

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Evaluación de extractos de enzimas lignocelulolíticas del hongo  
*Trichoderma harzianum* en la generación de azúcares fermentables  
a partir de vaina de frijol

Trabajo de graduación presentado por Luigi Alfonso Cabrera Cortés  
para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería en Biotecnología  
Industrial

Guatemala,

2023







UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Evaluación de extractos de enzimas lignocelulolíticas del hongo  
*Trichoderma harzianum* en la generación de azúcares fermentables  
a partir de vaina de frijol


Trabajo de graduación presentado por Luigi Alfonso Cabrera Cortés  
para optar al grado académico de Licenciado en Ingeniería en Biotecnología  
Industrial

Guatemala,

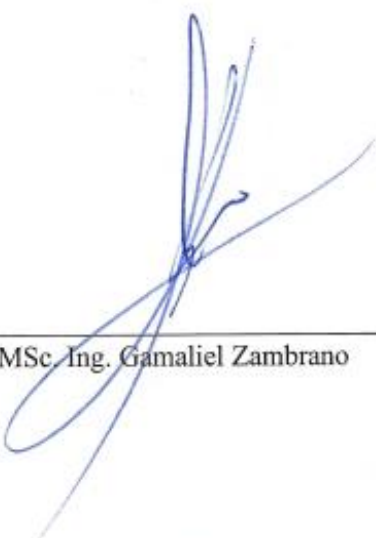
2023



Vo.Bo.

(f)   
MSc. Ing. Eduard Peters

Tribunal examinador:

(f)   
MSc. Ing. Gamaliel Zambrano

(f)   
MSc. y MBA. Ing. Luis Núñez

(f)   
MSc. Ing. Eduard Peters

Fecha de aprobación del examen de graduación:

Guatemala, 05 de enero de 2023





## Prefacio

A lo largo de mi carrera siempre he tenido interés en utilizar microorganismos y enzimas para obtener productos que serían muy difíciles de obtener por procesos químicos o físicos y en especial ha llamado mi atención la posibilidad de utilizar residuos como materia prima para obtener un producto de mayor valor agregado a partir de ellos. Con esto, en mi trabajo de graduación quise aplicar los conocimientos que adquirí en el transcurso de la licenciatura y quise aprovechar algún residuo que existe en Guatemala para obtener un producto de mayor valor.

Pero también quise utilizar un residuo cuyo aprovechamiento no estuviera tan estudiado, como el rastrojo de maíz o el bagazo, para iniciar una línea de investigación y que en el futuro se tuviera un mejor aprovechamiento del residuo, tanto a nivel nacional como internacional. Por ello, quise utilizar la vaina de frijol ya que tenía acceso a ella y es un residuo que se produce ampliamente en Guatemala, pero no se le da un uso productivo e incluso puede llegar a ser un problema para los agricultores.

Luego de una etapa de investigación y revisión de literatura no encontré muchas aplicaciones para la vaina de frijol por lo que tuve que verificar con qué microorganismos podría trabajar y las características que podría aprovechar de ellos. De todos los microorganismos del cepario, me llamó la atención el hongo *Trichoderma harzianum* ya que se ha comprobado que puede producir enzimas lignocelulolíticas al crecer en un sustrato lignocelulósico como lo es la vaina de frijol. Por eso, decidí utilizarlo para producir estas enzimas al usar la vaina de frijol como inductor. Pero también les quise dar una aplicación a las enzimas producidas para mostrar la importancia de su producción y la relevancia que puede tener la vaina de frijol.

Para ello, quise utilizar las enzimas producidas para hidrolizar más vaina de frijol ya que serían enzimas especializadas para ello, puesto que para crecer el hongo tendría que haber producido estas enzimas para que liberaran azúcares y pudiera crecer, y que los azúcares liberados por la hidrólisis enzimática fueran aprovechados por levaduras para producir etanol. De los métodos para producir etanol con residuos lignocelulósicos, me llamó más la atención la sacarificación y fermentación simultánea, en la que en el mismo medio se lleva a cabo la hidrólisis enzimática para la producción de azúcares y su consumo por las levaduras para la producción de etanol, por lo que fue el método utilizado en esta investigación.

Cabe mencionar que esta investigación fue apoyada con materiales, reactivos y equipos del Departamento de Ingeniería Química, Química Industrial y Biotecnología Industrial de la Universidad del Valle de Guatemala, al cual expreso un profundo agradecimiento.

De igual forma, agradezco al Sr. Salvador Castellanos por haberme donado la vaina de frijol utilizada, sin la cual no habría sido posible llevar a cabo este estudio. Agradezco a las personas que me apoyaron en la elaboración del trabajo de graduación, en especial a mi asesor el MSc. Ing.

Eduard Peters quien me apoyó en la delimitación del trabajo y me guio en la redacción del trabajo escrito. También agradezco al MSc. y MBA. Ing. Luis Núñez por su apoyo y consejos en la elaboración del trabajo escrito. Así mismo, agradezco al Lic. Carlo Martínez por su asesoría y apoyo durante el trabajo en el laboratorio. Finalmente, agradezco a la Licda. Ana Luisa Mendizábal por haber realizado los análisis de HPLC con los cuales obtuve algunos resultados de mi investigación.

# CONTENIDO

	Página
Prefacio.....	ix
LISTA DE CUADROS .....	xiii
LISTA DE FIGURAS .....	xv
LISTA DE ECUACIONES .....	xix
Resumen .....	xxi
Abstract .....	xxiii
I. Introducción.....	1
II. Antecedentes.....	3
III. Justificación .....	7
IV. Objetivos.....	9
V. Marco teórico.....	11
A. Residuos lignocelulósicos.....	11
B. Vaina de frijol .....	14
C. Hidrólisis de lignocelulosa.....	15
D. Enzimas lignocelulolíticas .....	17
E. <i>Trichoderma harzianum</i> .....	22
F. Producción de enzimas hidrolíticas a partir de <i>Trichoderma harzianum</i> .....	25
G. Extracción y purificación de enzimas .....	27
H. Producción de etanol y sus aplicaciones .....	28
I. Producción de etanol a partir de residuos lignocelulósicos .....	30
J. Cromatografía líquida de alta resolución.....	32
K. Otros métodos analíticos.....	34
VI. Metodología.....	35
A. Pretratamiento de la vaina de frijol.....	35
B. Propagación inicial del hongo.....	36
C. Inducción de producción de enzimas en medio con vaina de frijol.....	39
D. Extracción de enzimas .....	41
E. Determinación de actividad enzimática.....	42
F. Hidrólisis alcalina de la vaina de frijol .....	44
G. Hidrólisis enzimática de la vaina de frijol.....	45

H.	Fermentación alcohólica .....	46
I.	Determinación de etanol y azúcares .....	48
J.	Pruebas en biorreactor .....	50
K.	Análisis de error estadístico .....	54
VII.	Resultados.....	57
A.	Pretratamiento de la vaina de frijol utilizada .....	57
B.	Inducción de producción de enzimas en medio con vaina de frijol.....	58
C.	Extracción de enzimas y actividad enzimática.....	59
D.	Hidrólisis alcalina de la vaina de frijol .....	61
E.	Fermentación alcohólica .....	63
F.	Resultados de pruebas en biorreactor .....	64
VIII.	Análisis de resultados .....	67
IX.	Conclusiones .....	83
X.	Recomendaciones.....	85
XI.	Bibliografía .....	87
XII.	Anexos .....	93
A.	Imágenes de la experimentación .....	93
B.	Diagramas de los sistemas .....	115
C.	Datos originales.....	117
D.	Cálculos de muestra.....	123
E.	Datos calculados.....	130
F.	Análisis de error .....	135
G.	Datos de placa de equipos utilizados .....	141
H.	Reactivos utilizados en la experimentación .....	143
I.	Glosario .....	144

## LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Características de la vaina de frijol utilizada en el trabajo de graduación.....	57
Cuadro 2. Formulación de los medios de cultivo con vaina de frijol para inducir la producción de enzimas lignocelulolíticas .....	59
Cuadro 3. Características de los extractos enzimáticos obtenidos en las fermentaciones con <i>T. harzianum</i> usando vaina de frijol como inductor de la producción enzimática.....	59
Cuadro 4. Actividad enzimática de los extractos obtenidos en unidades de papel filtro por mililitro .....	60
Cuadro 5. Comparación de azúcares reductores en forma de glucosa liberados por la vaina de frijol hidrolizada químicamente y por la vaina sin hidrolizar .....	61
Cuadro 6. Conversión de la vaina de frijol en la producción de azúcares reductores en forma de glucosa con la hidrólisis enzimática.....	61
Cuadro 7. Concentración final de etanol, glucosa y fructosa en la fermentación alcohólica llevada a cabo en Erlenmeyers con deflectores .....	63
Cuadro 8. Características del extracto enzimático obtenido en la fermentación con el hongo <i>T. harzianum</i> en la producción enzimática usando un biorreactor de 1 L.....	64
Cuadro 9. Resultados de la sacarificación y fermentación simultánea con la levadura <i>S. cerevisiae</i> en la producción de etanol a partir de vaina de frijol usando un biorreactor de 1 L. ....	64
Cuadro 10. Medición de las dimensiones de la vaina de frijol utilizada en el estudio.....	117
Cuadro 11. Medición de la humedad inicial de la vaina utilizada en el estudio en porcentaje masa/masa .....	117
Cuadro 12. Masas obtenidas en el proceso de molienda de la vaina de frijol.....	117
Cuadro 13. Masa de la harina que quedó en cada malla del análisis granulométrico .....	117
Cuadro 14. Masa y volumen de los reactivos utilizados para preparar los medios de cultivo con vaina de frijol para inducir la producción de enzimas lignocelulolíticas .....	118
Cuadro 15. Masa de los envases en los cuales se almacenaron los extractos enzimáticos obtenidos luego de la centrifugación y de los beakers con los cuales se determinó el porcentaje de sólidos .....	118
Cuadro 16. Absorbancias de los estándares de glucosa usados en la curva de calibración para determinar azúcares reductores.....	119
Cuadro 17. Absorbancias de las muestras analizadas en la determinación de la actividad enzimática con el ensayo de papel filtro.....	119
Cuadro 18. Absorbancias de las muestras luego de diferentes tiempos en la hidrólisis enzimática de la vaina de frijol.....	120
Cuadro 19. Señal del área del índice de refracción por el tiempo de los estándares utilizados para elaborar las curvas de calibración de etanol y azúcares a diferentes concentraciones en HPLC..	120
Cuadro 20. Señal del área del índice de refracción por el tiempo de las muestras analizadas en HPLC para la determinación de etanol, glucosa y fructosa en la fermentación en Erlenmeyers .....	121
Cuadro 21. Masas del extracto enzimático, sólidos disueltos, vaina y biomasa fúngica de la producción enzimática en el biorreactor de 1 L.....	121
Cuadro 22. Absorbancias de las muestras del extracto enzimático obtenido del biorreactor en la determinación de la actividad enzimática con el ensayo de papel filtro .....	122

Cuadro 23. Conteo de las levaduras en el biorreactor durante la fermentación alcohólica usando la cámara de Neubauer.....	122
Cuadro 24. Datos utilizados para calcular la concentración de las levaduras en peso seco en el inóculo inicial .....	122
Cuadro 25. Señal del área del índice de refracción por el tiempo de las muestras analizadas en HPLC para la determinación de etanol, sacarosa, glucosa y fructosa en la fermentación alcohólica en el biorreactor de 1 L.....	123
Cuadro 26. Masas de la vaina y biomasa en el biorreactor de 1 L en la sacarificación y fermentación simultánea.....	123
Cuadro 27. Masa y porcentaje de masa retenida en las mallas del análisis granulométrico.....	130
Cuadro 28. Porcentaje de masa de harina que pasó en las mallas del análisis granulométrico ....	130
Cuadro 29. Constantes obtenidas en la regresión lineal utilizada para calcular la concentración de azúcares reductores en forma de glucosa .....	130
Cuadro 30. Glucosa liberada del papel filtro en la hidrólisis enzimática y concentración de la enzima que libera la cantidad crítica de glucosa.....	131
Cuadro 31. Azúcares reductores en forma de glucosa liberados de la vaina de frijol por la hidrólisis enzimática luego de diferentes tiempos de hidrólisis.....	131
Cuadro. 32. Constantes obtenidas en las regresiones lineales utilizadas para calcular la concentración de azúcares y etanol analizados en HPLC.....	132
Cuadro 33. Concentración final de etanol, glucosa y fructosa en la fermentación llevada a cabo en Erlenmeyers con deflectores.....	132
Cuadro 34. Glucosa liberada del papel filtro en la hidrólisis enzimática y concentración de la enzima que libera la cantidad crítica de glucosa en las muestras del biorreactor .....	133
Cuadro 35. Actividad enzimática de los extractos obtenidos en unidades de papel filtro por mililitro de las muestras del biorreactor .....	133
Cuadro 36. Promedio del conteo de las levaduras en el biorreactor durante la fermentación alcohólica usando la cámara de Neubauer.....	133
Cuadro 37. Concentración de las levaduras en el biorreactor en el cual se llevó a cabo la fermentación alcohólica en número de células por mL.....	134
Cuadro 38. Concentración de las levaduras en el biorreactor en el cual se llevó a cabo la fermentación alcohólica en peso seco por mL.....	134
Cuadro 39. Concentración de sacarosa, glucosa, fructosa y etanol en la fermentación llevada a cabo en el Biorreactor de 1 L a diferentes instantes de tiempo.....	134
Cuadro 40. Concentración de la vaina de frijol sobrante y de sólidos disueltos en la sacarificación y fermentación simultánea.....	135
Cuadro 41. Logaritmo de la concentración de las levaduras en el biorreactor y velocidad específica de crecimiento.....	135
Cuadro 42. Error del ensayo de papel filtro para determinar la actividad enzimática utilizando el método DNS para la cuantificación de azúcares reductores.....	139
Cuadro 43. Datos de placa de los principales equipos utilizados durante la experimentación .....	141
Cuadro 44. Principales reactivos utilizados durante la experimentación .....	143

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representación esquemática de la pared celular de las plantas.....	12
Figura 2. Representación de la estructura de la lignocelulosa .....	13
Figura 3. Modelo estructural de la lignina en madera aserrada .....	13
Figura 4. Reacción enzimática de las peroxidasas. ....	18
Figura 5. Reacción enzimática de las lacasas. ....	19
Figura 6. Representación esquemática de las celulasas sobre la celulosa. ....	20
Figura 7. Representación esquemática de la despolimerización de los componentes de la lignocelulosa.....	21
Figura 8. Diagrama de ciclo de vida de <i>Trichoderma spp.</i> .....	23
Figura 9. Ruta metabólica de la fermentación alcohólica.....	29
Figura 10. Proceso de producción de etanol a partir de maíz y rastrojo de maíz.....	30
Figura 11. Rutas metabólicas en las que se produce etanol a partir de glucosa y xilosa.....	32
Figura 12. Diagrama de funcionamiento de un cromatógrafo líquido de alta resolución.....	33
Figura 13. Reacción colorimétrica de la oxidación de la glucosa por el reactivo DNS .....	34
Figura 14. Histograma de los resultados del análisis granulométrico luego de la molienda de la vaina de frijol.....	57
Figura 15. Distribución del porcentaje de vaina que pasó en las mallas del análisis granulométrico .....	58
Figura 16. Crecimiento del hongo <i>Trichoderma harzianum</i> en el medio con vaina de frijol.....	58
Figura 17. Actividad enzimática de los extractos obtenidos a diferentes concentraciones de vaina de frijol.....	60
Figura 18. Curva de liberación de azúcares en forma de glucosa de la vaina hidrolizada y de la vaina sin hidrolizar químicamente .....	62
Figura 19. Curva de liberación de azúcares en forma de glucosa de la vaina hidrolizada y de la vaina sin hidrolizar a diferentes tiempos con extracto de menor actividad .....	62
Figura 20. Curva de cambio en la concentración celular, etanol y azúcares en el tiempo en la sacarificación y fermentación simultánea en el biorreactor de 1 L.....	65
Figura 21. Curva de crecimiento de la levadura en el tiempo en la sacarificación y fermentación simultánea en el biorreactor de 1 L.....	65
Figura 22. Recepción de la vaina de frijol utilizada en el estudio.....	93
Figura 23. Apariencia de la vaina de frijol utilizada. ....	93
Figura 24. Medición de humedad de la vaina en balanza de humedad .....	93
Figura 25. Molienda de la vaina de frijol en molino de martillos .....	94
Figura 26. Harina obtenida luego de la molienda de la vaina de frijol.....	94
Figura 27. Mallas usadas en el análisis granulométrico de la harina obtenida .....	94
Figura 28. Recuperación inicial de la cepa del hongo <i>Trichoderma harzianum</i> CBS 130681 en caldo nutritivo.....	95
Figura 29. Crecimiento del hongo en placa de agar PDA. ....	95
Figura 30. Crecimiento del hongo observado en el estereoscopio. ....	95
Figura 31. Micrografía del hongo. ....	96
Figura 32. Micrografía del micelio y conidios del hongo.....	96
Figura 33. Medios de cultivo para el pre-inóculo del hongo antes de la incubación. ....	96

Figura 34. Medios de cultivo para el pre-inóculo luego del tiempo de incubación. ....	97
Figura 35. Autoclave utilizada para esterilizar los medios de cultivo en las diferentes fermentaciones .....	97
Figura 36. Preparación de medios de cultivo con vaina de frijol.....	97
Figura 37. Incubación del hongo <i>T. harzianum</i> con vaina de frijol para inducir la producción enzimática.....	98
Figura 38. Medios de cultivo con vaina de frijol para inducir la producción enzimática.....	98
Figura 39. Centrifugadora de 1 L utilizada para obtener los extractos enzimáticos. ....	98
Figura 40. Extracto enzimático obtenido luego del crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> en medio con vaina de frijol como fuente de carbono. ....	99
Figura 41. Ensayo de papel filtro para la determinación de la actividad enzimática. ....	99
Figura 42. Tubos de ensayo con las muestras en ebullición luego de la hidrólisis enzimática.....	99
Figura 43. Dilución de los tubos de reacción en tubos con 20 mL de agua destilada. ....	100
Figura 44. Espectrofotómetro utilizado para medir la absorbancia de las muestras analizadas con el método DNS. ....	100
Figura 45. Vaina de frijol en el medio de reacción luego de la hidrólisis alcalina. ....	100
Figura 46. Vaina hidrolizada luego de la filtración en manta.....	101
Figura 47. Vaina hidrolizada luego del proceso de secado.....	101
Figura 48. Preparación del preinóculo de levadura.....	101
Figura 49. Medios de cultivo usados para la fermentación alcohólica.....	102
Figura 50. Centrifugadora utilizada para clarificar muestras para enviar a HPLC.....	102
Figura 51. Biorreactor utilizado en las fermentaciones.....	102
Figura 52. Equipo complementario del biorreactor usado en las fermentaciones.....	103
Figura 53. Calibración del sensor de oxígeno disuelto.....	103
Figura 54. Burbujeo del medio de fermentación al proporcionar aire al reactor. ....	103
Figura 55. Panel de control del biorreactor en la producción enzimática.....	104
Figura 56. Vaina de frijol y micelio recuperado luego de la producción de enzimas.....	104
Figura 57. Panel de control del biorreactor en la fermentación alcohólica.....	105
Figura 58. Recuento de las levaduras presentes en el biorreactor en la fermentación alcohólica utilizando la cámara de Neubauer.....	105
Figura 59. Cromatograma del resultado de la fermentación en el Erlenmeyer 1 con vaina de frijol sin hidrólisis alcalina.....	106
Figura 60. Cromatograma del resultado de la fermentación en el Erlenmeyer 2 con vaina de frijol sin hidrólisis alcalina.....	106
Figura 61. Cromatograma del resultado de la fermentación en el Erlenmeyer 3 con vaina de frijol sin hidrólisis alcalina.....	106
Figura 62. Cromatograma del resultado de la fermentación en el Erlenmeyer 1 con vaina de frijol sometida a hidrólisis alcalina.....	107
Figura 63. Cromatograma del resultado de la fermentación en el Erlenmeyer 2 con vaina de frijol sometida a hidrólisis alcalina.....	107
Figura 64. Cromatograma del resultado de la fermentación en el Erlenmeyer 3 con vaina de frijol sometida a hidrólisis alcalina.....	108
Figura 65. Cromatograma del resultado de la fermentación en el control con vaina de frijol sin hidrólisis alcalina y sin levadura.....	108



Figura 66. Cromatograma del resultado de la fermentación en el control con vaina de frijol sometida a hidrólisis alcalina sin levadura .....	109
Figura 67. Cromatograma del resultado de la fermentación en el control con vaina de frijol sin hidrólisis alcalina y sin extracto enzimático .....	109
Figura 68. Cromatograma del resultado de la fermentación en el control con vaina de frijol sometida a hidrólisis alcalina sin extracto enzimático .....	110
Figura 69. Cromatograma del resultado de la fermentación en el control sin vaina de frijol .....	110
Figura 70. Cromatograma del extracto enzimático obtenido en el biorreactor de 1 L .....	111
Figura 71. Cromatograma del medio en la fermentación alcohólica en el reactor de 1 L a las 22 h de fermentación .....	111
Figura 72. Cromatograma del medio en la fermentación alcohólica en el reactor de 1 L a las 47 h de fermentación .....	112
Figura 73. Cromatograma del medio en la fermentación alcohólica en el reactor de 1 L a las 70 h de fermentación .....	112
Figura 74. Cromatograma de la muestra 1 del medio en la fermentación alcohólica en el reactor de 1 L a las 88 h de fermentación .....	113
Figura 75. Cromatograma de la muestra 2 del medio en la fermentación alcohólica en el reactor de 1 L a las 88 h de fermentación .....	113
Figura 76. Cromatograma de la muestra 3 del medio en la fermentación alcohólica en el reactor de 1 L a las 88 h de fermentación .....	114
Figura 77. Diagrama del equipo y balance de masa de la producción enzimática con el hongo <i>T. harzianum</i> usando vaina de frijol como inductor .....	115
Figura 78. Diagrama del equipo y balance de masa del sistema de sacarificación y fermentación simultánea usando vaina de frijol como fuente de carbono .....	116
Figura 79. Curva de calibración de azúcares reductores en forma de glucosa utilizada con el método DNS .....	138
Figura 80. Curva de calibración de sacarosa en el equipo HPLC con índice de refracción .....	139
Figura 81. Curva de calibración de glucosa en el equipo HPLC con índice de refracción .....	140
Figura 82. Curva de calibración de fructosa en el equipo HPLC con índice de refracción .....	140
Figura 83. Curva de calibración de etanol en el equipo HPLC con índice de refracción .....	141



## LISTA DE ECUACIONES

	Página
Ecuación 1. Masa retenida en las mallas utilizadas en el análisis granulométrico de la harina de vaina de frijol.....	123
Ecuación 2. Porcentaje de masa de harina que pasó en las mallas del análisis granulométrico ...	124
Ecuación 3. Concentración de los reactivos en el medio de cultivo usado para inducir la producción de enzimas usando vaina de frijol. ....	124
Ecuación 4. Masa del extracto enzimático obtenido .....	124
Ecuación 5. Concentración de sólidos en el extracto obtenido .....	125
Ecuación 6. Concentración de glucosa liberada del papel filtro en la determinación de la actividad enzimática.....	125
Ecuación 7. Actividad enzimática de las celulasas producidas en unidades de papel filtro .....	125
Ecuación 8. Actividad enzimática de las celulasas producidas en unidades de papel filtro para bajas actividades .....	126
Ecuación 9. Conversión de la vaina en la producción de azúcares reductores en forma de glucosa .....	126
Ecuación 10. Concentración del analito analizado en HPLC .....	126
Ecuación 11. Porcentaje de viabilidad de las levaduras presentes en la fermentación alcohólica	127
Ecuación 12. Concentración de células en el medio de fermentación en células por mL .....	127
Ecuación 13. Concentración de células en el medio de fermentación en peso seco por mL .....	127
Ecuación 14. Concentración de la vaina de frijol sobrante en la fermentación alcohólica.....	128
Ecuación 15. Rendimiento de la producción de etanol a partir de la vaina de frijol .....	128
Ecuación 16. Rendimiento de la producción de biomasa a partir de la vaina de frijol.....	129
Ecuación 17. Velocidad específica de crecimiento de las levaduras.....	129
Ecuación 18. Tiempo de generación de las levaduras.....	129
Ecuación 19. Media aritmética: .....	135
Ecuación 20. Desviación estándar: .....	136
Ecuación 21. Intervalo de confianza: .....	136
Ecuación 22. Coeficiente de variación: .....	136
Ecuación 23. Propagación de error para multiplicación y división.....	137
Ecuación 24. Propagación de error para sumas y restas.....	137
Ecuación 25. Propagación de error para logaritmos.....	138



## Resumen

La vaina de frijol es un residuo lignocelulósico que, para aprovechar, es necesario hidrolizar para liberar azúcares fermentables. El objetivo de este estudio fue evaluar extractos de enzimas lignocelulolíticas producidas por el hongo *Trichoderma harzianum* en una fermentación sumergida usando vaina de frijol como inductor, para la generación de azúcares fermentables a partir de la hidrólisis enzimática de la vaina. Para ello, fue necesario moler la vaina para trabajar con un D70 de 0.828 mm. Luego, se realizó la propagación del hongo para cultivarlo en medios con vaina de frijol. De estos medios se obtuvo extractos enzimáticos cuya actividad se determinó con el ensayo de papel filtro. La mayor actividad se obtuvo con una concentración de vaina de  $12.5 \pm 0.3$  g/L, la cual fue de  $0.298 \pm 0.037$  FPU/mL. Se evaluó la influencia de una hidrólisis alcalina a la vaina en la producción de azúcares tanto en una hidrólisis enzimática como en una sacarificación y fermentación simultánea para la producción de etanol a partir de la vaina. El etanol se cuantificó mediante HPLC. Se observó que este pretratamiento no tiene una influencia significativa, ya que el intervalo de confianza de los azúcares liberados por la vaina con el pretratamiento ( $3.23 \pm 8.92$  g/L) y sin él ( $3.55 \pm 7.44$  g/L) se traslapan, así como en la producción de etanol, los cuales fueron de  $0.056 \pm 0.006$  y  $0.063 \pm 0.013$  % (m/v) respectivamente. La producción enzimática y la de etanol se realizaron en un biorreactor de 1 L obteniendo un extracto con una actividad de  $0.178 \pm 0.002$  FPU/mL. La concentración de etanol obtenida fue de  $1.36 \pm 0.48$  g/L con un rendimiento respecto al consumo de vaina del  $39.3 \pm 11.2$  %. El rendimiento de la producción de levaduras respecto al sustrato fue mayor, del  $69.9 \pm 29.5$  %. Para futuras investigaciones se recomienda optimizar y estandarizar las condiciones de operación para maximizar el rendimiento, así como utilizar levaduras modificadas que expresen enzimas lignocelulolíticas y que metabolicen pentosas para llevar a cabo un bioproceso consolidado en el que la levadura produzca enzimas para hidrolizar la vaina y que use los azúcares liberados para producir etanol en un solo reactor.



## Abstract

The bean pod is a lignocellulosic residue that, to be used, must be hydrolyzed to release fermentable sugars from it. The objective of this study was to evaluate extracts of lignocellulolytic enzymes produced by the fungus *Trichoderma harzianum* in a submerged fermentation using the bean pod as inducer, for the generation of fermentable sugars from the enzymatic hydrolysis of the pod. For this, it was necessary to grind the pod to work with a D70 of 0.828 mm. Then, the fungus was propagated to cultivate it in media with bean pod. Enzymatic extracts were obtained from these media, whose activity was determined by the filter paper assay. The highest activity was obtained with a pod concentration of  $12.5 \pm 0.3$  g/L, which was  $0.298 \pm 0.037$  FPU/mL. The influence of an alkaline hydrolysis to the pod on the production of sugars was evaluated, both in an enzymatic hydrolysis and in a simultaneous saccharification and fermentation to produce ethanol from the pod. Ethanol was quantified by HPLC. It was found that this pretreatment does not have a significant influence, since the confidence interval of the sugars released by the pod with the pretreatment ( $3.23 \pm 8.92$  g/L) and without it ( $3.55 \pm 7.44$  g/L) overlap, as well as in the production of ethanol, which were  $0.056 \pm 0.006$  and  $0.063 \pm 0.013$  % (w/v) respectively. The enzymatic and ethanol production were conducted in a 1 L bioreactor and an extract with an activity of  $0.178 \pm 0.002$  FPU/mL was obtained. The ethanol concentration obtained was  $1.36 \pm 0.48$  g/L with a yield of  $39.3 \pm 11.2$  % with respect to the pod consumption. The yield of yeast production relative to the substrate was higher,  $69.9 \pm 29.5$ %. For future research, it is recommended to optimize and standardize the operating conditions to maximize yield, as well as using modified yeasts that express lignocellulolytic enzymes and that metabolize pentoses to conduct a consolidated bioprocess in which the yeast produces enzymes to hydrolyze the pod and use the released sugars to produce ethanol in a single reactor.





# I. Introducción

En esta investigación se evalúa el aprovechamiento de residuos de la vaina de frijol, que es la envoltura que protege a los granos de frijol antes de ser cosechados, de la cual solo en Guatemala se generan aproximadamente 350 mil toneladas anuales (MAGA, 2017); para proveer una base técnica sobre el aprovechamiento de estos contaminantes.

La vaina de frijol no suele ser utilizada como alimento ya que es un residuo lignocelulósico compuesto principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales no son aprovechables por el humano ni por la mayoría de los microorganismos. Sin embargo, se pueden utilizar enzimas lignocelulolíticas, que son proteínas extracelulares que son excretadas por diferentes microorganismos para acelerar la conversión de la lignocelulosa en compuestos que puedan ser metabolizables como azúcares simples o fermentables en un proceso llamado hidrólisis. Los azúcares fermentables pueden ser utilizados por microorganismos como fuente de carbono para obtener diferentes productos de interés (Namnuch *et al.*, 2021).

Uno de los productos que se puede obtener al tener azúcares fermentables disponibles es el bioetanol, el cual se produce en una fermentación cuando las levaduras, que son microorganismos unicelulares, consumen los azúcares en un medio sin oxígeno y los convierten en bioetanol que es un alcohol usado en la industria química, farmacéutica, de alimentos, como desinfectante y como biocombustible (Vimmerstedt *et al.*, 2012).

El hongo *Trichoderma harzianum* es un hongo filamentoso que tiene la capacidad de alimentarse de residuos lignocelulósicos mediante la secreción de enzimas extracelulares que digieren polisacáridos como la celulosa o proteínas para poder absorber los monómeros como fuente de carbono para obtener energía (Madigan *et al.*, 2015). El hongo puede crecer en un medio sólido, así como en un medio líquido y por ello se evalúa la producción de enzimas lignocelulolíticas en una fermentación sumergida, que representa un medio fermentativo líquido más controlado y eficiente.

La degradación de compuestos lignocelulolíticos requiere un pretratamiento para facilitar la obtención de enzimas y azúcares fermentables. Dentro de estos tratamientos se puede mencionar la molienda y la hidrólisis alcalina, evaluados en esta investigación. Además, es necesaria la inducción de la producción de las enzimas al cultivar al hongo en un medio con residuos lignocelulósicos y se debe evaluar la actividad de las enzimas producidas con métodos estándar como el ensayo de papel filtro (cuantificado por el método DNS).

Para evaluar la aplicación de las enzimas en la producción de etanol, se llevó a cabo una fermentación y sacarificación simultánea, al usar la vaina de frijol como fuente de carbono, en la cual se hidroliza la vaina por las enzimas para producir azúcares y estos son consumidos por las levaduras para producir etanol en el mismo medio de reacción. Los azúcares y el etanol producido

pueden ser cuantificados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que es una técnica que separa componentes por las interacciones fisicoquímicas que pueden tener entre los componentes de la fase móvil y la columna por la cual eluyen.

De manera que en esta investigación se muestra la posibilidad de utilizar la vaina de frijol como materia prima para producir un biocombustible (bioetanol) y además utilizar este mismo residuo para la producción de enzimas que puedan hidrolizar los componentes de la vaina en azúcares fermentables. Para una mayor profundidad de los temas, en el capítulo del Marco Teórico y en Antecedentes se puede encontrar más información sobre las enzimas lignocelulolíticas, sus aplicaciones, las formas de producción, el mecanismo con el que actúan y la forma en la que se produce el bioetanol. En el capítulo de Metodología se muestra con mayor detalle lo realizado en el presente trabajo, los procedimientos seguidos y las técnicas empleadas. En Resultados se presentan los resultados obtenidos en cada parte de la investigación y se profundiza sobre ellos en Análisis de resultados. Posteriormente se pueden encontrar las Conclusiones y Recomendaciones del trabajo de graduación y finalmente en Anexos se encuentra información extra que puede ayudar a tener una mayor comprensión de lo obtenido en esta investigación.

## II. Antecedentes

La utilización de residuos es algo que ha llamado la atención hoy en día para buscar una economía circular ya que con ello se utilizan menos recursos, representando menores costos, así como se tiene una mayor preservación del medio ambiente. Un ejemplo de ello fue la investigación en la que se evaluaron diferentes residuos lignocelulósicos para optimizar la producción del inóculo y formación de carpóforos del hongo comestible *Lentinula boryana*. En el estudio se encontró que el uso de paja de cebada junto con viruta de madera de encino, madera de la poda de vid o bagazo de caña favorecen el crecimiento del micelio y con ello la producción de un alimento a partir de un residuo (Gaitan & Salmones, 2015).

El uso de residuos lignocelulósicos es posible mediante hidrólisis químicas, fisicoquímicas o bien con el uso de enzimas generadas por diferentes organismos como el hongo del estudio mencionado para generar azúcares fermentables que pueden ser utilizados para producir diferentes productos de interés. Para poder utilizar estas enzimas es necesario aislar y cultivar microorganismos capaces de producir estas enzimas en condiciones específicas. El hongo utilizado en este estudio es *Trichoderma harzianum*, el cual ya se ha utilizado en diferentes residuos lignocelulósicos por su capacidad de producir enzimas lignocelulolíticas.

Michel *et al.*, (2008) utilizaron diferentes sustratos orgánicos para evaluar el crecimiento de *T. harzianum*, entre ellos estuvieron el grano de arroz, el cual tiene un costo elevado, olote de maíz, cáscara de cacahuete, cáscara de arroz, grano de alpiste, grano de sorgo, rastrojo de maíz, rastrojo de soya, cáscara de ajo, cáscara de ajonjolí, de tomate, de cacao y de café, los cuales son residuos lignocelulósicos. Incluso evaluaron el crecimiento en vaina de frijol, el cual es el residuo utilizado en el presente estudio, y comprobaron que en todos hubo un buen crecimiento y una alta viabilidad, lo que indica que es posible usar estos residuos para cultivar al hongo debido a su alta producción enzimática.

Se encontró que este hongo contiene en su genoma más genes que codifican para enzimas lignocelulósicas que *T. reesei*, el cual se ha usado industrialmente para producir celulasas. De hecho, en la cepa T6776 se encontraron 42 genes que codifican para celulasas con mayor actividad de endoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas y 24 para hemicelulasas que son más que los que tiene *T. reesei* y los cocteles enzimáticos comerciales (Zhang *et al.*, 2020).

En diferentes estudios se ha utilizado este hongo para producir enzimas lignocelulolíticas usadas para aprovechar diferentes residuos. Algunas enzimas que se han logrado purificar y caracterizar además de las celulasas son: xilanasas y mananasas que degradan el xilano y manano, que son de los principales componentes de la hemicelulosa (Franco *et al.*, 2004), xilosidasas, arabinofurosidasas, manosidasas, galactosidasas, carboxilesterasas y monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMOs) (Zhang *et al.*, 2020).

La producción de enzimas con este hongo puede realizarse en estado sólido. Por ejemplo, se han producido celulasas a partir de residuos de arroz, trigo, maíz, bagazo de caña y aserrín (Sajith *et al.*, 2016) así como xilanasas y otras hemicelulasas (de Carvalho, 2016). Incluso se ha evaluado el uso de una fermentación en estado sólido por *T. reesei* para producir celulasas y usar estas enzimas para producir etanol a partir de residuos de sorgo, lo cual se logró realizar con un 80 % de eficiencia (Idris *et al.*, 2017). La fermentación también puede ser sumergida o en estado líquido

Para producir celulasas y otras enzimas lignocelulolíticas usando hongos como *T. harzianum* en fermentaciones sumergidas se han evaluado diferentes alternativas. Por ejemplo (Zhang *et al.*, 2020) usaron un cultivo de *T. harzianum* en la solución de sales de Mandel suplementada con sustratos lignocelulósicos para producir diferentes celulasas y hemicelulasas. (García *et al.*, 2006) lograron aumentar la producción de biomasa de *T. harzianum* al usar melaza de trapiche y *Saccharomyces cerevisiae* como suplementos nutricionales.

Lee *et al.*, (2017) optimizaron la producción de enzimas de *T. harzianum* al variar los cambios morfológicos inducidos por diferentes surfactantes en la fermentación y encontraron que la actividad de las celulasas aumenta en un 177 % al usar Tween 80 al 1.0 % y en un 142 % al usar polietilenglicol al 0.5 % en comparación con fermentaciones sin surfactante. En otro estudio (Nanjundaswamy & Okeke, 2020) optimizaron diferentes condiciones para una especie de *Trichoderma* y encontraron que la mayor actividad de enzimas hidrolíticas se obtuvo al usar 1 g/L de peptona, 0.5 g/L de extracto de levadura y 1.2 g/L de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, como fuente de carbono evaluaron varios sustratos y el mejor fue la mezcla de papel con pasto varilla. La temperatura óptima de crecimiento del hongo fue de 30° C y el pH de 7. Usando otra especie de *Trichoderma*, Zahra *et al.*, (2020) optimizaron las condiciones de cultivo para producir celulasas usando la vaina de semillas de algodón y encontraron una máxima producción con una concentración del sustrato al 5 %, un 0.05 % de peptona y 0.05% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 30° C y pH de 5.0.

Franco *et al.*, (2004) lograron producir y caracterizar β-mananasa y β-xilanasas a partir de *T. harzianum* usando avena espelta y salvado de trigo. Libardi *et al.*, (2017) lograron obtener celulasas con *T. harzianum* usando aguas residuales domésticas como sustrato, lo cual es otra alternativa interesante para reducir contaminación y disminuir costos en la producción de enzimas. La caña de azúcar es un sustrato de gran interés para producir celulasas, por ejemplo da Silva *et al.*, (2012) aislaron una cepa de *T. harzianum* y con ella lograron producir un complejo lignocelulolítico a partir de residuos pretratados de bagazo de caña y usaron esas mismas enzimas para hidrolizar ese residuo. Este estudio se mejoró por da Silva *et al.*, (2021) al eliminar el gen *cre1* que codifica para un represor transcripcional de celulasas, por lo que se aumentó la producción de estas enzimas, así como de xilanasas.

En otro estudio llevado a cabo por da Silva *et al.*, (2016) mejoraron la producción de *T. harzianum* al usar glicerol, un subproducto del biodiesel, como fuente de carbono para la propagación inicial del hongo y su posterior producción de celulasas en un biorreactor de tanque agitado cambiando el glicerol por bagazo de caña pretratado. La importancia de esto es que normalmente se usa glucosa para el inóculo inicial, pero esta puede inhibir la producción de celulasas, por lo que se observó que el uso de glicerol duplica la actividad de estas enzimas. Otra alternativa que se ha usado para producir celulasas es la inducción directa con celulosa, por ejemplo Lee *et al.*, (2015) optimizaron la producción de endoglucanasas al usar 1.85 % de celulosa, 0.48 % de peptona de soya y 0.10 % de tiamina HCl en el medio de cultivo.

Finalmente, se ha utilizado *T. harzianum* para producir otro tipo de enzimas hidrolíticas como lipasas que pueden hidrolizar lípidos o bien llevar a cabo reacciones de transesterificación en la producción de biodiesel, para ello se ha evaluado la fermentación sumergida y en estado sólido al inducir la producción de enzimas con aceites y usando residuos agroindustriales y se encontró una mayor actividad en la fermentación sumergida (Coradi *et al.*, 2013).

Las enzimas obtenidas pueden utilizarse para obtener azúcares fermentables de diferentes residuos lignocelulósicos y con ellos obtener productos de interés como el etanol, el cual es el compuesto que se busca obtener en el presente estudio. La producción de etanol con residuos lignocelulósicos puede hacerse con una hidrólisis y fermentación separadas en diferentes reactores (SHF) o bien en una sacarificación y fermentación simultánea (SSF) en la que ambos procesos se realizan en el mismo reactor (Galbe & Zacchi, 2014).

Se han realizado diferentes experimentos en los que se obtiene etanol con el método SHF. Por ejemplo Idris *et al.*, (2017) hidrolizaron residuos de sorgo con celulasas producidas por *T. reesei* y *Aspergillus niger*, luego tomaron el hidrolizado y lo usaron como medio para producir etanol con *Saccharomyces cerevisiae*, obteniendo un 76.8 % de conversión. De igual forma, Upendra *et al.*, (2013) usaron a la misma levadura para obtener etanol a partir de la hidrólisis enzimática de vainas de arvejas, con un rendimiento de 250 mL de etanol/kg de residuo agrícola.

En la presente investigación se pretende evaluar una sacarificación y fermentación simultánea usando vaina de frijol como residuo lignocelulósico ya que tiene la ventaja de que solo se utiliza un reactor, hay menos etapas de purificación y no hay inhibición de las enzimas por los azúcares liberados ya que se consumen por las levaduras. Esto se ha demostrado en estudios como el de Kelbert *et al.*, (2016) en el que se produjo etanol en un sistema SSF a partir de madera de eucalipto bajo diferentes condiciones de estrés. Se observó que la combinación de temperatura y altas cargas de sólidos fue la combinación de variables más significativa que afectó la concentración de etanol y la conversión de celulosa a etanol. Luego de la optimización obtuvieron una concentración de etanol de 54 g/L, lo que corresponde a una conversión del 85 %.

De igual forma, Liu *et al.*, (2014) lograron utilizar el rastrojo de maíz pretratado con explosión de vapor en una fermentación y sacarificación simultánea con enzimas y la levadura *S. cerevisiae* para obtener una concentración de etanol de 59.8 g/L y un rendimiento del 77.2 %. La concentración de etanol aumentó un 18.7 % en comparación con un hidrólisis y fermentación separadas. Esto se logró al usar una cepa termo tolerante de *S. cerevisiae* para operar a la temperatura óptima de las enzimas.

Finalmente, no se han realizado muchos estudios utilizando la vaina de frijol como residuo lignocelulósico para producir etanol en comparación con otras materias primas. El más resaltable es el llevado a cabo por Upendra *et al.*, (2013) en el que utilizaron vainas de frijol, la envoltura de la semilla y vaina de arvejas pretratadas con ácido y sacarificadas usando un consorcio de cepas del hongo *Aspergillus*. Con esto obtuvieron 90 g de glucosa por kg de residuo, la cual fue consumida por *S. cerevisiae* para obtener una producción de etanol de 250 mL / kg de residuo.

A falta de más estudios similares, es necesario realizar investigaciones para evaluar el uso de la vaina de frijol como sustrato para producir enzimas lignocelulósicas, así como materia prima para producir etanol, ya que hay una gran producción de frijol en el país.



### III. Justificación

Cada año en el sector agroindustrial se producen más de 40 millones de toneladas de biomasa lignocelulósica que no es comestible y en muchas ocasiones solo se descarta sin recibir un tratamiento, lo que puede generar problemas ambientales, además se invierten recursos para que crezca esa biomasa, a la cual no se le suele obtener un provecho a pesar de que contiene azúcares que pueden ser metabolizados por microorganismos para producir diferentes compuestos de interés (Sanderson, 2011).

A diferencia de otros residuos lignocelulósicos como restos del maíz, ha habido poca investigación sobre el aprovechamiento de la vaina de frijol, la cual tiene pocas aplicaciones productivas directas y puede generar contaminación. Anualmente, se generan alrededor de 19.4 millones de toneladas de vaina sin un uso específico mundialmente (Martínez *et al.*, 2020; Aigbodion, 2019) y en Guatemala donde el frijol es un alimento básico, se producen alrededor de 350 mil toneladas anuales (MAGA, 2017).

Esta vaina puede ser utilizada para producir compuestos de valor agregado como el etanol ya que contiene en su estructura azúcares que pueden metabolizar las levaduras para producir el alcohol, sin comprometer la seguridad alimentaria ya que se usaría un residuo. El etanol es un compuesto cuya demanda ha ido aumentando ya que se utiliza en la industria farmacéutica, como desinfectante, en industria de alimentos, industria química y como biocombustible, lo cual ha llamado mucho la atención en los últimos años, de hecho se piensa que a partir del 2022 se usarán 36 mil millones de galones del biocombustible anualmente debido a las regulaciones que se han ido estableciendo (Vimmerstedt *et al.*, 2012). En 2020 el tamaño de mercado del bioetanol se estimaba alrededor de 100 mil millones de litros con un valor de mercado de 93.7 mil millones de dólares y se espera que para el 2030 el valor del mercado sea de 155.6 mil millones de dólares con una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) del 5.2 % (GlobeNewswire, 2021).

Por otro lado, la producción de enzimas con un uso industrial ha ido en aumento, de hecho, el mercado de enzimas industriales tenía un valor de 5.9 mil millones de dólares en 2020 y se piensa que para el 2030 el valor será de más de 9.7 mil millones de dólares con una CAGR del 6.5 % (GlobeNewswire, 2021). Las enzimas lignocelulolíticas tienen un comportamiento similar ya que solo el valor del mercado de las celulasas, que es un tipo de estas enzimas era de 1677.7 millones de dólares en 2020 y se espera que alcance un valor de 2450.7 millones de dólares en 2026 con un CAGR del 5.5 % (RFDTV, 2022). Al analizar todas las enzimas utilizadas en la producción de biocombustibles, se piensa que la CAGR será del 9.4 % para el periodo del 2021 al 2026 (Research and Markets, 2021) por lo que hay un alto interés en la producción de estas enzimas.

Estas enzimas tienen un alto precio tanto por el proceso de purificación como por el medio en el cual se lleva a cabo la fermentación para producirlas. El aporte de la presente investigación es la evaluación del uso de la vaina de frijol para producir esta clase de enzimas, así como su uso en la producción de etanol a partir del mismo residuo. Por ello, en la presente investigación se propone

la obtención de enzimas lignocelulolíticas a partir del hongo *Trichoderma harzianum* usando residuos de vaina de frijol como medio de cultivo, lo cual inducirá la producción de enzimas, así como les dará un uso a estos residuos para obtener un producto de mayor valor agregado. De igual forma, se pretende evaluar el uso de estas enzimas para obtener los azúcares fermentables de la vaina de frijol y con ellos producir bioetanol en una fermentación alcohólica usando levaduras.



## IV. Objetivos

### A. General

Evaluar extractos de enzimas lignocelulolíticas producidas por el hongo *Trichoderma harzianum* en una fermentación sumergida usando vaina de frijol como inductor para la generación de azúcares fermentables a partir de la hidrólisis enzimática de la vaina.

### B. Específicos

- Preparar medios de cultivo con diferentes concentraciones de vaina de frijol para inducir la producción de enzimas lignocelulolíticas en una fermentación sumergida con el hongo *Trichoderma harzianum*.
- Obtener extractos de las enzimas producidas por el hongo para evaluar la concentración de vaina de frijol en el medio con la que se mejora la actividad enzimática al medir azúcares fermentables producidos.
- Evaluar un pretratamiento hidrolítico de la vaina de frijol para determinar la influencia que tiene en la producción de azúcares fermentables.
- Evaluar una sacarificación y fermentación simultánea usando las enzimas lignocelulolíticas obtenidas y levaduras para producir etanol a partir de la vaina de frijol como fuente de carbono.



## V. Marco teórico

### A. Residuos lignocelulósicos

La lignocelulosa es el principal componente de la biomasa de las plantas y consume cerca de la mitad de los productos de la fotosíntesis, por lo que es una fuente abundante y de bajo costo al momento de utilizarla como materia prima para diferentes procesos, ya que se suele desechar (Rodríguez *et al.*, 2017). La biomasa lignocelulósica comprende residuos forestales, agrícolas y agroindustriales, los cuales son fuentes de energía abundantes, renovables y económicos. Estos incluyen una variedad de materiales como aserrín, álamos, bagazo de caña, desechos de papel, residuos de granos cerveceros, pastos, paja, troncos, tallos, cáscaras, vainas, hojas y cortezas de diferentes plantas (Mussatto & Teixeira, 2010).

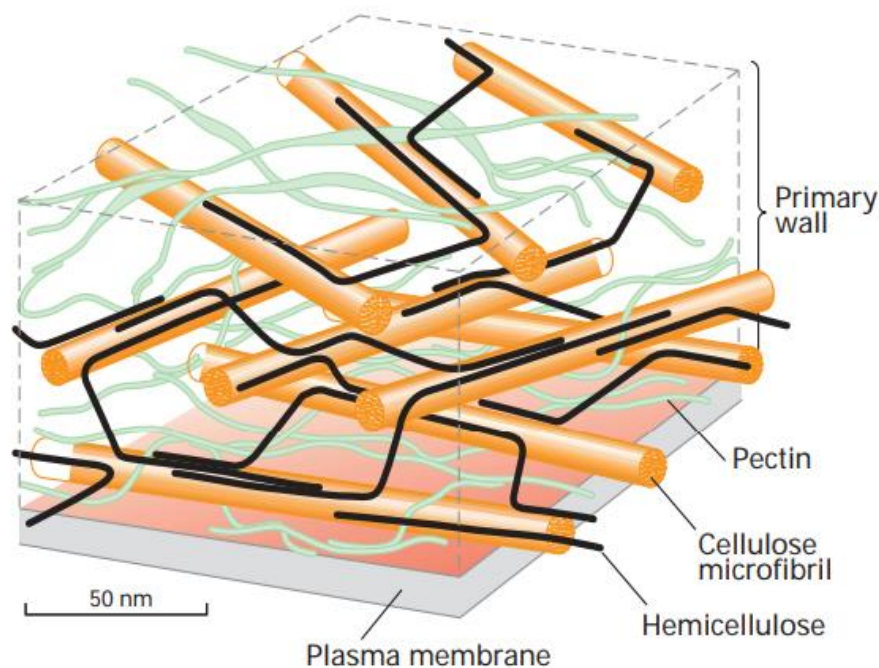
Cada año se producen más de 40 millones de toneladas de biomasa que no es comestible, la cual suele ser descartada, por lo que los residuos lignocelulósicos se acumulan cada año en grandes cantidades, lo que causa problemas ambientales, en especial si no se les realiza ningún tratamiento. Agregado a esto, hay que considerar que una gran parte de los recursos utilizados para diferentes cultivos como agua, fertilizantes y suelo fueron utilizados por las plantas para producir la biomasa lignocelulósica que por su composición química basada en azúcares y otros compuestos de interés, podría ser utilizada para producir productos con valor agregado como el etanol, aditivos de alimentos, ácidos orgánicos, enzimas, entre otros. Por ello, además de los problemas ambientales que puede generar, solo descartar esta biomasa, sería un gran desperdicio pues se estarían perdiendo recursos potencialmente valiosos que necesitaron una inversión energética por parte de las plantas y de los agricultores (Sanderson, 2011; Mussatto & Teixeira, 2010).

La lignocelulosa está compuesta principalmente por 3 constituyentes poliméricos que están cercanamente asociados entre sí, la celulosa (35-50 %), la hemicelulosa (25-30%) y la lignina (25-30%) (Namnuch *et al.*, 2021). Estos polímeros son los que forman la pared celular de las plantas, la cual les da rigidez y las hace resistentes a cambios en la osmolaridad y al ingreso de patógenos o sustancias dañinas. La pared celular tiene un espesor aproximado de 0.2  $\mu\text{m}$  y envuelve las membranas plasmáticas, conecta las células en tejidos, favorece la señalización celular para crecer y dividirse, controla la forma de los órganos de la planta y de la planta en sí (Lodish *et al.*, 2003).

La celulosa es un homopolímero de alto peso molecular formado por unidades de glucosa unidas por un enlace  $\beta$ -1,4 glucosídico (Nelson & Cox, 2009). Mediante ese enlace se forman largas cadenas de celulosa, las cuales se unen entre sí por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, lo que causa que se empaquen en microfibrillas de celulosa, lo que las coloca en una estructura paralela y cristalina que es más resistente, menos soluble y degradable, así como hay estructuras amorfas de celulosa a lo largo de la pared (Mussatto & Teixeira, 2010). Las microfibrillas de celulosa son sintetizadas en la cara exoplásmica de la membrana celular a partir de UDP-glucosa y ADP-glucosa formadas en el citosol, la polimerización la realiza la enzima celulosa sintasa (Lodish *et al.*, 2003).

Las microfibrillas de celulosa están incorporadas en una matriz compuesta de pectina, que es un polímero de ácido D-galacturónico y otros monosacáridos que le dan carga negativa a la pared para interactuar con compuestos positivos y participa en el cambio de las propiedades de la pared para el desarrollo vegetal (Salazar & Gamboa, 2013). Así como de hemicelulosa que es un heteropolímero corto pero ramificado de varios monosacáridos de 5 y 6 carbonos como la xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, glucosa y ácido glucurónico o galacturónico. La fuerza mecánica de la pared celular depende del entrecruzamiento de las microfibrillas de celulosa por las cadenas de hemicelulosa como se puede observar en la Figura 1. La pectina y la hemicelulosa son sintetizadas en el aparato de Golgi y transportadas a la superficie celular donde forman la red interconectada que ayuda a unir las paredes celulares de células adyacentes. En la pared también se puede encontrar una glucoproteína llamada extensina (Lodish *et al.*, 2003).

Figura 1. Representación esquemática de la pared celular de las plantas.

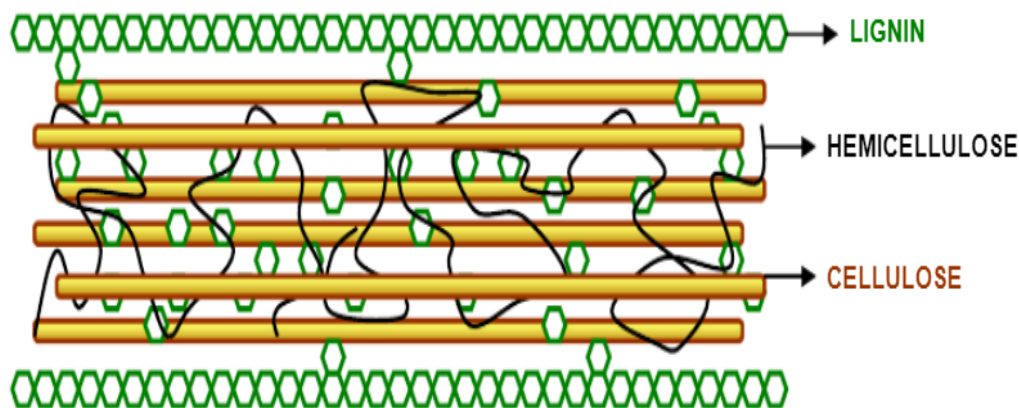


(Lodish *et al.*, 2003)

Se observa que la hemicelulosa entrecruza las microfibrillas de celulosa aumentando la resistencia de la pared, la pectina realiza un efecto similar además de proporcionar una carga negativa.

