



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Evaluación del efecto de condiciones de cultivo sobre la producción de *Penicillium* sp. HC1 usado en la degradación de residuos vegetales de cultivos de flores en Guasca – Cundinamarca**

**Danna Lorena García Rico**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias  
Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia  
Bogotá, Colombia

2023



# **Evaluación del efecto de condiciones de cultivo sobre la producción de *Penicillium* sp. HC1 usado en la degradación de residuos vegetales de cultivos de flores en Guasca – Cundinamarca**

**Danna Lorena García Rico**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias - Microbiología**

Directora:

MSc. Nubia Carmenza Moreno Sarmiento

Codirectora:

Ph.D. Ivonne del Socorro Gutiérrez Rojas

Línea de Investigación:

Bioinsumos

Grupo de Investigación:

Bioprocesos y Bioprospección

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia

Bogotá, Colombia

2023



*Dedicado a Archie*

## Agradecimientos

Agradezco a mis directoras de tesis, las investigadoras Nubia Moreno e Ivonne Gutiérrez, por su apoyo, confianza y acompañamiento en el desarrollo de este trabajo, por compartir conmigo sus conocimientos y experiencia, por ser inspiración en la academia y en la industria.

A la Gobernación de Cundinamarca y a la Fundación Ceiba por el financiamiento de la maestría y por promover la formación de profesionales enfocados en aportar a sus territorios.

Al Laboratorio de Fermentaciones, a la Cooperación Técnica No Reembolsable BID / FONTAGRO – Proyecto 2020-ID-30: “Mayor Producción Agrícola con Menor Emisión de Óxido Nitroso”, al Instituto de Biotecnología y a la Universidad Nacional de Colombia por hacer posible la realización de este trabajo.

A Siecha Flowers, por abrirme espacio en sus instalaciones.

Agradezco profundamente a mi familia, amigas y amigos por su constante apoyo, por sus afectos y solidaridad.

## Resumen

### **Evaluación del efecto de condiciones de cultivo sobre la producción de *Penicillium* sp. HC1 usado en la degradación de residuos vegetales de cultivos de flores en Guasca – Cundinamarca**

En las últimas décadas, Colombia se ha posicionado como un referente a nivel mundial en la industria floricultora. Sin embargo, este próspero sector enfrenta retos ambientales, siendo la generación de residuos una preocupación constante. En contexto, la producción de desechos de clavel en el país es de 1500 kg/mes por hectárea, de los cuales en promedio el 10% es utilizado en compostaje y el 90% restante es dado por lo general como alimento para animales, lo cual ha sido cuestionable por magnificar los plaguicidas en la cadena trófica. Es así, como la búsqueda de soluciones sostenibles y eficientes para la degradación de residuos vegetales se ha convertido en una prioridad de este sector agrícola. Una alternativa que se ha venido estudiando es el uso directo de microorganismos con capacidad lignocelulolítica. Biocultivos S.A. y el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia – IBUN desarrollaron un inóculo a partir de *Penicillium* sp. HC1 para acelerar la degradación de material lignocelulósico. Este bioinsumo presenta desafíos alineados a la producción y calidad de sus conidios en fermentación sumergida y, por tanto, el presente trabajo evaluó diferentes condiciones de cultivo sobre la producción de *Penicillium* sp. HC1, así como su uso en la degradación de

residuos de material vegetal de cultivos de residuos de clavel en búsqueda de la mejora del producto.

Esta investigación no mostró cambios significativos en el producto final utilizando  $\text{CaCl}_2$ . Por otra parte, se profundizó en la influencia que tienen diversos aditivos complejos como casaminoácidos, aminoácidos ramificados, otros suplementos y vitaminas al ser agregados al medio de cultivo líquido en la producción de *Penicillium* sp. HC1, encontrándose resultados positivos. Concentraciones de 13 g/L de casaminoácidos mejoran la producción de biomasa y conidios 6% y 11% respectivamente con relación al control (medio base). Del mismo modo, los llamados aminoácidos de prueba (AP) en esta investigación, resultaron ser un reemplazo efectivo y más económico a los casaminoácidos, obteniendo además mejoría en la viabilidad y productividad de los conidios de *Penicillium* sp. HC1. Sin embargo, la tolerancia térmica no mostraba progreso. Esto se solucionó al adicionar vitaminas obteniendo un incremento del 64% de la tolerancia térmica con respecto al valor obtenido con el producto inicial. Adicionalmente, se exploró el efecto que tienen tres flujos aire en el proceso de fermentación sumergida en tanque agitado, logrando una mejoría significativa en el producto a 2,5 vvm. En resumen, la biomasa mejoró un 27%, los conidios 16%, la viabilidad 76% y la tolerancia térmica 54% en el producto del biorreactor.

Por último, se validó el uso de *Penicillium* sp. HC1 proveniente del medio de cultivo MBAP VIT producido a 2,5 vvm, satisfaciendo así una necesidad agrícola en la industria floricultora, que busca constantemente alternativas para el manejo de sus residuos vegetales. Esta investigación demostró la mejora en la aceleración de la degradación de los residuos de clavel utilizando *Penicillium* sp. HC1, consiguiendo resultados favorables en co-cultivos con *Pleurotus ostreatus* T1.1.

**Palabras clave:** *Penicillium* sp., calcio, casaminoácidos, aireación, degradación, flores.

## Abstract

### **Evaluation of the effect of growing conditions on the production of *Penicillium* sp. HC1 used in the degradation of plant residues from flower crops in Guasca - Cundinamarca**

In recent decades, Colombia has positioned itself as a world leader in the flower industry. However, this thriving sector faces environmental challenges, with waste generation being a constant concern. In context, carnation waste production in the country is 1500 kg/month per hectare, of which an average of 10% is used in composting and the remaining 90% is usually given as animal feed, which has been questioned for magnifying pesticides in the food chain. Thus, the search for sustainable and efficient solutions for the degradation of plant residues has become a priority in this agricultural sector. One alternative that has been studied is the direct use of microorganisms with lignocellulolytic capacity. Biocultivos S.A. and the Institute of Biotechnology of the National University of Colombia - IBUN developed an inoculum from *Penicillium* sp. HC1 to accelerate the degradation of lignocellulosic material. This bioinput presents challenges aligned to the production and quality of its conidia in submerged fermentation and, therefore, the present work evaluated different culture conditions on the production of *Penicillium* sp. HC1, as well as its use in the degradation of plant material residues from carnation residue crops in search of product improvement.

This research did not show significant changes in the final product using  $\text{CaCl}_2$ . On the other hand, the influence of various complex additives such as casamino acids, branched amino acids, other supplements and vitamins when added to the liquid culture medium on the production of *Penicillium* sp. HC1 was studied, and positive results were found. Concentrations of 13 g/L of casamino acids improve the production of biomass and conidia 6% and 11%, respectively, with respect to the control (base medium). Similarly, the so-called test amino acids (PA) in this research proved to be an effective and more economical replacement for casamino acids, also improving the viability and productivity of *Penicillium* sp. HC1 conidia. However, thermal tolerance did not show progress. This was solved by adding vitamins, obtaining a 64% increase in thermal tolerance with respect to the initial product. Additionally, the effect of three air flows in the submerged fermentation process in a stirred tank was explored, achieving a significant improvement in the product at 2.5 vvm. In summary, biomass improved 27%, conidia 16%, viability 76% and thermal tolerance 54% in the bioreactor product.

Finally, the use of *Penicillium* sp. HC1 from the MBAP VIT culture medium produced at 2.5 vvm was validated, thus satisfying an agricultural need in the floriculture industry, which is constantly looking for alternatives for the management of its plant residues. This research demonstrated the improvement in the acceleration of carnation waste degradation using *Penicillium* sp. HC1, achieving favorable results in co-cultures with *Pleurotus ostreatus* T1.1.

**Keywords:** *Penicillium* sp., calcium, casamino acids, aeration, degradation, flowers.

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen</b>	<b>VII</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XVI</b>
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	<b>XVII</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Capítulo 1. Revisión de literatura</b> .....	<b>5</b>
1.1 Sector floricultor en Colombia y residuos agroindustriales.....	5
1.1.1 Residuos de clavel.....	8
1.1.2 Composición de los residuos de clavel .....	9
1.1.3 Degradación de los residuos vegetales .....	12
1.2 <i>Penicillium</i> spp. ....	16
1.2.1 <i>Penicillium</i> sp. HC1.....	19
1.3 Factores que promueven la conidiogénesis de <i>Penicillium</i> spp. en fermentación sumergida.....	23
1.3.1 Influencia del calcio en fermentación sumergida para <i>Penicillium</i> spp. ....	24
1.3.2 Influencia de casaminoácidos en fermentación sumergida para <i>Penicillium</i> spp.....	26
1.3.3 Influencia de aireación en fermentación sumergida para <i>Penicillium</i> spp.....	29
<b>2. Capítulo 2. Efecto del calcio y de los casaminoácidos sobre la producción y calidad de conidios y biomasa de <i>Penicillium</i> sp. HC1 en fermentación sumergida</b> .....	<b>33</b>
2.1 Introducción.....	33
2.2 Materiales y métodos .....	34
2.2.1 Banco de trabajo.....	34
2.2.2 Tren de inoculación .....	35
2.2.3 Condiciones y medios de cultivo.....	36
2.2.4 Variables de respuesta .....	38
2.2.5 Procesamiento de datos y análisis estadístico.....	40
2.3 Resultados y discusión.....	40
2.3.1 Medio base .....	40
2.3.2 Evaluación del efecto del calcio .....	41
2.3.3 Evaluación del efecto de casaminoácidos.....	48

2.3.4	Evaluación del efecto de aminoácidos de prueba (AP).....	55
2.3.5	Evaluación del efecto del uso de vitaminas .....	60
2.4	Conclusiones .....	68
<b>3.</b>	<b>Capítulo 3. Efecto de la aireación sobre la producción y calidad de conidios y biomasa de <i>Penicillium</i> sp. HC1 en fermentación sumergida en tanque agitado ....</b>	<b>69</b>
3.1	Introducción .....	69
3.2	Materiales y métodos.....	70
3.2.1	Banco de trabajo .....	70
3.2.2	Tren de inoculación .....	71
3.2.3	Condiciones y medio de cultivo .....	71
3.2.4	Variables de respuesta.....	72
3.2.5	Procesamiento de datos y análisis estadístico .....	72
3.3	Resultados y discusión .....	72
3.3.1	Evaluación del efecto de la aireación .....	72
3.4	Conclusiones .....	80
<b>4.</b>	<b>Capítulo 4. Evaluación de la degradación de residuos vegetales de cultivos de flores por <i>Penicillium</i> sp. HC1 .....</b>	<b>83</b>
4.1	Introducción .....	83
4.2	Materiales y métodos.....	85
4.2.1	Medios de crecimiento y microorganismos .....	85
4.2.2	Montaje de microcosmos.....	86
4.2.3	Montaje en campo.....	86
4.2.4	Evaluación de la producción de CO <sub>2</sub> .....	87
4.2.5	Obtención de extractos enzimáticos .....	88
4.2.6	Determinación de actividades enzimáticas .....	89
4.2.7	Caracterización de los residuos vegetales.....	90
4.2.8	Procesamiento de datos y análisis estadístico .....	90
4.3	Resultados y discusión .....	91
4.3.1	Evaluación del crecimiento microbiano mediante el seguimiento a la producción de CO <sub>2</sub> .....	91
4.3.2	Evaluación de la actividad celulolítica.....	94
4.3.3	Evaluación de la actividad ligninolítica.....	98
4.3.4	Evaluación de la degradación de residuos de clavel mediante la caracterización de material vegetal sometido a los tratamientos .....	106
4.4	Conclusiones .....	109
<b>5.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>110</b>
5.1	Conclusiones .....	110
5.2	Recomendaciones .....	112
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>113</b>
<b>A.</b>	<b>Anexo: Medios de cultivo .....</b>	<b>135</b>
<b>B.</b>	<b>Anexo: Curva de calibración Nelson y Somogy .....</b>	<b>142</b>
<b>C.</b>	<b>Anexo: Resultados de la caracterización de las muestras de residuos de clavel después de los tratamientos .....</b>	<b>143</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1-1:</b> Claveles de la empresa Siecha Flowers S.A – Guasca Cundinamarca.....	9
<b>Figura 1-2:</b> Estructura de la biomasa lignocelulósica. Modificada a partir de (Wu et al., 2023)..	10
<b>Figura 1-3:</b> Conidióforos y patrones de ramificación de <i>Penicillium</i> (A) Conidióforos con fiálide solitaria. (B) Monoverticilados (C) Bifurcado (D, E) Biverticilados (F) Terverticilado (G) Poliverticilado. Barra de escala = 10 $\mu$ l (Visagie et al., 2014).....	19
<b>Figura 1-4:</b> Características macroscópicas y microscópicas de <i>Penicillium</i> sp. HC1 (A) Macroscópica en agar PDA, 4 días y 25°C (B) Microscópica 40X de agar PDA, 4 días y 25°C con tinción azul de lactofenol (C) Macroscópica en medio líquido, 7 días y 25°C (D) Microscópica 40X en medio líquido, 7 días y 25°C con tinción azul de lactofenol. ....	21
<b>Figura 2-1:</b> Cinética de producción de conidios y biomasa de <i>Penicillium</i> sp. HC1 en medio base (MB). ....	41
<b>Figura 2-2:</b> Cinética de producción de conidios y biomasa de <i>Penicillium</i> sp. HC1 en diferentes medios sumergidos (A) 2 g/L CaCl <sub>2</sub> (B) 4 g/L CaCl <sub>2</sub> (C) 6 g/L CaCl <sub>2</sub> .....	42
<b>Figura 2-3:</b> Conidios máximos y productividad de conidios máximos de <i>Penicillium</i> sp. HC1 en diferentes medios sumergidos: MB - 2 g/L – 4 g/L – 6 g/L CaCl <sub>2</sub> . Las letras iguales no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%). ....	43
<b>Figura 2-4:</b> Biomasa máxima y productividad de biomasa máxima de <i>Penicillium</i> sp. HC1 en diferentes medios sumergidos: MB - 2 g/L – 4 g/L – 6 g/L CaCl <sub>2</sub> .....	45
<b>Figura 2-5:</b> Viabilidad y tolerancia térmica de <i>Penicillium</i> sp. HC1 en diferentes medios sumergidos: MB - 2 g/L – 4 g/L – 6 g/L de CaCl <sub>2</sub> . Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%). .	46
<b>Figura 2-6:</b> Cinética de producción de conidios y biomasa. (A) MAC – E1 con 1,3 g/L casaminoácidos (B) MBC – E1 con 1,3 g/L casaminoácidos (C) MAC – E2 con 13 g/L casaminoácidos (D) MBC – E2 con 13 g/L casaminoácidos. ....	49
<b>Figura 2-7:</b> Conidios máximos y productividad de conidios máximos de <i>Penicillium</i> sp. HC1 en diferentes medios en cultivos sumergidos: MAC – E1, MBC – E1, MAC – E2 y MBC – E2. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%).....	50
<b>Figura 2-8:</b> Biomasa máxima y productividad de biomasa máxima de <i>Penicillium</i> sp. HC1 en diferentes medios en cultivos sumergidos: MAC – E1, MBC – E1, MAC – E2 y MBC – E2. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%).....	51
<b>Figura 2-9:</b> Cinética viabilidad y tolerancia térmica de <i>Penicillium</i> sp. HC1 en el Medio Base (MB).....	52

<b>Figura 2-10:</b> Cinética viabilidad y tolerancia térmica de <i>Penicillium</i> sp. HC1 en diferentes medios en cultivos sumergidos. (A) MAC – E1 con 1,3 g/L casaminoácidos (B) MBC – E1 con 1,3 g/L casaminoácidos (C) MAC – E2 con 13 g/L casaminoácidos (D) MBC – E2 con 13 g/L casaminoácidos. ....	53
<b>Figura 2-11:</b> Viabilidad y tolerancia térmica – Día 7 de <i>Penicillium</i> sp. HC1 en los medios MAC – E1, MBC – E1, MAC – E2 y MBC – E2. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%)...	54
<b>Figura 2-12:</b> Cinética de producción de conidios y biomasa de <i>Penicillium</i> sp. HC1 en diferentes medios sumergidos. (A) MBAP (B) MBC - E2. ....	55
<b>Figura 2-13:</b> Conidios máximos y productividad de conidios máximos de <i>Penicillium</i> sp. HC1 en diferentes medios sumergidos: MB, MBAP y MBC – E2. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%). ....	56
<b>Figura 2-14:</b> Biomasa máxima y productividad de biomasa máxima de <i>Penicillium</i> sp. HC1 en diferentes medios sumergidos: MB, MBAP y MBC – E2. ....	57
<b>Figura 2-15:</b> Cinética viabilidad y tolerancia térmica de <i>Penicillium</i> sp. HC1 en diferentes medios en cultivos sumergidos. (A) MBAP (B) MBC – E2. ....	59
<b>Figura 2-16:</b> Viabilidad y tolerancia térmica – Día 7 de <i>Penicillium</i> sp. HC1 en diferentes medios sumergidos: MB, MBAP y MBC – E2. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%)...	60
<b>Figura 2-17:</b> Cinética de producción de conidios y biomasa de <i>Penicillium</i> sp. HC1 en diferentes medios en cultivos sumergidos. (A) MBC VIT (B) MBAP VIT. ....	61
<b>Figura 2-18:</b> Conidios máximos y productividad de conidios máximos de <i>Penicillium</i> sp. HC1 en diferentes medios en cultivos sumergidos (A) MBC VIT (B) MBAP VIT. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%). ....	62
<b>Figura 2-19:</b> Biomasa máxima y productividad de biomasa máxima de <i>Penicillium</i> sp. HC1 en diferentes medios en cultivos sumergidos: MB, MBC VIT y MBAP VIT. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%). ....	63
<b>Figura 2-20:</b> Cinética de viabilidad y tolerancia térmica de <i>Penicillium</i> sp. HC1 en diferentes medios en cultivos sumergidos. (A) MBC VIT (B) MBAP VIT ....	66
<b>Figura 2-21:</b> Viabilidad y tolerancia térmica – Día 7 de <i>Penicillium</i> sp. HC1 en diferentes medios en cultivos sumergidos: MB, MBC VIT y MBAP VIT. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%). ....	66
<b>Figura 3-1:</b> Cinética de la producción de conidios y biomasa de <i>Penicillium</i> sp. HC1 con diferentes flujos de aireación. (A) 0,5 vvm (B) 1,5 vvm (C) 2,5 vvm. ....	73
<b>Figura 3-2:</b> Conidios máximos y productividad de conidios máximos (A) 0,5 vvm (B) 1,5 vvm (C) 2,5 vvm. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%). ....	74
<b>Figura 3-3:</b> Biomasa máxima y productividad de biomasa máxima de <i>Penicillium</i> sp. HC1 con diferentes flujos de aireación (A) 0,5 vvm (B) 1,5 vvm (C) 2,5 vvm. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%). ....	76
<b>Figura 3-4:</b> Cinética viabilidad y tolerancia térmica de <i>Penicillium</i> sp. HC1 con diferentes flujos de aireación. (A) 0,5 vvm (B) 1,5 vvm (C) 2,5 vvm. ....	78
<b>Figura 3-5:</b> Viabilidad y tolerancia térmica – Día 7 de <i>Penicillium</i> sp. HC1 con diferentes flujos de aireación (A) 0,5 vvm (B) 1,5 vvm (C) 2,5 vvm. Las letras iguales representan	

---

los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%).....	79
<b>Figura 4-1.</b> Cinéticas mg CO <sub>2</sub> / g residuos de clavel para microcosmos 1 y 2. ....	91
<b>Figura 4-2.</b> Producción de mg CO <sub>2</sub> / g residuos de clavel al día 42. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%). ....	92
<b>Figura 4-3.</b> Productividad de mg CO <sub>2</sub> / g residuos de clavel en los microcosmos 1 y 2. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%). ....	93
<b>Figura 4-4.</b> Cinética de la actividad celulasa en los microcosmos 1 y 2.....	95
<b>Figura 4-5.</b> Actividad celulolítica por semanas. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%). .	97
<b>Figura 4-6.</b> Cinética de lacasa en los microcosmos 1 y 2. ....	99
<b>Figura 4-7.</b> Actividad lacasa por semanas. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%). ....	101
<b>Figura 4-8.</b> Cinética de la actividad manganeso peroxidasa (MnP) en los microcosmos 1 y 2... ..	102

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1-1:</b> Porcentaje de lignina, celulosa y hemicelulosa en diferentes biomásas lignocelulósicas en base seca. Adaptado de (Al-Snafi, 2017; Mejía Rivera, 2021; Nugrahini et al., 2022; Quevedo Hidalgo, 2011) .....	11
<b>Tabla 2-1.</b> Resumen de los medios de cultivo estudiados en el capítulo 2. ....	37
<b>Tabla 2-2.</b> Efecto de las vitaminas sobre el crecimiento y la esporulación de varias especies de <i>Penicillium</i> . Adaptado de (Basu & Bhattacharyya, 1962) .....	64
<b>Tabla 2-3.</b> Resumen de los máximos resultados obtenidos por cada ensayo en Erlenmeyer.....	67
<b>Tabla 3-1.</b> Resumen de los máximos resultados obtenidos por cada ensayo en el biorreactor.....	80
<b>Tabla 4-1.</b> Resumen de los montajes para la evaluación de la degradación de residuos de clavel.....	87
<b>Tabla 4-2.</b> Actividad celulasa máxima por ensayo. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%).....	96
<b>Tabla 4-3.</b> Actividad lacasa máxima por ensayo. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%).....	99
<b>Tabla 4-4.</b> Actividad MnP máxima por ensayo. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%).	103
<b>Tabla 4-5.</b> Composición de celulosa y lignina en la pared celular después de cada tratamiento .....	106

## Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
ABTS	Ácido 2,2' azino-bis-(3 etil benzatiazoline sulfato)
AP	Aminoácidos de Prueba
BCAA	Aminoácidos ramificados
C	Centígrados
CMC	Carboximetilcelulasa o endoglucanasa
C/N	Relación carbono nitrógeno
DMP	2,6 dimetoxifenol
g	Gramo
h	Hora
HPB	Hongo de podredumbre blanca
LiP	Lignina peroxidasa
mg	Miligramo
mL	Mililitro
MB	Medio base
MAC	Medio artículo con casaminoácidos
MBC	Medio base con casaminoácidos
MBAP	Medio base con aminoácidos de prueba
MBC VIT	Medio base con casaminoácidos y vitaminas
MBAP VIT	Medio base con aminoácidos de prueba y vitaminas
MnP	Manganeso peroxidasa
rpm	Revoluciones por minuto
vvm	Litros de aire/Litros de sustrato/minuto
μL	Microlitro



# Introducción

La floricultura es una de las actividades agroindustriales más desarrolladas en Colombia. Desde sus inicios, la industria floricultora ha sido concebida como una actividad orientada hacia la exportación (Bonilla Rojas, 2021). A partir de los años sesenta, se desarrolló mediante un enfoque de agricultura intensiva, lo que le ha permitido crecer rápidamente y convertirse en una atractiva oportunidad de inversión en el país. En contexto, Colombia produce más de 1.600 variedades de flores (Ceniflores, 2023) y cuenta con más de 7.700 hectáreas sembradas (registradas en 2020) de las cuales se encuentran distribuidas principalmente en Cundinamarca el 66% de la producción total nacional (Bonilla Rojas, 2021; Minagricultura, 2020). Esta industria exporta el 95% y es un importante generador de empleo, ya que destaca por ser la actividad agrícola con mayor demanda de mano de obra por hectárea (Minagricultura, 2020). Gracias a esta trayectoria, la industria floricultora colombiana ha logrado una posición privilegiada a nivel internacional, posicionándose como el mayor exportador de clavel, el segundo con más exportaciones de flores frescas cortadas con una participación del 16% en el mercado mundial después de Holanda que tiene un 45%, y el primer proveedor de flores importadas en los Estados Unidos (Santos Ríos, 2021). Sin embargo, para mantenerse a la vanguardia y seguir contribuyendo de manera significativa a la economía nacional, es esencial fortalecer un pensamiento integral que tome en cuenta la conciencia de los trabajadores, la comunidad y el ambiente en todas las etapas de la producción. Esto implica fomentar la innovación y el uso de tecnologías e insumos que sean sostenibles y respetuosos con el entorno (Villarreal Usaquén, 2022).

La generación de residuos agroindustriales en las diferentes etapas de los procesos productivos es actualmente una problemática a nivel mundial, debido a que en la mayoría de los casos no son procesados o dispuestos adecuadamente, situación que contribuye a la contaminación ambiental y a la ineficiencia de los procesos (Vargas Corredor & Pérez Pérez, 2018). Cerca del 93% de los residuos sólidos convencionales generados por la floricultura corresponden a desechos vegetales que provienen de las etapas de corte, post cosecha y arranque de plantas (Cadena Forero, 2022; Montero et al., 2019). Estos

residuos son de naturaleza lignocelulósica, es decir, están compuestos por polímeros estructurales: celulosa, lignina y hemicelulosas, los cuales son complejos y costosos de separar y procesar para su aprovechamiento (Nugrahini et al., 2022). A nivel nacional, la floricultura genera alrededor de 130 mil toneladas de residuos vegetales al año (Minagricultura, 2020). Estos residuos podrían ser empleados para la generación de energía, la producción de biocombustibles y otros compuestos químicos como el papel (Alfonso Moreno et al., 2016; Yepes Maya & Chejne Janna, 2012). Sin embargo, las prácticas que se realizan para emplearlos de esa forma salen excesivamente costosas para los agricultores en términos económicos de tratamiento y transporte, y no suelen ser la especialidad ni el interés del sector (DANE & DIRPEN, 2011; Florverde, 2022). Hasta la actualidad se sigue recurriendo al compostaje tradicional, a darlo como alimento para animales y a las quemas a cielo abierto (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2020; Villarreal Usaquén, 2022). Estas acciones tienen implicaciones ambientales por su lenta degradación, generando lixiviados que contaminan suelos y aguas, introducción de plaguicidas en las cadenas tróficas al darlo como alimento para animales y emisiones al aire por las quemas (Barriga, 2007; Ceniflores, 2023; Yepes Maya & Chejne Janna, 2012).

El desarrollo de bioinoculantes que usan organismos fúngicos como principio activo han sido evaluados como alternativas biológicas en el manejo de los residuos de postcosecha y se ha venido desarrollando como una tecnología limpia que disminuye los tiempos de degradación para que correspondan con los tiempos del cultivo, y a la vez, incrementan los rendimientos agrícolas y forestales (de Carvalho, 2016). La empresa Biocultivos S.A en convenio con el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, han desarrollado varios bioinoculantes, uno de ellos promueve la aceleración de la degradación de residuos vegetales *in situ*; la base de este insumo es el hongo denominado *Penicillium sp. HC1* que ha demostrado tener una muy buena actividad celulolítica y xilanolítica, además de ser un microorganismo GRAS (Generally Recognised As Safe) (Gutiérrez et al., 2012; Pedraza-Zapata et al., 2017). La producción industrial de *Penicillium sp HC1* ha venido enfrentando retos por la dificultad de producir conidios en fermentación sumergida (Macias Camacho, 2017). La importancia de los conidios o esporas es que son estructuras de resistencia que mejoran la calidad del insumo con el aumento de su viabilidad y tolerancia a condiciones ambientales (Durán Sequeda, 2017; Gutiérrez Rojas, 2017). Por otro lado, la producción a gran escala también debe garantizar la viabilidad del microorganismo y la conservación de las características de interés como la secreción de

enzimas celulolíticas tal como se espera para *Penicillium* sp. HC1 (Gutiérrez Rojas, 2017). En este caso, debido a que es posible que el bioinoculante se almacene sin cadena de frío o a las condiciones de uso en los cultivos, los conidios presentes en el bioinoculante deben tolerar condiciones ambientales diferentes a las condiciones óptimas de crecimiento. Luego, estudiar las condiciones de producción que conlleven a la obtención de conidios y su tolerancia a condiciones de estrés es prioritario para la mejora del bioinsumo (Gutiérrez Rojas, 2017; Paixão et al., 2019; Swain et al., 2023).

Con el objetivo de generar conocimiento en torno al perfeccionamiento de los procesos productivos de bioinsumos que promuevan el manejo adecuado de residuos lignocelulósicos, este proyecto se enfoca en evaluar el efecto de condiciones de cultivo en fermentación sumergida sobre la producción de *Penicillium* sp. HC1 usado en la degradación de residuos vegetales de cultivos de flores en Guasca - Cundinamarca.

