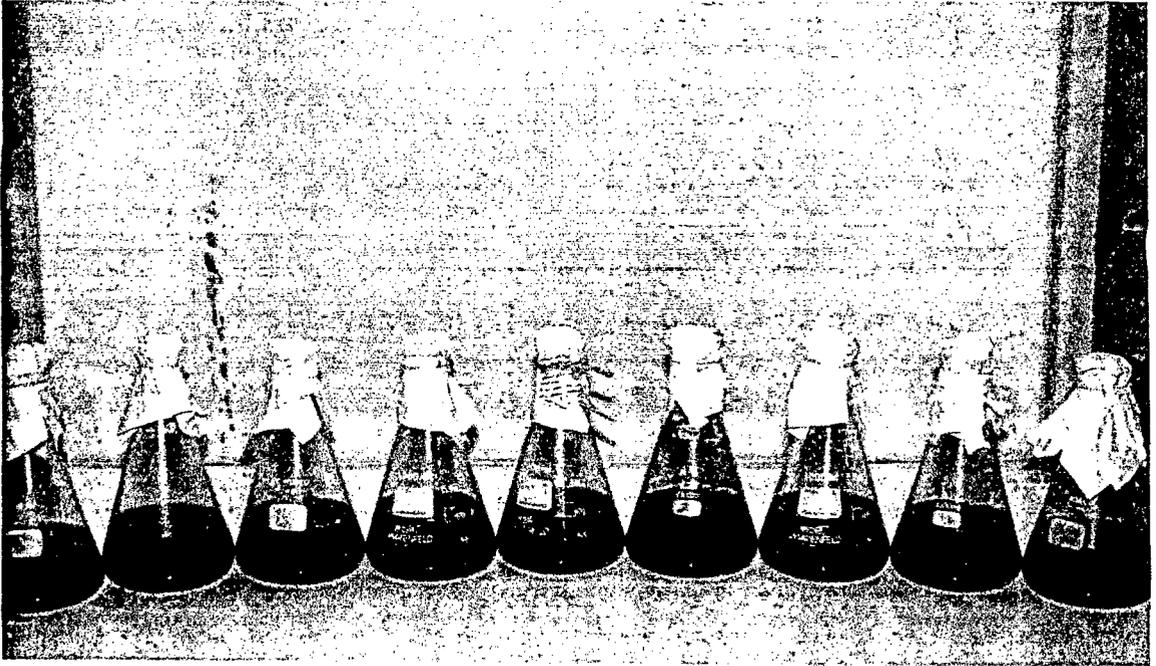
## ANEXO VIII



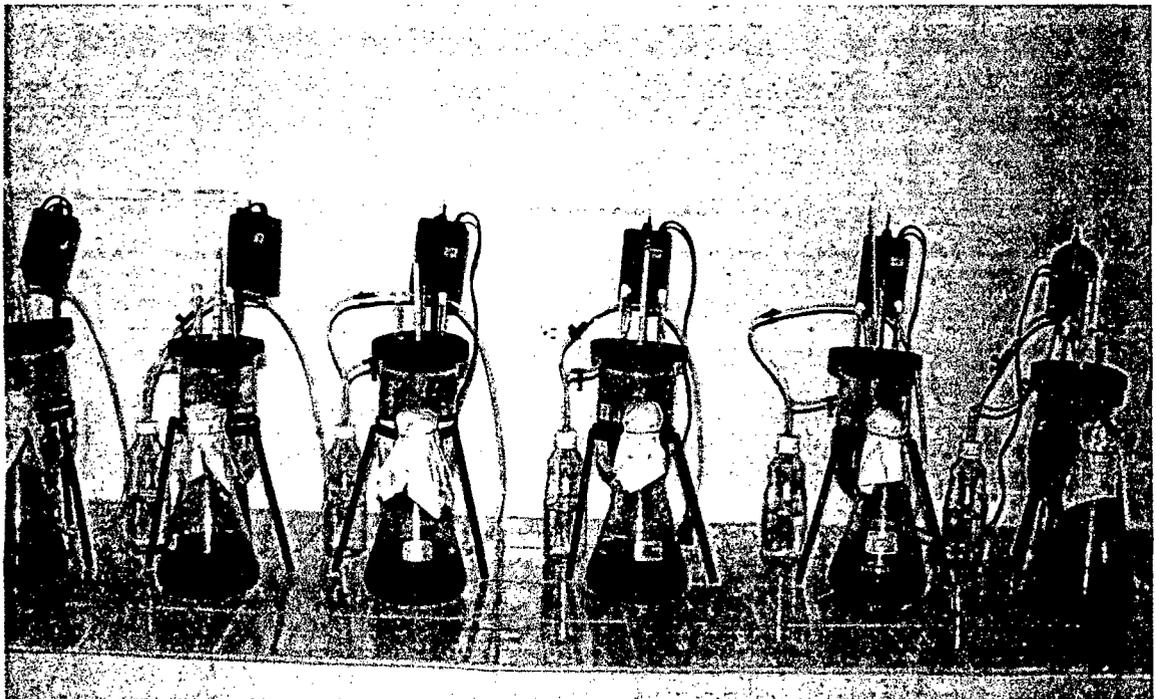
Biorreactores en pleno proceso de esterilización