Otro componente de la lignocelulosa y de las paredes celulares es la lignina, la cual es un polímero complejo e insoluble de residuos fenólicos (unidades de fenilpropano) unidas en una gran estructura tridimensional. Los 3 alcoholes monoméricos de la lignina son el alcohol p-cumarílico, el alcohol coniferílico y el alcohol sinapílico. La lignina está unida a la celulosa y hemicelulosa y su función es proveer rigidez y cohesión a la pared celular, conferir impermeabilidad al agua en los vasos del xilema y formar una barrera fisicoquímica contra los ataques microbianos. Por su composición, la lignina es muy resistente a la degradación química y enzimática y está presente en mayor cantidad en los tejidos leñosos (Chávez & Domine, 2013; Mussatto & Teixeira, 2010). En la Figura 2 se puede observar como la lignina le da una protección extra y mayor rigidez a la pared celular.

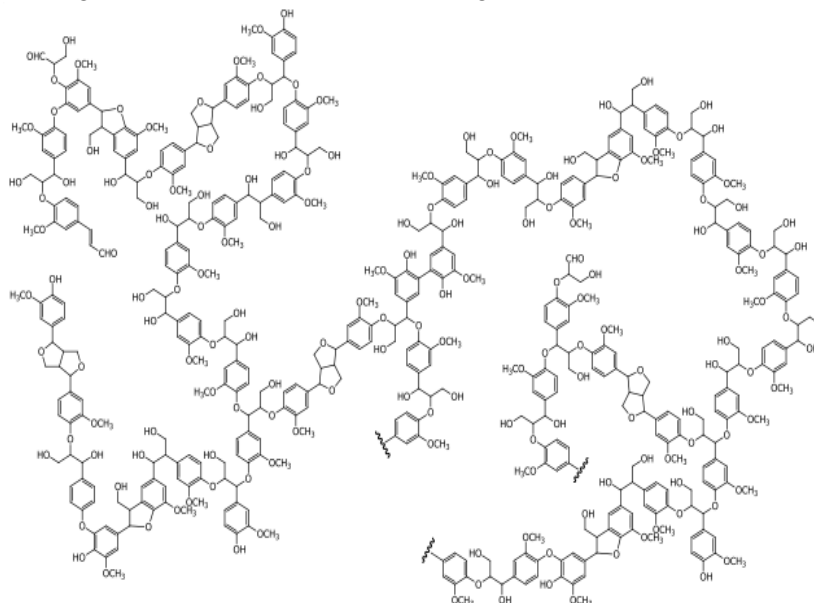
Figura 2. Representación de la estructura de la lignocelulosa



(Mussatto & Teixeira, 2010)

Se observan las microfibrillas de celulosa, las cadenas de hemicelulosa y las fracciones de lignina que recubre a estas últimas.

Figura 3. Modelo estructural de la lignina en madera aserrada



(Chávez & Domine, 2013)

Se observa que es una estructura compleja formada por residuos fenólicos.

Los residuos lignocelulósicos por su biorrenovabilidad y disponibilidad tienen un gran interés industrial ya que a partir de ellos se pueden obtener muchos productos como biocombustibles (bioaceite, biocarbón, gas de síntesis, biodiesel, bioetanol, biobutanol), bioquímicos (saborizantes, aromáticos, alcoholes), biomateriales (biopolímeros, bioplásticos, biocompuestos), materiales celulósicos (hidrogeles, fibras, telas), materiales de lignina (resinas, plastificantes, antioxidantes) y materiales de carbono (carbón activado, nanotubos, nanocuernos) (Okolie *et al.*, 2021). Por lo que su implementación es necesaria para tener una economía sostenible.

Se han utilizado diferentes materiales lignocelulósicos para producir diferentes compuestos de interés como restos de madera, paja de cebada, rastrojo de maíz, restos de arroz, pulpa de café, bagazo de caña, restos de trigo, avena, algodón, soya, girasol, entre otros. Pero no se han realizado muchas investigaciones usando restos de frijol (Okolie *et al.*, 2021).

## **B. Vaina de frijol**

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) pertenece a la familia *Fabaceae*, es una planta herbácea nativa de Mesoamérica, en especial de México, Guatemala, Honduras, El Salvador y Perú, lugares en los que se empezó a cultivar hace 7000 años. Luego se distribuyó alrededor del mundo y dependiendo de la región se le conoce como frejol, frijol, frisol, habichuela, caraota, poroto, judía, balín o alubia (Kamarudin & Gan, 2016).

El frijol es la leguminosa más importante para el consumo humano por ser una importante fuente de proteína, calorías, minerales, vitaminas del complejo B, compuestos fenólicos y fibra (Fernández & Sánchez, 2007). Se ha reportado que su consumo además de ser una importante fuente de energía para muchas familias, minimiza el riesgo de enfermedades crónicas como diabetes, enfermedad coronaria, cáncer de colon, mama y próstata (Kamarudin & Gan, 2016).

En el mundo los mayores productores son India, Brasil, Birmania, China y Estados Unidos. Del año 1993 al 2014 produjeron 3.3, 3.0, 2.1, 1.5 y 1.2 millones de toneladas de frijol seco al año respectivamente (Kamarudin & Gan, 2016). En el 2018 la producción mundial fue de 30.4 millones de toneladas. Sin embargo, se genera una gran cantidad de residuos en el proceso postcosecha, uno de ellos es la vaina, la cual puede representar problemas ambientales y económicos por sus grandes volúmenes y costos de disposición (Martínez *et al.*, 2020). La vaina constituye aproximadamente el 39 % del peso del fruto (el 61 % restante corresponde a la pulpa y semillas), por lo que la producción anual generaría 19.4 millones de toneladas de vaina sin un uso específico (Aigbodion, 2019).

En Guatemala el frijol es la principal fuente de proteína vegetal (22 %) y es un cultivo básico en la dieta, en especial en el área rural donde se basa en el consumo de maíz y frijol. El frijol ocupa el 31 % del área cultivada con granos básicos y se tiene una ingesta promedio de 58 g al día, por lo que el consumo aparente anual per cápita para el país es de 9.4 kg (Aldana, 2010).

Para el año 2017 se estima que la producción de frijol en Guatemala fue de 546,040 toneladas, lo que equivaldría a 350 mil toneladas generadas de vaina aproximadamente. El cultivo de frijol es principalmente para autoconsumo y la mayor producción se da en los departamentos de Petén (27 %), Jutiapa (13%), Chiquimula (10 %), Santa Rosa (7 %) y Jalapa (6 %), con un ciclo de alta cosecha desde los meses de agosto hasta diciembre (MAGA, 2017).

Dado que hay una alta producción de frijol en el país, también se genera una gran cantidad de residuos como la vaina, ya que en el proceso postcosecha se debe secar la vaina con el frijol, luego se realiza el aporreo, que es un proceso en el que se golpean las plantas secas para que las vainas se quiebren y liberen el grano. Esto hace que la vaina ya no sea comestible para las personas. Además, es la primera que entra en contacto con diferentes plagas, por lo que es preferible no consumirla (Álvarez, 2018).

El gran volumen de vaina producida representa problemas ambientales y económicos para los agricultores ya que no tiene un uso que genere mucho valor, en ocasiones se usa como abono en nuevas plantaciones o se les da como alimento a los animales, pero en ninguno de los casos aporta muchos beneficios (Aldana, 2010). Por el contrario, por su composición química, la vaina podría utilizarse para obtener productos con un mayor valor agregado como ser fuente de fibra para la elaboración de harinas, la obtención de nanopartículas o bien como fuente de carbono para la producción de biobutanol (Aigbodion, 2019; Martínez *et al.*, 2020; Nimbalkar *et al.*, 2017).

La vaina de frijol es rica en fibra, la cual consiste en celulosa, hemicelulosa y lignina. De las primeras 2 se pueden obtener azúcares que son metabolizables por las levaduras para producir etanol. En un estudio en el que se obtuvo una harina de la vaina se determinó que contenía un 66.93 % de fibra total, así como un 15.65 % de carbohidratos simples (Martínez *et al.*, 2020). En otro estudio se determinaron parámetros fisicoquímicos de la vaina de una variedad de frijol mexicana, la cual contenía un 13.24 % de fibra y 39.19 % de carbohidratos simples (Fernández & Sánchez, 2007). También se ha analizado la composición de las vainas de arveja, las cuales son similares a las de frijol y se encontró que tienen un 26 % de celulosa, 20.5 % de hemicelulosa y 3.92 % de lignina (Nimbalkar *et al.*, 2017).

En otro estudio se extrajeron los carbohidratos de la vaina de frijol y se encontró que el 2.5 % corresponde a manosa, el 4.0 % a ramnosa, el 2.9 % a xilosa, el 4.3 % a arabinosa, el 15.0 % a ácido galacturónico, el 9.0 % a glucosa y el 62.2 % a galactosa (Kamarudin & Gan, 2016). Esto es prometedor ya que los últimos 2 pueden ser metabolizados por cepas silvestres de *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que otras levaduras también pueden metabolizar las pentosas presentes en la vaina para producir etanol. Sin embargo, es importante considerar que el ácido galacturónico puede inhibir el consumo de galactosa cuando el pH es de 3.5 en la fermentación, por lo que se debe controlar este factor para obtener buenos rendimientos, se ha observado que a pH de 5 no ocurre esta inhibición (Huisjes *et al.*, 2012).

Esto muestra que la vaina de frijol tiene potencial para ser utilizada como fuente de carbono en la producción de etanol, obteniendo un producto de valor agregado a partir de un residuo, lo que puede disminuir los costos de producción, proporciona un nuevo recurso no basado en petróleo, que no compromete la salud alimentaria y contribuye a reducir el impacto en el medio ambiente. Incluso, la vaina contiene de un 20.2 % (Nimbalkar *et al.*, 2017) a un 39.09 % de proteína cruda y otros nutrientes como cobre, níquel, manganeso, hierro, zinc, fósforo, potasio, magnesio, calcio y nitrógeno (Fernández & Sánchez, 2007), por lo que no es necesario realizar una suplementación muy grande de estos nutrientes a los medios de cultivo.

### **C. Hidrólisis de lignocelulosa**

Para poder aprovechar los azúcares fermentables presentes en la lignocelulosa de diferentes materiales como la vaina de frijol, es necesario realizar pretratamientos a la lignocelulosa para hidrolizar los polímeros y tener acceso a estos azúcares. El proceso inicia con una deslignificación para retirar la lignina y liberar a la celulosa y hemicelulosa y luego se da la hidrólisis de estos polímeros para la obtención de azúcares simples. Para esto se han explorado métodos físicos, químicos, biológicos o una combinación de varios (Rodríguez *et al.*, 2017). Algunos de estos métodos son:

- Métodos físicos: Incluyen el corte, maceración y molienda. Estos aumentan el área superficial sobre la cual pueden actuar las enzimas y reducen la cristalinidad de la celulosa, pero requieren un alto consumo energético (Verardi *et al.*, 2012). Otros son la extrusión mecánica, uso de microondas, ultrasonido y pirólisis (Zuccaro *et al.*, 2020) Un tratamiento que se debe realizar es el secado ya que este disminuye el contenido de humedad y con ello la contaminación y descomposición del sustrato, reduce el peso para el transporte y facilita procesos de producción (Nimbalkar *et al.*, 2017).
- Métodos químicos: Se incluye la hidrólisis ácida, que puede ser con ácidos concentrados a menores temperaturas o con ácidos diluidos a temperaturas mayores. Estos pueden hidrolizar la hemicelulosa y la celulosa (esta necesita mayores temperaturas para romper la estructura cristalina), así como alteran la estructura de la lignina, el inconveniente es la corrosión que se da en el equipo, las altas condiciones de operación y formación de compuestos tóxicos. Algunos ácidos utilizados son el sulfúrico, clorhídrico y nítrico (Galbe & Zacchi, 2014; Rodríguez *et al.*, 2017).

También se puede realizar una hidrólisis alcalina al aplicar soluciones de compuestos como hidróxido de sodio, calcio, potasio o de amonio, lo que ayuda a remover la lignina y parte de la hemicelulosa, así como causa el hinchamiento de la celulosa, lo que disminuye la cristalinidad y aumenta el área superficial disponible para que sea hidrolizada por enzimas (Mussatto & Teixeira, 2010), lo que muestra que es importante realizar este pretratamiento para una buena hidrólisis enzimática. La lignina también se puede extraer con una mezcla de solventes orgánicos como etanol, metanol, acetona, etilenglicol o trietilenglicol (organosolv), el problema es que se deben recuperar los solventes en el proceso (Chávez & Domine, 2013). Al degradar la lignina se pueden producir compuestos fenólicos que actúan como inhibidores durante las fermentaciones por lo que se pueden remover usando carbón activado al 5 % a 60° C con agitación a 200 rpm por 2 h y el carbón activado se puede recuperar por filtración (Nimbalkar *et al.*, 2017).

- Métodos fisicoquímicos: Está el método de explosión de fibra de amonio (APEX) y el de percolación de reciclaje de amonio (ARP) los cuales usan amonio a altas temperaturas y presiones para aumentar el área superficial y remover la lignina y hemicelulosa, pero no la hidrolizan. Otro método que aumenta el área superficial y que no produce inhibidores pero que no realiza una hidrólisis es la explosión con dióxido de carbono supercrítico (Verardi *et al.*, 2012; Galbe & Zacchi, 2014).

Otros métodos son la ozonólisis que reduce el contenido de lignina a condiciones ambientales y no produce residuos tóxicos, pero que es costoso por el ozono requerido. Está la oxidación húmeda en la que se usa agua y aire u oxígeno con un catalizador alcalino, la cual remueve de forma eficiente la lignina y hay una baja formación de inhibidores, pero el oxígeno y catalizador pueden ser costosos (Verardi *et al.*, 2012; Mussatto & Teixeira, 2010).

Finalmente, están los tratamientos con vapor, los cuales causan la hidrólisis de la celulosa y auto hidrólisis de la hemicelulosa. Estos pueden generar compuestos inhibidores y en ocasiones no se da una separación completa de la lignina. Se puede generar una explosión de vapor al cambiar las presiones o se puede realizar una hidrotermólisis con agua caliente comprimida (Galbe & Zacchi, 2014). Esta última opción ha tenido un alto interés industrial



por su rentabilidad y bajo impacto ambiental. El inconveniente es que los fragmentos de lignina se pueden volver a asentar en la celulosa, lo que impide una adsorción adecuada de las enzimas para el proceso de hidrólisis, por lo que se han evaluado formas de mitigar este problema como el uso de proteína de soya, la cual bloquea la deposición de lignina en la celulosa, mejorando el proceso de hidrólisis (Luo *et al.*, 2019).

- Métodos eléctricos: Se crea un campo eléctrico pulsado que rompe las células vegetales, lo que facilita la separación de los polímeros lignocelulósicos. Esto se puede realizar a condiciones ambientales, pero el proceso aún necesita investigación (Verardi *et al.*, 2012).
- Métodos biológicos: Estos han tenido un gran interés ya que se pueden usar microorganismos como ciertos hongos que pueden degradar la lignina, celulosa y hemicelulosa con bajos requerimientos energéticos o bien se pueden utilizar sus enzimas. El inconveniente es que el proceso de hidrólisis es más lento y la extracción de las enzimas puede ser costosa. La mayor ventaja del uso de enzimas es que el proceso es muy específico, se puede realizar en condiciones moderadas, tiene un menor consumo energético y un menor impacto ambiental. No genera problemas de corrosión, se obtienen altos rendimientos de glucosa y una baja formación de subproductos indeseables (Mussatto & Teixeira, 2010; Rodríguez *et al.*, 2017).

Es importante tener en cuenta varios factores que pueden afectar la recalcitrancia de materiales lignocelulósicos a la hidrólisis enzimática (disminuyen el efecto de las enzimas). Estos factores pueden ser químicos (composición de la celulosa, hemicelulosa, lignina, presencia de grupos acetilo y la interacción entre los polímeros) o físicos (cristalinidad, tamaño de partícula y área superficial accesible) por lo que es importante realizar los pretratamientos previamente mencionados para disminuir la interacción entre polímeros (en especial con la lignina), disminuir la cristalinidad de la celulosa y aumentar el área superficial en la que puedan actuar las enzimas hidrolíticas (Verardi *et al.*, 2012; Zoghلامي & Paës, 2019).

#### **D. Enzimas lignocelulolíticas**

Las enzimas lignocelulolíticas también son conocidas como lignocelulasas y son biocatalizadoras involucradas en la descomposición de lignina y materiales celulósicos al hidrolizar sus componentes para obtener productos útiles. Estas enzimas son proteínas extracelulares que son excretadas por diferentes microorganismos para acelerar la conversión de la lignocelulosa en compuestos que puedan ser metabolizables como azúcares simples (Chukwuma *et al.*, 2020). Estas enzimas tienen una gran especificidad al sustrato, no proporcionan reacciones secundarias indeseables, presentan alta actividad catalítica incluso a bajas concentraciones, las reacciones son regio y estereoselectivas y no necesitan condiciones experimentales agresivas. Por ello, se tiene un gran interés en su uso para aprovechar la biomasa lignocelulósica en la obtención de productos con valor agregado como el bioetanol (Sánchez *et al.*, 2014).

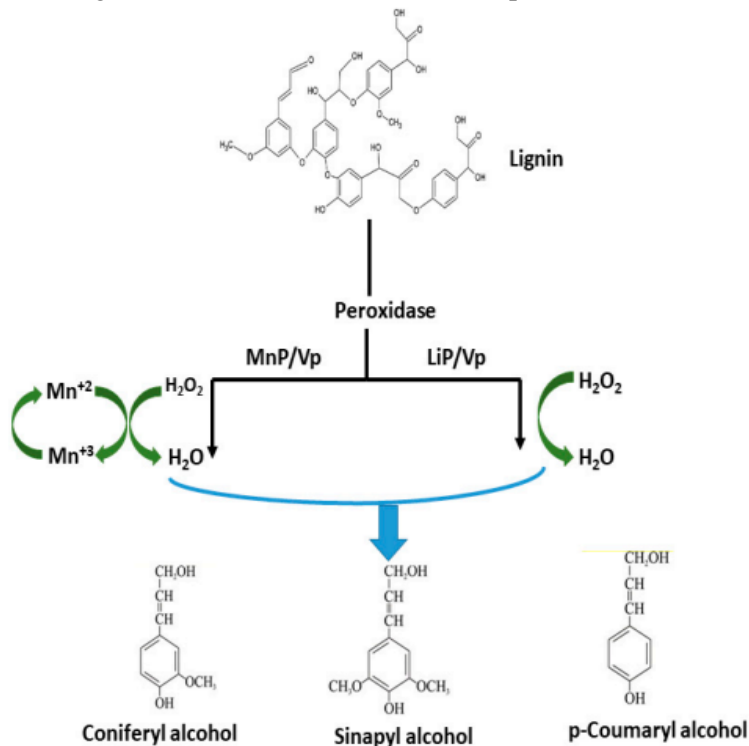
Estas enzimas pueden clasificarse como ligninolíticas (peroxidasas y oxidasas) y como hidrolíticas (celulasas, hemicelulasas, pectinasas, quitinasas, amilasas, proteasas, esterases y mananasas). Las primeras entran en la clasificación de oxidoreductasas ya que llevan a cabo reacciones de transferencia de electrones para cortar los monómeros de la lignina, mientras que las últimas se clasifican como hidrolasas ya que hidrolizan los monómeros de los carbohidratos con el uso de agua (Chukwuma *et al.*, 2020; Nelson & Cox, 2009).

La lignina por su estructura no puede ser degradada por enzimas hidrolíticas y por su heterogeneidad se dificulta la descomposición por microorganismos dada su esteoquímica irregular. La degradación es realizada con enzimas oxidativas que causan la producción de compuestos que requieren varias reacciones oxidativas ya que son muy inestables. Estas enzimas son las peroxidadasas y las oxidasas (Chukwuma *et al.*, 2020).

Las peroxidadasas usan peróxido de hidrógeno como cosustrato y aceleran oxidaciones en las que se forman radicales libres, cationes reactivos o aniones que causan la degradación de la lignina para liberar sus monómeros, el mecanismo se observa en la Figura 4. Las peroxidadasas conocidas son la lignina peroxidada (LiP), la manganeso peroxidada (MnP), la peroxidada versátil (VP) y la peroxidada decolorante del tinte (DyP). Estas están presentes en diferentes hongos que digieren madera (Chukwuma *et al.*, 2020)

El otro grupo de enzimas ligninolíticas son las oxidasas conocidas como lacasas, estas se encuentran en hongos, plantas y bacterias. Estas usan oxígeno molecular como cofactor e implican la transferencia de hidrógeno y átomos de oxígeno o electrones desde el sustrato a otra molécula, catalizando la oxidación de la lignina y reduciendo el oxígeno a agua. Las enzimas ligninolíticas tienen aplicaciones en la biotecnología verde, industria de alimentos y bebidas, textiles, manejo de desechos, salud y cuidado personal, papel e industria de pulpa (Chukwuma *et al.*, 2020; Sánchez *et al.*, 2014).

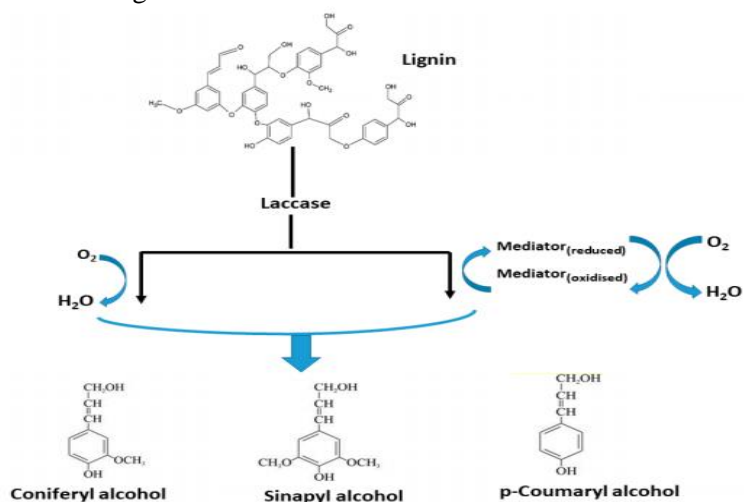
Figura 4. Reacción enzimática de las peroxidadasas.



(Chukwuma *et al.*, 2020)

Se observa que utilizan peróxido de hidrógeno para degradar la lignina en sus 3 alcoholes monoméricos.

Figura 5. Reacción enzimática de las lacasas.



(Chukwuma *et al.*, 2020)

Se observa que estas utilizan oxígeno molecular para obtener los alcoholes monoméricos de la lignina.

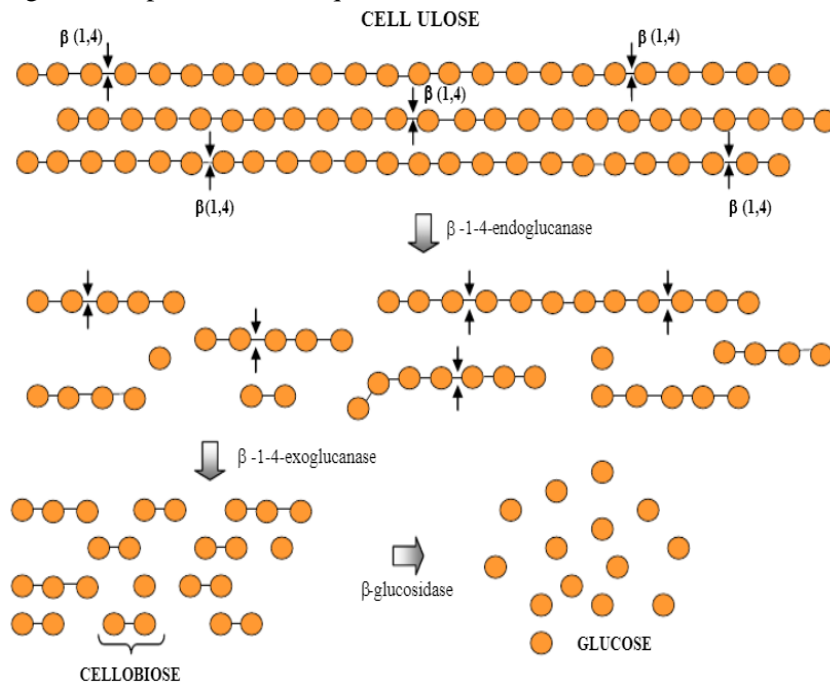
Unas de las enzimas más importantes en la degradación de la lignocelulosa son las celulasas. Estas son un grupo de enzimas que actúan de forma sinérgica en la conversión de celulosa a glucosa (da Silva *et al.*, 2016). Este grupo de enzimas incluye las  $\beta$ -1-4-endoglucanasas que atacan regiones de baja cristalinidad e hidrolizan aleatoriamente enlaces  $\beta$ -1-4-glucosídicos en las cadenas de celulosa, formando celu-oligosacáridos de menor tamaño, lo que disminuye el grado de polimerización y aumenta el área superficial disponible (Verardi *et al.*, 2012; Zuccaro *et al.*, 2020).

Las otras enzimas involucradas son las celobiohidrolasas, también conocidas como  $\beta$ -1-4-exoglucanasas, que liberan intermediarios solubles de la superficie de la celulosa llamados celobiosa, que es una molécula formada por dos glucosas. Finalmente, las  $\beta$ -glucosidasas hidrolizan la celobiosa en glucosa, así como pueden cortar unidades de glucosa de los extremos de los celu-oligosacáridos al hidrolizar los enlaces  $\beta$ -1-4-glucosídicos (Verardi *et al.*, 2012; Zuccaro *et al.*, 2020). En la Figura 6 se puede observar cómo realizan los cortes estas enzimas.

La estructura modular de las celulasas tiene tres partes, un dominio de unión a carbohidratos (CBD), un dominio catalítico o núcleo (CD) y una unión entre el CBD y el CD. El CBD es importante porque permite la adsorción de la celulasa en la celulosa cristalina, lo cual es necesario para iniciar el proceso de hidrólisis (Baig, 2020).

Todo esto es cierto para sistemas no complejos de celulasas como los de los hongos y bacterias aeróbicas. Por otro lado, los microorganismos anaeróbicos producen sistemas de celulasas complejos llamados celulosomas. Los celulosomas son protuberancias que se producen en la pared celular y contienen a las enzimas que están fuertemente unidas a la pared celular, pero son lo suficientemente flexibles para unirse fuertemente a la celulosa. El celulosoma contiene dos tipos de subunidades, las subunidades no catalíticas llamadas scaffoldings que contienen múltiples copias de cohesinas que interactúan selectivamente con dominios de las otras subunidades y las enzimáticas que realizan el proceso de hidrólisis. La ventaja de los celulosomas son que mejoran el sinergismo de las celulasas y que se elimina la adsorción inespecífica (Verardi *et al.*, 2012).

Figura 6. Representación esquemática de las celulasas sobre la celulosa.



(Mussatto & Teixeira, 2010)

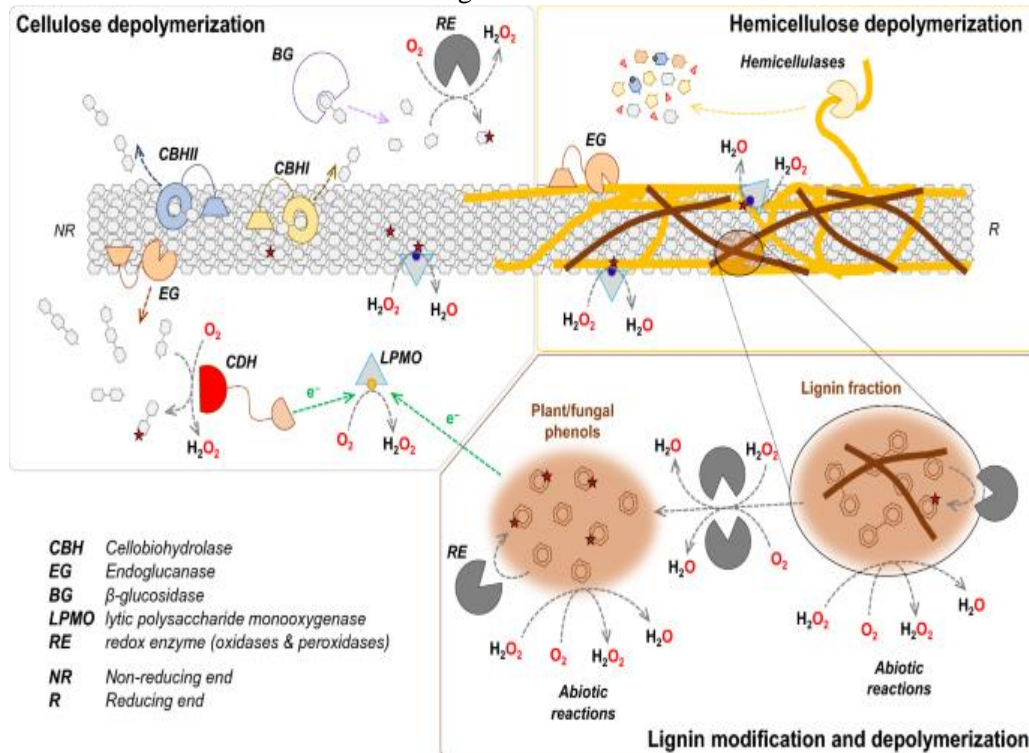
Se observa que las endoglucanasas cortan las largas cadenas de celulosa para obtener oligosacáridos. Las exoglucanasas forman unidades de celobiosa que es hidrolizada por las glucosidasas a glucosa. Todas hidrolizan enlaces  $\beta$ -1-4-glucosídicos.

Las enzimas lignocelulolíticas que hidrolizan la hemicelulosa se conocen como hemicelulasas y degradan la hemicelulosa en monosacáridos y ácido acético. Como la hemicelulosa puede estar formada por diferentes carbohidratos, se necesitan diferentes enzimas para degradar por completo el heteropolisacárido. Las principales enzimas son las xilanasas que forman un grupo de enzimas como las celulasas que deben actuar de forma sinérgica, estas son las endo-1-4- $\beta$ -D-xilanasas que cortan la cadena de xilano, las exoxilanasas que hidrolizan las uniones  $\beta$ -1-4 del xilano de los extremos no reductores y liberan xilooligosacáridos. Finalmente, las  $\beta$ -xilosidasas cortan la xilobiosa y los xilooligosacáridos para liberar la xilosa (Chukwuma *et al.*, 2020; Zuccaro *et al.*, 2020).

Otras enzimas son las endo-1-4- $\beta$ -D-mananasas que rompen enlaces internos de los mananos para producir mano-oligosacáridos. Estos son hidrolizados por las 1,4- $\beta$ -D-manosidasas en manosa (Zuccaro *et al.*, 2020). Para una hidrólisis completa también son necesarias enzimas desramificadoras que remueven sustituciones en el esqueleto del polímero como las deacetilasas que eliminan el acetato que puede estar unido a la celulosa, las arabinosidasas o arabinofuranosidasas que remueven las cadenas laterales de arabinosa y las galactosidasas que remueven las cadenas laterales de galactosa. La hemicelulosa suele estar unida a la lignina por lo que se necesitan enzimas que realicen la separación como las feruloil esterases que cortan las uniones de arabinosa a los alcoholes de la lignina y las glucuronil esterases que cortan los enlaces éster formados entre la lignina y sustituciones de ácido glucurónico en el esqueleto de xilano (Sánchez *et al.*, 2014; Østby *et al.*, 2020).

Otras enzimas hidrolíticas son las amilasas que hidrolizan el almidón en maltosa y luego glucosa, las pectinasas que degradan la pectina, las proteasas que degradan glucoproteínas que pueden estar presente en la lignocelulosa y las quitinasas que hidrolizan la quitina presente en caparzones de crustáceos, exoesqueletos de insectos y paredes celulares de hongos (Chukwuma *et al.*, 2020). Otras enzimas que están involucradas en la descomposición de la lignocelulosa son las monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMOs) que ayudan a la conversión de la celulosa y hemicelulosa en monosacáridos por procesos oxidativos (Østby *et al.*, 2020).

Figura 7. Representación esquemática de la despolimerización de los componentes de la lignocelulosa.



(Østby *et al.*, 2020)

Se observa en la parte izquierda la despolimerización de la celulosa por celulasas y LPMO, en la parte superior derecha la despolimerización de la hemicelulosa con el uso de las diferentes hemicelulasas y en la parte inferior derecha la modificación y despolimerización de la lignina por las oxidorreductasas.

Para poder utilizar estas enzimas en la hidrólisis de biomasa lignocelulósica se deben considerar algunos factores como que es importante realizar un pretratamiento para que las enzimas actúen de manera eficiente sobre los polisacáridos, así como se debe favorecer la adsorción de las enzimas para que realicen la hidrólisis. El mecanismo general de adsorción de las enzimas comienza con un movimiento browniano en el medio que lleva las enzimas al sustrato. Al acercarse comienzan a actuar fuerzas de Van der Waals, las cuales acercan aún más la enzima al sustrato y se ve influenciada por las fuerzas de Van der Waals, fuerzas de largo alcance y de corto alcance, hasta que la enzima está tan cerca del sustrato que se realiza la unión con interacciones químicas en el sitio de unión al sustrato (Baig, 2020).

Este mecanismo se puede ver afectado por la composición de la lignocelulosa, en especial si no se hacen tratamientos y por las fuerzas de corte generadas en la agitación, por lo que se debe tener cierta agitación para poner en contacto las enzimas con los sustratos, pero no debe ser mucha porque disminuye el tiempo de contacto y la actividad enzimática. Se ha observado que a una velocidad de 150 rpm por 72 h se obtiene una buena hidrólisis. Otro factor que se debe considerar es la temperatura y se ha observado que el aumento de temperatura favorece la adsorción, pero no se puede aumentar tanto porque después de 55° C las enzimas se comienzan a desnaturalizar y pierden su actividad. Otros factores a considerar son el tiempo de contacto y la concentración de la enzima y sustratos, los cuales favorecen la adsorción (Baig, 2020).

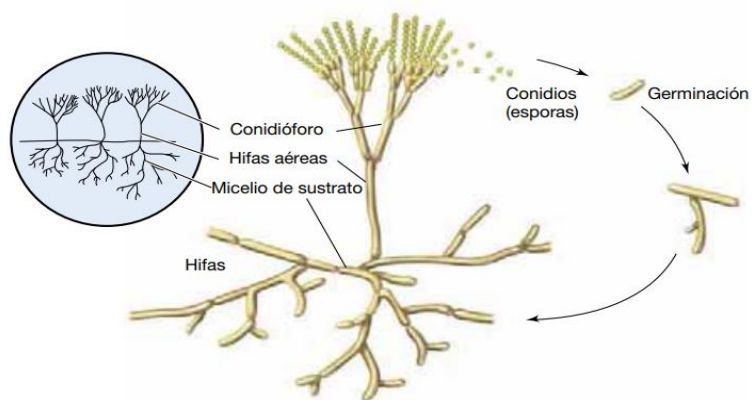
Finalmente, es importante mencionar que a pesar de los beneficios de estas enzimas lignocelulolíticas, su aplicación industrial no está tan generalizada por las cantidades que se deben usar y por los costos relacionados a producirlas, por lo que se deben aprovechar las enzimas al máximo posible, reciclándolas. Se han evaluado diferentes métodos, uno de ellos es realizando la inmovilización de las enzimas, el inconveniente es que muchas veces no se conoce la estructura de las enzimas para desarrollar un soporte o bien, el soporte puede impedir la interacción enzima-sustrato. La inmovilización más accesible es la inmovilización covalente (Verardi *et al.*, 2012) y la inmovilización usando nanopartículas magnéticas es prometedora ya que la recuperación es más sencilla al aplicar un campo magnético externo (Sánchez *et al.*, 2014). Otra alternativa es reciclar los sólidos insolubles sobrantes del proceso de hidrólisis ya que en ellos se quedan adheridas las enzimas que pueden ser usadas en otros procesos. De hecho, se ha observado que la productividad de las enzimas puede aumentar del 30 al 50 % al reciclarlas, lo que disminuye el uso de enzimas que deben adquirir las empresas, los requerimientos de enzimas y los costos de operación en la producción de combustibles renovables como el etanol (Weiss *et al.*, 2013).

## E. *Trichoderma harzianum*

*Trichoderma harzianum* es un hongo filamentoso que tiene la capacidad de alimentarse mediante la secreción de enzimas extracelulares que digieren polisacáridos o proteínas para poder absorber los monómeros como fuente de carbono para obtener energía. Este hongo es un organismo multicelular que forma un entramado de filamentos llamados hifas, las cuales están formadas por paredes celulares tubulares que rodean la membrana plasmática. Las paredes celulares de los hongos están formadas por quitina, que es un homopolisacárido formado por N-acetilglucosamina y otros polisacáridos como mananos, galactosanos o incluso celulosa, así como contienen proteínas, lípidos, polifosfatos e iones inorgánicos (Madigan *et al.*, 2015).

Estos hongos son ascomicetos que se caracterizan por un crecimiento rápido y por tener una distribución mundial, no están asociados con un estado sexual y se cree que son mitóticos y clonales, por lo que solo se reproducen asexualmente mediante esporas asexuales llamadas conidios. Los conidióforos que son las estructuras donde se forman los conidios son ramificados y pueden emerger directamente del micelio. Como método de resistencia pueden producir clamidosporas, las cuales son resistentes a condiciones desfavorables como estaciones secas o cálidas (Mesa *et al.*, 2019). El color del micelio del hongo es blanco y eventualmente se torna a un color verde oscuro luego de la esporulación de conidios. Su ciclo de vida inicia cuando el hongo crece y se ramifica como una hifa fúngica típica de 5-10 µm de diámetro, luego se forman las esporas y cuando alcanzan un tamaño de 3-5 µm de diámetro son liberadas en gran número en el proceso de esporulación asexual. Luego las esporas al estar en condiciones favorables se pueden desarrollar en un nuevo hongo como se observa en la Figura 8 (Romero *et al.*, 2009).

Figura 8. Diagrama de ciclo de vida de *Trichoderma spp.*



(Madigan *et al.*, 2015)

Se observa el crecimiento de conidióforos a partir del micelio, de los cuales se desarrollarán los conidios que son dispersados por el viento o por animales para germinar en otra ubicación.

Los hongos del género *Trichoderma* son cosmopolitas en suelo, madera y hortalizas en descomposición y en general son colonizadores de materiales celulósicos por lo que se pueden encontrar en casi cualquier material vegetal en descomposición, así como en la rizosfera de las plantas donde inducen resistencia sistémica contra patógenos (Schuster & Schmoll, 2010; Mesa *et al.*, 2019).

Algunas cepas del hongo prefieren localidades secas y templadas y otras templadas y frías, prefieren un pH ácido entre 4.5-5 y una temperatura entre 20 y 28° C, aunque crecen bien entre 6 y 32°C. Como cualquier hongo, necesita un alto contenido de humedad, cercano al 92 % para el crecimiento vegetativo y del 93 al 95 % para la esporulación, además se ha observado que la producción de esporas aumenta al estar expuestos a luz (Romero *et al.*, 2009).

Este hongo por su capacidad de producir enzimas extracelulares puede crecer en diferentes sustratos orgánicos. Se ha usado grano entero de arroz para su producción, pero este tiene un costo elevado, por lo que se han evaluado alternativas como olote de maíz, grano de alpiste, cáscara de cacahuate, grano de sorgo, cáscara de arroz, rastrojo de maíz, rastrojo de soya, cáscara de ajo, cáscara de ajonjolí, cáscara de tomate, cáscara de café, cáscara de cacao, grano de maíz y vaina de frijol y en todos tuvo un buen crecimiento y un porcentaje de viabilidad elevado, lo que muestra que se pueden utilizar residuos lignocelulósicos para cultivar al hongo y obtener productos de interés (Michel *et al.*, 2008). Otros sustratos que se han analizado para obtener productos de interés del hongo como celulasas son bagazo de caña de azúcar pretratado (da Silva *et al.*, 2012) y aguas residuales domésticas (Libardi *et al.*, 2017). Incluso se han aislado hongos del género *Trichoderma* en cucarachas, mejillones marinos y otros mariscos y en intestinos de termitas (Schuster & Schmoll, 2010).

Este hongo se ha utilizado ampliamente en el sector agrícola ya que se puede asociar con la rizosfera de las plantas, promoviendo su crecimiento y desarrollo por la producción de auxinas y giberelinas (fitohormonas), por producir ácidos orgánicos que disminuyen el pH y propician la solubilización de fosfatos, magnesio, hierro y manganeso (necesarios para el metabolismo de las plantas), por contribuir a la reincorporación de materia orgánica al suelo y contribuyen al control



de patógenos, especialmente hongos mediante la competencia por nutrientes y espacio, micoparasitismo, inducción de mecanismos de defensa vegetal y antibiosis. El control de hongos fitopatógenos lo logran realizar por la producción de enzimas extracelulares que degradan la pared celular de los hongos y por la producción de metabolitos secundarios (Hernández *et al.*, 2019; Cardoza *et al.*, 2005).

Algunos de los metabolitos secundarios producidos por este hongo con actividad antifúngica son pentaiboles (péptidos lineales como la trichorzianina TA y trichorzianina TB), policétidos (harzianopiridona, harzianolida, dehidroharzianolida, 6-pentil- $\alpha$ -pirona, 6-pent-1-enil-  $\alpha$ -pirona, koninginina E, B, D y A, seco-koninginina y masoilactona) y terpenos (como harzianum A) (Cardoza *et al.*, 2005). Otros metabolitos secundarios que se han aislado son algunas azafilonas, ácido harziánico y otros metabolitos que inhiben las moléculas bioactivas de otros hongos o que mejoran la competencia por nutrientes (Vinale *et al.*, 2014) Se ha observado que tanto los compuestos volátiles como los no volátiles de *T. harzianum* pueden inhibir el crecimiento de diferentes hongos patógenos como *Fusarium oxysporum*, que es uno de los hongos que más problemas causa en diferentes cultivos (Raza *et al.*, 2013).

Además de los metabolitos con actividad antifúngica, el hongo puede producir otros metabolitos con actividad antibacteriana, con actividad nematocida y otros con actividad insecticida, los cuales también tienen importantes aplicaciones en la agrobiotecnología (Mesa *et al.*, 2019).

*Trichoderma harzianum* se ha utilizado por estas características en el área agrícola como controlador de patógenos, pero también tiene aplicaciones industriales, en especial por su habilidad de crecer en diferentes sustratos. El hongo puede ser utilizado para producir proteínas heterólogas como fragmentos de anticuerpos inmunológicamente activos o enzimas que produzcan antibióticos al modificarlo genéticamente (Schuster & Schmoll, 2010).

Otra de sus aplicaciones es su capacidad de producir lacasas que pueden decolorar colorantes sintéticos sin generar intermediarios tóxicos o quitinasas que pueden degradar la quitina de hongos, crustáceos e insectos (Hernández *et al.*, 2019). Pueden producir enzimas usadas en la industria de alimentos como  $\beta$ -glucanasas, pectinasas, celulasas y hemicelulasas, así como mutanasas que pueden usarse en la pasta dental para evitar la acumulación de mutano, que es insoluble, en la placa dental (Schuster & Schmoll, 2010).

Finalmente, ya que *T. harzianum* puede crecer en diferentes sustratos, tiene la capacidad de producir enzimas extracelulares que pueden ser utilizadas para degradar biomasa lignocelulósica y obtener azúcares fermentables para producir etanol u otros productos de interés. Incluso se piensa que *T. harzianum* contiene en su genoma más genes que codifican para enzimas lignocelulósicas que *T. reesei*, el cual se ha usado industrialmente para producir celulasas, pero con una baja concentración de  $\beta$ -glucosidasa, que es la que corta la celobiosa en 2 glucosas. De hecho, en la cepa T6776 se encontraron 42 genes que codifican para celulasas y 24 para hemicelulasas que son más que los que tiene *T. reesei* (Zhang *et al.*, 2020).

Se ha observado que *T. harzianum* puede producir un complejo celulolítico con mayor actividad de endoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas, así como una mayor actividad de xilanasas que cocteles enzimáticos comerciales (Zhang *et al.*, 2020). *T. harzianum* puede producir hemicelulasas que son necesarias para degradar la hemicelulosa y liberar la celulosa para que actúen las celulasas,



por lo que estas enzimas tienen un efecto sinérgico y es importante que ambas estén presentes para una degradación eficiente de la lignocelulosa. Algunas enzimas que se han logrado purificar y caracterizar son xilanasas y mananasas que degradan el xilano y manano, que son de los principales componentes de la hemicelulosa (Franco *et al.*, 2004). Otras hemicelulasas obtenidas del hongo son xilosidasas, arabinofurosidasas, manosidasas, galactosidasas, carboxilesterasas y monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMOs) (Zhang *et al.*, 2020) las cuales ayudan a la conversión de la celulosa y hemicelulosa en monosacáridos por procesos oxidativos (Østby *et al.*, 2020).

## **F. Producción de enzimas hidrolíticas a partir de *Trichoderma harzianum***

Para producir enzimas a partir de este hongo se han evaluado diferentes metodologías, variando el tipo de fermentación, los sustratos en los que crece el hongo o la inducción realizada para que el hongo produzca las enzimas. Los dos tipos de fermentación usados para producir enzimas u otros productos a partir de hongos filamentosos son la fermentación líquida o sumergida y la fermentación en estado sólido, cada una tiene sus ventajas y desventajas (de Carvalho, 2016).

La fermentación en estado sólido se ha usado por años para producir pan, queso y otros productos y recientemente ha generado interés ya que permite reciclar los nutrientes de residuos lignocelulósicos y emula las condiciones en las que crecerían los hongos en la naturaleza (Sajith *et al.*, 2016). La fermentación en estado sólido es un cultivo en el que los microorganismos crecen en la superficie y en el interior de una matriz sólida, en la ausencia de agua libre y la humedad se limita a la que pueda retener la matriz sólida (de Carvalho, 2016).

Este tipo de fermentación se ha utilizado para producir enzimas a escala industrial por la posibilidad de usar residuos lignocelulósicos, por la baja inversión necesaria y los costos de operación. Por ejemplo, se han producido celulasas a partir de residuos de arroz, trigo, maíz, bagazo de caña y aserrín (Sajith *et al.*, 2016) así como xilanasas y otras hemicelulasas (de Carvalho, 2016). Incluso se ha evaluado el uso de una fermentación en estado sólido por *T. reesei* para producir celulasas y usar estas enzimas para producir etanol a partir de residuos de sorgo, lo cual se logró realizar con un 80 % de eficiencia (Idris *et al.*, 2017).

Para utilizar este tipo de fermentación es importante considerar algunos factores que influyen la morfología del hongo y su productividad. Estos son la selección de la cepa (silvestre o modificada), el sustrato sólido (residuos o material sintético inerte), la aireación (se debe controlar), actividad de agua (depende de la capacidad de retención del sustrato), parámetros físicos (temperatura, pH y otras condiciones ambientales) y la composición del medio (concentración, tipo, adición de nutrientes) (de Carvalho, 2016).

Este tipo de fermentación tiene ventajas como bajo capital y costos de operación, facilidad de manejo de grandes volúmenes de residuos, reutilización de los residuos producto de la fermentación, menor consumo de energía y efluentes de aguas residuales, menor número de operaciones de separación y purificación de metabolitos y menor susceptibilidad por sustrato. Sin embargo, tiene varias desventajas en cuanto a reproducibilidad ya que el tiempo de fermentación es largo, no se maneja un sistema de aireación eficiente, el sistema es heterogéneo y la concentración de los nutrientes cambia en el sustrato y a lo largo del tiempo, es difícil de escalar a nivel industrial, hay poco control en la temperatura, hay cambios críticos en la actividad del agua, es difícil el

mezclado, esterilización y control de contaminantes, se deben agregar macro y micronutrientes y se requiere mucho espacio (Hernández *et al.*, 2019).

Para superar estos inconvenientes se han propuesto diferentes biorreactores en los que pueden crecer los hongos, algunos de ellos son los biorreactores de bandejas que son los más sencillos y los que se pueden escalar más rápido con suficiente espacio, están los tambores giratorios que permiten el mezclado con un control de la velocidad de giro, están los de lecho empacado que tienen una alta relación sustrato/volumen y que necesitan una aireación forzada, se pueden enchaquetar para controlar la temperatura y la recuperación del producto se puede complicar. Otro tipo son los biorreactores de lecho móvil aireado lateralmente, los cuales pueden llevar a cabo fermentaciones sólidas por lotes y continuas (de Carvalho, 2016).

El otro tipo de fermentación es la fermentación sumergida, la cual es la más utilizada para producir enzimas a gran escala y se lleva a cabo en la presencia de un medio líquido que fluye libremente, en el cual están dispersos los sustratos. Algunos factores que se deben considerar en este tipo de fermentación son el pH, temperatura, concentración del sustrato, composición del medio y presencia de inductores para influenciar la producción de enzimas como celulasas (Sajith *et al.*, 2016).

Entre las ventajas de este tipo de fermentación están que es un sistema homogéneo, por lo que la concentración de nutrientes se suele mantener constante en todo el medio, tiene un mezclado más sencillo, hay un mejor monitoreo y control de temperatura, pH, oxígeno disuelto o aireación, hay una mejor esterilización y control de contaminantes, se necesita una menor cantidad de inóculo, se facilita la separación de la biomasa luego de la fermentación y es más factible el escalamiento. Las desventajas de este sistema son que se generan grandes cantidades de efluentes y que puede ser más costoso por la adquisición del equipo y la implementación de sistemas de monitoreo y control (Hernández *et al.*, 2019).

El reactor más utilizado para fermentaciones sumergidas es el de tanque agitado, el cual proporciona suficiente mezclado y transferencia de masa y calor, así como tiene un buen control de temperatura, pH y puede tener una gran concentración de biomasa (de Carvalho, 2016). Algo que hay que tener en cuenta con el uso de estos sistemas es que pueden generar grandes esfuerzos cortantes, alterando la morfología de los hongos al romper el micelio en pellets y dañando las hifas, lo que disminuye el rendimiento (Hernández *et al.*, 2019). A lo largo de la fermentación aumenta la viscosidad del medio, lo que disminuye la transferencia de oxígeno, causa gradientes de concentración y reduce la productividad, por lo que es necesario aumentar la agitación, pero esto aumenta el esfuerzo cortante por lo que es importante estudiar las condiciones de fermentación en cada reactor (de Carvalho, 2016).

Una alternativa que puede resolver el problema del estrés por corte es el uso de biorreactores airlift, los cuales tienen un sistema de agitación neumática que pone en contacto el líquido del medio y el gas que suele estar filtrado, por medio de un bucle interno que permite la transferencia de masa y el mezclado (Hernández *et al.*, 2019), estos requieren un menor consumo de energía para la misma transferencia de masa de oxígeno que uno de tanque agitado (de Carvalho, 2016). Un sistema similar es el uso de reactores de columna de burbuja, los cuales burbujan aire filtrado, estas burbujas permiten la difusión de oxígeno al medio, así como el mezclado y se han utilizado para producir celulasas con *T. harzianum* (Libardi *et al.*, 2017).

Otros biorreactores utilizados son los de bolsa desechable, los cuales son utilizados para prevenir la agregación celular y sobre todo cuando el hongo es muy sensible al estrés de corte. También se ha evaluado el uso de reactores de membrana, los cuales aprovechan la habilidad de los hongos de adherirse a superficies (de Carvalho, 2016).

Otro tipo de estrategia para obtener productos de hongos es el uso de reactores de biofilm o biopelícula, en los cuales se permite la formación de biofilm en un soporte inerte agregado a diferentes tipos de biorreactores. Esto permite combinar las ventajas de la fermentación sumergida en términos del control del proceso y las ventajas de la fermentación en estado sólido en términos de la biología y desarrollo del hongo, aumentando la densidad y estabilidad celular y con ello la productividad del reactor (Musoni *et al.*, 2015; Qureshi *et al.*, 2005).

## G. Extracción y purificación de enzimas

Las enzimas hidrolíticas producidas a partir de *T. harzianum* deben ser extraídas para poder utilizarlas en la hidrólisis de biomasa lignocelulósica y obtener azúcares para producir etanol u otros compuestos. En general, el proceso realizado para obtener las enzimas es primero obtener un extracto enzimático crudo. Para ello, el producto del cultivo del hongo se centrifuga para separar los restos del sustrato y la biomasa del hongo de la fase acuosa donde están las enzimas. Incluso se pueden extraer las enzimas intracelulares al someter la biomasa obtenida a un proceso de sonicación, pero como las enzimas hidrolíticas suelen ser extracelulares no se aumenta en mucho el rendimiento (Lee *et al.*, 2017).

Las condiciones de centrifugación pueden cambiar entre experimentos, por ejemplo Nanjundaswamy & Okeke (2020) obtuvieron el extracto al centrifugar las muestras a 5000 rpm por 10 min y recolectaron el sobrenadante, mientras que Libardi *et al.*, (2017) también centrifugaron por 10 min pero a 3000 rpm, solo que si indicaron la fuerza centrífuga relativa (2146 g). En otros estudios la obtención del extracto la hicieron centrifugando a 10,000 rpm por 20 min a 4° C cuando el sustrato fue bagazo de caña (da Silva *et al.*, 2016).

Este extracto puede ser utilizado directamente para hidrolizar biomasa lignocelulósica y obtener azúcares fermentables, almacenándolo a 4° C hasta su uso para evitar su degradación. Por lo que puede utilizarse para determinar la actividad de las enzimas obtenidas. Para ello hay diferentes ensayos como el ensayo de papel filtro (FPA) en el cual se usa papel filtro Whatman 1 que está compuesto casi en su totalidad por celulosa, este se somete a un proceso de hidrólisis por el extracto obtenido y la glucosa producida puede ser cuantificada por el método DNS (ácido dinitrosalicílico), lo que permite cuantificar la actividad de las celulasas obtenidas (Libardi *et al.*, 2017; Ghose, 1987).

La medición de la actividad de xilanasas se puede hacer de una forma similar pero usando xilano en vez de papel filtro y la medición de mananasas se puede hacer con galactomanano (Franco *et al.*, 2004). La medición específica de endoglucanasas se puede hacer sustituyendo el papel filtro por carboximetilcelulosa y la medición de celobiohidrolasas,  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -xilosidasa y  $\alpha$ -arabinofuranosidasa se puede realizar usando p-nitrofenil- $\beta$ -d-cellobioside (pNPC), p-nitrofenil- $\beta$ -glucopiranoside (pNPG), p-nitrofenil- $\beta$ -d-xilopiranoside (pNPX), y p-nitrofenil- $\alpha$ -l-arabinofuranoside (pNPAF) respectivamente como sustratos y la medición se hace con la absorbancia del p-nitrofenol liberado (Zhang *et al.*, 2020). La cuantificación de la actividad de

monooxigenasas líticas de polisacáridos se puede realizar al medir el peróxido de hidrógeno generado por la enzima usando el ensayo Amplex® Red (da Silva *et al.*, 2021).