Varios objetivos se propusieron para lograr este fin. El primero fue la evaluación de la influencia del uso de calcio y de los casaminoácidos a diferentes concentraciones sobre la producción de *Penicillium* sp. HC1, el medio de cultivo base que se usó como patrón de referencia para los análisis comparativos fue el medio estandarizado por la alianza Biocultivos – IBUN (capítulo 2). A partir de los resultados obtenidos en esta etapa, se seleccionó la mejor condición teniendo como variables de respuesta la concentración de conidios (conidios/mL), la producción de biomasa (UFC/mL), la viabilidad (% de germinación) y tolerancia térmica del insumo (% de germinación), e indicadores como los conidios máximos (conidios/mL), productividad de conidios (conidios/mL/hora), biomasa máxima (UFC/mL) y productividad de biomasa (UFC/mL/hora). El segundo objetivo específico fue la evaluación de la influencia de diferentes flujos de aire para un sistema de fermentación de 4 litros en tanque agitado, usando la mejor condición de medio de cultivo seleccionado del objetivo anterior y tomando las mismas variables de respuesta e indicadores para el análisis (capítulo 3). Nuevamente se seleccionó la condición que generó los mejores resultados para producir el hongo y luego, se implementó el producto de la fermentación en la evaluación de la degradación de residuos vegetales de un cultivo de clavel de una empresa ubicada en el municipio de Guasca Cundinamarca, en esta etapa se realizaron pruebas en laboratorio con la construcción de microcosmos y una prueba en campo; se analizó la producción de dióxido de carbono semanal, el material vegetal se estudió en cuanto a su composición de lignina, celulosa y hemicelulosa al inicio y final de la degradación que duró 45 días, así como también se hizo un seguimiento a la actividad enzimática de lacasa, manganeso peroxidasa y celulasa cada semana (capítulo 4).



# 1. Capítulo 1. Revisión de literatura

## 1.1 Sector floricultor en Colombia y residuos agroindustriales

Colombia ha experimentado un notable avance en el sector de la floricultura desde sus inicios en la década de los 60, destacándose como una de las principales actividades agroindustriales del país. Se ha posicionado como el mayor exportador de clavel a nivel mundial, el segundo con más exportaciones de flores frescas cortadas en el mundo con una participación del 16% en el mercado mundial después de Holanda que tiene un 45% (Santos Ríos, 2021), y el primer proveedor de flores importadas en los Estados Unidos (Minagricultura, 2020).

Su clima favorable, diversidad geográfica y condiciones ideales para el cultivo han impulsado el desarrollo de esta industria, generando importantes beneficios económicos para el país. Según datos proporcionados por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), en el año 2020, el país produjo alrededor de 1,6 mil millones de tallos de flores y cuenta con más de 7.700 hectáreas sembradas de flores (para el año 2020), de las cuales se encuentran distribuidas principalmente en Cundinamarca el 66% de la producción total nacional, seguido de Antioquia con 33% y el 1% restante se encuentra distribuido en pequeñas áreas en Boyacá, Eje cafetero, valle del cauca y Nariño (Bonilla Rojas, 2021; Minagricultura, 2020). Estas regiones cuentan con las condiciones climáticas y edafológicas adecuadas para su desarrollo.

En Colombia se producen más de 1.600 variedades de flores, entre las cuales se destacan la rosa con un 33,5% de las hectáreas sembradas de flores en el territorio nacional, seguido por la hortensia con un 20,5%, el crisantemo con 12%, el clavel con 11,6%, alstroemeria con 4,9% y otras variedades corresponden al 17,5% (Ceniflores, 2023). Más de 89 países importan flores colombianas, los principales mercados son Estados Unidos (76%), Rusia (5%), Reino Unido (4,1%) y Japón (3,8%) (Minagricultura, 2020; Procolombia, 2019).

Cerca del 95% de la producción se exporta (Minagricultura, 2020). Resulta relevante destacar que este ámbito contribuye aproximadamente con el 7% del Producto Interno Bruto agropecuario de Colombia, generando empleo para 120.000 trabajadores y representando una fuente de trabajo para el 25% de la mano de obra femenina en las zonas rurales (Colombia CO, 2019). Más exactamente, por cada hectárea cultivada se generan 17 empleos (Procolombia, 2019). De manera similar, cuenta con un tejido empresarial de casi 400 empresas, las cuales generan tanto empleos directos como indirectos en 60 municipios a lo largo del país (Minagricultura, 2020; Procolombia, 2019). En definitiva, además de tener un impacto social fuerte, la floricultura también juega un papel crucial en términos de sostenibilidad. En 1973, se conformó el gremio denominado Asociación Colombiana de Exportadores de Flores, Asocolflores, y dentro de este, se creó un programa llamado Florverde que promueve las buenas prácticas en materia de sostenibilidad y responsabilidad social (Bonilla Rojas, 2021; Icontec, 2023). El objetivo es que los floricultores empleen menos insumos agrícolas de síntesis química, que protejan los derechos de los trabajadores, la calidad del producto y las buenas prácticas gerenciales (Icontec, 2023). Con esta certificación, los floricultores generan confianza en los mercados, garantizan la trazabilidad y el control sobre los productos y mejoran la competitividad del sector (Bonilla Rojas, 2021; Icontec, 2023).

En el marco de la Agenda Estratégica 2030 'Por la Sostenibilidad del Sector Floricultor', desde el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural se continuará con la articulación de actores de la cadena, con el apoyo de la Consejería Presidencial para la Competitividad y la Gestión Pública - Privada, para desarrollar la política pública que permita la reactivación, promoción y consolidación de la floricultura colombiana en los mercados internacionales, bajo parámetros de productividad sostenible, adaptación tecnológica, rentabilidad del sector y bienestar para los trabajadores de la floricultura y sus comunidades. El sector floricultor es el segundo reglón de exportaciones agrícolas del país, con un 20,1% de participación en las exportaciones nacionales, después del café que posee el 32,2% (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2020). Las exportaciones se vieron afectadas en el sector por causa de la crisis del COVID-19, sin embargo, la floricultura siguió creciendo durante 2022, el país tuvo el regreso de la presencialidad y el fortalecimiento de las exportaciones a más de 100 países, representando un incremento del 17% de toneladas enviadas frente al 2019 (Asocolflores, 2022). Como se evidencia, el sector

floricultor en Colombia tiene proyecciones de crecimiento con perspectivas sostenibles. No obstante, mayor producción implica mayor generación de residuos.

Una problemática transversal en la agroindustria es la generación de subproductos o residuos en las diferentes etapas del proceso productivo que no son dispuestos adecuadamente. En algunos casos los residuos son tratados hasta reducir el impacto negativo que su emisión, vertimiento o disposición pudiera generar; reincorporándolos al proceso productivo o convirtiéndolos en un producto útil y de mayor valor agregado que solucione una problemática y genere ingresos económicos adicionales (R et al., 2017). Para el contexto de la investigación, se sabe que la producción masiva de flores en Colombia conlleva la generación de residuos entre los que se encuentran los tallos y hojas descartados durante el proceso de cosecha y clasificación de las flores, así como los residuos de empaque, como plásticos y cartón (Cadena Forero, 2022). El 93% de los residuos sólidos generados son de naturaleza lignocelulósica, lo que quiere decir que son complejos y costosos de separar para su correcto tratamiento o aprovechamiento (García, 2019).

Según un estudio realizado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia en el año 2019, se estima que la generación anual de residuos de flores en el país alcanza aproximadamente 130 mil toneladas. Este volumen considerable destaca la importancia de implementar estrategias efectivas de gestión de residuos en la industria floricultora (Minagricultura, 2020). Se estima que alrededor del 10% al 30% de las flores producidas pueden convertirse en residuos, dependiendo del tipo de cultivo y las prácticas de gestión aplicadas (Montero Sánchez & Quintero Cardoso, 2010).

A nivel nacional, la floricultura genera alrededor de 1,5 m<sup>3</sup>/ha/día o aproximadamente 1 t/ha/semana de desechos vegetales (García Mora, 2006). Este sector genera residuos vegetales en grandes cantidades, lo que, unido a su lenta degradación, dificulta el manejo y se convierte en un problema de alto impacto ambiental, pérdida de espacio físico, generación de plagas, eutroficación de aguas si estos o sus lixiviados llegan a los cuerpos de agua, emisiones al aire si se queman y potenciales riesgos de magnificación de plaguicidas en la cadena trófica, si se dan como alimento al ganado u otros animales (Barriga, 2007). Además, el agua de lluvia y la descomposición del material vegetal hacen que las sustancias tóxicas pasen al suelo y a aguas superficiales y subterráneas; esta

contaminación puede llegar a ser peligrosa localmente en el largo plazo (Quevedo Hidalgo, 2011).

Existen diversas opciones para el uso de los residuos vegetales y evitar la acumulación de biomasa en grandes cantidades, por ejemplo, se usa en el sector energético, para la generación de energía y biocombustibles, en bioproductos agrícolas y como materia prima para la industria del papel (Alfonso Moreno et al., 2016; Yepes Maya & Chejne Janna, 2012). Sin embargo, todas ellas tienen altos costos asociados a los equipos necesarios para llevar a cabo estos aprovechamientos o a separación de los componentes de la matriz vegetal (algunas implican el uso de enzimas y ácidos) y al proceso de transformación como tal (Montero Sánchez & Quintero Cardoso, 2010). Pequeños y medianos agricultores en el contexto colombiano no están en capacidad de absorber los costos que ello demanda y tampoco es la especialidad en su sector; por esta razón, dentro del programa de gestión ambiental, los residuos vegetales se suelen tratar en pilas de compostaje (DANE & DIRPEN, 2011), no obstante, el compostaje requiere de mano de obra adicional y un largo periodo de tiempo que, en el mejor de los casos, puede ser de 5 a 8 semanas (Santos Ríos, 2021; Yepes Maya & Chejne Janna, 2012). También, suelen disponerse los residuos vegetales como alimento para animales, se recurre a quemar o se entrega a una entidad que esté autorizada para su correcto tratamiento.

### **1.1.1 Residuos de clavel**

El clavel o clavelina es una planta vascular perteneciente a la familia de las *Caryophyllaceae* y al género *Dianthus*. Es una planta perenne de día largo y con base leñosa, de las cuales se conocen numerosas variedades debido a los procesos de selección y las diversas técnicas de hibridación. Alcanzan alturas de 45 a 60 cm (Idárraga & Callejas, 2011). Ver Figura 1-1.



**Figura 1-1:** Claveles de la empresa Siecha Flowers S.A – Guasca Cundinamarca.

Colombia es reconocida por ser el mayor exportador mundial de claveles con más de 100 variedades. Los claveles representan el 14% de las exportaciones nacionales de flores (Ceniflores, 2023). Luego, Colombia concentra su mayor producción de claveles (97%) en el departamento de Cundinamarca (Asocolflores, 2022).

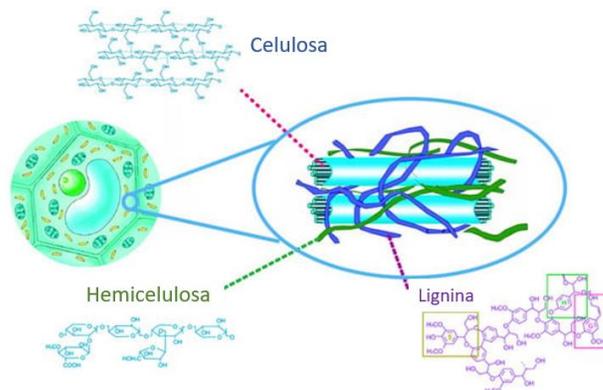
Según cifras proporcionadas por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia, en el año 2020 se produjeron aproximadamente 360 millones de tallos de claveles en el país. Se estima que aproximadamente el 15% al 25% de la producción total de claveles se convierte en residuos. Esto significa que se generan alrededor de 54 millones a 90 millones de tallos de claveles que terminan como residuos anualmente en el país (Montero Sánchez & Quintero Cardoso, 2010).

### **1.1.2 Composición de los residuos de clavel**

La biomasa lignocelulósica es una matriz compuesta principalmente por ésteres extraíbles, proteínas, carbohidratos, lignina y material mineral. Estos compuestos actúan como intermediarios metabólicos, reserva de energía o forman parte de los mecanismos de defensa contra los ataques microbianos. Los extraíbles corresponden a ceras y lípidos, los carbohidratos se clasifican en solubles, como fructosa y sacarosa, no estructurales, como el almidón y estructurales como celulosa y hemicelulosa (Rangel Ortega, 2012).

La biomasa típica seca de las plantas vasculares está compuesta de celulosa, la lignina y la hemicelulosa. Estos son compuestos claves en la pared celular de las plantas y se

encuentran entrelazados formando una matriz compleja como se muestra en la Figura 1-2 (Wu et al., 2023).



**Figura 1-2:** Estructura de la biomasa lignocelulósica. Modificada a partir de (Wu et al., 2023).

La celulosa es el mayor componente estructural de todas las células de las plantas y es el compuesto orgánico más abundante de la tierra (Vargas Rodríguez & Romero Gutiérrez, 2009). Es un polímero lineal que está compuesto de subunidades de D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 glicosídicos y forma cadenas largas o fibrillas elementales, unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de van de Waals (Sánchez, 2009). Sus propiedades macromoleculares y características estructurales hacen los estudios de la biodegradación complejos (Sánchez, 2009)

La hemicelulosa es un polisacárido con un peso molecular más bajo que la celulosa. Está formada de D-xilosa, D-manosa, D-galactosa, D-glucosa, L-arabinosa y ácidos 4,0-metilglucurónico, Dgalacturónico y D-glucurónico. Los azúcares están unidos por enlaces  $\beta$ -1,4 y algunas veces  $\beta$ -1, 3-glicosídicos. La hemicelulosa es la fracción más biodegradable de la lignocelulosa porque no adopta una estructura cristalina como la celulosa y su complejidad estructural no es tan alta como la lignina, además se biodegrada a azúcares monoméricos y ácido acético (Sánchez, 2009).

La lignina proviene de tres alcoholes precursores: el alcohol p-hidroxicinamílico (cumarílico), el alcohol 4-hidroxi-3-metoxicinamílico (coniferílico) y el alcohol 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinamílico (sinapílico). La copolimerización de radicales libres de estos alcoholes, iniciadas por peroxidasas vegetales, da lugar a este polímero (Calderón Tenori et al., 2001). Es entonces un polímero amorfo tridimensional que contiene muchos enlaces estables, siendo el más común el  $\beta$  aril éter ( $\beta$ -O-4). Las causas por las cuales la lignina

es tan resistente al ataque de las enzimas microbianas son: los anillos aromáticos son generalmente más difíciles de degradar, la variedad de enlaces entre las unidades constitutivas de la lignina y la naturaleza hidrofóbica requiere un sistema de rompimiento no específico, que para la mayor parte debe ser tanto no hidrolítico como extracelular (Quevedo Hidalgo, 2011). Además, esta red de polímeros altamente resistentes a la degradación anaeróbica hace que la celulosa se encuentre incrustada en la lignina, y, por tanto, las enzimas celulolíticas tienen un difícil acceso a la celulosa, retardando o previniendo la hidrólisis, que convertirá a este polímero en azúcares (Fernandes et al., 2009). Algunos basidiomicetes son los más eficientes degradadores de este polímero recalcitrante en la naturaleza (Martínez et al., 2009).

Los otros compuestos de la biomasa lignocelulósica son generalmente solubles y representan el 4 – 10% del peso seco del material. Entre los compuestos orgánicos se encuentran: pectinas, alcaloides, proteínas, ceras, grasas, fenoles, azúcares simples, mucílagos, gomas, resinas y terpenos, entre otros. Los compuestos inorgánicos, como las cenizas, los cuales no se alteran al someter la biomasa a altas temperaturas, presentan valores iguales o inferiores al 2% en peso seco de la madera (Cunningham & López, 1994; Prinsen, 2010).

La estructura de la celulosa es la misma en los diferentes tipos de material vegetal. Sin embargo, en las hemicelulosas existe una considerable variación, especialmente entre las angiospermas y gimnospermas: las primeras son en general más ricas en mananos mientras las segundas suelen contener más xilanos (Quevedo Hidalgo, 2011; Santos et al., 2011). Para evaluar el material y su degradación, es importante conocer su composición química. Sin embargo, el conocimiento de la composición de los residuos vegetales en el sector floricultor es incompleto y varía mucho dependiendo de las condiciones de cultivo y de la especie. La Tabla 1-1 muestra la composición de la matriz lignocelulósica de algunos materiales vegetales. Lo anterior es primordial para la investigación ya que permitirá hacer una aproximación para el caso de los residuos de clavel, los cuales son tallos y hojas principalmente.

**Tabla 1-1:** Porcentaje de lignina, celulosa y hemicelulosa en diferentes biomásas lignocelulósicas en base seca. Adaptado de (Al-Snafi, 2017; Mejía Rivera, 2021; Nugrahini et al., 2022; Quevedo Hidalgo, 2011)

<b>Biomasa</b>	<b>Celulosa (%)</b>	<b>Hemicelulosa (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>
Bagazo	25 - 45	28 - 32	15 - 25
Bambú	26 - 43	15 - 26	21 - 31
Cascara de cebada	34	36	13,8 - 19
Residuos de banano	13	15	14
Pulpa de café	35	46	19
Mazorcas de maíz	33,7 – 41,2	31,9 - 36	6,1 – 15,9
Rastrojo de maíz	40	31	18
Rye Grass (hoja temprana)	21	16	3
Tallo de madera dura	40 - 50	24 - 40	18 - 25
Tallo de madera blanda	45 - 50	25 - 35	25 - 35
Residuos vegetales clasificados	60	20	20
Hojas	15 - 20	80 - 85	NR
Miscanthus	45 - 52	24 - 33	9 - 13
Sorgo dulce	45	25	18
Pastos	25 - 40	35 - 50	10 - 30
Corona de crisantemo	24,51	NR	12,14
Tallos de crisantemo	21,55	NR	23,55
Crisantemo	49,6	7,5	17,5
Rosa	42,9	5,7	14,8
<b>Clavel fresco</b>	<b>28,2</b>	<b>6,2</b>	<b>10,7</b>

NR. No reportado

### 1.1.3 Degradación de los residuos vegetales

La degradación de polímeros estructurales de material lignocelulósico se puede dar a través de diversos métodos fisicoquímicos, pero también, es posible llevarse a cabo mediante estrategias biológicas como el uso directo de microorganismos con la forma reproductiva activa, de esta manera producir inóculos con la capacidad de sintetizar los compuestos al momento de su aplicación.

La degradación de los compuestos lignocelulósicos es un proceso complejo que involucra la acción sinérgica de un gran número de enzimas extracelulares, como las celulasas, hemicelulasas y ligninasas.

## ***Celulasas***

Las enzimas celulolíticas desempeñan un papel esencial en la hidrólisis de la celulosa para convertirla en glucosa. Entre las principales enzimas celulolíticas se encuentran las endoglucanasas, exoglucanasas y celobiohidrolasas, las cuales presentan diferentes niveles de especificidad hacia el sustrato (Gutiérrez-Rojas et al., 2015).

La degradación del polímero de celulosa esta mediada por 3 pasos fundamentales: Reducción de tamaño, pretratamiento e hidrólisis enzimática (Y.-H. P. Zhang & Lynd, 2004). Las celulasas son las responsables de la hidrólisis de la celulosa. Están compuestas de un complejo enzimático con diferentes especificidades que permiten hidrolizar los enlaces glicosídicos (Howard et al., 2003). Son enzimas que catalizan la conversión de la celulosa en glucosa y se dividen tradicionalmente en tres clases: celobiohidrolasas que, una vez unidas al sustrato, por un módulo de unión a carbohidratos, se mueven a lo largo de la cadena de glucosa liberando celobiosa; endoglucanasas que hidrolizan enlaces internos de la cadena de celulosa dejando extremos libres como resultado; y  $\beta$ -glucosidasas que hidrolizan moléculas de celobiosa convirtiéndolas en glucosa. Estas enzimas, en conjunto, trabajan en la hidrólisis de celulosa (Zambrano Arcentales, 2017). Para una hidrólisis completa de la celulosa a glucosa, el sistema de enzimas debe contener las tres enzimas en proporciones adecuadas. Además del sinergismo entre estas enzimas, la adsorción de las celulasas a los sustratos insolubles es un paso necesario antes de la hidrólisis. Ha sido ampliamente estudiada la cinética de la hidrólisis enzimática de la celulosa incluyendo la adsorción, la inactivación y la inhibición de las enzimas (Y. Zhang & Yamaura, 2020)

## ***Hemicelulasas***

En cuanto a las hemicelulasas, que se encargan de degradar los azúcares de cinco carbonos presentes en la hemicelulosa, las enzimas más importantes son las xilanasas, xilosidasas y glucuronidasas.

En la degradación de la hemicelulosa intervienen las hemicelulasas. Estas son hidrolasas o esterases. La biodegradación total de xilano requiere endo- $\beta$ -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8),  $\beta$ -xilosidasa (EC 3.2.1.37) y muchas enzimas accesorias, tales como:  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55),  $\alpha$ -glucuronidasa (EC 3.2.1.131), acetilxilano esterasa (EC 3.1.1.72), ácido ferúlico esterasa (EC 3.1.1.73) y ácido p-cumárico esterasa,

necesarias para la hidrólisis de varios de los xilanos (Saha, 2004). Se afirma que un impedimento en la biodegradación de la lignocelulosa está asociado con los compuestos fenólicos. Los ácidos fenólicos se producen por la vía biosintética de los fenilpropanoides, y actúan como agentes de entrecruzamiento entre la lignina y los carbohidratos o entre carbohidratos. La  $\beta$ -mananasa (EC 3.2.1.78) hidroliza mananos provenientes de las hemicelulasas y libera  $\beta$ -1,4-manooligómeros, los cuales pueden ser degradados a manosa por la  $\beta$ -manosidasa (EC 3.2.1.25) (Quevedo Hidalgo, 2011; Saha, 2004). Las xilanasas son enzimas que catalizan la conversión del xilano de la hemicelulosa en xilosas, lo cual deja más expuesta la celulosa para ser degradada por celulasas. Se ha observado el efecto sinérgico de las xilanasas en hidrólisis de lignocelulosa (Zambrano Arcentales, 2017).

### ***Ligninasas***

Existen diversas enzimas ligninolíticas fúngicas que desempeñan un papel fundamental en la degradación de la lignina. Entre ellas se encuentran la manganeso peroxidasa y la ligninoperoxidasa, las cuales catalizan una variedad de reacciones oxidativas dependientes de  $H_2O_2$ . También se encuentran la lacasa, que oxida los compuestos fenólicos y reduce el oxígeno molecular a agua.

Por la complejidad de su estructura, la lignina es una molécula recalcitrante y su rompimiento involucra múltiples reacciones bioquímicas que se dan más o menos simultáneamente: clivaje de enlaces inter monoméricos, demetilaciones, hidroxilaciones, modificaciones de extremo de cadena y fisión de los anillos aromáticos seguido por desasimilación de los metabolitos alifáticos producidos. Bajo condiciones naturales las enzimas ligninolíticas producidas por diferentes grupos de microorganismos producen la degradación. Así, la degradación biológica de la lignina debe ser consecuencia de la actividad de enzimas extracelulares. La habilidad de estas enzimas para actuar en diferentes compuestos fenólicos y no-fenólicos de la lignina ha sido explotada en el sector comercial para diferentes aplicaciones (Howard et al., 2003; Quevedo Hidalgo, 2011; Saha, 2004)

La degradación completa de la lignina requiere la acción sinérgica de enzimas oxidativas: la lignina peroxidasa (LiP), la manganeso peroxidasa (MnP) y la lacasa son enzimas que degradan la mayor parte de la lignina (Howard et al., 2003; Saha, 2004). La habilidad de un microorganismo para producir una o más de estas enzimas varía enormemente.

Además de la LiP, MnP y lacasa, en la degradación de la lignina están implicadas otras enzimas, como veratril alcohol oxidasa, aril alcohol deshidrogenasa, quinona oxidoreductasa, aromático ácido reductasa, dioxigenasa, catalasa, aromático aldehído oxidasa y glioxal oxidasa, entre otras. Dicho esto, estas últimas enzimas desempeñan un papel secundario en comparación con las peroxidases, ya que actúan como intermediarias en la degradación de la lignina al generar  $H_2O_2$  necesario para la actividad de las peroxidases, o bien, catalizan la ruptura de los productos resultantes de la degradación de la lignina que está siendo llevada a cabo por las enzimas como LiP, MnP y lacasa (Mendonça Maciel et al., 2010).

### ***Factores que influyen en la actividad enzimática***

Los hongos de podredumbre blanca (HPB) son responsables de la degradación efectiva de la lignina natural. Si bien muchos HPB producen fenol oxidases extracelulares, solo alrededor del 40% de ellos producen la combinación de lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa. Por otro lado, la combinación de manganeso peroxidasa y lacasa es mucho más común entre estos hongos (Gupta et al., 2011). La degradación de la lignina por los HPB se desarrolla en la fase de crecimiento post primaria o bajo condiciones donde el metabolismo secundario (idiofase) se exprese simultáneamente con crecimiento primario restringido. Diversos factores nutricionales y condiciones de cultivo afectan la expresión y la actividad del sistema ligninolítico. Se han llevado a cabo investigaciones para analizar los impactos de diferentes factores, como co-sustratos (carbono), concentración y origen de la fuente de nitrógeno, tensión de oxígeno, agitación del cultivo y pH, con el objetivo de optimizar las condiciones para la degradación de la lignina por los hongos de podredumbre blanca (HPB) (Singhal & Rathore, 2001). Los efectos de los nutrientes minerales en la ligninólisis permite afirmar que un balance de  $Mg^{+2}$  y  $Ca^{+2}$  es importante en la degradación de la lignina. El  $Mn^{+2}$  juega un papel regulador en la expresión de la lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa, lacasa y en la degradación de la lignina (Singhal & Rathore, 2001). Un aumento en los niveles de oxígeno incrementa la actividad del sistema de degradación de la lignina, ya que proporciona el oxígeno necesario para las reacciones degradativas y la producción de  $H_2O_2$  (Kirk & Farrell, 1987; Quevedo Hidalgo, 2011).

Para que una enzima producida por un microorganismo pueda desempeñar su función de degradar un sustrato, es necesario proporcionarle las condiciones adecuadas. Diversos factores, como el pH, la temperatura, la concentración de la enzima y la concentración del

sustrato, entre otros, pueden influir en la acción enzimática. Por ejemplo, en estudios realizados en especies del género *Penicillium*, se ha observado que la enzima endo- $\beta$ -1,4-glucanasa producida por *Penicillium purpurogenum* muestra una actividad enzimática significativa a altas temperaturas (70°C y 60°C) y un pH óptimo de 5, según lo informado por Lee y sus colegas en 2010. De manera similar, Liao y sus colegas en 2015 describieron la actividad enzimática y la estabilidad de las xilanasas producidas por *Penicillium oxalicum* en diferentes sustratos lignocelulósicos. Se encontró que la actividad enzimática se mantuvo estable en un rango de pH entre 3 y 5, así como a una temperatura entre 50°C y 55°C, donde se conservó aproximadamente el 80% de la actividad enzimática. Estos ejemplos demuestran que cada enzima presenta condiciones específicas que pueden favorecer o afectar su actividad. (Bernal Ruiz & Gómez Sánchez, 2016).

La valorización de los residuos agroindustriales se ha realizado mediante procesos biológicos utilizando diversos microorganismos, tanto en fermentación sólida como sumergida, con el objetivo de obtener biomasa, azúcares o producir enzimas lignocelulolíticas. Estas estrategias han utilizado cepas como *Penicillium* sp, que tienen la capacidad de producir enzimas celulolíticas estables y altamente activas capaces de degradar los componentes de los residuos agrícolas. De esta manera, se están desarrollando alternativas limpias y naturales para controlar la acumulación de residuos vegetales (Duque Vidal & Gutiérrez Beltrán, 2011). Los HPB a pesar de tener la capacidad de degradar los componentes de la lignocelulosa, presentan largos tiempos de crecimiento, y, por tanto, el uso de cultivos mixtos es una alternativa implementada para la degradación rápida de residuos vegetales junto con el uso de hongos filamentosos de rápido crecimiento los cuales son productores de estructuras de propagación como especies de *Ascomycetes* (Durán Sequeda, 2017), entre ellas el género *Penicillium* como ya se mencionó.

## **1.2 *Penicillium* spp.**

### **Generalidades**

*Penicillium* es uno de los géneros de hongos clasificados en el filo *Ascomycota*, clase *Eurotiomycetes*, orden *Eurotiales* y familia *Trichocomaceae*. *Penicillium* es un género fúngico diverso y ubicuo, de amplia distribución por el mundo, caracterizado por ser saprófita oportunista, sus especies tienen diversas aplicaciones como producción de

micotoxinas, generación de enzimas, antibióticos y descomposición de materia orgánica (Frisvad et al., 2004; Seydametova & Zainol, 2021). Se han descrito como hongos filamentosos, heterótrofos y aerobios facultativos (Pitt & Hocking, 2009). El número de especies dentro del género aún es controversial debido a la gran plasticidad fenotípica y metabólica que muestran estos microorganismos (Frisvad, 2015); sin embargo, se estima la existencia de más de 350 especies (Refai et al., 2015; Visagie et al., 2014).

El mayor impacto de *Penicillium* es la producción de penicilina, que revolucionó los enfoques médicos para el tratamiento de enfermedades bacterianas (Pitt & Hocking, 2009; Refai et al., 2015). También es un género reconocido en la industria de alimentos por la producción de quesos asociadas a especies como *P. roqueforti* y *P. camemberti* (Refai et al., 2015). Otros reportes declaran especies de este género como capaces de degradar celulosa, quitina, almidón, azúcares, lignina (Carrillo, 2003), así como también, aplicaciones en otros campos como agentes biocontroladores y catalizadores para la biotransformación (de Castro Coêlho et al., 2021; Larroche & Gros, 1997). Para intereses de esta investigación, *Penicillium* sp. ha sido utilizado para degradar compuestos lignocelulósicos, y para el manejo de degradación de residuos agrícolas en campos y pilas de compostaje (de Castro Coêlho et al., 2021).

