

**INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN EN LA
PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS HÚMICOS POR *TRICHODERMA*, USANDO COMO
SUSTRATO RAQUIS DE PALMA AFRICANA.**

INGRI JULIETH MANCILLA CORZO



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2017

**INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN EN LA
PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS HÚMICOS POR *TRICHODERMA*, USANDO COMO
SUSTRATO RAQUIS DE PALMA AFRICANA.**

INGRI JULIETH MANCILLA CORZO

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de
Ingeniera Química**

Director

LUÍS JAVIER LÓPEZ GIRALDO

Doctor en Ciencia de Alimentos - Ciencia de Procesos

Codirectora

MARÍA HELENA ANDRADE SANTANA

Doctora en Ingeniería Mecánica

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO-QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2017

Dedico este trabajo a Dios en primera instancia por darme la sabiduría y fortaleza que requería para llevar a cabo esta gran labor de formación. A mi madre Martha y a mi papá Jesús por ser los motores que movieron cada una de las metas que procuro cumplir, por ayudarme y por ser esa guía que no permitió que desistiera de mis sueños en momentos que parecían casi nulas las esperanzas.

A mis abuelos María Gabriela y Alfonso los cuales hicieron parte de este gran sueño y aunque uno de ellos no pudo ver como culminaría, murió con la satisfacción de sentir que su nieta sería una profesional.

A mis hermanos Tatiana y Juan los cuales han sido la inspiración en gran parte de estos años de estudio y dedicación, brindándome apoyo, fuerza y aliento para ver en cada situación lo mejor de ella, para aprender que no existen imposibles.

Agradezco a todos mis tíos por ser esos seres llenos de conocimiento que estaban pendientes de cómo iba mi proceso, de cómo me estaba sintiendo y de expresar su emoción por lo que estaba a punto de conseguir, lo cual alimento mi deseo de dar por culminada esta fascinante carrera.

No podría olvidar a mis amigos los cuales hicieron de esta meta la mejor de todas; ellos eran los encargados de animar los fines de semana y hacer que la estadía en las ciudades donde curse la carrera (Socorro-Bucaramanga-Campinas) no fuese sedentaria. Por su apoyo, por sus consejos, por su alegría y por su compañía; durante este tiempo ellos se convirtieron en mis “hermanos”, los cuales junto a mi luchábamos por una misma meta la cual el día de hoy estamos dando por culminada.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Industrial de Santander, por ser la galante del proceso de formación más completo, íntegro y lleno de conocimiento del cual he hecho parte en mi vida; a los profesores y/o educadores, los cuales con sus conocimientos supieron transmitir la base esencial de lo que es Ingeniería Química.

A la universidad Estatal de Campinas y en especial a la Facultad de Ingeniería Química en compañía del laboratorio de la Facultad de alimentos, por permitir desarrollar dentro de sus instalaciones la parte práctica e investigativa del proyecto que estaba desarrollando, conllevando a fortalecer mis conocimientos y aprender un poco más acerca del área de los bioprocesos en otro país.

Agradecimientos especiales a mi director Luis Javier López Giraldo, y a mi codirectora María Helena Andrade Santana de la Universidad Estatal De Campinas (UNICAMP), por darme la oportunidad de desarrollar mis inicios como investigadora dentro de sus grupos de investigación, haciendo parte de sus proyectos.

Y por último a la Biotecnóloga María P. Cardeal Volpi, la cual fue la encargada de enseñarme las bases fundamentales para con el desarrollo del proyecto, análisis e interpretación de datos y conceptos teóricos en el área de bioprocesos; por su entrega, paciencia, disponibilidad y buena actitud para con cada día durante mi estadía en Brasil.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	14
1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA	23
1.1 DESARROLLO EXPERIMENTAL	23
1.2 CARACTERIZACIÓN DEL EFB	24
1.2.1 Residuo sólido (EFB)	24
1.2.2 Cuantificación de celulosa, hemicelulosa y lignina	24
1.2.3 Tamaño de las partículas	24
1.2.4 Humedad	24
1.2.5 Capacidad máxima de absorción del agua	24
1.3 PROCESO DE EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS EN LAS FIBRAS DE EFB	25
1.3.1 Extracción de lípidos en las fibras de EFB	25
1.4 CULTIVO DEL MICROORGANISMO (<i>T. reesei</i>)	25
1.4.1 Microorganismos y mantenimiento	25
1.4.2 Medio de cultivo de microorganismos	26
1.5 CULTIVO EN ESTADO SÓLIDO	26
1.6 CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO FÚNGICO Y PRODUCCIÓN DE AH	29
1.6.1 Contenido de humedad	29
1.6.2 Cuantificación de proteínas	29
1.6.3 Cuantificación de AH	30
1.6.4 Tasa global de transferencia de oxígeno	30
1.6.5 pH	31
1.6.6 Glucosa	31
1.7 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)	31

1.8 RECUENTO DE ESPORAS.....	32
1.9 PRODUCTIVIDAD DE LA FERMENTACIÓN	32
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
2.1 CARACTERIZACIÓN LIGNOCELULOSICA DEL SUSTATO SÓLIDO.....	33
2.2 CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE AH.....	35
2.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO EN LAS FIBRAS DE EFB (MEB).....	42
3. CONCLUSIONES	47
BIBLIOGRAFÍA.....	49
ANEXOS.....	55

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura de los AH.....	15
Figura 2. Fotografías de: árbol de palma de aceite (a), racimos de fruto (b) y fibras de EFB.....	19
Figura 3. Esquema metodológico	23
Figura 4. Esquema experimental de la fermentación en columna de Raimbault. A: Compresor dental; B: rotámetro; C: incubador bacteriológico; D: Columnas empacadas y aire humidificador; E: Ventilador; F: oxímetro.....	28
Figura 5. Columnas empacadas con sistema de aireación forzada; A: Entrada de aire humedecido; B: Agua destilada; C: Lecho de EFB; D: Salida de aire de las columnas	28
Figura 6. Concentración de AH (a), proteína celular (b), pH (c), concentración de glucosa (d), humedad (e), oxígeno consumido vs tiempo de FES (f) para las fibras de Agropalma.....	36
Figura 7. Concentración de AH, proteína celular, pH, concentración de glucosa, humedad, oxígeno consumido vs tiempo de FES para las fibras de Bahía	40
Figura 8. Crecimiento de <i>T. Reesei</i> durante la FES para las fibras de Agropalma con lípido (a)- antes de la FES, (b) 72 horas y (c) 120 horas.	42
Figura 9. Imágenes de MEB de partículas de EFB de Agropalma, (a) EFB con lípido antes de la FES, (b) EFB con lípido en la FES en 120 horas.....	43
Figura 10. Imágenes de MEB de partículas de EFB de Bahía, (a) EFB sin lípido antes de la FES, (b) EFB sin lípido en la FES en 120 horas.	44
Figura 11. Comparación de los cuerpos de sílica presentes en: a-Trabajo de Law y b- Nuestro trabajo	46

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Composición de los compuestos lignocelulósicos de los EFBS de Agropalma y de la Cooperativa de industrias de Bahía	33
---	----

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Producción de aceite de palma en Colombia.....	55
ANEXO B. Producción de aceite de palma en Santander	56
ANEXO C. Curvas patrón	57
ANEXO D. Proporciones usadas para el análisis de glucosa	60

RESUMEN

TÍTULO: INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE FERMENTACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS HÚMICOS POR *TRICHODERMA*, USANDO COMO SUSTRATO RAQUIS DE PALMA AFRICANA*

AUTORA: INGRI JULIETH MANCILLA CORZO**

PALABRAS CLAVES: Ácidos húmicos, biomasa, raquis de palma (EFB), residuo agroindustrial, Fermentación en estado sólido (FES), *Trichoderma reesei*, Microscopia electrónica de barrido (MEB).

DESCRIPCIÓN

Los ácidos húmicos (AH) son un grupo de sustancias orgánicas extraídas químicamente de fuentes no renovables como las turbas y carbón. Debido a sus aplicaciones en la agricultura, la industria, el medio ambiente y la biomedicina, han atraído la atención de varios investigadores, generando la necesidad de desarrollar procesos biotecnológicos para su obtención y producción sostenible, siendo la fermentación en estado sólido (FES) un camino promisorio para imitar el hábitat natural de los hongos.

La FES fue llevada a cabo en seis columnas de lecho fijo, dentro de un incubador microbiológico a 30°C, con inyección de aire de 0,4 L/min, durante un periodo de 120 horas. Se monitorearon las variables de producción diarias de AH, proteína celular, consumo de glucosa, pH, humedad y tasa de transferencia de oxígeno, usando como sustrato dos fuentes de raquis de palma africana (Bahía y Agropalma).

Los resultados mostraron que la mayor productividad en términos del producto y biomasa en Agropalma fue en las fibras con lípido con valores de 4,71 mg de AH/100g de EFB*h y 0,06mg de proteína celular/100g de EFB*h. En caso de Bahía la mayor productividad en términos de producto se dio en las fibras sin lípido (2,28 mg/100g de EFB*h) y en términos de biomasa fue en las fibras con lípido (0,07 mg de proteína celular/100g de EFB*h). La productividad relacionada con la producción de AH fue mucho mayor que la de biomasa, indicando utilización eficiente del EFB. A partir de imágenes microscópicas del crecimiento y esporulación de *T. reesei* en EFB junto a las tasas de producción de AH, indicaron que estos están relacionados.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: LuíS Javier López Giraldo, Doctor en Ciencia de Alimentos - Ciencia de Procesos. Codirectora: María Helena Andrade Santana, Doctora en Ingeniería Mecánica

ABSTRACT

TITLE: "INFLUENCE OF FERMENTATION CONDITIONS ON THE PRODUCTION OF HUMIC ACIDS BY TRICHODERMA, USING AS A SUBSTRATE EFB"

AUTHORS: INGRI JULIETH MANCILLA CORZO**

KEYWORDS: Humic acids, biomass, EFB, agroindustrial residue, solid state fermentation (FES), *Trichoderma reesei*, scanning electron microscopy (SEM).

DESCRIPTION

Humic acids (AH) are a group of organic substances extracted chemically from non-renewable sources such as peat and coal. Due to their applications in agriculture, industry, environment and biomedicine, they have attracted the attention of several researchers, generating the need to develop biotechnological processes for their production and sustainable production, being the solid state fermentation (FES) a promising way to imitate the natural habitat of fungi.

The FES was carried out in six columns of fixed bed, in a microbiological incubator at 30 °C, with air injection of 0.4 L/min, during a period of 120 hours. The daily production variables of AH, cellular protein, glucose consumption, pH, humidity and oxygen transfer rate, using as substrate two sources of EFB (Bahia and Agropalma).

The results showed that the highest productivity in terms of the product and biomass in Agropalma was in the fibers with lipid with values of 4.71 mg AH/100 g EFB * h) and 0.06 mg cellular protein/100 g EFB*h. In the case of Bahia, the highest productivity in terms of product was in the fibers without lipid (2.28 mg/100g of EFB*h) and in terms of biomass it was in the fibers with lipid (0.07 mg of cellular protein/100g of EFB*h). The productivity related to the production of AH was much higher than that of biomass, indicating efficient use of the EFB. From microscopic images of the growth and sporulation of *T. reesei* in EFB together with the production rates of AH, they indicated that they are related.

* DegreeWork

** Faculty of Physical-Chemical Engineering. School of Chemical Engineering. Director: Luis Javier López Giraldo, Doctor in Food Science - Process Science. Co-director: María Helena Andrade Santana, Doctor in Mechanical Engineering

INTRODUCCIÓN

Las sustancias húmicas (SH) son productos de la degradación oxidativa y subsecuente polimerización de la materia orgánica tanto vegetal como animal¹ realizada por hongos y actinomicetos. Estas sustancias componen del 85 al 90% de la reserva total de carbono orgánico presente en el suelo, siendo extraídas del carbón mineral y turbas (fuentes no renovables)². Estudios actuales han mostrado innumerables aplicaciones para las SH en áreas como la agricultura, construcción civil, medio ambiente y medicina.³

Las SH están constituidas por una mezcla de compuestos con elevada masa molar y variedad de grupos funcionales en su estructura⁴, estando así clasificadas con base en su solubilidad en tres grupos: ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) y huminas residuales (HR)⁵. Algunas de las principales características de esta clasificación son las siguientes: los AF son solubles en cualquier valor de pH, las HR son una fracción insoluble en medio acuoso y los AH son solubles en medios alcalinos (pH > 2) e insolubles en medio ácido, ocurriendo precipitación y formación de producto oscuro y amorfo.⁶

¹ MOTTA, Fernanda y SANTANA, Maria Helena. Solid-state fermentation for humic acids production by a *Trichoderma reesei* strain using an oil palm empty fruit bunch as the substrate. En: *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Marzo, 2014. vol 172, no 4, p. 2205–2217.

² TROMPOWSKY, Patrick.M. Síntese e caracterização de substâncias semelhantes aos ácidos húmicos de carvão de eucalipto e sua interação com diclorofenol, cálcio, manganês e alumínio. Tesis de maestría. Brasil: Facultad de ingeniería química, Universidad Federal de Viçosa, Brasil, 2006, 20 p.

³ PEÑA-MENDEZ, Eladia, HAVEL, Josef y PATOCKA, Jiri. Humic substances – compounds of still unknown structure: application in agriculture industry environment and biomedicine. En: *J Appl Biomed*. Enero, 2005. vol. 3, p. 13-24.