Una mayor purificación de la enzima se puede realizar al tomar el sobrenadante de la centrifugación y precipitar las proteínas al agregar sulfato de amonio hasta una saturación del 80 %. La solución se mantiene por 12 h a 4° C y se centrifuga. Luego el precipitado se resuspende en buffer de citrato y se somete a diálisis por 24 h a 4° C (Coradi *et al.*, 2013; Sulyman *et al.*, 2020).

Para tener una mejor purificación y caracterización de las enzimas obtenidas es necesario tomar la enzima dializada y purificarla en una columna empacada con DEAE celulosa en una cromatografía de intercambio iónico y luego realizar una última purificación en una columna empacada con gel Sephadex G-100 o G-200 realizando una cromatografía por exclusión molecular (Hamdan & Jasim, 2018; Sulyman *et al.*, 2020).

Esto aplica para purificar celulasas pero si se busca purificar hemicelulasas como las xilanasas se debe concentrar el extracto crudo por ultrafiltración y luego usar cromatografía de exclusión molecular usando una columna empacada con Sephadex G-50 y finalmente con una columna empacada con fenil sefarosa (Franco *et al.*, 2004).

Finalmente, para caracterizar las enzimas obtenidas se debe determinar su peso molecular, lo cual se puede realizar usando una columna de exclusión molecular y estándares con diferentes pesos moleculares (Hamdan & Jasim, 2018) o bien usando electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), la cual separa las proteínas por peso molecular y con la ayuda de una escalera de marcadores se puede determinar el peso de las proteínas al compararla con los estándares. Finalmente se pueden determinar las condiciones de temperatura, pH y especificidad de sustrato a las que mejor opera la enzima, así como sus constantes cinéticas (Sulyman *et al.*, 2020; Hamdan & Jasim, 2018).

## H. Producción de etanol y sus aplicaciones

El etanol o alcohol etílico es un compuesto orgánico con fórmula molecular  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  con masa molar de 46.07 g/mol, tiene un punto de ebullición de 78° C a 1 atm y por su grupo hidroxilo es una molécula polar. Este compuesto es utilizado en la síntesis química ya que por la reactividad de su grupo hidroxilo es usado para obtener productos e intermediarios de interés industrial mediante reacciones de deshidratación, deshidrogenación, condensación, eterificación, transesterificación, oxidación, entre otras (Coral & Magalhaes, 2020).

Además de su uso como reactivo, este compuesto químico tiene muchas aplicaciones, se usa en la industria farmacéutica como principio activo, diluyente o coadyuvante en la fabricación, se usa para limpieza y desinfección de materiales y equipos, se utiliza para la fabricación de productos de limpieza y desinfectantes, se usa en la fabricación de cosméticos y fragancias, como solvente en fabricación de tintas, pegamentos, anticongelante para parabrisas, en bebidas alcohólicas y como biocombustible tanto para generar energía eléctrica como para ser usado en vehículos (González, 2017).

Su uso como biocombustible ha llamado mucho la atención en los últimos años, de hecho, es el biocombustible más crítico en la economía actual, contribuyendo al 65 % de la producción anual

de biocombustibles y se piensa que a partir del 2022 se usarán 36 mil millones de galones del biocombustible anualmente, así como será uno de los biocombustibles renovables dominantes en el futuro (Coral & Magalhaes, 2020; Vimmerstedt *et al.*, 2012).

Su uso como biocombustible tiene muchas ventajas: mejora el octanaje de los combustibles actuales así como el desempeño de los vehículos, tiene beneficios ambientales ya que reduce las emisiones de gases de efecto invernadero hasta en más de 100 % dependiendo de la materia prima usada y el método de producción, tiene beneficios a la salud al reducir los niveles de compuestos aromáticos en la gasolina, así como las emisiones de material particulado, se puede producir a partir de una diversidad de materias primas por lo que disminuye la dependencia de recursos petroquímicos y puede competir con el precio de la gasolina por lo que ayudaría a disminuir el precio de los combustibles (Illinois Corn Marketing Board, 2018).

El etanol puede producirse en una síntesis química mediante la hidratación del eteno con vapor, el proceso químico es exotérmico y reversible y se representa mediante la siguiente reacción química:



(Coral & Magalhaes, 2020)

Pero actualmente la mayor parte de la producción se realiza por la vía fermentativa utilizando microorganismos como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que consumen azúcares y los convierten en etanol y dióxido de carbono en condiciones anaeróbicas, así como producen metabolitos secundarios, biomasa y energía por ser un proceso exotérmico (Coral & Magalhaes, 2020). La reacción de fermentación con la que se produce etanol se puede observar en la Figura 9.

Figura 9. Ruta metabólica de la fermentación alcohólica



(Nelson & Cox, 2009)

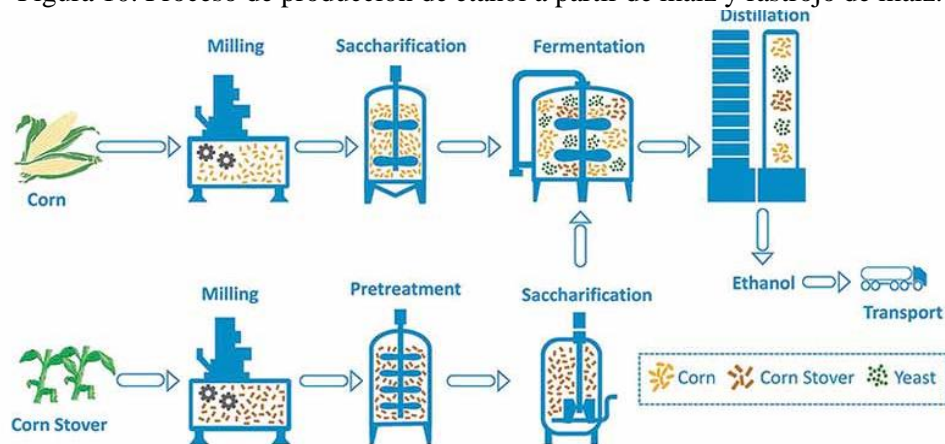
El piruvato se origina de carbohidratos como la glucosa, fructosa, galactosa, entre otros mediante la glucólisis. Luego es oxidado con la enzima piruvato descarboxilasa que necesita magnesio y TPP para producir acetaldehído, el cual se reduce con la enzima alcohol deshidrogenasa para producir el etanol con ayuda del NADH.

Luego de producir el etanol en un fermentador es necesario separarlo del resto de componentes de la fermentación como la biomasa de las levaduras, el medio con los nutrientes utilizado, agua y otros metabolitos. Para ello se utiliza la destilación que separa el etanol al calentar la mezcla y como este es más volátil que la mayoría de los compuestos se evapora de primero, lo que permite su

separación y posteriormente se condensa para recuperarlo de forma líquida. El alcohol obtenido en la destilación no es 100 % puro ya que contiene restos de agua que acarrea en la destilación, por lo que es necesario deshidratarlo con un desecante, especialmente si se usará como biocombustible (Chen *et al.*, 2018)

Actualmente, la mayor producción de etanol se realiza en Estados Unidos a partir de maíz y en Brasil a partir de caña de azúcar y la producción de ambos representa un poco más del 80 % del alcohol producido y comercializado en el mundo. A estos países les sigue la Unión Europea, China y Canadá (Coral & Magalhaes, 2020). Sin embargo, estos dos cultivos, así como la remolacha se destinan directamente a la producción de etanol, lo que requiere el uso de tierra, agua y nutrientes que podrían ser utilizados para producir alimentos. Por lo que una alternativa es el uso de residuos lignocelulósicos de otros cultivos como materia prima para la obtención de etanol. Esto disminuye los problemas de seguridad alimentaria, así como disminuye problemas ambientales ya que se les da un uso a los desechos que en otro caso causarían contaminación, promoviendo la economía circular al aprovechar recursos que necesitaron una inversión para formarse y con ello disminuyendo costos. De hecho, se estima que la biomasa lignocelulósica proporcionará cerca del 30 % de la materia prima usada en la industria química para el 2025 (Okolie *et al.*, 2021). En la Figura 10 se observa un diagrama de la producción de etanol usando maíz y el rastrojo de maíz, un residuo lignocelulósico.

Figura 10. Proceso de producción de etanol a partir de maíz y rastrojo de maíz.



(Chen *et al.*, 2018)

En la parte superior se observa la producción convencional con maíz (amarillo). En la parte inferior se observa la producción con el rastrojo de maíz (café). Se observa que en ambos se obtienen los azúcares que serán usados por las levaduras (verde) para producir el etanol en la fermentación, que posteriormente será separado mediante destilación.

## I. Producción de etanol a partir de residuos lignocelulósicos

La producción de bioetanol a partir de estos residuos inicia con un pretratamiento mecánico, químico o enzimático para remover la lignina de la biomasa lignocelulósica. Luego se utiliza un tratamiento químico o enzimático para hidrolizar la celulosa y hemicelulosa y producir pentosas y hexosas fermentables, finalmente los residuos hidrolizados se usan para producir bioetanol en una fermentación microbiana (Sajith *et al.*, 2016; Mussatto & Teixeira, 2010).

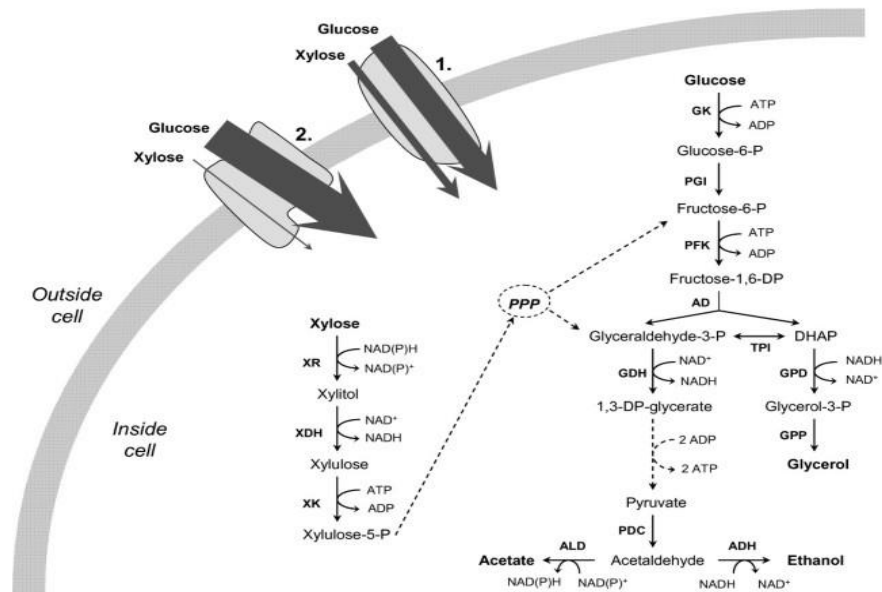
La hidrólisis enzimática y la fermentación se pueden llevar a cabo en dos reactores separados en un proceso denominado SHF (Separate Hydrolysis and Fermentation). Esto tiene la ventaja de que cada operación puede optimizarse de forma separada en cuanto a temperatura, pH y agitación. La mayoría de las celulasas y hemicelulasas tienen una máxima actividad a 50° C (Lee *et al.*, 2015), mientras que las levaduras usadas para producir etanol suelen crecer a menos de 35° C por lo que al llevar a cabo los procesos por separado aumenta la productividad de cada uno. Otra ventaja es que la fermentación se lleva a cabo en un medio líquido y no en una suspensión que contiene materiales sólidos, lo que facilita la transferencia de masa y el reciclaje de las levaduras al separarlas por filtración o centrifugación. El inconveniente de este sistema es que las celulasas se inhiben por su producto, por lo que su actividad disminuye al aumentar la concentración de celobiosa y glucosa, así como las xilanasas se inhiben a altas concentraciones de xilosa (Zuccaro *et al.*, 2020). Las enzimas también se pueden inhibir por azúcares y residuos de lignina que pueden quedar luego del pretratamiento de la biomasa. Además, este sistema tiene la desventaja de que se pueden perder azúcares en la separación de sólidos y líquidos luego de la hidrólisis (Galbe & Zacchi, 2014).

El otro sistema es llevar a cabo la hidrólisis y fermentación en el mismo reactor, en un proceso denominado SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation). Este tiene la ventaja de que los azúcares producidos por la hidrólisis enzimática son consumidos por las levaduras tan pronto como se liberan, lo que mantiene una baja concentración en el medio y con ello se evita la inhibición de las enzimas y la contaminación del medio (Zuccaro *et al.*, 2020). Otra ventaja es que algunas levaduras pueden desintoxicar el medio que contiene los inhibidores provenientes del pretratamiento de la lignocelulosa, aumentando la actividad de las enzimas y con ello una productividad mayor de etanol, incluso que cuando se lleva a cabo la hidrólisis a altas temperaturas ya que aunque tienen una mayor actividad las enzimas, se desactivan más rápido, por lo que no se pueden usar tanto tiempo, mientras que a menores temperaturas tienen más resistencia y se pueden usar por más tiempo en un sistema SSF. El inconveniente de este sistema es que se dificulta la recuperación de las levaduras ya que se mezclan con los residuos sólidos (Galbe & Zacchi, 2014).

Este sistema es muy prometedor para producir etanol a partir de residuos lignocelulósicos, pero para utilizarlo es importante determinar los parámetros en los que se tendrá una fermentación e hidrólisis adecuadas. Se ha observado que el contenido de sólidos insolubles debe ser menor al 10 % o disminuye el rendimiento de etanol, por lo que no todo el sustrato se debe agregar desde el inicio, sino que progresivamente. Esto también disminuye los costos de mezclado al tener una viscosidad menor y la presencia de inhibidores en el medio (Olofsson *et al.*, 2008).

Otro factor que se debe tener en cuenta es que la levadura más usada para producir etanol, *S. cerevisiae*, solo fermenta hexosas como glucosa, manosa y galactosa, pero no fermenta xilosa, la cual forma gran parte de la hemicelulosa, por lo que para aumentar la producción de etanol se pueden agregar al medio levaduras que metabolizan pentosas como *Pichia stipitis* o bien se puede modificar a *S. cerevisiae* para que tenga genes que codifiquen para xilosa reductasa (XR), xilitol deshidrogenasa (XGH) y xiluloquinasa (XK), los cuales permiten la fermentación de este carbohidrato (Olofsson *et al.*, 2008). En la Figura 11 se observan las rutas mediante las cuales se puede producir etanol a partir de glucosa y xilosa.

Figura 11. Rutas metabólicas en las que se produce etanol a partir de glucosa y xilosa.



(Olofsson *et al.*, 2008)

Se observan los transportadores de estos azúcares (hay más afinidad por la glucosa). En la célula la glucosa se oxida a piruvato y luego este a etanol, mientras que la xilosa debe convertirse en xilulosa-5-P para entrar en la ruta de pentosas fosfato (PPP) y posteriormente poder ser oxidada a etanol.

Finalmente, se debe controlar la temperatura que debe estar alrededor de 34° C para favorecer el crecimiento de la levadura y la actividad enzimática, así como el pH. Este último tiene un valor óptimo de 5 ya que a ese pH las enzimas hidrolíticas tienen su mayor actividad, así como pueden crecer las levaduras (pH óptimo entre 4 y 6) y tener una producción óptima de etanol (5 a 5.5) (Narendranath & Power, 2005). Además a ese pH no crecen muchas bacterias que pueden contaminar el medio y no se afecta la fermentación de galactosa, xilosa o arabinosa por el ácido galacturónico que puede estar en la hemicelulosa, como ocurre a un pH menor (Huisjes *et al.*, 2012).

## J. Cromatografía líquida de alta resolución

Existen diferentes métodos analíticos para cuantificar los azúcares liberados en la hidrólisis enzimática o el etanol producido en la fermentación. Uno de ellos es la cromatografía, que es una técnica de separación analítica que permite separar, identificar y determinar compuestos químicos en mezclas complejas. Esta se basa en las diferencias de velocidades con las que los analitos son acarreados por una fase móvil a través de una estacionaria, esto depende de la afinidad e interacción que tengan con ambas fases (Skoog *et al.*, 2015).

La cromatografía líquida de alta resolución es un tipo de cromatografía en la cual la fase móvil es un solvente líquido que fluye a través de una columna que posee una fase estacionaria que puede ser sólida o líquida. La diferencia de afinidad de los analitos a ambas fases determina la velocidad con la que se separan ya que esta técnica se basa en las solubilidades del analito y demás compuestos con ambas fases, por ejemplo, si el analito es apolar y la fase móvil es apolar y la estacionaria polar, este se moverá más rápido que otros compuestos más polares (Gary, 2009).

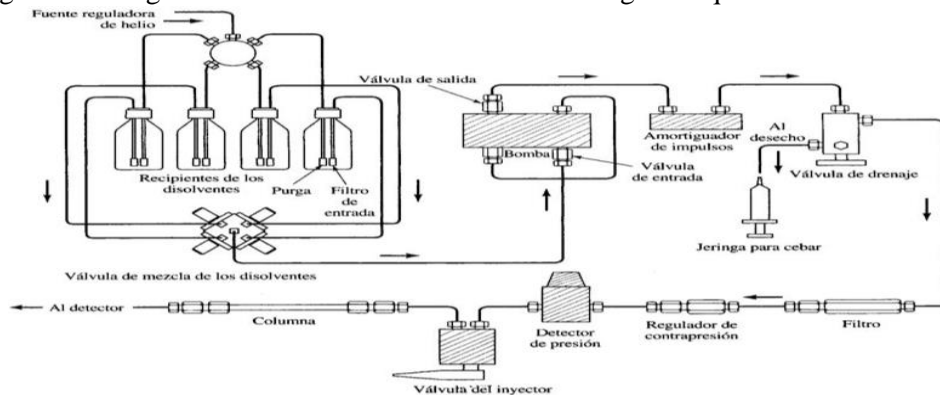


Los equipos de HPLC consisten en reservorios de fase móvil, que son reservorios de vidrio que contienen 500 mL del disolvente, el cual depende de la solubilidad y la masa molecular del analito. También cuentan con sistemas de tratamiento de disolventes en el cual se hace un burbujeo con un gas inerte para eliminar los gases disueltos en el disolvente. El equipo también cuenta con un sistema de bombeo, que suelen ser bombas de tipo jeringa impulsada por tornillos y las bombas de tipo embolo, estas deben generar presiones de + 6000 PSI, tener salida libre de pulsos, velocidades de flujo de 0.1 a 10 mL/min, reproducibilidades de flujo relativas al 0.65 % y resistencia a la corrosión por varios solventes (Skoog *et al.*, 2015).

Luego, la muestra es bombeada al sistema de inyección de muestras y pasa a las columnas para HPLC que suelen construirse de acero inoxidable, vidrio o polímeros como PEEK. Puede haber columnas analíticas y precolumnas, las columnas suelen tener un control de temperatura y de empacamiento. El proceso de separación es detectado y cuantificado con detectores para HPLC, los cuales pueden detectar absorbancia, fluorescencia, electroquímica, IR, conductividad, espectrometría de masas, dispersión de luz, etc. Uno de los detectores utilizados es el de índice de refracción, el cual mide la variación del índice de refracción en una muestra por la presencia de un soluto. Constan de una cubeta con dos compartimentos separados por una placa de vidrio, por uno de los cuales solamente pasa la fase móvil, como referencia, y por el otro pasa el eluato que abandona la columna y que contiene la muestra. Sobre la cubeta se irradia un haz de luz que se desvía cuando la muestra aparece en el líquido eluido de la columna. La ventaja de estos es que son detectores universales y que no dependen del caudal, sin embargo, sus medidas se ven afectadas por el cambio de temperatura (Skoog *et al.*, 2015).

Existen muchas aplicaciones para el uso de HPLC y dependen del tipo de fase estacionaria utilizada, por ejemplo, en la de partición o líquido – líquido, hay muchas aplicaciones en farmacéuticos, bioquímicos, productos alimenticios, químicos industriales, contaminantes, ciencias forenses y química clínica. Con este tipo se pueden determinar diferentes azúcares y etanol al utilizar una columna y una fase móvil que permita su separación como la Hi-Plex H. Lo mismo se puede determinar con la de adsorción, iónica, de afinidad, de exclusión molecular, que, además, permite determinar rápidamente las masas moleculares o distribución de masas moleculares en un número de polímeros o productos naturales. Otra aplicación es la separación de enantiómeros (Skoog *et al.*, 2015). El funcionamiento del cromatógrafo se observa en la siguiente figura.

Figura 12. Diagrama de funcionamiento de un cromatógrafo líquido de alta resolución



(Skoog *et al.*, 2015)

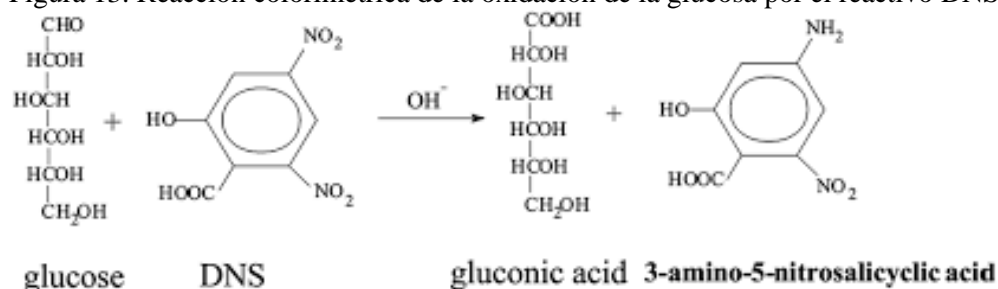
Se observan las diferentes partes que componen al cromatógrafo para lograr una separación adecuada de los compuestos para su posterior cuantificación en el detector.

## K. Otros métodos analíticos

En la experimentación el método utilizado para determinar la actividad enzimática es el ensayo de papel filtro, el cual fue desarrollado por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) para estandarizar la medición de la actividad de las celulasas ya que existen muchos métodos empíricos desarrollados a lo largo de los años por la insolubilidad y variabilidad en la estructura del sustrato. Estos métodos empíricos dificultan la comparación con otros resultados, por lo que se decidió utilizar el ensayo de papel filtro (FPA) el cual es el método más estandarizado, especialmente utilizando hongos miceliales del género *Trichoderma* (Ghose, 1987).

El método consiste en agregar el extracto enzimático obtenido o una solución de enzimas purificadas a un buffer de citrato de sodio para mantener el pH óptimo de la enzima. La solución obtenida es incubada a 50° C con una tira de papel filtro por 1 hora, de forma que en ese tiempo las celulasas presentes en el medio hidrolizan la celulosa del papel filtro para liberar azúcares reductores como la glucosa por el mecanismo de hidrólisis presentado previamente. Luego del tiempo de hidrólisis, los azúcares liberados son cuantificados con el método DNS, en el cual el ácido 3,5-dinitrosalicílico es reducido por los azúcares liberados para formar ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, el cual tiene una fuerte absorbancia a 540 nm la cual se puede registrar en un espectrofotómetro, la reacción se observa en la Figura 13. Con curvas de calibración es posible determinar la cantidad de azúcares liberados y con ello cuantificar la actividad enzimática de las enzimas presentes en el extracto analizado de acuerdo con el método de la IUPAC (Ghose, 1987).

Figura 13. Reacción colorimétrica de la oxidación de la glucosa por el reactivo DNS



(Xia *et al.*, 2015)

Se observa que la glucosa actúa como un azúcar reductor y es oxidada por el DNS para producir ácido glucónico y ácido 3-amino-5-nitrosalicílico.

Finalmente, el método utilizado para cuantificar las levaduras en la fermentación y sacarificación simultánea fue el conteo en cámara de Neubauer. Con este método, se mezcla el medio con levaduras con azul de metileno y se colocan en la cámara, la cual tiene un volumen definido. Luego la cámara se coloca bajo el microscopio y se cuentan las células que quedan sobre los cuadros de la cámara, los cuales están definidos por una cuadrícula. Las células que no se tiñen son células viables ya que estas impiden el ingreso del colorante a su citoplasma, mientras que las células no viables son teñidas de azul ya que el colorante puede ingresar a las células. Se cuentan todas las células viables de los 4 cuadros grandes y se obtiene el promedio. Este resultado es multiplicado por el factor de dilución usado para la mezcla con el colorante y por el factor indicado por el fabricante por el volumen de la cámara para obtener la concentración celular (Bastidas, s. f.).

## VI. Metodología

### A. Pretratamiento de la vaina de frijol

#### 1. Materiales y equipos

- Costales con vaina de frijol
- Balanza de humedad Ohaus MB45
- Regla
- Espátula
- Bolsas plásticas
- Recipiente para pesar
- Molino de martillos con motor Baldor
- Equipo para análisis granulométrico W.S. Tyler
- Mallas para análisis granulométrico con especificación A.S.T.M.E.-11
- Balanza semianalítica Ohaus Precision
- Brocha
- Balanza de piso Ohaus
- Refrigerador/cuarto frío

#### 2. Procedimiento

- a. Se obtuvieron 2 costales de la vaina de frijol de una cosecha del municipio de San Andrés Itzapa, Chimaltenango, colocándolos dentro de bolsas plásticas para evitar la humidificación y contaminación.
- b. La vaina fue trasladada a la universidad y almacenada en el cuarto frío para conservarla.
- c. Se determinó el tamaño inicial de la vaina al medir con una regla una muestra de vainas, se midió el ancho y largo de la vaina, la cual se observaba seca y curvada.
- d. Se midió el contenido de humedad de la vaina al medir tres muestras diferentes en una balanza de humedad.
- e. A la vaina proporcionada se le redujo el tamaño para aumentar el área superficial en la que pueden actuar las enzimas, a la vez que se reduce la cristalinidad de la celulosa. Para ello, se pesó la cantidad inicial de vaina con la que se contaba en una balanza de piso y se introdujo en un molino de martillos, en donde fue molida a un tamaño menor. No se usaron las ramas ni tallos gruesos que estaban en los sacos proporcionados.
- f. La vaina molida fue recolectada en bolsas plásticas y se pesó en la balanza de piso para conocer la cantidad de harina recuperada.
- g. Para determinar el tamaño de partícula de la vaina que se usó para la producción de enzimas y de etanol, se realizó un análisis granulométrico a la harina obtenida al tomar una muestra de 100 g de la harina y colocarla en un equipo de análisis granulométrico con mallas No. 20, 30, 45, 60, 80 y 100 (especificación A.S.T.M.E.-11).
- h. La muestra se colocó sobre el tamiz de mayor tamaño que estaba sobre el resto de los tamices, se cerró el equipo y se puso a funcionar por 15 minutos para lograr la separación.

- i. Al terminar, se pesó la harina de cada tamiz para determinar la granulometría de la harina obtenida, asegurándose de recuperar toda la masa de los tamices en un recipiente con ayuda de una brocha.
- j. La harina obtenida se guardó en bolsas plásticas para evitar contaminación y humidificación. Se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

## **B. Propagación inicial del hongo**

### 1. Recuperación de la cepa

#### a. Materiales y equipo

- Cepa del hongo *Trichoderma harzianum* CBS 130681
- Erlenmeyer de 125 mL
- Caldo nutritivo
- Agua destilada
- Estufa con agitador magnético Thermo Scientific
- Balanza analítica Ohaus
- Autoclave Tuttnauer
- Cinta testigo
- Espátula analítica
- Campana de flujo laminar Labconco
- Asa microbiológica
- Mechero y encendedor
- Etanol al 70 % y cloro al 0.1 %
- Incubadora Labline
- Tubos de ensayo con rosca
- Micropipeta
- Puntas para micropipeta estériles

#### b. Procedimiento

- 1) Para recuperar la cepa de la universidad se inoculó en caldo nutritivo. Para ello fue necesario preparar caldo nutritivo al disolver en un Erlenmeyer de 125 mL la cantidad necesaria para tener una concentración de 8 g/L con un agitador magnético.
- 2) Con una micropipeta se colocaron 10 mL del medio de cultivo en tubos de ensayo con rosca.
- 3) Los tubos se dejaron entrecerrados y fueron esterilizado en autoclave por 20 min a 121° C. Se verificó el ciclo de esterilización con cinta testigo. El medio se almacenó en refrigeración hasta su uso.
- 4) Para inocular el medio, con una asa microbiológica se tomó una porción del tubo original de la cepa CBS 130681 y se colocó en los tubos con el caldo nutritivo en la campana de flujo laminar, luego de desinfectar el área con cloro y etanol y de flamear el asa con el mechero.
- 5) Los tubos de ensayo se dejaron incubando entreabiertos a 25° C por 4 días.

### 2. Medio de cultivo sólido

#### a. Materiales y equipo

- Tubos con la cepa del hongo *Trichoderma harzianum* recuperada

- Placas Petri
- Erlenmeyer de 125 mL
- Agar PDA
- Agua destilada
- Ácido clorhídrico
- Balón aforado de 100 mL
- Pipeta graduada con pipeteador
- Potenciómetro
- Estufa con agitador magnético Thermo Scientific
- Balanza analítica Ohaus
- Autoclave Tuttnauer
- Cinta testigo
- Papel aluminio
- Papel Parafilm
- Espátula analítica
- Campana de flujo laminar Labconco
- Asa microbiológica
- Mechero y encendedor
- Etanol al 70 % y cloro al 0.1 %
- Incubadora Labline
- Estereoscopio Premiere
- Microscopio Fisher Scientific
- Portaobjetos
- Tape transparente
- Refrigerador

b. Procedimiento

- 1) Para preservar la cepa y utilizarla en la experimentación se prepararon placas con agar PDA, ya sea comercial o preparado con 4 g/L de extracto de papa, 20 g/L de dextrosa y 15 g/L de agar.
- 2) En un Erlenmeyer se disolvió la cantidad necesaria de agar PDA para una concentración de 39 g/L usando una estufa con agitador magnético y se calentó hasta ebullición.
- 3) Luego se ajustó el pH del medio a 5.6 utilizando HCl al 1 %, el cual fue preparado en un balón aforado de 100 mL, el pH final se comprobó con un potenciómetro.
- 4) El Erlenmeyer se cubrió con papel aluminio y fue esterilizado en autoclave por 20 min a 121° C. Se verificó el ciclo de esterilización con cinta testigo.
- 5) Al disminuir su temperatura el agar fue vertido en placas Petri en una campana de flujo laminar desinfectada y se esperó a que solidificara, luego se almacenaron en refrigeración las placas hasta su uso.
- 6) Para inocular el hongo en el agar, en la campana de flujo laminar desinfectada se flameó una asa microbiológica y luego se introdujo en los tubos de ensayo (también flameados) para tomar una asada del hongo que había crecido y se estrió sobre las placas de agar.

- 7) Las placas se cerraron con papel Parafilm y se incubaron a 25° C por 5 días hasta observar la formación de conidios.
- 8) El crecimiento del hongo fue observado utilizando un estereoscopio.
- 9) Las hifas y conidios fueron observados al tomar una muestra del micelio con tape transparente y colocarlo sobre un portaobjetos, el cual se observó en el microscopio.
- 10) Las placas con el crecimiento del hongo se almacenaron en refrigeración hasta su uso y unas de ellas fueron destinadas para el cepario.

### 3. Medio de cultivo líquido

#### a. Materiales y equipo

- Placas con la cepa del hongo *Trichoderma harzianum*
- Erlenmeyers de 250 mL
- Beaker de 500 mL
- Surfactante Tween 80
- Urea
- Fosfato monopotásico
- Sulfato de amonio
- Cloruro de calcio dihidratado
- Sulfato de magnesio heptahidratado
- Peptona
- Sulfato de hierro II heptahidratado
- Sulfato de manganeso monohidratado
- Sulfato de zinc heptahidratado
- Cloruro de cobalto II hexahidratado
- Glicerol
- Ftalato de potasio
- Agua destilada
- Ácido clorhídrico al 1 %
- Hidróxido de sodio al 1 %
- Balón aforado de 100 mL
- Pipeta graduada con pipeteador
- Probeta de 100 mL
- Potenciómetro
- Estufa con agitador magnético Thermo Scientific
- Balanza analítica Ohaus
- Autoclave Tuttnauer
- Cinta testigo
- Papel aluminio
- Espátula analítica
- Campana de flujo laminar Labconco
- Mechero y encendedor
- Etanol al 70 % y cloro al 0.1 %
- Varilla de vidrio
- Incubadora con agitador orbital Barnstead

- Espectrofotómetro Shimadzu
- Celda para espectrofotómetro
- Kimwipes
- Micropipeta
- Puntas para micropipeta
- Tubo de ensayo con rosca
- Refrigerador

b. Procedimiento

- 1) Para propagar al hongo utilizado en la experimentación, en un tubo de ensayo con rosca se preparó una solución de agua destilada con el surfactante Tween 80 al 1 % (v/v) para obtener una suspensión de conidios para el pre-inóculo.
- 2) Se preparó el medio de cultivo para el pre-inóculo en un beaker de 500 mL al disolver en una estufa con agitador magnético los siguientes componentes con sus respectivas concentraciones: Tween 80 al 1 % (v/v), 3 g/L de urea, 2.0 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1.4 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0.4 g/L de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0.3 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1.0 g/L de peptona; 5.0 mg/L de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1.6 mg/L de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 1.4 mg/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 2.0 mg/L de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y como fuente de carbono se utilizó glicerol a una concentración de 20 g/L para evitar la inhibición por sustrato de las celulasas como ocurre al usar glucosa en el medio de cultivo.
- 3) Para mantener el pH se usó ftalato de potasio 50 mM como buffer en el cual se disolvieron los componentes.
- 4) El pH inicial del medio se ajustó a 5.0 con NaOH al 1 %, el cual se preparó en un balón de 100 mL, esto luego de obtener un volumen final de 380 mL. El pH se verificó con un potenciómetro.
- 5) Luego el medio de cultivo se vertió en 2 Erlenmeyers de 250 mL que se taparon con papel aluminio y junto con la solución de Tween 80 preparada fueron esterilizados en autoclave por 20 min a  $121^\circ \text{C}$ . Se verificó el ciclo de esterilización con cinta testigo.
- 6) Luego de enfriarse, en la campana de flujo laminar desinfectada, se agregaron 20 mL de la solución con el surfactante a una placa de agar PDA con el cultivo de 5 días del hongo y se agitó para obtener la suspensión de conidios. Esta suspensión se agregó a los Erlenmeyers con el medio de cultivo para el pre-inóculo (10 mL a cada uno).
- 7) Los Erlenmeyers se incubaron a  $28^\circ \text{C}$  en una incubadora con agitador rotatorio a 150 rpm por 100 h manteniendo el aluminio para evitar contaminación.
- 8) Se midió la densidad óptica del medio antes y después de la incubación para comprobar el crecimiento del hongo usando un espectrofotómetro a 600 nm.
- 9) Los pre-inóculos se almacenaron en refrigeración hasta su uso.

## C. Inducción de producción de enzimas en medio con vaina de frijol

### 1. Materiales y equipos

- Pre-inóculo con la cepa del hongo *Trichoderma harzianum*
- Erlenmeyers de 250 mL
- Erlenmeyer de 2 L

- Surfactante Tween 80
- Urea
- Fosfato monopotásico
- Sulfato de amonio
- Cloruro de calcio dihidratado
- Sulfato de magnesio heptahidratado
- Peptona
- Sulfato de hierro II monohidratado
- Sulfato de manganeso monohidratado
- Sulfato de zinc heptahidratado
- Cloruro de cobalto II hexahidratado
- Harina de vaina de frijol
- Ftalato de potasio
- Agua destilada
- Ácido clorhídrico al 1 %
- Hidróxido de sodio al 1 %
- Pipeta graduada con pipeteador
- Probeta de 100 mL
- Potenciómetro
- Estufa con agitador magnético Thermo Scientific
- Balanza analítica Ohaus
- Autoclave Tuttnauer
- Cinta testigo
- Papel aluminio
- Espátula analítica
- Campana de flujo laminar Labconco
- Mechero y encendedor
- Etanol al 70 % y cloro al 0.1 %
- Varilla de vidrio
- Incubadora con agitador orbital New Brunswick Scientific
- Kimwipes
- Micropipeta
- Puntas para micropipeta

## 2. Procedimiento

- a. Para llevar a cabo la producción de enzimas lignocelulósicas se utilizó la harina obtenida de la vaina de frijol como fuente de carbono. Para ello, se preparó el medio de cultivo en un Erlenmeyer de 2 L al disolver los mismos componentes que los usados en la obtención del preinóculo para un volumen final de 1400 mL, con la diferencia de que se usó urea a una concentración de 0.3 g/L y que no se agregó glicerol.
- b. Para mantener el pH se usó ftalato de potasio 50 mM como buffer en el cual se disolvieron los componentes.
- c. El pH inicial del medio se ajustó a 5.0 con NaOH al 1 % y se verificó con un potenciómetro.



- d. El medio de cultivo se trasvasó a 7 Erlenmeyers y en vez de glicerol la fuente de carbono fue la harina de la vaina de frijol. Se analizó la producción de enzimas con 3 concentraciones diferentes: 12.5 g/L, 25 g/L y 37.5 g/L.
- e. La misma cantidad de harina de la vaina se agregó a dos de los Erlenmeyers y al último no se le agregó vaina de frijol.
- f. Los Erlenmeyers se taparon con papel aluminio y fueron esterilizados en autoclave por 20 min a 121° C. Se verificó el ciclo de esterilización con cinta testigo.
- g. Luego de enfriarse, en la campana de flujo laminar desinfectada, se agregó el pre-inóculo con una micropipeta con puntas estériles a un Erlenmeyer para cada concentración de vaina, a una concentración del 10 % (v/v), el Erlenmeyer restante sirvió como control. De igual forma se agregó el pre-inóculo al Erlenmeyer sin vaina de frijol como otro control negativo.
- h. Los Erlenmeyers se mantuvieron con el papel aluminio para evitar contaminación y se incubaron en una incubadora con agitador rotatorio a 28° C a 150 rpm por una semana.

## **D. Extracción de enzimas**

### **1. Materiales y equipos**

- Medios usados en la inducción de la producción de enzimas
- Frascos de plástico con rosca
- Frascos para centrífuga
- Centrifugadora con control de temperatura Sorvall
- Cinta testigo
- Balanza semianalítica Ohaus
- Autoclave Tuttnauer
- Cinta testigo
- Campana de flujo laminar Labconco
- Mechero y encendedor
- Etanol al 70 % y cloro al 0.1 %
- Micropipeta
- Puntas para micropipeta
- Refrigerador
- Beakers de 50 mL
- Horno secador VWR

### **2. Procedimiento**

- a. Para poder analizar si se logran obtener enzimas lignocelulolíticas usando la vaina de frijol como inductor y para determinar la concentración a la cual aumenta la producción de las enzimas fue necesario separarlas del medio de cultivo. Para ello, se esterilizaron en autoclave a 121° C por 15 minutos frascos de plástico con rosca para almacenar el extracto enzimático.
- b. El extracto se obtuvo al centrifugar el contenido de los Erlenmeyers en los que se indujo la producción enzimática incluyendo los controles a 4000 rpm por 25 minutos a 4° C.
- c. Las enzimas se encuentran en el sobrenadante, por lo que este se consideró como el extracto enzimático. Los sólidos se descartaron y los sobrenadantes se colocaron en los botes de plástico esterilizados, cuya masa fue cuantificada con una balanza semianalítica.
- d. Los botes con los extractos enzimáticos se mantuvieron en refrigeración hasta su uso.

- e. Se tomó una muestra de 2 mL de cada extracto y se colocó en un beaker de 50 mL completamente seco, los beakers se introdujeron en un secador a 60° C por un día hasta que no quedó agua en el medio y se pesaron los sólidos presentes en el extracto para determinar la concentración de sólidos.

## **E. Determinación de actividad enzimática**

### 1. Materiales y equipos

- Frascos de plástico con los extractos enzimáticos
- Balón aforado de 250 mL
- Balón aforado de 100 mL
- Ácido cítrico monohidratado
- Agua destilada
- Hidróxido de sodio
- Pipetas graduadas y pipeteador
- Beakers de 600 mL
- Erlenmeyer de 2 L
- Ácido 3,5-dinitrosalicílico
- Tartrato de sodio potasio
- Fenol
- Metabisulfito de sodio
- Probeta de 1 L
- Recipientes para almacenar soluciones
- Papel aluminio
- Estufa con agitador magnético Thermo Scientific
- Espátula analítica
- Balón aforado de 10 mL
- Beaker de 10 mL
- Dextrosa anhidra
- Tubos de ensayo con rosca
- Micropipeta
- Puntas para micropipeta
- Probeta de 100 mL
- Varilla de vidrio
- Celda para espectrofotómetro
- Tubos de ensayo de al menos 25 mL con tapones
- Gradillas
- Papel filtro
- Kimwipes
- Balanza analítica Ohaus
- Potenciómetro
- Termómetro
- Campana de flujo laminar Labconco
- Espectrofotómetro Shimadzu
- Baño térmico Precision

- Mechero y encendedor
- Etanol al 70 % y cloro al 0.1 %

## 2. Procedimiento

- Para determinar la actividad enzimática, se hizo un ensayo para la determinación de celulasas ya que estas son las más importantes en la etapa de hidrólisis por ser capaces de liberar glucosa de la celulosa. Para ello se utilizó el ensayo estándar de papel filtro (FPA), el cual determina azúcares reductores como la glucosa liberados luego de una reacción enzimática.
- Para ello, es necesario preparar una solución buffer de citrato 0.05 M a pH de 4.8, la cual se preparó en una estufa con agitador magnético en un beaker de 600 mL al agregar 52.5 g de ácido cítrico monohidratado, 190 mL de agua destilada y 12.5 g de hidróxido de sodio hasta obtener un pH de 4.3. El pH se verificó con potenciómetro.
- La solución se diluyó a 250 mL y se ajustó el pH a 4.5 con hidróxido de sodio. Con eso se obtuvo un stock de buffer 1 M. Para utilizarlo en el ensayo de actividad enzimática fue necesario diluirlo en un balón aforado de 100 mL para obtener una concentración de 0.05 M, cuyo pH debe ser de 4.8.
- También fue necesario preparar el reactivo DNS que es el que reacciona con los azúcares reductores para producir un compuesto que absorbe fuertemente a 540 nm. Para ello, en un Erlenmeyer de 2 L en una estufa con agitador magnético se mezclaron 1416 mL de agua destilada, 10.6 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico y 19.8 g de hidróxido de sodio.
- Se disolvió y luego se añadieron 306 g de tartrato de sodio potasio, 7.1 g de fenol y 8.3 g de metabisulfito de sodio.
- Se esperó a que se disolvieran por completo los componentes y la solución se trasvasó a un recipiente que se envolvió en papel aluminio para evitar degradación.
- Se preparó una curva de calibración usando estándares de glucosa de 1.0 a 10 mg/mL y con ella se calculó la glucosa liberada del papel filtro en la reacción enzimática y con ello las unidades enzimáticas por mililitro.
- Para ello se preparó una solución madre de glucosa en un balón aforado de 10 mL con una concentración de 10 mg/mL.
- A partir de esta solución se realizaron diluciones en tubos de ensayo con buffer de citrato 0.05 M, al agregar en los tubos 1 mL de la solución madre más 0.5 mL de buffer para una solución de 6.7 mg/mL, 1 mL de buffer para una solución de 5 mg/mL, 2 mL de buffer para una solución de 3.3 mg/mL, 4 mL de buffer para una solución de 2 mg/mL y 9 mL de buffer para una solución de 1 mg/mL.
- Fue necesario preparar un blanco que se restó al resto de mediciones al colocar en un tubo de ensayo 1.5 mL de buffer de citrato y 3 mL del reactivo DNS, el tubo se colocó en agua en ebullición por 5 minutos y luego se pasó a otro tubo de ensayo grande, al cual se le agregaron 20 mL de agua destilada, se agitó y se midió la absorbancia a 540 nm.
- Para realizar la curva de calibración, en tubos de ensayo se colocaron 0.5 mL de cada estándar de glucosa con 1 mL de buffer de citrato y 3 mL del reactivo DNS.
- Los tubos se colocaron en agua en ebullición por 5 minutos y luego el contenido se pasó a tubos de ensayo mayores junto con 20 mL de agua destilada, se agitaron y se midió la absorbancia a 540 nm, a la cual se le restó el blanco. Con estos datos se obtuvo la curva de calibración.
- Para la determinación de las unidades de actividad enzimática se agregó 1 mL del buffer de citrato a un tubo de ensayo y luego se agregaron 0.5 mL del extracto

enzimático previamente diluido en buffer de citrato (se tuvieron 2 diluciones por muestra, 1 concentrada y 1 dilución 1:5) y se llevó a una temperatura de 50° C en un baño térmico.

- n. Luego de temperarse, se agregó al medio una tira de papel filtro de 1.0 x 6.0 cm asegurándose que quedara sumergida una parte y se incubó a 50° C por 60 min en el baño térmico.
- o. Posteriormente, se añadieron 3.0 mL de reactivo DNS y se colocó en agua a ebullición por 5 min, luego se pasó el contenido a un tubo de ensayo mayor junto con 20 mL de agua destilada y se mezcló el tubo por inversión. Se esperó a que la pulpa se asentara y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 540 nm.
- p. A este resultado se le restó la absorbancia del blanco, así como del blanco enzimático, el cual se preparó al agregar en un tubo de ensayo 1.0 mL de buffer de citrato, 0.5 mL del extracto enzimático diluido y 3 mL del reactivo DNS.
- q. El tubo se colocó en agua en ebullición por 5 minutos, luego el contenido se pasó a un tubo de ensayo mayor junto con 20 mL de agua destilada, se agitó y se midió la absorbancia a 540 nm, a la cual se le restó el blanco.
- r. Este procedimiento se realizó para todas las muestras con diferente concentración de vaina y con los controles. El extracto enzimático de la muestra con la que se obtuvo una mayor actividad enzimática fue utilizado en la hidrólisis de la vaina y en la fermentación alcohólica.

## **F. Hidrólisis alcalina de la vaina de frijol**

### **1. Materiales y equipos**

- Harina de vaina de frijol
- Espátula analítica
- Bolsas plásticas
- Recipiente plástico
- Erlenmeyers de 2 L
- Agua destilada
- Hidróxido de sodio
- Estufa con agitador magnético Thermo Scientific
- Probeta de 1 L
- Manta
- Guantes
- Varilla de vidrio
- Balanza semianalítica Ohaus
- Termómetro
- Horno secador VWR
- Balanza de humedad Ohaus

### **2. Procedimiento**

- a. Para evaluar el efecto de una hidrólisis alcalina en la mejora del proceso de hidrólisis se preparó una solución de NaOH al 10 % (m/v) en Erlenmeyers de 2 L.
- b. A los Erlenmeyers se les agregó vaina de frijol de forma que se obtuviera una concentración de 0.05 g de biomasa molida/mL de solución y se incubó por 1.5 h a 45° C en una estufa con agitador magnético con agitación moderada.

- c. Luego la solución obtenida fue filtrada con manta al colocar la manta sobre un recipiente e introducir la mezcla sobre ella, se envolvió la mezcla con la manta y utilizando guantes se exprimió para eliminar el líquido.
- d. El sólido obtenido se lavó con agua para eliminar el exceso de NaOH y se volvió a eliminar el agua al filtrar en la manta.
- e. El sólido obtenido se secó en un secador a 60° C por un día hasta obtener una humedad similar a la de la vaina sin tratamiento, la cual se midió con la balanza de humedad.
- f. El sólido se almacenó en bolsas para evitar su contaminación y humidificación y en refrigeración.

## **G. Hidrólisis enzimática de la vaina de frijol**

### **1. Materiales y equipos**

- Harina de vaina de frijol hidrolizada y sin hidrolizar
- Extracto enzimático
- Espátula analítica
- Erlenmeyers de 125 mL
- Buffer de citrato 0.05 M
- Reactivo DNS
- Micropipeta
- Puntas para micropipeta
- Tubos de ensayo
- Tubos de ensayo de al menos 25 mL
- Baño térmico Precision
- Beaker de 600 mL
- Agua destilada
- Autoclave Tuttnauer
- Cinta testigo
- Papel aluminio
- Balanza analítica Ohaus
- Campana de flujo laminar Labconco
- Etanol al 70 % y cloro al 0.1 %
- Probeta de 100 mL
- Incubadora con agitador orbital Barnstead
- Celda para espectrofotómetro
- Espectrofotómetro Shimadzu

### **2. Procedimiento**

- a. Para evaluar el efecto de una hidrólisis alcalina se realizó una hidrólisis enzimática de la vaina de frijol para liberar azúcares fermentables al preparar medios con vaina de frijol hidrolizada y sin hidrolizar químicamente.
- b. Para ello en cuatro Erlenmeyers de 125 mL se agregó vaina de frijol sin hidrólisis alcalina y en otros cuatro Erlenmeyers se agregó vaina de frijol con hidrólisis alcalina a una concentración de 12.5 g/L en buffer de citrato 0.05 M. Los Erlenmeyers se taparon con aluminio y fueron esterilizados en autoclave a 121° C por 20 minutos. La esterilización se verificó con cinta testigo.

- c. Al enfriarse, a tres de los medios de cada tipo se les agregó 8 mL del extracto enzimático que mostró mayor actividad enzimática. El extracto enzimático se tomó del frasco en una campana de flujo laminar desinfectada.
- d. Los Erlenmeyers con la vaina hidrolizada y sin hidrolizar con el extracto enzimático se incubaron en incubadora a 40° C y 150 rpm por 50 horas, durante ese tiempo se tomaron muestras de 0.5 mL a las 2, 24, 48 y 50 horas para elaborar curvas de liberación de azúcares usando los valores promedio de las tres muestras de cada tipo de medio.
- e. De igual forma, al otro Erlenmeyer de cada tipo de medio se le agregó 30 mL del extracto con la segunda mayor actividad para observar el efecto de una hidrólisis alcalina en la liberación de azúcares con una actividad enzimática menor. El extracto enzimático se tomó del frasco en una campana de flujo laminar desinfectada.
- f. Los Erlenmeyers con la vaina hidrolizada y sin hidrolizar con el extracto enzimático se incubaron en incubadora a 40° C y 150 rpm por 26 horas, durante ese tiempo se tomaron muestras de 0.5 mL a las 1, 4, 24 y 26 horas para elaborar curvas de liberación de azúcares.
- g. Para determinar los azúcares reductores producidos en las curvas, en tubos de ensayo se colocaron los 0.5 mL de cada medio de reacción con 1 mL de buffer de citrato y 3 mL del reactivo DNS.
- h. Los tubos se colocaron en agua en ebullición por 5 minutos en el beaker de 600 mL y luego el contenido se pasó a tubos de ensayo mayores junto con 20 mL de agua destilada, se agitaron y se midió la absorbancia a 540 nm, a la cual se le restó el blanco. Con la curva de calibración de glucosa obtenida, se determinó la concentración de azúcares liberados en la hidrólisis enzimática y con ello se compararon los resultados obtenidos entre la vaina con hidrólisis alcalina y la vaina sin hidrólisis alcalina.

## **H. Fermentación alcohólica**

### **1. Preparación de inóculo inicial**

#### **a. Materiales y equipo**

- Levadura seca comercial Fermipan
- Beaker de 250 mL
- Erlenmeyer de 500 mL
- Extracto de levadura
- Peptona
- Dextrosa
- Agua destilada
- HCl al 1 %
- Pipetas graduadas con pipeteador
- Potenciómetro
- Papel aluminio
- Estufa con agitador magnético Thermo Scientific
- Balanza analítica Ohaus
- Autoclave Tuttnauer
- Cinta testigo
- Probeta de 1 L
- Espátula analítica

- Varilla de vidrio
- Campana de flujo laminar Labconco
- Mechero y encendedor
- Etanol al 70 % y cloro al 0.1 %
- Incubadora con agitador orbital Barnstead
- Refrigerador

b. Procedimiento

- 1) Para propagar la levadura utilizada para la producción de etanol se preparó el medio de propagación que consistió en 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona y 20 g/L de dextrosa, los cuales se disolvieron en un Erlenmeyer de 500 mL con el agitador magnético.
- 2) El pH del medio se ajustó a 5 con HCl al 1 % y se verificó con un potenciómetro.
- 3) El Erlenmeyer se tapó con aluminio y se esterilizó en autoclave a 121° C por 20 minutos. Se verificó la esterilización con cinta testigo.
- 4) Al enfriarse el medio, en campana de flujo laminar desinfectada, se agregó levadura seca para obtener una concentración de 1 g/L y el medio se mantuvo con el aluminio para evitar contaminación. El medio se incubó a 30° C y 120 rpm por 24 h.
- 5) Luego el inóculo inicial se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

2. Producción de etanol

a. Materiales y equipo

- Inóculo inicial de levadura
- Erlenmeyers de 250 mL con deflectores y tapones
- Extracto de levadura
- Peptona
- Harina de vaina sin tratamiento
- Harina de vaina hidrolizada con NaOH
- Agua destilada
- HCl al 1 %
- Pipetas graduadas con pipeteador
- Potenciómetro
- Papel aluminio
- Estufa con agitador magnético Thermo Scientific
- Balanza analítica Ohaus
- Autoclave Tuttnauer
- Cinta testigo
- Probeta de 1 L
- Espátula analítica
- Varilla de vidrio
- Micropipeta
- Puntas para micropipeta
- Extracto enzimático

- Campana de flujo laminar Labconco
- Mechero y encendedor
- Etanol al 70 % y cloro al 0.1 %
- Incubadora con agitador orbital Barnstead
- Refrigerador
- Parafilm

b. Procedimiento

- 1) Para evaluar la producción de etanol a partir de la vaina de frijol se preparó el medio de cultivo en Erlenmeyers con deflectores y tapones de 250 mL que consistió en 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona y una concentración de la harina de vaina de 12.5 g/L. Se prepararon cinco medios con vaina hidrolizada y cinco con vaina que no fue sometida a hidrólisis alcalina, así como un medio que no contenía vaina como control.
- 2) El pH del medio se ajustó a 5 con HCl al 1 % y se verificó con un potenciómetro.
- 3) Los Erlenmeyers se taparon con aluminio y se esterilizaron en autoclave a 121° C por 20 minutos. Se verificó la esterilización con cinta testigo.
- 4) Al enfriarse, a tres de los medios de cada vaina (hidrolizada y sin hidrolizar), en campana de flujo laminar desinfectada, se les agregó 8 mL del extracto enzimático con mayor actividad, así como se agregó el inóculo al tomar alícuotas del inóculo inicial para tener una concentración del 15 % (v/v).
- 5) Como controles, a uno de los medios de cada tipo de vaina se agregó el extracto enzimático, pero no se agregó el inóculo de levaduras. Como otro control, se agregó el inóculo de levaduras, pero no se agregó el extracto enzimático. Finalmente, al medio que no contenía vaina se le agregó la levadura y el extracto enzimático.
- 6) Posteriormente, se taparon los Erlenmeyers con sus tapones y se sellaron con Parafilm. Los Erlenmeyers se incubaron a 34°C con agitación de 150 rpm por 72 h.
- 7) Al terminar la fermentación, se tomaron muestras de los medios para analizarlas en HPLC. Las condiciones del medio con mayor producción de etanol se utilizaron para una fermentación en un biorreactor para tener condiciones más controladas, así como para analizar el crecimiento celular mediante un conteo.