### **Conidiogénesis**

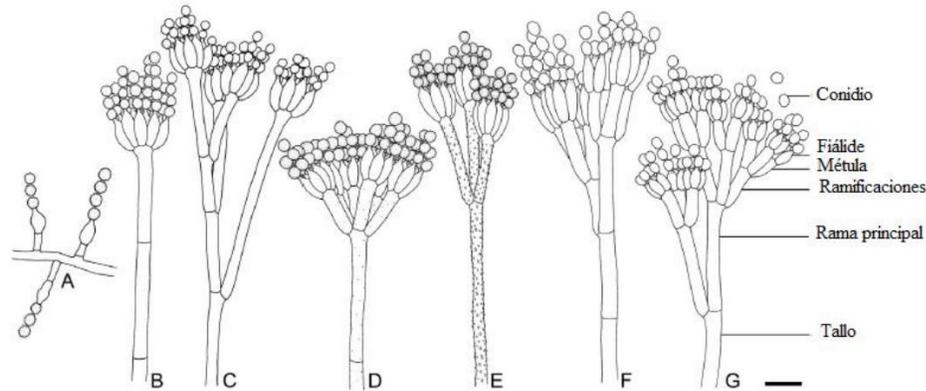
Para el género *Penicillium* el ciclo de vida puede transcurrir entre los estados de reproducción sexual y asexual (Frisvad, 2015; Malloch & Cain, 1972; Pitt & Hocking, 2009). Un organismo holomorfo, es un término utilizado en micología para describir un hongo que pasa por diferentes etapas en su ciclo de vida, incluyendo tanto la fase asexual como la fase sexual (Samson et al., 2011). En la fase sexual, el organismo holomorfo produce estructuras de reproducción sexual, como gametangios, ascos o basidios, que dan lugar a la formación de esporas sexuales, como ascosporas o basidiosporas (Houbraken & Samson, 2011). Estas esporas sexuales resultan de la fusión de gametos o células especializadas y permiten la recombinación y la variabilidad genéticas dentro de la especie (Dyer & O’Gorman, 2011a). En la fase asexual, el organismo holomorfo produce estructuras de dispersión asexuales, como conidios o esporas mitóticas, que le permiten propagarse y colonizar nuevos ambientes (Moss, 1987). Estas estructuras asexuales se forman mediante procesos como la conidiogénesis, esporulación o gemación (Pitt & Hocking, 2009; Samson et al., 2011). La capacidad de un organismo holomorfo para

alternar entre la reproducción asexual y sexual en su ciclo de vida, le confiere una mayor plasticidad reproductiva y adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales (Mukherjee & Ghorai, 2023).

La reproducción asexual o mitospórica en *Penicillium* spp. es la forma más común y eficiente en este género de hongos y tiene las siguientes fases (Dyer & O’Gorman, 2011b): *Fase de adaptación*: los conidios reconocen y se adaptan a las nuevas condiciones física y químicas del entorno; *fase de crecimiento exponencial o germinación*: se produce un aumento significativo de la masa celular de los conidios, los cuales experimentan un crecimiento isotrópico y germinan, lo que da lugar a la formación de una estructura filamentosa conocida como hifa; *fase estacionaria o de crecimiento vegetativo*: se establece un equilibrio entre el aumento y la disminución de la masa micelial; y la *fase de conidiogénesis*: en donde se generan nuevos conidios a partir de una estructura característica llamada conidióforo por una célula especializada llamada fiálide (Canteri & Ghoul, 2015; Durán Sequeda, 2017; Foster et al., 1945). De una misma hifa pueden aparecer diversas fiálides que forman una estructura característica llamada conidióforo; en el caso de *Penicillium* spp. el conidióforo tiene forma de pequeñas brochas lo que dio origen al nombre del género (Pitt & Hocking, 2009). Los conidios maduros se liberan de las fiálides y se dispersan en el entorno, permitiendo la colonización de nuevos hábitats (Dijksterhuis & Samson, 2002; Mukherjee & Ghorai, 2023). Una vez que el primer conidio se ha formado en la fiálide, un nuevo conidio aparece en intervalos aproximadamente de hora en hora aproximadamente, dando por resultado una cadena de conidios (Roncal & Ugalde, 2003).

Los conidióforos son de gran importancia taxonómica y su micro morfología puede variar dependiendo del tiempo de cultivo y la especie (Visagie et al., 2014). Las ramificaciones se ubican formando verticilos y la Figura 1-3 ilustra las diversas formas de conidióforos que se encuentran en *Penicillium*. Estos pueden incluir conidióforos simples con fiálides solitarias (Figura 1-3 A), conidióforos monoverticilados con un tallo septado único que se ramifica en un grupo de fiálides (Figura 1-3 B), conidióforos diverticilados que presentan una ramificación que va de simple a compleja con múltiples ramas subterminales, aunque las ramificaciones o secciones del conidióforo se desvían (Figura 1-3 C). También se encuentran conidióforos biverticilados con un tallo septado que posee tres o más métulas, las cuales son células que sostienen las fiálides y se extienden desde el extremo final del tallo hasta la base de la fiálide. Las métulas pueden variar en longitud, divergencia y forma,

siendo generalmente cilíndricas, aunque también pueden ser lisas o ligeramente vesiculosas (Figura 1-3 D, E). Asimismo, existen conidióforos terverticilados con un nivel adicional de ramificación entre el tallo y las métulas (Figura 1-3 F). Por último, algunos *Penicillium* producen conidióforos cuaterverticilados, que presentan un nivel extra de ramificación más allá del patrón terverticilado y son característicos de unas pocas especies (Figura 1-3 G) (Visagie et al., 2014).



**Figura 1-3:** Conidióforos y patrones de ramificación de *Penicillium* (A) Conidióforos con fiálides solitarias. (B) Monoverticilados (C) Bifurcado (D, E) Biverticilados (F) Terverticilado (G) Poliverticilado. Barra de escala = 10  $\mu$ l (Visagie et al., 2014).

El proceso de conidiación implica temas comunes de desarrollo, incluyendo la regulación espacial y temporal de la expresión génica, la comunicación intercelular y la especialización celular (Adams et al., 1998). El tipo de reproducción y la morfología de las estructuras resultantes son factores esenciales para identificar que especie de hongo es. En este sentido, el conidio fúngico se puede considerar como el inicio y el fin del proceso de diferenciación (Heath, 1995; Macías Camacho, 2017).

### 1.2.1 *Penicillium* sp. HC1

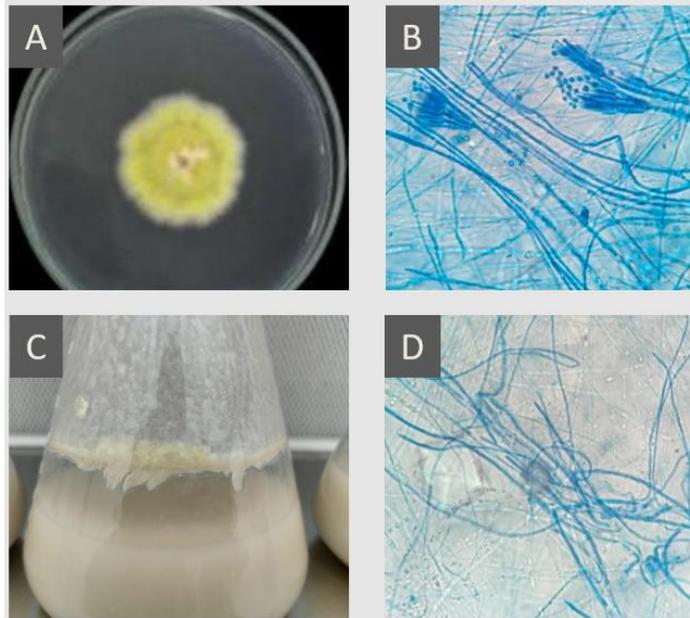
*Penicillium* sp. HC1 es el nombre asignado en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional – IBUN a un hongo obtenido de un tamizaje de microorganismos con actividad celulolítica en suelos rizosféricos de cultivos de arroz en los departamentos del Tolima y Meta en Colombia (Gutiérrez et al., 2012). Los resultados de la clave taxonómica (Samson et al., 2010) no fueron lo suficientemente concluyentes para determinar la especie (Gutiérrez Rojas, 2017).

En contexto, este hongo fue seleccionado junto con 54 aislamientos fúngicos para valorar su actividad celulolítica, de allí se filtraron y estudiaron ocho, de los cuales, cinco pertenecen al género *Penicillium*, reafirmando de esta manera la abundancia de este género en el suelo y su protagonismo en la degradación de residuos celulósicos (Pedraza-Zapata et al., 2017). *Penicillium* sp. HC1 ha sido estudiado desde entonces por su evidente actividad enzimática para la degradación de material vegetal, pero, además este hongo ha despertado interés como un promotor del crecimiento vegetal (Rodríguez Sánchez & Rodríguez Alfonso, 2017). Evaluando los posibles mecanismos directos mediante los cuales *Penicillium* sp. HC1 promueve el crecimiento de las plantas se descubrió principalmente que este hongo tiene la capacidad de descomponer diversas fuentes de fósforo, convirtiendo esos compuestos en ortofosfatos, que son la forma del fósforo que las plantas pueden asimilar (Rodríguez Sánchez & Rodríguez Alfonso, 2017). Además, el estudio reveló que *Penicillium* sp. HC1 puede producir ACC desaminasa, una enzima clave en el control del estrés celular de las plantas. Esta enzima reduce la síntesis de etileno por parte de la planta y aumenta la disponibilidad de amonio en la rizosfera (Bonilla López, 2020; Rodríguez Sánchez & Rodríguez Alfonso, 2017).

Focalizando la revisión bibliográfica en cuanto a su trabajo en la degradación de material vegetal, se encontró que se realizaron ensayos de degradación de tamo de arroz utilizando *Penicillium* sp. HC1, aquí midieron la producción de CO<sub>2</sub> durante sesenta días, encontrando que, produce  $140,33 \pm 2,6$  mgCO<sub>2</sub>/g tamo, superior a los demás aislamientos evaluados, seguramente por su capacidad de producción de enzimas con actividad celulolítica y xilanolítica (Pedraza-Zapata et al., 2017). Se incorporó al suelo el tamo tratado y se utilizó para un cultivo de plantas de arroz en invernadero. Los resultados mostraron que esta práctica tuvo un impacto positivo en diversos parámetros, como el peso seco del tallo, el peso seco de la raíz, la longitud del tallo y la longitud de la raíz (Sánchez Rodríguez, 2012).

La alianza Biocultivos S.A y La Universidad Nacional de Colombia a través del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional seleccionaron a *Penicillium* sp. HC1 para la formulación de un bioinoculante utilizado para acelerar la degradación de cosechas in situ (Gutiérrez Rojas, 2017; Macias Camacho, 2017). Desde el aislamiento de *Penicillium* sp. HC1, empezaron diferentes investigaciones exploratorias enfocadas al mismo objetivo, como la evaluación de su actividad enzimática, caracterización del microorganismo, pruebas en campo para evaluar su capacidad degradadora, evaluación de condiciones del

medio en fermentación sumergida, y después de seleccionado para crear un bioinsumo, todos estos factores con perspectiva al escalamiento industrial.



**Figura 1-4:** Características macroscópicas y microscópicas de *Penicillium* sp. HC1 (A) Macroscópica en agar PDA, 4 días y 25°C (B) Microscópica 40X de agar PDA, 4 días y 25°C con tinción azul de lactofenol (C) Macroscópica en medio líquido, 7 días y 25°C (D) Microscópica 40X en medio líquido, 7 días y 25°C con tinción azul de lactofenol.

*Penicillium* sp. HC1 crece muy bien y produce abundantes conidios en medio sólido, sin embargo, cuando se cultiva en medio líquido, utilizando los medios comúnmente usados en el laboratorio, produce abundante biomasa, pero no genera estructuras de reproducción y en consecuencia no se observan conidios (Gutiérrez Rojas, 2017). La Figura 1-4 muestra la morfología macro y microscópica de *Penicillium* sp. HC1 en medio sólido y líquido. Partiendo de los medios sólidos como punto de referencia, se encontró que los conidios de *Penicillium* sp HC1 obtenidos en esta fermentación presentaban altos porcentajes de germinación y tolerancia térmica, cercanos al 100% (Gutiérrez Rojas, 2017). Vale tener presente que, la producción del inóculo en fermentación sumergida tiene un serie de ventajas sobre la sólida en escala industrial, como permitir un mayor control sobre las variables a evaluar, obtener resultados en poco tiempo y bajos costos de medio, además se tiene la posibilidad de automatización y obtención de producto sin operaciones posteriores de separación; el problema de este tipo de fermentación está en que *Penicillium* sp HC1 se le dificulta producir conidios en medios líquidos y cuando lo logra,

éstos presentan menor viabilidad (Durán Sequeda, 2017). La importancia de los conidios es que son estructuras resistentes y tolerantes a condiciones ambientales, lo que mejora la viabilidad del producto (Canteri & Ghoul, 2015; Gutiérrez Rojas, 2017; Hadley & Harrold, 1958; Macias Camacho, 2017; Rodríguez & Romero, 2014). Por lo anterior, se dio prioridad al estudio del organismo para ser reproducido en medios líquidos.

Se han llevado a cabo investigaciones que contribuyen a la utilización de la mejor combinación de fuente de carbono y de nitrógeno para la inducción y/o aceleración de la conidiogénesis y la posterior evaluación de la calidad de los conidios obtenidos frente a diferentes temperaturas (Tibasosa Rodríguez, 2014). A partir de estos resultados, se seleccionaron los medios que mostraron una mayor producción de conidios, los cuales consistían en dos fuentes de carbono (sacarosa y almidón) y dos fuentes de nitrógeno (fosfato di amónico y extracto de levadura) (Pedraza-Zapata et al., 2017). Los resultados mostraron que la mayor producción de conidios se obtiene utilizando fuentes de carbono complejas con relaciones C/N altas, y la mayor tolerancia térmica a 50°C se logra utilizando fuentes de carbono complejas con fuentes de nitrógeno inorgánicas. Sin embargo, en el caso de fuentes de carbono simples, se obtuvieron buenas producciones ( $10^{10}$  conidios/g) y alta tolerancia a 50°C (58%), pero esto depende de la concentración inicial de carbono, específicamente limitada, y una relación alta de C/N (Gutiérrez Rojas, 2017).

Por otro lado, se encontró que la tolerancia a diversas condiciones de estrés como la exposición a radiación ultravioleta (García Castillo, 2015), la presencia de peróxido de hidrógeno y la exposición a tratamientos térmicos de 50°C durante una hora, responden a cambios en la relación C/N (Durán Sequeda, 2017; Gutiérrez Rojas, 2017), así pues, en un medio con glucosa y nitrato de potasio, la termotolerancia de los conidios aumentaba conforme se aumentaba la relación C/N (Durán Sequeda, 2017).

Como posibles variables de calidad asociadas a la tolerancia térmica se determinó la acumulación de manitol, trehalosa y cambios en la superficie de la pared celular de los conidios de *Penicillium sp. HC1*. Se encontró que conidios con alta tolerancia térmica producidos en medios de cultivo líquido que contienen sacarosa como fuente de carbono acumularon cerca de 90 mg/g de manitol. Aunque los cambios en la superficie de los conidios no se pudieron asociar a la termotolerancia de *Penicillium sp. HC1*, la combinación de las fuentes y las concentraciones evaluadas en los medios seleccionados presentaron cambios en el tamaño y variaciones en los patrones de ornamentación, estos patrones

fueron predominantemente cerebriformes. Los resultados indican que *Penicillium* sp. HC1 es un hongo muy sensible a las condiciones nutricionales de crecimiento, capaz de sensar y responder no sólo los tipos de fuentes de carbono o nitrógeno sino también las concentraciones y relaciones de C/N de las fuentes (Durán Sequeda, 2017). Macías Camacho (2017) realizó un modelo macro cinético generado a partir de las cinéticas obtenidas en fermentación sumergida, modelo que fue ajustado con parámetros teóricos adicionales relacionados con las características metabólicas asociadas a la generación de biomasa y se verificó su validez en producción piloto de 100 litros.

A partir de estos antecedentes, se seleccionaron las condiciones de operación y la composición del medio de cultivo que produce *Penicillium* sp. HC1 con los mejores resultados en la actualidad del proceso. Este es el punto de referencia de esta investigación y el medio base o de control. Ver Anexo A.

### **1.3 Factores que promueven la conidiogénesis de *Penicillium* spp. en fermentación sumergida**

En la mayoría de los hongos filamentosos, las etapas del ciclo de vida en el estado asexual involucran muchos factores, asociados a la regulación temporal y espacial de la expresión de genes, la diferenciación celular, la comunicación intra e intercelular y la respuesta a condiciones ambientales (Park & Yu, 2012).

La conidiogénesis en los hongos del género *Penicillium* puede estar influenciada por varios factores durante la fermentación sumergida. La composición del medio de cultivo, incluyendo los nutrientes, fuentes y/o limitaciones de carbono y nitrógeno, es crucial para inducir la formación de conidios (Durán Sequeda, 2017; Hadley & Harrold, 1958). Además, el oxígeno disponible, la adición de calcio, acumulación de metabolitos secundarios como la conidiogenona, el pH y la temperatura del medio deben mantenerse dentro de los rangos óptimos para promover una conidiogénesis adecuada. La luz y el fotoperíodo pueden estimular la formación de conidios en ciertas especies de *Penicillium* (García Castillo, 2015). Se debe tener en cuenta otros factores físicos que los involucran y afectan la morfología como la geometría del fermentador, la tasa de esfuerzo cortante, la reología y la agitación (Papagianni, 2004; Roncal & Ugalde, 2003). Debido a las características genéticas, algunas cepas pueden tener una mayor capacidad para producir conidios en comparación con otras (Canteri & Ghoul, 2015). Algunas interacciones microbianas, como

la competencia por nutrientes o la producción de compuestos inhibidores, toxinas o subproductos metabólicos en el medio de cultivo, pueden tener un impacto en la formación de conidios (Mukherjee & Ghorai, 2023; Pitt & Hocking, 2009). Por lo tanto, el estudio y la optimización de estos factores son importantes para la producción industrial de conidios de *Penicillium* spp. en diversas aplicaciones, como la producción de enzimas, alimentos fermentados y productos biocontroladores.

### **1.3.1 Influencia del calcio en fermentación sumergida para *Penicillium* spp.**

El calcio es un mineral esencial que desempeña un papel importante en numerosos procesos biológicos, incluyendo la fermentación microbiana (Pitt & Hocking, 2009). En el caso de la fermentación sumergida de *Penicillium* spp., el calcio puede tener varias influencias. En primer lugar, se ha encontrado que la presencia adecuada de calcio en el medio de cultivo mejora la resistencia de *Penicillium* spp. a condiciones adversas como cambios bruscos de temperatura, pH y estrés osmótico (U. O. Ugalde et al., 1990). Esto puede tener un impacto positivo en la viabilidad celular y la productividad durante la fermentación. Se presume que el aporte a la tolerancia a estresores ambientales por el calcio es contribuido en la estabilidad, fortaleza de la pared celular y prevención de la lisis celular de los hongos (Lange & Peiter, 2020). Además, el calcio puede actuar como un segundo mensajero intracelular y activar rutas de señalización que conducen a cambios en la expresión de genes específicos los cuales pueden influir en la producción de enzimas, metabolitos y otros productos de interés durante la fermentación (Boyle, 2005; Reddy et al., 2011).

También, se ha publicado que el ion calcio, desempeña un papel en el control del inicio del proceso de conidiogénesis, que está relacionado con el tiempo de crecimiento vegetativo (Pitt & Poole, 1981). Se ha demostrado que la interacción del calcio con el micelio sigue una cinética bifásica. La primera fase implica una rápida adsorción del catión a la superficie celular, independiente del metabolismo, mientras que la segunda fase muestra una cinética más lenta y dependiente del metabolismo, que está mediada principalmente por mecanismos de transporte activo (Canteri & Ghoul, 2015; U. O. Ugalde & Pitt, 1986). La adsorción de calcio por las paredes celulares puede inhibir el crecimiento celular, pero a concentraciones subóptimas se promueve el crecimiento micelial (Bockelmann et al., 1999; Lange & Peiter, 2020). Luego, se ha observado que el calcio está involucrado en la

formación y germinación de conidios en diversos hongos. El rango de concentraciones de calcio que se encuentra reportado como inductor de conidiogénesis para diferentes especies de *Penicillium* varía en 0,02 y 50 g/L (Macias Camacho, 2017) Sin embargo, los datos predominantes son de  $\text{CaCl}_2$  y están en concentraciones inferiores a 10 g/L.

Se ha observado que la adición de calcio al medio de cultivo puede aumentar la producción de ciertos metabolitos, como enzimas hidrolíticas, pigmentos y compuestos bioactivos (Pitt & Poole, 1981; U. O. Ugalde & Pitt, 1986; U. Ugalde & Pitt, 1983). En ciertas especies de *Penicillium* se observa la formación de conidios cuando se presentan condiciones de limitación de fuentes de carbono y nitrógeno. Para *P. oxalicum*, se ha determinado que el agotamiento de nitrógeno y su interacción con la concentración de calcio son los factores más importantes que desencadenan el proceso de conidiogénesis. Específicamente, la falta de nitrógeno y la adición de calcio a un medio con una alta relación C/N son las condiciones que inducen este proceso (Pascual et al., 1997). Este efecto también fue observado en *P. griseofulvum* y *P. chrysogenum*, la producción de conidios es inducida por la transferencia del microorganismo a medios libres de nitrógeno con altas concentraciones de calcio y azúcar (Morton, 1961). En su estudio realizado en 1986, Pitt y Mosley investigaron el efecto de la adición de calcio en la conidiogénesis y su relación con el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) en *Penicillium notatum*. Descubrieron que la formación de conidios en *P. notatum* puede ocurrir en presencia de ciertos intermediarios del TCA, aminoácidos o glicerol. Estos hallazgos sugieren que el mecanismo por el cual el calcio induce la conidiogénesis está relacionado con la interrupción de múltiples vías en la glicólisis, el catabolismo de carbohidratos y la función mitocondrial. Esta disrupción conduce a un desequilibrio en la producción de energía y desencadena el proceso de conidiogénesis (D. Pitt & Mosley, 1986).

Es importante tener en cuenta que la concentración óptima de calcio en el medio de cultivo puede variar dependiendo de la especie específica de *Penicillium* y las condiciones de fermentación. Demasiado calcio puede tener efectos negativos, como la formación de precipitados insolubles, o formación de pellets, mientras que una deficiencia de calcio puede afectar el crecimiento y la producción de metabolitos (Krull et al., 2013; Lange & Peiter, 2020; Pascual et al., 1997). Por lo tanto, es recomendable optimizar la concentración de calcio en el medio de cultivo durante la fermentación sumergida de *Penicillium* spp, incluso antes que establecer cualquier nutriente (Pitt & Poole, 1981; U.

Ugalde & Pitt, 1983). Esto se puede lograr mediante la adición de fuentes de calcio adecuadas, como cloruro de calcio o carbonato de calcio, y monitoreando la respuesta de la cepa específica utilizada en términos de crecimiento y producción de metabolitos deseado.

Por otro lado, el calcio está involucrado en la regulación de la homeostasis iónica en las células fúngicas (Lange & Peiter, 2020; Tisi et al., 2016). Juega un papel en el equilibrio y la regulación de otros iones, como el potasio y el sodio, que son esenciales para muchas funciones celulares (Lange & Peiter, 2020). El calcio además puede interactuar con otros nutrientes presentes en el medio de fermentación, como los micronutrientes y los iones metálicos, estas interacciones pueden influir en la disponibilidad y la absorción de otros nutrientes esenciales para el crecimiento y metabolismo del organismo (Hadley & Harrold, 1958; Lange & Peiter, 2020). Dado que los hongos filamentosos como *Penicillium* pueden secretar ácidos orgánicos como resultado de su metabolismo, el calcio podría neutralizar y regular el pH del medio de fermentación (Scervino et al., 2011; Vrabl et al., 2012).

### **1.3.2 Influencia de casaminoácidos en fermentación sumergida para *Penicillium* spp.**

Los casaminoácidos son hidrolizados de caseína, una proteína presente en la leche, y se utilizan como fuente de nutrientes en la fermentación sumergida, incluyendo para especies de *Penicillium*. Los casaminoácidos son una rica fuente de nitrógeno orgánico, fácilmente asimilable y su adición al medio promueve la reproducción y el crecimiento celular, resultando en una mayor producción de biomasa (Detroy et al., 1978). Esto es demostrado también en 2014, cuando Kobori y colaboradores definieron medios y protocolos en los cuales se favorecía la producción de conidios y microesclerocios sumergidos de *Trichoderma harzianum* en fermentación sumergida variando fuentes y concentraciones de carbono y nitrógeno, y encontraron que los medios de cultivo que contenían melaza y casaminoácidos produjeron más biomasa fúngica (19,5 mg/mL al día 2 y 21,8 mg/mL al día 4) que los medios que contenían glucosa, extracto de levadura o licor de maíz, todos a una relación 50:1 de C/N y una concentración de carbono de 36 g/L (Kobori et al., 2015).

Adicionalmente pueden influir en la producción de enzimas por parte de *Penicillium*, esenciales para la degradación de sustratos y la síntesis de metabolitos secundarios (Shora et al., 2021). Al proporcionar una fuente de nitrógeno, los casaminoácidos

aumentan la síntesis de enzimas, lo que conduce a una mayor actividad enzimática y una mayor capacidad de *Penicillium* para descomponer y utilizar los sustratos presentes en el medio de fermentación (Shora et al., 2021).

Pueden mejorar las rutas metabólicas de los hongos y aumentar la producción de metabolitos deseados, como enzimas, antibióticos u otros compuestos bioactivos. En el 2007, Méndez Zavala y colaboradores evaluaron la capacidad del hongo *Penicillium purpurogenum* GH-2 para producir pigmentos tanto en medios líquidos como sólidos, así como medios mínimos y enriquecidos. Ellos probaron 9 medios de cultivo para la producción de pigmentos en los cuales el organismo fue capaz de crecer, obteniendo velocidades de crecimiento diferentes y pigmentos en 6 de ellos. De este estudio se concluyó que los medios con sacarosa, extracto de malta, casaminoácidos y mayor cantidad de sales, marcaron la alta pigmentación; datos similares encontrados por otros autores en donde la presencia de componentes de alto peso molecular o de polisacáridos, tales como el almidón incrementan la producción de pigmentos (Cho et al., 2002a). La fuente de nitrógeno marca un efecto significativo sobre la expresión de estos compuestos, encontrándose que, con el uso de fuentes orgánicas de nitrógeno, se incrementó la producción de pigmentos en comparación con las fuentes inorgánicas (Cho et al., 2002a). Lo anterior se respalda con Su (1983), quien encontró que las fuentes de nitrógeno orgánicas tales como el monoglutamato de sodio (MSG) y los casaminoácidos, incrementan la producción de pigmentos (Méndez Zavala et al., 2007; Su, 1983) .

Los casaminoácidos pueden complementar otros nutrientes presentes en el medio y proporcionar un equilibrio adecuado de nutrientes esenciales para el crecimiento óptimo de los hongos. En 2011, se evaluó la producción de ácido micofólico, un fármaco utilizado actualmente como agente inmunosupresor en trasplantes de corazón, riñón e hígado, producido industrialmente a través del proceso de fermentación del hongo *Penicillium brevi-compactum* y se determinó que la caseína, la peptona y el casaminoácido originados a partir de la proteína de la leche aumentaron el rendimiento de fermentación del ácido micofenólico unas 3,4 veces más que el control (Rho, 2011).