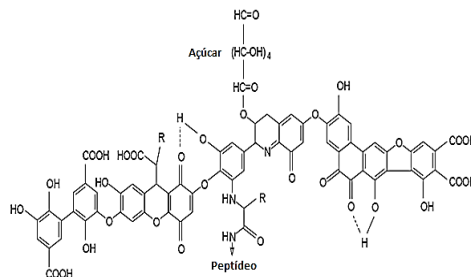
⁴ RAUEN, Tower, GRANDE, Dalter y SERRA, Miser. Tensoatividade de ácido húmico de procedência distintas. En: *Química Nova*. Marzo, 2002. vol. 25, no. 6, p. 1-7.

⁵ SENESI, Nicola y LOFFREDO, Elisabetta. Soil humic substances. En: Hofrichter M, Steinbuechel A. *Biopolymers. Lignin, humic substances and coal*. Enero, 2001. vol. 3, p. 247–99.

⁶ LAIN, Chang, y CHEN, Ciyai. Removal of metal ions and humic acid from water by iron-coated filter media. En: *Chemosphere*. Agosto, 2001. vol. 44, no. 5, p. 1177-1184.

Los AH son macromoléculas compuestas, las cuales están constituidas por diferentes estructuras aromáticas y alifáticas con funciones fenólicas y carboxílicas. Tales estructuras se unen a los péptidos y otros componentes que contienen nitrógeno y carbohidratos en pequeñas cantidades (Hayes *et al.*, 2001). Los contenidos de AH existentes dependen de la materia orgánica, grado de humidificación, tratamiento recibido, condiciones ambientales y de la cadena carbónica.⁷(Figura 1).

Figura 1. Estructura de los AH



Los AH son el grupo más estudiado de entre estas SH, conllevado al desarrollo de nuevas investigaciones debido a sus características, propiedades y aplicaciones en la agricultura, la industria, el medio ambiente y la biomedicina⁸. En el caso de la agricultura estos ácidos ayudan a descomponer la arcilla en suelos compactados, facilitan la transferencia de micronutrientes del suelo a las plantas, aumentan las tasas de germinación de las semillas, mejoran la retención de agua y favorecen el desarrollo de poblaciones de microflora en el suelo, reduciendo la evaporación de agua⁹. Según ¹⁰, los AH provenientes de residuos lignocelulósicos de la caña de azúcar, son estimuladores del crecimiento de plantas, promoviendo el crecimiento

⁷ RAUEN, GRANDO, SERRA, Óp. Cit.

⁸ PEÑA-MÉNDEZ, HAVEL PATOCKA, Óp. Cit.

⁹ Ibid.

¹⁰ BUSATO, Jader, et al. Humic substances isolated from residues of sugar cane industry as root growth promoter. En: Science Agriculture. Marzo, 2010. vol. 67, no. 2, p. 206-212.

radial.

Sin embargo, el objetivo principal y de mayor interés en los AH está relacionado con su uso en el área de la medicina, debido a sus propiedades antivirales, estrogénicas y desmutagénicas; sus propiedades antiinflamatorias; su influencia en la coagulación sanguínea¹¹, en la neutralización y eliminación de toxinas; en la prevención de problemas estomacales e intestinales, entre otros¹². Van Rensburg¹³, usó AH para un estudio piloto con el fin de obtener un tratamiento para la inflamación y osteoartritis de las rodillas; los pacientes que fueron tratados con AH presentaron mejorías significativas en relación a los que fueron tratados con placebo. Litvin¹⁴ llevaron a cabo un proceso químico de dos pasos con el fin de preparar AH de manera sintética con propiedades similares a los de origen natural.

Al igual que las SH, los AH son obtenidos de fuentes no renovables siendo la leonardita una de ellas, conteniendo 40% de estos ácidos; otras fuentes importantes son la turba negra y el carbón pardo, los cuales contienen cerca del 10% de AH¹⁵. No obstante, la recolección de los AH de aquellas fuentes resulta ser un proceso costoso, dispendioso y ambiental y ecológicamente poco viable, ya que al momento de extraer dichos ácidos de las turbas se presenta daños de las turberas, las cuales proporcionan fuentes de almacenamiento de carbono y ayudan a evitar inundaciones.¹⁶

¹¹ PEÑA-MÉNDEZ, HAVEL PATOCKA, Óp. Cit.

¹² KLOCKING, Renate y HELBIG, Bjorn. Medical Aspects and Applications of humic substances. En: Germany: Wiley VCH. Enero, 2005. vol.15, p. 3-16.

¹³ VAN, Rensburg Ce, et al. Investigation of the anti-HIV properties of oxihumate. En: Chemotherapy. Julio, 2002. vol. 48, p. 138-143.

¹⁴ LITVIN, Valentina, GALAGAN, Rostslav y MINAEV, Boris. Synthesis and properties of synthetic analogs of natural humic acids. En: Russian Journal of Applied Chemistry. Febrero, 2012. vol. 85, p. 296-302.

¹⁵ LESTER, Dylan. Shopping for humic acids [online]. University of Guelph [Guelph, Canada]: Mar. 2009 [Cited 20 June 2017]. Availed from internet: <<http://jhbiotech.com/Publications/Pub%2058.pdf>>. LESTER, D. 2009. Shopping for humic acids. Available from: <http://jhbiotech.com/Publications/Pub%2058.pdf>. Accessed June 20 2017.

¹⁶ ALEXANDER, Richard . Improving gardeners' understanding of water management in peat and peat-free multi-purpose growing media. [online]. Acta Horticulturae- Agris since [Guelph, Canada]: May. 2014 [Cited 20 January 2017]. Availed from internet:<<http://agris.fao.org/agrissearch/search.do?recordID=US201400154251>>.

Pese a todo lo anterior, en la literatura son pocas las investigaciones relacionadas con la producción de los AH mediante la implementación de procesos biotecnológicos. Para nuestro caso, se tiene una brecha importante puesto que se requiere una producción sostenible, escalable y controlada.

La fermentación en estado sólido (FES) surgió como alternativa tecnológica para la producción de combustibles, alimentos y productos farmacéuticos y químicos, que debido a la ampliación de conocimientos en el área de la bioquímica (modelamiento matemático y diseño de reactores) ha conllevado al desarrollo de nuevas alternativas de producción de este tipo de bienes usando biomasa residual de otros procesos productivos.¹⁷

En este contexto, el residuo agroindustrial del proceso de extracción de aceite de palma llamado EFB (Empty frunch bunch) o raquis de palma como es bien conocido en nuestro país, es un subproducto del procesamiento de aceite de palma obtenido luego de someter los frutos frescos a un prensado. Este residuo representa el 23% del peso total de los racimos que ingresan al proceso¹⁸. Debido al contenido de material lignocelulósico (45-50% de celulosa y 25-35 % entre hemicelulosa y lignina), el raquis de palma puede convertirse en una fuente renovable para su uso como sustrato en procesos fermentativos, siendo esta una alternativa que le agrega valor a este residuo que es subutilizado o no utilizado por la industria de aceites¹⁹ (figura 2).

En este escenario, la producción de AH usando EFB se presenta como una alternativa promisoriosa debido a la alta producción mundial de la palma aceitera, la cual se duplicó en la última década, esperándose que se pueda volver a duplicar

¹⁷ MOTTA, SANTANA, 2013. Óp. Cit.

¹⁸ LAW, Kwei-Nam, DAUD, Wan y GHAZALI, Arniza. Morphological and chemical nature of fiber strands of oil palm empty-fruit-bunch (OPEFB). En: BioResources. Marzo, 2007. vol 2, no. 3, p. 351–362.

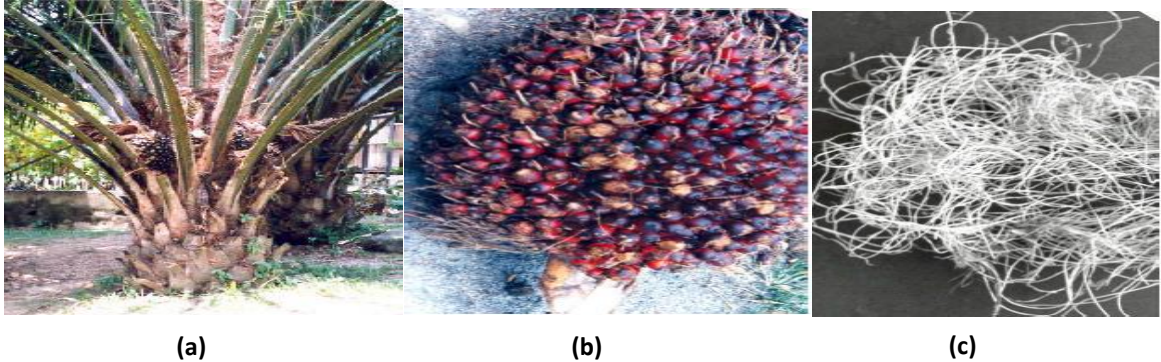
¹⁹ MOTTA, SANTANA, 2013. Óp. Cit.

para el 2020²⁰. La palma de aceite es la oleaginosa más productiva del planeta; una hectárea sembrada produce entre 6 a 10 veces más aceite que las demás. Colombia es el cuarto productor de aceite de palma en el mundo y el primero en América con 483.733 hectáreas sembradas en 124 municipios de 20 departamentos, con más de 5000 productores en el país. Sus productos se diseminan en todo el mundo en forma de aceite comestible, alimentos concentrados para animales, cosméticos, pintura, jabones, detergentes, tintas para impresión, velas, entre otros derivados de la biomasa y productos de la oleoquímica (Fedepalma y Cenipalma, 2016) (Anexo A). Produciéndose en el departamento de Santander 173.400 toneladas para el 2015, lo que correspondió al 14 % de la producción nacional (Anexo B). El 2017 arrancó a toda marcha para el sector palmero colombiano que, durante el primer trimestre del año, logró un record histórico de producción de aceite de palma crudo, superando las 422 mil toneladas, 35% superior a la del mismo trimestre del año anterior (Fedepalma, 2017). A partir de lo anterior, es preciso inferir que dicha producción trae consigo gran cantidad de residuo que genera grandes impactos a nivel ambiental, como los relacionados con la descomposición de los mismos, la cual trae consigo un aumento en la proliferación de plagas, existiendo por tanto un interés creciente por agregarle valor al EFB y reducir su impacto en el medio ambiente.²¹

²⁰ LEVIN, Joshua. Sustainable palm oil is on the up [online]. Entrepreneurial development bank [Sumatra, Indonesia]: Mar. 2012 [Cited 03 May 2017] Available from internet: <<http://www.upsides.com/2012/04/13/sustainable-palm-oil-is-on-the-up/>>.

²¹ SUDIYANI, Yanni. Utilization of Biomass Waste Empty Fruit Fruit Bunch Fiber of Palm Oil for Bunch Fiber of Palm Oil for Bioethanol Production. [online]. Energy procedia- Instituto de ciencias [Indonesia]: Mar. 2013 [Cited 23 May 2017]. Available from internet: <<http://www.iges.or.jp/en/bf/pdf/activity20090204/session2/Yanni.pdf>>.

Figura 2. Fotografías de: árbol de palma de aceite (a), racimos de fruto (b) y fibras de EFB.



La FES en la mayoría de los casos requiere del cultivo de hongos filamentosos sobre un sustrato sólido el cual contiene dentro de su estructura, una fuente de carbono vital para llevar a cabo el proceso de fermentación²². Las especies de *Trichoderma* crecen en el suelo y otros sustratos como la madera, lo que demuestra su adaptabilidad a distintas condiciones ecológicas²³, estas características hacen que este género sea útil en aplicaciones biotecnológicas.

Trichoderma es un género complejo de hongos con importantes aplicaciones en la agricultura y medicina. Esta especie se caracteriza por el rápido crecimiento de las colonias que después de 4 días pasan de un diámetro de 2 a 9cm a 20°C²⁴.

Este hongo es ampliamente utilizado en la industria, ya que produce hidrolasas extracelulares degradantes de sustratos complejos tales como celulosa, quitina, xilano y lignina, que pueden ser útiles para el reciclaje de residuos celulósicos, así

²² MITCHELL, David, et al. A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and interparticle phenomena in solid-state fermentation. En: *Biochem Eng.* Marzo, 2004. vol. J 17, p. 15–26.

²³ DRUZHININA, Irina, et al. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. En: *Nat. Rev. Microbiol.* Octubre, 2011. vol. 9, p. 749-759.

²⁴ SHUSTER, André y SCHMOLL, Monika. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl. En: Microbiol. Biotechnol.* Julio, 2006. vol. 87, p. 787-799.

como para la producción de subproductos útiles²⁵. *T. viride* y *T. reesei* son los hongos más extensamente estudiados en el campo de la degradación del material celulósico, siendo aisladas del suelo, madera en descomposición y materia orgánica vegetal, presentando potencial de degradación de compuestos lignocelulósicos, estas especies producen enzimas hidrolíticas, celulíticas y hemicelulíticas como, por ejemplo, celulasas²⁶, que pueden ser usadas en la hidrólisis de polisacáridos.

Entre los trabajos encontrados con la especie *Trichoderma* están los de El-Sayed²⁷, el cual produjo L-glutaminasa por *T. koningii* utilizando el salvado de trigo como sustrato, y los de Singhanian²⁸ los cuales utilizaron residuos lignocelulósicos y *Trichoderma reesei* para la producción de celulosas, bajo fermentación en estado sólido. UmiKalsom *et al.* (2006) estudiaron el potencial de la producción de AH por medio de FES utilizando EFB, y hongos de la especie *Trichoderma viride*, éstos últimos aislados del propio EFB. En este caso, el objetivo principal fue caracterizar los AH producidos, sin hacer un estudio de las variables importantes en el proceso, encontrándose que este sustrato y el uso de esta especie de hongos, contribuía a la producción de AH.