## I. Determinación de etanol y azúcares

### 1. Materiales y equipos

- Beaker de 50 mL
- Balones aforados de 25 mL
- Etanol absoluto
- Dextrosa anhidra
- Fructosa anhidra
- Sacarosa anhidra
- Balones aforados de 10 mL
- Agua ultrapura
- Agua destilada



- Pipetas graduadas con pipeteador
- Micropipeta
- Puntas para micropipeta
- Estufa con agitador magnético Thermo Scientific
- Espátula analítica
- Probeta de 10 mL
- Varilla de vidrio
- Filtro de jeringa de 0.22  $\mu\text{m}$
- Viales de cromatografía
- Columna Hi-Plex H para separación de azúcares y alcoholes
- Balanza analítica Ohaus
- Potenciómetro
- Centrífuga Fisher Scientific
- Campana de flujo laminar Labconco
- Cromatógrafo HPLC con detector de índice de refracción Agilent
- Etanol al 70 % y cloro al 0.1 %
- Tubos de ensayo con rosca

## 2. Procedimiento

- a. El etanol producido en las fermentaciones y los azúcares liberados en la hidrólisis enzimática fueron analizados mediante cromatografía líquida de alta resolución. Para ello, es necesario preparar soluciones estándar de calibración usando etanol, así como de glucosa, fructosa y sacarosa para comprobar si quedaron restos de los azúcares en la fermentación.
- b. Las soluciones para preparar las curvas de calibración fueron preparadas por el encargado del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada, las cuales tuvieron concentraciones de 1, 2, 3, 4 y 5 % (m/v) utilizando los compuestos a analizar disueltos en agua ultrapura o para HPLC.
- c. Para el análisis de las muestras, se tomaron muestras de todos los Erlenmeyers (así como del biorreactor) y se centrifugaron a 3400 rpm por 10 minutos para separar las células y la biomasa restante.
- d. El sobrenadante se colocó en tubos de ensayo con rosca, los cuales se almacenaron en refrigeración hasta su análisis.
- e. Las muestras (estándares y muestras de fermentaciones) fueron analizadas por el encargado del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada, al filtrarlas en un filtro de jeringa de 0.22  $\mu\text{m}$  y colocarlas en viales de cromatografía. Para la corrida se usó agua como fase móvil a un flujo de 0.6 mL/min. Se utilizó una columna Agilent Hi-Plex H de 300 x 7.8 mm, 5  $\mu\text{m}$ , para separar etanol de azúcares a una temperatura de 40° C en la columna y el detector y de 25° C en el termostato del auto muestreador. El análisis se hizo con un detector de índice de refracción acoplado al cromatógrafo. El volumen de inyección fue de 20  $\mu\text{L}$  y las corridas se hicieron por 30 minutos.
- f. Se determinó la concentración de etanol y azúcares en las muestras luego de obtener la curva de calibración con los estándares preparados y los resultados del área de los picos de los compuestos para las diferentes muestras analizadas.

## J. Pruebas en biorreactor

### 1. Producción de enzimas lignocelulolíticas

#### a. Materiales y equipo

- Pre-inóculo con la cepa del hongo *Trichoderma harzianum*
- Erlenmeyer de 2 L
- Surfactante Tween 80
- Urea
- Fosfato monopotásico
- Sulfato de amonio
- Cloruro de calcio dihidratado
- Sulfato de magnesio heptahidratado
- Peptona
- Sulfato de hierro II monohidratado
- Sulfato de manganeso monohidratado
- Sulfato de zinc heptahidratado
- Cloruro de cobalto II hexahidratado
- Harina de vaina de frijol
- Ftalato de potasio
- Agua destilada
- Ácido clorhídrico al 1 %
- Hidróxido de sodio al 1 %
- Pipeta graduada con pipeteador
- Probeta de 1 L
- Estufa con agitador magnético Thermo Scientific
- Balanza analítica Ohaus
- Autoclave Tuttnauer
- Cinta testigo
- Papel aluminio
- Espátula analítica
- Mechero y encendedor
- Etanol al 70 % y cloro al 0.1 %
- Varilla de vidrio
- Micropipeta
- Puntas para micropipeta
- Nitrógeno gaseoso
- Electrodo para medición de pH
- Electrodo para medición de oxígeno disuelto
- Termocupla para medición de temperatura
- Recipientes para almacenamiento de ácido y base
- Mangueras
- Agitador
- Biorreactor Sartorius Stedim BIOSTAT A plus con controladores
- Bolsa plástica
- Compresor de aire
- Filtro de 0.22  $\mu\text{m}$

- Estándares de pH
- Horno secador VWR
- Centrifugadora Sorvall

b. Procedimiento

- 1) Para llevar a cabo la producción de enzimas lignocelulósicas en el biorreactor fue necesario calibrar los sensores. Para ello se calibró el sensor de pH sumergiendo el sensor en estándares de pH según las indicaciones del equipo.
- 2) La calibración del sensor de oxígeno disuelto se realizó con una medición con el sensor al aire libre para indicar el 100 % de oxígeno, mientras que el 0 % se logró al introducir el sensor en una atmósfera con nitrógeno puro. Para ello se llenó una bolsa de plástico con una manguera proveniente de un tanque de nitrógeno y el sensor se introdujo en la bolsa durante la medición, asegurándose de que no ingresara aire.
- 3) Para inducir la producción enzimática se utilizó la harina obtenida de la vaina de frijol sin hidrólisis alcalina como fuente de carbono a una concentración de 12.5 g/L. Para ello, se preparó el medio de cultivo en un Erlenmeyer de 2 L al disolver los mismos componentes que los usados en la inducción de la producción de enzimas en Erlenmeyers para un volumen final de 1 L.
- 4) Para mantener el pH se usó ftalato de potasio 50 mM como buffer en el cual se disolvieron los componentes.
- 5) Se prepararon soluciones de NaOH al 1 % y HCl al 1 % para regular el pH en el biorreactor, estas soluciones se colocaron dentro de los recipientes del equipo.
- 6) El medio de cultivo se trasvasó al recipiente del biorreactor, el cual es autoclaveable, este se introdujo en el autoclave con su tapadera, dejando flojos los tornillos de cierre para evitar la acumulación de presión. Los recipientes con el ácido y la base se taparon con papel aluminio y también se introdujeron en el autoclave y se esterilizaron por 20 min a 121° C. Se verificó el ciclo de esterilización con cinta testigo.
- 7) Los sensores no son autoclaveables por lo que antes de introducirlos al biorreactor fueron desinfectados con etanol al 70 %, luego de haber desinfectado el área con cloro y etanol.
- 8) Luego de enfriarse el medio de cultivo, a un lado del reactor con un mechero cerca para mantener la zona estéril, se conectaron los recipientes con ácido y base al biorreactor utilizando mangueras que pasan por una bomba peristáltica.
- 9) Se introdujeron los sensores al equipo y se agregó el pre-inóculo del hongo con una micropipeta con puntas estériles para tener una concentración del 10 % (v/v).
- 10) Se colocó el motor del agitador y la chaqueta de calentamiento para el control de temperatura, así como la manguera para la entrada de aire, el cual pasa por un filtro.
- 11) Se encendió el equipo y se configuró para mantener una temperatura de 28.0° C, una agitación de 150 rpm y un pH de 5.00.
- 12) Estas condiciones se mantuvieron durante 1 semana, durante ese tiempo se aireó el equipo manualmente todos los días para mantener una concentración de oxígeno disuelto del 30 %, para ello fue necesario encender un compresor

de aire y abrir la válvula que lleva el aire al biorreactor, controlando que no hubiera un burbujeo excesivo para que no se salieran las burbujas por la purga de gases.

- 13) Al terminar la fermentación, se apagó y desensambló el equipo y el medio fue centrifugado para separar la biomasa del hongo y la vaina residual del extracto enzimático a 4000 rpm por 25 minutos a 4° C. El extracto se almacenó en botes plásticos esterilizados.
- 14) Los sólidos fueron secados en un horno a 60° C en papel aluminio por 2 días y se pesaron para realizar el balance de masa, así como se determinó la concentración de sólidos disueltos en el extracto como en los apartados anteriores.
- 15) Al extracto obtenido se le determinó la actividad enzimática con el ensayo de papel filtro por triplicado.

## 2. Producción de etanol

### a. Materiales y equipo

- Inóculo inicial de levadura
- Extracto de levadura
- Peptona
- Harina de vaina de frijol sin hidrólisis alcalina
- Agua destilada
- Erlenmeyer de 1 L
- HCl al 1 %
- NaOH al 1 %
- Pipetas graduadas con pipeteador
- Papel aluminio
- Estufa con agitador magnético Thermo Scientific
- Balanza analítica Ohaus
- Autoclave Tuttnauer
- Cinta testigo
- Probeta de 1 L
- Espátula analítica
- Micropipeta
- Puntas para micropipeta
- Extracto enzimático del biorreactor
- Mechero y encendedor
- Etanol al 70 % y cloro al 0.1 %
- Electrodo para medición de pH
- Electrodo para medición de oxígeno disuelto
- Termocupla para medición de temperatura
- Recipientes para almacenamiento de ácido y base
- Mangueras
- Agitador
- Biorreactor Sartorius Stedim BIOSTAT A plus con controladores
- Horno secador VWR
- Tubos para centrifuga

- Centrifugadora Sorvall
- Centrifugadora Fisher Scientific
- Azul de metileno al 1 %
- Cámara de Neubauer con cubreobjeto especial
- Microscopio Fisher Scientific
- Parafilm
- Jeringa para filtros de disco
- Tubos de ensayo con rosca

b. Procedimiento

- 1) Para evaluar la producción de etanol a partir de la vaina de frijol en la sacarificación y fermentación simultánea en el biorreactor, se preparó el medio de cultivo en un Erlenmeyer de 1 L para un volumen final de 550 mL, el cual consistió en 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona y una concentración de la harina de vaina sin hidrólisis alcalina de 12.5 g/L.
- 2) Se prepararon soluciones de NaOH al 1 % y HCl al 1 % para regular el pH en el biorreactor, estas soluciones se colocaron dentro de los recipientes del equipo.
- 3) El medio de cultivo se trasvasó al recipiente del biorreactor, el cual es autoclaveable, este se introdujo en el autoclave con su tapadera, dejando flojos los tornillos de cierre para evitar la acumulación de presión. Los recipientes con el ácido y la base se taparon con papel aluminio y también se introdujeron en el autoclave y se esterilizaron por 20 min a 121° C. Se verificó el ciclo de esterilización con cinta testigo.
- 4) Los sensores no son autoclaveables por lo que antes de introducirlos al biorreactor fueron desinfectados con etanol al 70 %, luego de haber desinfectado el área con cloro y etanol.
- 5) Luego de enfriarse el medio de cultivo, a un lado del reactor con un mechero cerca para mantener la zona estéril, se conectaron los recipientes con ácido y base al biorreactor utilizando mangueras que pasan por una bomba peristáltica.
- 6) Se introdujeron los sensores al equipo y se agregaron 300 mL del extracto enzimático obtenido en el biorreactor. Luego se agregaron 150 mL del inóculo de levaduras preparado previamente para tener una concentración del 15 % (v/v) con una micropipeta con puntas estériles.
- 7) Se colocó el motor del agitador y la chaqueta de calentamiento para el control de temperatura, en este caso no se aireó al buscar tener un sistema anaeróbico, por lo que la entrada se tapó con papel aluminio esterilizado.
- 8) Se encendió el equipo y se configuró para mantener una temperatura de 34.0°C, una agitación de 150 rpm y un pH de 5.00.
- 9) Estas condiciones se mantuvieron durante 88 horas, durante ese tiempo se utilizó una jeringa para filtros de jeringa y se unió a una manguera que podía conectarse a una salida del biorreactor por la parte de arriba para poder tomar muestras. Con la jeringa se succionó el líquido, presionando la manguera para evitar que volviera a bajar mientras se regresaba el émbolo de la jeringa. Se tomaron muestras a las 0, 22, 47, 70 y 88 horas (la última en triplicado de diferentes puntos del biorreactor al abrirlo) y se colocaron dentro de tubos de ensayo con rosca.

- 10) Los tubos se dejaron reposar un tiempo corto para que se asentara la vaina de frijol, luego para determinar la concentración de células en el medio, se tomaron 10  $\mu\text{L}$  del tubo de ensayo y se colocaron en una tira de Parafilm.
- 11) Posteriormente, se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de azul de metileno y se mezclaron por pipeteo con la muestra del biorreactor y se dejaron reposar por 2 minutos.
- 12) Se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla y se colocaron en la orilla de la cámara de Neubauer con el cubreobjetos puesto hasta que se llenara todo el cuadro donde se hace el conteo.
- 13) La cámara se colocó debajo del microscopio y usando el aumento  $\times 10$  y ocular  $\times 10$  se identificaron los cuadrantes de la cámara y se contaron las células viables (transparentes) y las no viables (teñidas de azul).
- 14) Se realizó un conteo de células del inóculo inicial, así como se centrifugó a 3400 rpm por 10 minutos un volumen de 11.5 mL del inóculo. El pellet formado se secó a  $60^\circ\text{C}$  por 2 días para conocer la masa del pellet seco y con ello se calculó la concentración del inóculo en peso seco y con ello se relacionó el número de células con la masa de células.
- 15) El resto del contenido del tubo de ensayo con el medio del biorreactor se centrifugó a 3400 rpm por 10 minutos para enviar el sobrenadante a HPLC y determinar la concentración de azúcares y etanol presentes en un determinado momento.
- 16) Al terminar la fermentación, se apagó y desensambló el equipo y el medio fue centrifugado para separar la biomasa de las levaduras y la vaina residual a 4000 rpm por 25 minutos a  $4^\circ\text{C}$ .
- 17) Los sólidos fueron secados en un horno a  $60^\circ\text{C}$  en papel aluminio por 2 días y se pesaron para realizar el balance de masa, así como se determinó la concentración de sólidos disueltos en el líquido como en los apartados anteriores.

## **K. Análisis de error estadístico**

1. Para evaluar el error estadístico que puede existir en las mediciones realizadas, se realizaron triplicados de diferentes mediciones, a excepción de la medición de las dimensiones de la vaina de frijol utilizada, donde se analizaron 8 muestras.
2. Para los métodos utilizados se calculó el coeficiente de variación para conocer su variabilidad y se estableció un 15 % como valor aceptable en la presente investigación.
3. Los resultados de la actividad enzimática dependen del ensayo de papel filtro, por lo que se analizó un triplicado de la misma muestra para evaluar la variabilidad del método.
4. Para la comparación de azúcares reductores liberados en la hidrólisis enzimática de la vaina hidrolizada químicamente y la vaina sin hidrolizar, se realizó un triplicado de ambas hidrólisis y se calcularon los intervalos de confianza de las mediciones a lo largo del tiempo para determinar si hubo una diferencia significativa entre ambos tratamientos al comparar si los intervalos se traslapan con un porcentaje de confianza del 95 %.
5. Lo mismo se realizó con la fermentación alcohólica usando la vaina hidrolizada y la vaina sin hidrolizar para determinar si hay una diferencia significativa en la producción de etanol y si es necesario llevar a cabo el proceso de la hidrólisis alcalina o no.
6. En las fermentaciones de los biorreactores, al ser un volumen mayor, también se realizó un triplicado de las mediciones finales, al tomar muestras de diferentes puntos, tanto para la determinación de la actividad enzimática, como en la determinación de etanol y azúcares en el medio.

7. Para calcular la concentración de diferentes compuestos fue necesario realizar curvas de calibración y obtener regresiones lineales de ellas. Para calcular el error involucrado en las regresiones se utilizó el error típico de Excel con un porcentaje de confianza del 95 %, así como se tomó en cuenta el  $R^2$  para decidir si era válido o no utilizarlas, siempre y cuando este fuera cercano a 1.
8. Además del error estadístico, se tomó en cuenta la incertidumbre de las diferentes mediciones, por lo que también se calculó la propagación del error.





## VII.Resultados

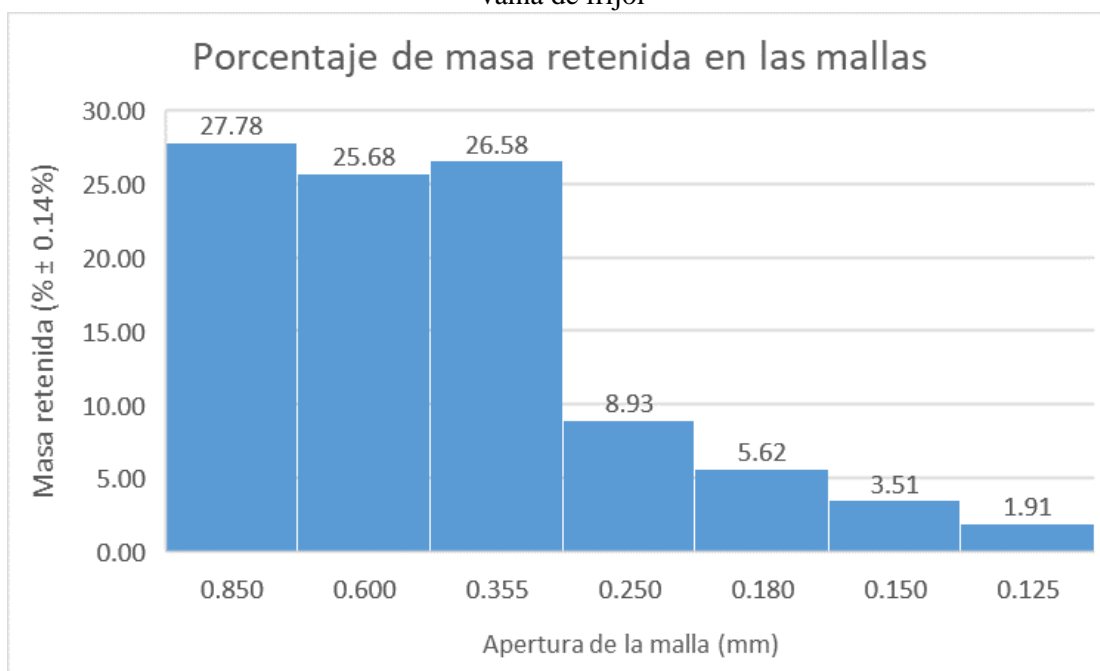
### A. Pretratamiento de la vaina de frijol utilizada

Cuadro 1. Características de la vaina de frijol utilizada en el trabajo de graduación

Característica	Media	Desviación estándar	Intervalo de confianza	Coefficiente de variación
Largo de la vaina	10.06 cm	1.25 cm	10.06 ± 1.71 cm	20.30 %
Ancho de la vaina	1.25 cm	0.05 cm	1.25 ± 0.04 cm	4.28 %
Humedad inicial	10.40 % (m/m)	1.30 % (m/m)	10.4 ± 3.23 cm	12.51 %

En el cuadro se observan las características de la vaina utilizada, así como su análisis de error. Las imágenes de la vaina se pueden observar en la sección de Anexos.

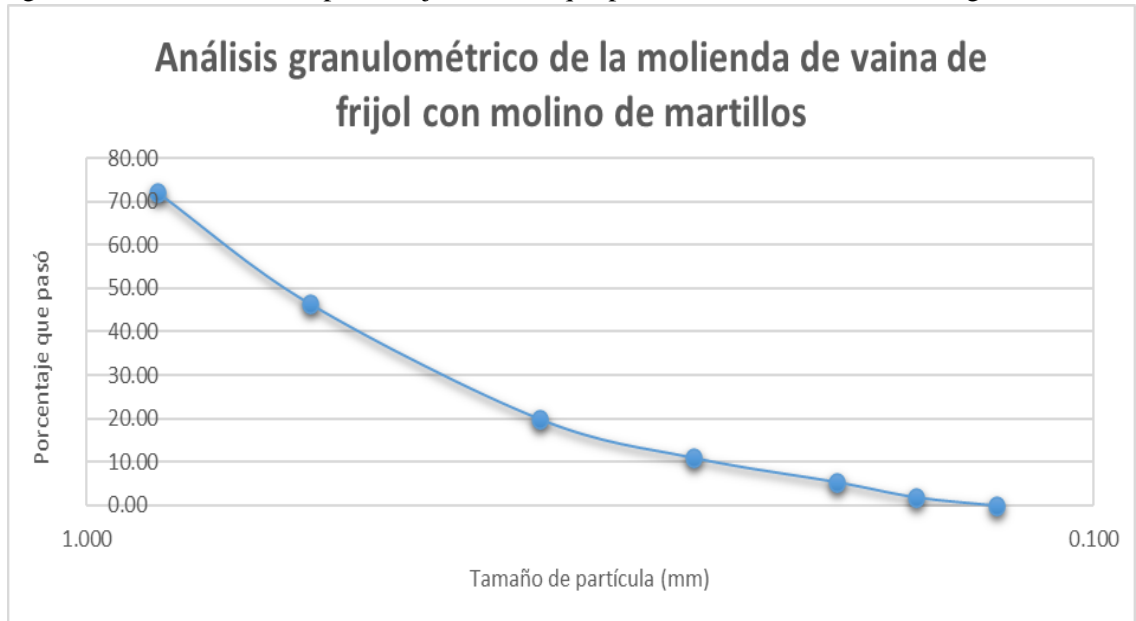
Figura 14. Histograma de los resultados del análisis granulométrico luego de la molienda de la vaina de frijol



Fuente: Elaboración propia.

Se observa que el mayor porcentaje de la vaina posee un tamaño de partícula entre 0.355 y 0.850 mm. El promedio ponderado es de 0.522 mm. El gráfico fue elaborado con los datos del Cuadro 27 de Datos calculados.

Figura 15. Distribución del porcentaje de vaina que pasó en las mallas del análisis granulométrico



Fuente: Elaboración propia.

El eje x se encuentra en escala logarítmica y está invertido. Con el análisis obtenido se puede concluir que la harina utilizada tiene un D70 de 0.828 mm, el cual corresponde al diámetro por el cual pasa el 70 % de la harina obtenida. El gráfico se realizó con los datos del Cuadro 28 de Datos calculados y el D70 se calculó con una interpolación de esos datos.

## B. Inducción de producción de enzimas en medio con vaina de frijol

Los medios con vaina de frijol mostraron un crecimiento del hongo, lo cual indica que el hongo es capaz de producir enzimas que hidrolicen componentes de la vaina para consumirlos y que se dé su crecimiento.

Figura 16. Crecimiento del hongo *Trichoderma harzianum* en el medio con vaina de frijol



Fuente: Elaboración propia.

Se observa el crecimiento del micelio blanco sobre la vaina. La imagen corresponde al medio con concentración de 12.5 g/L de vaina. Las fermentaciones se llevaron a cabo a pH 5, 28° C y 150 rpm por una semana.

Cuadro 2. Formulación de los medios de cultivo con vaina de frijol para inducir la producción de enzimas lignocelulolíticas

Componentes	Concentración		
	Medio de cultivo 1	Medio de cultivo 2	Medio de cultivo 3
Tween 80	1.00 ± 0.05 % (v/v)	1.00 ± 0.05 % (v/v)	1.00 ± 0.05 % (v/v)
Urea	0.30 ± 0.01 g/L	0.30 ± 0.01 g/L	0.30 ± 0.01 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.00 ± 0.04 g/L	2.00 ± 0.04 g/L	2.00 ± 0.04 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.40 ± 0.03 g/L	1.40 ± 0.03 g/L	1.40 ± 0.03 g/L
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.40 ± 0.01 g/L	0.40 ± 0.01 g/L	0.40 ± 0.01 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.30 ± 0.01 g/L	0.30 ± 0.01 g/L	0.30 ± 0.01 g/L
Peptona	1.00 ± 0.02 g/L	1.00 ± 0.02 g/L	1.00 ± 0.02 g/L
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5.0 ± 0.1 mg/L	5.0 ± 0.1 mg/L	5.0 ± 0.1 mg/L
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1.6 ± 0.1 mg/L	1.6 ± 0.1 mg/L	1.6 ± 0.1 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.4 ± 0.1 mg/L	1.4 ± 0.1 mg/L	1.4 ± 0.1 mg/L
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2.0 ± 0.1 mg/L	2.0 ± 0.1 mg/L	2.0 ± 0.1 mg/L
Harina de vaina de frijol	12.5 ± 0.3 g/L	25.0 ± 0.5 g/L	37.5 ± 0.8 g/L
Ftalato de potasio	10.211 ± 0.227 g/L	10.211 ± 0.227 g/L	10.211 ± 0.227 g/L

A estos medios de cultivo se le agregó el inóculo a una concentración del 10 % (v/v). Las fermentaciones se llevaron a cabo a pH 5, 28° C y 150 rpm por una semana.

### C. Extracción de enzimas y actividad enzimática

Cuadro 3. Características de los extractos enzimáticos obtenidos en las fermentaciones con *T. harzianum* usando vaina de frijol como inductor de la producción enzimática

Concentración de vaina	Masa del extracto (g ± 0.1 g)	Concentración de sólidos (g/L)
Sin vaina	199.9	21.0 ± 1.1
Control 12.5 g/L	162.4	25.5 ± 1.3
Control 25 g/L	152.6	23.9 ± 1.2
Control 37.5 g/L	145.0	26.9 ± 1.3
12.5 g/L-1	61.8	28.1 ± 1.4
25 g/L	167.6	24.6 ± 1.2
37.5 g/L	146.5	26.1 ± 1.3
12.5 g/L-2	188.0	20.1 ± 1.0
12.5 g/L-3	164.6	21.6 ± 1.1

En los medios control no se agregó el inóculo con el hongo, en el medio sin vaina si se agregó el inóculo, pero no había vaina presente. Las muestras corresponden a la concentración de vaina de

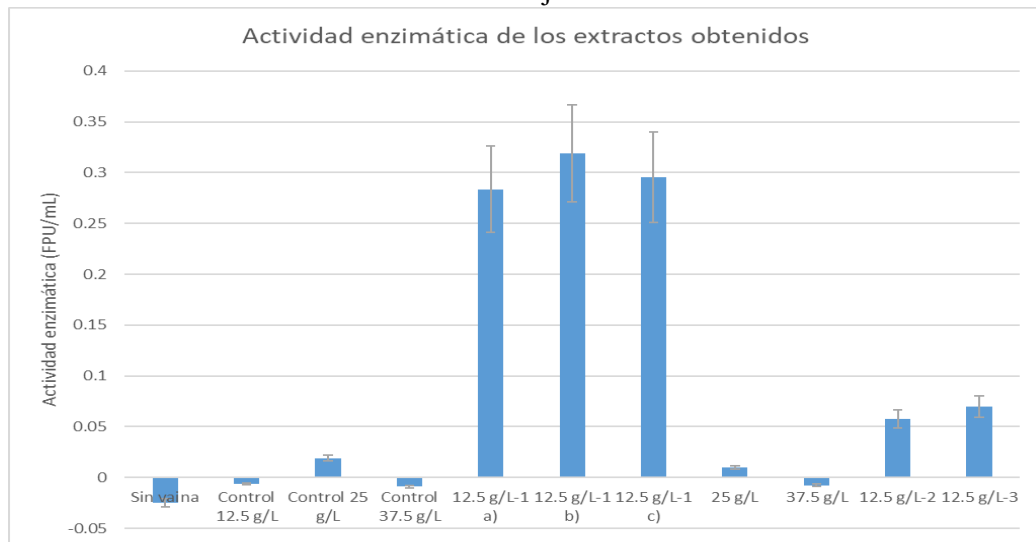
frijol utilizada. Para tener una mayor cantidad de extracto se repitió la fermentación con la que se obtuvo mayor actividad enzimática, que fue a la concentración de 12.5 g/L, de la cual hubo un derrame y por ello la masa es menor.

Cuadro 4. Actividad enzimática de los extractos obtenidos en unidades de papel filtro por mililitro

Concentración de vaina	FPU (unidades/mL)	FPU B (unidades/mL)
Sin vaina	-0.002	-0.025 ± 0.024
Control 12.5 g/L	-0.008	-0.006 ± 0.024
Control 25 g/L	0.076	0.048 ± 0.024
Control 37.5 g/L	-0.007	-0.009 ± 0.024
12.5 g/L-1 a)	0.288	0.284 ± 0.027
12.5 g/L-1 b)	0.315	0.319 ± 0.028
12.5 g/L-1 c)	0.291	0.296 ± 0.028
25 g/L	0.022	0.010 ± 0.024
37.5 g/L	0.009	-0.008 ± 0.024
12.5 g/L-2	0.079	0.058 ± 0.024
12.5 g/L-3	0.079	0.070 ± 0.024

Las FPU se calcularon con la Ecuación 7, mientras que las FPU B se calcularon con la Ecuación 8 que se utiliza cuando la glucosa liberada con el extracto concentrado es menor al valor crítico de 2 mg, como en los resultados obtenidos. 1 FPU B equivale a 5.405 mg de glucosa liberados por hora. Se observa que solo hay actividad enzimática significativa con la concentración de 12.5 g/L, esto corresponde al medio usado inicialmente, a) b) y c) corresponden a muestras diferentes tomadas del mismo extracto para evaluar la variabilidad del método. La concentración de 12.5 g/L -2 y -3 corresponden a diferentes extractos que se prepararon con la misma concentración.

Figura 17. Actividad enzimática de los extractos obtenidos a diferentes concentraciones de vaina de frijol



Fuente: Elaboración propia.

Se muestran los resultados para la actividad en FPU B. Se comprueba que hay mayor actividad al usar una concentración de vaina de 12.5 g/L. Las barras de error tienen un 15 % de error.

## D. Hidrólisis alcalina de la vaina de frijol

Luego de hidrolizar 2 L con la metodología mencionada, se obtuvieron  $154.9 \pm 0.1$  g de vaina a una humedad del  $15.41 \pm 0.01$  % (m/m).

Cuadro 5. Comparación de azúcares reductores en forma de glucosa liberados por la vaina de frijol hidrolizada químicamente y por la vaina sin hidrolizar

Tiempo (h $\pm$ 0.05 h)	Azúcares en forma de glucosa (g/L)					
	Vaina sin hidrolizar			Vaina con hidrólisis alcalina		
	Media	Desviación estándar	Intervalo de confianza	Media	Desviación estándar	Intervalo de confianza
2	2.21	1.03	$2.21 \pm 2.56$	2.49	2.38	$2.49 \pm 5.90$
24	3.51	2.66	$3.51 \pm 6.62$	3.48	3.95	$3.48 \pm 9.81$
48	3.49	2.85	$3.49 \pm 7.08$	3.79	4.47	$3.79 \pm 11.11$
50	3.55	3.00	$3.55 \pm 7.44$	3.23	3.59	$3.23 \pm 8.92$

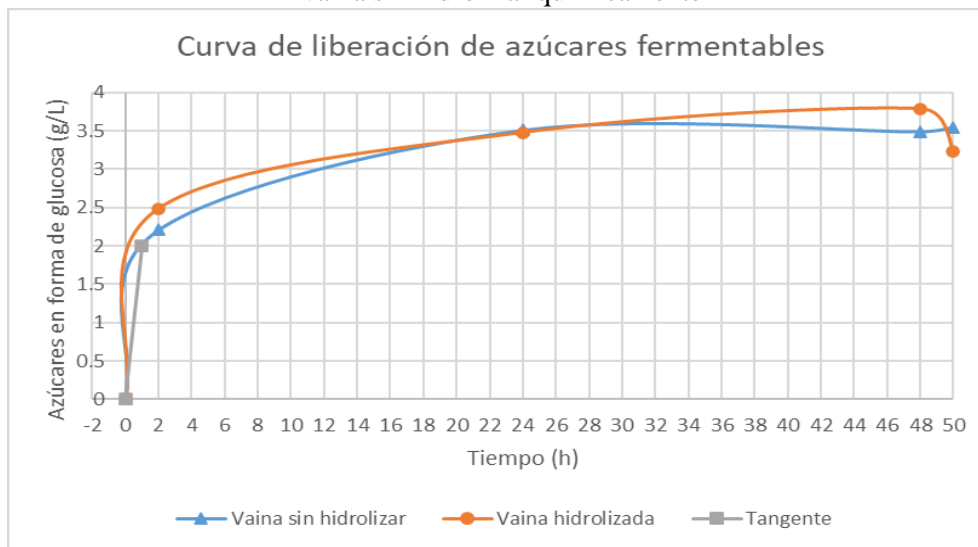
Al comparar los resultados de las muestras con un alfa de 0.05, se observa que los intervalos de confianza se traslapan para todas las medidas de tiempo, por lo que no hay una diferencia significativa en la producción de azúcares reductores entre el uso de vaina sometida a hidrólisis alcalina y de vaina sin hidrolizar. Las reacciones se realizaron a 40° C y a 150 rpm.

Cuadro 6. Conversión de la vaina de frijol en la producción de azúcares reductores en forma de glucosa con la hidrolisis enzimática

Muestra	Conversión (g vaina/g vaina)	Incertidumbre (g vaina/g vaina)
Vaina sin hidrolizar	0.284	$\pm 0.240$
Vaina con hidrólisis alcalina	0.258	$\pm 0.287$

Al comparar los resultados también se puede comprobar que no hay una diferencia significativa entre la vaina hidrolizada y la vaina sin hidrolizar químicamente. La conversión se calculó usando el valor promedio de la medición a las 50 horas de hidrólisis enzimática ya que al ser una hidrólisis el rendimiento es del 100 % y la cantidad de azúcares producidos será igual a la de la vaina consumida. La incertidumbre se calculó usando la desviación estándar de la media como incertidumbre del dato para la propagación del error. En general, se observa que con la actividad enzimática obtenida para las 50 h de reacción se tiene una conversión cercana al 30 %.

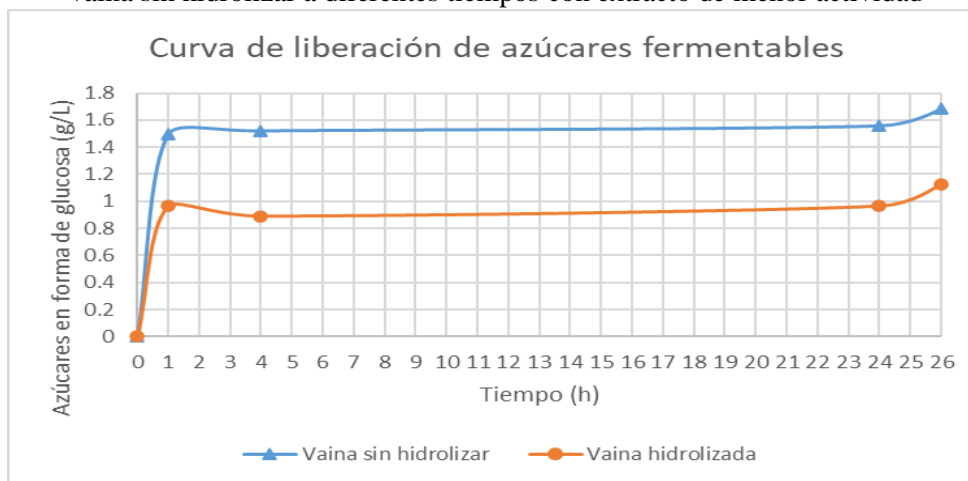
Figura 18. Curva de liberación de azúcares en forma de glucosa de la vaina hidrolizada y de la vaina sin hidrolizar químicamente



Fuente: Elaboración propia.

Se observa que luego de 24 horas ya no hay un aumento significativo en la concentración de azúcares. Se observa de forma gráfica que no hubo una diferencia significativa en ambas hidrólisis enzimáticas, por lo que no sería necesario realizar la hidrólisis alcalina. En las curvas se utilizaron datos promedio. Las líneas no representan un modelo, sino que tienen el suavizamiento de Excel. En la gráfica también se observa una recta que es tangente a las curvas. La pendiente de esta recta representa la productividad enzimática y es de 2 g/L·h.

Figura 19. Curva de liberación de azúcares en forma de glucosa de la vaina hidrolizada y de la vaina sin hidrolizar a diferentes tiempos con extracto de menor actividad



Fuente: Elaboración propia.

Se elaboró otra curva utilizando un extracto de menor actividad enzimática. En la curva anterior se observa que no hay una diferencia en el comportamiento en el que se liberan los azúcares, pero en esta, hay una mayor concentración de azúcares liberados con la vaina sin hidrolizar, confirmando que no es necesaria la hidrólisis alcalina. Las líneas no representan un modelo, sino que tienen el suavizamiento de Excel.

## E. Fermentación alcohólica

Cuadro 7. Concentración final de etanol, glucosa y fructosa en la fermentación alcohólica llevada a cabo en Erlenmeyers con deflectores

Muestra		Media % (m/v)	Desviación estándar % (m/v)	Intervalo de confianza % (m/v)	Coefficiente de variación %
VN	Glucosa	0.021	0.001	0.021 ± 0.001	2.71
	Fructosa	0.000	0.000	0.000 ± 0.000	0.00
	Etanol	0.063	0.005	0.063 ± 0.013	8.10
VH	Glucosa	0.000	0.000	0.000 ± 0.000	0.00
	Fructosa	0.164	0.001	0.164 ± 0.002	0.51
	Etanol	0.056	0.003	0.056 ± 0.006	4.47
VN sin levadura	Glucosa	0.040 ± 0.003	-	-	-
	Fructosa	0.000 ± 0.000	-	-	-
	Etanol	0.033 ± 0.002	-	-	-
VH sin levadura	Glucosa	0.000 ± 0.000	-	-	-
	Fructosa	0.000 ± 0.000	-	-	-
	Etanol	0.039 ± 0.003	-	-	-
VN sin enzimas	Glucosa	0.024 ± 0.002	-	-	-
	Fructosa	0.000 ± 0.000	-	-	-
	Etanol	0.024 ± 0.002	-	-	-
VH sin enzimas	Glucosa	0.000 ± 0.000	-	-	-
	Fructosa	0.164 ± 0.009	-	-	-
	Etanol	0.048 ± 0.003	-	-	-
Sin vaina	Glucosa	0.030 ± 0.002	-	-	-
	Fructosa	0.030 ± 0.002	-	-	-
	Etanol	0.026 ± 0.002	-	-	-

La concentración de etanol y glucosa fue determinada por HPLC usando una columna Hi-Plex H. VN corresponde a la vaina de frijol sin hidrólisis alcalina. VH corresponde a la vaina de frijol sometida a hidrólisis alcalina. Se prepararon controles de los medios sin levadura, sin extracto enzimático y uno sin vaina, pero con levaduras y extracto enzimático. Solo se realizó triplicado de las fermentaciones con levadura, vaina y extracto enzimático. En los controles se muestra la incertidumbre del resultado obtenido. Las fermentaciones se realizaron a 34° C y 150 rpm por 72 horas.

## F. Resultados de pruebas en biorreactor

Cuadro 8. Características del extracto enzimático obtenido en la fermentación con el hongo *T. harzianum* en la producción enzimática usando un biorreactor de 1 L

Característica	Media	Desviación estándar	Intervalo de confianza	Coefficiente de variación
Masa del extracto	864.7 ± 0.1 g	-	-	-
Concentración de sólidos	35.5 ± 1.8 g/L	-	-	-
Actividad enzimática	0.178 FPU/mL	0.001 FPU/mL	0.178 ± 0.002 FPU/mL	0.435 %
Concentración de glucosa	0.040 ± 0.003 % (m/v)	-	-	-

La producción enzimática se realizó a 28° C, 150 rpm y pH 5 por una semana. Se aireó diariamente. La actividad enzimática mostrada se calculó con la Ecuación 8 ya que la glucosa liberada fue menor al valor crítico. 1 FPU equivale a 5.405 mg de glucosa liberados por hora. Se realizó un triplicado de la medición de actividad enzimática. Al analizar el extracto en HPLC se detectó glucosa.

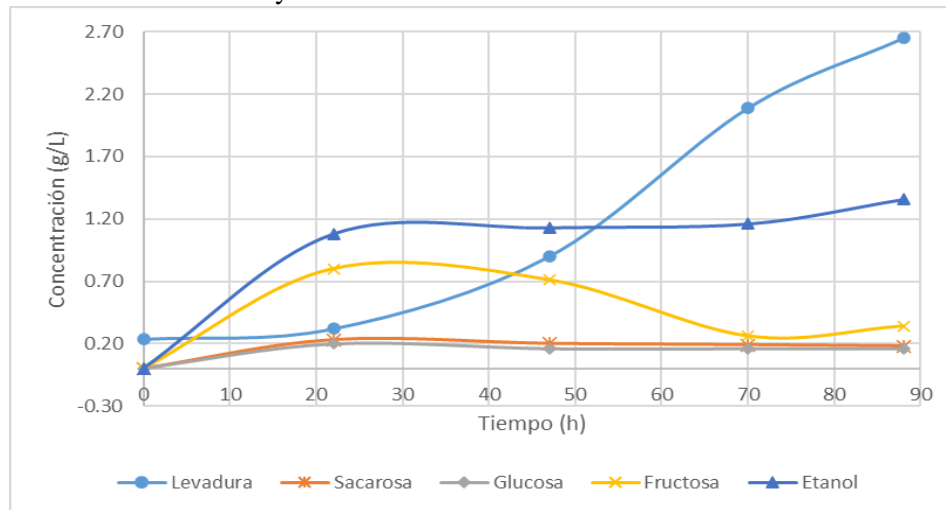
Cuadro 9. Resultados de la sacarificación y fermentación simultánea con la levadura *S. cerevisiae* en la producción de etanol a partir de vaina de frijol usando un biorreactor de 1 L.

Resultado	Media	Desviación estándar	Intervalo de confianza	Coefficiente de variación
Sacarosa % (m/v)	0.018	0.000	0.018 ± 0.000	0.00 %
Glucosa % (m/v)	0.016	0.000	0.016 ± 0.000	0.00 %
Fructosa % (m/v)	0.034	0.019	0.034 ± 0.048	56.34 %
Etanol % (m/v)	0.136	0.019	0.136 ± 0.048	14.32 %
Rendimiento etanol (g/g)	0.393 ± 0.112	-	-	-
Rendimiento biomasa (g/g)	0.699 ± 0.295	-	-	-
Td (h)	17.81 ± 1.51	-	-	-

Se observan las concentraciones finales de la fermentación, así como el rendimiento asociado a la concentración final de etanol, el cual se calculó usando el valor promedio y usando la desviación estándar como incertidumbre para la propagación de error. El rendimiento está expresado en g de etanol/g de vaina de frijol, lo que equivale a un rendimiento del 39 %. También se observa el rendimiento de biomasa expresado en g de levadura/g de vaina, el cual es del 70 %, así como el tiempo de generación (Td). La fermentación se llevó a cabo a 34° C, 150 rpm y pH 5 por 88 horas.



Figura 20. Curva de cambio en la concentración celular, etanol y azúcares en el tiempo en la sacarificación y fermentación simultánea en el biorreactor de 1 L

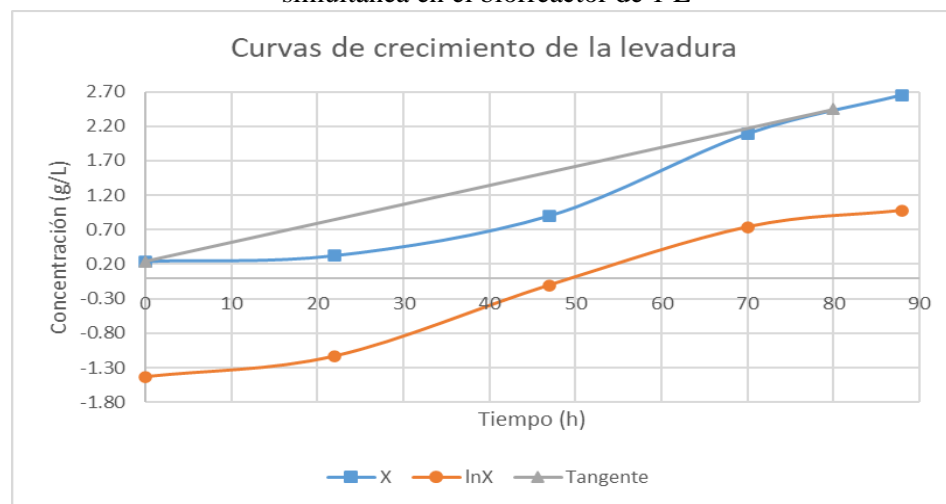


Fuente: Elaboración propia.

Los datos con los que se elaboró la curva se encuentran en el Cuadro 38 y 39 de Datos calculados.

Se observa que hubo un aumento en la concentración celular y un ligero aumento en la concentración de etanol. A diferencia de las fermentaciones a partir de azúcares como fuente de carbono, la concentración de azúcares no disminuyó sino se mantuvo constante a bajas concentraciones. Las líneas no representan un modelo, sino que tienen el suavizamiento de Excel.

Figura 21. Curva de crecimiento de la levadura en el tiempo en la sacarificación y fermentación simultánea en el biorreactor de 1 L



Fuente: Elaboración propia.

La curva se elaboró con los datos del Cuadro 38 y 41 de Datos calculados. Se graficó la concentración celular y su logaritmo para distinguir de mejor manera la fase exponencial que correspondería a la sección con un comportamiento más lineal en el centro de la gráfica (22 a 70 h). Las líneas no representan un modelo, sino que tienen el suavizamiento de Excel. En la curva de concentración también se observa una recta que es tangente. La pendiente de esta recta representa la productividad del crecimiento celular y es de  $0.028 \text{ g/L}\cdot\text{h}$ .



## VIII. Análisis de resultados

El propósito de esta investigación fue evaluar extractos de enzimas lignocelulolíticas producidas por el hongo *Trichoderma harzianum* en una fermentación sumergida usando vaina de frijol como inductor de la producción enzimática. Con estas enzimas se generaron azúcares fermentables a partir de la hidrólisis enzimática de la misma vaina de frijol y estos azúcares fueron consumidos por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones anaeróbicas para producir etanol.

Esto fue posible ya que se propiciaron las condiciones necesarias para que se llevara a cabo la producción enzimática y la hidrólisis de la vaina de frijol. Comenzando con el pretratamiento, fue necesario determinar las características de la vaina utilizada en el estudio, para ello se midieron dimensiones como el ancho y largo, los cuales fueron de  $1.25 \pm 0.05$  cm y  $10.06 \pm 1.25$  cm respectivamente y la humedad que tenía la vaina fue del  $10.40 \pm 1.30$  % (m/m). Estos son los valores promedio con su desviación estándar y como se puede observar en el Cuadro 1, a excepción del largo, la variabilidad es menor al 15 % en las mediciones, lo que indica que la vaina utilizada tenía condiciones similares entre sí.

Esta vaina fue sometida a un proceso de molienda para reducir el tamaño de partícula de la vaina, de forma que se obtuviera una harina. Esto es ventajoso ya que facilita la utilización de la vaina en el resto del proceso y genera una homogenización de esta. Pero la implicación más importante de reducir el tamaño de la vaina es aumentar el área superficial sobre la cual pueden actuar las enzimas, tanto en la producción enzimática, donde el hongo tiene una mayor área en la cual las enzimas pueden extraer nutrientes, como en la hidrólisis enzimática de la vaina para la obtención de azúcares. Además, la molienda y el calor generado en el proceso reducen la cristalinidad de la celulosa, la cual se define por los puentes de hidrógeno formados de forma intermolecular entre las cadenas de celulosa. Esta cristalinidad confiere protección a las células pero constituye un impedimento estérico al ataque de reactivos y enzimas, por lo que la reducción en la cristalinidad ayudó a que las enzimas pudieran penetrar en la estructura y llevar a cabo el proceso de hidrólisis (Verardi *et al.*, 2012).

Luego de llevar a cabo la molienda en un molino de martillos, se redujo el tamaño de partícula a un tamaño entre 0.355 y 0.850 mm, con un promedio ponderado de 0.522 mm con el porcentaje de masa retenido en los diferentes tamices (ver Figura 14). En la Figura 15 se puede observar la distribución del porcentaje de vaina que pasó por las diferentes mallas y se observa una curva típica obtenida en un análisis granulométrico. En el lado izquierdo se encontrarían las partículas más gruesas y del lado derecho se encontrarían las más finas. Con la curva puede observarse la granulometría de la vaina utilizada en la investigación y para tener una especificación, se calculó el D70, el cual es el diámetro por el cual pasa el 70 % de la harina obtenida, usando una interpolación en la curva y este fue de 0.828 mm. Esto permite conocer la vaina con la cual se trabajó y al momento de escalar el proceso permitiría dimensionar la potencia del motor que debería tener el molino.

Finalmente, la harina obtenida se mantuvo en refrigeración en bolsas cerradas, esto para evitar su humidificación y la contaminación con diferentes microorganismos que podrían alterar las propiedades de la vaina o bien generar un impacto en las fermentaciones realizadas posteriormente.

El siguiente paso en el estudio fue inducir la producción de enzimas lignocelulolíticas utilizando vaina de frijol. Para ello fue necesario realizar una propagación del hongo productor de las enzimas, *Trichoderma harzianum*. El hongo se inoculó inicialmente en agar PDA, el cual es específico para hongos y se observó un crecimiento de conidios de color verde característico del hongo (ver Figura 27 en Anexos) los cuales se forman cuando el hongo ingresa una fase reproductiva. Posteriormente, se propagó en un medio de cultivo que contenía glicerol en vez de glucosa como fuente de carbono. Esto fue importante tanto por el aprovechamiento del glicerol, subproducto en la producción de biodiesel, como por evitar la inhibición de las celulasas (da Silva *et al.*, 2016).

Las celulasas son de las principales enzimas lignocelulolíticas producidas por el hongo, estas enzimas se encargan de hidrolizar la celulosa para liberar glucosas. Pero la glucosa al ser el producto de la reacción actúa como un regulador negativo, provocando una fuerte represión a la transcripción de los genes que codifican para las enzimas, para que dejen de liberar más glucosas y este efecto continúa hasta que la concentración de glucosa en el medio disminuya (Nelson & Cox, 2009). Para evitar este efecto desde el inicio, se utilizó glicerol como fuente de carbono, ya que el hongo es capaz de utilizarlo y junto con la fuente de nitrógeno, se proporcionaron los nutrientes necesarios para la producción de enzimas. En la Figura 32 de Anexos, se puede observar un crecimiento del hongo con glicerol, esta propagación es necesaria ya que para la producción enzimática se necesita una concentración de biomasa microbiana considerable.

Para lograr la producción enzimática, no es suficiente con no agregar los represores de la síntesis de las enzimas, sino que también se deben agregar inductores de la transcripción de los genes y con ello de la síntesis enzimática. Un ejemplo en el caso de las celulasas, sería agregar celulosa pura o carboximetilcelulosa al medio para que el hongo reconozca que hay celulosa y que para obtener los azúcares debe secretar las celulasas que hidrolicen la celulosa (Zahra *et al.*, 2020). En esta investigación, se utilizó la harina de vaina de frijol obtenida en la molienda como inductor en la producción enzimática ya que esta en su estructura contiene celulosa, así como hemicelulosa, lo cual pudo inducir la síntesis de hemicelulasas.

Para ello, se prepararon medios formulados con diferentes nutrientes y usando vaina de frijol como única fuente de carbono. Como se puede observar en la Figura 16, hubo un crecimiento del hongo en el medio con vaina de frijol (el micelio blanco que se observa en la parte superior). Esto indica que se logró inducir la producción de enzimas ya que para que creciera el hongo, este tuvo que producir enzimas que hidrolizaran la vaina y que liberaran azúcares que el hongo pudo consumir para lograr su crecimiento.

Se prepararon tres medios con diferentes concentraciones de vaina de frijol para evaluar con cual se mejora la producción enzimática, la composición de los medios se encuentra en el Cuadro 2. Entre los componentes, vale la pena resaltar el Tween 80 que actuó como un surfactante que mejora la producción de enzimas ya que causa un cambio morfológico de una forma agregada a una más dispersa del hongo, lo que aumenta la accesibilidad a los nutrientes, también aumenta la permeabilidad de las membranas, mejorando la secreción de enzimas y promueve la liberación de enzimas unidas a las células (Lee *et al.*, 2017).

La urea actuó como fuente de nitrógeno, al igual que la peptona, que proporcionó los aminoácidos necesarios para la síntesis de las proteínas esenciales del hongo, como de las enzimas lignocelulolíticas que realizaron la hidrólisis de la vaina de frijol. El fosfato de potasio es una importante fuente de fósforo que se utiliza para la producción de ATP y otros procesos metabólicos regulatorios, todas las sales proporcionaron un balance osmótico e iones necesarios para el crecimiento del hongo ya que actúan como cofactores en diferentes reacciones enzimáticas. El ftalato de potasio se utilizó como buffer para regular el pH y finalmente, la vaina de frijol fue la fuente de carbono que indujo la producción de las enzimas lignocelulolíticas (Madigan *et al.*, 2015).

Todos los medios tenían la misma composición, la diferencia era la concentración de vaina de frijol, la cual fue de 12.5, 25 y 37.5 g/L. Estas concentraciones se determinaron durante la experimentación ya que originalmente se pensaba evaluar concentraciones del 5, 10 y 15 % (m/v) ya que (Zahra *et al.*, 2020) optimizaron las condiciones de cultivo para la producción de celulasas y se obtuvo una mejor producción con una concentración del sustrato del 5 % (50 g/L). Sin embargo, en ese estudio se utilizaron semillas de vaina de algodón, pero al querer utilizar esa concentración de vaina de frijol, era un volumen excesivo de vaina dado que su densidad es diferente. Por lo que se tuvo que reducir la concentración a una cantidad que permitiera una buena agitación en los Erlenmeyers.

A los medios de cultivo con vaina de frijol se les inoculó el hongo propagado en los medios con glicerol y en todos se observó su crecimiento, sin embargo, la producción enzimática no fue la misma y esto era lo que se quería evaluar. Luego de las fermentaciones, se obtuvieron extractos enzimáticos al centrifugar los medios de cultivo. La biomasa del hongo y la vaina de frijol al tener una mayor densidad, sedimentaron en el fondo de los frascos de centrifugación y las proteínas liberadas quedaron en el sobrenadante, por lo que se descartaron los sólidos y el sobrenadante se tomó como el extracto enzimático como en otros estudios (Nanjundaswamy & Okeke, 2020; Libardi *et al.*, 2017).