Los aminoácidos presentes en los casaminoácidos pueden ser utilizados como precursores para la síntesis de proteínas y otros componentes celulares esenciales (Bapat et al., 2006). Esto puede ayudar a mantener la integridad y funcionalidad de las células de *Penicillium*, lo que resulta en una mayor viabilidad y longevidad celular durante el proceso

de fermentación. En 1997, se ensayaron medios líquidos con diferentes concentraciones de carbono y diferente relación C/N para la producción de blastosporas tolerantes a la desecación de *Paecilomyces fumosoroseus*, se obtuvieron altas concentraciones de blastosporas ( $5,8 \times 10^8$  esporas/mL) con medios que contenían 80 g de glucosa y 13,2 g de casaminoácidos, resultando un porcentaje significativamente mayor al 79% de blastosporas sobrevivió al secado al aire. Los medios que contenían concentraciones de glucosa superiores a 20 g/L y concentraciones de casaminoácidos entre 13,2 g/L y 40 g/L favorecieron la producción máxima de blastosporas tolerantes a la desecación. En estas condiciones de producción, cuando se almacenaron a 4°C, más del 60 % de las blastosporas liofilizadas producidas seguían siendo viables después de 7 meses de almacenamiento, mientras que menos del 25 % de las blastosporas secadas al aire sobrevivieron después de 90 días de almacenamiento (Jackson et al., 1997). Unos años después, en el 2005 Cliquet y Jackson publicaron los resultados de la continuación de su investigación con *Paecilomyces fumosoroseus*, allí evaluaron medios líquidos que contenían cuatro combinaciones de glucosa y casaminoácidos (8 g/L o 80 g/L de glucosa, 1,32 g/L o 13,2 g/L de casaminoácidos), basándose en la producción de blastosporas, la tasa de germinación, la viabilidad tras la liofilización y la estabilidad del almacenamiento a corto plazo. Cuando las blastosporas se produjeron utilizando una concentración elevada de casaminoácidos, la producción de blastosporas y las tasas de germinación fueron significativamente mayores ( $13,2 - 18,5 \times 10^7$  blastosporas/mL, 50-60% de germinación después de 4 h), en comparación con los cultivos realizados en medios que contenían concentraciones más bajas de casaminoácidos ( $0,4 - 2,3 \times 10^7$  blastosporas/mL, 10-20% de germinación después de 4 h). Los análisis químicos de la composición de las blastosporas mostraron que la germinación acelerada de las blastosporas puede estar relacionada con el aumento de las reservas proteínicas más que con la acumulación de glucógeno o lípidos (Inch et al., 1986; Jackson & Schisler, 1992; Schisler, 1991). La tolerancia a la liofilización por parte de las blastosporas suspendidas en el medio se vio reforzada por una elevada concentración inicial de casaminoácidos y por las concentraciones residuales de glucosa, obteniendo un 75% de supervivencia (Cliquet & Jackson, 2005).

En comparación con otras fuentes de nitrógeno, como los extractos de levadura o los peptidos, los casaminoácidos suelen ser más económicos y están disponibles en forma de polvo o solución. Esto hace que los casaminoácidos sean una opción atractiva desde el

punto de vista económico para la producción de *Penicillium* spp. a escala industrial (Shora et al., 2021).

### **1.3.3 Influencia de aireación en fermentación sumergida para *Penicillium* spp.**

La aireación es un factor crucial en la fermentación sumergida, ya que afecta directamente el crecimiento, el metabolismo y la producción de metabolitos de *Penicillium*. En la fermentación sumergida, la aireación proporciona el oxígeno necesario para el crecimiento y la respiración del organismo (Tlecuítl-Beristain et al., 2010). El oxígeno es utilizado por las células del hongo para la síntesis de energía y otros procesos metabólicos. Una disponibilidad adecuada de oxígeno a través de la aireación garantiza un crecimiento óptimo de las células fúngicas (Issaly et al., 2005). Un estudio seleccionó el medio y evaluó el efecto del oxígeno en el cual se produce en calidad conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*; así pues, se estudió el efecto del oxígeno en la producción de conidios utilizando el medio avena-peptona a dos niveles: Atmósfera normal (21% O<sub>2</sub>) y pulsos ricos en oxígeno (26% O<sub>2</sub>). La producción máxima de conidios (4,25x10<sup>7</sup> conidios/mL) se alcanzó utilizando pulsos con 26% de O<sub>2</sub> después de 156 h de cultivo, que fue superior al 100% en relación con los niveles de conidios bajo atmósfera normal. El rendimiento de conidios por gramo de biomasa fue 2,6 veces superior con 26% de O<sub>2</sub> (1,12x10<sup>7</sup> conidios/mg). Los parámetros de calidad de los conidios, como la germinación y la hidrofobicidad, no mostraron diferencias significativas entre esos tratamientos (Tlecuítl-Beristain et al., 2010). Estos resultados son relevantes para los procesos de producción, ya que un aumento del oxígeno mediante flujos de aire permite niveles superiores de conidios por *M. anisopliae* sin alterar los parámetros de calidad. Es así, como también se comprueba que la aireación adecuada es crucial para mantener la viabilidad celular. Durante la fermentación sumergida, las células fúngicas requieren oxígeno para mantener sus procesos metabólicos y su integridad estructural (Issaly et al., 2005; Mukherjee & Ghorai, 2023). La falta de aireación suficiente puede llevar a la acumulación de toxinas metabólicas y productos de desecho, lo que afecta negativamente la viabilidad celular. La aireación óptima asegura una mayor supervivencia de las células y una mejor productividad del proceso (Albaek et al., 2011).

La aireación también contribuye a una mezcla homogénea del medio de fermentación. Junto con la agitación mecánica, la aireación evita la formación de zonas muertas o gradientes de nutrientes en el cultivo, lo que asegura una distribución uniforme de los nutrientes y una disponibilidad adecuada para el crecimiento de *Penicillium* spp (Harvey et al., 1998). Además, la mezcla adecuada también ayuda a prevenir la formación de agregados celulares como pellets y la sedimentación excesiva (García-Soto et al., 2006). Los hongos filamentosos pueden presentar dos tipos de crecimiento macroscópicos, el micelial y en pellets. Cada uno de estos tipos de crecimiento está asociado con una aplicación final específica. En el caso de la producción de metabolitos secundarios, se prefiere el crecimiento en forma de pellets debido a que esto reduce las operaciones de separación necesarias posteriormente. Por otro lado, cuando se trata de la producción de bioinsumos, donde el microorganismo en sí es el producto final, es importante tener en cuenta un crecimiento homogéneo que permita una fácil dispersión en el campo. Por lo anterior, autores como García (2004), determinaron que la morfología macroscópica se puede controlar por medio de condiciones hidrodinámicas determinadas, y que, una de las relaciones que interviene en la producción de pellets es la del factor de fricción y la velocidad de aire superficial, de allí, determinaron que a velocidades de aire superficial altas y factores de fricción bajos se evita la formación de pellets (Bird et al., 2002; García-Soto et al., 2006).

La aireación está estrechamente relacionada con otros parámetros de fermentación, como la agitación, la temperatura, pH y la concentración de nutrientes (Albaek et al., 2011). Estos parámetros pueden interactuar entre sí y afectar conjuntamente el crecimiento y la producción de *Penicillium* spp. Por lo tanto, es importante optimizar y ajustar la aireación en función de los otros parámetros de fermentación para lograr un rendimiento óptimo. Por ejemplo, las condiciones apropiadas de aireación se ven afectadas por los iones presentes en el medio, se ha encontrado que al aumentar la concentración de calcio disminuye la concentración de oxígeno y se requiere aumentar la agitación o aumentar el flujo de aire (Bockelmann et al., 1999). Por otro lado, el crecimiento vegetativo está asociado a pH bajos, mientras la producción de conidios generalmente está asociada a pH cercanos al neutro, en este caso es necesario controlar el pH ya que en condiciones cercanas a la neutralidad se activa la formación de pellets (Pirt & Callow, 1959). En este sentido, la aireación adecuada puede ayudar a mantener el pH en un rango óptimo para el crecimiento y la actividad metabólica de *Penicillium* spp (Germec & Turhan, 2023). Esto es

especialmente importante en cultivos de larga duración, donde la acumulación de metabolitos ácidos puede inhibir el crecimiento de las células (Germec & Turhan, 2023; Pirt & Callow, 1959; Singh et al., 2019).

Se investigó la influencia de la fuente de carbono y la tasa de aireación en la reología de la fermentación sumergida, la morfología del micelio y la producción de pigmento rojo de *Paecilomyces sinclairii* en un biorreactor de tanque agitado de 5 litros. La velocidad de aireación se varió entre 0,5 y 3,5 vvm mientras se ejecutaba la fermentación a una agitación suave de 150 rpm utilizando sacarosa como fuente de carbono. La concentración máxima de biomasa de *P. sinclairii* fue de unos 33 g/L con una tasa de aireación de 1,5 vvm, mientras que el rendimiento máximo de producción de pigmento rojo (4,73 g/L) se alcanzó con 3,5 vvm. La morfología celular altamente ramificada apareció a 1,5 vvm y la morfología celular altamente vacuolada se observó en una tasa de aireación elevada (3,5 vvm (Cho et al., 2002b). Se observaron tendencias similares en los procesos de fermentación de *Aspergillus niger*, *Actinomadura roseorufa*, y *Saccharopolyspora erythraea* (Berovič et al., 1991; Cho et al., 2002b; Warren et al., 1995).

La aireación es un factor crítico en la fermentación sumergida a gran escala (Albaek et al., 2011). La adecuada oxigenación del medio de fermentación es esencial para asegurar un suministro suficiente de oxígeno a todas las células fúngicas presentes en el cultivo. Esto es particularmente relevante en sistemas de fermentación de gran volumen, donde se requiere una buena aireación para asegurar un crecimiento uniforme y una producción óptima de metabolitos (Issaly et al., 2005; Tlecuil-Beristain et al., 2010). Dependiendo de las etapas de crecimiento y producción de *Penicillium* spp., así como de los requisitos metabólicos, la aireación puede variar en intensidad, frecuencia y duración. Esto permite una flexibilidad en el control del proceso de fermentación y la optimización de las condiciones de crecimiento y producción (Albaek et al., 2011; Cho et al., 2002b).



## **2. Capítulo 2. Efecto del calcio y de los casaminoácidos sobre la producción y calidad de conidios y biomasa de *Penicillium* sp. HC1 en fermentación sumergida**

### **2.1 Introducción**

*Penicillium* sp. HC1, es un hongo que presenta actividad celulolítica y xilanolítica, fue seleccionado como resultado de un estudio de microorganismos celulolíticos aislados de suelos rizosféricos de cultivos de arroz ubicados en los departamentos de Tolima y Meta, Colombia. La alianza Biocultivos S.A. y la Universidad Nacional de Colombia a través del Instituto de Biotecnología – IBUN, eligieron este hongo para la formulación de un inoculante el cual es producido en medio de cultivo sumergido. Los antecedentes del grupo de investigación permitieron contribuir al desarrollo del medio de cultivo estándar y a establecer las condiciones de operación con las cuales se obtienen los mejores resultados en el proceso actual del bioinsumo. A pesar de las múltiples investigaciones, la producción de conidios no es la óptima ni con la calidad requerida para el proceso a gran escala. Varios factores como la composición del medio de cultivo, incluyendo los nutrientes, fuentes y/o limitaciones de carbono y nitrógeno, son cruciales para inducir la formación de conidios (Mukherjee & Ghorai, 2023). Algunos de estos ya han sido estudiados y han permitido mayor entendimiento del comportamiento del organismo. Otros factores como la adición de calcio, la adición de otros suplementos, la acumulación de metabolitos secundarios y el oxígeno disponible, no se han profundizado aún para la cepa de interés.

Por un lado, el calcio ha surgido como un factor crucial en la producción de conidios y biomasa de *Penicillium* spp. Numerosos estudios han revelado la influencia significativa de los niveles de calcio en diferentes etapas del ciclo de vida del hongo. Encontrar la fuente y la concentración ideal de calcio en el medio de cultivo puede variar según la especie de

*Penicillium* y las condiciones de fermentación. Un exceso de calcio puede tener efectos negativos, como la formación de precipitados insolubles o la formación de pellets, mientras que una deficiencia de calcio puede afectar el crecimiento y la producción de metabolitos (Krull et al., 2013; Lange & Peiter, 2020; Pascual et al., 1997). Por lo anterior, se hace necesario optimizar la concentración de calcio en el medio de cultivo durante la fermentación sumergida, incluso antes de considerar cualquier otro nutriente (D. Pitt & Poole, 1981; U. Ugalde & Pitt, 1983). Esto se puede lograr mediante la adición de fuentes de calcio adecuadas, como cloruro de calcio o carbonato de calcio, y monitoreando la respuesta de la cepa específica utilizada en términos de crecimiento y producción de metabolitos deseados.

Por otra parte, los casaminoácidos son una mezcla de aminoácidos libres y de péptidos (Shora et al., 2021). Esta característica hace que sea una fuente de nitrógeno orgánico fácilmente asimilable para los organismos, lo que se traduce en un mayor crecimiento y producción de biomasa (Kobori et al., 2015). En particular, en el caso del género *Penicillium*, se ha observado que el uso de casaminoácidos puede tener un efecto significativo en el crecimiento y la producción de compuestos bioactivos (Méndez Zavala et al., 2007). Los aminoácidos contenidos en los casaminoácidos tienen la capacidad de servir como precursores para la síntesis de proteínas y otros componentes celulares esenciales; este aporte puede contribuir a mantener la integridad y funcionalidad de las células de *Penicillium*, lo que representa una mayor viabilidad y longevidad celular durante el proceso de fermentación (Cliquet & Jackson, 2005).

En este capítulo, se explorará la importancia del calcio y los casaminoácidos, su interacción con *Penicillium* sp. HC1 en fermentación sumergida, con el objetivo de proporcionar una visión más profunda de los efectos y la influencia de estos compuestos sobre la producción de conidios y biomasa.

## **2.2 Materiales y métodos**

### **2.2.1 Banco de trabajo**

Los conidios del aislamiento de *Penicillium* sp. HC1, se mantienen conservados a una temperatura de -20°C en el banco de genes y cepas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia - IBUN. A partir de una muestra de este banco, se creó

un banco secundario de la siguiente manera. Se tomó una muestra de microorganismo conservado y se reactivó en medio PDA, posteriormente se incubó a una temperatura de  $28 \pm 2$  °C durante 7 días. Luego se obtuvo una suspensión de conidios en una solución salina al 0,85% (p/v) adicionada de Tween 80 al 0,1% (v/v). La suspensión obtenida se mezcló con glicerol al 20% (v/v) como agente protector contra el congelamiento, se dividió en microviales en porciones de 1 mL y se congeló a -20°C.

### 2.2.2 Tren de inoculación

La producción de *Penicillium* sp. HC1 se llevó a cabo en un tren de inoculación que consta de tres fases: preinóculo, inóculo y fermentación.

#### ▪ Preinóculo

El preinóculo consistió en una suspensión conidial. En primer lugar, se reactivó el microorganismo tomando un vial del banco secundario y sembrándolo en medio PDA, luego, se incubó a  $28 \pm 2$  °C por 4 días. Después, se raspó la caja esporulada y se mezcló en Tween 80 al 0,1% (v/v) con 0,85% (p/v) de solución salina, esta suspensión conidial fue ajustada a una concentración de  $10^8$  conidios/mL y filtrada para eliminar fragmentos de micelio.

#### ▪ Inóculo

El inóculo consistió en un Erlenmeyer de 250 mL en donde se prepararon 200 mL de medio de caldo de arroz (ver Anexo A) al cual se le adicionaron 12 mL de la suspensión conidial obtenida como se describió anteriormente, para mantener una relación del 6% del inóculo respecto al volumen final de trabajo, junto con 100 µg/L de cloranfenicol para controlar y reducir el riesgo de contaminación. Luego, se incubó a  $28 \pm 2$  °C, 300 rpm durante 2 días.

#### ▪ Fermentación

La fermentación es el punto del tren en donde se obtiene el producto final de *Penicillium* sp. HC1. Utilizando Erlenmeyer de 1000 mL se adicionaron 30 mL del inóculo para mantener la relación del 6% en diferentes medios estudiados (ver Anexo A), cada uno para un volumen final de 500 mL de producto. Se incubó a  $28 \pm 2$  °C y 300 rpm durante 7 días.

### 2.2.3 Condiciones y medios de cultivo

En primer lugar, se realizó la fermentación en el medio de cultivo base (MB) para la producción de *Penicillium* sp. HC1, este es el medio estandarizado por el grupo de investigación de Bioprospección y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia – IBUN (Ver Anexo A). El MB se tomó como referencia y punto de partida para el diseño experimental y el análisis de resultados. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

#### Efecto del calcio

Los ensayos para evaluar los efectos que tiene el ion calcio sobre la producción de conidios de *Penicillium* sp. HC1 se llevaron a cabo usando cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ).

El diseño experimental se propuso variando la concentración de  $\text{CaCl}_2$  en el medio de cultivo. Se tomó como referencia la composición del medio base (MB), reemplazando el  $\text{CaCO}_3$  por el  $\text{CaCl}_2$  en las tres (3) concentraciones. Las concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  fueron: 2 g/L, 4 g/L y 6 g/L (Ver Anexo A).

#### Efecto de los casaminoácidos

Los ensayos para evaluar los efectos que tiene los casaminoácidos sobre la producción de conidios de *Penicillium* sp. HC1 se llevaron a cabo usando OmniPur® Casamino Acids – CAS 65072-00-6 – Calbiochem (Marca Millipore). La ficha técnica del reactivo indica que contiene un 55% de nitrógeno total y un 40% de cenizas.

El diseño experimental consistió en cuatro medios de cultivo, los dos primeros (E1) contienen la concentración más baja de casaminoácidos, 1,3 g/L, uno de estos medios es el propuesto por Cliquet y Jackson (2005) al cual se le llamó MAC – E1, y el otro es el medio base utilizado en la actualidad con la modificación de sacarosa por glucosa a una concentración de 8 g/L y la adición de los casaminoácidos, MBC – E1. Los otros dos medios (E2) fueron los que presentan la mayor concentración de casaminoácidos, 13 g/L, de la misma manera, uno es el medio de los investigadores Cliquet y Jackson (2005), este fue nombrado MAC – E2, y el otro es el medio base modificado con glucosa a 8 g/L y los casaminoácidos, MBC – E2 (Ver Anexo A).

- **Efecto de aminoácidos de prueba**

Posterior al análisis de los casaminoácidos, se decidió probar una alternativa utilizando Megaplex Creatine Power (marca Nutramerican Pharma), un suplemento elaborado con proteína de lactosuero, con un óptimo perfil de aminoácidos de cadena ramificada y glutamina. A este compuesto se le denominó Aminoácidos de Prueba (AP).

La fermentación llamada MBAP se hizo con la modificación del medio base utilizando los AP a una concentración de 13 g/L y glucosa a 8 g/L, esto con la finalidad de tener en contraste los resultados utilizando los casaminoácidos y los AP.

- **Efecto de vitaminas**

Finalmente, se propuso evaluar la influencia de las vitaminas utilizando tiamina, riboflavina, pantotenato, niacina, piridoxamina, ácido tiótico, ácido fólico, biotina y vitamina B<sub>12</sub>, todas ellas a la concentración propuesta por la investigación de Cliquet y Jackson (2005). Estas fueron: Tiamina, riboflavina, pantotenato de calcio, niacina, piridoxina, ácido tiótico, todas a una concentración de 0,5 g/L, y ácido fólico, biotina y vitamina B<sub>12</sub> a una concentración de 0,05 g/L.

El montaje experimental consistió en la fermentación en el medio MBC – E2 con la adición de las vitaminas, a lo cual se le denominó MBC VIT, y otra fermentación utilizando el medio MBAP modificado de la misma manera con las vitaminas a las mismas concentraciones, a la cual se le llamó MBAP VIT (Ver Anexo A).

**Tabla 2-1.** Resumen de los medios de cultivo estudiados en el capítulo 2.

Ensayo	Nombre del medio de cultivo	Característica	
Evaluación efecto del calcio	2 g/L	2 g/L de CaCl <sub>2</sub>	
	4 g/L	4 g/L de CaCl <sub>2</sub>	
	6 g/L	6 g/L de CaCl <sub>2</sub>	
Evaluación efecto de casaminoácidos	<b>MAC</b>	<b>E1</b> 1,3 g/L casaminoácidos	<b>E2</b> 13 g/L casaminoácidos
	<b>MBC</b>	1,3 g/L casaminoácidos	13 g/L casaminoácidos
Evaluación efecto de AP	<b>MBAP</b>	13 g/L aminoácidos de prueba (AP)	
Efecto de vitaminas	<b>MBC VIT</b>	13 g/L casaminoácidos + Vitaminas	
	<b>MBAP VIT</b>	13 g/L AP + Vitaminas	

## 2.2.4 Variables de respuesta

Se midieron las siguientes variables de respuesta en todos los ensayos propuestos. Éstas fueron: concentración de conidios (conidios/mL), biomasa (UFC/mL), viabilidad (% germinación), tolerancia al estrés térmico a  $50 \pm 2^\circ\text{C}$  (% germinación) y pureza (%).

- **Determinación de la concentración de conidios (conidios/mL).** Se tomó una alícuota de 20  $\mu\text{L}$  de la muestra directa y se puso en la cámara de Neubauer para el conteo por duplicado de conidios. Se evaluó a diario durante los 7 días de la fermentación. La ecuación 2.1 muestra el cálculo de los conidios utilizando la cámara de Neubauer (Santos Díaz et al., 2022).

$$\frac{\text{Conidios}}{\text{ml}} = \frac{\text{Recuento obtenido}}{\text{Número de cuadros contados}} * \text{Factor de dilución} * \text{Factor de la cámara} \quad (2.1)$$

- **Determinación de biomasa (UFC/mL).** Pasados 3 días del inicio de la fermentación se recolectó 1 mL por cada réplica y se realizaron las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  utilizando Tween 80 al 0,1% (v/v) con 0,85% (p/v) de solución salina y agitando con Vortex durante 15 segundos, se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las diluciones para ser sembrada en cajas de Petri con PDA, y estas fueron llevadas a incubación a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Pasadas 24 a 36 horas, se realizó el conteo por Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por medio de método de recuento en placa – siembra en superficie (ISO 4833-1:2013) (Santos Díaz et al., 2022). Esta variable se evaluó a partir del día 3 a diario hasta finalizar la fermentación.

$$\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = \frac{\left(\frac{\text{Número de colonias contadas} * 1}{\text{Factor de dilución}}\right)}{\text{Volumen sembrado}} \quad (2.2)$$

- **Determinación de la viabilidad de los conidios (% germinación).** Se evaluó el porcentaje de germinación en agar-agua. Primero se tomaron las muestras de cada una de las fermentaciones y se filtraron en algodón esterilizado para eliminar fragmentos de micelio, se lavó dos veces con solución salina al 0,85% (p/v) y Tween 80 al 0,1% (v/v) llevándolo a centrifugación durante 30 minutos, y se ajustó la concentración a  $10^6$  conidios/mL. Se sembraron tres alícuotas de 20  $\mu\text{L}$  en una caja de agar-agua y se incubaron a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 16 horas. Pasado este tiempo, se frenó el crecimiento con 10  $\mu\text{L}$  de azul de lactofenol. La lectura se realizó en un

microscopio óptico con el objetivo 40X, empleando el número de campos mínimos de lectura en los que se logró una cantidad mínima o igual de 100 conidios entre germinados y no germinados, por cada réplica. Un conidio se consideró germinado si la longitud del tubo germinativo era igual o sobrepasaba el diámetro del conidio (Santos Díaz et al., 2022). El porcentaje de germinación fue calculado como la relación entre conidios germinados y el total de conidios contados (ecuación 2.3). Se evaluó a partir del día 3 a diario hasta finalizar la fermentación.

$$\text{Germinación (\%)} = \frac{\sum \text{conidios germinados}}{\sum \text{conidios germinados} + \sum \text{conidios NO germinados}} * 100 \quad (2.3)$$

- **Determinación de la tolerancia a estrés térmico de los conidios (% germinación).** De la misma manera que se hizo para la determinación de viabilidad de los conidios, se tomaron muestras de las fermentaciones para ser filtradas en algodón esterilizado, centrifugadas, lavadas dos veces y concentradas para ajustar a  $10^6$  conidios/mL. Se tomaron alícuotas de 1 mL de la suspensión, se sometieron a una temperatura de  $50 \pm 5^\circ\text{C}$  por una hora. El control fue una alícuota de una suspensión a temperatura ambiente de cada una de las fermentaciones. Pasada la hora, se sembraron alícuotas de  $20\mu\text{L}$  y se evaluó el porcentaje de germinación sembrando en agar-agua y evaluando al día siguiente adicionando  $10\mu\text{L}$  de azul de lactofenol (Metodología modificada de García-Rico et al., 2011 y usada por Gutiérrez Rojas, 2017). Así, la tolerancia se expresa en porcentaje de germinación relativo al control no expuesto a la condición de estrés térmico (ecuación 2.4). Se realizó por triplicado. Se evaluó a partir del día 3 a diario hasta finalizar la fermentación.

$$\text{Germinación relativa (\%)} = \frac{\% \text{Germinación expuesto a estrés térmico}}{\% \text{Germinación NO expuesto a estrés térmico}} * 100 \quad (2.4)$$

- **Determinación de la pureza (%).** Se tomó como un indicador del producto final. Terminada la fermentación, se tomó 1 mL de la producción y se realizaron las diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  en solución salina estéril al 0,85% (p/v) y Tween 80 al 0,1% (v/v), luego, se tomaron  $100\mu\text{L}$  de cada dilución y se sembraron en cajas de Petri

con medio nutritivo. Pasadas 24 horas, se realiza el conteo de UFC asociada a la formación de contaminantes. Se expresa en porcentaje de pureza.

$$\text{Pureza (\%)} = \frac{\text{UFC de contaminantes}}{\text{UFC de principio activo} + \text{UFC de contaminantes}} * 100 \quad (2.5)$$

## 2.2.5 Procesamiento de datos y análisis estadístico

Los indicadores fueron: conidios máximos (conidios/mL), productividad de conidios (conidios/mL/hora), biomasa máxima (UFC/mL) y productividad de biomasa (UFC/mL/hora).

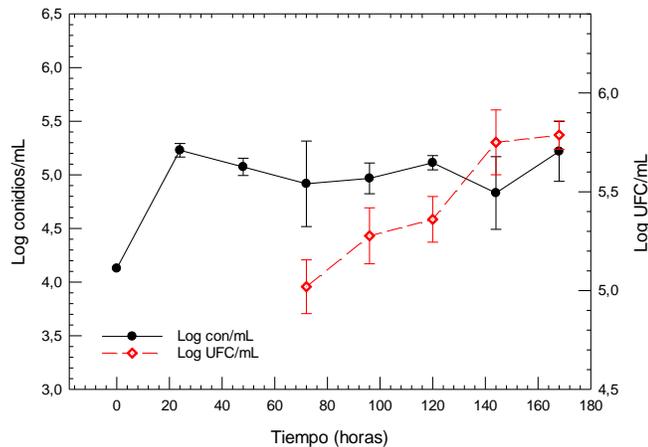
Se utilizó SigmaPlot edición 15 y GraphPad Prism 8 para la construcción de las gráficas. El análisis estadístico estableció si existían diferencias entre los tratamientos en la evaluación de la relación de: viabilidad, tolerancia térmica, conidios máximos, productividad de conidios, biomasa máxima y productividad de biomasa. Se utilizó una prueba ANOVA de un factor seguida de una prueba Post-Hoc de Tukey para comparación de medias con un nivel de confianza del 95%, en el programa estadístico IBM SPSS Statistics ® 21.0.

## 2.3 Resultados y discusión

### 2.3.1 Medio base

El grupo de investigación de Bioprospección y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia – IBUN estandarizó un medio de cultivo líquido para la producción de *Penicillium* sp. HC1. Este medio base (MB) es el que se tomó como punto de partida para la construcción del diseño experimental y es el punto de referencia para comparar y mejorar producto obtenido en la actualidad. Es importante recordar que la fuente de calcio del control es CaCO<sub>3</sub> a una concentración de 0,5 g/L. Es así, como en primera instancia se desarrolló la fermentación con este medio base (MB) obteniendo la cinética de producción de conidios y biomasa durante 168 horas correspondientes a 7 días de fermentación.

La Figura 2-1 muestra que la mayor producción de conidios se da a las 168 horas obteniendo una concentración de  $\text{Log}_{10} 5,27 \pm 0,20$  conidios/mL. Sin embargo, se evidencia una tendencia constante desde el primer día y la producción de conidios no cambia significativamente durante los días de la fermentación. Por otro lado, la producción de biomasa si muestra un incremento con el paso de los días, alcanzando su mayor dato entre las 144 y las 168 horas, con un valor de  $\text{Log}_{10} 5,84 \pm 0,09$  UFC/mL.