Motta y Santana (2013) confirmaron el potencial de las especies de *Trichoderma* en la producción de AH usando fibras de EFB como sustrato. En este caso fueron realizadas fermentaciones sumergidas con EFB haciendo uso de la cepa de *T. viride*. Siguiendo con el trabajo de Motta y Santana (2013), debido a que los EFB son fuente de celulosa, hemicelulosa y lignina, estos polímeros también fueron

²⁵ SAMUELS, Gary. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. En: Mycol. Res. Agosto, 1996. vol. 100, p. 923-935.

²⁶ DRUZHININA, SEIDL-SEIBOTH, HERRERA-ESTRELLA, HORWITZ, KENERLEY, MONTE, MUKHERJEE, ZEILINGER, GRIGORIEV; KUBICEK, Op. Cit.

²⁷ EL-SAYED, Ashraf. L-glutaminase production by *Trichoderma koningii* under solid-state fermentation. En: Indian J Microbiol. Septiembre, 2009. vol. 49, p. 243-250.

²⁸ SINGHANIA, Reeta, SUKUMARAN, Rajeev y PANDEY, Ashok. Improved cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF through process optimization. En: Appl Biochem Biotechnol. Julio, 2007. vol. 142, p. 60-70.

usados como fuente de carbono, por separado y combinados, con el fin de determinar los efectos de los sustratos celulósicos al igual que de las fuentes orgánicas de nitrógeno necesarias para el proceso de producción de AH. Como resultados se obtuvo una mayor producción en las culturas con EFB y en aquellas con la mezcla de los tres polímeros, demostrando que la presencia de celulosa, hemicelulosa y lignina tiene un efecto sinérgico puesto que cada uno de esos polímeros por separado produjo una menor cantidad de AH.

Para el caso de fermentación en estado sumergido, se realizó la comparación entre dos especies *Trichoderma viride* y *Trichoderma reesei*, esta última presentó una producción tres veces mayor de AH ($143,1 \pm 3,0 \text{ mg L}^{-1}$) que la *T. viride* ($58,8 \pm 1,4 \text{ mg L}^{-1}$), estos resultados se deben a que la especie *T. reesei* utiliza mejor la fuente de carbono proveniente del sustrato y la energía disponible cuando es expuesta a una mezcla de materia orgánica, debido a la expresión de genes envueltos en la degradación de la fuente de carbono²⁹.

En el cultivo en estado sólido (FES) con EFB usando *Trichoderma reesei* para producir AH, ocurrió una esporulación rápida, acompañada de un consumo significativo de oxígeno, presentando así una mayor producción de AH en comparación con la producción de biomasa, indicando un consumo del sustrato. Es así como el cultivo en estado sólido fue la mejor alternativa para la producción de AH, debido a que asemeja mejor el hábitat natural de estos hongos³⁰.

Las condiciones de fermentación con este hongo son altamente aeróbicas, conllevando a que la transferencia de oxígeno sea uno de los parámetros y

²⁹ SEIBOTH, Bernhard, IVANOVA, Christa y SEIDL-SEIBOTH, Verena. *Trichoderma reesei*: A Fungal Enzyme Producer for Cellulosic Biofuels. Energy engineering [Minas Gerais, Brasil]: Sep. 2011 [Cited 03 May 2017]. Available from internet: <<http://www.intechopen.com/books/biofuel-production-recent-developments-and-prospects/trichoderma-reeseia-fungal-enzyme-producer-for-cellulosic-biofuels>>.

³⁰ MOTTA, Fernanda y SANTANA, Maria Helena. Solid-state fermentation for humic acids production by a *Trichoderma reesei* strain using an oil palm empty fruit bunch as the substrate. En: Applied Biochemistry and Biotechnology. Marzo, 2014. vol 172, no 4, p. 2205–2217.

fenómenos más importantes para poder mantener la actividad microbiana dentro del proceso³¹, y el mayor factor limitante en la tasa de conversión biológica.

De esta manera, este trabajo tiene como objetivo estudiar la influencia de las condiciones de fermentación en estado sólido (FES), como lo fueron pH, humedad, tasa de transferencia de oxígeno y glucosa consumida durante el proceso, cuantificando así la producción de AH y crecimiento fúngico durante un periodo de fermentación de 120 horas. A su vez se realizó el estudio de la composición de las fibras y lípidos residuales que permanecen después del proceso de extracción en las fibras de EFB, para la producción de AH por *T. reesei*, a partir del residuo agroindustrial de dos industrias de palma: Agropalma® (Limeira- SP) y la cooperativa de pequeñas industrias productoras de aceite de palmera (Muniz Ferreira-Sergipe).

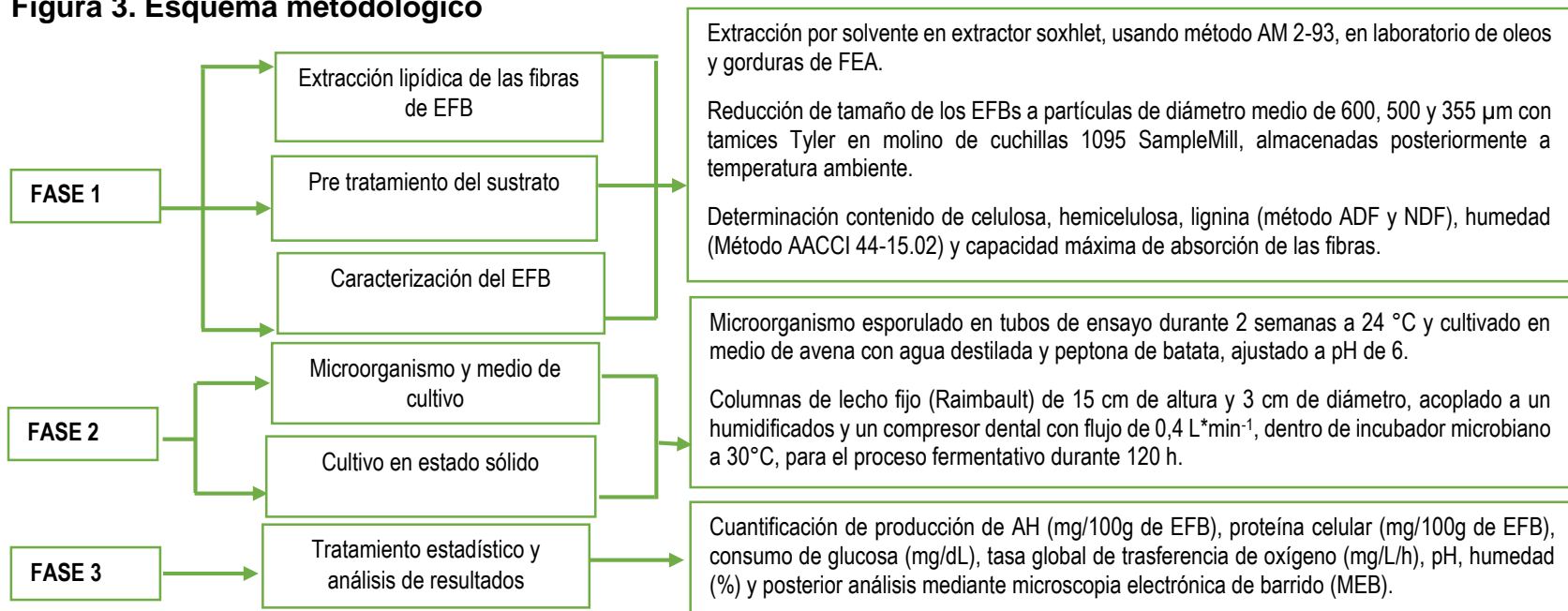
³¹ VERMA, Mausam, *et al.* Dissolved oxygen as principal parameter for conidia production of biocontrol fungi *Trichoderma viride* in non-Newtonian wastewater. En: J. Ind. Microbiol. Biotechnol. Diciembre 2006. vol. 33, p. 941-952.

1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA

1.1 DESARROLLO EXPERIMENTAL

El esquema metodológico mostrado en la figura 3 representa el desarrollo experimental que siguió el presente trabajo.

Figura 3. Esquema metodológico



1.2 CARACTERIZACIÓN DEL EFB

1.2.1 Residuo sólido (EFB). Las muestras de EmptyFruitBunch (EFB) fueron brindadas por las industrias de Agropalma (Limeira- SP) y por la cooperativa de pequeñas industrias productoras de aceite de palma (Muniz Ferreira-Bahía).

1.2.2 Cuantificación de celulosa, hemicelulosa y lignina. La cuantificación de celulosa, hemicelulosa y lignina se realizó usando los métodos *neutral detergentfiber (NDF)* y *acid detergentfiber (ADF)* de la *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*, en el Laboratorio de Análisis y Simulación Tecnológica (LAST), en la Universidad Federal de São Carlos, Campus Araras-SP.

1.2.3 Tamaño de las partículas. Las fibras utilizadas en el proceso de FES fueron trituradas en un triturador, posteriormente tamizadas y clasificadas de acuerdo con el diámetro medio de las partículas. El diámetro medio fue determinado por análisis granulométrico en tamices Bertel, con tamaños de malla de 24, 28, 32 y 42, equivalentes a tamaños de abertura de 710, 600, 500 y 355 μm , respectivamente.

1.2.4 Humedad. Las muestras fueron almacenadas a 5°C, y en triplicado fueron caracterizados los contenidos de humedad de acuerdo con los métodos AACCI 44-15.02 (AACCI, 2010).

1.2.5 Capacidad máxima de absorción del agua. La capacidad máxima de absorción de agua fue estimada sumergiendo las partículas de EFB por medio de sistema de goteo en agua destilada a 30 °C hasta conseguir un estado de saturación. Posteriormente esas fibras fueron colocadas en una estufa Merse® a 105 °C durante 24 horas.

Después de este periodo las muestras fueron puestas en un desecador, siendo pesadas posteriormente. La capacidad máxima de absorción del agua fue estimada de acuerdo a la ecuación 1

$$Absorción_{max} (\%): \frac{(Ph - Ps)}{Ph} * 100 \quad (1)$$

Donde:

Ps: Peso de la muestra seca; Ph: Peso de la muestra húmeda

1.3 PROCESO DE EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS EN LAS FIBRAS DE EFB

1.3.1 Extracción de lípidos en las fibras de EFB. La extracción de lípidos remanentes en el residuo se realizó por solvente, usando éter de petróleo en un extractor Soxhlet de acuerdo con el método AM 2-93³².

1.4 CULTIVO DEL MICROORGANISMO (*T. reesei*)

1.4.1 Microorganismos y mantenimiento. El microorganismo utilizado fue *Trichoderma* de la especie *reesei*, puesto que fue la que presentó mejor desempeño en la fermentación de EFB, según el trabajo de Motta y Santana, (2012).

³² AOCS. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society. New York: Campaing, 2009. 15 p.

La cepa de *Trichoderma reesei* usada en el proceso de fermentación proviene de la colección de culturas tropicales (CCT) Campinas, São Paulo- Brasil. Las culturas fueron esporuladas en tubos de ensayo inclinados que contenían un medio agar dextrosa, durante un periodo de dos semanas a 24 °C hasta tener gran número de esporas. Fueron adicionados 25 mL de solución estéril de 20% de glicerol en agua a cada tubo. Esta mezcla fue almacenada en criotubos de 1,2 mL a -70 °C.

1.4.2 Medio de cultivo de microorganismos. El medio de cultivo utilizado para *T. reesei*, fue desarrollado en investigaciones realizadas por Motta y Santana (2012), realizado a partir de avena. Se adicionaron 30 g de avena en 1 litro de agua, el cual fue hervido a 90°C, durante 90 minutos. Esta suspensión se filtró, y se agregó agua destilada al filtrado para obtener un volumen final de 1 litro. Al final de estas etapas es agregado 5 gr de peptona de batata y el medio es ajustado hasta un pH de 6,0. Los microorganismos almacenados en criotubos fueron cultivados en Erlenmeyer, los cuales contenían 300 mL de medio de cultura de avena más 0,4 ml de solución de esporas en suspensión, y posteriormente se incubaron durante un periodo de 120 horas.

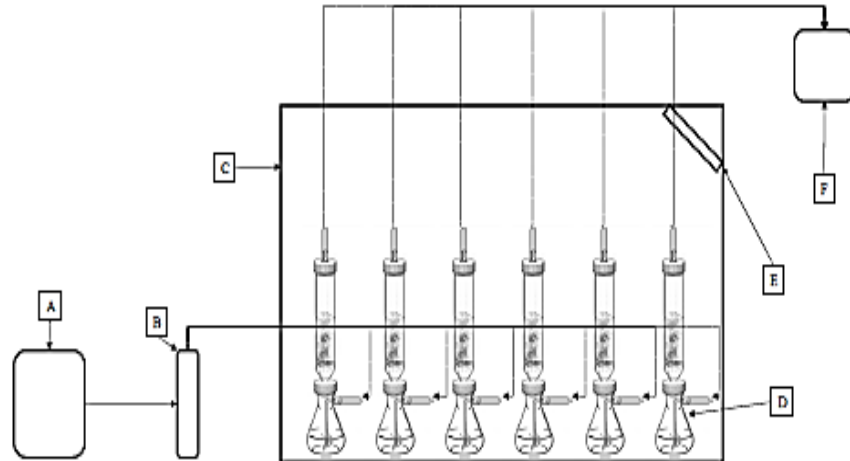
1.5 CULTIVO EN ESTADO SÓLIDO

Las FES fueron realizadas en bioreactores tipo “columna de Raimbault”, de acuerdo a lo establecido por el grupo de Macedo (2006). El sistema estaba compuesto de 6 columnas de vidrio cilíndricas de 15 cm de altura y 3 cm de diámetro, acopladas a un humidificador de aire en la entrada de las columnas (Figura 4). El sistema se ventiló con aire saturado suministrado por un compresor dental Schulz y se humidificó burbujeando agua antes de entrar en la columna.