Se midió la masa de los extractos obtenidos, así como la concentración de sólidos disueltos luego de secar un volumen del extracto. La concentración de sólidos es un indicador de la producción de enzimas, ya que estas no son volátiles y luego de secar el medio, estas quedan en el recipiente, pudiendo cuantificarlas de forma indirecta. Estos resultados se encuentran en el Cuadro 3 y se puede observar que el medio con una concentración de vaina de 12.5 g/L-1 fue el que tuvo una mayor cantidad de sólidos ( $28.1 \pm 1.4$  g/L). Aunque todos los sólidos disueltos no correspondan a enzimas lignocelulolíticas ya que hay otras biomoléculas y sales presentes en el medio, se observa que con esa concentración de vaina aumenta la concentración de sólidos disueltos y coincide con que es el extracto que tuvo un mejor desempeño en cuanto a actividad enzimática, la cual tuvo un valor medio de  $0.298 \pm 0.037$  FPU/mL.

La actividad enzimática se puede observar en el Cuadro 4. Esta se midió utilizando el ensayo estándar de papel filtro, el cual es específico para celulasas y mide la cantidad de glucosa que se libera de un papel filtro por la acción de celulasas luego de una hora a 50° C. La glucosa liberada se cuantifica con el método DNS (ver metodología).

Luego de haber llevado a cabo los ensayos de actividad enzimática, se observó que el medio de cultivo preparado con una concentración de 12.5 g/L de vaina de frijol fue el que tuvo mayor actividad. En el Cuadro 4 se observan diferentes resultados para la concentración de 12.5 g/L, los que tienen un 1 son resultados del mismo extracto, pero con mediciones en diferentes puntos para

evaluar la variabilidad del método. En el Cuadro 42 de Análisis de error se puede observar que la variación es menor al 5 %, por lo que el método puede ser utilizado para hacer la determinación de la actividad enzimática, sin que el error sea representado por el método.

El 2 y 3 son extractos que se obtuvieron con un medio con la misma concentración, pero posteriormente. Estos tuvieron una actividad menor lo cual se pudo deber a variaciones en el método de extracción de las enzimas principalmente. Como se mencionó, el extracto se consideró como el sobrenadante obtenido luego de la centrifugación de los medios y se esperó a que las enzimas quedaran libres en el sobrenadante. Sin embargo, es posible que las enzimas no hayan quedado libres, sino que pudieron haber quedado unidas a la vaina de frijol ya que es el sustrato al cual se unen para hidrolizarlo. Por ejemplo, las celulasas fúngicas además de tener un sitio activo que realiza la hidrólisis, tienen módulos de unión que se unen fuertemente al sustrato y pueden tener hasta 9 subsitios para la unión de los oligómeros (Payne *et al.*, 2015).

Estas fuertes uniones de las enzimas al sustrato, además de la adsorción física por existir una interfase sólido-líquido, pudieron haber impedido su separación en el proceso de centrifugación y por ello pudieron haber quedado más enzimas unidas a la vaina y menos en el extracto, explicando la reducción en la actividad enzimática. De hecho, para obtener los extractos, en los recipientes de centrifugación se incluyó el medio de cultivo con la vaina de frijol, pero en una de las experimentaciones (datos no mostrados) no se incluyó la vaina de frijol en los recipientes, sino que solo se centrifugó el líquido del medio de cultivo y al medir la actividad enzimática fue de 0. Esto ayudaría a confirmar que hay una fuerte unión de las enzimas al sustrato y que para extraerlas es necesario inducir esa separación, incluyendo la vaina en el proceso de centrifugación y evaluando la velocidad angular y el tiempo para lograr una mejor extracción de las enzimas.

Dejando de lado la variación entre los extractos obtenidos con la misma concentración de vaina de frijol, se puede observar que la de 12.5 g/L fue la que presentó una mayor actividad enzimática. Como se observa en la Figura 17, la actividad obtenida con las concentraciones de 25 y 37.5 g/L fue menor, incluso con valores similares a los obtenidos en los controles, lo cual indica que a altas concentraciones de vaina se puede inducir una inhibición o bien, por la gran cantidad de vaina en el medio, se pudo haber dificultado la transferencia de masa ya que todos tuvieron la misma agitación, y con ello fue más difícil que el hongo produjera enzimas y que estas llegaran a la vaina para hidrolizar los nutrientes necesarios para que el hongo creciera y siguiera produciendo enzimas.

Esto demuestra que no se hubieran obtenido resultados satisfactorios si se hubieran usado las concentraciones originales de vaina (50, 100 y 150 g/L) ya que hubiera sido mucha vaina en el medio y no se habría logrado una agitación adecuada y con ello la transferencia de masa necesaria para el proceso de hidrólisis o bien se hubiera inducido una inhibición del hongo. A partir de ello, se podrían evaluar en futuras experimentaciones concentraciones menores a los 12.5 g/L y verificar si con alguna se mejora la producción enzimática.

En la Figura 17 las barras de error son del 15 % y se observa que para la concentración de 12.5 g/L la actividad es mayor que las demás y significativamente mayor que el resultado de los controles, en los cuales no se agregó el inóculo del hongo para diferentes concentraciones de vaina y en uno no se agregó vaina de frijol. Esto comprueba que la actividad enzimática se logra únicamente cuando está presente el hongo que produce las enzimas y cuando está presente la vaina para inducir la producción de las enzimas ya que en los extractos de los controles mencionados no se observó actividad enzimática. Con esto, la concentración de 12.5 g/L fue la que se utilizó para el

resto de la experimentación, tanto en las pruebas en biorreactor como en la hidrólisis enzimática de la vaina para la liberación de azúcares fermentables por levaduras.

En la investigación también se buscaba evaluar el efecto que tiene realizar un pretratamiento hidrolítico de la vaina de frijol en la liberación de azúcares fermentables en la hidrólisis enzimática. Para ello se sometió la vaina de frijol a hidrólisis alcalina con NaOH al 10 % a 45° C. Esto se realizó porque teóricamente la hidrólisis alcalina ayuda a remover la lignina presente en los residuos lignocelulósicos como la vaina de frijol, la cual puede interferir con la hidrólisis enzimática. Esta hidrólisis también causa el hinchamiento de la celulosa, disminuyendo la cristalinidad y aumentando el área superficial para que sea hidrolizada por enzimas (Mussatto & Teixeira, 2010).

Con esto se esperaba obtener mejores resultados en la liberación de azúcares con la vaina hidrolizada químicamente que con la vaina sin hidrolizar. Sin embargo, como se observa en el Cuadro 5, no hubo una diferencia significativa entre la cantidad de azúcares en forma de glucosa liberados por la vaina hidrolizada químicamente y por la vaina sin hidrolizar. Se midió la concentración de azúcares liberados en diferentes instantes de tiempo a 3 muestras con cada tipo de vaina y al analizar los intervalos de confianza obtenidos, con un porcentaje de confianza del 95 %, se observa que hay un traslape en todos, lo cual indica que no hay una diferencia significativa y que la hidrólisis alcalina realmente no tuvo un efecto positivo en la liberación de azúcares fermentables.

En el Cuadro 6, se puede observar la conversión de la vaina de frijol en la producción de azúcares reductores en forma de glucosa. De igual forma, se observa que no hubo una diferencia significativa en la conversión de ambos tipos de vaina. En ambos casos la conversión es menor al 30 %, lo que indica que aun quedó una gran cantidad de vaina de frijol que no fue hidrolizada a azúcares reductores y esto se puede deber a que los azúcares liberados causaron una inhibición en las enzimas, disminuyendo la velocidad de reacción o bien a que hay otros compuestos en la vaina para los cuales no se lograron obtener enzimas hidrolíticas, por ejemplo, para las cadenas de lignina, la fracción proteica de la vaina o carbohidratos específicos.

Algo que llama la atención, es que los resultados tienen una dispersión considerable ya que las desviaciones estándar tienen magnitudes cercanas a las de la media para la vaina sin hidrolizar e incluso son mayores que la media en la vaina con hidrólisis alcalina, lo cual explica por qué los intervalos de confianza son amplios. Esto pudo deberse a que las reacciones se llevaron a cabo en Erlenmeyers y para tomar la muestra de los azúcares liberados, fue necesario detener las reacciones y tomar una muestra con una micropipeta. Durante el muestreo pudo haberse dado una contaminación de los medios, haciendo que los resultados variaran ya que si algún microorganismo ingresó al medio este pudo haberse consumido los azúcares, alterando las mediciones. De igual forma, la variación se pudo deber a que la vaina es un sustrato no homogéneo y pudo ser posible que en algunos medios había una mayor disponibilidad para hidrolizar azúcares que en otros. La incertidumbre de la conversión también tiene valores considerables ya que se utilizó la desviación estándar del resultado a las 50 horas para la propagación del error.

En la Figura 18 se puede observar gráficamente la curva de liberación de azúcares reductores en el tiempo para comprobar que no hubo una diferencia entre la vaina hidrolizada químicamente y la vaina sin hidrolizar. En la curva se observa que luego de las 24 h de reacción, no hubo un aumento considerable en la liberación de azúcares, lo cual se podría deber a una inhibición de las enzimas por los azúcares ya liberados, lo que causó una disminución en la velocidad de reacción. Las curvas tienen comportamientos similares y a partir de ellas se calculó la productividad

enzimática, con la pendiente de la recta tangente formada al inicio de las curvas, la cual fue de 2 g de azúcares en forma de glucosa por litro por hora, la cual es una medida de qué tan rápido aumentan las enzimas la concentración de azúcares en el medio (Chukwuma *et al.*, 2020).

Finalmente, para confirmar que no había un efecto por la hidrólisis alcalina en la liberación de azúcares en la hidrólisis enzimática, se utilizaron extractos enzimáticos con menor actividad para verificar que los resultados anteriores no dependían de la actividad de las enzimas si no del tipo de vaina utilizada. De igual forma, se hicieron diferentes mediciones de los azúcares liberados en el tiempo y los resultados se encuentran en la Figura 19. En ella se observa que incluso hay una mayor liberación de azúcares en la vaina sin hidrólisis alcalina, lo cual demuestra que en el proceso no es necesaria una hidrólisis alcalina de la vaina de frijol utilizada en este estudio, lo cual es algo positivo ya que se ahorrarían costos y tiempo tanto en el proceso de hidrólisis, como en la recuperación de la vaina seca luego de la hidrólisis y del manejo de los químicos que quedaron en el líquido hidrolizado.

La razón por la cual no se obtuvo el resultado esperado con la hidrólisis alcalina se pudo deber a que durante el proceso de hidrólisis se disuelve la lignina, lo cual es el objetivo, pero en este proceso se producen compuestos fenólicos que pudieron haber quedado unidos a la vaina de frijol luego del filtrado y lavado y que pudieron haber actuado como inhibidores de las enzimas y por ello no se obtuvo una mayor producción de azúcares. Además, es posible que si se haya liberado más glucosa por la disminución en la cristalinidad de la celulosa con la vaina hidrolizada. Sin embargo, en la hidrólisis alcalina también se remueve parte de la hemicelulosa, por lo que esos azúcares se perdieron en el proceso de filtrado y lavado y no se cuantificaron en la hidrólisis enzimática, mientras que con la vaina sin hidrólisis química, la hemicelulosa estaba intacta y en el extracto pudieron haber enzimas que causaron su hidrólisis y liberaron azúcares reductores como glucosa, galactosa, xilosa, entre otros que son detectables por el método DNS usado para la cuantificación de azúcares. Esto hizo que no se observara una diferencia significativa al usar el extracto con mayor actividad y que se observara una mayor liberación de azúcares de la vaina sin hidrolizar al usar el extracto con menor actividad (Nimbalkar *et al.*, 2017).

En la investigación también se buscó evaluar una sacarificación y fermentación simultánea usando las enzimas lignocelulolíticas obtenidas y levaduras para producir etanol a partir de la vaina de frijol como fuente de carbono. En muchos estudios se ha realizado la hidrólisis de residuos lignocelulolíticos para obtener azúcares y luego usar esos azúcares para producir etanol en un reactor diferente como (Idris *et al.*, 2017) que obtuvieron un 76.8 % de conversión en el proceso SHF. Sin embargo, el objetivo de esta investigación era usar el método SSF en el cual en el mismo reactor se hace la hidrólisis de la vaina y crecen las levaduras aprovechando los azúcares para producir etanol.

La razón por la cual se escogió este método es porque tiene la ventaja de que los azúcares producidos en la hidrólisis enzimática son consumidos por las levaduras tan pronto como se liberan, manteniendo una baja concentración en el medio, evitando la inhibición de las enzimas y la contaminación con otros microorganismos. Además, las levaduras pueden desintoxicar el medio que puede contener inhibidores provenientes de la lignocelulosa, aumentando la actividad de las enzimas y con ello la producción de etanol, así como se reducen los costos de usar 2 reactores diferentes y de purificar los azúcares obtenidos en el primer reactor (Galbe & Zacchi, 2014).



Se realizaron fermentaciones SSF en Erlenmeyers cerrados con deflectores usando vaina de frijol hidrolizada químicamente y vaina sin hidrólisis alcalina para evaluar si la hidrólisis alcalina mejora la producción de etanol en el sistema SSF. En el Cuadro 7 se pueden observar las concentraciones de glucosa, fructosa y etanol finales luego de la fermentación SSF por 72 horas. Se observa que en promedio se obtiene una mayor producción de etanol utilizando la vaina sin hidrólisis alcalina, pero al tomar en cuenta los intervalos de confianza, se observa que no hay una diferencia significativa en la producción de etanol.

Estos resultados van de la mano con lo discutido anteriormente en cuanto a la liberación de azúcares con la vaina hidrolizada y la vaina sin hidrolizar. Como no se observó diferencia significativa en cuanto a la liberación de azúcares, no se esperaba tener una diferencia significativa en cuanto a la producción de etanol ya que la levadura necesita los azúcares fermentables para metabolizarlos en etanol. El promedio de la producción de etanol es mayor con la vaina sin hidrólisis alcalina, lo cual se puede deber a que la vaina hidrolizada químicamente haya perdido azúcares en el proceso de lavado y filtrado pero principalmente a que pudieron haber quedado en la vaina compuestos fenólicos de la lignina que pudieron causar una inhibición tanto en las enzimas lignocelulolíticas como en las levaduras, dificultando su crecimiento y produciendo una menor cantidad de etanol (Nimbalkar *et al.*, 2017). Sin embargo, esto no tuvo tanto efecto ya que como se mencionó, las levaduras tienen la capacidad de desintoxicar el medio de estos inhibidores y por ello no hubo una diferencia significativa estadísticamente en cuanto a la producción de etanol, comprobando una de las ventajas de utilizar el método SSF (Galbe & Zacchi, 2014).

Para esta fermentación también se prepararon diferentes controles para comprobar que la producción de etanol se debía a la hidrólisis enzimática de la vaina y la conversión de azúcares a etanol por las levaduras. Como se puede observar en el Cuadro 7, los resultados para los diferentes controles tienen una menor concentración de etanol que la obtenida con la vaina hidrolizada químicamente y la vaina sin hidrolizar en los extremos inferiores de los intervalos, lo que indica que la producción de etanol es mayor cuando está presente la vaina de frijol, enzimas para su hidrólisis y levaduras para fermentar los azúcares en etanol. Sin embargo, las concentraciones de etanol en los controles no fueron de 0.000 % (m/v).

En los controles sin levadura se observó presencia de etanol, este pudo estar presente en el extracto enzimático utilizado, ya que previamente se ha observado que *T. harzianum* es capaz de producir etanol al fermentar celulosa (Stevenson & Weimer, 2002). Como para producir los extractos enzimáticos el hongo creció en medios con vaina de frijol, es posible que el medio se haya quedado sin oxígeno y que el hongo haya utilizado parte de los azúcares liberados para producir etanol, el cual es el etanol presente en los controles. Por otro lado, en los controles sin los extractos enzimáticos también se observó presencia de etanol, este pudo haberse producido luego de que las levaduras fermentaran los azúcares que pudieron haber permanecido en el medio de cultivo del inóculo, el cual contenía glucosa, pero la concentración fue mayor con la vaina hidrolizada químicamente, lo cual puede indicar que con esta hidrólisis sí se liberan azúcares fermentables que las levaduras pueden aprovechar para producir etanol. El etanol producido en el control sin vaina pudo provenir tanto del extracto enzimático como de la fermentación de la glucosa residual en el inóculo de levadura.

Finalmente, se puede observar que con la vaina de frijol sin hidrólisis alcalina se obtiene una concentración final de glucosa mayor que en los medios con vaina hidrolizada químicamente. Esto puede confirmar que en la hidrólisis alcalina se liberan compuestos que pueden inhibir a las

celulasas y por ello hay una menor concentración final de glucosa. Por otro lado, los medios con vaina hidrolizada tienen una concentración final mayor de fructosa, lo que puede indicar que en la hidrólisis alcalina se facilita la liberación de fructosa de la vaina de frijol.

Para evaluar si los resultados mejoran a una mayor escala y a condiciones más controladas, se llevaron a cabo fermentaciones para la producción de las enzimas utilizando al hongo *T. harzianum* con vaina de frijol y para la producción de etanol usando el método SSF en un biorreactor de 1 L. Primero se llevó a cabo la producción de las enzimas lignocelulolíticas usando las mismas condiciones que en las pruebas en Erlenmeyers y la concentración de vaina de frijol de 12.5 g/L. La diferencia es que en el biorreactor se logró una mejor agitación gracias a las 2 turbinas de 6 palas, las cuales ayudaron a que hubiera una mejor transferencia de masa en el medio. Sin embargo, estas turbinas también causaron un mayor esfuerzo cortante que el existente en el agitador orbital, lo cual hizo que el micelio del hongo se rompiera y que quedara distribuido en todo el medio y no solo en la parte superior como en los Erlenmeyers, lo cual pudo haber disminuido la producción enzimática si hubo un daño considerable al micelio.

La otra principal diferencia es que el biorreactor permitió tener un flujo de ingreso de aire al medio. Esto es importante ya que el hongo es un organismo aeróbico que necesita oxígeno para producir energía y llevar a cabo sus funciones metabólicas como la síntesis de las enzimas lignocelulolíticas y un flujo de aire ayudaría a aumentar esta producción. Sin embargo, la aireación del biorreactor se hizo de forma manual una vez al día, tratando de alcanzar la concentración de oxígeno disuelto del 30 % (indicada en el sensor). Esta concentración solo se alcanzó en el momento que se aireó el sistema, pero no fue una concentración constante ya que el biorreactor no tenía los ajustes necesarios para un flujo continuo de aire.

Por ejemplo, era necesario encender manualmente el compresor del laboratorio para el suministro de aire y posteriormente se debía abrir la válvula que permite el paso del aire comprimido al biorreactor. El aire pasa por una manguera conectada a un filtro, pero esta manguera solo es adecuada para presiones mínimas ya que al aumentar el flujo la manguera se hinchaba y podía explotar. El equipo cuenta con un rotámetro para calibrar y regular el flujo, sin embargo, al disminuirlo se aumentaba la presión en la manguera, por lo que era necesario abrir levemente la válvula que permitía el paso de aire al equipo, la cual es una válvula de bola y no es adecuada para regular el flujo, sino que debe usarse completamente abierta para una operación continua. Finalmente, al dejar mucho tiempo el flujo de aire, se comenzaban a generar burbujas en el biorreactor, las cuales formaban una espuma que llenaba el equipo y comenzaban a salirse por la salida de gases en la parte superior. Esto impidió un flujo constante de aire e hizo que se tuviera que airear manualmente. Sin embargo, no fue posible monitorear personalmente todo el día al biorreactor, por lo que la concentración de oxígeno en el medio no fue constante y de hecho fue disminuyendo hasta el siguiente día, en el cual se observaba una concentración del 0 %. De hecho, es posible que la mayor parte del tiempo la concentración de oxígeno haya sido baja ya que luego de la aireación comenzaba a decrecer y era complicado alcanzar esa concentración por las razones mencionadas y porque el aire no es soluble en los medios de cultivo, por lo que se tendría que haber aumentado la agitación para aumentar la transferencia de masa, pero eso también habría aumentado el esfuerzo cortante que sufriría el hongo (da Silva *et al.*, 2016).

Luego de llevar a cabo la fermentación en el biorreactor y de obtener el extracto enzimático, se determinó que el extracto obtenido tuvo una concentración de sólidos de  $35.5 \pm 1.8$  g/L, la cual es mayor a la obtenida en las pruebas en Erlenmeyers (ver Cuadro 3), indicando que probablemente

se produjo una mayor cantidad de enzimas y azúcares. La actividad enzimática del extracto obtenido tuvo un intervalo de confianza de  $0.178 \pm 0.002$  FPU/mL (ver Cuadro 8). Esta actividad es mayor a la obtenida en las pruebas en Erlenmeyers a excepción del medio 1 con concentración de 12.5 g/L. Esto indica que aumentó la actividad respecto al resto de medios lo cual se pudo deber a la aireación proporcionada, sin embargo, no fue mayor que la obtenida en el medio 1 mencionado posiblemente por el esfuerzo cortante que dañó el micelio del hongo y que pudo haber disminuido la producción de enzimas. Otro aspecto que pudo haber influido en la actividad fue la extracción ya que como se mencionó, es posible que las enzimas se hayan quedado unidas a la vaina de frijol.

En un estudio en el que optimizaron la producción de celulasas extracelulares usando Tween 80, la actividad enzimática fue de 0.5 FPU/mL (Lee *et al.*, 2017), lo cual es similar a lo obtenido en este estudio, sin embargo (da Silva *et al.*, 2016) obtuvieron celulasas con una actividad de  $2.27 \pm 0.37$  FPU/mL. Los resultados de este estudio fueron mayores ya que realizaron una optimización de las condiciones de producción, variando el inductor, las concentraciones y temperaturas. Además, la estrategia de producción fue por lote alimentado, lo cual aumentó la producción ya que se fue agregando con el tiempo la biomasa lignocelulósica que indujo la producción de enzimas, evitando la inhibición que puede ocurrir al agregar toda desde el inicio. Además, en el experimento si pudieron tener un flujo constante de aire, lo cual no se realizó en el experimento y por ello la actividad enzimática fue menor.

Además, se determinó la concentración de glucosa presente en el extracto enzimático y esta fue del  $0.040 \pm 0.003$  % (m/v) (ver Cuadro 8). La presencia de glucosa confirma la actividad de las celulasas en el extracto ya que no se agregó nada de glucosa para la preparación del medio inductor de la producción de celulasas en el biorreactor ni en el pre-inóculo del hongo. Por lo que esta concentración es la glucosa residual de la que utilizó el hongo para crecer y seguir produciendo enzimas. Además de las celulasas, *T. harzianum* es capaz de secretar hemicelulasas como xilanasas, mananasas, xilosidasas, arabinofurosidasas, manosidasas, galactosidasas, carboxilesterasas y monooxigenasas líticas de polisacáridos (Zhang *et al.*, 2020). Sin embargo, la actividad o presencia de estas enzimas en el extracto obtenido no fue cuantificada ya que no se contaba con los reactivos necesarios, por lo que se recomienda cuantificar la actividad de estas enzimas en estudios posteriores ya que estas enzimas pueden hidrolizar la hemicelulosa y producir otros azúcares fermentables.

Finalmente, se llevó a cabo una sacarificación y fermentación simultánea (SSF) en el biorreactor de 1 L utilizando vaina de frijol a una concentración de 12.5 g/L, un inóculo de levaduras y el extracto enzimático a las mismas condiciones que las fermentaciones en los Erlenmeyers con deflectores. Esta fermentación se llevó a cabo por un tiempo de 88 horas durante las cuales se tomaron muestras a diferentes tiempos. Al final de la fermentación se tomaron muestras del biorreactor en diferentes puntos y se obtuvo una concentración final promedio de sacarosa del 0.018 % (m/v), de glucosa del 0.016 % (m/v), de fructosa del 0.034 % (m/v), los cuales no se habían agregado al fermentador y de etanol del 0.136 % (m/v) que equivale a una concentración de 1.36 g/L (ver Cuadro 9). Esto indica que se logró llevar a cabo exitosamente la sacarificación y fermentación simultánea ya que originalmente no se habían agregado azúcares al medio ni etanol. (El extracto enzimático utilizado tenía un 0 % de etanol ya que el hongo no estuvo en condiciones anaeróbicas por la aireación del biorreactor). Por lo que las enzimas del extracto enzimático fueron capaces de hidrolizar la vaina de frijol y los azúcares liberados fueron consumidos por las levaduras para producir etanol.

La concentración de etanol obtenida es más del doble de la obtenida en la fermentación en Erlenmeyers, lo cual se puede deber a que en el biorreactor se pueden mantener las condiciones anaeróbicas con mayor control ya que el equipo se encuentra sellado y la salida para gases estaba tapada superficialmente con papel aluminio, permitiendo la salida del dióxido de carbono producido, pero impidiendo la entrada de aire. Por la producción del dióxido de carbono la presión en el biorreactor era mayor, por lo que habría únicamente un flujo hacia afuera y no una entrada de aire externo. Además, el agitador con las 2 turbinas mejoró la agitación del medio al tener patrones de flujo radiales y axiales que permitieron una mayor transferencia de masa para que las enzimas llegaran a la vaina y que luego los azúcares liberados llegaran a las levaduras en comparación con el agitador orbital.

Al terminar la fermentación también se centrifugó el medio para recuperar la vaina de frijol y luego de secarla se cuantificó para determinar el rendimiento en la producción de etanol, el cual fue del  $39.3 \pm 11.2$  %, lo que significa que por cada 100 gramos de vaina consumida se producen 39.3 g de etanol. Este valor pudo haber sido aun mayor ya que al momento de separar la vaina de frijol del medio líquido para secarla, una parte de la vaina se perdió, por lo que realmente hubo un menor consumo de vaina y por ende el rendimiento pudo ser mayor.

En comparación con otros estudios, (Kelbert *et al.*, 2016) obtuvieron una concentración final de etanol de 54 g/L en un sistema SSF usando madera de eucalipto y (Liu *et al.*, 2014) obtuvieron una concentración final de 59.8 g/L con un rendimiento del 77.2 % usando rastrojo de maíz pretratado. En estos estudios se obtuvieron mejores resultados ya que se hicieron optimizaciones de los procesos, por ejemplo, en el primero se evaluaron diferentes situaciones de estrés como la presencia de compuestos inhibidores, altas temperaturas y alta carga de sólidos y se observó que la combinación de temperatura y la carga de sólidos fueron las variables más significativas en la producción de etanol. Por otro lado, en el segundo estudio se optimizó la carga del sustrato agregado, la concentración de las enzimas añadidas, la cual fue mayor que en dicho estudio y se utilizó una levadura tolerante a altas temperaturas y al etanol, lo cual aumentó el rendimiento del proceso ya que las enzimas tienen una mayor actividad a temperaturas cercanas a los 40° C.

El único estudio encontrado en el que se utilizó un sustrato similar a la vaina de frijol fue el de (Upendra *et al.*, 2013) en el que usaron vainas de frijol, envoltura de semilla y vainas de arveja, las cuales fueron pretratadas con ácido y sacarificadas usando un consorcio de cepas del hongo *Aspergillus*. Con esto obtuvieron 90 g de glucosa por kg de residuo, la cual fue consumida por *S. cerevisiae* para obtener una producción de etanol de 250 mL / kg de residuo que equivale a un rendimiento de 0.197 g/g de residuo. Este es un sistema SHF ya que la hidrólisis del sustrato se hace en un medio separado al de la fermentación. Esto demuestra la ventaja del método SSF ya que en la presente investigación el rendimiento fue casi el doble (0.393 g etanol/g de vaina) (ver Cuadro 9) sin haber optimizado el proceso, lo cual se debe a las ventajas mencionadas previamente.

En la fermentación también se fue registrando el crecimiento de las levaduras usando un conteo celular con la cámara de Neubauer. El conteo fue calibrado con el peso seco de las levaduras para hallar la concentración de levaduras en g/L y al final de la fermentación se tuvo un rendimiento de  $0.699 \pm 0.295$  g de levadura/g de vaina, lo cual se podría expresar como un rendimiento del 70 %. Esto indica que las levaduras fueron capaces de consumir los azúcares liberados en la hidrólisis de la vaina para producir etanol y para reproducirse y aumentar su población.

En la Figura 20 se puede observar cómo fueron cambiando en el tiempo las concentraciones de levadura, sacarosa, glucosa, fructosa y etanol. Se observa que las levaduras tienen una típica curva de crecimiento inicial, la cual se puede observar mejor en la Figura 21, donde se graficó el logaritmo de la concentración de las levaduras y puede observarse al inicio una fase lag donde se adaptan las levaduras al medio de cultivo ya que no hay un aumento considerable en la población entre las 0 y 10 horas. De las 10 a las 22 horas se observa la fase de aceleración ya que comienza a aumentar en mayor cantidad la concentración celular. De las 22 a las 70 horas se consideró la fase exponencial de crecimiento ya que hay un mayor aumento en la concentración de células y en la curva logarítmica se puede observar un comportamiento lineal, característico de la fase exponencial. Luego se observa la fase de desaceleración ya que hay un cambio en la concavidad de la curva y la velocidad a la que crecen las células es menor.

Con los datos de la fase exponencial se calculó la velocidad específica de crecimiento y se utilizó un valor promedio para calcular el tiempo de generación de las levaduras en la fermentación, el cual fue de  $17.81 \pm 1.51$  horas. Este valor es mayor al que se reporta generalmente para las levaduras (1.5 a 2 horas) (Madigan *et al.*, 2015). Sin embargo, este valor se consigue en medios de cultivo especializados para el crecimiento de *S. cerevisiae* a su temperatura óptima de crecimiento (25-30° C), mientras que en este estudio la levadura no tenía una alta concentración de azúcares para crecer, sino que tenía que esperar a que fueran hidrolizados por las enzimas, el medio no era homogéneo ya que la vaina al ser un sustrato sólido dificultó la transferencia de masa para que las enzimas llegaran a la vaina y luego los azúcares a las levaduras, es posible que en la vaina hayan compuestos que inhiban el crecimiento de las levaduras y se trabajó a una temperatura ligeramente mayor (34° C) a la temperatura óptima de la levadura ya que las enzimas tienen una mayor actividad a altas temperaturas y se tuvo que escoger un valor que estuviera entre el óptimo del crecimiento de las levaduras y de la actividad enzimática (40 a 50° C), lo que muestra la desventaja del método SSF. Todos estos factores hicieron que las levaduras crecieran más lento de como lo harían en un medio especializado para ellas. En la Figura 21 también se obtuvo la pendiente de la recta tangente a la curva de crecimiento con la cual se obtuvo la productividad del crecimiento que fue de 0.028 g/L\*h, esto también ayuda a mostrar que el crecimiento fue más lento por las razones mencionadas.

Aunque el crecimiento fue lento, las levaduras estaban vivas y reproduciéndose, de hecho, en el Cuadro 36 de Datos calculados se puede observar que, durante todo el tiempo de la fermentación, el porcentaje de viabilidad de las células fue mayor al 95 % lo que indica que las células podían aprovechar los azúcares liberados por las enzimas y aunque pudo haber inhibidores en la vaina, no eran letales. Por esto mismo y por el lento crecimiento, durante el tiempo de la experimentación, no se logró observar la fase estacionaria en la cual no hay un cambio en la concentración celular ya que las células se reproducen a la misma tasa que mueren, ni la fase de muerte.

Esto también se debe a que nunca se agotó la concentración de azúcares en el medio. En la Figura 20 se puede observar que a diferencia de las típicas curvas de crecimiento en las que la concentración celular y el producto (etanol) aumentan mientras que la concentración del sustrato limitante (glucosa) decae; en el biorreactor la concentración inicial de azúcares era nula y hasta que las enzimas lograron hidrolizar la vaina se liberaron azúcares, para aumentar su concentración, esto coincidió con el tiempo en el cual las levaduras comenzaron a aumentar su concentración. Luego los azúcares no disminuyeron, sino que se mantuvieron en valores constantes (sacarosa y glucosa) a lo largo del tiempo, mientras que la concentración de levaduras seguía en aumento. Esto indica que se liberaban azúcares a la misma tasa que eran consumidos por las levaduras. La fructosa muestra concentraciones mayores, lo cual se debe a que las levaduras tienen una menor afinidad a

ella que a la glucosa y a la sacarosa que hidrolizaron para producir glucosa. Cuando tuvo un mayor aumento la concentración celular fue cuando decayó la concentración de fructosa, pero posteriormente aumentó ya que se liberó una mayor cantidad de la vaina que la consumida por las levaduras.

Esto indica que la fermentación pudo haber continuado por más tiempo para que las enzimas siguieran hidrolizando la vaina de frijol y la levadura al consumir los azúcares evitar la inhibición de las enzimas, mientras continúa el crecimiento de las levaduras y la producción de etanol. Sin embargo, la concentración de etanol no tiene el mismo crecimiento que el de las levaduras, lo cual muestra un crecimiento no asociado. Esto se puede deber a que se utilizó levadura comercial para la elaboración de pan y no una cepa industrial que produzca altas concentraciones de etanol. Por ello en futuras experimentaciones se recomienda utilizar cepas que puedan producir grandes concentraciones de etanol y que tengan una buena tolerancia a este compuesto. Incluso se podrían utilizar cepas modificadas genéticamente para que no solo fermenten hexosas como la glucosa, sino que también fermenten pentosas como la xilosa que forma parte de la hemicelulosa y con ello aprovechar todos los azúcares liberados en la hidrólisis enzimática. *S. cerevisiae* podría ser modificada para que tenga genes que codifiquen para xilosa reductasa (XR), xilitol deshidrogenasa (XGH) y xiluloquinasa (XK), los cuales permiten la fermentación de la xilosa (Olofsson *et al.*, 2008).

En los cromatogramas encontrados en Anexos, se observan picos con una gran área, estos pueden corresponder por el tiempo de retención a sacarosa presente en el medio o bien a celobiosa que son dos glucosas unidas por un enlace beta, formadas por la hidrólisis parcial de la celulosa. Como no se tenían estándares para estos compuestos no se puede asegurar con certeza, de igual forma, es posible que el pico correspondiente a la glucosa se haya traslapado con el de la galactosa y que el de la xilosa y arabinosa se hayan traslapado con el de la fructosa ya que estos compuestos suelen estar presentes en la vaina de frijol y el hongo utilizado puede producir enzimas para hidrolizar la vaina en estos compuestos (Kamarudin & Gan, 2016). Determinar esto es importante ya que, si se identifica la presencia de estos compuestos en la fermentación, sería necesario modificar a las levaduras para que puedan asimilar estos compuestos.

En el proceso también sería importante determinar si la sacarificación y fermentación simultánea es la mejor estrategia o bien si es mejor hacer los procesos por separado. La ventaja de la sacarificación y fermentación simultánea es que evita la inhibición de las enzimas por los azúcares ya que son consumidos en el tiempo por las levaduras, lo cual también evita contaminación, así como las levaduras pueden eliminar inhibidores para las enzimas. La otra ventaja es que no es necesario purificar un hidrolizado para luego ingresarlo al reactor de la producción de etanol, lo cual tiene mayor riesgo de contaminación (Galbe & Zacchi, 2014).

El mayor inconveniente de esta estrategia es que el tiempo de generación de las levaduras es muy grande en comparación con otros tiempos reportados, por lo que la producción de etanol es más lenta en parte porque no se opera a la temperatura óptima de las levaduras y estas deben esperar a que se liberen azúcares, lo cual tampoco sucede de forma rápida ya que las enzimas no operan a su temperatura óptima, mientras que, al realizar los procesos por separado, ambos pueden ser optimizables. Por ello, para aprovechar las ventajas de la sacarificación y fermentación simultánea sería necesario utilizar levaduras que sean tolerantes a temperaturas cercanas a los 45° C para operar cerca de la temperatura óptima de las enzimas y con ello lograr una liberación de azúcares más rápida y tener un mejor crecimiento de las levaduras y con ello la producción de etanol. El uso de

estas levaduras tiene también las ventajas de una reducción de contaminación y costos de enfriamiento, mayor viabilidad, actividad metabólica y velocidad de fermentación, mayor mantenimiento de un ambiente anaeróbico ya que disminuye la solubilidad del oxígeno, disminuye la viscosidad del medio de fermentación y hay una menor lisis celular, con lo que se ha producido tolerancia de etanol de hasta 96.7 g/L con crecimiento de 40 a 45° C (Mejía et al., 2016).

Finalmente, para llevar a cabo todo el proceso presentado en esta investigación usando un solo microorganismo, se podría modificar genéticamente a una levadura para que no solo sea capaz de metabolizar pentosas y tolerar altas temperaturas y concentraciones de etanol, sino que también posea genes que le permitan producir enzimas lignocelulolíticas como las celulasas y hemicelulasas para que no tenga que haber una producción previa con un hongo micelar, el cual es más difícil de cultivar, ni sea necesaria una extracción de las enzimas, sino que en un solo biorreactor la levadura podría ser inducida por un sustrato lignocelulósico para producir enzimas hidrolíticas y que con ellas se liberen azúcares que puedan aprovechar las levaduras para crecer y para producir etanol en un bioproceso consolidado.

Estas levaduras también deben ser resistentes contra el estrés que se generaría por la presencia de los inhibidores liberados durante el proceso de hidrólisis. Los métodos de expresión de celulasas que se han evaluado en levaduras incluyen la secreción de las enzimas, la expresión de las enzimas en la superficie de la célula y la expresión de un celulosoma, que es un andamio de enzimas, en el cual las enzimas están unidas a un complejo en el exterior de la célula y al acercarse el sustrato se da una conversión más rápida por la cercanía de las enzimas. Con estos métodos se han obtenido concentraciones de etanol desde 1 hasta 43.1 g/L usando diferentes sustratos celulósicos y productividades volumétricas de hasta 0.599 g/L\*h (Oh & Jin, 2020).

Tanto en la producción enzimática como en la fermentación y sacarificación simultánea en el biorreactor se observaron mejoras en comparación con los resultados en Erlenmeyers. La diferencia de resultados entre las escalas se pudo deber principalmente a que los procesos estuvieron más controlados por los sensores del equipo que permitieron un mejor control de la temperatura y del pH de las fermentaciones. En el caso de la producción enzimática la posibilidad de suministrar aire al medio mejoró el crecimiento del hongo al ser aeróbico y con esto la producción de enzimas lignocelulolíticas. Finalmente, la agitación tuvo el efecto más importante en el aumento de escala en ambas fermentaciones ya que tanto en la producción de enzimas como en la producción de etanol había un sustrato sólido en el medio, lo cual dificultaba la transferencia de masa de todos los componentes tanto al hongo como a las levaduras.

En los Erlenmeyers la agitación del agitador orbital no era suficiente ya que la mayor parte de la vaina de frijol y la biomasa de las levaduras se sedimentó en la parte inferior de los Erlenmeyers, lo cual dificultó que las enzimas llegaran a la vaina y que luego los azúcares liberados llegaran tanto al hongo para crecer y producir más enzimas como a las levaduras para producir etanol. Por otro lado, en el biorreactor el agitador con las 2 turbinas mejoró la agitación del medio al tener patrones de flujo radiales y axiales que permitieron una mayor transferencia de masa al tener una mayor distribución de la vaina, del hongo y de las levaduras en todo el reactor para que las enzimas llegaran a la vaina y que luego los azúcares liberados llegaran a las levaduras y al hongo. En el caso de la producción enzimática, la agitación también favoreció que hubiera una mejor transferencia de oxígeno por todo el biorreactor ya que el aire ingresaba por la parte inferior y el agitador permitió que el oxígeno estuviera en todo el medio y no solo en la parte superior como en el agitador orbital.

El aumento de escala podría sugerir rendimientos mayores en el proceso, pero para llevar a cabo las reacciones a una mayor escala es importante primero optimizar las condiciones de las fermentaciones a menor escala como las temperaturas, pH, flujo de aire al biorreactor para la producción enzimática, concentración de vaina, de los inóculos, de los extractos enzimáticos dependiendo de la actividad y la agitación. Al hacerlo es necesario realizar estudios cinéticos con las condiciones óptimas para obtener modelos que permitan predecir tanto el crecimiento del hongo, la producción de enzimas, la liberación de azúcares en la hidrólisis enzimática, el crecimiento de las levaduras y la producción de etanol. Esto es importante porque permite predecir lo que sucede en la reacción y al monitorear el proceso verificar que se esté dando de la forma esperada. Pero también permitiría determinar el tiempo de reacción o espacio-tiempo que las partículas deben pasar dentro del reactor para dimensionar el tamaño del biorreactor necesario al tener el flujo a tratar (Levenspiel, 1999).

Al tener el tamaño del reactor es importante determinar el tamaño y potencia del agitador ya que de este dependerá que haya una agitación que permita una adecuada transferencia de masa y homogeneización de todo el medio. Lo más común es que se mantenga la relación potencia/volumen que se usó en una menor escala constante a mayor escala. El inconveniente de hacerlo es que también podría aumentar de forma considerable el esfuerzo cortante que ejerce el agitador sobre el hongo para la producción enzimática y sobre las enzimas en la hidrólisis. Esto podría causar daño a la estructura del hongo impidiendo un crecimiento adecuado y con ello la producción de enzimas, así como estas podrían desnaturalizarse y perder actividad. Por ello, también es importante reducir el esfuerzo cortante para evitar estos daños y para mantener una agitación apropiada se podría mantener constante la relación velocidad\*diámetro del agitador al conocer el tamaño del reactor final. Para ello también es importante a una menor escala hacer pruebas para conocer qué tanto se puede aumentar la velocidad sin que el daño sea considerable (McCabe *et al.*, 2007).

Finalmente, para dimensionar de forma adecuada los biorreactores y el resto del proceso, es necesario realizar de forma adecuada los balances de masa de ambas reacciones. En la Figura 77 y 78 de la sección de Anexos, se pueden observar los balances para la producción de enzimas y para la sacarificación y fermentación simultánea respectivamente. En el primero se puede observar el ingreso de oxígeno, de la vaina de frijol, de los sólidos en el medio de cultivo y la biomasa del pre-inóculo del hongo y en la salida se observa el dióxido de carbono, los sólidos disueltos en el medio incluyendo azúcares reductores, sales, enzimas y azúcares no reductores, además de la vaina residual y la biomasa del hongo formada. En el balance se puede observar que los sólidos disueltos pasaron de 15.621 g a 35.5 g, lo cual indica que la vaina de frijol fue utilizada para liberar azúcares y que estos fueron consumidos por el hongo para liberar otras biomoléculas como las enzimas lignocelulolíticas. Pero para tener un mejor control y definir de mejor manera las etapas previas y posteriores a la fermentación, sería necesario tener una mejor caracterización de todos esos sólidos para hacer un mejor balance y cuadrar no solo la masa total sino las especies atómicas. De hecho, por no poder balancear los átomos, en el balance aparece una incógnita ya que no fue posible medir ni el dióxido de carbono producido, ni el oxígeno que ingresó al equipo y fue aprovechado por el hongo y por ello la variable se encuentra en ambas especies para balancear la masa aunque es importante resaltar que el oxígeno del dióxido de carbono no proviene del oxígeno en la alimentación ya que este es usado para producir agua, sino que proviene del oxígeno en las biomoléculas consumidas por el hongo (Nelson & Cox, 2009).



En la sacarificación y fermentación simultánea si fue posible realizar el balance, en el cual ingresó la vaina de frijol, los sólidos del medio de cultivo, la levadura del inóculo y los sólidos en el extracto enzimático para obtener luego de la fermentación el etanol, los sólidos disueltos que incluyen glucosa, fructosa, sacaros, sales y otras biomoléculas como las enzimas lignocelulolíticas, así como la vaina residual y la biomasa formada de levaduras. El dióxido de carbono producido en la reacción para producir etanol y para el mantenimiento celular no fue medido, pero se determinó con el balance del resto de componentes. Se observa que se logró producir etanol y azúcares a partir de la vaina, pero de igual forma es importante caracterizar todos los sólidos disueltos para las etapas de purificación posteriores.

Para poder aplicar todo el proceso a una escala industrial sería importante determinar todas las operaciones unitarias ligadas a este, por ejemplo, definir cómo llegaría la materia prima, que podría ser la vaina con cierto nivel de humedad y podría pasar por un proceso de secado para que tenga una humedad determinada y no haya contaminación. La vaina podría pasar por un secador continuo y posteriormente pasar por el proceso de molienda para obtener una harina con la cual trabajar. Sería necesario realizar estudios previos para determinar si una mayor reducción en el tamaño de partícula genera un efecto positivo significativo o no para dimensionar el molino necesario y si se necesita una etapa de tamizaje para recircular los gruesos o si se puede utilizar toda la harina obtenida del molino.

En una etapa en paralelo sería necesario tener un biorreactor para el pre-inóculo del hongo, en el cual se dosifique el medio de cultivo necesario, incluyendo el glicerol como fuente de carbono para evitar la inhibición de las celulasas. Sería importante hacer estudios para evaluar si es posible utilizar glicerol proveniente de la industria del biodiesel para revalorizarlo y que sea de menor costo o si es necesario realizar algún tratamiento para eliminar impurezas en caso de que actúen como inhibidores para el hongo.

Al tener el preinóculo listo, este ingresaría al biorreactor en el que se producen las enzimas junto con la vaina de frijol y el resto de los nutrientes, con un flujo de aire y una agitación optimizadas. Luego de la fermentación, para aumentar la actividad de los extractos enzimáticos, sería necesario purificar las enzimas, por ejemplo, con una etapa de precipitación para que no haya tanto medio de cultivo en los extractos y finalmente una resuspensión del precipitado obtenido en buffer para tener un extracto más concentrado y con una mejor preservación.

Para la producción de etanol de igual forma sería necesario un biorreactor para preparar el pre-inóculo y luego del crecimiento, las levaduras ingresarían al biorreactor principal junto con el extracto enzimático y la vaina de frijol para la sacarificación y fermentación simultánea. Para extraer el etanol todo el medio debe pasar por una etapa de centrifugación para separar el medio de las levaduras y la vaina sobrante y el sobrenadante pasaría por una torre de destilación para recuperar el etanol y en caso de que sea utilizado como combustible tendría que pasar por una etapa de secado para eliminar el agua o bien por una adsorción para eliminar componentes aromáticos en caso de que se use en la industria cosmética o farmacéutica.

En el residuo de la destilación quedaría un medio de cultivo con azúcares residuales, por lo que podría utilizarse para los pre-inóculos y aprovechar todos los azúcares, así como la vaina residual de ambas fermentaciones podría recircularse para aprovechar todos los azúcares que contenga y la levadura al dañarse en la separación de la biomasa podría actuar como fuente de nitrógeno, vitaminas y otros nutrientes para los medios de cultivo. La vaina que ya no libere

azúcares en los medios líquidos al estar hidrolizada podría proporcionar mejores beneficios como fertilizante ya que sería más fácil de aprovechar por los microorganismos del suelo o bien podría ingresar a un biodigestor para producir biogás y un lixiviado que puede ser utilizado como fertilizante.

De igual forma, se podría evaluar el contenido de lignina de la vaina residual y determinar si con una hidrólisis alcalina u otro método se pueden recuperar los compuestos fenólicos de la lignina para generar materiales como resinas, plastificantes, antioxidantes u otros polímeros de interés. (Okolie *et al.*, 2021). Y el resto de vaina que no se pueda aprovechar podría utilizarse como combustible sólido en calderas para generar el vapor necesario para diferentes procesos en la planta como para mantener la temperatura necesaria en los biorreactores o para generar el calor necesario en la etapa de destilación.

## IX. Conclusiones

- Se lograron preparar tres medios de cultivo utilizando vaina de frijol con un D70 de 0.828 mm como fuente de carbono con concentraciones de  $12.5 \pm 0.3$  g/L,  $25.0 \pm 0.5$  g/L y  $37.5 \pm 0.8$  g/L. En estos medios se indujo la producción de enzimas lignocelulolíticas ya que el hongo *T. harzianum* pudo crecer en una fermentación sumergida usando estos medios. Luego de las fermentaciones, se obtuvieron extractos de las enzimas producidas y luego de realizar los ensayos de papel filtro, los extractos tuvieron actividades de  $0.298 \pm 0.037$  FPU/mL,  $0.010 \pm 0.024$  FPU/mL y  $-0.008 \pm 0.024$  FPU/mL respectivamente. Se obtuvo mayor actividad con el medio con menor concentración de vaina, lo cual se puede deber a que se haya dado una inhibición por el sustrato o bien se dificultó la transferencia de masa en los medios con concentraciones mayores de vaina por el contenido de sólidos.
- Se observó que, para la vaina de frijol utilizada, el pretratamiento con una hidrólisis alcalina no tiene una influencia significativa en la producción de azúcares fermentables con la hidrólisis enzimática, ya que el intervalo de confianza de los azúcares en forma de glucosa liberados por la vaina con hidrólisis alcalina ( $3.23 \pm 8.92$  g/L) y sin hidrólisis alcalina ( $3.55 \pm 7.44$  g/L) se traslapan, así como la conversión ( $25.8 \pm 28.7$  % y  $28.4 \pm 24.0$  % respectivamente).
- Se observó que la hidrólisis enzimática de la vaina de frijol con el extracto enzimático obtenido tiene una liberación de azúcares con una productividad de 2 g de azúcares en forma de glucosa/L\*h, lo cual indica que tan rápido aumentan las enzimas la concentración de azúcares en el medio. Sin embargo, esta es la inicial ya que posteriormente la liberación de azúcares es más lenta, lo cual se puede deber a que los azúcares liberados hayan inhibido a las enzimas, disminuyendo la velocidad de reacción.
- Fue posible llevar a cabo una fermentación y sacarificación simultánea ya que al agregar en el mismo medio de reacción el extracto enzimático, vaina de frijol y levaduras, fue posible producir etanol. En las pruebas en Erlenmeyers se evaluó el uso de vaina con y sin hidrólisis alcalina y de igual forma no se obtuvo una diferencia significativa en los resultados, ya que con hidrólisis alcalina el intervalo de confianza de la concentración final fue de  $0.056 \pm 0.006$  % (m/v) y sin hidrólisis alcalina fue de  $0.063 \pm 0.013$  % (m/v), los cuales se traslapan. Esto confirma que no es necesario realizar este proceso para la vaina de frijol utilizada.
- Al llevar a cabo la producción de enzimas en el biorreactor de 1 L se obtuvo una actividad enzimática de  $0.178 \pm 0.002$  FPU/mL, lo cual fue mayor al resto de extractos obtenidos pero menor a uno de los obtenidos en Erlenmeyers. Esto se pudo deber a que el sistema no tuvo una aireación constante y que la agitación pudo haber causado un esfuerzo cortante que dificultara el crecimiento del hongo.
- Al realizar la fermentación y sacarificación simultánea en el biorreactor se pudieron tener condiciones más controladas, por lo que se obtuvo una concentración de etanol mayor que en los Erlenmeyers, de  $1.36 \pm 0.48$  g/L, con un rendimiento respecto al consumo de vaina del  $39.3 \pm 11.2$  %. El rendimiento podría ser mayor ya que la levadura utilizada no es

especializada para producción industrial de etanol y no es capaz de metabolizar pentosas, que son azúcares liberados de la vaina de frijol.

- El rendimiento de la producción de levaduras respecto al sustrato fue mayor, del  $69.9 \pm 29.5 \%$ , lo cual indica que las levaduras pudieron aprovechar los azúcares liberados por la hidrólisis enzimática de la vaina de frijol y tuvieron una productividad de  $0.028 \text{ g/L}\cdot\text{h}$ . Esto está relacionado con el tiempo de generación observado de  $17.81 \pm 1.51 \text{ h}$ , el cual es mayor al reportado. Esto se debe a que las levaduras tenían que esperar a que se liberaran azúcares de la vaina para poder utilizarlos, así como no se operó a su temperatura óptima de crecimiento ya que se operó en un intermedio entre su temperatura óptima y la temperatura óptima de las enzimas.

## X. Recomendaciones

- Durante la experimentación se utilizó la vaina obtenida en la molienda, con el D70 especificado, pero para futuras experimentaciones se recomienda evaluar el uso de diferentes tamaños de partícula para la generación de enzimas y para la liberación de azúcares en la hidrólisis enzimática al tamizar toda la harina obtenida y observar con qué tamaño de partícula se mejora la actividad enzimática ya que, al disminuir el tamaño, también aumentaría el área superficial pero habría que evaluarlo económicamente ya que también aumentarían los costos de molienda, tamizado y de manejo de polvos finos.
- Se recomienda evaluar diferentes tiempos o velocidades de centrifugación en el proceso de extracción de las enzimas lignocelulolíticas para determinar con cual se obtiene la mejor separación de las enzimas del sustrato y las condiciones con las que aumenta la actividad enzimática del extracto obtenido. Así como se recomienda evaluar concentraciones menores a los 12.5 g/L de vaina y verificar si con alguna se mejora la producción enzimática o bien evaluar un sistema por lote alimentado para que la concentración de vaina no sea alta desde el principio, sino que se vaya agregando conforme es hidrolizada.
- Se recomienda realizar ajustes a las conexiones del biorreactor para el suministro de aire de forma que se obtenga un flujo continuo, por ejemplo, colocar una válvula de aguja para permitir el paso de aire al equipo ya que esta sí regula el flujo de forma adecuada y puede permanecer abierta todo el tiempo para tener flujos controlados. También se recomienda cambiar la manguera de aire por una más resistente, de forma que soporte los aumentos de presión que se generarían al regular el flujo en el rotámetro del equipo. El equipo permite tener una configuración determinada del flujo de aire ingresado, por lo que estas modificaciones permitirían mejorar esta función.
- Al poder tener un flujo constante, se recomienda realizar variaciones del flujo de aire ingresado al biorreactor para observar con cual se mejora la producción de las enzimas lignocelulolíticas. Para esto también sería necesario evaluar el uso de antiespumante para evitar que se genere mucha espuma durante la aireación y que esta salga del biorreactor.
- Se recomienda hacer variaciones en la agitación del biorreactor para evaluar con cual se maximiza la producción enzimática al tomar en cuenta que, con el aumento en la velocidad de agitación, aumenta el esfuerzo cortante que puede estar afectando el micelio, pero también el coeficiente de transferencia de masa para que haya una mayor concentración de oxígeno disuelto y la transferencia de azúcares al hongo y de enzimas a la vaina de frijol.
- En el estudio se determinó la actividad de las celulasas que son las principales enzimas lignocelulolíticas, pero en futuras experimentaciones se recomienda determinar la actividad de todas las enzimas lignocelulolíticas que puedan estar presentes en el extracto como xilanasas usando xilano en vez de papel filtro y la medición de mananasas se puede hacer con galactomanano. La medición específica de endoglucanasas se puede hacer sustituyendo el papel filtro por carboximetilcelulosa y la medición de celobiohidrolasas,  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -xilosidasa y  $\alpha$ -arabinofuranosidasa se puede realizar usando p-nitrofenil- $\beta$ -d-cellobioside (pNPC), p-nitrofenil- $\beta$ -glucopiranoside (pNPG), p-nitrofenil- $\beta$ -d-xilopiranoside (pNPX), y p-nitrofenil- $\alpha$ -l-arabinofuranoside (pNPAF) respectivamente como sustratos y la medición

se hace con la absorbancia del p-nitrofenol liberado. La cuantificación de la actividad de monooxigenasas líticas de polisacáridos se puede realizar al medir el peróxido de hidrógeno generado por la enzima usando el ensayo Amplex® Red.