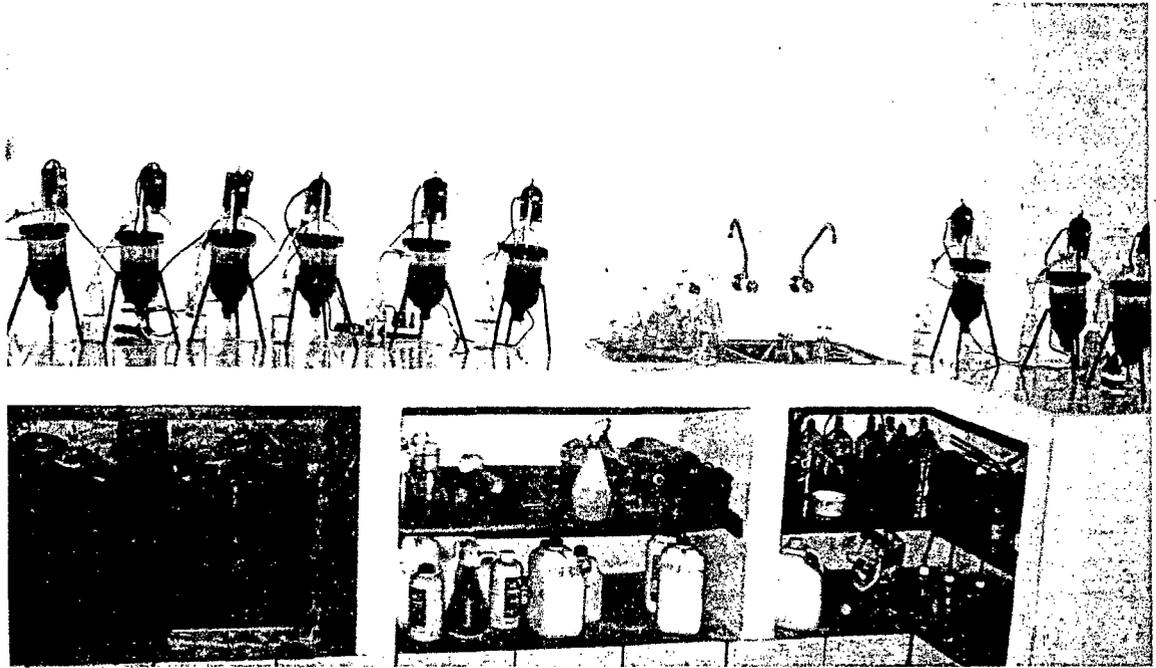
Biorreactores después del esterilizado, en proceso de lavado con agua destilada estéril.