La razón de aire en la entrada de la columna fue ajustada a 0,4 L/ min y monitoreado por rotámetros. Para controlar la temperatura, las columnas se colocaron en un incubador bacteriológico (estufa microbiológica) a 30°C, utilizando un ventilador interno para homogeneizar mejor la temperatura. La concentración de oxígeno disuelto se midió previamente después de pasar a través del humidificador primario para determinar su concentración en la entrada de la columna y durante la fermentación a la salida de las columnas; esta medida fue realizada con un oxímetro YSI®Model 5300, Yellow Springs, EE.UU.

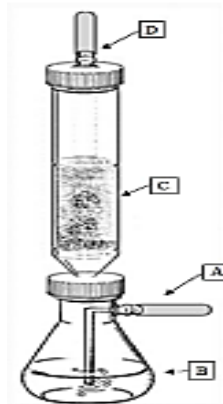
Las columnas fueron esterilizadas previamente en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, seguidamente fueron introducidos dentro de ellas, 30 g de medio de cultura preparado de la siguiente manera: 100 g de EFB con 100% (v/m) de agua destilada, 2,5% de peptona (m/m), 1% de (NH₄)₂SO₄ (m/m), 0,2 % de K₂HPO₄ (m/m), el pH fue ajustado a 6,0, dicha mezcla de sustrato fue inoculado con 1 mL de inóculo (10⁶ – 10⁷ esporos) que se preparó como se describe en el ítem 1.4.1 (Motta y Santana, 2014) (Figura 5). Las columnas fueron retiradas junto con las muestras en intervalos de 24 horas durante un periodo total de fermentación de 120 horas, para sus respectivos análisis.

Figura 4. Esquema experimental de la fermentación en columna de Raimbault.
A: Compresor dental; B: rotámetro; C: incubador bacteriológico; D: Columnas empacadas y aire humidificador; E: Ventilador; F: oxímetro



Fuente: MOTTA, Fernanda y SANTANA, Maria Helena. Solid-state fermentation for humic acids production by a *Trichoderma reesei* strain using an oil palm empty fruit bunch as the substrate. En: *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Marzo, 2014. vol 172, no 4, p. 2205–2217.

Figura 5. Columnas empacadas con sistema de aireación forzada; A: Entrada de aire humedecido; B: Agua destilada; C: Lecho de EFB; D: Salida de aire de las columnas



Fuente: MOTTA, Fernanda y SANTANA, Maria Helena. Solid-state fermentation for humic acids production by a *Trichoderma reesei* strain using an oil palm empty fruit bunch as the substrate. En: *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Marzo, 2014. vol 172, no 4, p. 2205–2217.

1.6 CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO FÚNGICO Y PRODUCCIÓN DE AH

1.6.1 Contenido de humedad. El contenido de humedad se determinó secando una cantidad conocida de muestras fermentadas hasta un peso constante en un horno Fanem® a 105 °C durante 24 h. Por medio de la ecuación 2, fueron realizados los cálculos.

$$Ubh (\%): \frac{(M1 - M2)}{M1} * 100 \quad (2)$$

Ubh: Humedad en base húmeda

M1: Masa antes del secado (gr)

M2: Masa después del secado (gr)

1.6.2 Cuantificación de proteínas. La estimación indirecta de la biomasa fúngica se realizó mediante la determinación de la concentración de proteínas con el método propuesto por Callow y Ju³³ para cuantificar sólo proteínas celulares. Las muestras de cultivo (3 gr) fueron mezcladas con 3 mL de agua destilada, pH 7 y se agitó vigorosamente en un equipo vortex. A continuación, se centrifugó a 1000 rpm en una centrifuga Hettich- ROTINA 380R, durante 10 minutos para obtener pellets. Los sobrenadantes fueron recogidos para su posterior análisis y los pellets fueron re-suspendidos y lavados dos veces con agua desionizada.

Después de cada paso de lavado y para la liberación de las proteínas intercelulares, los pellets se suspendieron en 3 mL de NaOH 1N y se calentaron a 100°C durante 10 minutos. Después de enfriar, la solución fue centrifugada a 10000 rpm durante 10 minutos para eliminar restos celulares y otros sólidos; los

³³ CALLOW, Nicholas y JU, Lu-Kwang. Promoting pellet growth of *Trichoderma reesei* Rut C30 by surfactants for easy separation and enhanced cellulase production. En: *Enzyme Microb Technol.* Mayo, 2012. vol. 50, p. 311-317.

sobrenadantes se recogieron entonces, y se determinaron sus concentraciones de proteína. Las determinaciones fueron hechas por medio de kit comercial Pierce BCA (ThermoScientific, USA), el cual emplea el método de Lowry. Allí fueron adicionados 2 ml de reactivo patrón a 0,1mL de muestra, la mezcla fue calentada en un baño termostático a 60 °C durante 15 minutos. Después del enfriamiento hasta temperatura ambiente, fue realizada la lectura de la absorbancia a 562 nm. Se construyeron curvas estándar con albumina de suero bovino (proteína comercial) (Anexo C, figura C1).

1.6.3 Cuantificación de AH. Siguiendo los métodos adaptados por Badis³⁴, las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 min (Centrífuga Rotina 380 R, HettichZentrifugen, Tuttlingen, Alemania) y las fracciones sobrenadantes se filtraron usando microfiltro de jeringa (Thomapor®-Membranfilter, 5FP 025/1).

Las fracciones de sobrenadante (2 ml) fueron diluidas cinco veces con solución de NaOH 0,5 M y se midieron las absorbancias a 350 nm y pH 4,5±0,01.

Se obtuvieron curvas estándar a partir de las absorbancias a 350 nm de concentraciones conocidas de AH comerciales (Sigma-Aldrich, Reino Unido) en una solución de NaOH 0,5 M, pH 4,5 ± 0,01, (Anexo C, figura C2).

1.6.4 Tasa global de transferencia de oxígeno. La concentración de oxígeno a la entrada y salida de las columnas fue medida por oxímetro (YSI®Model 5300 Spring, EEUU) calibrado en relación a la temperatura y humedad utilizadas. El cálculo de la tasa de transferencia de oxígeno fue realizado por medio de un balance de oxígeno en la columna de acuerdo con la ecuación 3 adoptado de Doran³⁵.

³⁴ BADIS, Abdel, et al. Removal of natural humic acids by decolorizing actinomycetes isolated from different soils (Algeria) for application in water purification. En: Desalination. Septiembre, 2010. vol. 2, no. 259, p. 216-222.

³⁵ DORAN, Pauline. Bioprocess Engineering Principles. New York: Academic Press, 1995. 417 p.

$$No2 = \frac{(Fin*Co2in - Fout*Co2out)}{VL} \quad (3)$$

Donde Fin y Fout son el flujo de aire en la entrada y la salida, respectivamente, que tienen el mismo valor en este proceso; CO2in y CO2out son las concentraciones de oxígeno en la columna de entrada y salida, respectivamente; y VL es el volumen de líquido en el fermentador, que se calculó considerando el contenido de humedad (hallado en el punto 1.6.1).

1.6.5 pH. El pH del medio se midió empleando un pHmetro después de haber agitado vigorosamente 3 g de medio fermentado y 5 ml de agua destilada, en equipos vortex.

1.6.6 Glucosa. La concentración de glucosa fue determinada usando el kit enzimático glucosa oxidasa, LABORLAB. Fueron adicionados 10 µL de muestra a 1 mL de reactivo patrón y calentados a 37 °C por 5 minutos.

Después del enfriamiento hasta temperatura ambiente, fue realizada la lectura de la absorbancia a 505nm; dichos ensayos fueron realizados en triplicado.

1.7 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (MEB)

Las muestras fueron examinadas por microscopía electrónica de barrido (Leo 440i, LEO ElectronMicroscopy, Inglaterra) en modo de alto vacío con una tensión de aceleración de 10 kV. Los polvos se espolvorearon sobre trozos de SEM recubiertos con cinta adhesiva de carbono.

1.8 RECUENTO DE ESPORAS

Las esporas se enumeraron contando directamente con una cámara de Neubauer para comparar la concentración inicial de esporas inoculadas con la concentración de esporas al final de la fermentación de cada una de las fibras usadas.

1.9 PRODUCTIVIDAD DE LA FERMENTACIÓN

La evaluación de la productividad en el proceso de fermentación se realizó en términos de la biomasa y el producto, de acuerdo con la ecuación 4 y la ecuación 5, respectivamente.

$$Px: \frac{X_{max} - X_o}{t_f} \quad (4)$$

$$Pp: \frac{P_{max} - P_o}{t_f} \quad (5)$$

Donde:

Px: productividad de la fermentación en términos de la biomasa fúngica.

Xo y Xmax: concentraciones en g /100 g de EFB de biomasa inicial y máxima alcanzadas en el tiempo tf (horas).

Pp: productividad de la fermentación en términos del producto (HA).

Po y Pmax: concentraciones en g /100 g de EFB de producto inicial y máxima alcanzadas en el tiempo tf (horas).

2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1 CARACTERIZACIÓN LIGNOCELULOSICA DEL SUSTATO SÓLIDO

En los procesos de FES, es usado como sustrato un material que sea no soluble con el fin de que actúe tanto como soporte físico, así como fuente de nutrientes durante los procesos de fermentación, siendo los residuos agroindustriales obtenidos luego del procesamiento de actividades agrícolas una alternativa.³⁶

La tabla 1 muestra la caracterización lignocelulósica de los dos EFBs usados en la fermentación, en los cuales se evidencia la presencia en las fibras de tres componentes lignocelulósicos (celulosa, hemicelulosa y lignina); presentándose mayores contenidos de material lignocelulósico en las fibras de Agropalma en comparación con las de Bahía. Las proporciones en peso de celulosa: hemicelulosa: lignina fueron de 1,3: 0,8: 1 para el caso de Agropalma y de 1,3: 1,1: 1 para el caso de Bahía, respectivamente.

Tabla 1. Composición de los compuestos lignocelulósicos de los EFBs de Agropalma y de la Cooperativa de industrias de Bahía

EFB	Celulosa (%m/m)	Hemicelulosa (%m/m)	Lignina (%m/m)
Agropalma	31,9	19,8	24,1
Bahía	17,9	15,2	13,7

En el mismo contexto, la utilización de un sustrato sólido como lo es el caso del

³⁶ MANPREET, Sachin, et al. Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. En: Malaysian Journal of Microbiology. Enero, 2005. vol. 2, p. 1-9.

EFB trae consigo también otros factores que pueden afectar la eficiencia del proceso, como lo es la accesibilidad del sustrato al microorganismo, en el cual el tamaño de las partículas afectará de manera proporcional la cantidad de superficie accesible por los microorganismos, con un efecto de masa y efecto de película. Según Motta y Santana ³⁷ dependiendo del tamaño de las partículas del sustrato se puede afectar la extensión y tasa de colonización microbiana, la eliminación de CO₂ y la aireación en los sistemas de fermentación, es gracias a ello que el tamaño de las partículas en estos sistemas esta correlacionada estrechamente con la accesibilidad de nutrientes y la disponibilidad de oxígeno (Manpreet *et al.*, 2005).

En investigaciones realizadas por Pandey (1991), la productividad de enzimas en FES utilizando un género de hongos fueron mayores con un sustrato que contenía partículas de tamaño mixto que variaron entre 180 µm a 1,4 Mm, por tal motivo para nuestra investigación fueron usados aquellos tamaños de partícula retenidos en los tamices de 600, 500 y 355 µm de diámetro de poro, estando estos valores entre los sugeridos por la literatura que pueda favorecer la producción de AH.

El contenido de humedad de las fibras de EFB utilizado como sustrato fue del 3,71% y 5,96% para la industria de Bahía y Agropalma, respectivamente. Teniendo en cuenta este valor, se midió la capacidad máxima de absorción de agua de EFB tanto para las fibras con lípidos así como para las fibras sin lípidos obteniéndose los siguientes valores: 73,50 % (Agropalma con lípido); 68,17% (Agropalma sin lípido); 60,78 (Bahía con lípido) y 75,6 % (Bahía sin lípido), significando que por ejemplo en el caso de Agropalma con lípido cada 100 g de EFB es capaz de absorber 73,5 mL de agua destilada, considerando una densidad de agua de 1 g / cm³. Con estos datos se puede apreciar que la humedad de las fibras presentó valores inferiores en comparación con la capacidad máxima de absorción de agua para con cada uno de los casos (Agropalma con y sin lípido, Bahía con y sin lípido),

³⁷ MOTTA, SANTANA, 2014. Op. Cit.