- Se recomienda evaluar el uso de una levadura modificada genéticamente para que pueda metabolizar no solo hexosas sino también pentosas y con ello aprovechar todos los azúcares liberados en la hidrólisis enzimática, así como que sea resistente al etanol y a los inhibidores que se puedan liberar. De ser posible, también se recomienda modificar genéticamente a la levadura para que exprese las enzimas lignocelulolíticas como celulasas para que se lleve a cabo un bioproceso consolidado en el que la levadura produzca las enzimas para hidrolizar la vaina y que use los azúcares liberados para producir etanol en un solo reactor.
- Este estudio fue exploratorio, en el cual se evaluó la posibilidad de usar vaina de frijol para la producción de enzimas lignocelulolíticas y de usar estas enzimas para hidrolizar más vaina para liberar azúcares que pudieran ser metabolizados por las levaduras para producir etanol, lo cual fue posible. Los siguientes pasos son la optimización o estandarización de las condiciones a las cuales se deben llevar a cabo las fermentaciones como la temperatura, agitación, flujo de aire en el caso de la producción enzimática, concentración de vaina agregada, del inóculo del hongo, del inóculo de la levadura y del extracto enzimático agregado y de los tiempos de fermentación para maximizar la producción de enzimas y de etanol.
- Al estandarizar esas condiciones a los valores óptimos se recomienda elaborar modelos cinéticos que permitan modelar el comportamiento de las reacciones, en especial la sacarificación y fermentación simultánea, de forma que se pueda predecir lo que sucede en la reacción y que el modelo permita diseñar el reactor necesario en un escalamiento industrial.

## XI. Bibliografía

- Aigbodion, V. S. (2019). Bean pod ash nanoparticles a promising reinforcement for aluminium matrix biocomposites | Elsevier Enhanced Reader. *Journal of Materials Research and Technology*, 8(6), 6011-6020. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2019.09.075>
- Aldana, L. F. (2010). *Manual Producción Comercial y de Semilla de Frijol (Phaseolus Vulgaris L.)*. ICTA. <http://www.funsepa.net/guatemala/docs/produccionSemillaFrijol.pdf>
- Álvarez, E. (2018). *CULTIVO DE FRIJOL (Phaseolus vulgaris L.)*. CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA Y FORESTAL. [http://centa.gob.sv/docs/guias/granos%20basicos/Guia%20Centa\\_Frijol%202019.pdf](http://centa.gob.sv/docs/guias/granos%20basicos/Guia%20Centa_Frijol%202019.pdf)
- Anderson, D., Sweeten, D., & Williams, T. (2012). *Estadística para negocios y economía*. Cengage Learning.
- Baig, K. S. (2020). Interaction of enzymes with lignocellulosic materials: Causes, mechanism and influencing factors. *Bioresources and Bioprocessing*, 7(21), 1-19. <https://doi.org/10.1186/s40643-020-00310-0>
- Bastidas, O. (s. f.). *Cell counting with Neubauer chamber. Basic Hemocytometer Usage*. Recuperado 13 de septiembre de 2022, de [https://www.academia.edu/34297748/Cell\\_counting\\_Neubauer\\_chamber](https://www.academia.edu/34297748/Cell_counting_Neubauer_chamber)
- Cardoza, R., Hermosa, R., Vizcaino, J., Sanz, L., Monte, E., & Gutierrez, S. (2005). Secondary metabolites produced by Trichoderma and their importance in the biocontrol process. En E. M. Durán & J. L. Barredo (Eds.), *Microorganisms for Industrial Enzymes and Biocontrol* (pp. 1-22). Research Signpost.
- Chávez, M., & Domine, M. E. (2013). LIGNINA, ESTRUCTURA Y APLICACIONES: MÉTODOS DE DESPOLIMERIZACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE DERIVADOS AROMÁTICOS DE INTERÉS INDUSTRIAL. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 4(4), 15-46.
- Chen, S., Xu, Z., Li, X., Yu, J., Cai, M., & Jin, M. (2018). Integrated bioethanol production from mixtures of corn and corn stover. *Bioresource Technology*, 258, 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.02.125>
- Chukwuma, O. B., Rafatullah, M., Tajarudin, H. A., & Ismail, N. (2020). Lignocellulolytic Enzymes in Biotechnological and Industrial Processes: A Review. *Sustainability*, 12(18), 1-31. <https://doi.org/10.3390/su12187282>
- Coradi, G. V., da Visitação, V. L., de Lima, E. A., Saito, L. Y. T., Palmieri, D. A., Takita, M. A., de Oliva Neto, P., & de Lima, V. M. G. (2013). Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues for the production and characterization of lipase by Trichoderma harzianum. *Annals of Microbiology*, 63(2), Art. 2. <https://doi.org/10.1007/s13213-012-0500-1>
- Coral, J. D., & Magalhaes, A. I. (2020). Ethanol Production, Current Facts, Future Scenarios, and Techno-Economic Assessment of Different Biorefinery Configurations. En F. Inambao (Ed.), *Bioethanol Technologies*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.95081>
- da Silva, P., Lima, D. J., Codima, C. A., Ramoni, J., Gelain, L., Sampaio, V., Sanchez, C., da Cruz, J. G., & Seiboth, B. (2021). Replacement of the carbon catabolite regulator ( cre1) and fed-batch cultivation as strategies to enhance cellulase production in Trichoderma harzianum. *Bioresource Technology Reports*, 13, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100634>

- da Silva, P., Lima, D. J., Robl, D., Rabelo, S. C., Farinas, C. S., & da Cruz, J. G. (2016). Enhanced cellulase production by *Trichoderma harzianum* by cultivation on glycerol followed by induction on cellulosic substrates. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(5), 617-626. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1744-8>
- da Silva, P., Sanchez, C., Ribeiro, M., Freitas, S., & da Cruz, J. G. (2012). Use of a new *Trichoderma harzianum* strain isolated from the Amazon rainforest with pretreated sugar cane bagasse for on-site cellulase production. *Bioresource Technology*, 107, 517-521. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.048>
- de Carvalho, C. C. C. R. (2016). Fungi in Fermentation and Biotransformation Systems. En D.-W. Li (Ed.), *Biology of Microfungi* (pp. 525-541). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-29137-6\\_21](https://doi.org/10.1007/978-3-319-29137-6_21)
- Fernández, A. F., & Sánchez, E. (2007). Revista Electrónica Nova Scientia. *Nova Scientia*, 9(18), 133-148.
- Franco, P. F., Ferreira, H. M., & Ferreira, E. X. (2004). Production and characterization of hemicellulase activities from *Trichoderma harzianum* strain T4. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 40(3), 255-259. <https://doi.org/10.1042/BA20030161>
- Gaitan, R., & Salmons, D. (2015). Uso de residuos lignocelulósicos para optimizar la producción de inóculo y la formación de carpóforos del hongo comestible *Lentinula boryana*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(7), 1639-1652. <https://doi.org/10.29312/remexca.v6i7.556>
- Galbe, M., & Zacchi, G. (2014). PRODUCTION OF ETHANOL FROM LIGNOCELLULOSIC MATERIALS. En L. Barbosa, *Sugarcane bioethanol—R&D for Productivity and Sustainability* (pp. 697-716). Editora Edgard Blücher.
- García, R., Durán, M. A., & Riera, R. (2006). PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE TRICHODERMA HARZIANUM POR FERMENTACIÓN LÍQUIDA. *Fitosanidad*, 10(4), 295-298.
- Gary, C. D. (2009). *Química Analítica*. McGraw-Hill.
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2), 257-268. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>
- GlobeNewswire. (2021a, enero 18). *Ethanol Market Size Worth Around USD 155.6 Billion by 2030*. GlobeNewswire News Room. <https://www.globenewswire.com/news-release/2021/01/18/2160198/0/en/Ethanol-Market-Size-Worth-Around-USD-155-6-Billion-by-2030.html>
- GlobeNewswire. (2021b, febrero 12). *Industrial Enzymes Market Size to Surpass US\$ 9.7 Bn by 2030*. GlobeNewswire News Room. <https://www.globenewswire.com/news-release/2021/12/02/2345511/0/en/Industrial-Enzymes-Market-Size-to-Surpass-US-9-7-Bn-by-2030.html>
- González, J. (2017). *ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL EN GUATEMALA Y SU COMERCIALIZACIÓN A NIVEL INTERNACIONAL PERIODO 2013-2015* [Licenciatura]. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Hamdan, N. T., & Jasim, H. M. (2018). Purification and Characterization of Cellulase enzyme from *Trichoderma longibrachiatum* isolated in Iraqi soil. *Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 4(1), 32-41.
- Hernández, D. J., Ferrera, R., & Alarcón, A. (2019). Trichoderma: IMPORTANCIA AGRÍCOLA, BIOTECNOLÓGICA, Y SISTEMAS DE FERMENTACIÓN PARA PRODUCIR BIOMASA Y ENZIMAS DE INTERÉS INDUSTRIAL. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 35(1), 98-112. <https://doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>
- Huisjes, E. H., de Hulster, E., van Dam, J. C., Pronk, J. T., & van Maris, A. J. A. (2012). Galacturonic Acid Inhibits the Growth of *Saccharomyces cerevisiae* on Galactose, Xylose,



- and Arabinose. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), 5052-5059. <https://doi.org/10.1128/AEM.07617-11>
- Idris, A. S. O., Pandey, A., Rao, S. S., & Sukumaran, R. K. (2017). Cellulase production through solid-state tray fermentation, and its use for bioethanol from sorghum stover. *Bioresource Technology*, 242, 265-271.
- Illinois Corn Marketing Board. (2018). *Fuel Ethanol: The Future of Clean Octane, Today*. U.S. Grains Council. <https://grains.org/wp-content/uploads/2018/12/Fuel-Ethanol-Handbook-The-Future-of-Clean-Octane-Today-PDF-2.pdf>
- Kamarudin, F., & Gan, C.-Y. (2016). Molecular structure, chemical properties and biological activities of Pinto bean pod polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 88, 280-287. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.003>
- Kelbert, M., Román, A., Coelho, E., Pereira, F. B., Teixeira, J. A., & Domingues, L. (2016). Simultaneous Saccharification and Fermentation of Hydrothermal Pretreated Lignocellulosic Biomass: Evaluation of Process Performance Under Multiple Stress Conditions. *BioEnergy Research*, 9(3), 750-762. <https://doi.org/10.1007/s12155-016-9722-6>
- Lee, H., Lee, Y. M., Heo, Y. M., Hong, J.-H., Jang, S., Ahn, B. J., Lee, S.-S., & Kim, J.-J. (2017). Optimization of Fungal Enzyme Production by *Trichoderma harzianum* KUC1716 through Surfactant-Induced Morphological Changes. *Mycobiology*, 45(1), 48-51. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2017.45.1.48>
- Lee, H., Lee, Y. M., Heo, Y. M., Lee, H., Hong, J.-H., Jang, S., Min, M., Lee, J., Kim, J. S., Kim, G.-H., & Kim, J.-J. (2015). Optimization of Endoglucanase Production by *Trichoderma harzianum* KUC1716 and Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. *BioResources*, 10(4), 7466-7476. <https://doi.org/10.15376/biores.10.4.7466-7476>
- Levenspiel, O. (1999). *Chemical Reaction Engineering* (Tercera Edición). John Wiley & Sons.
- Libardi, N., Soccol, C. R., Góes, A., Oliveira, J. de, & de Souza, L. P. (2017). Domestic wastewater as substrate for cellulase production by *Trichoderma harzianum*. *Process Biochemistry*, 57, 190-199. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.03.006>
- Liu, Z.-H., Qin, L., Zhu, J.-Q., Li, B.-Z., & Yuan, Y.-J. (2014). Simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded corn stover at high glucan loading and high temperature. *Biotechnology for Biofuels*, 7(167), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s13068-014-0167-x>
- Lodish, H., Berk, A., Lawrence, S., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2003). *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman.
- Luo, X., Liu, J., Zheng, P., Li, M., Zhou, Y., Huang, L., Chen, L., & Shuai, L. (2019). Promoting enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass by inexpensive soy protein. *Biotechnology for Biofuels*, 12(51), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1387-x>
- Madigan, C., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., & Stahl, D. (2015). *Brock. Biología de los microorganismos*. Pearson Education.
- MAGA. (2017). *Informe Situación del frijol a diciembre del año 2017*. [https://www.maga.gob.gt/sitios/diplan/download/informacion\\_del\\_sector/informes\\_de\\_situacion\\_de\\_maiz\\_y\\_frijol/2017/12%20Informe%20Situaci%C3%B3n%20Del%20Frijol%20Negro%20Diciembre%202017.pdf](https://www.maga.gob.gt/sitios/diplan/download/informacion_del_sector/informes_de_situacion_de_maiz_y_frijol/2017/12%20Informe%20Situaci%C3%B3n%20Del%20Frijol%20Negro%20Diciembre%202017.pdf)
- Martínez, M., Mejía, D. P., Contreras, J., & Gallardo, C. (2020). Physicochemical properties of bean pod (*Phaseolus vulgaris*) flour and its potential as a raw material for the food industry. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 73(2), 9179-9187. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v73n2.81564>
- McCabe, W., Smith, J., & Harriot, P. (2007). *Operaciones Unitarias en Ingeniería Química* (Séptima). McGraw-Hill.

- Mejía, J. A., Montoya, R., Cortés, C., & Saavedra, A. (2016). Levaduras Termotolerantes: Aplicaciones Industriales, Estrés Oxidativo y Respuesta Antioxidante. *Información tecnológica*, 27(4), 3-16.
- Mesa, A. M., Calle, J., & Marín, A. (2019). Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp. Y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. *Actualidades Biológicas*, 41(111), 32-44. <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v41n111a02>
- Michel, A. C., Otero, M. A., Martínez, R. D., Rodríguez, N. L., Ariza, R., & Barrios, A. (2008). Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 14(2), 185-191.
- Musoni, M., Destain, J., Thonart, P., Bahama, J.-B., & Delvigne, F. (2015). Bioreactor design and implementation strategies for the cultivation of filamentous fungi and the production of fungal metabolites: From traditional methods to engineered systems. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 19(4), 430-442.
- Mussatto, S., & Teixeira, J. (2010). Lignocellulose as raw material in fermentation processes. En A. Méndez, *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* (Vol. 2, pp. 897-907). Formatex Research Center.
- Namnuch, N., Thammasittirong, A., & Ranong, S. N. (2021). Lignocellulose hydrolytic enzymes production by *Aspergillus flavus* KUB2 using submerged fermentation of sugarcane bagasse waste. *Mycology*, 12(2), 119-127. <https://doi.org/10.1080/21501203.2020.1806938>
- Nanjundaswamy, A., & Okeke, B. C. (2020). Comprehensive Optimization of Culture Conditions for Production of Biomass-Hydrolyzing Enzymes of *Trichoderma* SG2 in Submerged and Solid-State Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 191(1), 444-462. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03258-1>
- Narendranath, N. V., & Power, R. (2005). Relationship between pH and Medium Dissolved Solids in Terms of Growth and Metabolism of *Lactobacilli* and *Saccharomyces cerevisiae* during Ethanol Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2239-2243. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2239-2243.2005>
- Nelson, D., & Cox, M. (2009). *Lehninger Principios de Bioquímica*. Ediciones Omega.
- Nimbalkar, P. R., Khedkar, M. A., Chavan, P. V., & Bankar, S. B. (2017). Biobutanol production using pea pod waste as substrate: Impact of drying on saccharification and fermentation. *Renewable Energy*, 117, 520-529. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.10.079>
- Oh, E. J., & Jin, Y.-S. (2020). Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient fermentation of cellulose. *FEMS Yeast Research*, 20(1), 1-11. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz089>
- Okolie, J. A., Nanda, S., Dalai, A. K., & Kozinski, J. A. (2021). Chemistry and Specialty Industrial Applications of Lignocellulosic Biomass. *Waste and Biomass Valorization*, 12(5), 2145-2169. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01123-0>
- Olofsson, K., Bertilsson, M., & Lidén, G. (2008). A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*, 1(7), 1-14. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-1-7>
- Østby, H., Hansen, L. D., Horn, S. J., Eijsink, V. G. H., & Várnai, A. (2020). Enzymatic processing of lignocellulosic biomass: Principles, recent advances and perspectives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 47(9), 623-657. <https://doi.org/10.1007/s10295-020-02301-8>
- Payne, C. M., Knott, B. C., Mayes, H. B., Hansson, H., Himmel, M. E., Sandgren, M., Ståhlberg, J., & Beckham, G. T. (2015). Fungal Cellulases. *Chemical Reviews*, 115(3), 1308-1448. <https://doi.org/10.1021/cr500351c>
- Qureshi, N., Annous, B. A., Ezeji, T. C., Karcher, P., & Maddox, I. S. (2005). Biofilm reactors for industrial bioconversion processes: Employing potential of enhanced reaction rates. *Microbial Cell Factories*, 4(24), 1-21. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-24>

- Raza, W., Faheem, M., Yousaf, S., Rajer, F. U., & Yameen, M. (2013). Volatile and non-volatile antifungal compounds produced by *Trichoderma harzianum* SQR-T037 suppressed the growth of *Fusarium oxysporum* f. Sp. Niveum. *Science Letters*, 1(1), 21-24.
- Research and Markets. (2021, septiembre 2). *Global Biofuel Enzymes Markets Report 2021: Amylase, Cellulase, Xylanase, Lipase, Protease, lysomax, FermaSure - Forecast to 2026*. <https://www.prnewswire.com/news-releases/global-biofuel-enzymes-markets-report-2021-amylase-cellulase-xylanase-lipase-protease-lysomax-fermasure---forecast-to-2026-301368308.html>
- RFDTV. (2022, enero 19). *Cellulase (CAS 9012-54-8) Market Size 2022 with CAGR of 5.5%, Top Growth Companies: Novozymes, DowDuPont, DSM, and, End-User, SWOT Analysis in Industry 2026*. <https://www.rfdtv.com/story/45679074/cellulase-cas-9012-54-8-market-size-2022-with-cagr-of-55-top-growth-companies-novozymes-dowdupont-dsm-and-end-user-swot-analysis-in-industry-2026>
- Rodríguez, M. D., Castrillo, M. L., Velázquez, J. E., Kramer, G. R., Sedler, C., Zapata, P. D., & Villalba, L. (2017). OBTENCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES A PARTIR DE ASERRÍN DE PINO PRETRATADO SECUENCIALMENTE CON ÁCIDO-BASE. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(2), 317-324. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.02.12>
- Romero, O., Huerta, M., Damián, M. A., Domínguez, F., & Arellano, D. A. (2009). Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(2), 143-151.
- Sajith, S., Priji, P., Sreedevi, S., & Benjamin, S. (2016). An Overview on Fungal Cellulases with an Industrial Perspective. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 06(01), 1-13. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000461>
- Salazar, A., & Gamboa, A. (2013). Importancia de las pectinas en la dinámica de la pared celular durante el desarrollo vegetal. *Revista de educación bioquímica*, 32(2), 67-75.
- Sánchez, J., Martínez, J. L., Segura, E. P., Contreras, J. C., Medina, M. A., Aguilar, C. N., & Iliná, A. (2014). Inmovilización de enzimas lignocelulolíticas en nanopartículas magnéticas. *Química Nova*, 37(3), 504-512. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140085>
- Sanderson, K. (2011). Lignocellulose: A chewy problem. *Nature*, 474(7352), S12-S14. <https://doi.org/10.1038/474S012a>
- Schuster, A., & Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), 787-799. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1>
- Skoog, D., West, D., Holler, J., & Crouch, S. (2015). *Fundamentos de química analítica*. Cengage Learning.
- Stevenson, D. M., & Weimer, P. (2002). Isolation and characterization of a *Trichoderma* strain capable of fermenting cellulose to ethanol. *Applied microbiology and biotechnology*, 59, 721-726. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1027-3>
- Sulyman, A. O., Igunnu, A., & Malomo, S. O. (2020). Isolation, purification and characterization of cellulase produced by *Aspergillus niger* cultured on *Arachis hypogaea* shells. *Heliyon*, 6(12), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05668>
- Upendra, R. S., Pratima, K., Priyanka, S., Jagadish, M. L., & Nandhini, N. J. (2013). Production of Bioethanol from hitherto underutilized agro waste (Field beans/Green Pea pods waste) incorporating zero waste generation technique. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 2(10), 5574-5579.
- Verardi, A., De Bari, I., Ricca, E., & Calabrò, V. (2012). Hydrolysis of lignocellulosic biomass: Current status of processes and technologies and future perspectives. En M. A. Pinheiro (Ed.), *Bioethanol* (pp. 95-122). Intech Open.

- Vimmerstedt, L. J., Bush, B., & Peterson, S. (2012). Ethanol Distribution, Dispensing, and Use: Analysis of a Portion of the Biomass-to-Biofuels Supply Chain Using System Dynamics. *PLOS ONE*, 7(5), 1-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035082>
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberty, E. L., Woo, S. L., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Pascale, A., Ruocco, M., Lanzuise, S., Manganiello, G., & Lorito, M. (2014). Secondary Metabolites Active on Plants and Fungal Pathogens. *The Open Mycology Journal*, 8, 127-139.
- Weiss, N., Börjesson, J., Pedersen, L. S., & Meyer, A. S. (2013). Enzymatic lignocellulose hydrolysis: Improved cellulase productivity by insoluble solids recycling. *Biotechnology for Biofuels*, 6(5), 1-14. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-5>
- Xia, M., Wang, L., Yang, Z., & Chen, H. (2015). A novel digital color analysis method for rapid glucose detection. *Analytical Methods*, 7(16), 6654-6663. <https://doi.org/10.1039/C5AY01233C>
- Zahra, T., Irfan, M., Nadeem, M., Ghazanfar, M., Ahmad, Q., Ali, S., Siddique, F., Yasmeen, Z., & Franco, M. (2020). Cellulase Production by *Trichoderma viride* in Submerged Fermentation using Response Surface Methodology. *Punjab University Journal of Zoology*, 35(2), 223-228. <https://doi.org/10.17582/journal.pujz/2020.35.2.223.228>
- Zhang, Y., Yang, J., Luo, L., Wang, E., Wang, R., Liu, L., Liu, J., & Yuan, H. (2020). Low-Cost Cellulase-Hemicellulase Mixture Secreted by *Trichoderma harzianum* EM0925 with Complete Saccharification Efficacy of Lignocellulose. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 1-18. <https://doi.org/10.3390/ijms21020371>
- Zoghalmi, A., & Paës, G. (2019). Lignocellulosic Biomass: Understanding Recalcitrance and Predicting Hydrolysis. *Frontiers in Chemistry*, 7(874), 1-11. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00874>
- Zuccaro, G., Pirozzi, D., & Yousuf, A. (2020). Lignocellulosic biomass to biodiesel. En A. Yousuf, D. Pirozzi, & F. Sannino (Eds.), *Lignocellulosic Biomass to Liquid Biofuels* (pp. 127-167). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815936-1.00004-6>

## XII. Anexos

### A. Imágenes de la experimentación

Figura 22. Recepción de la vaina de frijol utilizada en el estudio.



Fuente: Propia. Ubicación: Cuarto frío del Laboratorio de Operaciones Unitarias.  
La vaina se recibió en costales.

Figura 23. Apariencia de la vaina de frijol utilizada.



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Operaciones Unitarias.  
Se observa que es curvada y con consistencia rígida y seca.

Figura 24. Medición de humedad de la vaina en balanza de humedad



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

Figura 25. Molienda de la vaina de frijol en molino de martillos



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Operaciones Unitarias.

Figura 26. Harina obtenida luego de la molienda de la vaina de frijol



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Operaciones Unitarias.

Figura 27. Mallas usadas en el análisis granulométrico de la harina obtenida



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Operaciones Unitarias.

Figura 28. Recuperación inicial de la cepa del hongo *Trichoderma harzianum* CBS 130681 en caldo nutritivo



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

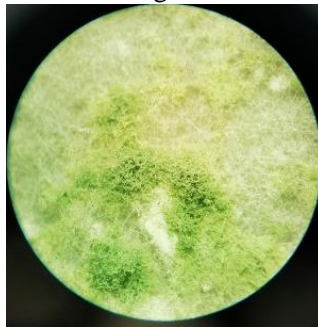
Figura 29. Crecimiento del hongo en placa de agar PDA.



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

Los conidios son de color verde característico del hongo.

Figura 30. Crecimiento del hongo observado en el estereoscopio.

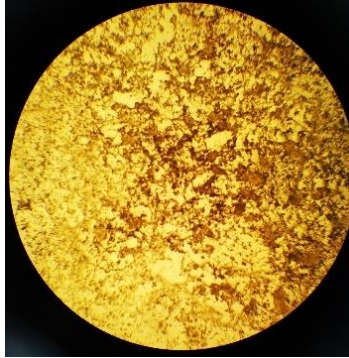


Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

Se pueden observar las hifas que son los filamentos formados y los conidios que son la parte que está en verde.



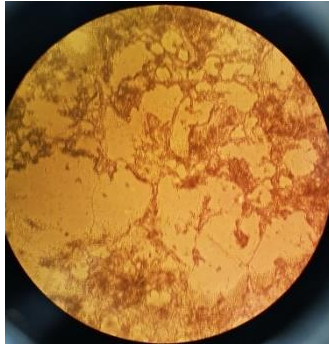
Figura 31. Micrografía del hongo.



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

Se observa con mayor detalle el entramado de hifas. Hay una alta densidad. Se observó con aumento x10 y ocular x10.

Figura 32. Micrografía del micelio y conidios del hongo.



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

Se observan las hifas del hongo y alrededor de ellas hay esferas que corresponden a los conidios con los cuales se reproducen. Se observó con aumento x40 y ocular x10.

Figura 33. Medios de cultivo para el pre-inóculo del hongo antes de la incubación.



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

La fotografía es luego de la inoculación con los conidios. La incubación se dio en agitador rotatorio a 28° C y 150 rpm. La densidad óptica del medio fue de 0.0425.



Figura 34. Medios de cultivo para el pre-inóculo luego del tiempo de incubación.



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

Se observa que hubo un aumento en la turbidez, lo que implica el crecimiento del hongo. La densidad óptica luego de la incubación fue de 0.3566.

Figura 35. Autoclave utilizada para esterilizar los medios de cultivo en las diferentes fermentaciones



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

Figura 36. Preparación de medios de cultivo con vaina de frijol



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Operaciones Unitarias.

Figura 37. Incubación del hongo *T. harzianum* con vaina de frijol para inducir la producción enzimática.



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

La fermentación se llevó a cabo a 28° C y 150 rpm por 1 semana.

Figura 38. Medios de cultivo con vaina de frijol para inducir la producción enzimática.



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

Se observa que hubo un crecimiento del hongo en los medios con una concentración de vaina de 12.5 g/L, mientras que en el control (derecha) no se observó un crecimiento. Lo mismo se dio con las demás concentraciones, pero no se observó tanto crecimiento.

Figura 39. Centrifugadora de 1 L utilizada para obtener los extractos enzimáticos.



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

La centrifugación se realizó a 4000 rpm a 4° C por 25 min.

Figura 40. Extracto enzimático obtenido luego del crecimiento de *Trichoderma harzianum* en medio con vaina de frijol como fuente de carbono.



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

El extracto corresponde al sobrenadante, en el fondo se observa el resto de la vaina y el crecimiento del hongo.

Figura 41. Ensayo de papel filtro para la determinación de la actividad enzimática.



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

La tira de papel filtro fue colocada con el extracto enzimático y buffer de citrato para que se liberara glucosa. La reacción se hizo en un baño térmico.

Figura 42. Tubos de ensayo con las muestras en ebullición luego de la hidrólisis enzimática.



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

Las muestras en las que se liberó una mayor concentración de glucosa reaccionaron con el reactivo DNS para obtener un color oscuro. Los tubos claros tienen una muy baja concentración de azúcares reductores.

Figura 43. Dilución de los tubos de reacción en tubos con 20 mL de agua destilada.



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

La dilución es importante para leer las muestras en el espectrofotómetro. Se observa que hay tubos con una coloración más fuerte y se debe a una mayor presencia de azúcares reductores.

Figura 44. Espectrofotómetro utilizado para medir la absorbancia de las muestras analizadas con el método DNS.



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

Para cuantificar los azúcares reductores se midió la absorbancia a 540 nm luego de la dilución con agua destilada.

Figura 45. Vaina de frijol en el medio de reacción luego de la hidrólisis alcalina.



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Operaciones Unitarias.

Figura 46. Vaina hidrolizada luego de la filtración en manta



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Operaciones Unitarias.

Figura 47. Vaina hidrolizada luego del proceso de secado



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

Figura 48. Preparación del preinóculo de levadura.



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

La levadura utilizada fue levadura comercial Fermipan.

Figura 49. Medios de cultivo usados para la fermentación alcohólica.



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.  
Se utilizaron Erlenmeyers con deflectores y con tapones. Se sellaron con Parafilm.

Figura 50. Centrifugadora utilizada para clarificar muestras para enviar a HPLC



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.  
Las muestras se centrifugaron a 3400 rpm por 10 min.

Figura 51. Biorreactor utilizado en las fermentaciones.



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.  
El equipo es de 1L de volumen efectivo. Se observa el agitador, sensores de temperatura, pH, oxígeno disuelto y la chaqueta de calentamiento.



Figura 52. Equipo complementario del biorreactor usado en las fermentaciones



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

Se observan los recipientes y bombas peristálticas para control de pH, así como del flujo de aire.

Figura 53. Calibración del sensor de oxígeno disuelto.



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

Para su calibración se necesitaba un ambiente libre de oxígeno, por lo que se llenó una bolsa con nitrógeno proveniente del Laboratorio de Operaciones Unitarias.

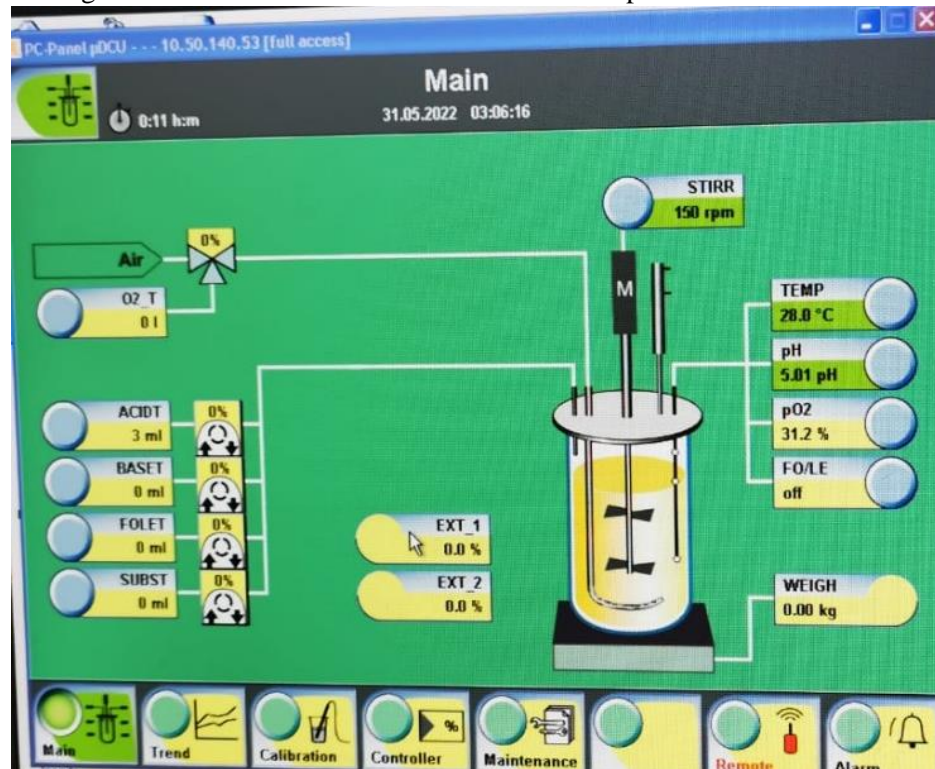
Figura 54. Burbujeo del medio de fermentación al proporcionar aire al reactor.



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

El aire se tuvo que proporcionar manualmente para mantener oxígeno disuelto en el reactor.

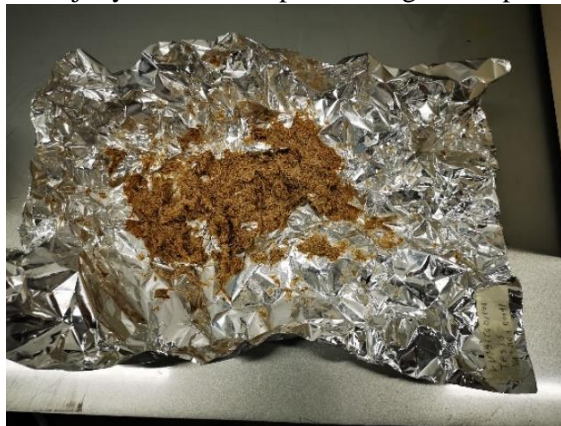
Figura 55. Panel de control del biorreactor en la producción enzimática.



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

Es posible controlar los valores de pH, temperatura, agitación, nivel de antiespumante y oxígeno disuelto. Se observan las condiciones a las que se operó el reactor para la producción de enzimas.

Figura 56. Vaina de frijol y micelio recuperado luego de la producción de enzimas

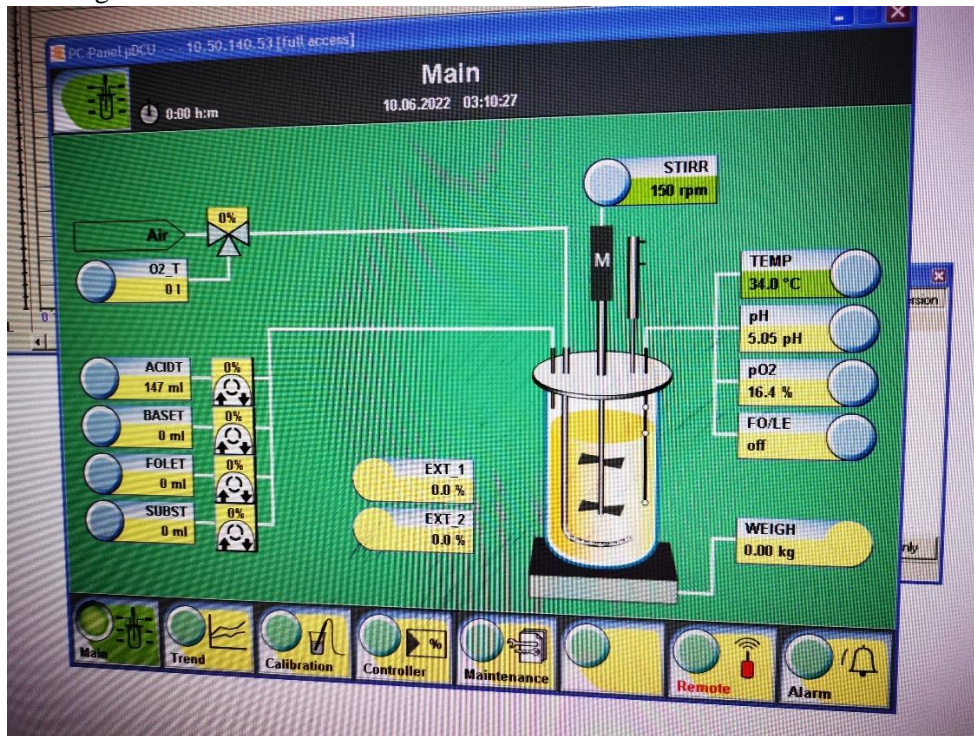


Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

La vaina y el micelio se recuperaron para poder realizar el balance de masa del sistema. No fue posible separarlos.



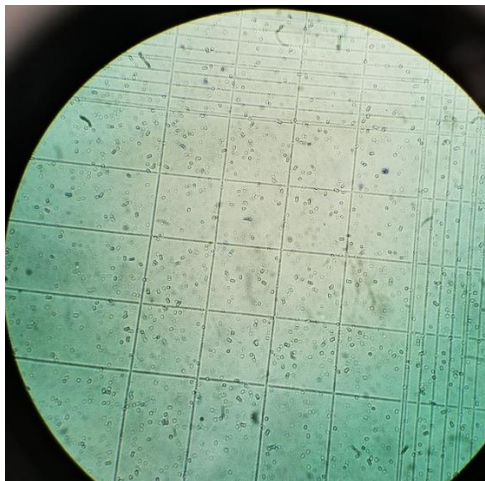
Figura 57. Panel de control del biorreactor en la fermentación alcohólica



Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

Se observan las condiciones a las que se operó el reactor para la producción de enzimas. Se observa que, según el sensor, no se alcanzaron condiciones totalmente anaeróbicas.

Figura 58. Recuento de las levaduras presentes en el biorreactor en la fermentación alcohólica utilizando la cámara de Neubauer

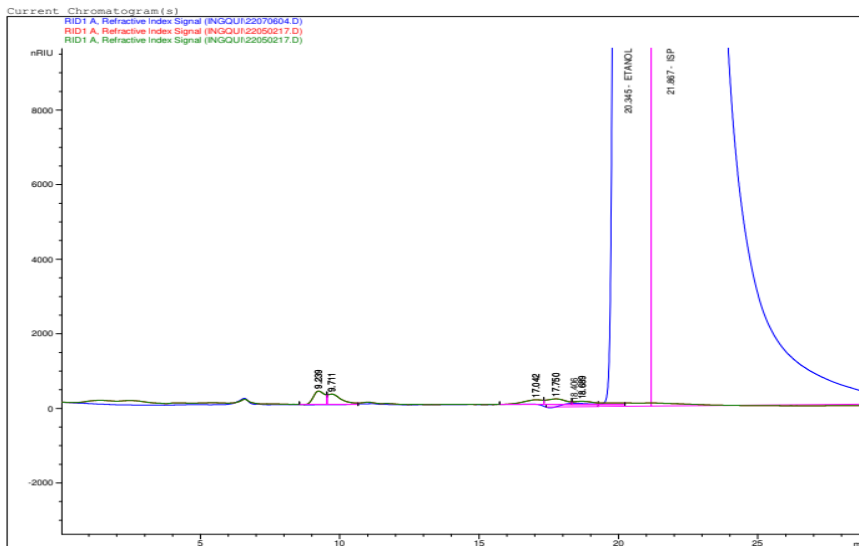


Fuente: Propia. Ubicación: Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

El conteo se realizó únicamente dentro de los 16 cuadros observados para cada una de las 4 secciones de la cámara. La figura corresponde a las 70 horas de fermentación. Se observó con aumento x10 y ocular x10.

En los siguientes cromatogramas se observan resultados para la cuantificación de azúcares y etanol. El tiempo de retención de la sacarosa es de 9.364 min, el de la glucosa es de 10.696 min, el de la fructosa es de 11.567 min y el del etanol es de 20.665 min.

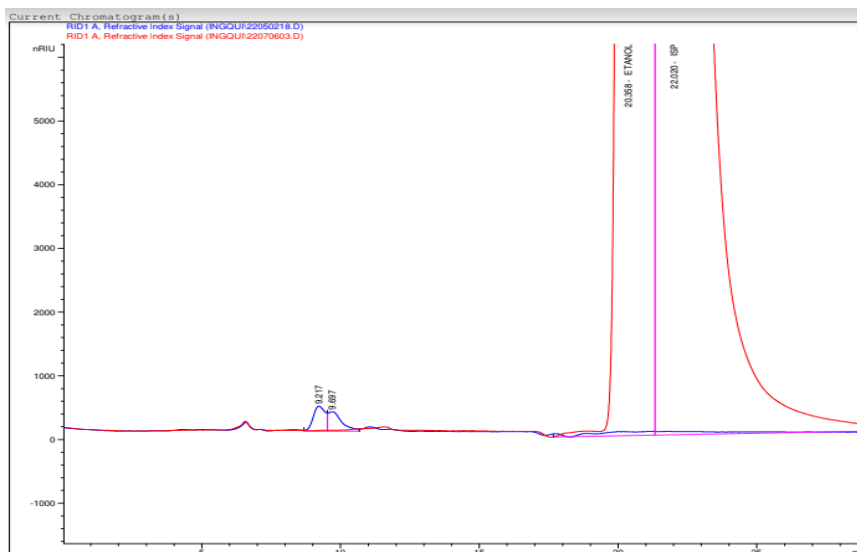
Figura 59. Cromatograma del resultado de la fermentación en el Erlenmeyer 1 con vaina de frijol sin hidrólisis alcalina



Fuente: Encargado del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada. Ubicación: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada.

En el cromatógrafo se analizó la concentración de azúcares y etanol, el cual está sobrepuesto.

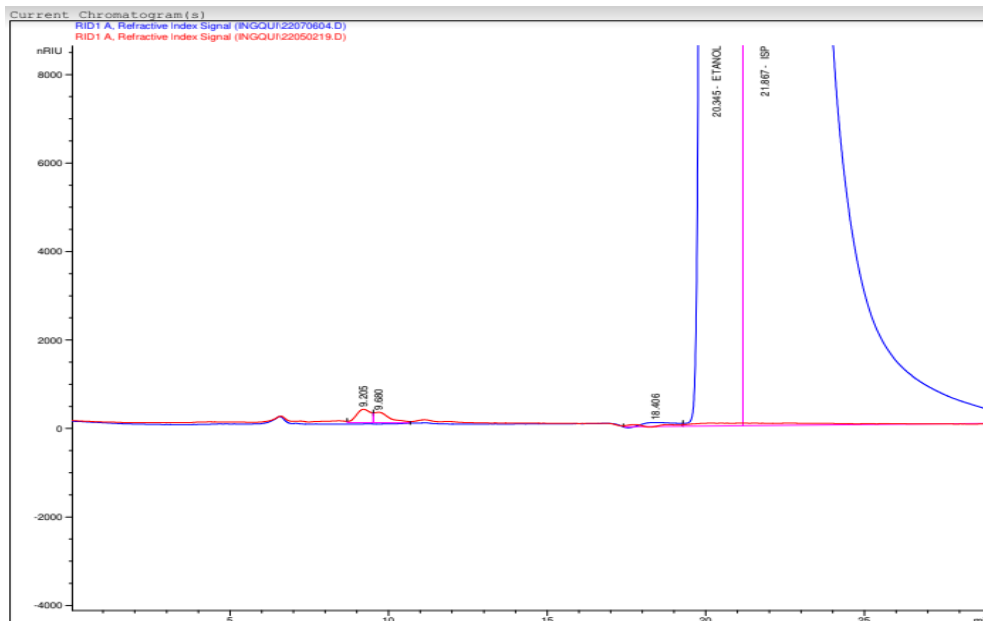
Figura 60. Cromatograma del resultado de la fermentación en el Erlenmeyer 2 con vaina de frijol sin hidrólisis alcalina



Fuente: Encargado del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada. Ubicación: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada.

En el cromatógrafo se analizó la concentración de azúcares y etanol, el cual está sobrepuesto.

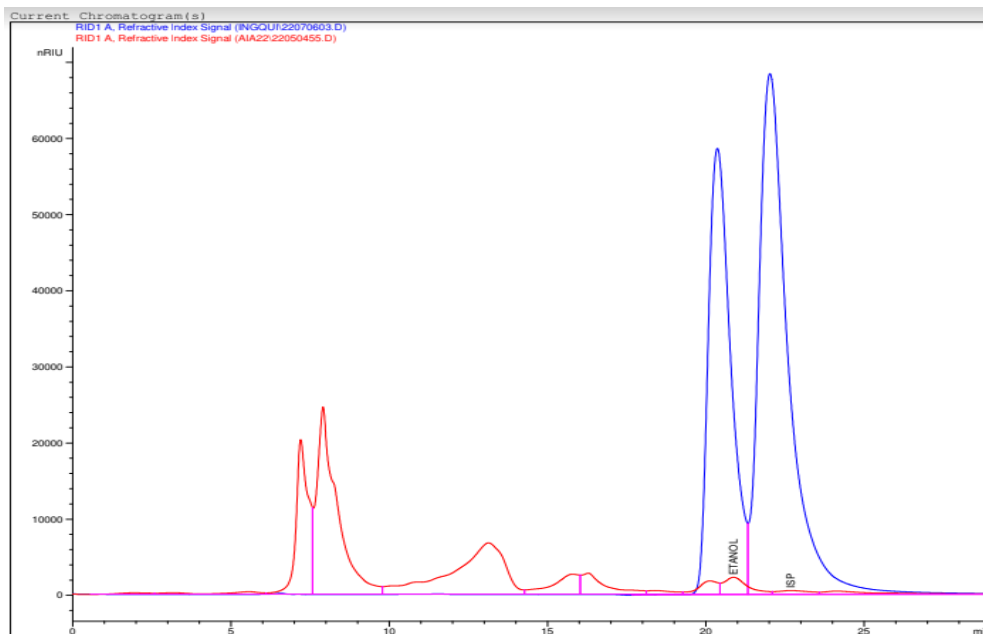
Figura 61. Cromatograma del resultado de la fermentación en el Erlenmeyer 3 con vaina de frijol sin hidrólisis alcalina



Fuente: Encargado del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada. Ubicación: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada.

En el cromatógrafo se analizó la concentración de azúcares y etanol, el cual está sobrepuesto.

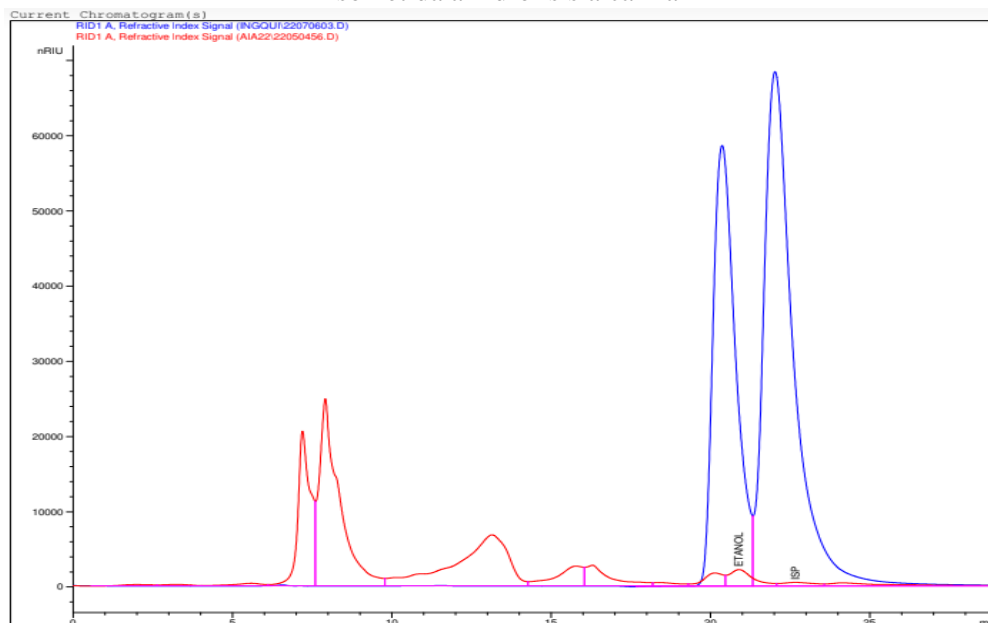
Figura 62. Cromatograma del resultado de la fermentación en el Erlenmeyer 1 con vaina de frijol sometida a hidrólisis alcalina



Fuente: Encargado del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada. Ubicación: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada.

En el cromatógrafo se analizó la concentración de azúcares y etanol, el cual está sobrepuesto.

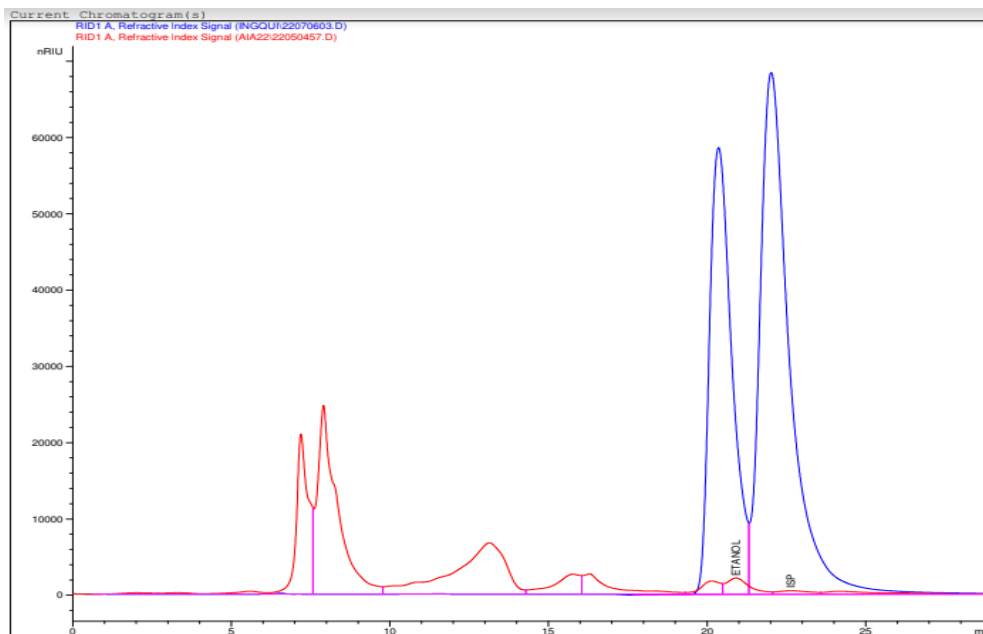
Figura 63. Cromatograma del resultado de la fermentación en el Erlenmeyer 2 con vaina de frijol sometida a hidrólisis alcalina



Fuente: Encargado del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada. Ubicación: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada.

En el cromatógrafo se analizó la concentración de azúcares y etanol, el cual está sobrepuesto.

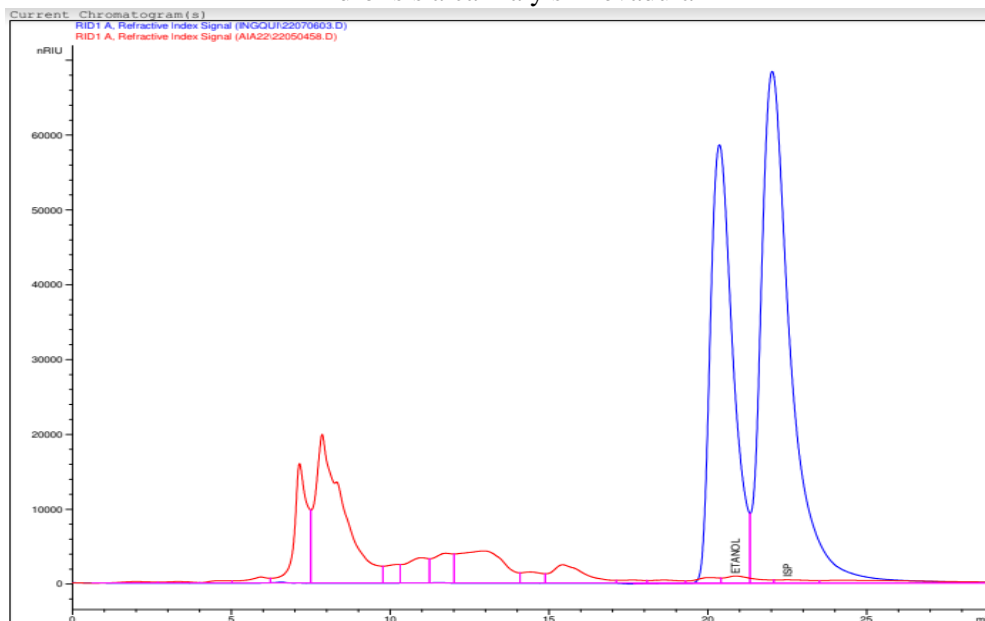
Figura 64. Cromatograma del resultado de la fermentación en el Erlenmeyer 3 con vaina de frijol sometida a hidrólisis alcalina



Fuente: Encargado del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada. Ubicación: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada.

En el cromatógrafo se analizó la concentración de azúcares y etanol, el cual está sobrepuesto.

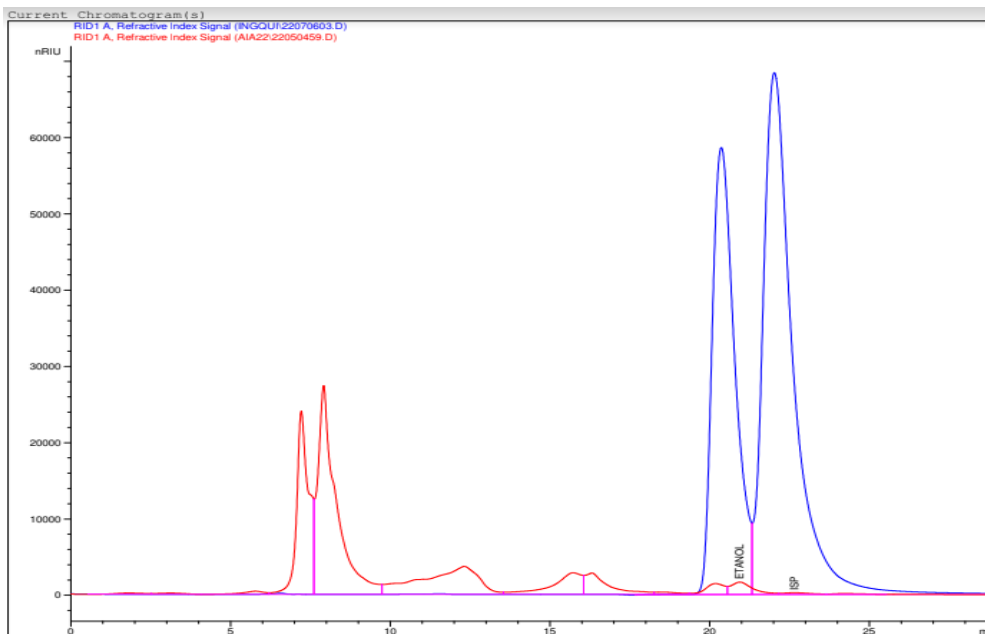
Figura 65. Cromatograma del resultado de la fermentación en el control con vaina de frijol sin hidrólisis alcalina y sin levadura



Fuente: Encargado del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada. Ubicación: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada.

En el cromatógrafo se analizó la concentración de azúcares y etanol, el cual está sobrepuesto.