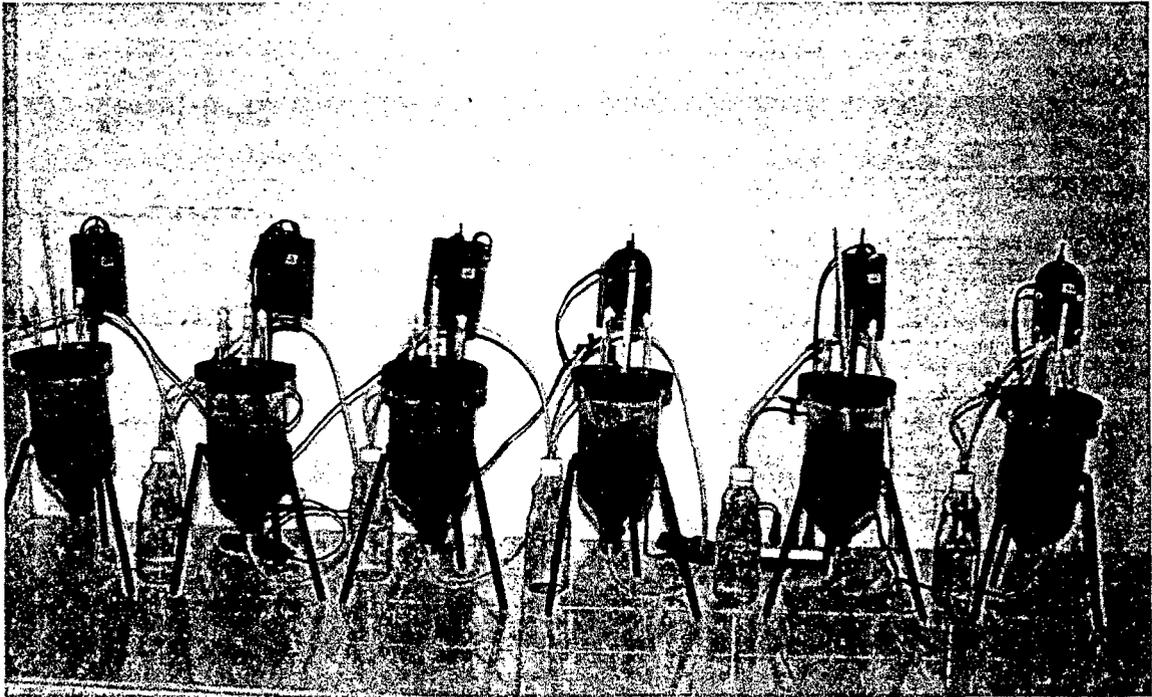
Preparado nutritivo en etapa de enfriamiento después del esterilizado



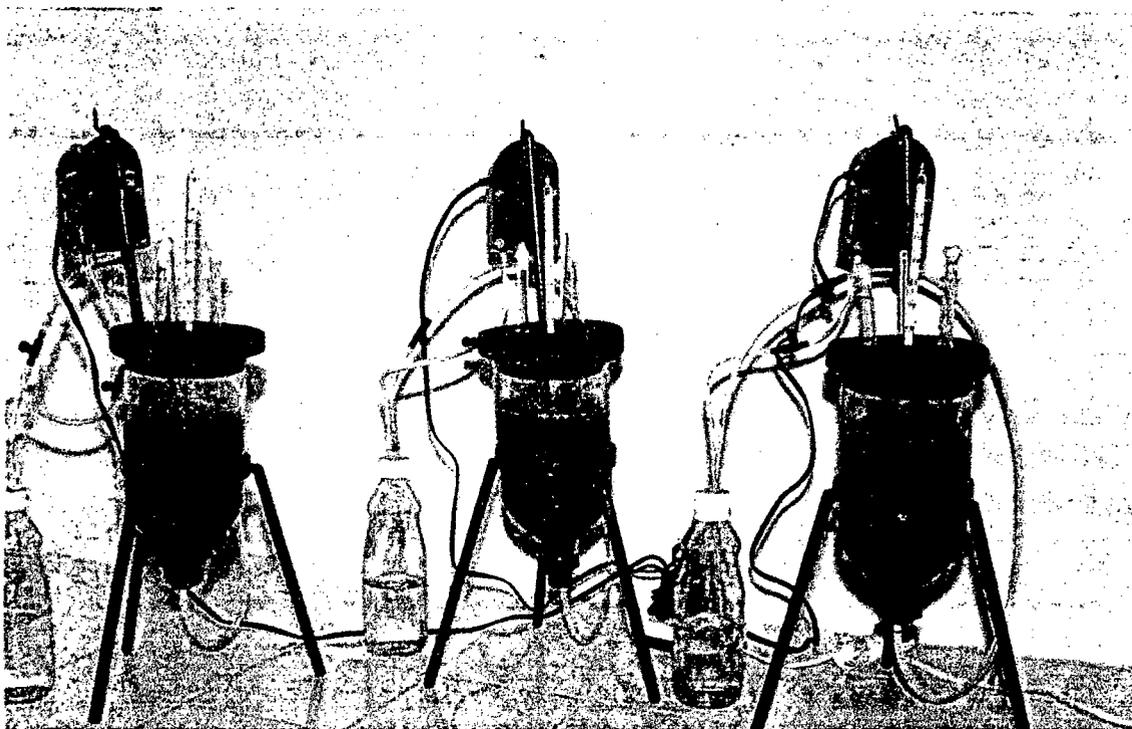
Biorreactores y medio nutritivos listos para iniciar el proceso de fermentación.



Inicio del proceso de fermentación sumergida



A los tres días del proceso de fermentación sumergida



Proceso de fermentación sumergida en fase terminal