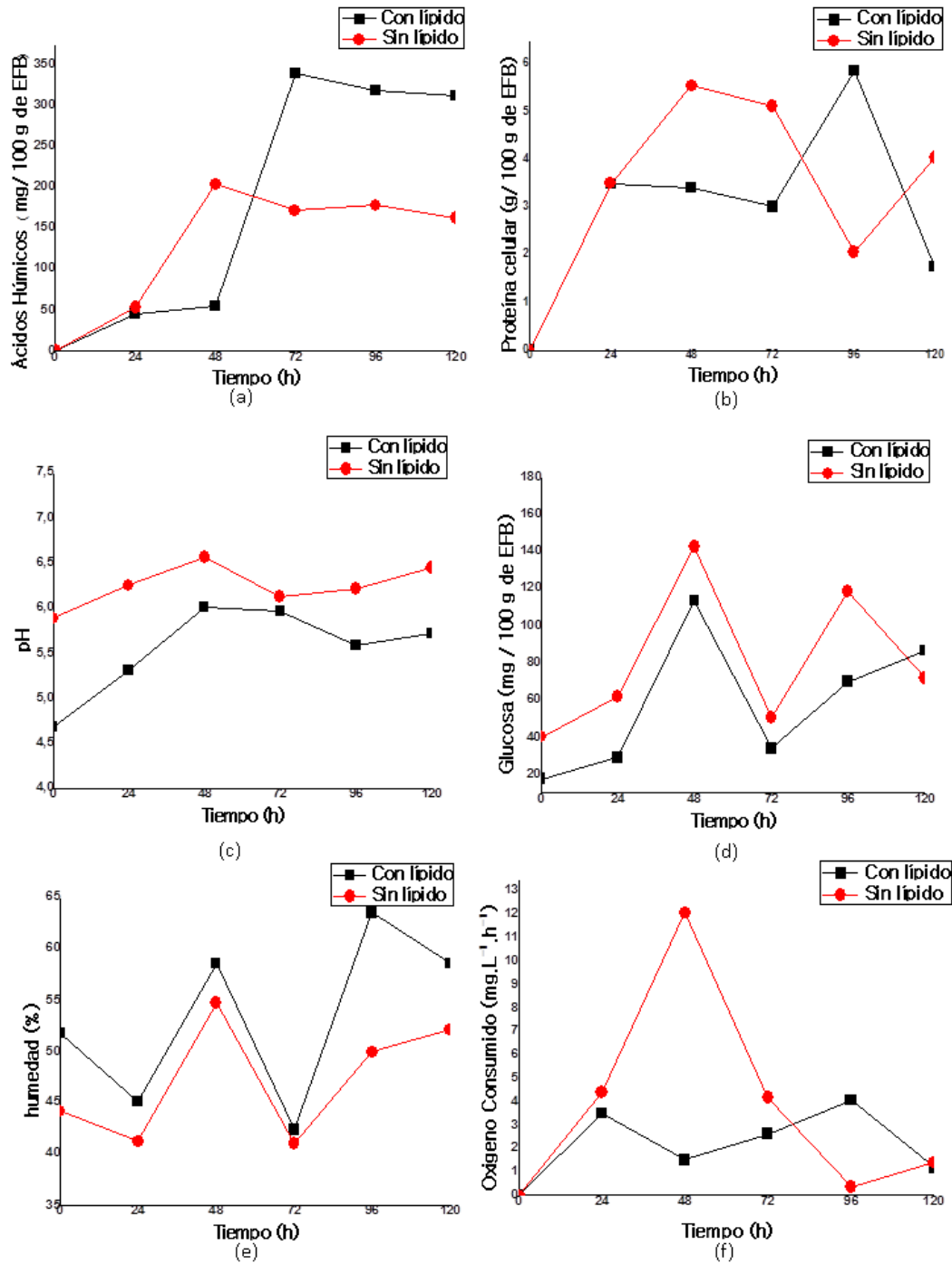
garantizando el principio de cultivo en estado sólido, es decir ausencia de agua libre³⁸.

2.2 CARACTERIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE AH

La figura 6 muestra la caracterización cinética de los cultivos en estado sólido en términos de la producción de AH, proteína celular, pH, glucosa, humedad y consumo de oxígeno para las fibras de EFB con lípidos y aquellas a las cuales se les fue extraído.

³⁸ RAIMBAULT, Maurice y ALAZARD, Didier. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. En: Eur J Appl Microbiol Biotechnol. Septiembre, 1980. vol 9, p. 199–209.

Figura 6. Concentración de AH (a), proteína celular (b), pH (c), concentración de glucosa (d), humedad (e), oxígeno consumido vs tiempo de FES (f) para las fibras de Agropalma



Conforme a los datos presentados en la figura 6 (a) se tiene que existió una producción de AH tanto en las fibras que contenían lípidos así como en las que estaban ausentes. Se obtuvo que la mayor producción de AH fue en las fibras en presencia de lípidos, el cual presentó el mayor valor a las 72 horas de fermentación (250 mg/ 100 g EFB). Luego de este tiempo la producción de AH en ambas fibras permaneció constante hasta el final del periodo de fermentación.

Para el caso del proceso fermentativo en Agropalma las proteínas celulares aumentaron entre 0 y 96 horas de fermentación en las fibras con lípido, presentándose el mejor desempeño en el tiempo de 96 h, con una obtención de 6,0 mg / 100 g de EFB (Figura 6b). En el caso de EFB sin lípido se presentó también un gran crecimiento celular con un valor máximo de 5,5 mg de proteína/ 100 g de EFB.

De acuerdo con la figura 6 (c), el pH medido durante el proceso fermentativo, varió de 4,5 a 6,6, estando aproximadamente dentro del rango de crecimiento fúngico, el cual según Kredics³⁹, varía de 2,0 a 6,0, para el caso de crecimiento fúngico.

La figura 6 (d) representa la cantidad de glucosa presente en el medio. En este caso se observó que el mayor consumo de glucosa se presentó en el tiempo de 72 h tanto para las fibras con y sin lípido, que es en el tiempo cuando ocurrió la mayor producción de AH para ambas condiciones. Infiriéndose, por tanto, que la glucosa presente en el medio, proveniente de la quiebra del residuo lignocelulósico, está asociada con la producción de AH. Esto puede ser evidenciado por ejemplo en la condición de EFB sin lípido (figura 6d), en la cual se observa una mayor concentración de glucosa en el medio, concordando con la baja producción de AH (figura 6a) en esta misma condición. *T. reesei* es considerado en la literatura como uno de los principales productores de endoglucanasas, secretando al menos cinco

³⁹ KREDICS, László, et al. Influence of environmental parameters on Trichoderma strains with biocontrol potential. En: Food Technol Biotechnol. Junio, 2003. Vol. 47, p. 37-42.

tipos de estas enzimas y justificando el aumento del crecimiento en cultivo, ya que el medio de avena está compuesto de β -glucanos que puede ser hidrolizado a glucosa, proporcionando al hongo una fuente de carbono fácilmente utilizable para el crecimiento⁴⁰. Para el caso de la proteína celular, el hongo utiliza preferencialmente el EFB en la presencia de lípidos, evidenciando que este metaboliza el lípido como fuente de carbono para estimular el crecimiento fúngico.

En relación al contenido de humedad (figura 6 e), este se mantuvo en torno del 65%, concordando con Bastos⁴¹ que en el estudio de producción de proteínas alergénicas con *Drechslera (Helminthosporium) monoceras* en un reactor de lecho fijo, recomendaron una humedad de 45 a 65%, como aptas para favorecer una FES. Según Pandey⁴², el bajo contenido de humedad puede conducir a una débil accesibilidad de los nutrientes, que resulta en un crecimiento pobre.

La tasa global de transferencia de oxígeno se presenta en la figura 6 (f); este es el parámetro más importante de la manutención de la actividad microbiana en los procesos de FES. En muchas ocasiones este es un factor limitante que determina la bioconversión, generando bajo crecimiento y formación de producto⁴³. En el tiempo de 96 horas para el EFB con lípido hubo un alto consumo de oxígeno, concordando al mismo tiempo con el mayor crecimiento fúngico (figura 6b). Para el EFB sin lípido en el tiempo de 48 horas se presentó un consumo alto de oxígeno, que también se ve reflejado en el mayor aumento de proteína celular. Según Rajagopalan (1995) cuando se limita el oxígeno en el medio se conlleva a una reducción del crecimiento microbiano, reduciéndose la cantidad de glucosa

⁴⁰ HERPOËL-GIMBERT, Isabelle, et al. Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains. En: *Biotechnology for Biofuels*. Diciembre, 2008. vol. 1, p. 1-18.

⁴¹ BASTOS, Reinaldo. Transferência de oxigênio no cultivo em estado sólido de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras*. Tesis de maestría. Brasil: Facultad de ingeniería química, Universidad Estatal de Campinas, 2006. 15 p.

⁴² PANDEY, Ashok. Solid-state fermentation. En: *Biochem Eng*. Marzo, 2003. vol. J 13, p. 81-84.

⁴³ THIBAUT, Jules, et al. Reassessment of the estimation of dissolved oxygen concentration profile and KLa in solid-state fermentation. En: *Process Biochemistry*. Marzo, 2000. vol. 36, p. 9-18.

consumida; esto se pudo constatar para el crecimiento del hongo a las 96 horas en el EFB sin lípido, donde se tiene bajo consumo de oxígeno, bajo crecimiento y gran cantidad de glucosa en el medio, significando que ésta no está siendo utilizada en el proceso.

En el caso de Bahía la caracterización cinética del cultivo en estado sólido se presenta en la figura 7, tanto para con las fibras con y sin lípido.

En la figura 7 (a), se aprecia que la mayor producción de ácidos húmicos se presenta en el cultivo de EFB sin lípido, en el tiempo de 48 horas con una concentración máxima de 110 mg/ 100 g de EFB. En el crecimiento fúngico observado en la figura 7 (b) se dio la mayor producción en el EFB en presencia de lípido en el tiempo de 72 horas con un valor de 7,5 mg / 100g de EFB.

Los valores de pH para las fibras de Bahía no presentaron mucha variación a lo largo del tiempo, manteniéndose entre 5 y 6,5, concordando con los datos registrados por Motta y Santana (2014) en los cuales el pH varió entre 4,55 a 5,87 (figura 7 c).

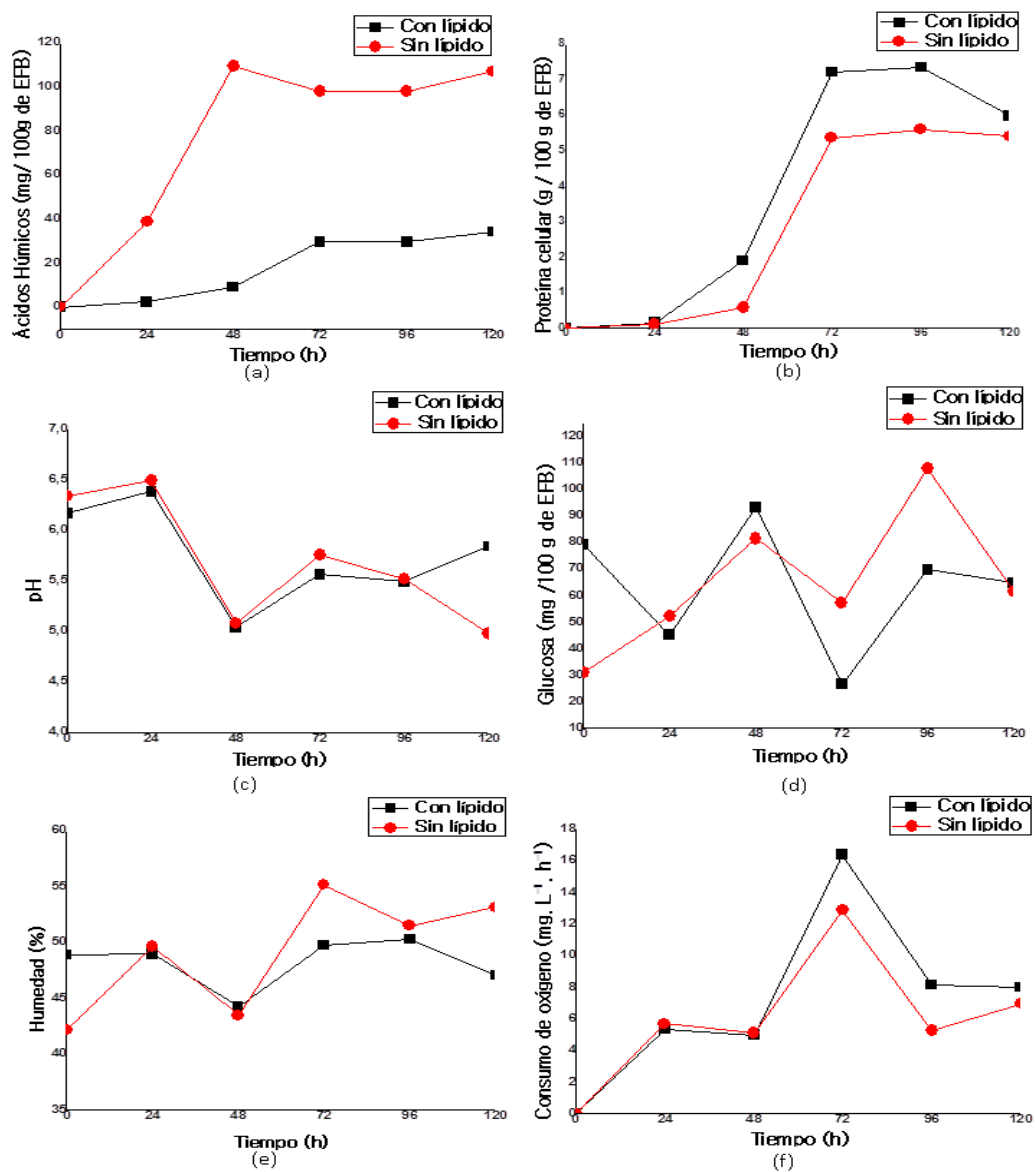
La figura 7 (d), representa la cantidad de glucosa presente en el medio, mostrando que, en el tiempo de 72 horas en el EFB con lípido, hubo una caída de la concentración de glucosa presente, indicando que ella fue consumida por el hongo para su crecimiento, lo que es confirmado en la figura 7 (b) en el EFB con lípido, donde hubo el mejor desempeño de crecimiento de la biomasa.