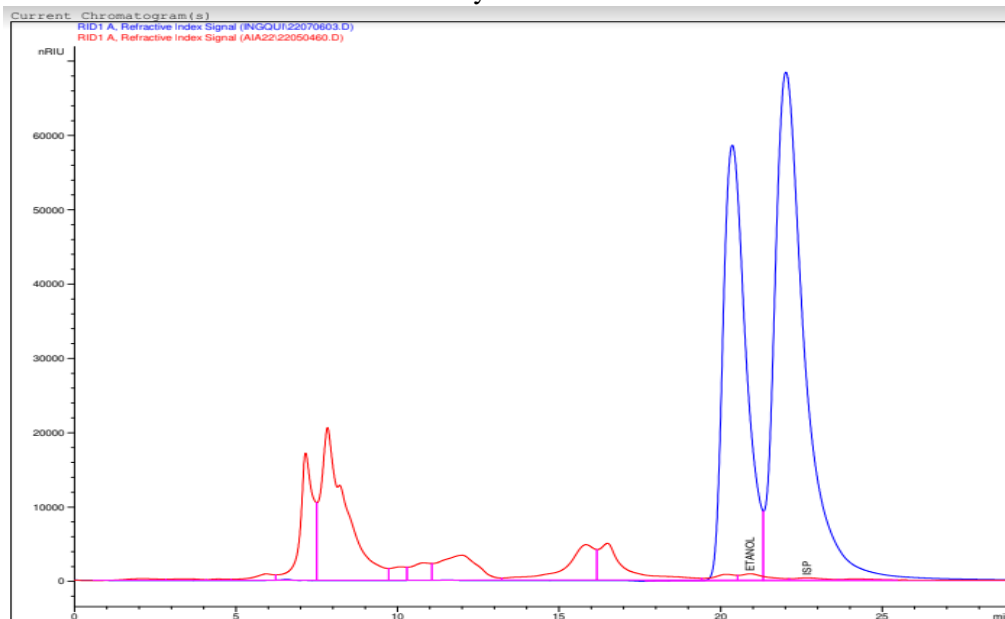
Figura 66. Cromatograma del resultado de la fermentación en el control con vaina de frijol sometida a hidrólisis alcalina sin levadura



Fuente: Encargado del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada. Ubicación: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada.

En el cromatógrafo se analizó la concentración de azúcares y etanol, el cual está sobrepuesto.

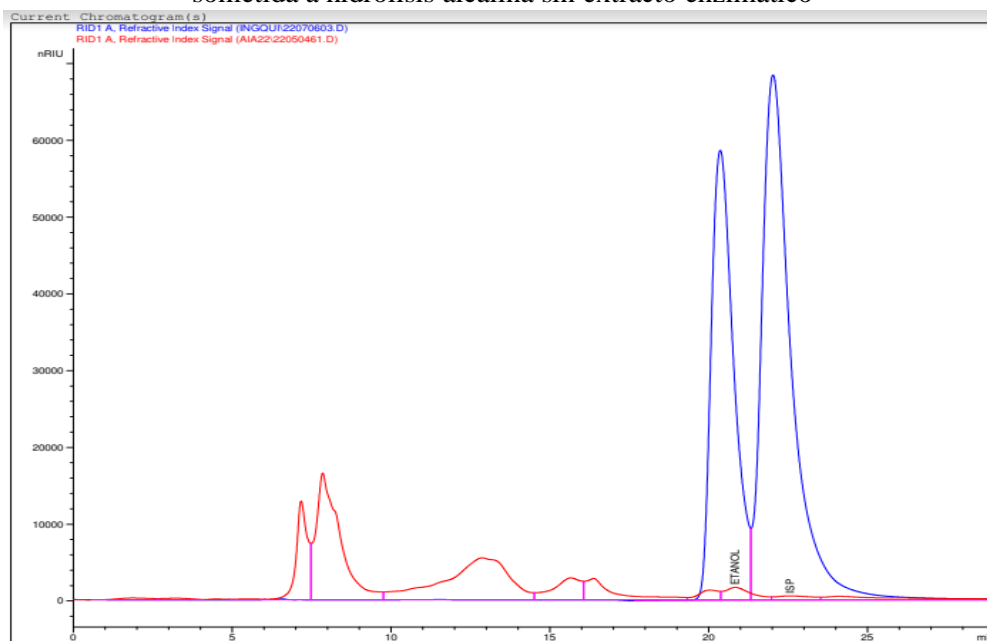
Figura 67. Cromatograma del resultado de la fermentación en el control con vaina de frijol sin hidrólisis alcalina y sin extracto enzimático



Fuente: Encargado del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada. Ubicación: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada.

En el cromatógrafo se analizó la concentración de azúcares y etanol, el cual está sobrepuesto.

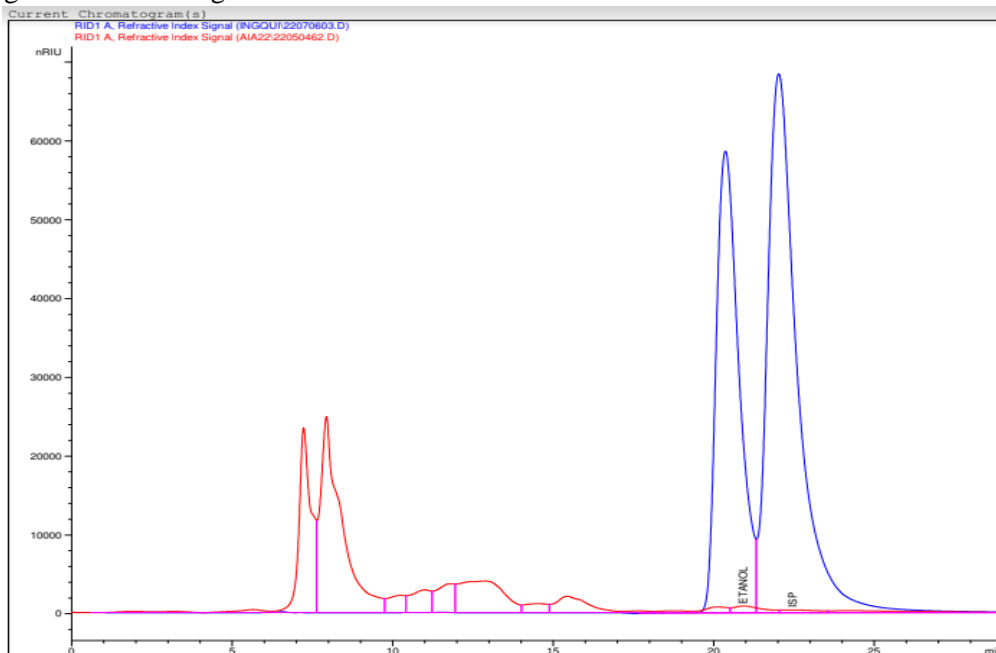
Figura 68. Cromatograma del resultado de la fermentación en el control con vaina de frijol sometida a hidrólisis alcalina sin extracto enzimático



Fuente: Encargado del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada. Ubicación: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada.

En el cromatógrafo se analizó la concentración de azúcares y etanol, el cual está sobrepuesto.

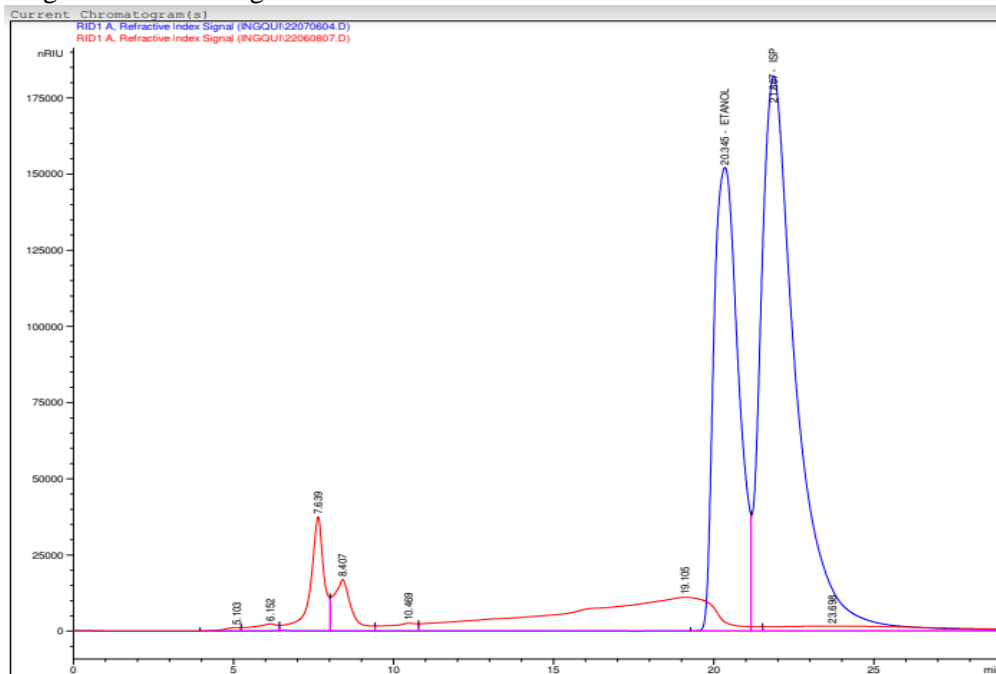
Figura 69. Cromatograma del resultado de la fermentación en el control sin vaina de frijol



Fuente: Encargado del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada. Ubicación: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada.

En el cromatógrafo se analizó la concentración de azúcares y etanol, el cual está sobrepuesto.

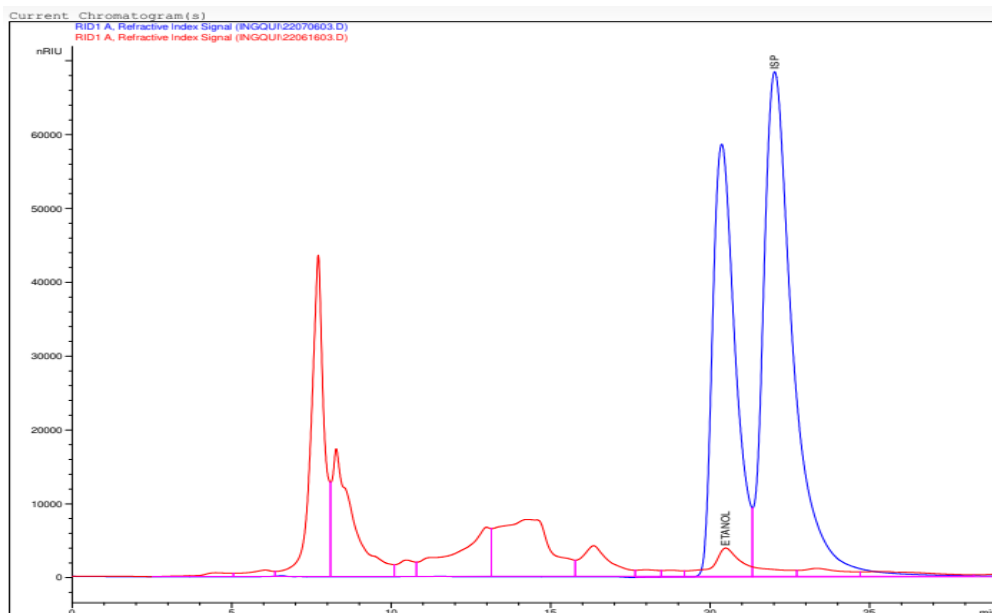
Figura 70. Cromatograma del extracto enzimático obtenido en el biorreactor de 1 L



Fuente: Encargado del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada. Ubicación: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada.

En el cromatógrafo se analizó la concentración de azúcares y etanol, el cual está sobrepuesto.

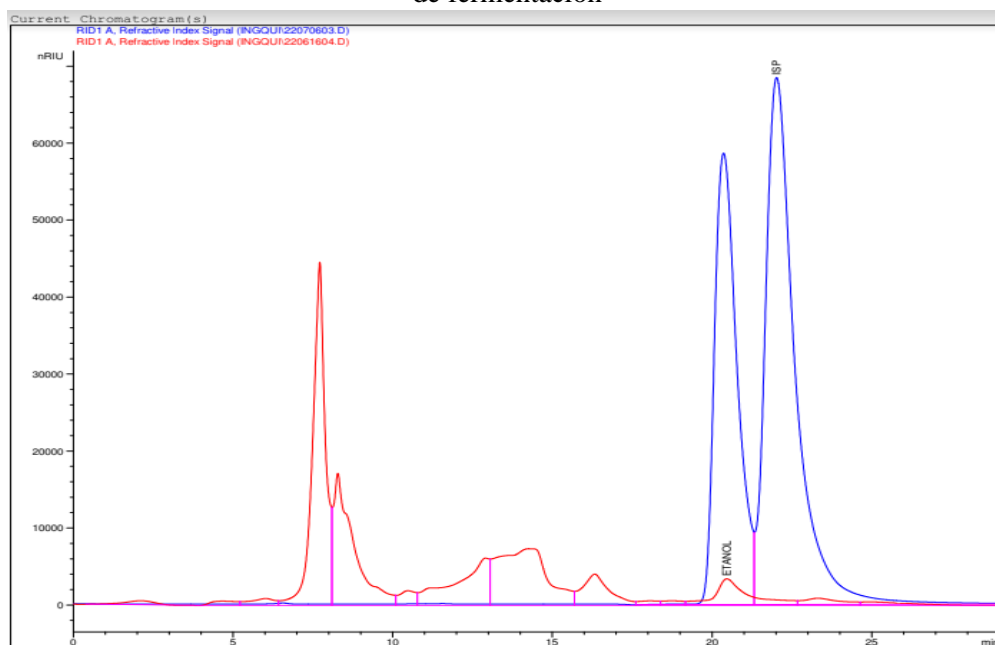
Figura 71. Cromatograma del medio en la fermentación alcohólica en el reactor de 1 L a las 22 h de fermentación



Fuente: Encargado del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada. Ubicación: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada.

En el cromatógrafo se analizó la concentración de azúcares y etanol, el cual está sobrepuesto.

Figura 72. Cromatograma del medio en la fermentación alcohólica en el reactor de 1 L a las 47 h de fermentación

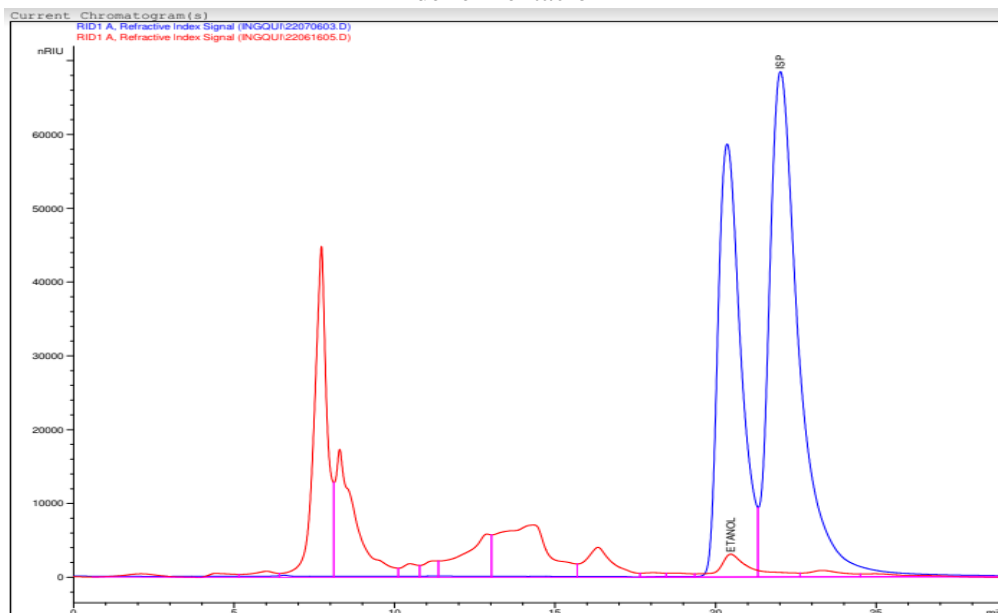


Fuente: Encargado del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada. Ubicación: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada.

En el cromatógrafo se analizó la concentración de azúcares y etanol, el cual está sobrepuesto.



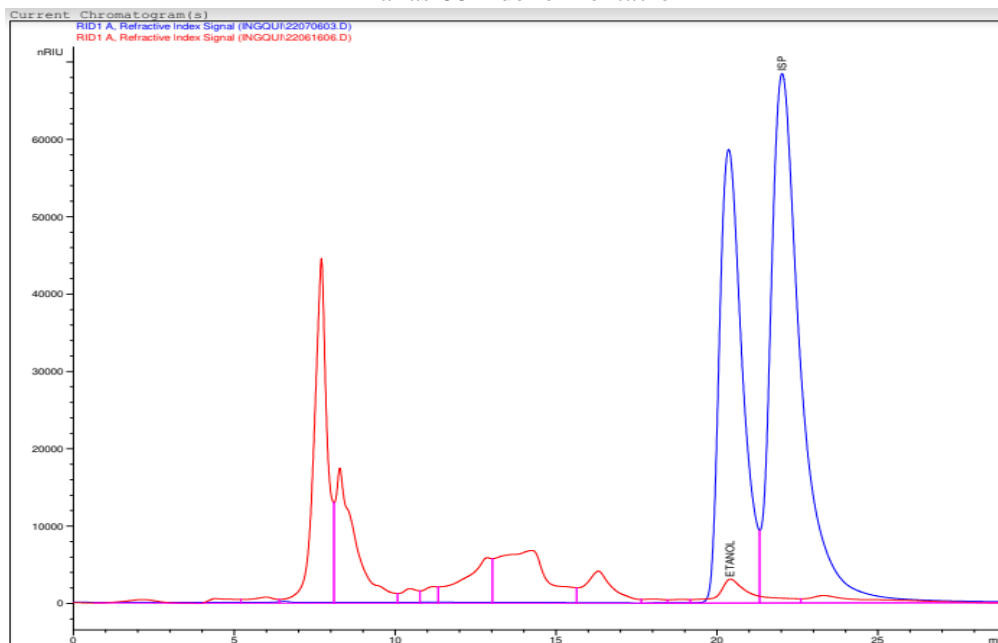
Figura 73. Cromatograma del medio en la fermentación alcohólica en el reactor de 1 L a las 70 h de fermentación



Fuente: Encargado del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada. Ubicación: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada.

En el cromatógrafo se analizó la concentración de azúcares y etanol, el cual está sobrepuesto.

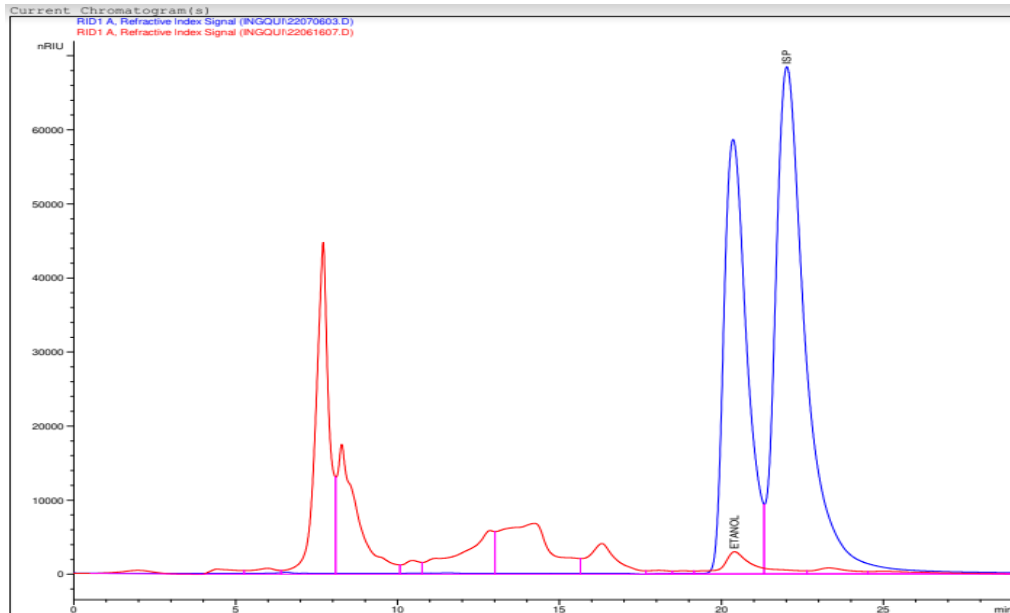
Figura 74. Cromatograma de la muestra 1 del medio en la fermentación alcohólica en el reactor de 1 L a las 88 h de fermentación



Fuente: Encargado del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada. Ubicación: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada.

En el cromatógrafo se analizó la concentración de azúcares y etanol, el cual está sobrepuesto.

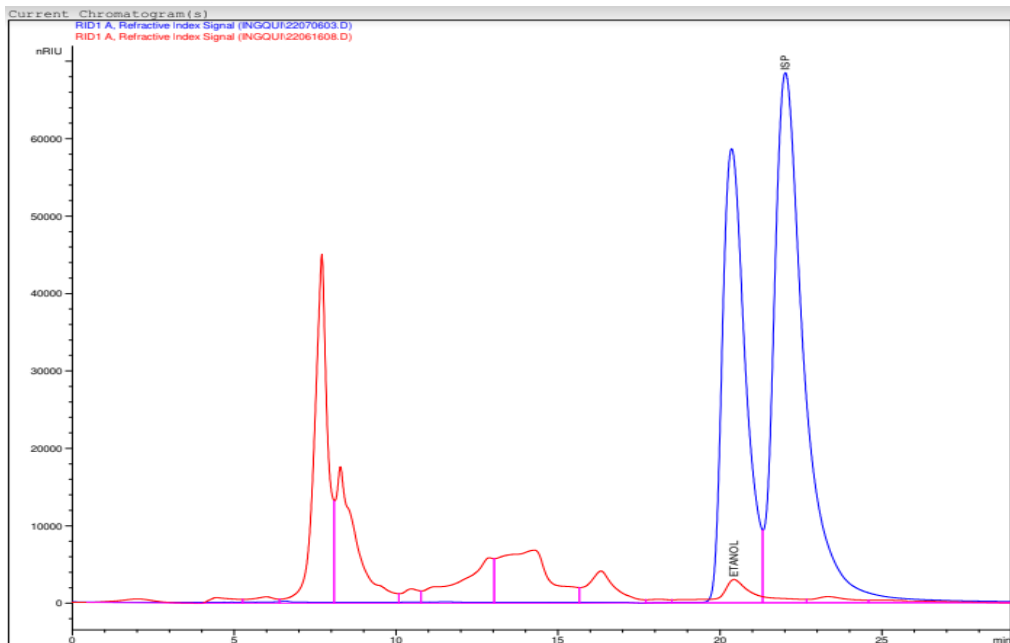
Figura 75. Cromatograma de la muestra 2 del medio en la fermentación alcohólica en el reactor de 1 L a las 88 h de fermentación



Fuente: Encargado del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada. Ubicación: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada.

En el cromatógrafo se analizó la concentración de azúcares y etanol, el cual está sobrepuesto.

Figura 76. Cromatograma de la muestra 3 del medio en la fermentación alcohólica en el reactor de 1 L a las 88 h de fermentación

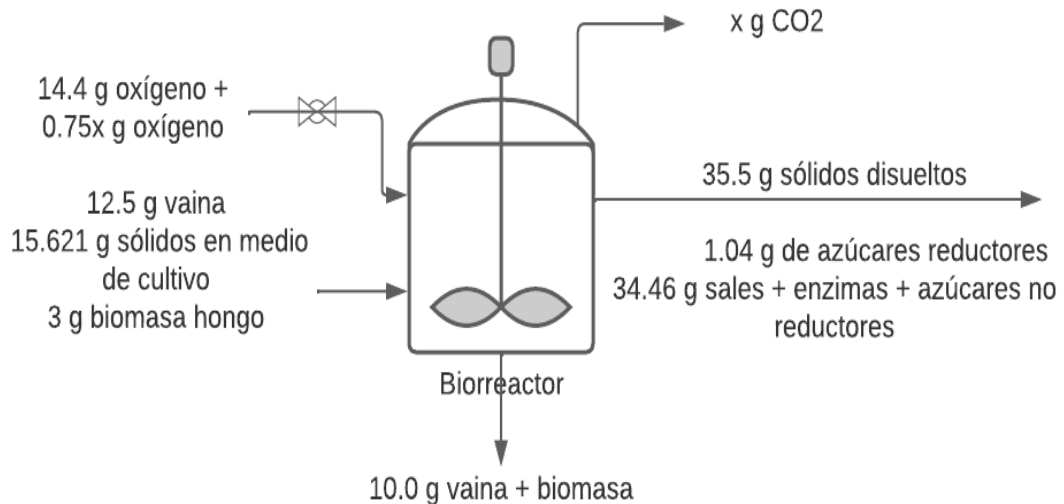


Fuente: Encargado del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada. Ubicación: Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada.

En el cromatógrafo se analizó la concentración de azúcares y etanol, el cual está sobrepuesto.

## B. Diagramas de los sistemas

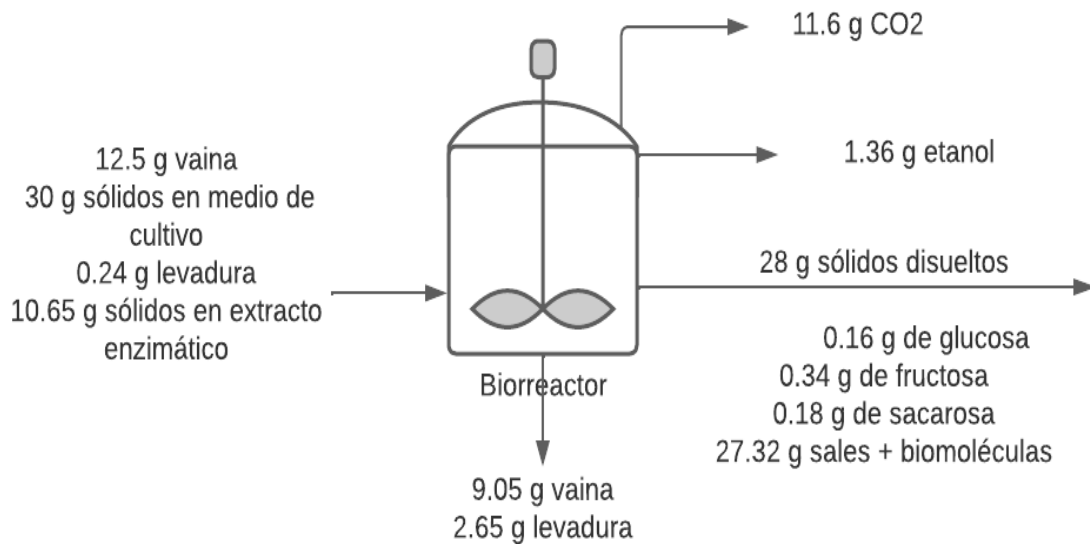
Figura 77. Diagrama del equipo y balance de masa de la producción enzimática con el hongo *T. harzianum* usando vaina de frijol como inductor



Fuente: Elaboración propia.

Los datos para el balance de masa fueron obtenidos del Cuadro 21 de Datos originales, la masa de vaina fue la agregada al medio para el litro de preparación, la de los sólidos corresponde a las sales y nutrientes del medio de cultivo, la biomasa del hongo se calculó con la concentración del inóculo y el volumen agregado (100 mL). Los sólidos disueltos se determinaron con la concentración presente en el Cuadro 8 de Resultados y los azúcares reductores con el blanco enzimático obtenido en la determinación de la actividad enzimática con la Ecuación 6. La diferencia entre los sólidos disueltos y los azúcares reductores corresponden al resto de sales, a las enzimas y otras biomoléculas producidas y a los azúcares no reductores como la sacarosa. El balance de masa entre los sólidos disueltos y la masa seca medida en el aluminio (vainas sobrantes con biomasa fúngica) en la salida fue compensado con 14.4 g de oxígeno en la entrada. Además, se incluyó una cantidad desconocida de dióxido de carbono producido ya que no pudo medirse, para completar el balance se incluyó el oxígeno que sería equivalente a la masa del dióxido de carbono producido. Es importante mencionar que el oxígeno del dióxido de carbono no proviene del oxígeno alimentado, sino del oxígeno en las biomoléculas consumidas.

Figura 78. Diagrama del equipo y balance de masa del sistema de sacarificación y fermentación simultánea usando vaina de frijol como fuente de carbono



Fuente: Elaboración propia.

Los datos para el balance de masa fueron obtenidos del Cuadro 26 de Datos originales y del Cuadro 40 de Datos calculados. La masa de vaina fue la agregada al medio para el litro de preparación, la de los sólidos corresponde a los nutrientes del medio de cultivo (peptona y extracto de levadura), la levadura se calculó con la concentración inicial y final en el medio, los sólidos en el extracto enzimático se calcularon con la concentración de sólidos en el extracto y el volumen agregado (300 mL). El etanol y los azúcares se calcularon con las concentraciones del Cuadro 9 de Resultados. La diferencia entre los sólidos disueltos (Cuadro 40) y en etanol y azúcares corresponde a las sales y nutrientes que quedaron en el medio, así como biomoléculas producidas por las levaduras y el resto de los sólidos del extracto enzimático (incluyendo enzimas). Para ajustar el balance, la masa extra de la entrada corresponde a la masa del dióxido de carbono producido tanto en la reacción para producir etanol como en el mantenimiento celular.

## C. Datos originales

Cuadro 10. Medición de las dimensiones de la vaina de frijol utilizada en el estudio

Muestra	Largo (cm $\pm$ 0.05 cm)	Ancho (cm $\pm$ 0.05 cm)
1	9.5	1.2
2	8.5	1.2
3	11	1.3
4	6	1.2
5	12.5	1.3
6	11.5	1.3
7	11	1.3
8	10.5	1.2

Las dimensiones fueron medidas utilizando una regla de 30 cm.

Cuadro 11. Medición de la humedad inicial de la vaina utilizada en el estudio en porcentaje masa/masa

Muestra	Humedad (% $\pm$ 0.01%)
1	10.98
2	8.91
3	11.31

La humedad fue medida con la balanza de humedad del Laboratorio de Procesos Bioindustriales.

Cuadro 12. Masas obtenidas en el proceso de molienda de la vaina de frijol

Masa	Saco 1 (kg $\pm$ 0.01 kg)	Saco 2 (kg $\pm$ 0.01 kg)
Vaina con saco	3.33	3.40
Bolsa receptora	0.02	0.02
Saco con residuos	0.25	0.32
Bolsa con harina	3.06	3.02

Las masas fueron medidas con una balanza de piso del Laboratorio de Operaciones Unitarias.

Cuadro 13. Masa de la harina que quedó en cada malla del análisis granulométrico

Malla	Masa malla (g $\pm$ 0.1 g)	Masa malla con harina (g $\pm$ 0.1 g)
20	381.9	409.6
30	368.9	394.5
45	330.4	356.9
60	329.7	338.6
80	338	343.6
100	323.1	326.6
Fondo	463.5	465.4

La vaina de frijol molida fue analizada en el equipo de análisis granulométrico del Laboratorio de Operaciones Unitarias y las masas se obtuvieron con una balanza semianalítica. La masa colocada en el equipo fue de  $100 \pm 0.1$  g.

Cuadro 14. Masa y volumen de los reactivos utilizados para preparar los medios de cultivo con vaina de frijol para inducir la producción de enzimas lignocelulolíticas

Componentes	Masa (volumen)		
	Medio de cultivo 1	Medio de cultivo 2	Medio de cultivo 3
Tween 80	0.0100 ± 0.0005 L	0.0100 ± 0.0005 L	0.0100 ± 0.0005 L
Urea	0.3000 ± 0.0001 g	0.3000 ± 0.0001 g	0.3000 ± 0.0001 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0000 ± 0.0001 g	2.0000 ± 0.0001 g	2.0000 ± 0.0001 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.4000 ± 0.0001 g	1.4000 ± 0.0001 g	1.4000 ± 0.0001 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.4000 ± 0.0001 g	0.4000 ± 0.0001 g	0.4000 ± 0.0001 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.3000 ± 0.0001 g	0.3000 ± 0.0001 g	0.3000 ± 0.0001 g
Peptona	1.0000 ± 0.0001 g	1.0000 ± 0.0001 g	1.0000 ± 0.0001 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0050 ± 0.0001 g	0.0050 ± 0.0001 g	0.0050 ± 0.0001 g
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.0016 ± 0.0001 g	0.0016 ± 0.0001 g	0.0016 ± 0.0001 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0014 ± 0.0001 g	0.0014 ± 0.0001 g	0.0014 ± 0.0001 g
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0020 0.0001 g	0.0020 0.0001 g	0.0020 0.0001 g
Harina de vaina de frijol	12.5 ± 0.1 g	25.0 ± 0.1 g	37.5 ± 0.1 g
Ftalato de potasio	10.2110 ± 0.0001 g	10.2110 ± 0.0001 g	10.2110 ± 0.0001 g
Agua destilada	0.90 ± 0.01 L	0.90 ± 0.01 L	0.90 ± 0.01 L

A estos medios de cultivo se les agregaron 100 mL del inóculo para una concentración del 10 % (v/v). Las masas fueron medidas con una balanza analítica, a excepción de la vaina de frijol que fue medida en balanza semianalítica. El volumen fue medido con probetas.

Cuadro 15. Masa de los envases en los cuales se almacenaron los extractos enzimáticos obtenidos luego de la centrifugación y de los beakers con los cuales se determinó el porcentaje de sólidos

Muestra	Masa del envase (g ± 0.1 g)	Masa del envase con extracto (g ± 0.1 g)	Masa del beaker (g ± 0.0001 g)	Masa del beaker con sólidos (g ± 0.0001 g)
Sin vaina	67.1	267.0	32.5123	32.5543
Control 12.5 g/L	66.9	229.3	30.8640	30.9150
Control 25 g/L	66.7	219.3	30.7169	30.7646
Control 37.5 g/L	67.0	212.0	31.5029	31.5567
12.5 g/L-1	66.4	128.2	29.6252	29.6813
25 g/L	66.4	234.0	32.4286	32.4778
37.5 g/L	66.5	213.0	31.5050	31.5572
12.5 g/L-2	66.7	254.7	67.7113	67.7514

12.5 g/L-3	66.4	231.0	52.9677	53.0108
------------	------	-------	---------	---------

La masa del extracto en los envases se midió con una balanza semianalítica, mientras que la masa en los beakers se hizo con una balanza analítica. Los sólidos corresponden a un volumen de extracto de  $2 \pm 0.1$  mL.

Cuadro 16. Absorbancias de los estándares de glucosa usados en la curva de calibración para determinar azúcares reductores

Concentración (mg/0.5 mL)	Absorbancia ( $\pm 0.0001$ )	Absorbancia real ( $\pm 0.0001$ )
0.50	0.0862	0.0960
1.00	0.1283	0.1381
1.65	0.1789	0.1887
2.50	0.3105	0.3203
3.35	0.4457	0.4555
5.00	0.6326	0.6424

La absorbancia real se obtuvo al restarle el blanco de -0.0098 a la absorbancia medida, el cual corresponde a un medio de reacción sin azúcares reductores. Las mediciones se hicieron a 540 nm.

Cuadro 17. Absorbancias de las muestras analizadas en la determinación de la actividad enzimática con el ensayo de papel filtro

Muestra	Absorbancia ( $\pm 0.0001$ )	Blanco enzimático ( $\pm 0.0001$ )	Absorbancia real ( $\pm 0.0002$ )
Sin vaina	0.0375	0.0424	-0.0049
Sin vaina 1:5	0.0181	0.0220	-0.0039
Control 12.5 g/L	0.0888	0.0810	0.0078
Control 12.5 g/L 1:5	0.0728	0.0605	0.0123
Control 25 g/L	0.0862	0.0412	0.0450
Control 25 g/L 1:5	0.0207	0.0210	-0.0003
Control 37.5 g/L	0.1023	0.0963	0.0060
Control 37.5 g/L 1:5	0.0297	0.0196	0.0101
12.5 g/L-1 a)	0.2648	0.0591	0.2057
12.5 g/L-1 1:5 a)	0.0320	-0.0079	0.0399
12.5 g/L-1 b)	0.3135	0.0836	0.2299
12.5 g/L-1 1:5 b)	0.0899	0.0188	0.0711
12.5 g/L-1 c)	0.2961	0.0821	0.2140
12.5 g/L-1 1:5 c)	0.0847	0.0198	0.0649
25 g/L	0.0393	0.0204	0.0189
25 g/L 1:5	-0.0018	-0.0080	0.0062
37.5 g/L	0.0515	0.0448	0.0067
37.5 g/L 1:5	-0.0027	-0.0045	0.0018
12.5 g/L-2	0.1349	0.0835	0.0514
12.5 g/L-2 1:5	0.0770	0.0716	0.0054
12.5 g/L-3	0.1934	0.1338	0.0596
12.5 g/L-3 1:5	0.0766	0.0617	0.0149

Las absorbancias se muestran luego de haberles restado el blanco de -0.0098. Las mediciones se hicieron a 540 nm. Las muestras corresponden a los diferentes medios de cultivo en los que se indujo la producción enzimática. El medio sin vaina es un control sin vaina de frijol, en los controles no se agregó el inóculo con el hongo y el resto corresponde a las concentraciones de vaina utilizada. El 1:5 indica que se realizó una dilución 1:5 del extracto enzimático. Para evaluar la variabilidad del método se analizó la actividad enzimática en 3 muestras del mismo extracto (12.5 g/L-1 a), b), c)). Las muestras 12.5 g/L-2, 3 corresponden a extractos que se tuvieron que volver a obtener por el derrame del primero. La absorbancia real se obtuvo al restar la absorbancia del blanco enzimático, que corresponde a la del extracto, de la absorbancia del extracto que había hidrolizado el papel filtro.

Cuadro 18. Absorbancias de las muestras luego de diferentes tiempos en la hidrólisis enzimática de la vaina de frijol

Tiempo (h ± 0.05 h)	Absorbancia (± 0.0001)							
	Vaina sin hidrolizar				Vaina con hidrólisis alcalina			
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Curva	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Curva
1	-	-	-	0.1067	-	-	-	0.0730
2	0.2264	0.1078	0.1203	-	0.3421	0.0789	0.0861	-
4	-	-	-	0.1082	-	-	-	0.0683
24	0.4256	0.1129	0.1615	0.1106	0.5185	0.0664	0.1104	0.0730
26	-	-	-	0.1184	-	-	-	0.0833
48	0.4386	0.1050	0.1543	-	0.5775	0.0815	0.0948	-
50	0.4530	0.1028	0.1532	-	0.4778	0.0735	0.0976	-

Las absorbancias se muestran luego de haberles restado el blanco de -0.0098. Estas también fueron medidas a 540 nm para determinar la concentración de azúcares reductores liberados de la vaina de frijol en la hidrólisis enzimática. Se realizó un triplicado para ciertos tiempos, así como se hizo una medición para otros instantes de tiempo con un extracto de menor actividad.

Cuadro 19. Señal del área del índice de refracción por el tiempo de los estándares utilizados para elaborar las curvas de calibración de etanol y azúcares a diferentes concentraciones en HPLC

Compuesto	Concentración % (m/v)	Área (nRIU*s)
Sacarosa	1.010	6.37144E+06
	2.021	8.99935E+06
	3.031	1.18658E+07
	4.042	1.41114E+07
	5.052	1.96619E+07
Glucosa	1.010	7.43189E+06
	2.020	8.66545E+06
	3.030	1.37261E+07
	4.041	1.35622E+07
	5.051	2.23785E+07



	1.011	7.13550E+06
	2.022	1.23314E+07
Fructosa	3.033	1.33104E+07
	4.045	1.93468E+07
	5.056	2.29488E+07
	1.002	3.51178E+06
	2.004	4.36976E+06
Etanol	3.006	5.73758E+06
	4.008	7.03738E+06
	5.010	1.06244E+07

Los datos fueron enviados por la persona encargada del Laboratorio de Instrumentación de Química Avanzada, quien se encarga de operar el equipo. Las muestras se corrieron en una columna Hyplex H.

Cuadro 20. Señal del área del índice de refracción por el tiempo de las muestras analizadas en HPLC para la determinación de etanol, glucosa y fructosa en la fermentación en Erlenmeyers

Muestra	Área glucosa (nRIU*s)	Área fructosa (nRIU*s)	Área etanol (nRIU*s)
VN – 1	9.18981E+04	0.00000E+00	1.38646E+05
VN – 2	8.77209E+04	0.00000E+00	1.24580E+05
VN – 3	8.77209E+04	0.00000E+00	1.18552E+05
VH – 1	0.00000E+00	7.79215E+05	1.18552E+05
VH – 2	0.00000E+00	7.82E+05	1.12524E+05
VH – 3	0.00000E+00	7.74158E+05	1.08505E+05
VN sin levadura	1.67088E+05	0.00000E+00	6.63087E+04
VH sin levadura	0.00000E+00	0.00000E+00	7.83648E+04
VN sin enzimas	1.00253E+05	0.00000E+00	4.82245E+04
VH sin enzimas	0.00000E+00	7.76332E+05	9.64490E+04
Sin vaina	1.25316E+05	1.42533E+05	5.22432E+04

Los datos fueron enviados por la persona encargada del Laboratorio de Instrumentación de Química Avanzada, quien se encarga de operar el equipo. Las muestras se corrieron en una columna Hyplex H. VN corresponde a la vaina de frijol sin hidrólisis alcalina. VH corresponde a la vaina de frijol sometida a hidrólisis alcalina. Se hizo un triplicado de ambos. Se prepararon controles de los medios sin levadura, sin extracto enzimático y uno sin vaina, pero con levaduras y extracto enzimático.

Cuadro 21. Masas del extracto enzimático, sólidos disueltos, vaina y biomasa fúngica de la producción enzimática en el biorreactor de 1 L

Recipiente	Masa del recipiente (g)	Masa del recipiente con muestra (g)
Beaker inóculo	32.424 ± 0.001 g	32.454 ± 0.001 g
Envase 1	66.2 ± 0.1	504.6 ± 0.1
Envase 2	66.1 ± 0.1	492.4 ± 0.1
Beaker sólidos	32.353 ± 0.001	32.424 ± 0.001
Aluminio	5.0 ± 0.1	15.0 ± 0.1

La masa del extracto en los envases se midió con una balanza semianalítica al igual que la masa de la vaina residual y la biomasa fúngica en aluminio, mientras que la masa en los beakers se midió con una balanza analítica para determinar la masa del inóculo agregado y los sólidos disueltos del extracto. El inóculo corresponde a un volumen de  $1 \pm 0.1$  mL y los sólidos corresponden a un volumen de extracto de  $2 \pm 0.1$  mL.

Cuadro 22. Absorbancias de las muestras del extracto enzimático obtenido del biorreactor en la determinación de la actividad enzimática con el ensayo de papel filtro

Muestra	Absorbancia ( $\pm 0.0001$ )	Blanco enzimático ( $\pm 0.0001$ )	Absorbancia real ( $\pm 0.0002$ )
1	0.2116	0.0778	0.1338
1 - 1:5	0.0846	0.0598	0.0248
2	0.2108	0.0778	0.1330
2 - 1:5	0.0843	0.0608	0.0235
3	0.2117	0.0777	0.1340
3 - 1:5	0.0848	0.0603	0.0245

Las absorbancias se muestran luego de haberles restado el blanco de -0.0098. Las mediciones se hicieron a 540 nm. El 1:5 indica que se realizó una dilución 1:5 del extracto enzimático. La absorbancia real se obtuvo al restar la absorbancia del blanco enzimático, que corresponde a la del extracto, de la absorbancia del extracto que había hidrolizado el papel filtro.

Cuadro 23. Conteo de las levaduras en el biorreactor durante la fermentación alcohólica usando la cámara de Neubauer

Tiempo (h $\pm 0.05$ h)	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4	
	Viabiles	No viabiles	Viabiles	No viabiles	Viabiles	No Viabiles	Viabiles	No Viabiles
Inóculo inicial	1917	68	2277	45	3345	60	3132	47
0	99	1	102	2	120	2	150	3
22	140	11	121	1	187	4	188	3
47	406	24	384	6	437	27	557	19
70	1104	4	1130	8	1004	5	900	2
88	1020	5	1287	3	1363	4	1577	7

Las levaduras fueron contadas en los cuadrantes de la cámara de Neubauer luego de teñirlas con azul de metileno al 1 %. El conteo se hizo en un microscopio.

Cuadro 24. Datos utilizados para calcular la concentración de las levaduras en peso seco en el inóculo inicial

Variable	Valor
Volumen del inóculo	$11.5 \pm 0.1$ mL
Masa del tubo vacío	$7.167 \pm 0.001$ g
Masa del tubo con pellet seco	$7.229 \pm 0.001$ g

El volumen del inóculo se colocó dentro de un tubo para centrifuga y se centrifugó para obtener el pellet de levaduras, este se secó en un secador a  $60^\circ$  C para tener el peso seco. Las masas se midieron con una balanza analítica.

Cuadro 25. Señal del área del índice de refracción por el tiempo de las muestras analizadas en HPLC para la determinación de etanol, sacarosa, glucosa y fructosa en la fermentación alcohólica en el biorreactor de 1 L

Tiempo (h ± 0.05h)	Área sacarosa (nRIU*s)	Área glucosa (nRIU*s)	Área fructosa (nRIU*s)	Área etanol (nRIU*s)
22	8.88667E+04	8.35438E+04	3.79559E+05	2.17010E+05
47	7.72754E+04	6.68350E+04	3.36858E+05	2.27057E+05
70	7.34116E+04	6.68350E+04	1.23357E+05	2.33085E+05
88-1	6.95479E+04	6.68350E+04	1.18612E+05	2.63226E+05
88-2	6.95479E+04	6.68350E+04	2.65691E+05	2.39113E+05
88-3	6.95479E+04	6.68350E+04	9.96342E+04	3.15469E+05

Los datos fueron enviados por la persona encargada del Laboratorio de Instrumentación de Química Avanzada, quien se encarga de operar el equipo. Las muestras se corrieron en una columna Hyplex H. Las muestras corresponden a diferentes tiempos en la fermentación. Se analizó un triplicado de las concentraciones finales.

Cuadro 26. Masas de la vaina y biomasa en el biorreactor de 1 L en la sacarificación y fermentación simultánea

Recipiente	Masa del recipiente (g)	Masa del recipiente con muestra (g)
Aluminio 1	4.3 ± 0.1	16.0 ± 0.1
Aluminio 2	0.820 ± 0.001	0.876 ± 0.001
Tubo de ensayo	14.3 ± 0.1	26.2 ± 0.1

La masa de la vaina residual y la biomasa de levaduras en el aluminio 1 se midió con una balanza semianalítica al igual que la masa del medio de cultivo en el tubo de ensayo, mientras que la masa en el aluminio 2 se midió con una balanza analítica para determinar la masa de los sólidos disueltos. El medio en el tubo corresponde a un volumen de 12.1 ± 0.1 mL y los sólidos corresponden a un volumen de medio de 2 ± 0.1 mL.

## D. Cálculos de muestra

Ecuación 1. Masa retenida en las mallas utilizadas en el análisis granulométrico de la harina de vaina de frijol

$$M = m1 - m2 = 409.6 \text{ g} - 381.9 \text{ g} = 27.7 \text{ g}$$

M = masa retenida en la malla del análisis granulométrico

m1 = masa de la malla con la harina

m2 = masa de la malla limpia

Los datos se obtuvieron del Cuadro 13 de la sección de Datos originales. El resultado obtenido se encuentra en la sección de Datos calculados en el Cuadro 27. El cálculo se realizó para determinar la masa de harina retenida en la primera malla del análisis granulométrico. El mismo cálculo se utilizó para el resto de las mallas.

Ecuación 2. Porcentaje de masa de harina que pasó en las mallas del análisis granulométrico

1.  $P1 = 100 \% - M1 = 100 \% - 27.78 \% = 72.22 \%$
2.  $P2 = P1 - M2 = 72.22 \% - 25.68 \% = 46.54 \%$

P1 = porcentaje de masa que pasó en la malla 1

M1 = porcentaje de masa retenida en la malla 1

P2 = porcentaje de masa que pasó en la malla 2

M2 = porcentaje de masa retenida en la malla 2

Los datos se obtuvieron del Cuadro 27 de la sección de Datos calculados. El resultado obtenido se encuentra en la sección de Datos calculados en el Cuadro 28. El cálculo se realizó para determinar la masa de harina que pasó en las mallas del análisis granulométrico. El cálculo a) se utilizó para la primera malla, el cálculo b) se utilizó para la segunda malla y para el resto de las mallas.

Ecuación 3. Concentración de los reactivos en el medio de cultivo usado para inducir la producción de enzimas usando vaina de frijol.

$$C = \frac{m}{v} = \frac{0.3000 \text{ g}}{1.00 \text{ L}} = 0.300 \text{ g/L}$$

C = concentración del reactivo en el medio de cultivo

m = masa del reactivo utilizado

v = volumen final del medio de cultivo

Los datos se obtuvieron del Cuadro 14 de la sección de Datos originales. El resultado obtenido se encuentra en la sección de Resultados en el Cuadro 2. El cálculo se realizó para determinar la concentración de los reactivos utilizados en el medio de cultivo inductor de la producción enzimática. El mismo cálculo se utilizó para el resto de los reactivos y de los medios. Las concentraciones bajas se convirtieron a mg/L al multiplicar el resultado por 1000.

Ecuación 4. Masa del extracto enzimático obtenido

$$M = m1 - m2 = 267.0 \text{ g} - 67.1 \text{ g} = 199.9 \text{ g}$$

M = masa del extracto enzimático obtenido

m1 = masa del envase con el extracto

m2 = masa del envase seco y vacío.

Los datos se obtuvieron del Cuadro 15 de la sección de Datos originales. El resultado obtenido se encuentra en la sección de Resultados en el Cuadro 3. El cálculo se realizó para determinar la masa del extracto enzimático correspondiente al control sin vaina de frijol. El mismo cálculo se utilizó para el resto de los extractos, incluido el del biorreactor.

Ecuación 5. Concentración de sólidos en el extracto obtenido

$$C = \frac{m1 - m2}{v} = \frac{32.5543 \text{ g} - 32.5123 \text{ g}}{0.002 \text{ L}} = 21.0 \text{ g/L}$$

C = concentración de sólidos en el extracto

m1 = masa del beaker con sólidos

m2 = masa del beaker seco y vacío

v = volumen del extracto colocado en el beaker para introducirlo en el secador

Los datos se obtuvieron del Cuadro 15 de la sección de Datos originales. El resultado obtenido se encuentra en la sección de Resultados en el Cuadro 3. El cálculo se realizó para determinar la concentración de sólidos en el extracto enzimático correspondiente al control sin vaina de frijol. El mismo cálculo se utilizó para el resto de los extractos, incluido el del biorreactor.

Ecuación 6. Concentración de glucosa liberada del papel filtro en la determinación de la actividad enzimática

$$C = \frac{A - b}{m} = \frac{0.2057 - 0.0121}{0.1263 (0.5 \text{ mL/mg})} = 1.533 \frac{\text{mg}}{0.5 \text{ mL}}$$

C = concentración de glucosa liberada del papel filtro o de la vaina de frijol

A = absorbancia real

b = intercepto de la curva de calibración de azúcares reductores en forma de glucosa

m = pendiente de la curva de calibración de azúcares reductores en forma de glucosa

Los datos se obtuvieron del Cuadro 17 de la sección de Datos originales y del Cuadro 29 de Datos calculados. El resultado obtenido se encuentra en la sección de Datos calculados en el Cuadro 30. El cálculo se realizó para determinar la concentración de la glucosa liberada en el ensayo de papel filtro para la determinación de la actividad enzimática de la muestra 12.5 g/L-1 a). El mismo cálculo se utilizó para el resto de las muestras, incluidas las del biorreactor y para la determinación de azúcares reductores en forma de glucosa en la hidrólisis enzimática de la vaina de frijol.

Ecuación 7. Actividad enzimática de las celulasas producidas en unidades de papel filtro

Esta unidad se basa en la unidad internacional IU que corresponde a la liberación de 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  de sustrato convertido. Como se libera glucosa corresponde a 0.18 mg/min y usando una cantidad crítica de glucosa de 2 mg, 0.5 mL de enzima y una reacción de 60 minutos (Ghose, 1987):

$$2 \text{ mg glucosa} = \frac{2 \mu\text{mol}}{0.18 * 0.5 \text{ mL} * 60\text{min}} = 0.37 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} * \text{mL}} = 0.37 \frac{\text{IU}}{\text{mL}}$$

$$\text{FPU} = \frac{0.37}{C} = \frac{0.37 \text{ U/mL}}{1.285 (\text{mL/mL})} = 0.288 \text{ FPU/mL}$$

FPU = actividad enzimática en unidades de papel filtro

C = concentración de enzima que libera 2 mg de glucosa

Los datos se obtuvieron del Cuadro 30 de la sección de Datos calculados. El resultado obtenido se encuentra en la sección de Resultados en el Cuadro 4. El cálculo se realizó para determinar la actividad enzimática de las celulasas producidas utilizando el ensayo de papel filtro en la muestra 12.5 g/L-1 a). El mismo cálculo se utilizó para el resto de las muestras, incluidas las del biorreactor.

Ecuación 8. Actividad enzimática de las celulasas producidas en unidades de papel filtro para bajas actividades

Esta ecuación se utiliza cuando no se logra liberar la cantidad crítica de glucosa con la enzima concentrada, por lo que el cálculo de la actividad se hace de la siguiente forma (Ghose, 1987):

$$1 \text{ mg glucosa} = \frac{1 \mu\text{mol}}{0.18 * 0.5 \text{ mL} * 60\text{min}} = 0.185 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} * \text{mL}} = 0.185 \frac{\text{IU}}{\text{mL}}$$

$$\text{FPU} = G * 0.185 = 1.533 \text{ mg} * 0.185 \text{ U/mL} = 0.284 \text{ FPU/mL}$$

FPU = actividad enzimática en unidades de papel filtro

G = cantidad de glucosa liberada del papel filtro en mg al utilizar el extracto concentrado

Los datos se obtuvieron del Cuadro 30 de la sección de Datos calculados. El resultado obtenido se encuentra en la sección de Resultados en el Cuadro 4. El cálculo se realizó para determinar la actividad enzimática de las celulasas producidas utilizando el ensayo de papel filtro en la muestra 12.5 g/L-1 a) ya que no se liberó la cantidad crítica de glucosa. El mismo cálculo se utilizó para el resto de las muestras, incluidas las del biorreactor.

Ecuación 9. Conversión de la vaina en la producción de azúcares reductores en forma de glucosa

$$X = \frac{A = V - V_f}{V} = \frac{3.55 \text{ g azúcares/L} = 3.55 \text{ g vaina/L}}{12.5 \text{ g vaina/L}} = 0.284 \text{ g vaina/g vaina}$$

X = conversión de la vaina en la hidrólisis enzimática para la producción de azúcares

A = concentración final de azúcares reductores en forma de glucosa

V = concentración inicial de la vaina de frijol

V<sub>f</sub> = concentración final de la vaina de frijol

Los datos se obtuvieron del Cuadro 5 de la sección de Resultados. Al ser una hidrólisis el rendimiento es del 100 % y la cantidad de los azúcares producidos será igual a la de la vaina consumida. El resultado obtenido se encuentra en la sección de Resultados en el Cuadro 6. El cálculo se realizó para determinar la conversión de la vaina de frijol en la producción de azúcares reductores en forma de glucosa para la vaina sin hidrolizar químicamente. El mismo cálculo se utilizó para la vaina hidrolizada químicamente.