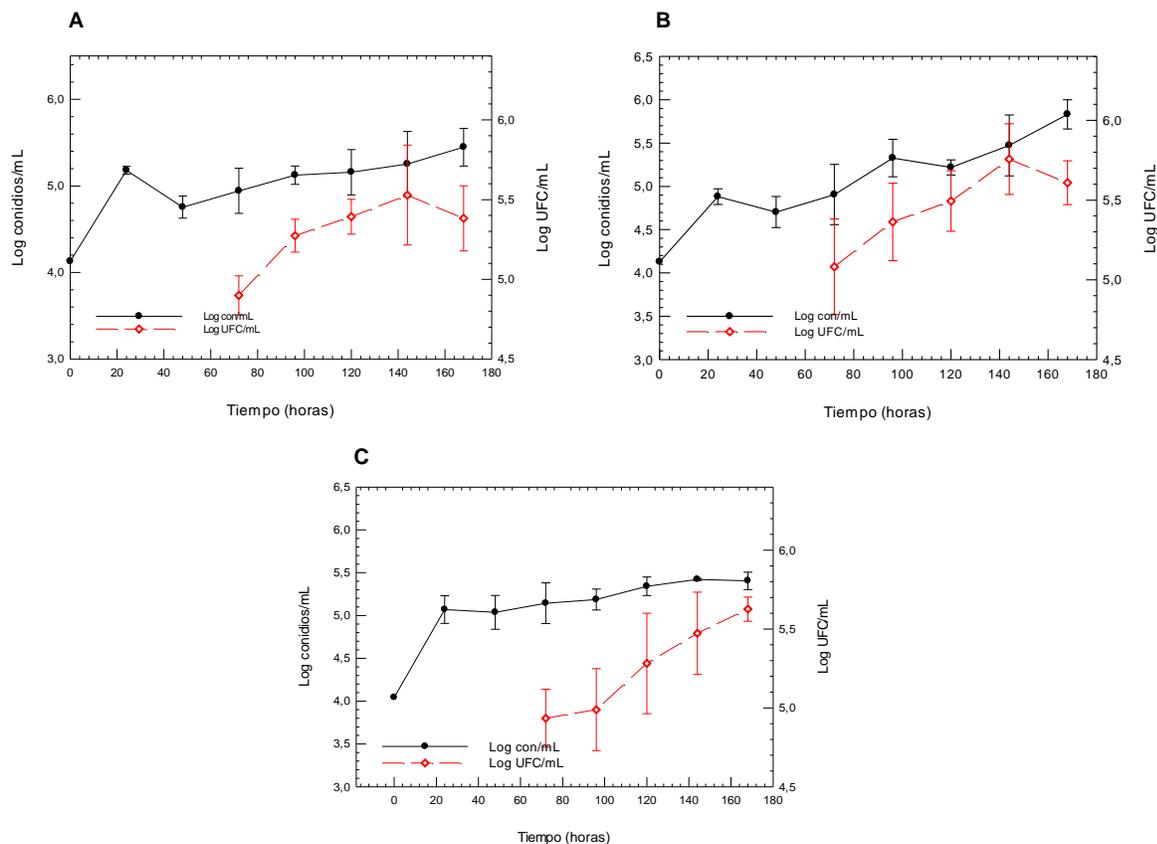


**Figura 2-1:** Cinética de producción de conidios y biomasa de *Penicillium* sp. HC1 en medio base (MB).

### 2.3.2 Evaluación del efecto del calcio

La presencia y disponibilidad adecuada de calcio en el entorno de crecimiento de los hongos *Penicillium* puede tener un impacto significativo en su desarrollo y metabolismo como se mostró en la revisión de literatura. Las concentraciones de calcio reportadas como inductoras de la conidiogénesis en distintas especies de *Penicillium* varían en un rango que va desde 0,02 hasta 50 g/L (Macias Camacho, 2017). No obstante, los datos más frecuentes son los del  $\text{CaCl}_2$  y se encuentran en concentraciones inferiores a 10 g/L. Es así como metodológicamente se proyectó reemplazar el  $\text{CaCO}_3$  por  $\text{CaCl}_2$  al medio base y variar su concentración.

Ahora bien, la Figura 2-2 muestra las cinéticas de producción de conidios y biomasa para las tres concentraciones de cloruro de calcio estudiadas.

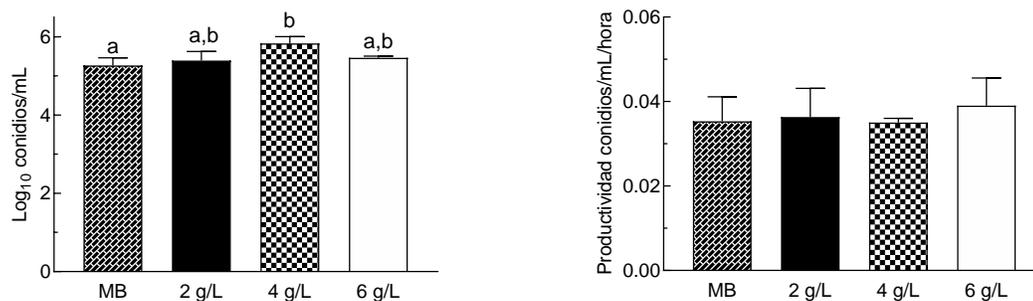


**Figura 2-2:** Cinética de producción de conidios y biomasa de *Penicillium* sp. HC1 en diferentes medios sumergidos (A) 2 g/L CaCl<sub>2</sub> (B) 4 g/L CaCl<sub>2</sub> (C) 6 g/L CaCl<sub>2</sub>.

### Efecto sobre la producción de conidios

Es válido recordar que la concentración máxima de conidios para el medio base (MB) fue de  $\text{Log}_{10} 5,27 \pm 0,20$  conidios/mL. Luego, gracias a la Figura 2-3, se logra evidenciar que la máxima producción de conidios se presentó en el ensayo con 4 g/L de CaCl<sub>2</sub> pasadas 168 horas desde el inicio de la fermentación y obteniendo una concentración de  $\text{Log}_{10} 5,83 \pm 0,17$  conidios/mL.

La productividad de conidios para el medio base (MB) fue de  $\text{Log}_{10} 0,035 \pm 0,006$  conidios/mL/hora. La tasa de productividad no representa diferencia significativa entre muestras, sin embargo, el ensayo con 6 g/L de CaCl<sub>2</sub> fue el que presentó mayor productividad de conidios con un valor de  $\text{Log}_{10} 0,039 \pm 0,006$  conidios/mL/hora.



**Figura 2-3:** Conidios máximos y productividad de conidios máximos de *Penicillium* sp. HC1 en diferentes medios sumergidos: MB - 2 g/L - 4 g/L - 6 g/L CaCl<sub>2</sub>. Las letras iguales no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%).

Lo primero a destacar es que se mejoró un poco la producción de conidios con la implementación del CaCl<sub>2</sub> en el sistema. A pesar de que el mejor resultado de concentración de conidios se obtuvo con el ensayo que tenía 4 g/L de CaCl<sub>2</sub>, la tasa de productividad de conidios no presentó diferencia significativa.

Se ha observado que el calcio induce la esporulación en cultivos sumergidos de distintas especies de *Penicillium* cuando crecen en medios con una alta relación C/N (U. O. Ugalde & Pitt, 1986). Por ejemplo, una relación C/N de 8:5 y 10mM de Ca<sup>2+</sup> promueve la formación de conidios (Foster et al., 1946; Pitt & Poole, 1981; U. Ugalde & Pitt, 1983). Este fenómeno también se observó en las especies *P. griseofulvum* y *P. chysogenum*, donde la producción de conidios es inducida por medios libres de nitrógeno con altas concentraciones de calcio y azúcar (Morton, 1961). Otros autores como Pitt y Mosley (1986) investigaron el efecto de la adición de calcio en la conidiogénesis y su relación con el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) en *Penicillium notatum*, aquí descubrieron que la formación de conidios en *P. notatum* puede ocurrir en presencia de ciertos intermediarios del TCA, aminoácidos o glicerol. Estos descubrimientos sugieren que el mecanismo por el cual el calcio induce la conidiogénesis está relacionado con la interrupción de múltiples vías en la glicólisis, el catabolismo de carbohidratos y la función mitocondrial. Esta disrupción conduce a un desequilibrio en la producción de energía y desencadena el proceso de conidiogénesis (D. Pitt & Mosley, 1986; Roy et al., 2021).

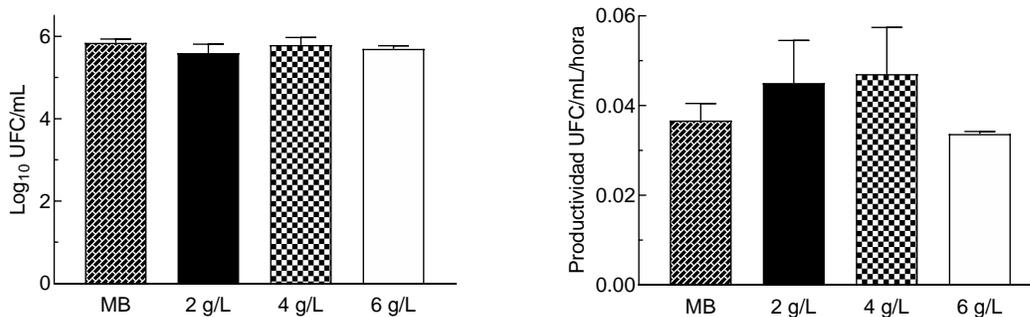
Por otro lado, trabajos como los de Pascual y colaboradores (1997) no produjeron esporulación cuando *P. oxalicum* se cultivó en un medio con diferentes cantidades de

calcio. Los investigadores concluyeron que cuando no hay calcio presente en el medio de cultivo, sólo el agotamiento total del nitrógeno es capaz de estimular la esporulación. Por el contrario, cuando el calcio está presente, es posible obtener la esporulación, pero sólo a valores determinados por la relación C/N del medio (Pascual et al., 1997). Otras cepas como *P. crustosum* que dan altos rendimientos de producción de toxinas, asociadas con una esporulación considerable, parecen insensibles a los iones de calcio en cultivo sumergido (Day et al., 1980; Ibbá et al., 1987). Relacionando lo anteriormente expuesto con los resultados obtenidos en esta investigación, se podría argumentar que los conidios que se generaron en las fermentaciones pudieron ser inducidos por otros factores como la fuente de nitrógeno o carbono del medio, y de esta manera, parece ser que la presencia del calcio no fue influyente para la inducción de la conidiogénesis, lo cual, se ve reflejado en la Figura 2-3, al no presentar diferencia significativa en la tasa de producción de conidios entre los ensayos.

### Efecto sobre el crecimiento

La biomasa máxima en el medio base (MB) fue de  $\text{Log}_{10} 5,84 \pm 0,09$  UFC/mL. A pesar de que no tuvieron diferencias significativas (ver Figura 2-4), los datos del montaje experimental para el calcio fueron inferiores, obteniendo para 2 g/L de  $\text{CaCl}_2$  una concentración de  $\text{Log}_{10} 5,59 \pm 0,22$  UFC/mL, para 4 g/L de  $\text{CaCl}_2$  fue de  $\text{Log}_{10} 5,79 \pm 0,18$  UFC/mL, y para 6 g/L de  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Log}_{10} 5,69 \pm 0,08$  UFC/mL.

La productividad de biomasa para el medio base (MB) fue de  $\text{Log}_{10} 0,037 \pm 0,004$  UFC/mL/hora. Este indicador no tuvo diferencias significativas entre los tratamientos estudiados, sin embargo, la mayor productividad de biomasa la presentó el ensayo con 4 g/L de  $\text{CaCl}_2$  con un valor de  $\text{Log}_{10} 0,047 \pm 0,010$  UFC/mL/hora.



**Figura 2-4:** Biomasa máxima y productividad de biomasa máxima de *Penicillium* sp. HC1 en diferentes medios sumergidos: MB - 2 g/L – 4 g/L – 6 g/L CaCl<sub>2</sub>.

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta parte del trabajo investigativo, no se presentó mejoría en los rendimientos de producción de biomasa del sistema comparados con lo producido en el control.

Un aspecto relevante para mencionar dentro de lo experimental es que en algunos de los ensayos con 6 g/L de CaCl<sub>2</sub> se veía al fondo de los Erlenmeyer la formación de lo que parecían precipitados o pellets dispersos, no en una gran cantidad. Es importante tener en cuenta que la concentración óptima de calcio en el medio de cultivo puede variar dependiendo de la especie específica de *Penicillium* y las condiciones de fermentación. Demasiado calcio puede tener efectos negativos, como la formación de precipitados insolubles, o formación de pellets, mientras que una deficiencia de calcio puede afectar el crecimiento y la producción de metabolitos (Krull et al., 2013; Lange & Peiter, 2020; Pascual et al., 1997). Da la impresión de que concentraciones mayores a 6 g/L de CaCl<sub>2</sub> en este sistema podrían tener efectos negativos por la presunta formación de precipitados.

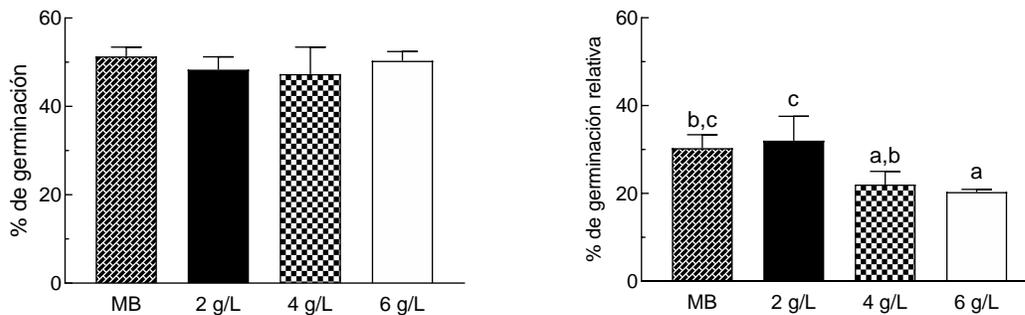
Lo anterior representaría un aumento de biomasa en el sistema y una reducción de conidiación, esto es explicado por Pascual (1997), cuando su fermentación produjo un aumento del tamaño de los gránulos de micelio, pero una reducción del índice de esporulación, ya que la esporulación sólo se produce en la superficie de los gránulos. Adicionalmente, la formación de pellets y precipitados pueden representar cambios en la reología del sistema y dificultar el control de variables en la producción a gran escala (Rodríguez Porcel et al., 2023).

### **Efecto sobre la viabilidad y tolerancia térmica de los conidios a 50°C**

Los conidios obtenidos en los medios evaluados fueron sometidos a evaluación de tolerancia a estrés térmico a 50±5°C. Se escogió esta condición de estrés teniendo en cuenta los resultados de Gutiérrez (2017), ya que los conidios responden directamente proporcional al estrés térmico, oxidativo y a la radiación UV, es decir, los conidios más tolerantes a una condición de estrés lo son para las otras dos.

Los resultados logrados se muestran en la figura 2-5 para cada concentración evaluada. La viabilidad no presenta diferencia significativa entre ensayos. El medio base (MB) posee un porcentaje de germinación de  $51\pm 2\%$ , mientras que para 2 g/L, 4 g/L y 6 g/L de  $\text{CaCl}_2$  se obtuvieron  $48\pm 3\%$ ,  $47\pm 6\%$  y  $50\pm 2\%$  de germinación respectivamente.

El porcentaje de germinación relativo al control de los conidios obtenidos para el medio base (MB) fue de  $30\pm 3\%$ . Para los ensayos de 2 g/L, 4 g/L y 6 g/L de  $\text{CaCl}_2$  fue de  $32\pm 6\%$ ,  $22\pm 3\%$  y  $20\pm 1\%$  respectivamente. Estos valores son los correspondientes a la tolerancia térmica, la cual vale la pena recordar que corresponde a la viabilidad después del choque térmico.



**Figura 2-5:** Viabilidad y tolerancia térmica de *Penicillium* sp. HC1 en diferentes medios sumergidos: MB - 2 g/L - 4 g/L - 6 g/L de  $\text{CaCl}_2$ . Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%).

Los resultados indican que no hay cambios destacables en cuanto a los porcentajes de germinación entre los ensayos. Sin embargo, la tolerancia térmica sí se vio afectada, obteniendo resultados desfavorables para la mayoría de los ensayos con  $\text{CaCl}_2$ , sólo la concentración de 2 g/L fue ligeramente superior al control.

El calcio desempeña múltiples funciones dentro de las células fúngicas, siendo esencial para el mantenimiento de la integridad de las paredes celulares y la regulación de diversos procesos fisiológicos (Lange & Peiter, 2020). Se ha comprobado que el calcio participa en la síntesis y fortalecimiento de la pared celular de los hongos *Penicillium* (Roncal & Ugalde, 2003). La pared celular es una estructura protectora que rodea a las células fúngicas y le confiere rigidez y resistencia. El calcio interviene en la formación de enlaces cruzados entre los componentes de la pared celular, como la quitina y las proteínas, lo que contribuye a

su estabilidad y resistencia a condiciones adversas (U. O. Ugalde et al., 1990). Adicionalmente, el calcio juega un papel crucial en la regulación de la señalización intracelular en *Penicillium*. Actúa como un mensajero secundario en diversas vías de transducción de señales, transmitiendo información dentro de la célula y regulando la expresión génica y la actividad enzimática (Boyle, 2005; Wang et al., 2021). Estas señales son fundamentales para la respuesta de los hongos a cambios ambientales, como la disponibilidad de nutrientes y el estrés abiótico (M. Chen et al., 2022; Reddy et al., 2011).

Por lo anterior, mantener una cantidad adecuada de calcio en el medio de cultivo aumenta la capacidad de resistencia de *Penicillium* spp. frente a condiciones adversas de temperatura, cambios de pH y estrés osmótico. Integrando lo mencionado con los resultados de esta investigación, no se puede determinar una condición óptima de calcio para aumentar la tolerancia a estrés térmico, y aunque el sistema con 2 g/L fue el que obtuvo apenas unos grados de tolerancia térmica por encima del control, todos los datos obtenidos en realidad están por debajo del 40% de germinación relativa. Luego, concentraciones superiores a los 4 g/L de  $\text{CaCl}_2$  no se recomiendan en este sistema, pues representan tolerancia térmica por debajo de los 22% de germinación relativa, lo que resulta en la reducción de la calidad del producto final.

Por otro lado, los medios de cultivo en todos los ensayos presentados en este capítulo tienen una solución de microelementos (ver Anexo A), estos compuestos puede que se hayan relacionado con los iones calcio y puede que hayan influido en los resultados obtenidos. Se sabe que el calcio puede interactuar con otros nutrientes presentes en el medio de fermentación, como los micronutrientes y los iones metálicos, estas interacciones pueden influir en la disponibilidad y la absorción de otros nutrientes esenciales para el crecimiento y metabolismo del organismo (Hadley & Harrold, 1958; Lange & Peiter, 2020). De la literatura se sabe que el calcio está involucrado en la regulación de la homeostasis iónica en las células fúngicas (Lange & Peiter, 2020; Tisi et al., 2016). Juega un rol en el equilibrio y la regulación de otros iones, como el potasio y el sodio, que son esenciales para muchas funciones celulares (Lange & Peiter, 2020).

El pH de los montajes no se controló, pero se monitoreo. En general, se mantuvo constante entre 5,0 y 6,0. Dado que los hongos filamentosos como *Penicillium* pueden secretar

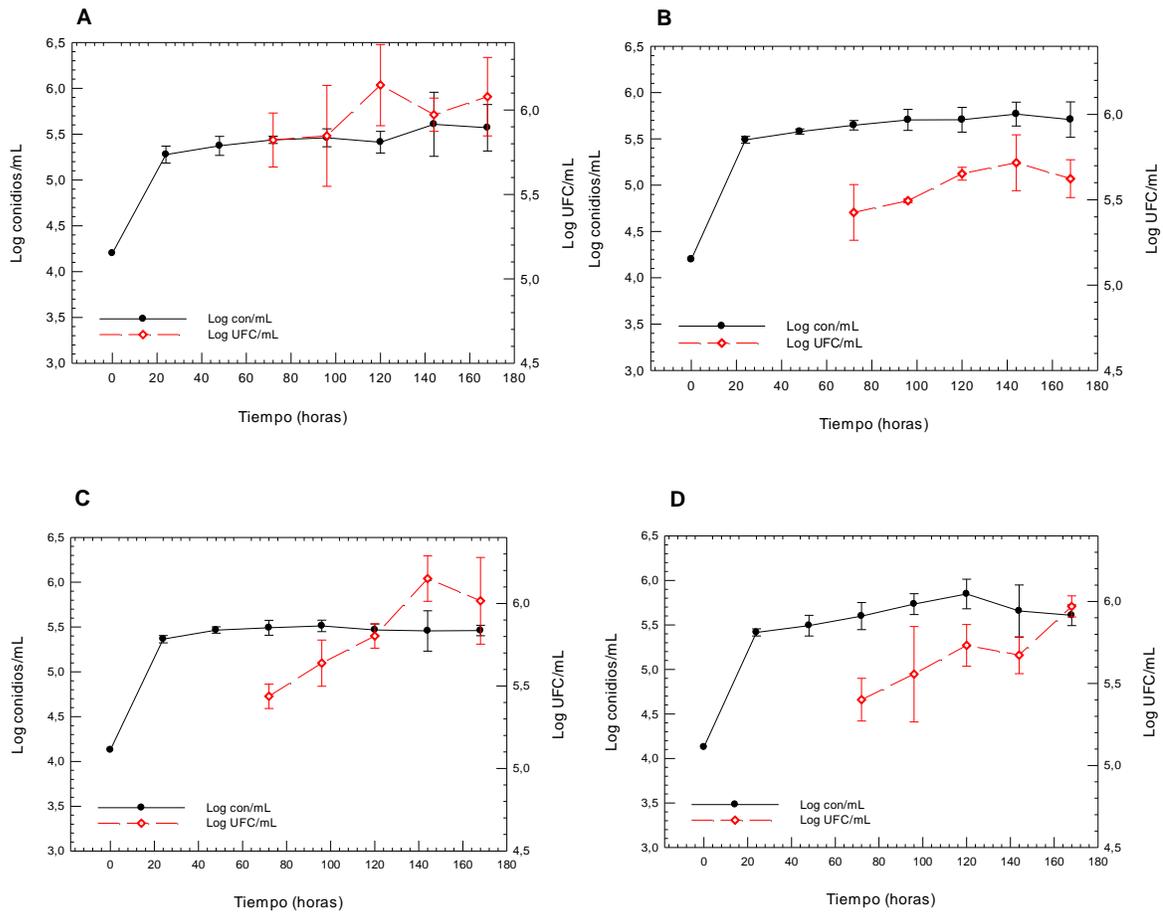
ácidos orgánicos como resultado de su metabolismo, el calcio podría neutralizar y regular el pH del medio de fermentación (Scervino et al., 2011; Vrabl et al., 2012).

Aunque se aumentó la concentración de conidios al utilizar 4 g/L de  $\text{CaCl}_2$  como se vio en la Figura 2-3, en ese mismo sistema se redujo la tolerancia térmica (ver Figura 2-5), lo cual no es muy conveniente, pues reduce la calidad del bioinsumo. Para sintetizar, los resultados indican que el  $\text{CaCl}_2$  no tiene influencia significativa en contraste con el  $\text{CaCO}_3$  usado en el medio base y, por lo tanto, se decide continuar con el medio estandarizado sin modificación alguna.

### **2.3.3 Evaluación del efecto de casaminoácidos**

Los casaminoácidos provienen de la hidrólisis de la caseína, una proteína presente en la leche. Específicamente, la hidrólisis es el proceso en el cual se rompen los enlaces peptídicos de la proteína y se obtienen aminoácidos individuales. Los aminoácidos son los bloques de construcción de las proteínas y desempeñan un papel fundamental en numerosos procesos biológicos. Los casaminoácidos son una fuente concentrada y equilibrada de aminoácidos y se utilizan principalmente como suplemento nutricional para el crecimiento de microorganismos y células en cultivo (Kobori et al., 2015).

El diseño experimental de esta parte de la investigación se propuso para estudiar dos concentraciones de casaminoácidos: E1 = 1,3 g/L y E2 = 13 g/L; y dos medios de cultivos: MAC = Medio del artículo de Cliquet y Jackson (2005) y MBC = Medio base modificado con Casaminoácidos. Todos los montajes se realizaron por triplicado. Las cinéticas de producción de conidios y biomasa se muestran en la Figura 2-6.

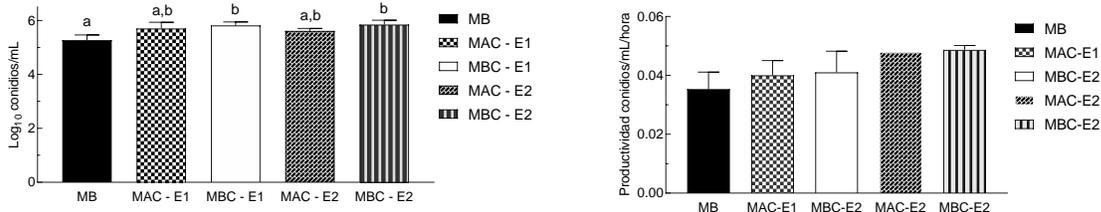


**Figura 2-6:** Cinética de producción de conidios y biomasa. (A) MAC – E1 con 1,3 g/L casaminoácidos (B) MBC – E1 con 1,3 g/L casaminoácidos (C) MAC – E2 con 13 g/L casaminoácidos (D) MBC – E2 con 13 g/L casaminoácidos.

### Efecto sobre la producción de conidios

La producción de conidios máxima se dio en los medios base modificados con casaminoácidos (MBC). Se obtuvo  $\text{Log}_{10} 5,70 \pm 0,24$  conidios/mL y  $\text{Log}_{10} 5,86 \pm 0,13$  conidios/mL para los medios MAC – E1 y MBC – E1 respectivamente, correspondientes a los medios con baja concentración de casaminoácidos. Mientras que, se logró  $\text{Log}_{10} 5,61 \pm 0,09$  conidios/mL para el medio MAC – E2 y  $\text{Log}_{10} 5,85 \pm 0,17$  conidios/mL para MBC – E2. El uso de casaminoácidos representa un aumento en la producción de conidios de hasta 11%.

La productividad de conidios no tiene diferencia significativa entre tratamientos. Para MAC – E1 fue de  $\text{Log}_{10} 0,040 \pm 0,005$  conidios/mL/hora, para MBC – E1 fue de  $\text{Log}_{10} 0,041 \pm 0,007$  conidios/mL/hora. Mientras que para MAC – E2 fue de  $\text{Log}_{10} 0,048 \pm 0,009$  conidios/mL/hora y para MBC – E2 de  $\text{Log}_{10} 0,049 \pm 0,001$  conidios/mL/hora.



**Figura 2-7:** Conidios máximos y productividad de conidios máximos de *Penicillium* sp. HC1 en diferentes medios en cultivos sumergidos: MAC – E1, MBC – E1, MAC – E2 y MBC – E2. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%).

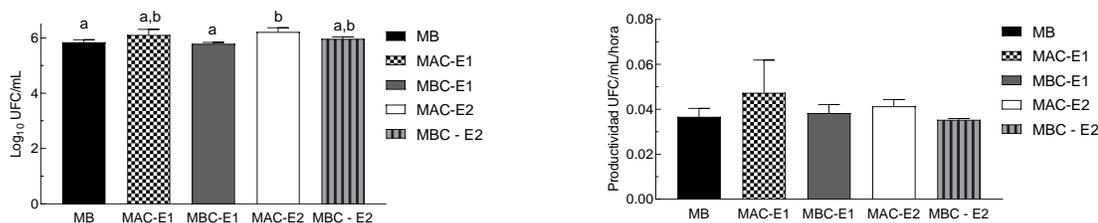
Los resultados obtenidos revelan un aumento en la producción de conidios de *Penicillium* sp. HC1 usando casaminoácidos para todos los casos. El medio MBC – E1 fue el que obtuvo la producción de conidios más alta, seguido por MBC – E2. A pesar de lo anterior, la tasa de productividad de conidios no tuvo diferencias relevantes entre los medios estudiados.

Lo interesante de este punto del análisis es que uno de los mejores resultados obtenidos fue con la concentración baja de casaminoácidos (1,3 g/L) y el otro con la concentración alta (13 g/L), pero ambos fueron con la modificación del medio base, esto quiere decir que, seguramente los demás componentes que conforman el medio base (ver Anexo A), en interacción con los casaminoácidos promovieron la conidiación.

### Efecto sobre el crecimiento

La producción máxima de biomasa se dio en el medio MAC – E2. Los resultados logrados fueron  $\text{Log}_{10} 6,11 \pm 0,20$  UFC/mL para MAC – E1 y  $\text{Log}_{10} 5,79 \pm 0,05$  UFC/mL para MBC – E1. Luego, los medios con la mayor concentración de casaminoácidos obtuvieron  $\text{Log}_{10} 6,22 \pm 0,15$  UFC/mL para MAC – E2 como el mejor resultado para esta experimentación y  $\text{Log}_{10} 5,97 \pm 0,06$  UFC/mL para MBC – E2. El uso de casaminoácidos representa un aumento en la producción de biomasa de hasta el 6%.

La productividad de biomasa no tuvo diferencias significativas entre tratamiento, sin embargo, el medio MAC – E1 obtuvo los mejores resultados con un valor de  $\text{Log}_{10}$   $0.047 \pm 0,015$  UFC/mL/hora, superando los  $\text{Log}_{10}$   $0,038 \pm 0,004$  UFC/mL/hora de MBC – E1, los  $\text{Log}_{10}$   $0,041 \pm 0,003$  UFC/mL/hora de MAC – E2 y los  $\text{Log}_{10}$   $0,036 \pm 0,000$  UFC/mL/hora del medio MBC – E2. Vale la pena tener presente que la productividad para el medio de control (MB) fue de  $\text{Log}_{10}$   $0,037 \pm 0,004$  UFC/mL/hora.



**Figura 2-8:** Biomasa máxima y productividad de biomasa máxima de *Penicillium* sp. HC1 en diferentes medios en cultivos sumergidos: MAC – E1, MBC – E1, MAC – E2 y MBC – E2. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%).