La figura 7 (e) representa la variación de la humedad, la cual no presentó mucha variación en las primeras horas del cultivo (42 a 47%) tanto para las fibras con y sin lípido.

Respecto al consumo de oxígeno (figura 7 f), este fue mayor en los periodos donde

hubo mayor crecimiento celular, tanto en el EFB con y sin lípido, dado en el tiempo de 72 horas para ambas condiciones. Al final de este cultivo se presentó un aumento de la cantidad de oxígeno en el medio que se puede indicar una etapa de muerte celular.

Figura 7. Concentración de AH, proteína celular, pH, concentración de glucosa, humedad, oxígeno consumido vs tiempo de FES para las fibras de Bahía



Realizando una comparación de los resultados obtenidos con las fibras de Agropalma y las de bahía (figura 6 y 7), se puede apreciar que para el caso de la producción de AH en el caso de Agropalma con lípido, se presentó una producción 67,8% mayor que la presentada en las fibras de Bahía sin lípido. Esto puede ser explicado a partir del contenido lignocelulósico presente en las fibras de ambas compañías, ya que según Motta y Santana⁴⁴ la mayor concentración de celulosa, hemicelulosa y lignina en el medio se asociada a la mayor tasa de síntesis de HA por *Trichoderma*, siendo este el caso de las fibras de Agropalma. Comparando estos dos resultados con los de Motta y Santana (2014) para FES, pero usando EFB proveniente de la industria OPALMA – Bahía (producción máxima de 85 mg de AH/100 g de EFB), se evidencia una producción 75% mayor para las fibras de Agropalma con lípido y de 22% si se compara con las de Bahía, respecto a lo obtenido por Motta y Santana.⁴⁵

En relación al crecimiento fúngico cuantificado por medio de la proteína celular, se obtuvo un crecimiento mayor del 22,7% para el caso del EFB de Bahía con lípido en relación con las de Agropalma con lípido. Esto puede ser explicado a partir de la presencia de ácidos grasos libres (AGL) que para el caso de Bahía fue de 51, 63% y en caso de Agropalma de 9,31 %. La presencia de estos AGL en las muestras pueden indicar la acción de enzimas lipolíticas, que provocan la hidrólisis de los glicéridos del fruto, y por consecuencia se liberan ácidos grasos⁴⁶. De esta manera, un material con elevado contenido de ácidos grasos indica una peor calidad y estabilidad del aceite debido posiblemente al tipo de extracción usado por cada empresa y el manejo de estos residuos, evidenciándose esto en la baja producción de AH. Por otro lado, un material con un alto contenido de AGL puede generar una conversión microbiana más fácil en el tipo de sustrato que los contenga, es por ello que en el caso de Bahía se presentó un mayor crecimiento

⁴⁴ MOTTA, SANTANA, 2013. Op. Cit.

⁴⁵ MOTTA, SANTANA, 2014. Op. Cit.

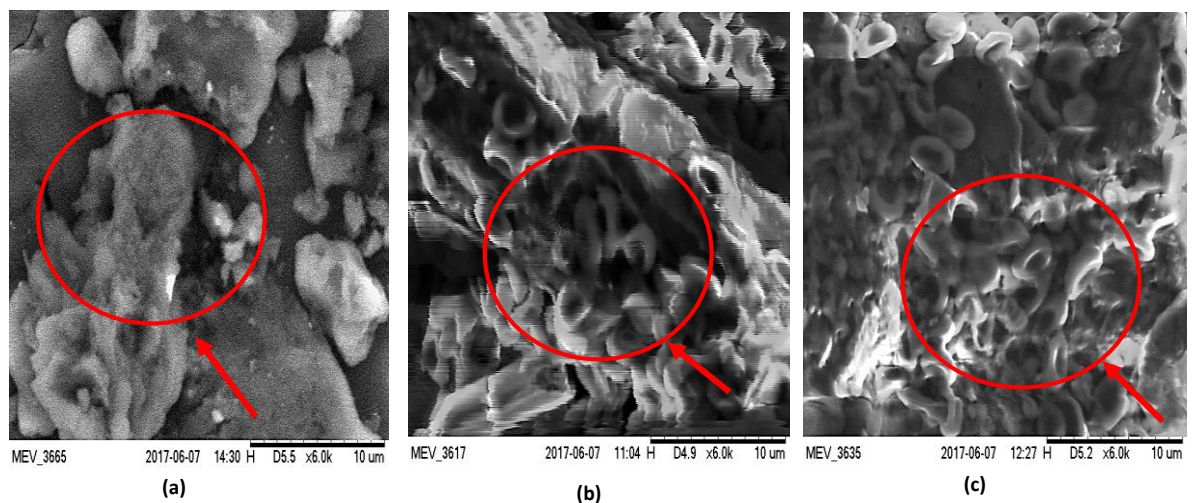
⁴⁶ SUMIYOSHI-SIMÕES, Ilka y GIOIELLI, Luiz. Crystal morphology of binary and ternary mixtures of hydrogenated fats and soybean oil. En: *biol. Technol.* Enero, 2000. vol. 43, p. 243-267.

fúngico en comparación con Agropalma y con Motta y Santana⁴⁷, el cual tuvo una producción fúngica de 33,2% de la presentada en Bahía.

2.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO EN LAS FIBRAS DE EFB (MEB)

Las imágenes tomadas por MEB fueron realizadas tanto para las fibras iniciales (al natural), así como a lo largo del proceso fermentativo, esto con el fin de poder observar el crecimiento fúngico y degradación del material lignocelulósico en las fibras con y sin lípido, para Agropalma y Bahía.

Figura 8. Crecimiento de *T. Reesei* durante la FES para las fibras de Agropalma con lípido (a)- antes de la FES, (b) 72 horas y (c) 120 horas.



⁴⁷ MOTTA, SANTANA, 2014. Op. Cit.

Al analizar las imágenes capturadas por MEB, se visualizó que las fibras iniciales usadas en el proceso no presentaban presencia de esporas (Figura 8 a). Desde el momento de la inoculación y durante el transcurso del proceso fermentativo, en las imágenes presentadas para los tiempos de 72 y 120 h se evidencian la aparición de esporas en las fibras con lípido (figura 8 b), y el aumento de estos en relación al tiempo transcurrido de fermentación (figura 8 c). Según Motta y Santana (2014) en FES y usando EFB como sustrato, la fase micelial de *T. reesei* es posiblemente lo suficientemente corta como para no ser visualizada ya que la aireación forzada pudo haber creado una condición que estimuló la esporulación fúngica. Este mismo comportamiento se presentó para las demás fibras utilizadas en este estudio (Agropalma con, Bahía sin y con). Además, se realizó un recuento de esporas en cámara de Neubauerdespués de la inoculación y luego de las 120 horas de fermentación para los dos medios de EFB, mostrando que tanto para Bahía así como para Agropalma se tenía inicialmente $5,06 \times 10^5$ esporas / 100 g de EFB, luego de 120h se presentaron para las fibras de Agropalma con y sin lípido valores de $3,39 \times 10^6$ esporas y $4,60 \times 10^6$ esporas / 100 g de EFB, respectivamente. Para el caso de Bahía luego de transcurridas las 120 h de fermentación se hizo imposible el conteo de esporas debido a la acumulación de estos en algunos de los cuadrantes obstaculizando el correcto conteo.

Figura 9. Imágenes de MEB de partículas de EFB de Agropalma, (a) EFB con lípido antes de la FES, (b) EFB con lípido en la FES en 120 horas.

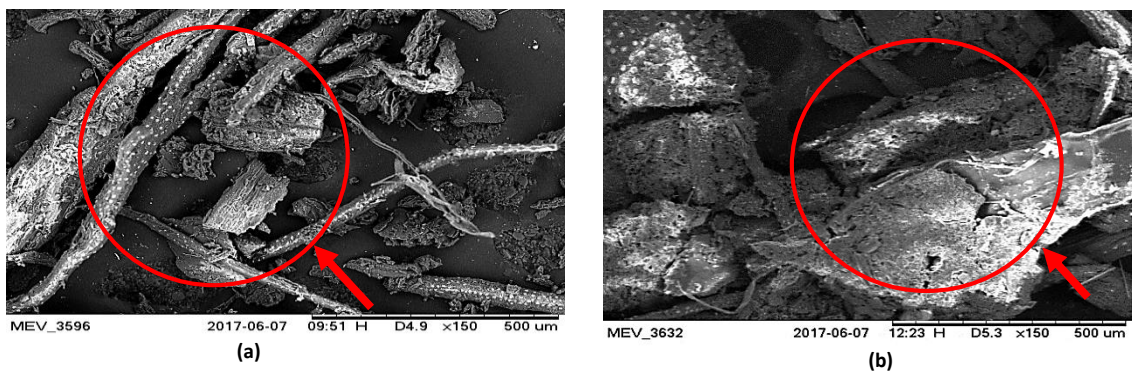
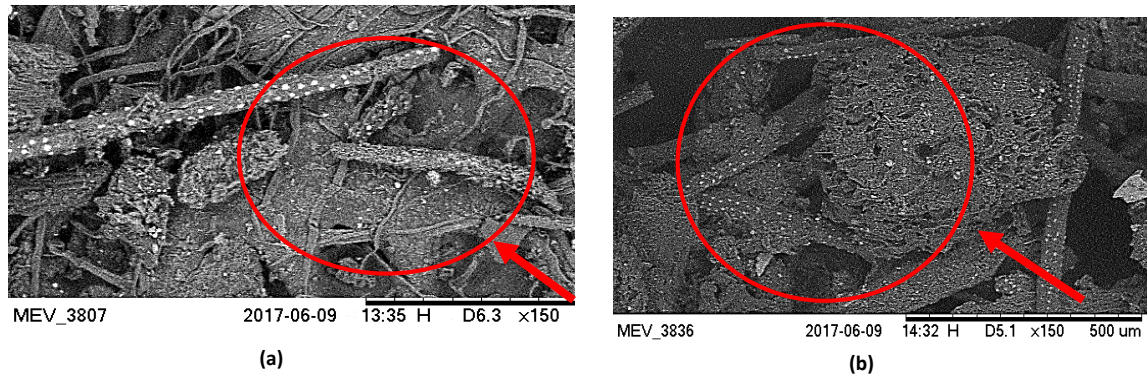


Figura 10. Imágenes de MEB de partículas de EFB de Bahía, (a) EFB sin lípido antes de la FES, (b) EFB sin lípido en la FES en 120 horas.



Al analizar las imágenes captadas por MEB, se visualizó que las fibras de Bahía y Agropalma al natural no presentaron diferencias significativas en las partículas con y sin lípido (Figura 9 y 10).

Las fibras a lo largo del proceso fermentativo van siendo degradadas por los hongos de *T. reesei* para obtener de allí las fuentes de carbono necesarias para el crecimiento fúngico y producción de AH. En el caso de Agropalma (figura 9), mediante el MEB realizado para las fibras con y sin lípido al inicio antes de la inoculación y al final (cumplidas a las 120 horas de fermentación), se observa que las fibras iniciales (enmarcadas por un círculo rojo) se presentan en un estado más compacto si se compara con las del final de fermentación; con una forma y tamaño definido. Pasadas las 120 horas de fermentación las fibras presentan cavidades o poros en forma de huecos sobre su estructura externa e internamente y no es posible apreciar una forma y estructura definida de las mismas; esto puede ser entendido como un proceso degradativo de material lignocelulósico por el que pasan las fibras durante el transcurso de la fermentación para poderse obtener la respectiva producción de AH y crecimiento celular.

Para el caso de las fibras de Bahía (figura 10) se presentó el mismo comportamiento que con las fibras de Agropalma, con el único diferencial que en Agropalma con lípido se puede apreciar una mayor presencia de espacios vacíos en forma de huecos sobre las fibras es mayor, sustentado esto por la mayor concentración de celulosa, hemicelulosa y lignina que presentan estas fibras en comparación con las de Bahía (Tabla 1).

En el trabajo de Law⁴⁸ sobre la naturaleza morfológica y química de las partículas de EFB, se evidenció que las figuras por MEB son similares a las de EFB obtenidas en este trabajo, tanto antes como después del cultivo microbiano. Evidenciando la presencia de un grupo de puntos blancos sobre las fibras, las cuales según Law son llamados cuerpos de sílica, encontrados generalmente en este residuo agroindustrial (Figura 11). Ellos poseen características circulares siendo uniformes y permaneciendo en la superficie de las fibras sin tener ninguna intervención en el proceso fermentativo⁴⁹.

La productividad se calculó a las 120 horas de fermentación para poder comparar los resultados con los de Motta y Santana⁵⁰. En términos de producto y para el caso de Agropalma con lípido se obtuvo una productividad de 2,59 mg de AH/ 100g de EFB/ h; en Agropalma sin lípido se presentó una productividad de 1,35 mg de AH/ 100g de EFB/ h. Para el caso de Bahía con lípido y sin lípido se obtuvieron productividades de 0,28 mg de AH/ 100g de EFB/ h y 0,82 mg de AH/ 100g de EFB/ h, respectivamente. Comparando estos resultados con los de Motta y Santana⁵¹ que fueron de 0,73 mg de AH/ 100g de EFB/ h, se observa que las fibras de las dos empresas presentan valores mucho más elevados que los presentados en la literatura haciendo que el uso de estos sustratos haya sido satisfactorio en la

⁴⁸ LAW, Kwei-Nam, DAUD, Wan y GHAZALI, Arniza. Morphological and chemical nature of fiber strands of oil palm empty-fruit-bunch (OPEFB). En: BioResources. Marzo, 2007. vol 2, no. 3, p. 351–362.