Ecuación 10. Concentración del analito analizado en HPLC

$$C = \frac{A}{m} = \frac{1.38646 * 10^5 \text{ nRIU} * s}{2.00936 * 10^6 \text{ nRIU} * s / \% (m/v)} = 0.069 \% (m/v)$$

C = concentración del analito analizado (glucosa, sacarosa, fructosa, etanol)

A = área indicada en el cromatograma obtenido para el analito analizado  
 m = pendiente de la curva de calibración del analito analizado

Los datos se obtuvieron del Cuadro 20 de la sección de Datos originales y del Cuadro 32 de Datos calculados. El resultado obtenido se encuentra en la sección de Datos calculados en el Cuadro 33. El cálculo se realizó para determinar la concentración de etanol en la muestra VN-1. El mismo cálculo se utilizó para el resto de las muestras, incluidas las del biorreactor y para la determinación del resto de analitos.

Ecuación 11. Porcentaje de viabilidad de las levaduras presentes en la fermentación alcohólica

$$\%V = \frac{CV}{CV + CN} * 100 = \frac{2667.75 \text{ células}}{2667.75 \text{ células} + 55 \text{ células}} * 100 = 97.98 \%$$

%V = porcentaje de viabilidad de las levaduras

CV = promedio de células viables en el medio

CN = promedio de células no viables en el medio

Los datos se obtuvieron del Cuadro 36 de la sección de Datos calculados. El resultado obtenido se encuentra en la sección de Datos calculados en el Cuadro 36. El cálculo se realizó para determinar el porcentaje de viabilidad de las levaduras en el inóculo inicial. El mismo cálculo se utilizó para el resto de las muestras.

Ecuación 12. Concentración de células en el medio de fermentación en células por mL

$$C = CV * 10,000 * F = 2667.75 \text{ células} * 10,000 \text{ mL}^{-1} * 2 = 5.34 * 10^7 \text{ células/mL}$$

C = concentración de células en el medio

CV = promedio de células viables en el medio

F = factor de dilución

Los datos se obtuvieron del Cuadro 36 de la sección de Datos calculados. Se usó 2 como factor de dilución porque las muestras se mezclaron con un volumen igual de azul de metileno. El resultado obtenido se encuentra en la sección de Datos calculados en el Cuadro 37. El cálculo se realizó para determinar la concentración de células en el inóculo inicial. El mismo cálculo se utilizó para el resto de las muestras.

Ecuación 13. Concentración de células en el medio de fermentación en peso seco por mL

$$a) Ci = \frac{M1-M2}{V} * \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} = \frac{7.229 \text{ g}-7.167 \text{ g}}{11.5 \text{ mL}} * \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} = 5.39 \text{ mg/mL}$$

$$b) P = \frac{Ci}{Ni} = \frac{5.39 \text{ mg/mL}}{5.34 * 10^7 \text{ células/mL}} = 1.01 * 10^{-7} \text{ mg/célula}$$

$$c) C = N * P * \frac{1 \text{ g/l}}{1 \text{ mg/mL}} = 2.36 * 10^6 \frac{\text{células}}{\text{mL}} * \frac{1.01 * 10^{-7} \text{ mg}}{1 \text{ célula}} * \frac{1 \text{ g/L}}{1 \text{ mg/mL}} = 0.24 \text{ g/L}$$

Ci = concentración de células en peso seco en el inóculo inicial

M1 = masa del tubo de centrifuga vacío  
M2 = masa del tubo de centrifuga con el pellet seco  
V = volumen del inóculo inicial colocado en el tubo de centrifuga  
P = factor de proporcionalidad del peso de cada célula  
Ni = número de células por mL en el inóculo inicial  
C = concentración de células en peso seco en el medio de fermentación  
N = número de células por mL en el medio de fermentación

Los datos se obtuvieron del Cuadro 24 de la sección de Datos originales y del Cuadro 37 de Datos calculados. El resultado obtenido se encuentra en la sección de Datos calculados en el Cuadro 38. El cálculo se realizó para determinar la concentración de células en peso seco en el inóculo inicial y con ello determinar el factor de proporcionalidad del peso de cada levadura. Con la Ecuación 13 c) se calculó la concentración inicial de células en peso seco en el medio de fermentación. El mismo cálculo se utilizó para el resto de las muestras.

Ecuación 14. Concentración de la vaina de frijol sobrante en la fermentación alcohólica

$$V = \frac{A1 - A2}{V} - L = \frac{16.0 \text{ g} - 4.3 \text{ g}}{1 \text{ L}} - 2.65 \frac{\text{g}}{\text{L}} = 9.05 \text{ g/L}$$

V = concentración de vaina de frijol sobrante  
A1 = masa del aluminio con los sólidos centrifugados secos  
A2 = masa del aluminio seco  
V = volumen del reactor  
L = concentración final de levaduras en el reactor

Los datos se obtuvieron del Cuadro 26 de la sección de Datos originales y del Cuadro 38 de Datos calculados. El resultado obtenido se encuentra en la sección de Datos calculados en el Cuadro 40. El cálculo se realizó para determinar la concentración de vaina de frijol sobrante en el reactor de 1 L.

Ecuación 15. Rendimiento de la producción de etanol a partir de la vaina de frijol

$$Y_{p/s} = \frac{E_f - E_i}{V_i - V_f} * \frac{10 \text{ g/L}}{1 \% \left(\frac{m}{v}\right)} = \frac{0.136 \% \left(\frac{m}{v}\right) \text{ etanol} - 0 \% \left(\frac{m}{v}\right) \text{ etanol}}{12.5 \frac{\text{g vaina}}{\text{L}} - 9.05 \text{ g vaina/L}} * \frac{10 \text{ g etanol/L}}{1 \% \left(\frac{m}{v}\right) \text{ etanol}}$$

$$Y_{p/s} = 0.393 \text{ g etanol/g vaina}$$

Yp/s = rendimiento de la producción de etanol a partir de vaina de frijol  
Ef = concentración final de etanol en el biorreactor  
Ei = concentración inicial de etanol en el biorreactor  
Vi = concentración inicial de la vaina de frijol  
Vf = concentración final de la vaina de frijol



Los datos se obtuvieron del Cuadro 9 de la sección de Resultados y del Cuadro 40 de la sección de Datos calculados, al inicio no hubo etanol. El resultado obtenido se encuentra en la sección de Resultados en el Cuadro 9. El cálculo se realizó para determinar el rendimiento de la producción de etanol a partir de la vaina de frijol en una sacarificación y fermentación simultánea.

Ecuación 16. Rendimiento de la producción de biomasa a partir de la vaina de frijol

$$Y_{x/s} = \frac{X_f - X_i}{V_i - V_f} = \frac{2.65 \text{ g levadura/L} - 0.24 \text{ g levadura/L}}{12.5 \text{ g vaina/L} - 9.05 \text{ g vaina/L}} = 0.699 \text{ g levadura/g vaina}$$

$Y_{x/s}$  = rendimiento de la producción de biomasa de levadura a partir de vaina de frijol

$C_x$  = concentración final de levaduras en el biorreactor

$C_v$  = concentración inicial de la vaina de frijol

Los datos se obtuvieron del Cuadro 38 y 40 de la sección de Datos calculados. El resultado obtenido se encuentra en la sección de Resultados en el Cuadro 9. El cálculo se realizó para determinar el rendimiento de la producción de biomasa de levadura a partir de la vaina de frijol en una sacarificación y fermentación simultánea.

Ecuación 17. Velocidad específica de crecimiento de las levaduras

$$\mu = \frac{d \ln X}{dt} \approx \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} = \frac{-0.010 - (-1.14)}{47h - 22h} = 0.041 \text{ h}^{-1}$$

$\mu$  = velocidad específica de crecimiento de la levadura

$X$  = concentración de levadura

$t$  = tiempo

$X_1$  = concentración de células en un instante

$X_2$  = concentración de células en un instante posterior

$t_1$  = tiempo correspondiente a  $X_1$

$t_2$  = tiempo correspondiente a  $X_2$

Los datos se obtuvieron del Cuadro 41 de la sección de Datos calculados. El resultado obtenido se encuentra en la sección de Datos calculados en el Cuadro 41. El cálculo se realizó para determinar la velocidad específica de crecimiento de las levaduras en el biorreactor de 1 L. El mismo cálculo se usó para todas las muestras.

Ecuación 18. Tiempo de generación de las levaduras

$$td = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{\ln 2}{0.039 \text{ h}^{-1}} = 17.81 \text{ h}$$

$td$  = tiempo de generación de las levaduras

$\mu$  = velocidad específica de crecimiento de la levadura

Los datos se obtuvieron del Cuadro 41 de la sección de Datos calculados. En la velocidad específica de crecimiento se utilizó el promedio de los valores que correspondían a la fase exponencial, la cual se identificó en la Figura 21. El resultado obtenido se encuentra en la sección de Resultados en el Cuadro 9. El cálculo se realizó para determinar el tiempo de generación de las levaduras en el biorreactor de 1 L en la sacarificación y fermentación simultánea.

## E. Datos calculados

Cuadro 27. Masa y porcentaje de masa retenida en las mallas del análisis granulométrico

Apertura (mm)	Masa retenida (g $\pm$ 0.1 g)	Porcentaje (% $\pm$ 0.14 %)
0.850	27.7	27.78
0.600	25.6	25.68
0.355	26.5	26.58
0.250	8.9	8.93
0.180	5.6	5.62
0.150	3.5	3.51
Fondo	27.7	1.91

Con los números de malla se obtuvo la apertura de las mallas (indicado en el equipo). La cantidad final analizada fue de  $99.7 \pm 0.1$  g (suma de masas retenidas), lo cual indica que es un buen análisis ya que la muestra inicial fue de 100 g y es mayor al 98 % aceptable. El porcentaje se calculó como la masa retenida dividido los 99.7 g finales por 100.

Cuadro 28. Porcentaje de masa de harina que pasó en las mallas del análisis granulométrico

Apertura (mm)	Porcentaje que pasó la malla (%)
0.850	$72.22 \pm 0.14$
0.600	$46.54 \pm 0.20$
0.355	$19.96 \pm 0.25$
0.250	$11.03 \pm 0.29$
0.180	$5.42 \pm 0.32$
0.150	$1.91 \pm 0.35$
0.125	$0.00 \pm 0.38$

Con estos datos fue posible elaborar la distribución de las partículas obtenidas de vaina de frijol luego de la molienda en el molino de martillos, así como fueron usados para determinar el D70.

Cuadro 29. Constantes obtenidas en la regresión lineal utilizada para calcular la concentración de azúcares reductores en forma de glucosa

Pendiente (abs * 0.5 mL/mg)	Intercepto (abs)
$0.1263 \pm 0.0059$	$0.0121 \pm 0.0164$

Las constantes se obtuvieron con el análisis de regresión de Excel. Los datos fueron utilizados para calcular la concentración de azúcares reductores en forma de glucosa en la determinación de la actividad enzimática. Los datos con los cuales se hizo la regresión se encuentran en el Cuadro 16 de Datos originales.

Cuadro 30. Glucosa liberada del papel filtro en la hidrólisis enzimática y concentración de la enzima que libera la cantidad crítica de glucosa

Muestra	Glucosa liberada (mg)	Concentración enzima (v/v)	Concentración que libera 2 mg de glucosa (v/v)
Sin vaina	-0.134 ± 0.130	1.000	-214.702
Sin vaina 1:5	-0.127 ± 0.130	0.200	-
Control 12.5 g/L	-0.034 ± 0.130	1.000	-44.676
Control 12.5 g/L 1:5	0.002 ± 0.130	0.200	-
Control 25 g/L	0.261 ± 0.130	1.000	4.880
Control 25 g/L 1:5	-0.098 ± 0.130	0.200	-
Control 37.5 g/L	-0.048 ± 0.130	1.000	-49.483
Control 37.5 g/L 1:5	-0.016 ± 0.130	0.200	-
12.5 g/L-1 a)	1.533 ± 0.148	1.000	1.285
12.5 g/L-1 1:5 a)	0.220 ± 0.130	0.200	-
12.5 g/L-1 b)	1.724 ± 0.153	1.000	1.175
12.5 g/L-1 1:5 b)	0.467 ± 0.132	0.200	-
12.5 g/L-1 c)	1.598 ± 0.150	1.000	1.272
12.5 g/L-1 1:5 c)	0.418 ± 0.131	0.200	-
25 g/L	0.054 ± 0.130	1.000	16.485
25 g/L 1:5	-0.047 ± 0.130	0.200	-
37.5 g/L	-0.043 ± 0.130	1.000	43.127
37.5 g/L 1:5	-0.081 ± 0.130	0.200	-
12.5 g/L-2	0.311 ± 0.131	1.000	4.710
12.5 g/L-2 1:5	-0.053 ± 0.130	0.200	-
12.5 g/L-3	0.376 ± 0.131	1.000	4.671
12.5 g/L-3 1:5	0.022 ± 0.130	0.200	-

Como en los ensayos se utilizaron 0.5 mL de los extractos, la cantidad de glucosa liberada es igual a la concentración obtenida en la Ecuación 6. La concentración de enzima corresponde a la concentración del extracto agregado, 1 corresponde al uso del extracto concentrado y 0.2 a la dilución 1:5 realizada en buffer de citrato. La concentración que libera 2 mg de glucosa se obtuvo con una extrapolación usando los datos del extracto concentrado y del diluido. El valor de 2 mg es la cantidad crítica del ensayo estándar utilizado.

Cuadro 31. Azúcares reductores en forma de glucosa liberados de la vaina de frijol por la hidrólisis enzimática luego de diferentes tiempos de hidrólisis

Tiempo (h ± 0.05 h)	Azúcares en forma de glucosa (g/L)							
	Vaina sin hidrolizar				Vaina con hidrólisis alcalina			
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Curva	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Curva
1	-	-	-	1.50 ± 0.27	-	-	-	0.96 ± 0.26

2	3.39 ± 0.30	1.52 ± 0.27	1.71 ± 0.27	-	5.23 ± 0.36	1.06 ± 0.26	1.17 ± 0.27	-
4	-	-	-	1.52 ± 0.27	-	-	-	0.89 ± 0.26
24	6.55 ± 0.40	1.60 ± 0.27	2.37 ± 0.28	1.56 ± 0.27	8.02 ± 0.46	0.86 ± 0.26	1.56 ± 0.27	0.96 ± 0.26
26	-	-	-	1.68 ± 0.27	-	-	-	1.13 ± 0.26
48	6.75 ± 0.41	1.47 ± 0.27	2.25 ± 0.28	-	8.95 ± 0.49	1.10 ± 0.26	1.31 ± 0.27	-
50	6.98 ± 0.42	1.44 ± 0.27	2.23 ± 0.28	-	7.37 ± 0.43	0.97 ± 0.26	1.35 ± 0.27	-

Los azúcares reductores liberados se calcularon utilizando los datos del Cuadro 18 y la Ecuación 6. Los resultados de la ecuación se convirtieron a g/L.

Cuadro. 32. Constantes obtenidas en las regresiones lineales utilizadas para calcular la concentración de azúcares y etanol analizados en HPLC

Compuesto	Pendiente (nRIU*s / % (m/v))
Sacarosa	(3.86377 ± 0.20916) E+06
Glucosa	(4.17719 ± 0.32807) E+06
Fructosa	(4.74449 ± 0.26027) E+06
Etanol	(2.00936 ± 0.13112) E+06

Las constantes se obtuvieron con el análisis de regresión de Excel, el cual coincidió con el análisis de regresión del cromatógrafo. Los datos fueron utilizados para calcular la concentración de azúcares y etanol. En las regresiones se igualó la constante a 0 para obtener las pendientes. Los datos con los cuales se hicieron las regresiones se encuentran en el Cuadro 19 de Datos originales.

Cuadro 33. Concentración final de etanol, glucosa y fructosa en la fermentación llevada a cabo en Erlenmeyers con deflectores

Muestra	Concentración glucosa % (m/v)	Concentración fructosa % (m/v)	Concentración etanol % (m/v)
VN – 1	0.022 ± 0.002	0.000 ± 0.000	0.069 ± 0.005
VN – 2	0.021 ± 0.002	0.000 ± 0.000	0.062 ± 0.004
VN – 3	0.021 ± 0.002	0.000 ± 0.000	0.059 ± 0.004
VH – 1	0.000 ± 0.000	0.164 ± 0.009	0.059 ± 0.004
VH – 2	0.000 ± 0.000	0.165 ± 0.009	0.056 ± 0.004
VH – 3	0.000 ± 0.000	0.163 ± 0.009	0.054 ± 0.004
VN sin levadura	0.040 ± 0.003	0.000 ± 0.000	0.033 ± 0.002
VH sin levadura	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.039 ± 0.003
VN sin enzimas	0.024 ± 0.002	0.000 ± 0.000	0.024 ± 0.002
VH sin enzimas	0.000 ± 0.000	0.164 ± 0.009	0.048 ± 0.003
Sin vaina	0.030 ± 0.002	0.030 ± 0.002	0.026 ± 0.002

Se observa que la mayor concentración de etanol se obtuvo en los medios con vaina, levadura y extracto enzimático. La determinación de las concentraciones se hizo mediante HPLC.

Cuadro 34. Glucosa liberada del papel filtro en la hidrólisis enzimática y concentración de la enzima que libera la cantidad crítica de glucosa en las muestras del biorreactor

Muestra	Glucosa liberada (mg)	Concentración enzima (v/v)	Concentración que libera 2 mg de glucosa (v/v)
1	0.964 ± 0.137	1.000	1.961
1 - 1:5	0.101 ± 0.130	0.2	-
2	0.957 ± 0.137	1.000	1.962
2 - 1:5	0.090 ± 0.130	0.2	-
3	0.965 ± 0.137	1.000	1.955
3 - 1:5	0.098 ± 0.130	0.2	-

Como en los ensayos se utilizaron 0.5 mL de los extractos, la cantidad de glucosa liberada es igual a la concentración obtenida en la Ecuación 6. La concentración de enzima corresponde a la concentración del extracto agregado, 1 corresponde al uso del extracto concentrado y 0.2 a la dilución 1:5 realizada en buffer de citrato. La concentración que libera 2 mg de glucosa se obtuvo con una extrapolación usando los datos del extracto concentrado y del diluido. El valor de 2 mg es la cantidad crítica del ensayo estándar utilizado.

Cuadro 35. Actividad enzimática de los extractos obtenidos en unidades de papel filtro por mililitro de las muestras del biorreactor

Muestra	FPU (unidades/mL)	FPU B (unidades/mL)
1	0.189	0.178 ± 0.025
2	0.189	0.177 ± 0.025
3	0.189	0.179 ± 0.025

Las FPU se calcularon con la Ecuación 7, mientras que las FPU B se calcularon con la Ecuación 8 que se utiliza cuando la glucosa liberada con el extracto concentrado es menor al valor crítico de 2 mg, como en los resultados obtenidos.

Cuadro 36. Promedio del conteo de las levaduras en el biorreactor durante la fermentación alcohólica usando la cámara de Neubauer

Tiempo (h ± 0.05 h)	Células viables	Células no viables	Porcentaje de viabilidad (%)
Inóculo inicial	2667.75 ± 680.81	55 ± 10.92	97.98 ± 35.01
0	117.75 ± 23.41	2 ± 0.82	98.33 ± 27.43
22	159 ± 33.81	4.75 ± 4.35	97.10 ± 28.90
47	446 ± 77.13	19 ± 9.27	95.91 ± 23.06
70	1034.5 ± 104.83	4.75 ± 2.50	99.64 ± 24.66
88	1311.75 ± 230.01	4.75 ± 1.71	99.54 ± 14.24

Los datos de células viables y no viables corresponden a valores promedios y la incertidumbre corresponde a la desviación estándar. El porcentaje de viabilidad se calculó con estos datos usando la Ecuación 11.

Cuadro 37. Concentración de las levaduras en el biorreactor en el cual se llevó a cabo la fermentación alcohólica en número de células por mL

<b>Tiempo (h ± 0.05 h)</b>	<b>Concentración de levaduras (células/mL)</b>
Inóculo inicial	(5.34 ± 1.36) E+07
0	(2.36 ± 0.47) E+06
22	(3.18 ± 0.68) E+06
47	(8.92 ± 1.54) E+06
70	(2.07 ± 0.21) E+07
88	(2.62 ± 0.46) E+07

La concentración se determinó usando la Ecuación 12. Se observa que las levaduras fueron creciendo en el tiempo usando la vaina de frijol como fuente de carbono.

Cuadro 38. Concentración de las levaduras en el biorreactor en el cual se llevó a cabo la fermentación alcohólica en peso seco por mL

<b>Tiempo (h ± 0.05 h)</b>	<b>Concentración de levaduras (g/L)</b>
Inóculo inicial	5.39 ± 0.13
0	0.24 ± 0.08
22	0.32 ± 0.11
47	0.90 ± 0.28
70	2.09 ± 0.58
88	2.65 ± 0.82

La concentración se determinó usando la Ecuación 13 al correlacionar la concentración en células por mL con el factor de proporción del peso de cada célula.

Cuadro 39. Concentración de sacarosa, glucosa, fructosa y etanol en la fermentación llevada a cabo en el Biorreactor de 1 L a diferentes instantes de tiempo

<b>Tiempo (h ± 0.05 h)</b>	<b>Concentración sacarosa % (m/v)</b>	<b>Concentración glucosa % (m/v)</b>	<b>Concentración fructosa % (m/v)</b>	<b>Concentración etanol % (m/v)</b>
22	0.023 ± 0.001	0.020 ± 0.002	0.080 ± 0.004	0.108 ± 0.007
47	0.020 ± 0.001	0.016 ± 0.001	0.071 ± 0.004	0.113 ± 0.007
70	0.019 ± 0.001	0.016 ± 0.001	0.026 ± 0.001	0.116 ± 0.008
88 – 1	0.018 ± 0.001	0.016 ± 0.001	0.025 ± 0.001	0.131 ± 0.009
88 – 2	0.018 ± 0.001	0.016 ± 0.001	0.056 ± 0.003	0.119 ± 0.008
88 – 3	0.018 ± 0.001	0.016 ± 0.001	0.021 ± 0.001	0.157 ± 0.010

La determinación de las concentraciones se hizo mediante HPLC. Se observa un aumento en la concentración de etanol con el tiempo, al final de la fermentación se realizó un triplicado de mediciones.

Cuadro 40. Concentración de la vaina de frijol sobrante y de sólidos disueltos en la sacarificación y fermentación simultánea

Material	Concentración (g/L)
Vaina de frijol sobrante	9.05 ± 0.83
Sólidos disueltos	28.0 ± 1.4

La concentración de vaina de frijol se determinó con la Ecuación 14, mientras que la de los sólidos se hizo con la Ecuación 5.

Cuadro 41. Logaritmo de la concentración de las levaduras en el biorreactor y velocidad específica de crecimiento

Tiempo (h ± 0.05 h)	Ln (Concentración de levaduras)	Velocidad específica de crecimiento (h <sup>-1</sup> )
0	-1.44 ± 0.32	0.000 ± 0.000
22	-1.14 ± 0.33	0.014 ± 0.021
47	-0.10 ± 0.31	0.041 ± 0.018
70	0.74 ± 0.28	0.037 ± 0.018
88	0.97 ± 0.31	0.013 ± 0.023

Se calculó el logaritmo natural de la concentración con los datos del Cuadro 38 para calcular la velocidad específica de crecimiento y con ello el tiempo de generación de las levaduras.

## F. Análisis de error

Cómo se podían dar variaciones en los datos en distintas muestras, se llevaron a cabo diferentes mediciones para analizar el error estadístico de los datos obtenidos, por lo que se calculó la media de los datos y su dispersión.

Ecuación 19. Media aritmética:

Indica el valor promedio en una muestra que se está analizando (Anderson et al., 2012).

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} = \frac{10.98 \% + 8.91 \% + 11.31 \%}{3} = 10.40 \% (m/m)$$

x= media aritmética

Xi = valor de cada dato

n = número de datos

Los datos se obtuvieron del Cuadro 10 de la sección de Datos originales. El resultado obtenido se encuentra en la sección de Resultados en el Cuadro 1. El cálculo se realizó para determinar el contenido de humedad promedio de la vaina de frijol utilizada en el estudio. Este cálculo fue realizado para determinar la media de los diferentes datos.

Ecuación 20. Desviación estándar:

Indica qué tan dispersos están los datos de la media típicamente (Anderson et al., 2012).

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} = \sqrt{\frac{(10.98\% - 10.40\%)^2 + (8.91\% - 10.40\%)^2 + (11.31\% - 10.40\%)^2}{3 - 1}} = 1.30\% (m/m)$$

s= desviación estándar

$x_i$  = valor de cada dato

$\bar{x}$  = media muestral

n = número de datos

Los datos se obtuvieron del Cuadro 10 de la sección de Datos originales y del resultado de la Ecuación 19. El resultado obtenido se encuentra en la sección de Resultados en el Cuadro 1. El cálculo se realizó para determinar la desviación o error estándar del contenido de humedad de la vaina de frijol utilizada en el estudio. El mismo cálculo se usó para determinar la desviación estándar de los diferentes datos.

Ecuación 21. Intervalo de confianza:

Indica el rango dentro del cual se encontrará la media poblacional con un nivel de confianza (Anderson et al., 2012).

$$IC = \bar{x} \pm \frac{t * S}{\sqrt{n}} = 10.40\% \pm \frac{4.303 * 1.30\%}{\sqrt{3}} = 10.40\% \pm 3.23\% (m/m)$$

IC = intervalo de confianza

$\bar{x}$  = media aritmética

t = valor de la distribución t Student a un nivel de confianza

S = desviación estándar

n = número de datos

Los datos se obtuvieron del Cuadro 1 de la sección de Resultados y de la tabla t-Student con un nivel de confianza del 95 % El resultado obtenido se encuentra en la sección de Resultados en el Cuadro 1. El cálculo se realizó para conocer el intervalo en el que se encuentra la media poblacional del contenido de humedad de la vaina de frijol utilizada en el estudio y el parámetro bajo el cual son aceptables los datos. Este cálculo fue realizado para determinar el intervalo de confianza de los demás datos.

Ecuación 22. Coeficiente de variación:

Indica qué tan grande es la desviación estándar respecto a la media. Es una medida de variabilidad relativa a la media (Anderson et al., 2012).

$$CV = \frac{S}{\bar{x}} * 100 = \frac{1.30\%}{10.40\%} * 100 = 12.51\%$$



CV = coeficiente de variación

$\bar{x}$  = media aritmética

S = desviación estándar

Los datos se obtuvieron del Cuadro 1 de la sección de Resultados. El resultado obtenido se encuentra en la sección de Resultados en el Cuadro 1. El cálculo se realizó para conocer la magnitud de la dispersión, respecto a la media muestral, de los datos del contenido de humedad de la vaina utilizada en el estudio. Este cálculo fue realizado para determinar el coeficiente de variación de los demás datos.

Para los diferentes cálculos se obtuvo la propagación de error ya que se usaron varios instrumentos de medición cuya incertidumbre se fue acumulando

Ecuación 23. Propagación de error para multiplicación y división

Se utiliza para determinar la incertidumbre del resultado obtenido en multiplicaciones o divisiones (Anderson et al., 2012).

$$\Delta\delta = \delta \sqrt{\left(\frac{\Delta x}{x}\right)^2 + \left(\frac{\Delta y}{y}\right)^2} = 27.78 \% \sqrt{\left(\frac{0.1 \text{ g}}{27.7 \text{ g}}\right)^2 + \left(\frac{0.1 \text{ g}}{99.7 \text{ g}}\right)^2} = \pm 0.14 \%$$

$\Delta\delta, \Delta x, \Delta y$  = incertidumbres de los datos o mediciones

$\delta, x, y$  = datos o mediciones

Los datos se obtuvieron de la incertidumbre del Cuadro 27 de Datos calculados. Los resultados obtenidos se utilizaron para calcular la incertidumbre del porcentaje de masa retenida en las mallas del análisis granulométrico y se muestra en el Cuadro 27 de Datos calculados. Este cálculo fue utilizado para toda la propagación de error que tenía una multiplicación o división.

Ecuación 24. Propagación de error para sumas y restas

Se utiliza para determinar la incertidumbre del resultado obtenido en sumas y restas (Anderson et al., 2012).

$$\Delta\delta = \sqrt{(\Delta x)^2 + (\Delta y)^2} = \sqrt{(0.14 \%)^2 + (0.14 \%)^2} = \pm 0.20 \%$$

$\Delta\delta, \Delta x, \Delta y$  = incertidumbres de los datos o mediciones

Los datos se obtuvieron de la incertidumbre del Cuadro 27 de Datos calculados. Los resultados obtenidos se utilizaron para calcular la incertidumbre del porcentaje de masa que pasó en las mallas del análisis granulométrico y se muestra en el Cuadro 28 de Datos calculados. Este cálculo fue utilizado para toda la propagación de error que tenía sumas o restas.

Ecuación 25. Propagación de error para logaritmos

Se utiliza para determinar la incertidumbre del resultado obtenido en logaritmos (Anderson et al., 2012).

$$\Delta\delta = \frac{\Delta x}{x * \ln a} = \frac{0.08 \text{ g/L}}{0.24 \text{ g/L} * \ln e} = \pm 0.32$$

$\Delta\delta$ ,  $\Delta x$  = incertidumbres de los datos o mediciones

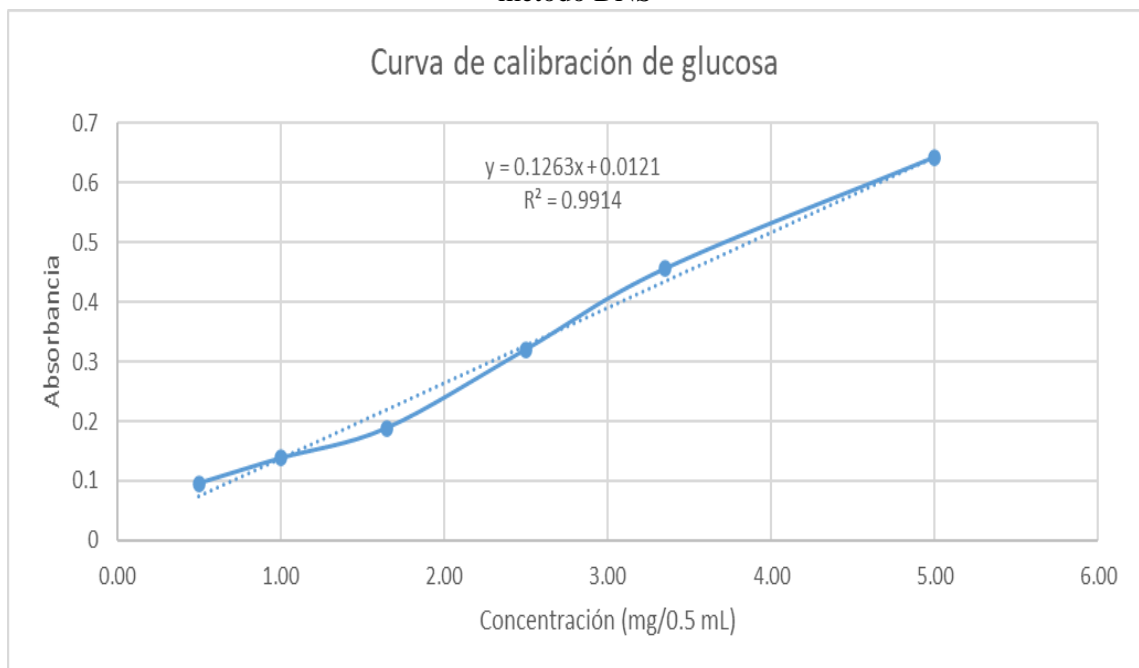
x = datos o mediciones

a = base del logaritmo utilizado

Los datos se obtuvieron de la incertidumbre del Cuadro 38 de Datos calculados. Los resultados obtenidos se utilizaron para calcular la incertidumbre del logaritmo de la concentración de levaduras y se muestra en el Cuadro 41 de Datos calculados. Este cálculo fue utilizado para toda la propagación de error que tenía un logaritmo.

Para poder determinar la concentración de azúcares reductores en forma de glucosa fue necesario realizar una curva de calibración entre la concentración de glucosa y la absorbancia. A continuación, se muestra la regresión obtenida.

Figura 79. Curva de calibración de azúcares reductores en forma de glucosa utilizada con el método DNS



Fuente: Elaboración propia.

Como se puede observar, el  $R^2$  es muy cercano a 1, lo que indica que hay una relación lineal entre los datos y que el modelo matemático permite predecir distintos valores de concentración a distintas absorbancias. Por lo tanto, es posible usar esta curva para determinar la concentración de glucosa y de azúcares reductores en forma de glucosa con el método DNS.

Con el análisis de regresión de Excel se obtuvo un error típico para la pendiente de 0.0059 y para el intercepto de 0.0164. Los datos usados para obtener la curva se encuentran en el Cuadro 16 de Datos originales.

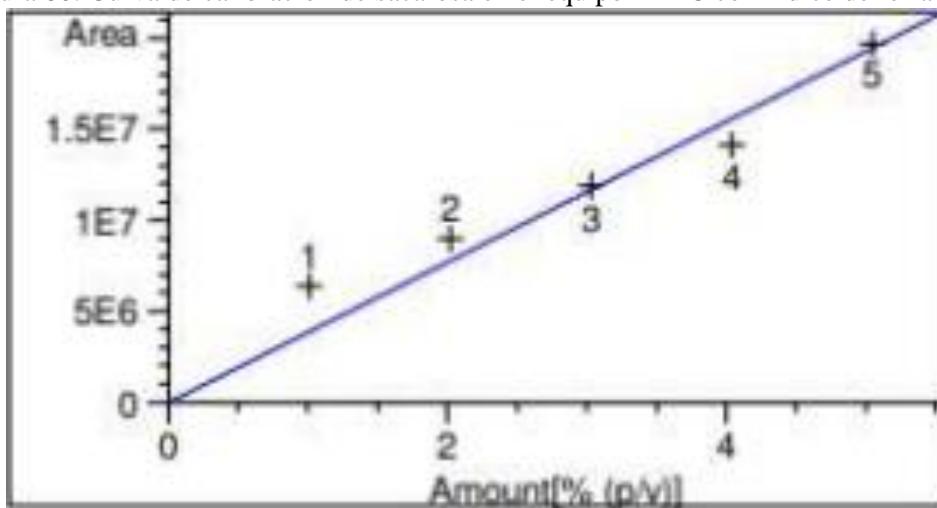
Cuadro 42. Error del ensayo de papel filtro para determinar la actividad enzimática utilizando el método DNS para la cuantificación de azúcares reductores

Media (FPU/mL)	Desviación estándar (FPU/mL)	Intervalo de confianza (FPU/mL)	Coefficiente de variación (%)
0.298	0.015	0.298 ± 0.037	4.97

Los datos corresponden a un triplicado del análisis de la actividad enzimática para un mismo extracto enzimático. Los datos se encuentran en el Cuadro 4 de Resultados. Se observa que la variación es menor al 5 % lo que indica que el método tiene una variabilidad aceptable.

Para poder determinar la concentración de azúcares y etanol en HPLC, fue necesario realizar curvas de calibración entre la concentración y el área de la señal recibida del equipo. A continuación, se muestran las regresiones obtenidas.

Figura 80. Curva de calibración de sacarosa en el equipo HPLC con índice de refracción

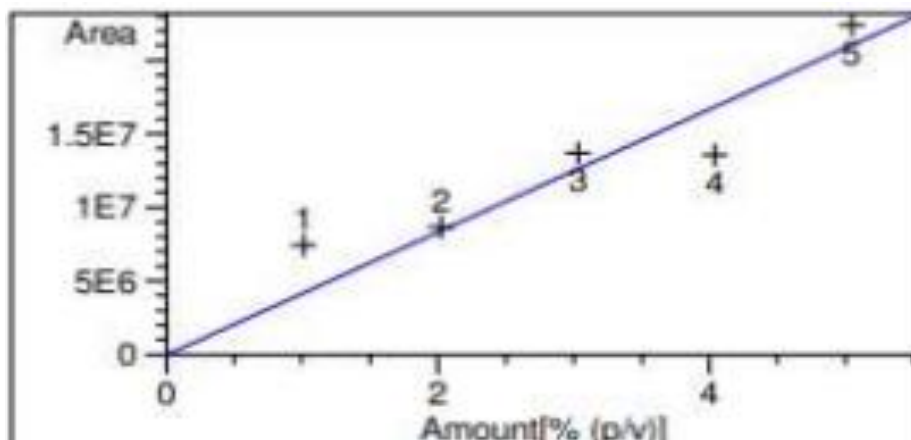


Fuente: Encargado del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada.

El  $R^2$  es de 0.988, lo que indica que hay una relación lineal entre los datos y que el modelo matemático permite predecir distintos valores de concentración a distintas áreas de los cromatogramas. Por lo tanto, es posible usar esta curva para determinar la concentración de sacarosa.

Con el análisis de regresión de Excel se obtuvo un error típico para la pendiente de  $2.09157E+05$ . Los datos usados para obtener la curva se encuentran en el Cuadro 19 de Datos originales.

Figura 81. Curva de calibración de glucosa en el equipo HPLC con índice de refracción

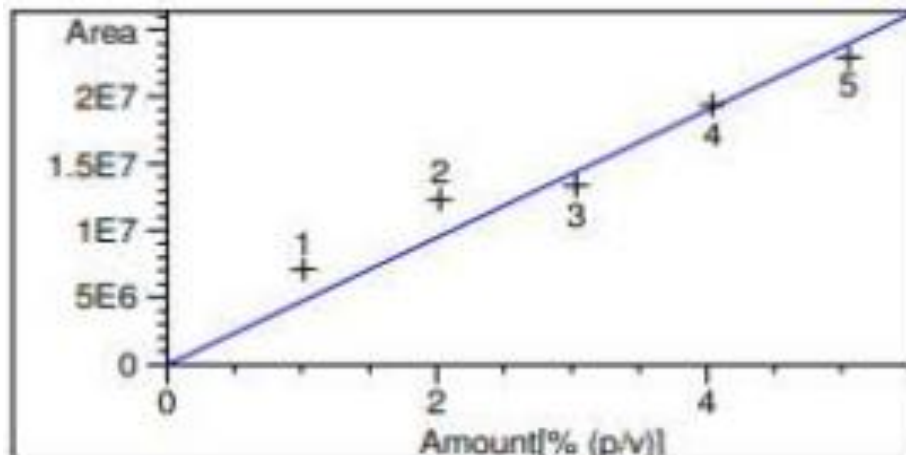


Fuente: Encargado del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada.

El  $R^2$  es de 0.976, lo que indica que hay una relación lineal entre los datos y que el modelo matemático permite predecir distintos valores de concentración a distintas áreas de los cromatogramas. Por lo tanto, es posible usar esta curva para determinar la concentración de glucosa.

Con el análisis de regresión de Excel se obtuvo un error típico para la pendiente de  $3.28074E+05$ . Los datos usados para obtener la curva se encuentran en el Cuadro 19 de Datos originales.

Figura 82. Curva de calibración de fructosa en el equipo HPLC con índice de refracción

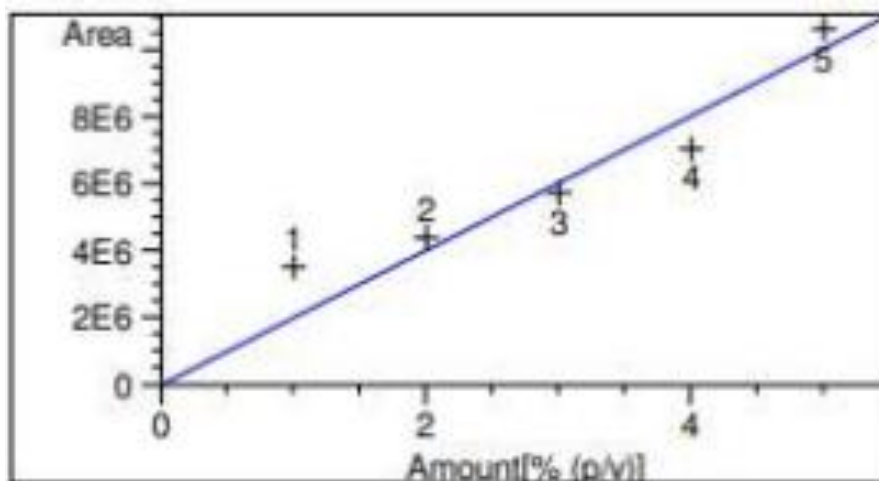


Fuente: Encargado del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada.

El  $R^2$  es de 0.988, lo que indica que hay una relación lineal entre los datos y que el modelo matemático permite predecir distintos valores de concentración a distintas áreas de los cromatogramas. Por lo tanto, es posible usar esta curva para determinar la concentración de fructosa.

Con el análisis de regresión de Excel se obtuvo un error típico para la pendiente de  $2.60265E+05$ . Los datos usados para obtener la curva se encuentran en el Cuadro 19 de Datos originales.

Figura 83. Curva de calibración de etanol en el equipo HPLC con índice de refracción



Fuente: Encargado del Laboratorio de Instrumentación Química Avanzada.

El  $R^2$  es de 0.983, lo que indica que hay una relación lineal entre los datos y que el modelo matemático permite predecir distintos valores de concentración a distintas áreas de los cromatogramas. Por lo tanto, es posible usar esta curva para determinar la concentración de etanol.

Con el análisis de regresión de Excel se obtuvo un error típico para la pendiente de  $1.31124E+05$ . Los datos usados para obtener la curva se encuentran en el Cuadro 19 de Datos originales.

## G. Datos de placa de equipos utilizados

Cuadro 43. Datos de placa de los principales equipos utilizados durante la experimentación

Equipo	Marca	Modelo	Serie	Energía eléctrica	Rango	Otro
Balanza de humedad	Ohaus	MB45	-	100 - 120 V 4 A 50/60 Hz	0.5 - 45 g	d: 0.001 g
Molino de martillos (motor)	Baldor	M3710T	F286	208-230 V 21.5 - 20 A 60 Hz 7.5 HP	1725 RPM	Eficiencia: 82 %
Equipo para análisis granulométrico	W. S. Tyler	RX-29	19183	-	-	Tipo: RO-TAP
Equipo para análisis granulométrico (motor)	Baldor	-	W1199	115 V 2.5 A 60 Hz 0.25 HP	1725 RPM	Eficiencia: 57 %

Balanza semianalítica	Ohaus Precision	TS4KS	1569	± 17 VDC 230 mA	0 – 4000 g	Incertidumbre: 0.1 g
Balanza de piso	Ohaus	Defender	3000	5-15 V	0 – 150 kg	Incertidumbre: 0.02 kg
Estufa con agitador magnético	Thermo Scientific	8P131325	1768090 700635	120 V 8.90 A 60 Hz	-	-
Balanza analítica	Ohaus	Pioneer	-	8 – 14.5 V 50/60 Hz 4W 230 V	0 – 110 g	Incertidumbre: 0.0001 g
Autoclave	Tuttnauer	-	19110541	10 A 60 Hz 2.4 kW	0 – 2.8 bar	-
Campana de flujo laminar	Labconco	3600000	70469119	115 V 12 A 60 Hz 120 V	0 – 30 psig	-
Incubadora	Labline	310	0599-0437	500 A 50/60 Hz 600 W	T amb – 100° C	-
Estereoscopio	Premiere	-	1391266	110 – 120 V 110 V	-	-
Microscopio	Fisher Scientific	Micromaster	-	125 mA 60 Hz 120 V	-	Bulbo: 6 V, 20W
Incubadora con agitador orbital	Barnstead	SHKA4450	1413070 765202	4.5 A 50/60 Hz 500 W	T amb + 10° C – 60° C	0 – 500 RPM
Espectrofotómetro	Shimadzu	UVmini-1240	A109343 34307CS	100 – 120 V 50/60 Hz	-	-
Incubadora con agitador orbital	New Brunswick Scientific	G-25	890614928	120 V 10 A 50/60 Hz	T amb + 5° C - 60° C	40 – 400 RPM
Centrifugadora	Sorvall	RT-7	-	115 V 12 A 60 Hz 1400 W	0 – 7000 RPM	Capacidad: 1 L, Temperatura: -5 a 25° C

Horno secador de convección	VWR	E19104 7	04104261 1A1013	120 V 60 Hz 1.4 kW	50 – 250° C	-
Baño térmico	Precision	MDL 183	69905069 1	120 V 3.3 A 50/60 Hz 400 W	T amb + 5° C – 100° C	-
Centrifugadora	Fisher Scientific	228	106N034 1	115 V 2.1 A 60 Hz	3400 RPM	Capacidad: 90 mL
Biorreactor	Sartorius Stedim	Biostat A plus	8843812	120 V 15 A 50/60 Hz	20 – 1200 RPM, 0 – 150° C	pH: 2 – 12, pO <sub>2</sub> : 0 – 100 %

## H. Reactivos utilizados en la experimentación

Cuadro 44. Principales reactivos utilizados durante la experimentación

Reactivo	Fórmula química	Marca	Grado, pureza	Número de referencia
Urea	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	Merck	Para análisis, 99.0 – 100.5 %	1.08487.0500
Fosfato monopotásico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fisher Scientific	Para análisis, 99.8 %	F.W.136.09
Sulfato de amonio	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck	Para análisis, 99.5 %	1.01217.1000
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	Merck	Para análisis, 99.0 – 102.0 %	1.02382.0500
Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	Merck	Para análisis, 99.5 %	1.05886.0500
Peptona de carne	-	Merck	Para microbiología	1.07214.1000
Sulfato de hierro (II) heptahidratado	FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	Merck	Para análisis, 99.0 – 102.0 %	1.03965.0500
Sulfato de manganeso (II) monohidratado	MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	Merck	Para análisis, 98.0 – 101.0 %	1.05941.0250
Sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	Merck	Para análisis, 99.5 – 103.0 %	1.08883.0500
Cloruro de cobalto (II) hexahidratado	Cl <sub>2</sub> Co * 6 H <sub>2</sub> O	Merck	Para análisis, 99.0 – 102.0 %	1.02539.0100

Hidrógeno ftalato de potasio	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> KO <sub>4</sub>	Merck	Para análisis, 99.5 %	1.04874.0250
Polisorbato Tween 80	C <sub>64</sub> H <sub>124</sub> O <sub>26</sub>	Distribuidora del Caribe	-	70100616
Extracto de levadura	-	Merck	Para microbiología	1.03753.0500
D (+) glucosa monohidratada	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> * H <sub>2</sub> O	Merck	Para bioquímica	1.04074.1000
Hidróxido de sodio	NaOH	Merck	Para análisis, 99.0 %	1.06498.1000
Fenol	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH	Merck	Para análisis, 99.0 – 100.5 %	1.00206.0250
Ácido 3,5-dinitrosalicílico	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Fisher Scientific	Reactivo, 97 %	-
Metabisulfito de sodio	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Sigma-Aldrich	Para análisis, 99 %	S9000-500G
Ácido cítrico monohidratado	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> * H <sub>2</sub> O	Merck	Para análisis, 99.5 – 100.5 %	1.00244.0500
Tartrato de sodio potasio tetrahidratado	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> KNaO <sub>6</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	Merck	Para análisis, 99.0 – 102.0 %	1.08087.1000
D (+) glucosa	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Sigma-Aldrich	Para HPLC, 99.5 %	G-7528
Glicerol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Merck	Para análisis, 99.5 %	1.04092.1000
Ácido clorhídrico fumante	HCl	Merck	Para análisis, 37.0 – 38.0 %	1.00317.2500
Agar papa dextrosa	-	Merck	Para microbiología	1.10130.5007
Caldo nutritivo	-	Merck	Para microbiología	1.05443

## I. Glosario

**Actividad enzimática:** es una medida que indica la velocidad de reacción catalizada por una enzima expresada en micromoles del sustrato transformado o producto obtenido por minuto. Indica qué tan rápido se lleva a cabo una reacción con una determinada cantidad de enzima.

**Análisis granulométrico:** es un procedimiento manual o mecánico por medio del cual se separan las partículas constitutivas de un agregado o conjunto de partículas según tamaños, permite conocer la distribución del tamaño de partículas en una muestra.

**Azúcares fermentables:** azúcares simples que pueden ser utilizados por los microorganismos como fuente de carbono para crecer y obtener diferentes productos de interés.

**Bioetanol:** compuesto químico obtenido a partir de la fermentación de azúcares por microorganismos como levaduras, el cual puede utilizarse como combustible o en otras aplicaciones.

**Bioproceso consolidado:** proceso en el que la levadura produce las enzimas para hidrolizar un sustrato lignocelulósico y que usa los azúcares liberados para producir etanol en un solo reactor.



**Biorreactor:** recipiente o sistema que mantiene un ambiente biológicamente activo en el cual pueden crecer microorganismos al consumir un sustrato en condiciones controladas de temperatura, pH, agitación, oxígeno disuelto, entre otras, para obtener un producto de interés.

**Catálisis:** proceso en el cual se aumenta la velocidad de una reacción química por la presencia de una sustancia llamada catalizador, cuya concentración no cambia durante la reacción.

**Celulasas:** son un grupo de enzimas complejas especializadas en catalizar la descomposición de la celulosa y otros polisacáridos relacionados en múltiples unidades de glucosa.

**Celulosa:** componente principal de la pared celular de las plantas, es un biopolímero compuesto por unidades de glucosa unidas mediante un enlace beta.

**Centrifugación:** método en el que se pueden separar sólidos de líquidos de diferente densidad por medio de una fuerza giratoria llamada centrífuga que genera un campo centrífugo.

**Cepa:** es una población de microorganismos de una sola especie que descienden de una única célula o provienen de una determinada muestra en particular.

**Ensayo de papel filtro:** ensayo estandarizado utilizado para determinar la actividad enzimática de las celulasas ya que estas pueden hidrolizar la celulosa del papel filtro para liberar glucosa que es posteriormente cuantificada.

**Enzimas:** moléculas orgánicas que actúan como catalizadores en reacciones químicas, acelerando la velocidad de reacción. Normalmente son de naturaleza proteica pero también hay de ARN. La velocidad de reacción es modificada sin afectar el equilibrio ni termodinámica global de esta.

**Enzimas lignocelulolíticas:** proteínas extracelulares excretadas por diferentes microorganismos para convertir la lignocelulosa en azúcares simples que pueden consumir.

**Espectrofotómetro:** instrumento que mide la cantidad de intensidad de luz que una muestra puede absorber con una determinada longitud de onda, esto ayuda a determinar la concentración de compuestos en una solución.

**Extracto enzimático:** solución en la cual se encuentra una o una serie de enzimas que tienen una función específica. Este extracto se puede utilizar para llevar a cabo diferentes reacciones o para purificar y caracterizar las enzimas que contiene.

**Fermentación:** es un proceso catabólico de oxidación incompleta que no requiere oxígeno y cuyo producto final es un compuesto orgánico como el etanol o el ácido láctico.

**Fermentación y sacarificación simultánea:** es un proceso en el cual en el mismo medio de reacción se lleva a cabo la hidrólisis de un sustrato lignocelulósico para liberar azúcares fermentables que son consumidos por microorganismos como levaduras para que produzcan un compuesto de interés como el etanol.

**Glucosa:** es un azúcar monosacárido, la cual es la principal fuente de energía en los organismos, esta es una hexosa que se encuentra en las frutas y en la miel.

**Hemicelulosa:** es un conjunto de polisacáridos heterogéneos formados por 2 tipos de monosacáridos unidos por enlaces beta, principalmente xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, glucosa y ácido glucurónico, esta está presente en la lignocelulosa.

**Hexosa:** monosacárido formado por una cadena de 6 átomos de carbono como la glucosa, fructosa y galactosa y son asimilables por la mayoría de los microorganismos.

**Hidrólisis:** es una reacción química entre una molécula de agua y otra macromolécula en la cual el agua rompe uno o más enlaces químicos y sus átomos pasan a formar otra especie química. La hidrólisis puede ser facilitada por compuestos químicos o con el uso de enzimas.

**Hongos miceliales:** hongos filamentosos pluricelulares que forman un entramado de hifas llamado micelio, el cual es parecido a una raíz, estos pueden producir una amplia variedad de enzimas.

**HPLC:** significa cromatografía líquida de alta resolución, es una técnica que permite separar diferentes componentes en una mezcla a través de una columna y una fase móvil y cuantificarlos mediante un detector.

**Inductor:** es un compuesto que puede unirse a una enzima para inducir un aumento en su actividad o bien puede unirse a segmentos de ADN para inducir la transcripción de genes que codifican para ciertas enzimas.

**Inhibidor:** es un compuesto que puede unirse a una enzima para disminuir su actividad o bien puede unirse a segmentos de ADN para evitar que se dé la transcripción de genes que codifican para ciertas enzimas.

**Inóculo:** pequeña cantidad de microorganismos que se introducirán en un medio para que crezcan y se reproduzcan.

**Intervalo de confianza:** es un par de números entre los cuales se estima estadísticamente que existe un valor respecto a un parámetro poblacional con un nivel de confianza determinado. Es útil cuando no se conoce toda la población y con una muestra se puede realizar estadística inferencial.

**Levaduras:** Hongos microscópicos unicelulares que se dividen por gemación y que pueden consumir azúcares en un medio sin oxígeno para producir etanol. Son los microorganismos utilizados para elaborar pan y cerveza.

**Lignina:** serie de polímeros orgánicos complejos formados por alcoholes fenólicos. Estos forman materiales estructurales en los tejidos de soporte de plantas y algunas algas al proporcionar resistencia, impermeabilidad y protección contra ataques microbianos.

**Lignocelulosa:** es el principal componente de la biomasa de las plantas y consume cerca de la mitad de los productos de la fotosíntesis. Comprende los residuos agrícolas y forestales y está compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina.

**Método DNS:** es un método utilizado para determinar azúcares reductores ya que el ácido 3,5-dinitrosalicílico se reduce para oxidar los azúcares y formar un compuesto que tiene una fuerte absorbancia a 540 nm, la cual se puede leer con un espectrofotómetro.

**Pentosa:** monosacárido formado por una cadena de 5 átomos de carbono como la ribosa y la xilosa, estas no son asimilables por todos los microorganismos.

**Productividad:** es el aumento en la concentración de un producto o microorganismo por unidad de tiempo, indica qué tan rápido se producen.

**Proteínas:** son macromoléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos, las cuales están presentes en todos los organismos ya que tienen funciones catalíticas, reguladoras, estructurales, defensivas, de transporte, receptoras, motoras y de almacenamiento de energía.

**Rendimiento:** es una relación entre lo que se produce realmente de un compuesto versus su producción teórica o versus el consumo de un sustrato.

**Sustrato:** es el componente sobre el cual actúa una enzima para llevar a cabo una reacción enzimática y obtener un producto de interés o bien es el compuesto que consume un microorganismo para crecer y para que produzca compuestos de interés.

***Trichoderma harzianum*:** hongo filamentoso que tiene la capacidad de alimentarse mediante la secreción de enzimas extracelulares que digieren los polisacáridos o proteínas para usar los monómeros como fuente de energía.

**Vaina de frijol:** envoltura aplanada y alargada que protege los granos de frijol antes de ser cosechados.