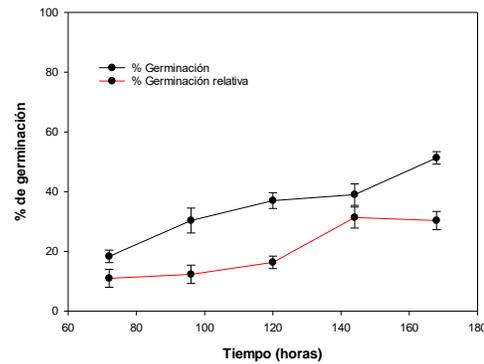
Los resultados señalan que los sistemas con la mayor concentración de casaminoácidos producen más biomasa de *Penicillium* sp. HC1. Esto se evidencia porque los dos sistemas E2 son estadísticamente diferentes al control, mientras que para la concentración más baja de casaminoácidos (E1) sólo un medio presentó diferencia. A pesar de esto, la tasa de producción de biomasa no aumenta con respecto a la del control en ninguno de los casos. Ahora bien, la biomasa máxima aumentó un orden de magnitud para los medios MAC, esto se puede visualizar fácilmente en la cinética roja de la Figura 2-6. Esto sucedió quizás porque los casaminoácidos pueden complementar otros nutrientes presentes en el medio y proporcionar un equilibrio adecuado de nutrientes esenciales para el crecimiento óptimo de los hongos (Rho, 2011).

Los resultados concuerdan con lo reportado en la literatura, cuando Kobori y colaboradores (2015) definieron medios y protocolos en los cuales se favorecía la producción de conidios y microesclerocios sumergidos de *Trichoderma harzianum* en fermentación sumergida variando fuentes y concentraciones de carbono y nitrógeno, y encontraron que los medios de cultivo que contenían melaza y casaminoácidos produjeron más biomasa fúngica, que los medios que contenían glucosa, extracto de levadura o licor de maíz, todos a una

relación 50:1 de C/N y una concentración de carbono de 36 g/L. Por lo tanto, para el sistema de interés, los casaminoácidos también ayudan a producir más biomasa de *Penicillium* sp. HC1.

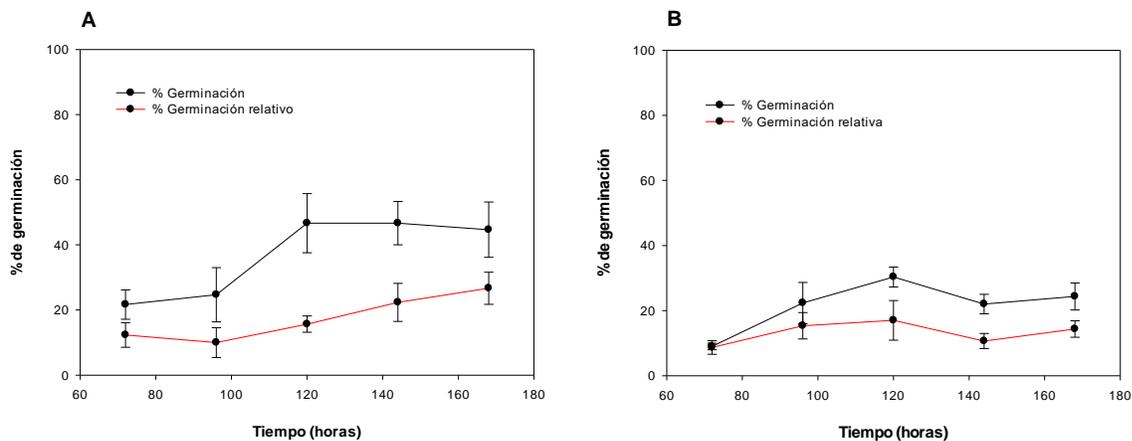
### Efecto sobre la viabilidad y tolerancia térmica de los conidios a 50°C

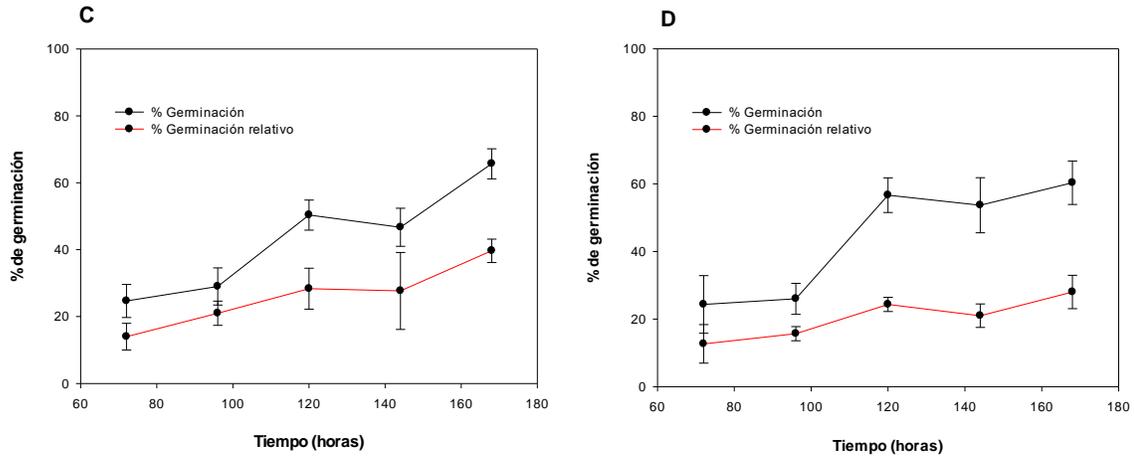
Se tomó la cinética de la viabilidad y tolerancia térmica a  $50\pm 2^\circ\text{C}$  del medio base para tener de referencia y poder comparar con los ensayos hechos a partir de este punto dentro de la investigación, este se muestra en la Figura 2-9.



**Figura 2-9:** Cinética viabilidad y tolerancia térmica de *Penicillium* sp. HC1 en el Medio Base (MB).

En general, tanto la viabilidad como la tolerancia térmica tienen una tendencia creciente con el paso de los días. Sin embargo, la viabilidad al finalizar la fermentación llega apenas a  $51\pm 2\%$  de germinación y la tolerancia a  $30\pm 3\%$  de germinación relativa. Luego, las cinéticas para los primeros ensayos con casaminoácidos se muestran en la Figura 2-10.

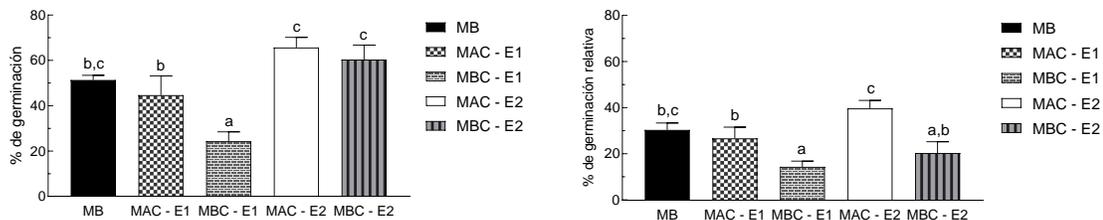




**Figura 2-10:** Cinética viabilidad y tolerancia térmica de *Penicillium* sp. HC1 en diferentes medios en cultivos sumergidos. (A) MAC – E1 con 1,3 g/L casaminoácidos (B) MBC – E1 con 1,3 g/L casaminoácidos (C) MAC – E2 con 13 g/L casaminoácidos (D) MBC – E2 con 13 g/L casaminoácidos.

Los medios con la mayor concentración de casaminoácidos (E2 = 13 g/L) obtuvieron los mayores porcentajes de germinación, con 65±4,51% y 60,33±6,43% para MAC – E2 y MBC – E2 respectivamente. Mientras que MAC – E1 logró 44,67±8,50% y MBC – E1 24,33±4,16% de germinación, ambos por debajo del medio de control.

Por otro lado, los porcentajes de germinación relativa fueron positivos para los medios del artículo (MAC). El mayor porcentaje de germinación relativa se obtuvo para MAC – E2 con un valor de 39,67±3,51%. Este valor supera la tolerancia del medio base (MB). Los demás medios evaluados obtuvieron datos de tolerancia térmica por debajo del de referencia. Así pues, MAC – E1 tuvo 26,67±4,93%, luego MBC – E1 obtuvo 14,33±2,52% y MBC – E2 20,33±4,93% de germinación relativa.



**Figura 2-11:** Viabilidad y tolerancia térmica – Día 7 de *Penicillium* sp. HC1 en los medios MAC – E1, MBC – E1, MAC – E2 y MBC – E2. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%).

Los resultados señalan a los medios con la mayor concentración de casaminoácidos como los que aumentan la viabilidad de los conidios de *Penicillium* sp. HC1, esto podría suceder gracias a los aminoácidos presentes en los casaminoácidos, ya que pueden ser utilizados como precursores para la síntesis de proteínas y otros componentes celulares esenciales (Bapat et al., 2006), esto puede ayudar a mantener la integridad y funcionalidad de las células de *Penicillium*, lo que resulta en una mayor viabilidad y longevidad celular durante el proceso de fermentación (Inch et al., 1986; Jackson & Schisler, 1992; Schisler, 1991).

En contraste, la tolerancia térmica sólo mejora para los medios MAC. Esto podría estar relacionado con alguno de los componentes de este medio. Revisando su composición, difiere de los demás medios por la adición de un grupo de vitaminas además de la concentración de los otros reactivos (Ver Anexo A). Parece ser que la influencia de las vitaminas en los medios MAC podría estar influyendo en el aumento de la tolerancia térmica de *Penicillium* sp. HC1. No obstante, en la literatura se reportan ensayos para aumentar la tolerancia de las esporas y blastosporas de *Paecilomyces fumosoroseus* a la desecación donde concluyeron que los medios que contenían concentraciones de glucosa superiores a 10 g/L y de casaminoácidos entre 13,2 g/L y 40 g/L favorecían la producción máxima de blastosporas tolerantes a la desecación, obteniendo un 75% de supervivencia (Cliquet & Jackson, 2005; Jackson et al., 1997). Con lo anterior, es posible también que se mejore la tolerancia térmica de los conidios de *Penicillium* sp. HC1 al encontrar la relación y concentración óptima entre la fuente de carbono y los casaminoácidos.

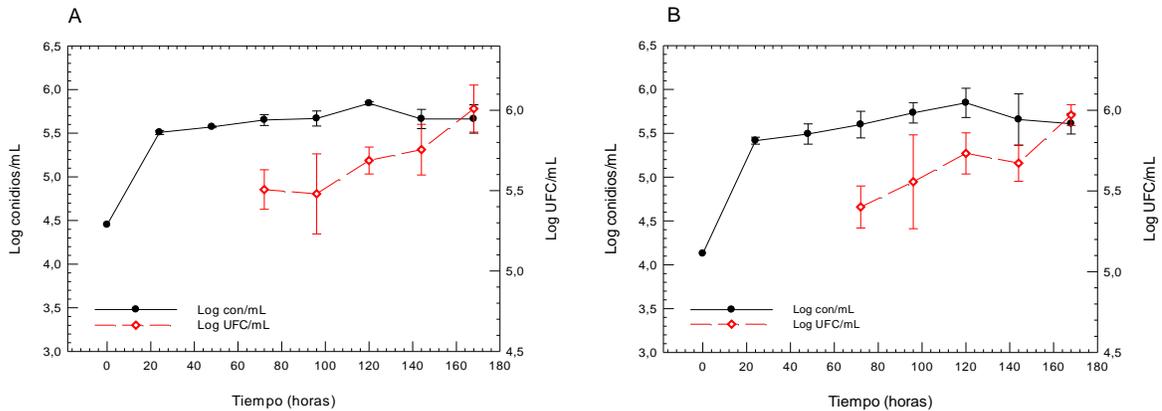
Los resultados indican que la mayor concentración de casaminoácidos, relacionado a los 13 g/L, mejora la viabilidad y la tolerancia térmica de los conidios de *Penicillium* sp. HC1. Sin embargo, para que este compuesto esté considerado en los procesos industriales puede implicar costos elevados a pesar de ser reportado como una de las fuentes de nitrógeno más económicas comparada con, por ejemplo, el extracto de levadura o los péptidos (Shora et al., 2021). En vista de lo anterior, se propone estudiar alguna alternativa que reemplace los casaminoácidos y represente una reducción en el valor del compuesto.

### 2.3.4 Evaluación del efecto de aminoácidos de prueba (AP)

Teniendo como prioridad los resultados positivos de la implementación de los casaminoácidos, se propuso realizar un ensayo utilizando aminoácidos de menor costo, a los cuales se llamó dentro de esta investigación: aminoácidos de prueba (AP).

La etiqueta de los AP indica que contiene proteína concentrada de suero de leche bovina, creatina monohidratada, hidroximetil butirato (HMB) y aminoácidos de cadena ramificada (BCAA). Cada 100 g de proteína de lactosuero contiene los siguientes aminoácidos: ácido glutámico (14 g), leucina BCAA (8,5 g), valina BCAA (4,5 g), isoleucina BCAA (5,2 g), arginina (2,2 g), ácido aspártico (8,7 g), cisteína (2 g), glicina (1,5 g), histidina (1,5 g), lisina (7,8 g), alanina (4,2 g), metionina (1,8 g), fenilalanina (2,6 g), hidroxiprolina (<0,1 g), prolina (4,9 g), serina (4,1 g), treonina (5,7 g), triptófano (1,7 g) y tirosina (2,5 g).

La Figura 2-12 muestra las cinéticas de producción de conidios y de biomasa para medios con 13 g/L, uno con los aminoácidos de prueba (AP) y el otro con los casaminoácidos MBC – E2.



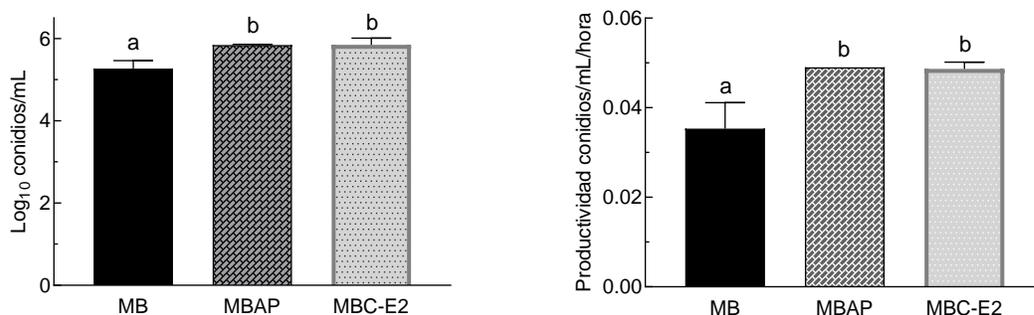
**Figura 2-12:** Cinética de producción de conidios y biomasa de *Penicillium sp. HC1* en diferentes medios sumergidos. (A) MBAP (B) MBC - E2.

#### Efecto sobre la producción de conidios

Los resultados demuestran que con el uso de aminoácidos de prueba se obtienen resultados similares que usando casaminoácidos referente a los conidios máximos y a la productividad de conidios como se muestra en la Figura 2-13.

Tanto MBAP como MBC – E2 se posicionan por encima del medio base (MB) en cuanto a conidios máximos. Con el medio MBAP se obtiene  $\text{Log}_{10} 5,84 \pm 0,02$  conidios/mL, valor cercano al que se obtuvo usando casaminoácidos a la misma concentración con el medio MBC – E2,  $\text{Log}_{10} 5,85 \pm 0,17$  conidios/mL.

La productividad de los conidios respondió de la misma manera. Se obtuvo  $\text{Log}_{10} 0,049 \pm 0,000$  conidios/mL/hora para el medio MBAP, cercano al valor  $\text{Log}_{10} 0,049 \pm 0,001$  conidios/mL/hora, obtenido para el medio MBC – E2. Estos datos resultaron superiores a los del control que fue de  $\text{Log}_{10} 0,035 \pm 0,006$  conidios/mL/hora.



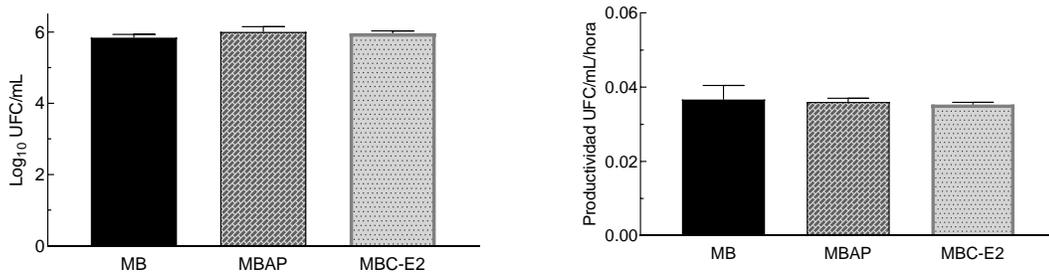
**Figura 2-13:** Conidios máximos y productividad de conidios máximos de *Penicillium* sp. HC1 en diferentes medios sumergidos: MB, MBAP y MBC – E2. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%).

Los AP contienen ácido glutámico y triptófano. En su investigación sobre la influencia de los aminoácidos en el proceso de esporulación de *Penicillium digitatum*, Zeidler y Margalith (1973) revelaron que, al utilizar ácido glutámico y aspártico como las únicas fuentes de nitrógeno, estos compuestos aceleraron la formación de esporas en un período de tiempo comprendido entre 10 y 12 horas. El estudio destacó que, en presencia de varios aminoácidos, también se observa la esporulación en microciclo y que el triptófano aumentó significativamente la longitud de la cadena conidial (Zeidler & Margalith, 1973). También se encontró en otras investigaciones, que la inducción a la conidiación en microciclos en cultivos agitados de *Penicillium cyclopium*, dependían de la presencia de ácido orgánico, especialmente ácido glutámico, en combinación con glucosa (Jung et al., 2014; Pazout & Schroder, 1988). Entonces, se puede decir que la mejora en la producción y tasa de

producción de conidios de *Penicillium* sp. HC1 para el medio MBAP puede deberse al efecto que tienen los aminoácidos como el ácido glutámico y el triptófano.

### Efecto sobre el crecimiento

La biomasa máxima y la productividad de biomasa no presentan diferencias significativas entre tratamientos. El valor obtenido para el medio MBAP fue de  $\text{Log}_{10} 6,01 \pm 0,15$  UFC/mL para la biomasa máxima y de  $\text{Log}_{10} 0,036 \pm 0,001$  UFC/mL/hora.



**Figura 2-14:** Biomasa máxima y productividad de biomasa máxima de *Penicillium* sp. HC1 en diferentes medios sumergidos: MB, MBAP y MBC – E2.

Teniendo presente la composición de los AP adicionados en el experimento, se tiene a la creatina como uno de los suplementos del medio MBAP. La creatina es fuente de nitrógeno y fue propuesta por Frivstad (1985) como un ingrediente del medio de cultivo CREA, el cual se usa como un diferencial para las *Penicillium* spp. tervertiladas. El autor realizaba un amplio estudio de la capacidad de crecimiento y de la posible formación de ácido y/o base utilizando un gran número de especies tervertiladas (Frivstad, 1985; Pitt & Hocking, 2009). Ahora bien, Gutiérrez (2017), señala las características de *Penicillium* sp. HC1 en medio líquido con la presencia de variedad de tipos de conidióforos que van desde fiálides solitarias hasta conidióforos cuatrivertilados, lo que podría relacionarse a que la creatina posiblemente funcione bien como fuente de nitrógeno y crecimiento para la especie de estudio, sin embargo, los resultados revelan que no existe influencia significativa de la creatina en el crecimiento de *Penicillium* sp. HC1 bajo las condiciones evaluadas como se puede observar en la Figura 2-14. En la descripción del CREA, Frivstad no citaba la razón por la que se presentaba un buen crecimiento de algunas especies de *Penicillium* spp. mientras otras parecían inhibidas (Frivstad, 1985). Algunos investigadores sugieren que

existe una relación filogenética más próxima entre las especies que presentan el mismo tipo de crecimiento en los medios con creatina (Houbraken et al., 2020; Torres-Garcia et al., 2022).

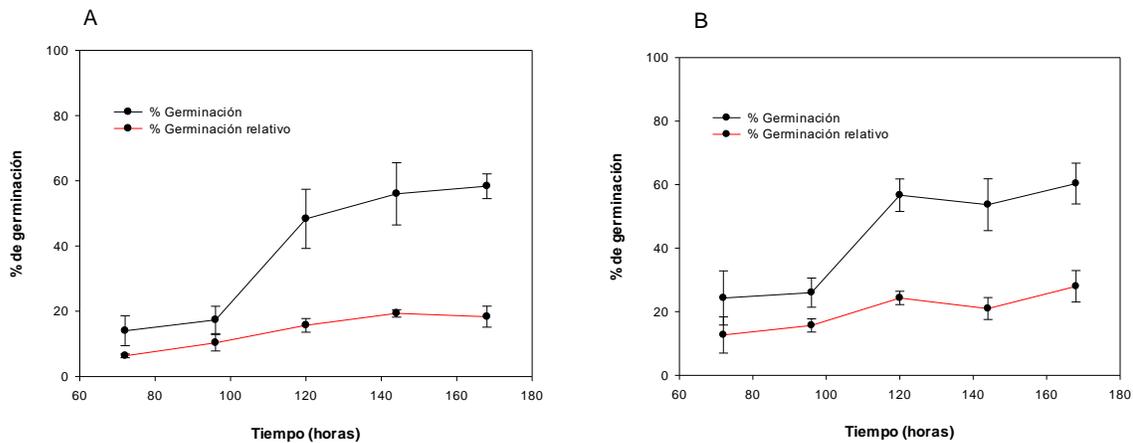
Por otro lado, los estudios con CREA obtienen virajes ácidos o básicos en los medios con creatina debido a los diferentes metabolismos de la sacarosa y de la creatina que tienen cada *Penicillium* spp (Houbraken et al., 2020). La producción de metabolitos ácidos en estos medios se debe a la utilización de la sacarosa como fuente de carbono (Pitt & Hocking, 2009), mientras que el viraje básico del medio se relacionó con la liberación de amoníaco (Mukherjee & Ghorai, 2023). Pitt y Hocking citaron que esta producción de base se debía a la liberación de iones de amoníaco a partir de la creatina (Pitt & Hocking, 2009). Los hallazgos de Adour y colaboradores (2002) respecto al crecimiento de *P. camemberti* y de *Geotrichum candidum* en un medio con peptona muestran que la liberación de amoníaco es posible que provenga de la desaminización de los aminoácidos (la creatina en este caso) al utilizarlos como fuente de carbono (Martínez Benítez, 2003; Santos-Ebinuma et al., 2013). Estas declaraciones podrían relacionarse con la estabilidad que tuvo el pH en las fermentaciones de los ensayos, aunque el pH no se controló, si se monitoreo y se mantuvo de inicio a fin entre 5,5 y 6,0, presuntamente por la interacción con la creatina y otros componentes que estabilizaron el pH del medio, lo que resulta beneficioso para el crecimiento de *Penicillium* sp. HC1.

Retomando la composición de los AP, el aporte de aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) al medio de trabajo es destacable. La leucina, valina e isoleucina son aminoácidos nutricionales importantes para la vida celular. En el 2012, Ardestani y Marzban resaltaron el efecto que tiene la adición de la L- isoleucina en el rendimiento y la productividad de un proceso de fermentación por lotes para la producción de ácido micofenólico (MPA) por *Penicillium brevicompactum*. En su investigación, determinaron que la adición de cualquier cantidad de L- isoleucina en el rango de 0,5 a 6 g/L hará que aumente la biosíntesis de MPA en *P. brevicompactum* debido a un efecto inhibitorio que promueve una ruta metabólica para el aumento de producción del metabolito de interés (Ardestani & Marzban, 2012). Por otro lado, los AP también aportan otros aminoácidos como la metiotina y la lisina, las cuales se ha encontrado que al ser adicionadas en concentraciones entre 1 y 3 g/L a los medios de fermentación sumergida incrementan la producción de MPA por *P. brevicompactum*. (Ardestani et al., 2009; Patel et al., 2016). Por lo tanto, es de esperarse que el aporte de

aminoácidos de los AP sea positivo para el crecimiento de *Penicillium* sp. HC1 pero esto en realidad no se ve reflejado en los resultados obtenidos por lo que no se puede hacer tal afirmación.

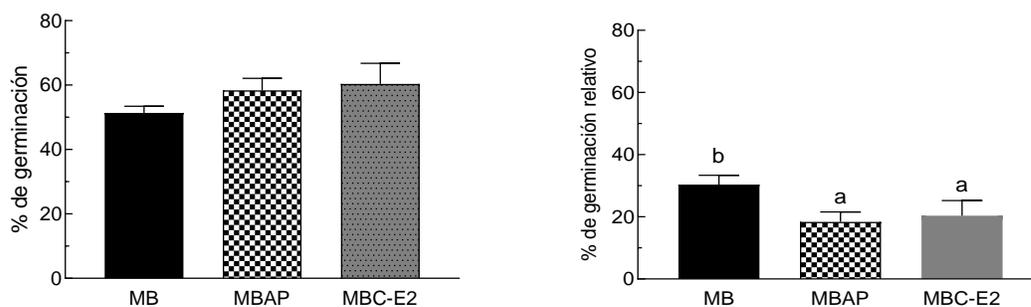
### Efecto sobre la viabilidad y tolerancia térmica de los conidios a 50°C

La viabilidad y tolerancia térmica también son similares tanto para el medio con aminoácidos de prueba, como con los casaminoácidos. La Figura 2-15 muestra sus cinéticas de viabilidad y tolerancia térmica. La tendencia es creciente para las dos variables



**Figura 2-15:** Cinética viabilidad y tolerancia térmica de *Penicillium* sp. HC1 en diferentes medios en cultivos sumergidos. (A) MBAP (B) MBC – E2.

Los datos al día 7 de la fermentación para el medio MBAP fueron  $58,33 \pm 3,79\%$  en la viabilidad y  $18,33 \pm 3,21\%$  para la tolerancia térmica. En los porcentajes de viabilidad se presentan resultados superiores a los del control, sin embargo, la tolerancia térmica es inferior a la del medio base. La Figura 2-16 muestra que no hay diferencias estadísticamente significativas para la viabilidad, mientras que si las hay para la tolerancia térmica resultando desfavorable para los ensayos propuestos.



**Figura 2-16:** Viabilidad y tolerancia térmica – Día 7 de *Penicillium* sp. HC1 en diferentes medios sumergidos: MB, MBAP y MBC – E2. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%).

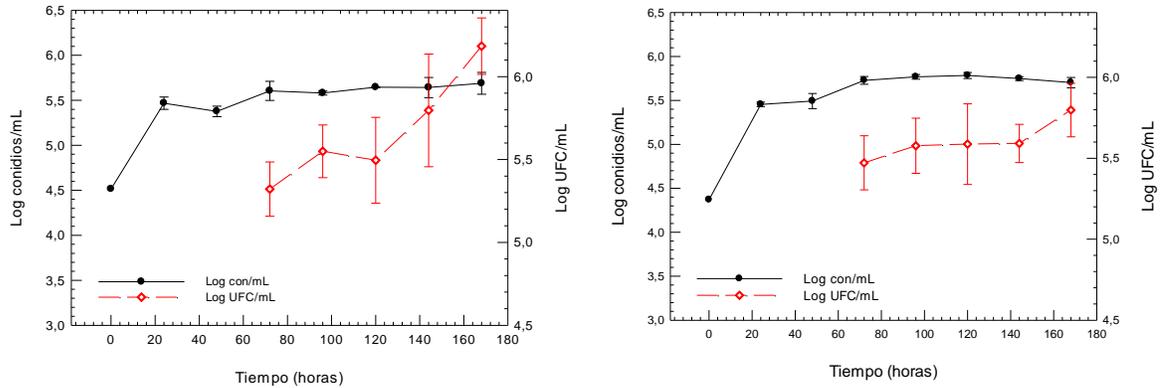
Se ha reportado que la glucosa, alanina y arginina (aminoácidos que conforman la composición de los AP) activan entre 12 y 21% la geminación conidial en estudios inducidos por L—aminoácidos para el crecimiento de *Penicillium roqueforti* y que la hinchazón de los conidios fue mínima o incluso indetectable antes de la formación del tubo germinal (Ijadpanahsaravi et al., 2021; Punt et al., 2022). Entonces, la alanina y la arginina pudieron tener efecto benéfico sobre la viabilidad de los conidios de *Penicillium* sp. HC1 en las fermentaciones realizadas.

Los resultados indican que los aminoácidos de prueba (AP) a una concentración de 13 g/L funcionan bien como reemplazo de los casaminoácidos al mejorar la productividad de conidios y su viabilidad. No obstante, la tolerancia térmica es un aspecto que sigue sin obtener resultados positivos en comparación con el medio base.

### 2.3.5 Evaluación del efecto del uso de vitaminas

Los ensayos iniciales de casaminoácidos mostraron una respuesta positiva con el uso del medio MAC en la tolerancia térmica, lo anterior presuntamente asociado a algún componente de este medio. Revisando la composición del medio se determinó que la adición de un conjunto de vitaminas podría estar influenciando el aumento de la tolerancia a la temperatura de *Penicillium* sp. HC1. Es por lo anterior que se propuso evaluar el efecto del uso de vitaminas con el montaje de dos fermentaciones utilizando los medios con los mejores resultados hasta este punto de la investigación (MBC – E2 y MBAP) y

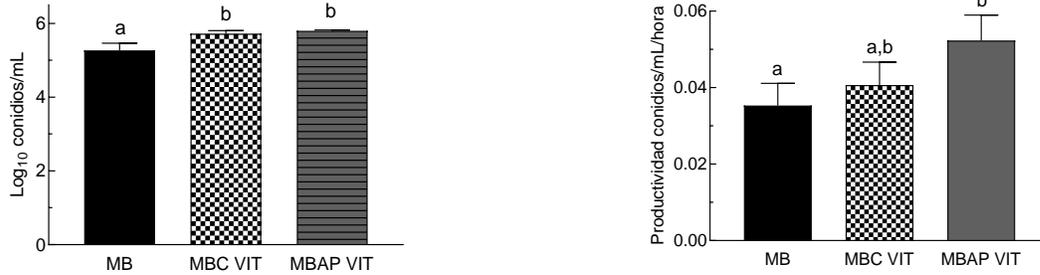
adicionándoles el set de vitaminas a las concentraciones establecidas por Cliquet y Jackson (2005). Estas fueron: Tiamina, riboflavina, pantotenato de calcio, niacina, piridoxina, ácido tiótico, todas a una concentración de 0,5 g/L, y ácido fólico, biotina y vitamina B<sub>12</sub> a una concentración de 0,05 g/L. Los resultados de la cinética de producción de conidios y biomasa durante los 7 días de fermentación se muestran a continuación.