⁴⁹ *Ibid.*

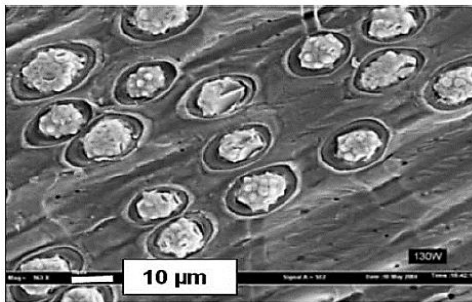
⁵⁰ MOTTA, SANTANA, 2014. *Op. Cit.*

⁵¹ *Ibid.*

producción de AH.

Para el caso de productividad en términos de Biomasa se obtuvieron los siguientes datos para el caso de Agropalma: Agropalma con lípido: 0,02 mg de proteína / 100g de EFB/ h, Agropalma sin lípido: 0,04 mg de proteína / 100g de EFB/ h; y para el caso de Bahía en las fibras con lípido y sin lípido se obtuvieron 0,05 mg de proteína / 100g de EFB/ h y 0,045 mg de proteína / 100g de EFB/ h, respectivamente. Comparando estos resultados con los de Motta y Santana (2014) donde se obtuvo una productividad de 0,07 mg de proteína / 100g de EFB/ h, se evidencia que ninguno de nuestros EFBs pudo superar la productividad en términos de biomasa en el tiempo de 120 horas, demostrando que el sustrato usado por Motta en su fermentación, propició un mejor crecimiento fúngico al final del proceso fermentativo.

Figura 11. Comparación de los cuerpos de sílica presentes en: a-Trabajo de Law y b- Nuestro trabajo



(a)



(b)

3. CONCLUSIONES

La caracterización lignocelulósica del EFB en términos de sus principales parámetros físico-químicos, indicó que este es adecuado para su uso como sustrato y soporte sólido en la producción de AH y crecimiento fúngico de *Trichoderma reesei*, observándose que el contenido lignocelulósico de las fibras de Agropalma es mayor que el de las de Bahía, justificando así la mayor producción de AH.

La presencia de lípidos en las fibras de Agropalma y de Bahía fue usada en el metabolismo del crecimiento del hongo, encontrándose que para el caso de las fibras de Bahía este lípido no contribuyó a la máxima producción de AH, debido al bajo contenido lignocelulósico de estas fibras, y en el caso de Agropalma se logró apreciar una mayor producción de AH en las fibras con lípido.

Según los datos obtenidos en el caso de Bahía se logró apreciar que en el caso de Bahía la producción de AH no estuvo asociada al crecimiento (mayor producción de AH en las fibras con lípido y máxima concentración celular en las fibras sin lípido), caso contrario a lo ocurrido en las fibras de Agropalma en las cuales se presentó una producción de AH asociada al crecimiento celular (mayor producción de AH y máxima concentración celular en las fibras con lípido).

El consumo de oxígeno estuvo relacionado con el crecimiento celular, donde hubo mayor consumo de oxígeno se presentaron los mayores picos de crecimiento fúngico, este comportamiento se evidenció tanto para las fibras de Agropalma así como para las de Bahía (con y sin lípido).

La microscopia electrónica de Barrido (MEB) permitió observar el proceso de esporulación de la *T. reesei* durante el transcurso de la fermentación, evidenciando la presencia de esporas a lo largo del tiempo. A su vez se pudo observar el estado degradativo con que terminan las fibras al final de proceso, constatando que no existen diferencias significativas en el comportamiento de EFB de Bahía y Agropalma con y sin lípido.

BIBLIOGRAFÍA

AACCI. American Association of Cereal Chemists International. Approved methods, St. Paul. San Diego, CA- USA: 2010. 6 p.

ALEXANDER, Richard . Improving gardeners' understanding of water management in peat and peat-free multi-purpose growing media. [online]. Acta Horticulturae-Agris since [Guelph, Canada]: May. 2014 [Cited 20 January 2017]. Availed from internet:<<http://agris.fao.org/agrissearch/search.do?recordID=US201400154251>>.

AOCS. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society. New York: Campaing, 2009. 15 p.

BADIS, Abdel, *et al.* Removal of natural humic acids by decolorizing actinomycetes isolated from different soils (Algeria) for application in water purification. En: Desalination. September, 2010. vol. 2, no. 259, p. 216-222.

BASTOS, Reinaldo. Transferência de oxigênio no cultivo em estado sólido de *Drechslera (Helminthosporium) monoceras*. Tesis de maestria. Brasil: Facultad de ingeniería química, Universidad Estatal de Campinas, 2006. 15 p.

BUSATO, Jader, *et al.* Humic substances isolated from residues of sugar cane industry as root growth promoter. En: Science Agriculture. Marzo, 2010. vol. 67, no. 2, p. 206-212.

CALLOW, Nicholas y JU, Lu-Kwang. Promoting pellet growth of *Trichoderma reesei* Rut C30 by surfactants for easy separation and enhanced celulase production. En: Enzyme Microb Technol. Mayo, 2012. vol. 50, p. 311-317.

CAVACO-PAULO, Artur y GUBITZ, Gilbert. Textile processing with enzymes. England: Woodhead Publishing, 2003. 50-95 p.

COUTO, Susana y SANROMÁN, Maria. Application of solid-state fermentation to food industry-A review. En: Journal of Food Engineering. Octubre, 2006. vol. 76, no. 3, p. 291–302.

DORAN, Pauline. Bioprocess Engineering Principles. New York: Academic Press, 1995. 417 p.

DRUZHININA, Irina, *et al.* Trichoderma: the genomics of opportunistic success. En: Nat. Rev. Microbiol. Octubre, 2011. vol. 9, p. 749-759.

EL-SAYED, Ashraf. L-glutaminase production by *Trichoderma koningii* under solid-state fermentation. En: Indian J Microbiol. Septiembre, 2009. vol. 49, p. 243–250.

HAYES, Michael, *et al.* Interpretation of heteronuclear and multidimensional NMR spectroscopy of humic substances. En: European Journal of Soil Science. Septiembre, 2001. vol. 52, p. 495-509.

HERPOËL-GIMBERT, Isabelle, *et al.* Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains. En: Biotechnology for Biofuels. Diciembre, 2008. vol. 1, p. 1-18.

KLOCKING, Renate y HELBIG, Bjorn. Medical Aspects and Applications of humic substances. En: Germany: Wiley VCH. Enero, 2005. vol.15, p. 3-16.

KREDICS, László, *et al.* Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. En: Food Technol Biotechnol. Junio, 2003. Vol. 47, p. 37-42.

LAIN, Chang, y CHEN, Ciyai. Removal of metal ions and humic acid from water by iron-coated filter media. En: Chemosphere. Agosto, 2001. vol. 44, no. 5, p. 1177-1184.

LAW, Kwei-Nam, DAUD, Wan y GHAZALI, Arniza. Morphological and chemical nature of fiber strands of oil palm empty-fruit-bunch (OPEFB). En: BioResources. Marzo, 2007. vol 2, no. 3, p. 351–362.

LESTER, Dylan. Shopping for humic acids [online]. University of Guelph [Guelph, Canada]: Mar. 2009 [Cited 20 June 2017]. Aailed from internet: <<http://jhbiotech.com/Publications/Pub%2058.pdf>>.

LEVIN, Joshua. Sustainable palm oil is on the up [online]. Entrepreneurial development bank [Sumatra, Indonesia]: Mar. 2012 [Cited 03 May 2017] Available from internet: <<http://www.upsides.com/2012/04/13/sustainable-palm-oil-is-on-the-up/>>.

LITVIN, Valentina, GALAGAN, Rostslav y MINAEV, Boris. Synthesis and properties of synthetic analogs of natural humic acids. En: Russian Journal of Applied Chemistry. Febrero, 2012. vol. 85, p. 296-302.

LIU, Collin, HUANG, Peng. Role of hydroxy-alumino silicate ions (proto-imogolite sol) in the formation of humic substances. En: Organic Geochemistry. Marzo, 2002. vol. 33, p. 295-305.

MACEDO, Andre. Estudo da produção de ácido hialurônico por fermentação de *Streptococcus zooepidemicus* em substrato de caju (*Anacardium occidentale L.*). Tesis de maestría. Brasil: Facultad de ingeniería química, Universidad Estatal de Campinas, 2006. 12 p.

MANPREET, Sachin, *et al.* Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation. En: Malaysian Journal of Microbiology. Enero, 2005. vol. 2, p. 1-9.

MITCHELL, David, *et al.* A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and interparticle phenomena in solid-state fermentation. En: Biochem Eng. Marzo, 2004. vol. J 17, p. 15–26.

MOTTA, Fernanda y SANTANA, Maria Helena. Production of humic acids from oil palm empty fruit bunch by submerged fermentation with *Trichoderma viride*: cellulosic substrates and nitrogen sources. En: Biotechnol Progress. Octubre, 2013. vol. 10, p. 12-17.

MOTTA, Fernanda y SANTANA, Maria Helena. Solid-state fermentation for humic acids production by a *Trichoderma reesei* strain using an oil palm empty fruit bunch as the substrate. En: Applied Biochemistry and Biotechnology. Marzo, 2014. vol 172, no 4, p. 2205–2217.

PANDEY, Ashok. Effect of particle size of substrate on enzyme production in solid-state fermentation. En: Biores Technol. Enero, 1991. vol. 37, p. 169-172.

PANDEY, Ashok. Solid-state fermentation. En: Biochem Eng. Marzo, 2003. vol. J 13, p. 81–84.

PEÑA-MENDEZ, Eladia, HAVEL, Josef y PATOCKA, Jiri. Humic substances – compounds of still unknown structure: application in agriculture industry environment and biomedicine. En: J Appl Biomed. Enero, 2005. vol. 3, p. 13-24.

RAIMBAULT, Maurice y ALAZARD, Didier. Culture method to study fungal growth

in solid fermentation. En: Eur J Appl Microbiol Biotechnol. Septiembre, 1980. vol 9, p. 199–209.

RAUEN, Tower, GRANDE, Dalter y SERRA, Miser. Tensoatividade de ácido húmico de procedência distintas. En: Química Nova. Marzo, 2002. vol. 25, no. 6, p. 1-7.

SAMUELS, Gary. Trichoderma: a review of biology and systematics of the genus. En: Mycol. Res. Agosto, 1996. vol. 100, p. 923-935.

SEIBOTH, Bernhard, IVANOVA, Christa y SEIDL-SEIBOTH, Verena. *Trichoderma reesei*: A Fungal Enzyme Producer for Cellulosic Biofuels. Energy engineering [Minas Gerais, Brasil]: Sep. 2011 [Cited 03 May 2017]. Available from internet: <<http://www.intechopen.com/books/biofuel-production-recent-developments-and-prospects/trichoderma-reeseia-fungal-enzyme-producer-for-cellulosic-biofuels>>.

SENESI, Nicola y LOFFREDO, Elisabetta. Soil humic substances. En: Hofrichter M, Steinbuchel A. Biopolymers. Lignin, humic substances and coal. Enero, 2001. vol. 3, p. 247–99.

SHUSTER, André y SCHMOLL, Monika. Biology and biotechnology of Trichoderma. Appl. En: Microbiol. Biotechnol. Julio, 2006. vol. 87, p. 787-799.

SINGHANIA, Reeta, SUKUMARAN, Rajeev y PANDEY, Ashok. Improved cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF through process optimization. En: Appl Biochem Biotechnol. Julio, 2007. vol. 142, p. 60-70.

SUDIYANI, Yanni. Utilization of Biomass Waste Empty Fruit Fruit Bunch Fiber of Palm Oil for Bunch Fiber of Palm Oil for Bioethanol Production. [online]. Energy procedia- Instituto de ciencias [Indonesia]: Mar. 2013 [Cited 23 May 2017].

Available from internet:
<<http://www.iges.or.jp/en/bf/pdf/activity20090204/session2/Yanni.pdf>>.

SUMIYOSHI-SIMÕES, Ilka y GIOIELLI, Luiz. Crystal morphology of binary and ternary mixtures of hydrogenated fats and soybean oil. *En: biol. Technol. Enero, 2000. vol. 43, p. 243-267.*

THIBAUT, Jules, *et al.* Reassessment of the estimation of dissolved oxygen concentration profile and KLa in solid-state fermentation. En: *Process Biochemistry. Marzo, 2000. vol. 36, p. 9–18.*

TROMPOWSKY, Patrick.M. Síntese e caracterização de substâncias semelhantes aos ácidos húmicos de carvão de eucalípto e sua interação com diclorofenol, cálcio, manganês e alumínio. Tesis de maestría. Brasil: Facultad de ingeniería química, Universidad Federal de Viçosa, Brasil, 2006, 20 p.