**Figura 2-17:** Cinética de producción de conidios y biomasa de *Penicillium* sp. HC1 en diferentes medios en cultivos sumergidos. (A) MBC VIT (B) MBAP VIT.

### Efecto sobre la producción de conidios

Como era de esperarse, los conidios máximos volvieron a superar el registro del medio base para las dos fermentaciones con la adición de las vitaminas. Esta se demuestra estadísticamente con la Figura 2-18, obteniendo  $\text{Log}_{10} 5,72 \pm 0,08$  conidios/mL para el medio MBC VIT y  $\text{Log}_{10} 5,80 \pm 0,02$  conidios/mL para MBAP VIT. Asimismo, en la productividad de conidios se consiguió  $\text{Log}_{10} 0,040 \pm 0,006$  conidios/mL/hora para MBC VIT y  $\text{Log}_{10} 0,052 \pm 0,007$  conidios/mL/hora para el medio MBAP VIT superiores a los  $\text{Log}_{10} 0,035 \pm 0,006$  conidios/mL/hora del medio base (MB).



**Figura 2-18:** Conidios máximos y productividad de conidios máximos de *Penicillium* sp. HC1 en diferentes medios en cultivos sumergidos (A) MBC VIT (B) MBAP VIT. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%).

Las vitaminas también se reportan como inductoras de conidiación. Por ejemplo, el pantotenato de calcio provocó un desarrollo moderado de conidios en *Penicillium rubrum* que no esporuló en absoluto en su medio de control (Basu & Bhattacharyya, 1962). Especies como *P. funiculosum* y *P. notatum* aumentaron su esporulación en presencia de ácido nicotínico, riboflavina y tiamina como se puede observar en la Tabla 2-1.

Sin duda, los AP y las vitaminas favorecen positivamente la producción y la tasa de producción de conidios de *Penicillium* sp. HC1, mejorando así, la calidad del bioinsumo.

### Efecto sobre el crecimiento

La biomasa máxima tuvo el mejor resultado para el medio MBC VIT comparado con el que contenía los AP y el de referencia. En la Figura 2-19 se puede observar que el medio estadísticamente diferencial obtuvo  $\text{Log}_{10} 6,22 \pm 0,14$  UFC/mL, en contraste con los  $\text{Log}_{10} 5,81 \pm 0,13$  UFC/mL de MBAP.

La productividad de biomasa no tuvo diferencias estadísticas significativa para los ensayos en comparación. Los valores obtenidos para MBC VIT y MBAP VIT fueron  $\text{Log}_{10} 0,039 \pm 0,003$  UFC/mL/hora y  $\text{Log}_{10} 0,036 \pm 0,002$  UFC/mL/hora respectivamente.



**Figura 2-19:** Biomasa máxima y productividad de biomasa máxima de *Penicillium* sp. HC1 en diferentes medios en cultivos sumergidos: MB, MBC VIT y MBAP VIT. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%).

Dentro del conjunto de vitaminas que se agregaron al medio se encuentra la tiamina, esta es conocida como la vitamina B<sub>1</sub>, es soluble en agua y juega un papel fundamental como coenzima en el metabolismo del carbono intermediario (Beguin, 2010). La mayoría de los hongos son capaces de sintetizar esta vitamina y se sabe que su disponibilidad tiene efectos profundos en la expresión génica por lo que la mayoría de los microorganismos han desarrollado medios para garantizar que la tiamina no se produzca en cantidades superiores a las necesarias para la biosíntesis de difosfato de tiamina (TDP), su forma biológicamente activa (Vogl et al., 2008). Un experimento con varias concentraciones de tiamina entre 0,001 y 1 µg/ml y pH entre 4,4 y 5,8, mostraron efectos positivos sobre el crecimiento de varias especies de *Penicillium* (Basu & Bhattacharyya, 1962). La tiamina, riboflavina y biotina fueron estudiadas (1964) por sus efectos en la producción de etileno por *Penicillium digitatum*, allí encontraron que la biotina aumentó significativamente el crecimiento y la producción de etileno, mientras la tiamina y la combinación de biotina – tiamina no tuvieron ningún efecto. La tiamina y la biotina parecen ser antagonistas, sin embargo, la mezcla completa de vitaminas aumentó significativamente la producción de etileno sin un aumento significativo en el crecimiento del organismo (Spalding & Lieberman, 1965). Los autores concluyeron que la mezcla de vitaminas fue significativa en la estimulación para la producción de etileno incluso en concentraciones bajas (<1%). Spalding y Lieberman también evaluaron la adición de aminoácidos, esta adición no aumentó la producción de etileno, pero sí provocó un aumento importante en la biomasa de *P. digitatum* (Spalding & Lieberman, 1965). Los resultados anteriores pueden ayudar a entender que el aumento en la biomasa del medio que contiene casaminoácidos (MBC

VIT) es mayor debido a su aporte en aminoácidos libres, los cuales pueden ser más fácilmente metabolizados por *Penicillium* sp. HC1, mientras que el medio con AP pudo generar algún tipo de antagonismo entre los suplementos y vitaminas adicionadas (como por ejemplo un exceso de tiamina), lo que probablemente afectó el crecimiento óptimo del hongo filamentoso.

Otros reportes sobre el efecto de las vitaminas en el crecimiento y la esporulación de varias especies de *Penicillium* se pueden visualizar en la Tabla 2-2.

**Tabla 2-2.** Efecto de las vitaminas sobre el crecimiento y la esporulación de varias especies de *Penicillium*. Adaptado de (Basu & Bhattacharyya, 1962)

<b>Especie</b>	<b>Aumento del crecimiento micelial (%) en presencia de</b>	<b>Aumento de la esporulación en presencia de</b>
<i>P. adametzi</i>	Pantotenato de calcio (35%)	N.R.
<i>P. canescens</i>	Ácido nicotínico (20%) biotina (29%)	N.R.
<i>P. citrinum</i>	N.R.	Ácido nicotínico, riboflavina
<i>P. cyaneum</i>	Biotina (11%)	N.R.
<i>P. fellutanum</i>	Tiamina (37%), riboflavina (16%), piridoxina (33%)	Tiamina, biotina
<i>P. funiculosum</i>	N.R.	Tiamina, ácido nicotínico, riboflavina, piridoxina, pantetonato de calcio, biotina
<i>P. notation</i>	N.R.	Tiamina, riboflavina, pantotenato de calcio, biotina
<i>P. oxalicum</i>	Tiamina (25%), pantotenato de calcio (22%)	Tiamina, ácido nicotínico, riboflavina, piridoxina, pantotenato de calcio
<i>P. purpurogenum</i>	Ácido nicotínico (36%), biotina (66%)	N.R.

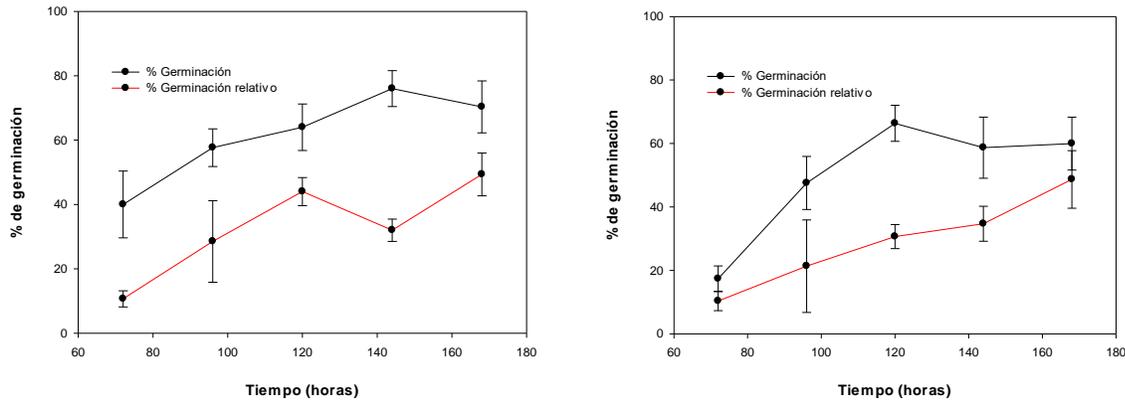
<i>P. roseo-purpurem</i>	N.R.	Riboflavina, pantotenato de calcio
<i>P. rubrum</i>	N.R.	Ácido nicotínico, pantetonato de calcio
<i>P. simplicissimum</i>	N.R.	Tiamina, riboflavina, ácido nicotínico
<i>P. steckii</i>	Piridoxina (13%) biotina (84%)	N.R.
<i>P. tardum</i>	Riboflavina (11%), piridoxina (25%), pantotenato de calcio (14%), biotina (12%)	N.R.
<i>P. variable</i>	Piridoxina (14%), pantotenato de calcio (12%), biotina (20%)	Tiamina, ácido nicotínico, piridoxina
<i>P. variable</i>	Tiamina (14%), riboflavina (16%), piridoxina (20%), biotina (20%)	N.R.
<i>P. digitatum</i>	Tiamina (11%), biotina (15%)	N.R.

---

N.R. No reportado

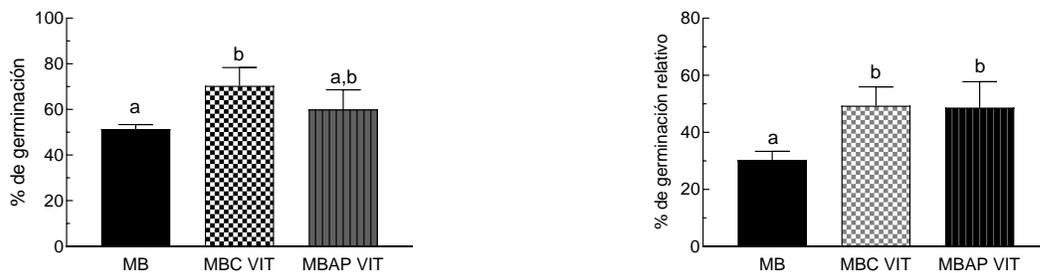
### **Efecto sobre la viabilidad y tolerancia térmica de los conidios a 50°C**

Se obtuvieron resultados favorables tanto para la viabilidad como para la tolerancia térmica en los medios con la adición de vitaminas. Las cinéticas que reflejan la germinación y germinación relativa para estos ensayos aparecen en la Figura 2-20.



**Figura 2-20:** Cinética de viabilidad y tolerancia térmica de *Penicillium* sp. HC1 en diferentes medios en cultivos sumergidos. (A) MBC VIT (B) MBAP VIT

Los datos alcanzados son superiores a los reportados en el medio base (MB). La Figura 2-21 pone en evidencia el aumento de la viabilidad y de la tolerancia térmica para ambos medios. Los valores logrados para el día 7 de la fermentación fueron  $70,33 \pm 8,08\%$  de germinación para el medio MBC VIT y  $59,96 \pm 8,35\%$  de germinación en el MBAP VIT. Además, en la tolerancia térmica se obtuvo  $49,33 \pm 6,66\%$  de germinación relativa para MBC VIT y  $48,67 \pm 9,07\%$  para MBAP VIT, valores superiores y estadísticamente significativos al  $30 \pm 3\%$  del medio de referencia (MB).



**Figura 2-21:** Viabilidad y tolerancia térmica – Día 7 de *Penicillium* sp. HC1 en diferentes medios en cultivos sumergidos: MB, MBC VIT y MBAP VIT. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%).

En 2021, Dietsch y colaboradores en un estudio sobre la tolerancia de blastosporas a la desecación, anunciaron resultados que muestran no sólo el potencial de mejora de una

determinada formulación mediante la adición de aditivos, sino que también demuestran cómo su modo de acción es bastante complicado. Los aditivos complejos que contienen azúcares, minerales, vitaminas y otras sustancias nutritivas parecen dar mejores resultados. Al igual que muchos de los otros métodos y materiales explorados para mejorar la desecación de blastosporas y la estabilidad de almacenamiento, no existe un único aditivo que sea el mejor, por lo que a menudo son necesarios estudios empíricos para determinar qué aditivo funciona bien con qué especie y/o formulación (Dietsch et al., 2021). En consecuencia, el uso de las vitaminas sin duda mejora la tolerancia térmica de los conidios de *Penicillium* sp. HC1 como se puede ver en la Figura 2-21, aumentando hasta 64% de la germinación relativa con respecto al medio de control. Se hace necesario profundizar los estudios para entender los mecanismos de influencia de cada suplemento y determinar las concentraciones óptimas para las condiciones de producción.

El resumen de los datos máximos alcanzados para cada ensayo en este capítulo se presenta en la Tabla 2-3. De esta manera, se puede evidenciar la mejora conseguida del producto final.

**Tabla 2-3.** Resumen de los máximos resultados obtenidos por cada ensayo en Erlenmeyer

Ensayo	Nombre del medio de cultivo	Conidios [Log <sub>10</sub> conidios/mL]	Biomasa [Log <sub>10</sub> UFC/mL]	Viabilidad (%)	Tolerancia térmica (%)
Medio Base	<b>MB</b>	5,27±0,20	5,84±0,09	51±2	30±3
Evaluación efecto del calcio	<b>2 g/L</b>	5,39±0,24	5,59±0,22	48±3	32±6
	<b>4 g/L</b>	5,83±0,17	5,79±0,18	47±6	22±3
	<b>6 g/L</b>	5,46±0,05	5,69±0,08	50±2	20±1
Evaluación efecto de casaminoácidos	<b>MAC – E1</b>	5,70±0,24	6,11±0,20	44,67±8,50	26,67±4,93
	<b>MBC – E1</b>	5,82±0,13	5,79±0,05	24,33±4,16	14,33±2,52
	<b>MAC – E2</b>	5,61±0,09	6,22±0,15	65±4,51	39,67±3,51
	<b>MBC – E2</b>	5,85±0,17	5,97±0,06	60,33±6,43	20,33±4,93
Evaluación efecto de AP	<b>MBAP</b>	5,84±0,02	6,01±0,15	58,33±3,79	18,33±3,21
Efecto de vitaminas	<b>MBC VIT</b>	5,72±0,08	6,22±0,14	70,33±8,08	49,33±6,66
	<b>MBAP VIT</b>	5,80±0,02	5,81±0,13	59,96±8,35	48,67±9,07

Con los resultados se presume que las interacciones de los aminoácidos, junto con los otros compuestos del medio y las vitaminas mejoran la viabilidad y la tolerancia térmica de los conidios de *Penicillium* sp. HC1, además de mejorar la producción de conidios. En consecuencia, se seleccionó el medio MBAP VIT para continuar con el siguiente objetivo.

## 2.4 Conclusiones

Los datos obtenidos indican que el  $\text{CaCl}_2$  a las concentraciones estudiadas no presentó influencia significativa sobre la producción de biomasa, conidios o su calidad de *Penicillium* sp. HC1, y, por lo tanto, se decide en ese punto continuar la investigación con el medio base sin modificaciones en la fuente de calcio.

Por otro lado, la influencia de los casaminoácidos fue positiva. La concentración de 13 g/L de casaminoácidos demostró mejorar la concentración de conidios y biomasa máxima, así como también la viabilidad y en algunos casos la tolerancia térmica en comparación con el medio base. Sin embargo, para fines de implementación en escala industrial, este compuesto representa altos costos, por lo que se decidió estudiar una alternativa, la cual era un suplemento alimenticio con aminoácidos de cadena ramificada a la que se llamó Aminoácidos de Prueba (AP). Estos últimos resultaron funcionar bien como reemplazo de los casaminoácidos, pues, también mejoraron la viabilidad y adicionalmente, la productividad de los conidios. A pesar de lo anterior, los AP no mostraron resultados favorables para la tolerancia térmica. Luego, la última medida estudiada fue la adición de un conjunto de vitaminas de las que se obtuvo un producto con un aumento en la tolerancia térmica del 64% con respecto al control.

Concretamente, en este capítulo se seleccionó el medio MBAP VIT, el medio base con la adición de aminoácidos de prueba a una concentración de 13 g/L y el set de vitaminas, para continuar con las pruebas en biorreactor del siguiente objetivo del trabajo investigativo. Este medio representa una mejoría en los conidios del 10%, en la viabilidad del 17% y en la tolerancia térmica del 62% en el producto final del biorreactor con respecto al control.

# **3. Capítulo 3. Efecto de la aireación sobre la producción y calidad de conidios y biomasa de *Penicillium* sp. HC1 en fermentación sumergida en tanque agitado**

## **3.1 Introducción**

La producción de bioinsumos a partir de inóculos de hongos filamentosos se hace más conveniente en fermentación sumergida debido a la facilidad de controlar la operación a gran escala (Durán Sequeda, 2017). A pesar de que la formación de conidios de estos organismos es difícil de lograr en fermentación líquida, es posible inducirla mediante la modificación de la composición del medio de cultivo y ajustando las condiciones de operación (Canteri & Ghoul, 2015). Cabe mencionar que estas condiciones y parámetros son específicos para cada especie y deben ser cuidadosamente determinadas para cada caso (Dietsch et al., 2021). El capítulo anterior profundizó en el efecto que tienen aditivos complejos como iones de calcio, casaminoácidos, aminoácidos ramificados, otros suplementos y vitaminas sobre la producción de *Penicillium* sp. HC1 en medio líquido. De ahí, se seleccionó el medio con los mejores resultados a nivel de Erlenmeyer para continuar con la evaluación de otros parámetros en biorreactor. Al escalar el proceso a un biorreactor, factores como la geometría del tanque, el sistema de agitación, la reología y el tipo de cultivo también afectan la formación de conidios (Canteri & Ghoul, 2015; Porto de Souza Vandenberghe et al., 2022). Es por esto, que las condiciones determinadas a nivel Erlenmeyer deben ser evaluadas y validadas en un biorreactor. En esta sección, se estudiarán los efectos que tiene un factor físico como la aireación en la producción del bioinsumo.

La aireación en los bioprocesos es un factor relevante que afecta el crecimiento celular y juega un papel crucial en los procesos de fermentación utilizados para producir bioinsumos (Porto de Souza Vandenberghe et al., 2022). Durante estos procesos, la adición de

oxígeno al medio de cultivo es esencial para mantener un ambiente propicio para el crecimiento y metabolismo de los microorganismos involucrados. La aireación adecuada proporciona el oxígeno necesario para las células y promueve la generación de productos deseados, como proteínas, enzimas o metabolitos (Maiorano et al., 2020). La aireación también influye en otros aspectos del bioproceso, como la agitación y la transferencia de calor. Una buena agitación y mezcla del medio de cultivo garantizan una distribución homogénea del oxígeno y nutrientes, permitiendo un crecimiento uniforme de las células (Zhou et al., 2018).

El monitoreo y control adecuados de los niveles de oxígeno, así como la cantidad y la tasa de aireación son factores críticos que deben controlarse cuidadosamente. Un suministro insuficiente de oxígeno puede limitar el crecimiento celular y afectar negativamente la productividad del bioproceso (Podrepšek et al., 2023). Por otro lado, una aireación excesiva puede generar estrés oxidativo en las células y afectar su viabilidad y rendimiento (Gomes et al., 2023). Una adecuada aireación permite controlar las condiciones de cultivo y optimizar la producción del bioinsumo deseado. Por lo tanto, encontrar un equilibrio óptimo en la aireación es fundamental en el diseño y operación de los sistemas de fermentación para maximizar la producción de bioinsumos de calidad.

En este capítulo, se explorará la influencia que tiene la tasa de aireación sobre la producción de *Penicillium* sp. HC1 en fermentación sumergida y en tanque agitado, con el propósito de brindar una comprensión más amplia del efecto que esta variable sobre la producción de conidios y biomasa para la mejora del diseño y operación de los sistemas de producción de bioinsumos.

## **3.2 Materiales y métodos**

### **3.2.1 Banco de trabajo**

El banco de trabajo utilizado es el mismo creado en el capítulo 2 a partir de la reactivación de *Penicillium* sp. HC1 en medio PDA a  $28 \pm 2$  °C durante 7 días, para luego obtener una suspensión conidial en Tween 80 al 0,1% (v/v) adicionada en solución salina al 0,85% (p/v) y ser conservado con glicerol al 20% (v/v). La suspensión conidial fue dividida de a 1 mL en microviales y congelada a -20°C. Este fue el banco secundario utilizado para los ensayos de la investigación.

### 3.2.2 Tren de inoculación

La producción de *Penicillium* sp. HC1 en biorreactor se llevó a cabo en un tren de inoculación que consta de tres fases: preinóculo, inóculo y fermentación.

- **Preinóculo**

Para la reactivación del microorganismo se tomó un vial del banco secundario, se sembró en medio PDA y se incubó a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  por 4 días. Pasado ese tiempo, se raspó la caja esporulada y se mezcló en Tween 80 al 0,1% (v/v) con 0,85% (p/v) de solución salina, esta suspensión conidial fue filtrada para eliminar fragmentos de micelio y ajustada a una concentración de  $10^8$  conidios/mL.

- **Inóculo**

El inóculo consistió en un Erlenmeyer de 500 mL en donde se prepararon 250 mL de medio de caldo de arroz (ver Anexo A) al cual se le adicionaron 15 mL de la suspensión conidial de concentración ajustada para mantener una relación del 6% del inóculo al volumen final de trabajo, junto con 100  $\mu\text{g/L}$  de cloranfenicol para controlar y reducir el riesgo de contaminación. Luego, se incubó a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , 300 rpm durante 2 días.

- **Fermentación**

La fermentación fue llevada a cabo en un biorreactor para producir 4 litros de *Penicillium* sp. HC1. El medio de cultivo para todos los ensayos de esta parte de la investigación fue MBAP VIT (ver Anexo A). El reactor se inoculó para mantener la relación del 6% y se hizo seguimiento durante 7 días, a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  y 300 rpm. El flujo de aire fue la variable estudiada.

### 3.2.3 Condiciones y medio de cultivo

El reactor utilizado tenía una capacidad total de 7 litros y dentro de él, se mantuvo un volumen final de trabajo de 4 litros. Se seleccionó el medio de cultivo a partir de los resultados del capítulo anterior. Este medio fue el MBAP VIT (ver Anexo A). Se realizó seguimiento de la fermentación durante 7 días y se mantuvo constante la temperatura a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  y la agitación en 300 rpm.

Los flujos de aire estudiados por triplicado fueron: 0,5 vvm, 1,5 vvm y 2,5 vvm.

### 3.2.4 Variables de respuesta

Las variables de respuesta fueron tomadas de la fermentación para todos los ensayos propuestos de la misma manera que en el capítulo 2. Éstas fueron: concentración de conidios (conidios/ml), biomasa (UFC/mL), viabilidad (% germinación), tolerancia al estrés térmico a 50°C (% germinación) y pureza (%).

### 3.2.5 Procesamiento de datos y análisis estadístico

Al igual que en el capítulo anterior, los indicadores fueron: conidios máximos (conidios/mL), productividad de conidios (conidios/mL/hora), biomasa máxima (UFC/mL) y productividad de biomasa (UFC/mL/hora).

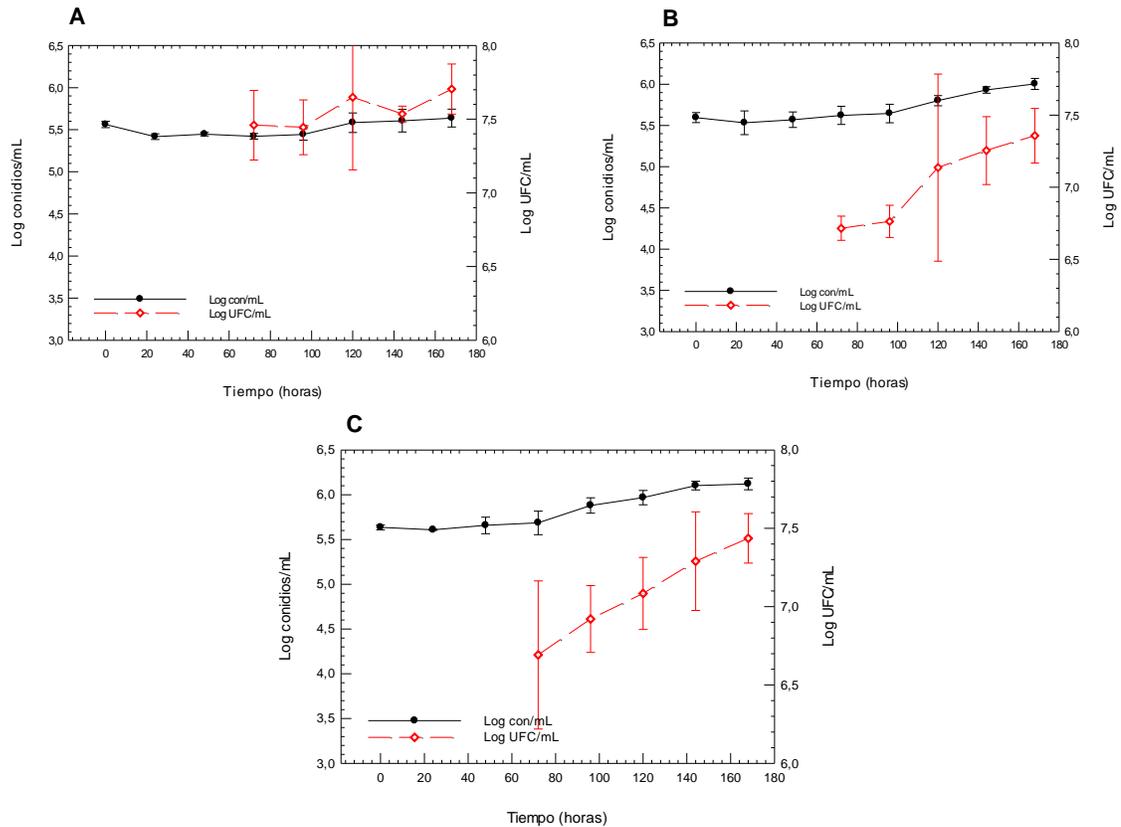
Se utilizó los programas SigmaPlot edición 15 y GraphPad Prism 8 para la construcción de las gráficas. El análisis estadístico estableció si existían diferencias entre los tratamientos en la evaluación de la relación de: viabilidad, tolerancia térmica, conidios máximos, productividad de conidios, biomasa máxima y productividad de biomasa. Se utilizó una prueba ANOVA de un factor seguida de una prueba Post-Hoc de Tukey para comparación de medias con un nivel de confianza del 95%, en el programa estadístico IBM SPSS Statistics ® 21.0.

## 3.3 Resultados y discusión

### 3.3.1 Evaluación del efecto de la aireación

La aireación desempeña un papel fundamental en los procesos de fermentación para la producción de bioinsumos. Una aireación adecuada garantiza una apropiada disponibilidad de oxígeno en el medio de cultivo, lo que promueve el crecimiento de los organismos de manera óptima (Gomes et al., 2023; Tlecuil-Beristain et al., 2010).

En esta etapa de la investigación se usó un biorreactor para la producción de 4 litros de *Penicillium* sp. HC1. En este equipo se estudiaron tres flujos de aire de los cuales se obtuvieron las cinéticas de la producción de conidios y biomasa que se muestran en la siguiente figura.

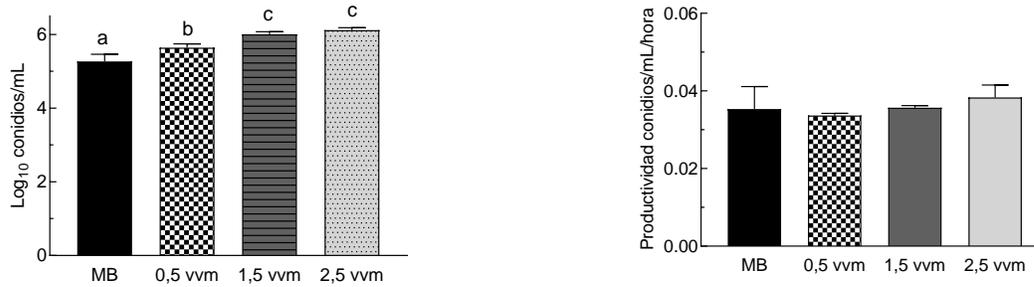


**Figura 3-1:** Cinética de la producción de conidios y biomasa de *Penicillium* sp. HC1 con diferentes flujos de aireación. (A) 0,5 vvm (B) 1,5 vvm (C) 2,5 vvm.