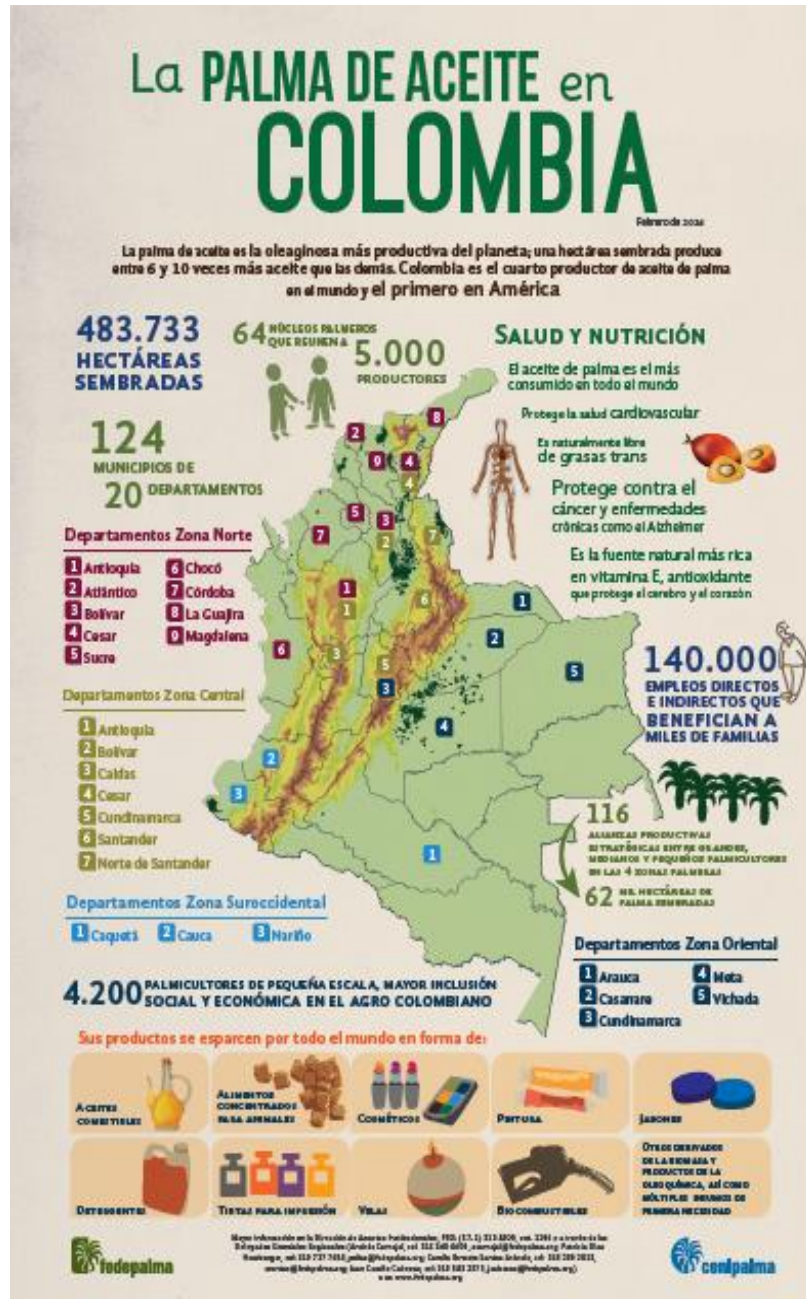
UMI KALSOM, Shah, *et al.* Characterization of humic acid from humification of oil palm empty fruit bunch fiber using *Trichoderma viride*. En: *J. Trop. Agric. FoodSci. Enero, 2006. vol.2, p.165-172.*

VAN, Rensburg Ce, *et al.* Investigation of the anti-HIV properties of oxihumate. En: *Chemotherapy. Julio, 2002. vol. 48, p. 138-143.*

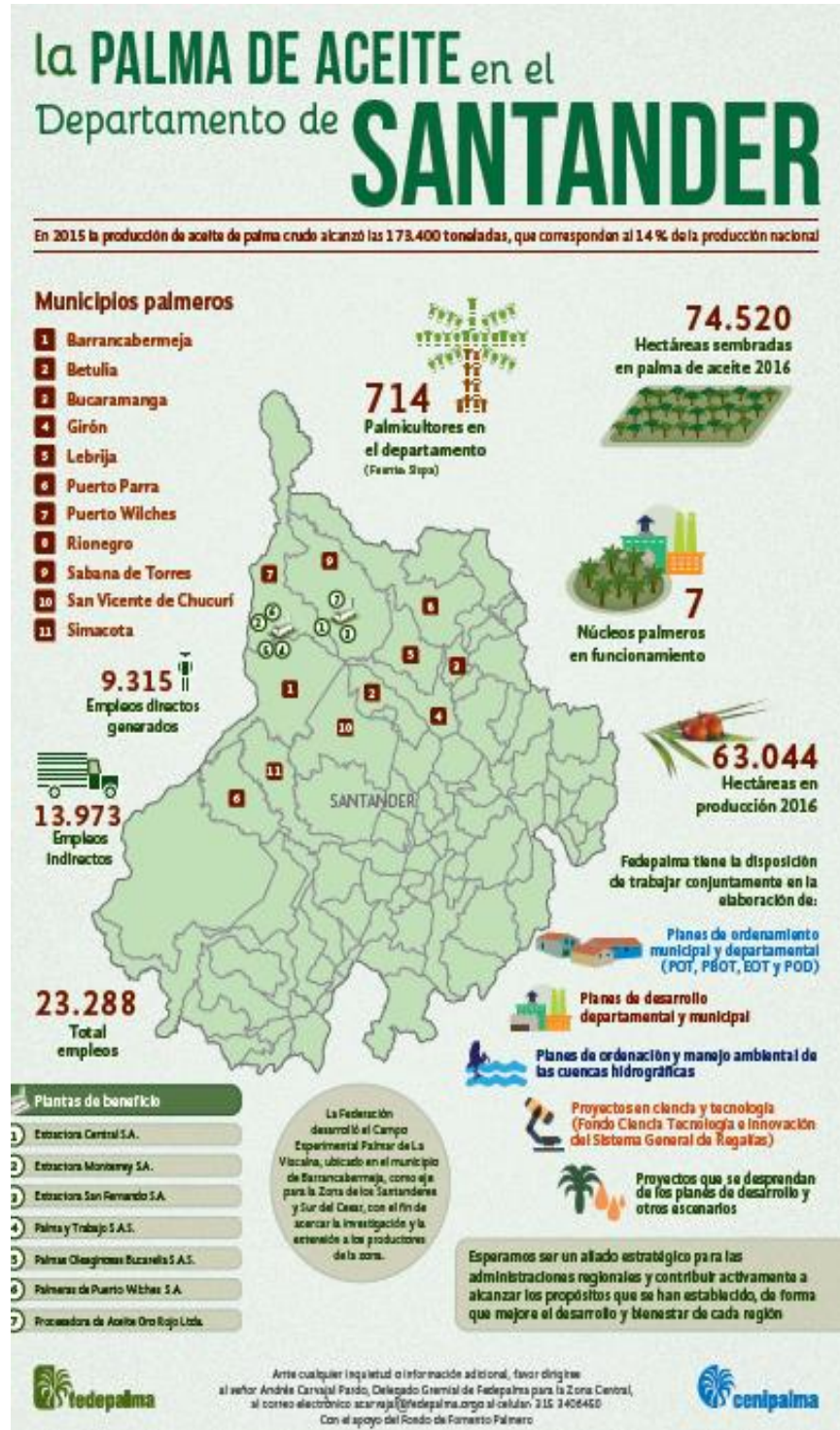
VERMA, Mausam, *et al.* Dissolved oxygen as principal parameter for conidia production of biocontrol fungi *Trichoderma viride* in non-Newtonian wastewater. En: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol. Diciembre, 2006. vol. 33, p. 941-952.*

ANEXOS

ANEXO A. Producción de aceite de palma en Colombia



ANEXO B. Producción de aceite de palma en Santander



ANEXO C. Curvas patrón

Tabla C1. Datos obtenidos para la construcción de la curva patrón en la producción de AH a partir de las absorbancias a 350 nm de concentraciones conocidas de AH comercial (Sigma-Aldrich, Reino Unido) en una solución de NaOH 0,5 M, pH 4,5 ± 0,01.

Conc (mg/ml)	Conc (mg/L)	abs 350 nm	abs 350 nm	abs 350 nm	média
1	100	1,468	1,513	1,454	1,48
0,9	90	1,278	1,301	1,325	1,30
0,8	80	1,164	1,16	1,176	1,17
0,7	70	1,024	1,027		1,03
0,6	60	0,901	0,905	0,899	0,90
0,5	50	0,747	0,754	0,725	0,74
0,4	40	0,608	0,588	0,6	0,60
0,3	30	0,469	0,535	0,459	0,49
0,2	20	0,331	0,374		0,35
0,1	10	0,183	0,183	0,183	0,18
0,05	5	0,073	0,061	0,071	0,07
0,01	1	0,013	0,014	0,014	0,01
0,005	0,5	0,01	0,009	0,01	0,01

Figura C1. Curva patrón en la producción de AH usando AH comerciales.

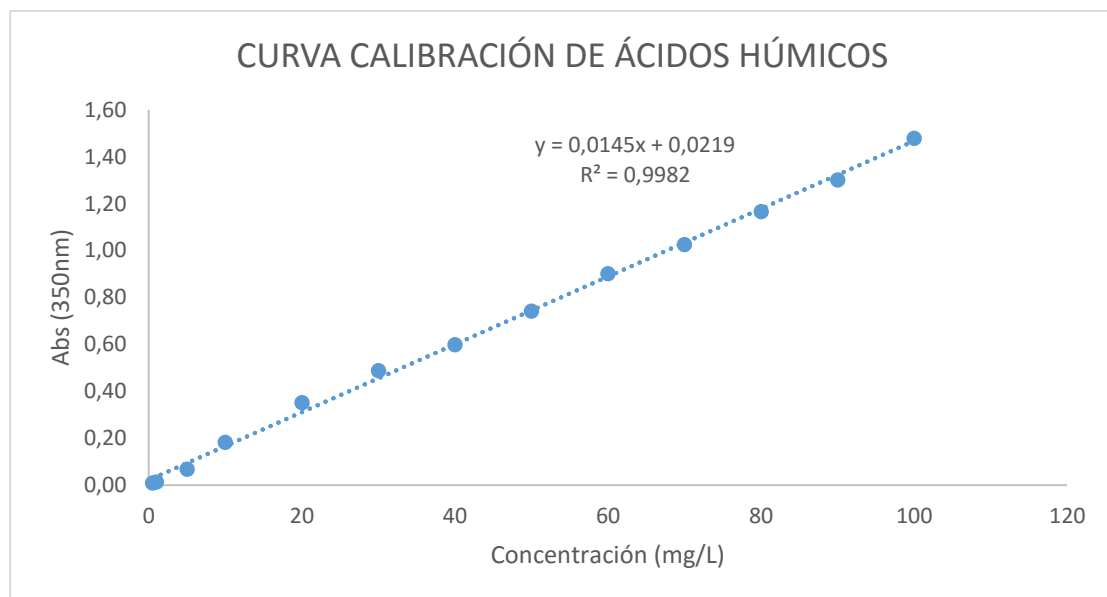
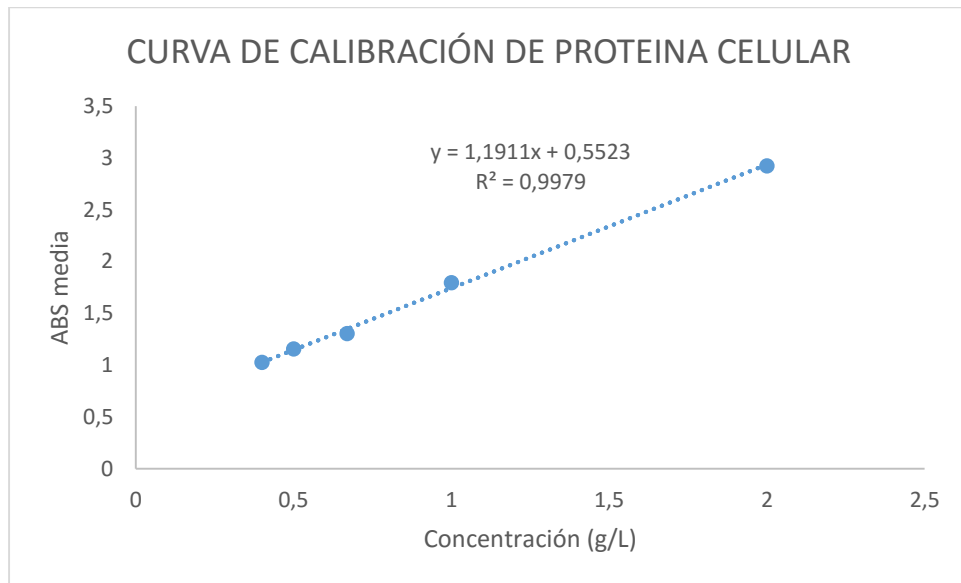


Tabla C2. Datos obtenidos para la construcción de la curva patrón para la proteína celular por medio del kit Pierce BCA (Thermoscientific, USA)

Concentración (g/L)	abs (562nm)	abs (562nm)	abs media
2	2,922	2,922	2,922
1	2,009	1,583	1,796
0,67	1,298	1,312	1,305
0,5	1,144	1,168	1,156
0,4	1,06	0,992	1,026
0,33	0,93	0,326	0,628

Figura C2. Curva patrón para la proteína celular, usando albumina de suero bovino (Proteína comercial).



ANEXO D. Proporciones usadas para el análisis de glucosa

Tabla D1. Datos usados durante el análisis de glucosa

	BLANCO	PATRÓN	DESCONOCIDO
Padrón	-	10 µL	-
Muestra	-	-	10 µL
Reactivo A	1 mL	1 mL	1 mL
Agua	10 µL	-	-

Cálculos de los resultados

$$Factor = \frac{100 \text{ mg/dL}}{P}$$
$$glucosa \left(\frac{mg}{dL} \right) = D * factor$$

Donde:

D: Absorbancia de la muestra

P: Absorbancia de la solución patrón