Tanto la producción de conidios como la de la biomasa en las fermentaciones con aireación son mayores comparadas con las producidas con el medio base (MB) (ver Figura 2-1).

**Efecto sobre la producción de conidios**

Los conidios máximos en cada fermentación fueron:  $\text{Log}_{10} 5,64 \pm 0,11$  conidios/mL para el ensayo con 0,5 vvm,  $\text{Log}_{10} 6,01 \pm 0,07$  conidios/mL para 1,5 vvm y  $\text{Log}_{10} 6,12 \pm 0,06$  conidios/mL cuando se usó 2,5 vvm. Todos superiores al  $\text{Log}_{10} 5,27 \pm 0,20$  conidios/mL del medio base (MB). La Figura 3-2 evidencia la mejoría en la producción de conidios para las fermentaciones con los mayores flujos de aire. No obstante, la productividad de conidios no presenta diferencia significativa entre los ensayos comparados, sin embargo, el mayor valor fue el de la condición 2,5 vvm con  $\text{Log}_{10} 0,038 \pm 0,003$  conidios/mL/hora.



**Figura 3-2:** Conidios máximos y productividad de conidios máximos (A) 0,5 vvm (B) 1,5 vvm (C) 2,5 vvm. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%).

Este efecto positivo sobre la producción de conidios de *Penicillium* sp. HC1 se deba probablemente al aumento en la disponibilidad de oxígeno causado por el incremento de la tasa de aire. En estos ensayos, utilizando el medio MBAP VIT, a 300 rpm y a 25°C, se puede destacar que, a mayor flujo de aire, mayor producción de conidios. La literatura respalda los resultados obtenidos, pues un aumento de oxígeno mediante flujos de aire permite niveles superiores de conidios de *M. anisopliae* sin alterar los parámetros de calidad (Tlecuítl-Beristain et al., 2010).

La aireación también contribuye a una mezcla homogénea del medio de fermentación. Junto con la agitación mecánica, la aireación evita la formación de zonas muertas o gradientes de nutrientes en el cultivo, lo que asegura una distribución uniforme de los nutrientes y una disponibilidad adecuada para el crecimiento de *Penicillium* spp (Harvey et al., 1998). Esto podría haber inducido a la generación de conidios al tener mejor distribuidos los nutrientes del medio. Por otra parte, *Penicillium* sp. HC1 como la mayoría de los hongos filamentosos, siempre buscaba adherirse a las superficies sólida y crecer, y en el caso del reactor se hizo más evidente el crecimiento en las paredes, el tubo de agitación y los baffles del reactor. Lo anterior pudo generar un aumento en la concentración de conidios en el medio líquido desde el aporte de la conidiación en las superficies sólidas y perturbar los resultados.

Es bueno recordar que, en medio sólido, las colonias de *Penicillium* sp HC1 crecen con tonalidades de amarillo a verde (ver Figura 1-1). Luego, es destacable que la coloración

del medio líquido inicialmente era blanca lechosa y con el paso de los días de la fermentación, se tornó amarilla – verdosa para el ensayo como mayor flujo de aire, lo que es equivalente a las tonalidades obtenidas en algunas de las pruebas con resultados positivos en Erlenmeyer. Esto podría servir como un bioindicador cualitativo posiblemente de esporulación. Por ejemplo, un estudio en 2017 examinó y evaluó una técnica colorimétrica usando espectrofotómetro UV-Vis que podría implementarse como sistemas de monitoreo continuo en tiempo real para medir el crecimiento de cultivos fúngicos en fermentación sumergida con presencia de partículas sólidas. Se sugirió que el color desarrollado durante el progreso de la fermentación está estrechamente relacionado con la producción de biomasa (Abdul Manan & Webb, 2018). Otra investigación, en la que estudiaban la producción de pigmentos naturales por *Penicillium brevicompactum*, mostró la asociación entre el momento determinado como punto de partida de consumo de lactosa y la aparición de color en el caldo de fermentación, lo que llevó a suponer que el uso de esta fuente de carbono por parte del hongo puede estar favoreciendo o activando rutas metabólicas secundarias y consecuentemente promoviendo la producción de pigmentos (Basto et al., 2022). Mas recientemente, en 2022, se hizo una comparación de la producción de pigmentos por cepas de hongos filamentosos bajo fermentación sumergida y de adhesión superficial, donde se encontró que pigmentos de colores amarillo y rojo producidas por especies de *Penicillium* y *Talaromyces* se asocian a la generación de micotoxinas, relacionadas con factores genéticos y ambientales (Rengifo et al., 2022). Aunque las investigaciones anteriores dan una pista para entender la relación de los cambios de color generados en el transcurso de la fermentación, se requiere mayor profundización para comprender si existe relación con el aumento de producción de conidios para el caso de *Penicillium* sp. HC1.

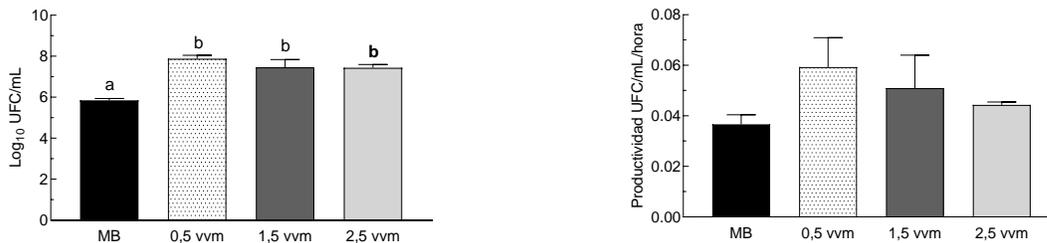
Estructuras vacuoladas se presenciaron para los medios con flujo de 0,5 vvm de aire. El organismo estaba en deficiencia de oxígeno. Contrario a lo visto, algunos autores reportan una morfología celular altamente vacuolada para la condición de aireación más alta que estudiaron (3,5 vvm), y, encontraron morfología celular altamente ramificada para flujos de 1,5 vvm de aire (Cho et al., 2002b). Se observaron tendencias similares en los procesos de fermentación de *Aspergillus niger*, *Actinomadura roseorufa*, y *Saccharopolyspora erythraea* (Berovič et al., 1991; Cho et al., 2002b; Warren et al., 1995). Esto reafirma que para cada organismo en específico existe una relación de flujo de aire óptima. Para el caso

de *Penicillium* sp. HC1 se recomiendan flujos de aire mayores a 1,5 vvm para mantener la integralidad celular.

### Efecto sobre el crecimiento

Se obtuvo el mejor resultado de biomasa máxima para el ensayo con menor flujo de aire, 0,5 vvm, con un valor de  $\text{Log}_{10} 7,88 \pm 0,17$  UFC/mL, seguido por el flujo de aire de 1,5 vvm con un valor de  $\text{Log}_{10} 7,47 \pm 0,37$  UFC/mL y luego el 2,5 vvm con  $\text{Log}_{10} 7,44 \pm 0,16$  UFC/mL. Todos estos resultados pertenecen al mismo grupo estadístico, y difieren en conjunto del medio base que tiene  $\text{Log}_{10} 5,84 \pm 0,09$  UFC/mL.

Como se ve en la parte derecha de la Figura 3-3, la fermentación utilizando 0,5 vvm presenta mayor productividad de biomasa con un valor de  $\text{Log}_{10} 0,059 \pm 0,011$  UFC/mL/hora. Sin embargo, la productividad de biomasa no tiene diferencias significativas entre las fermentaciones evaluada.



**Figura 3-3:** Biomasa máxima y productividad de biomasa máxima de *Penicillium* sp. HC1 con diferentes flujos de aireación (A) 0,5 vvm (B) 1,5 vvm (C) 2,5 vvm. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%).

Tan sólo con el uso del biorreactor en todos los ensayos se logró aumentar en un orden de magnitud la producción de biomasa. Esto podría relacionarse a que el medio establecido en Erlenmeyer fue validado y funciona bien para la generación de biomasa de *Penicillium* sp HC1 en escala de 4 litros.

La aireación está estrechamente relacionada con otros parámetros de fermentación, como la agitación, la temperatura, pH y la concentración de nutrientes (Albaek et al., 2011). Estos parámetros pueden interactuar entre sí y afectar conjuntamente el crecimiento y la producción de *Penicillium* spp. por lo que es importante optimizar y ajustar la aireación en

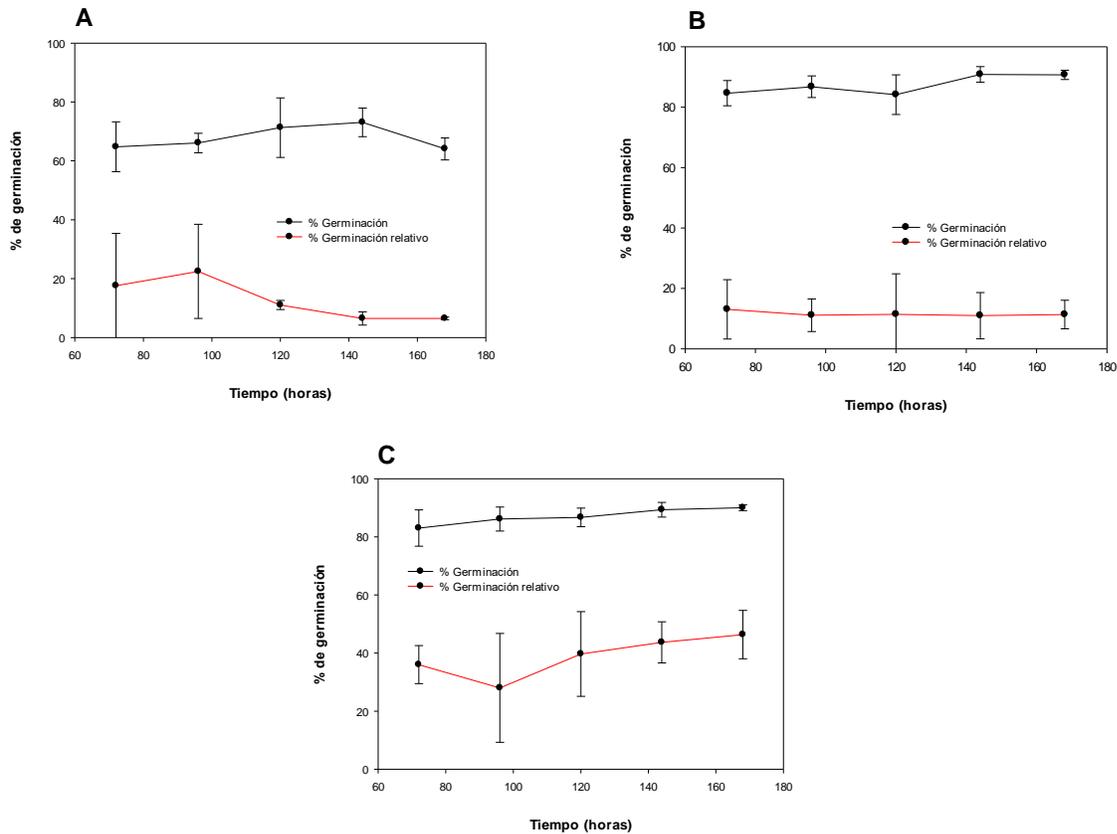
función de los otros parámetros de fermentación para lograr un rendimiento óptimo. Por ejemplo, las condiciones apropiadas de aireación se ven afectadas por los iones presentes en el medio, se ha encontrado que al aumentar la concentración de calcio disminuye la concentración de oxígeno y se requiere aumentar la agitación o aumentar el flujo de aire (Bockelmann et al., 1999).

Los flujos de aire ayudan a homogenizar el medio. La mezcla adecuada ayuda a prevenir la formación de agregados celulares como pellets y la sedimentación excesiva (García-Soto et al., 2006). Los hongos filamentosos pueden presentar dos tipos de crecimiento macroscópicos, el micelial y en pellets. Cuando se trata de la producción de bioinsumos, donde el microorganismo en sí es el producto final, es indeseable la formación de pellets y se prefiere un crecimiento homogéneo en un medio líquido que permita una fácil dispersión en el campo. Por lo anterior, autores como García (2004), determinaron que la morfología macroscópica se puede controlar por medio de condiciones hidrodinámicas determinadas, y que, una de las relaciones que interviene en la producción de pellets es la del factor de fricción y la velocidad de aire superficial, de allí, determinaron que a velocidades de aire superficial altas y factores de fricción bajos se evita la formación de pellets (Bird et al., 2002; García-Soto et al., 2006). En conexión con lo anteriormente expuesto, en ninguno de los ensayos en el biorreactor se generaron pellets, lo que es positivo pensando en el producto final.

El ensayo con el flujo de aire en 0,5 vvm mostró una disminución del pH en el monitoreo, iniciando con un valor de 6,0 y terminando al día 7 entre 4,5 y 4,8. La reducción en el pH pudo deberse a la acumulación de metabolitos ácidos. Según la literatura, el crecimiento vegetativo está asociado a pH bajos, mientras la producción de conidios generalmente está asociada a pH cercanos al neutro (Pirt & Callow, 1959). Esto tendría sentido para esta condición de 0,5 vvm que fue la que más biomasa produjo, pero también fue en la que menos conidios se obtuvieron dentro de los ensayos de aireación. Siguiendo el hilo anterior, la aireación adecuada puede ayudar a mantener el pH en un rango óptimo para el crecimiento y la actividad metabólica de *Penicillium spp* (Germec & Turhan, 2023). Esto es especialmente importante en cultivos de larga duración, donde la acumulación de metabolitos ácidos puede inhibir el crecimiento de las células (Germec & Turhan, 2023; Pirt & Callow, 1959; Singh et al., 2019).

### Efecto sobre la viabilidad y tolerancia térmica de los conidios a 50°C

La viabilidad mejoró notablemente para todas las fermentaciones producidas en el biorreactor. Aunque, respecto a la tolerancia térmica, sólo la fermentación a 2,5 vvm de aireación obtuvo resultados positivos.



**Figura 3-4:** Cinética viabilidad y tolerancia térmica de *Penicillium* sp. HC1 con diferentes flujos de aireación. (A) 0,5 vvm (B) 1,5 vvm (C) 2,5 vvm.

En la Figura 3-4 se puede observar que tanto la cinética de la viabilidad como la de la tolerancia mantienen una tendencia lineal y ligeramente creciente, exceptuando la tolerancia térmica de 0,5 vvm, la cual, a partir del día 5 presenta una disminución. Con ayuda de la Figura 3-5, se exhibe que la fermentación que genera las mejores condiciones de germinación y germinación relativa al día 7 es la de 2,5 vvm.

En concreto, para la viabilidad, los datos obtenidos fueron:  $64,07 \pm 3,73\%$  de germinación para 0,5 vvm,  $90,67 \pm 1,53\%$  de germinación para 1,5 vvm y  $90,00 \pm 1\%$  de germinación para

2,5 vvm. Los valores anteriores estuvieron muy por encima del medio base (MB), el cual vale la pena recordar que fue de  $51 \pm 2\%$  de germinación.

En lo que concierne a la tolerancia térmica se obtuvo:  $6,49 \pm 0,47\%$  de germinación relativa para 0,5 vvm,  $11,33 \pm 4,73\%$  de germinación relativa para 1,5 vvm y, finalmente,  $46,33 \pm 8,33\%$  de germinación relativa para la condición de 2,5 vvm. Como ya se mencionó, el flujo de aire con 2,5 vvm fue el único que mejoró la tolerancia térmica de *Penicillium* sp. HC1, en contraste con el punto de referencia del medio base (MB) que fue de  $30 \pm 3\%$  de germinación relativa.



**Figura 3-5:** Viabilidad y tolerancia térmica – Día 7 de *Penicillium* sp. HC1 con diferentes flujos de aireación (A) 0,5 vvm (B) 1,5 vvm (C) 2,5 vvm. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%).

Durante la fermentación sumergida, las células fúngicas requieren oxígeno para mantener sus procesos metabólicos y su integridad estructural (Issaly et al., 2005; Mukherjee & Ghorai, 2023). La falta de aireación suficiente puede llevar a la acumulación de toxinas metabólicas y productos de desecho, lo que afecta negativamente la viabilidad celular. La aireación óptima asegura una mayor supervivencia de las células y una mejor productividad del proceso (Albaek et al., 2011). Estas afirmaciones son congruentes con lo encontrado en esta investigación. A la condición de 0,5 vvm de aireación se disminuye el pH, lo cual estuvo asociado a la acumulación de metabolitos ácidos, además de la identificación morfológica de estructuras vacuoladas, sumado a esto, la inestabilidad del organismo a esta condición también se ve reflejada en los bajos porcentajes de germinación tanto para la viabilidad, como en la tolerancia térmica. Ahora bien, es congruente que la cinética de la tolerancia térmica disminuya para este caso entre el día 4

y 5 de la fermentación (ver Figura 3-4). El sistema a una aireación de 0,5 vvm no es sostenible. En cambio, una aireación de 2,5 vvm, además de mejorar la producción de conidios y biomasa como ya se vio anteriormente, garantizan la viabilidad y tolerancia al estrés térmico del inóculo. Mejorar la tolerancia significa también aumentar el número de conidios viables y, por lo tanto, mejorar la calidad del producto.

El resumen de los datos máximos alcanzados para cada ensayo de este capítulo se presenta en la Tabla 3-1. De esta manera, se puede evidenciar la mejora conseguida del producto final.

**Tabla 3-1.** Resumen de los máximos resultados obtenidos por cada ensayo en el biorreactor

Ensayo	Nombre del ensayo	Conidios [Log <sub>10</sub> conidios/mL]	Biomasa [Log <sub>10</sub> UFC/mL]	Viabilidad (%)	Tolerancia térmica (%)
Medio Base	<b>MB</b>	5,27±0,20	5,84±0,09	51±2	30±3
Evaluación	<b>0,5 vvm</b>	5,64±0,11	7,88±0,17	64,07±3,73	6,49±0,47
efecto de la	<b>1,5 vvm</b>	6,01±0,07	7,47±0,37	90,67±1,53	11,33±4,73
aireación	<b>2,5 vvm</b>	6,12±0,06	7,44±0,16	90,00±1	46,33±8,33

En consecuencia, el producto de la fermentación de *Penicillium* sp. HC1 en el biorreactor de 4 litros a 2,5 vvm fue el seleccionado para ser llevado a los ensayos de degradación de la siguiente etapa de la investigación

### 3.4 Conclusiones

Los datos revelaron que el medio MBAP VIT establecido en Erlenmeyer fue validado y funciona bien para la generación de *Penicillium* sp. HC1 en biorreactor para la producción de 4 litros.

La producción de conidios y biomasa en todos los ensayos para evaluar la aireación dieron resultados mayores comparados con los obtenidos con el medio base (MB). No se recomienda para este sistema flujos de aire menores a 0,5 vvm ya que no garantizan estabilidad e integralidad estructural del organismo. La condición a 2,5 vvm mejoró la viabilidad a un valor mayor al 90% y también la tolerancia térmica de los conidios de *Penicillium* sp. HC1.

Vale recordar que los datos del medio de control (MB) son: conidios máximos =  $\text{Log}_{10}$  5,27±0,20 conidios/mL, biomasa máxima =  $\text{Log}_{10}$  5,84±0,09 UFC/mL, viabilidad = 51±2% y tolerancia térmica = 30±3%. Mientras que, los resultados conseguidos con la condición de 2,5 vvm fueron: conidios máximos =  $\text{Log}_{10}$  6,12±0,06 conidios/mL, biomasa máxima =  $\text{Log}_{10}$  7,44±0,16 UFC/mL, viabilidad = 90,00±1% y tolerancia térmica = 46,33±8,33%. Esto representa una mejoría en los conidios del 16%, en la biomasa del 27%, en la viabilidad del 76% y en la tolerancia térmica del 54% en el producto final del biorreactor con respecto al control.

En resumen, el producto de la fermentación del biorreactor para 4 litros de *Penicillium* sp. HC1 con una tasa de aireación de 2,5 vvm fue el seleccionado para continuar con los ensayos sobre la degradación de un material vegetal en el siguiente objetivo.



# 4. Capítulo 4. Evaluación de la degradación de residuos vegetales de cultivos de flores por *Penicillium* sp. HC1

## 4.1 Introducción

Las vastas y coloridas extensiones de cultivos de flores en Colombia, especialmente en la región de Cundinamarca, no solo pintan invernaderos, sino que también desempeñan un papel crucial en la economía y la identidad cultural, posicionando a este país sudamericano como un gigante en la industria floral a nivel mundial (Santos Ríos, 2021). Sin embargo, este próspero sector floricultor también enfrenta desafíos ambientales, siendo la generación de residuos una preocupación constante. El sector genera grandes cantidades de residuos vegetales, como tallos, hojas y flores no comercializables (Minagricultura, 2020). Para entrar en contexto, la producción de desechos de clavel al mes por cada hectárea llega a los 1500 kg aproximadamente, de estos, el 10% es utilizado en compostaje, y el 90% restante es utilizado clandestinamente en la alimentación animal, lo cual ha sido cuestionable por magnificar los plaguicidas en la cadena trófica (Barriga, 2007; Roberto-López, 2013). Luego, la búsqueda de soluciones sostenibles y eficientes para la degradación de los residuos vegetales se ha convertido en un objetivo importante para la industria floricultora.

En los últimos años, se ha prestado especial atención al uso de bioinsumos agrícolas para el manejo de residuos vegetales. Los bioinsumos son productos derivados de fuentes naturales que promueven la salud de los suelos y mejoran la productividad agrícola (Asadollahzadeh et al., 2023; de Carvalho, 2016). Uno de estos bioinsumos fue desarrollado por el convenio entre la empresa Biocultivos S.A y el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia a partir de *Penicillium* sp. HC1, con el fin de promover la aceleración de la degradación de residuos vegetales *in situ*. Actualmente este producto es usado con más frecuencia para degradar tamo de arroz, caña y otro tipo de

cultivos semestrales, por lo que existe más respaldo investigativo para estos sustratos, pero se puede ampliar su repertorio de uso en otros sectores agroindustriales como el floricultor, validando la capacidad degradadora de *Penicillium* sp. HC1.

La evaluación de la degradación de residuos vegetales mediante el uso de *Penicillium* sp. HC1 implica el estudio de diversos parámetros. Se pueden medir aspectos como la tasa de descomposición de la materia vegetal, los cambios en la composición química de los residuos, la actividad enzimática y la liberación de nutrientes esenciales (de Castro Coêlho et al., 2021). Estos datos proporcionan información crucial sobre la eficacia de los bioinsumos en la degradación de los residuos vegetales y su potencial para mejorar la calidad del suelo. Ahora bien, en el contexto de la floricultura, se requiere una evaluación científica rigurosa para comprender completamente los beneficios y limitaciones de esta tecnología y su viabilidad a gran escala.

Por otra parte, *Pleurotus ostreatus* es un hongo descomponedor del grupo de la podredumbre blanca (HPB), es saprófito o parásito débil. Puede descomponer eficientemente materiales lignocelulósicos sin químicos o pretratamientos adicionales, porque posee un sistema enzimático complejo que incluye enzimas ligninolíticas y celulolíticas en menor grado (Pitt & Hocking, 2009). Se puede destacar que los HPB a pesar de tener la capacidad de degradar los componentes de la lignocelulosa, presentan largos tiempos de crecimiento, y, en consecuencia, el uso de cultivos mixtos es una alternativa implementada para la degradación rápida de residuos vegetales junto con el uso de hongos filamentosos de rápido crecimiento los cuales son productores de estructuras de propagación, entre ellas el género *Penicillium*.

Por lo tanto, en este capítulo se explorará el efecto que tiene usar *Penicillium* sp HC1, producto de la fermentación a las condiciones detalladas en los capítulos anteriores, en monocultivo y co-cultivo con *Pleurotus ostreatus* T1.1, sobre la degradación de residuos vegetales de flores de un cultivo de clavel de Guasca – Cundinamarca, con la finalidad de ampliar el abordaje del manejo sostenible de los residuos agrícolas mediante el uso de bioinsumos.

## 4.2 Materiales y métodos

### 4.2.1 Medios de crecimiento y microorganismos

El diseño experimental de este capítulo se realizó teniendo en cuenta la presencia de *Pleurotus ostreatus* T1.1 (en este capítulo se abreviará como T1.1) debido a que este organismo es utilizado en conjunto con *Penicillium* sp HC1 (en este capítulo se abreviará como HC1) en los procesos de degradación (Pedraza-Zapata et al., 2017). Se sabe que T1.1 presenta una buena actividad ligninolítica (Pedraza-Zapata et al., 2017; Vargas Rodríguez & Romero Gutiérrez, 2009), mientras que HC1 ha demostrado tener una buena actividad celulolítica y xilanolítica (Gutiérrez Rojas, 2017). En conjunto, estos microorganismos han demostrado que son capaces de descomponer las estructuras complejas de la matriz vegetal mediante la bioaugmentación de la cinética de degradación de compuestos recalcitrantes como la lignina, la celulosa y la hemicelulosa.

#### Medio sólido

Para obtener *Penicillium* sp. HC1, se tomó un vial del banco de trabajo y se reactivó en PDA. Luego, se incubó a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 7 días. Cuando se tuvo la caja de Petri completamente esporulada, se hizo un raspado y se disolvió en una solución salina al 0,85% (p/v) adicionada de Tween 80 al 0,1% (v/v), la cual fue ajustada para obtener una concentración de  $1\times 10^6$  esporas/mL. Con algodón estéril se filtró para eliminar los fragmentos de micelio. HC1 producido en medio sólido se usó como control.

Para obtener *Pleurotus ostreatus* T1.1, se tomó una fracción de la cepa conservada a  $4^{\circ}\text{C}$  en agar del banco de cepas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional, se sembró en cajas de Petri con agar salvado de trigo (ver composición en el Anexo A) y se incubó a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 15 días. Cuando se tiene la caja bien crecida se raspa y se hace licua en una solución salina al 0,85% (p/v) adicionada de Tween 80 al 0,1% (v/v) para obtener una solución homogénea a una concentración  $1\times 10^6$  UFC/mL.

#### Medio líquido

Se utilizó el producto de la fermentación sumergida de *Penicillium* sp. HC1 en el medio MBAP VIT, que se mantuvo a  $28^{\circ}\text{C}$ , 300 rpm y 2,5 vvm en biorreactor. Este es el producto obtenido en el capítulo 3 que logró una concentración de  $1\times 10^6$  esporas/mL.

### 4.2.2 Montaje de microcosmos

Se emplearon frascos de vidrio de 600 mL previamente esterilizados y dentro de cada uno de ellos se depositaron 60 g de los residuos de clavel como sustrato (brindados por la empresa Siecha Flowers S.A), principalmente tallos y hojas cortadas en fragmentos de 2-3 cm. Se adicionaron 15 mL de solución de sales (Anexo A) y 10 mL del microorganismo a evaluar. En los ensayos que mezclan los dos microorganismos, se empleó un inóculo de 5 mL de *Pleurotus ostreatus* T1.1 a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL, más, 5 mL de *Penicillium* sp. HC1 a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/mL. Se utilizó un control sin inoculación. En cada uno de los frascos se introdujeron trampas con 10 mL NaOH 0,3 N. Estos montajes se llevaron a incubar a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  y se dejaron en proceso de degradación durante 42 días (5 semanas). En el montaje se utilizaron los frascos suficientes para que cada semana pudiera haber pruebas de destrucción. Por cada tratamiento se hicieron 3 réplicas.

A los montajes de microcosmos se les hizo seguimiento de producción de  $\text{CO}_2$ , de actividad enzimática por semana con muestras destructivas, y, se caracterizó en su contenido de lignina y celulosa al finalizar los tratamientos.

### 4.2.3 Montaje en campo

La empresa Siecha Flowers S.A ubicada en el municipio de Guasca Cundinamarca prestó sus instalaciones para proponer un sistema de tratamiento de sus residuos de clavel. Se utilizaron 4 contenedores subdivididos en 3 secciones cada uno. Por cada contenedor se llevó a cabo un tratamiento con sus respectivas réplicas. Dentro de ellos, se tomaron 500 gramos de residuos de clavel cortado en fragmentos de 2 a 3 centímetros. Se adicionaron 125 mL de solución de sales (ver Anexo A) y 83 mL de inóculo por cada tratamiento. Se dejaron en degradación durante 5 semanas.

A los ensayos en campo se les hizo la caracterización de su contenido en lignina y celulosa después de los tratamientos. No se les hizo seguimiento de producción de  $\text{CO}_2$ , ni de actividad enzimática.

El resumen de los montajes se presenta en la Tabla 4-1. El denominado microcosmos 1 es el que utilizó HC1 proveniente del medio sólido PDA y por tanto sirvió de control,

mientras que, el microcosmos 2 y el experimento en campo utilizó HC1 crecido en medio líquido, producto del biorreactor.

**Tabla 4-1.** Resumen de los montajes para la evaluación de la degradación de residuos de clavel

Montaje	Tratamiento	Inóculo	
		HC1	T1.1
<b>Microcosmos 1</b> (HC1 de medio PDA)	1	+	-
	2	+	+
	3	-	+
	4	-	-
<b>Microcosmos 2</b> (HC1 de producto del biorreactor Cap. 3)	5	+	-
	6	+	+
	7	-	+
	8	-	-
<b>Campo</b> (HC1 de producto del biorreactor Cap. 3)	9	+	-
	10	+	+
	11	-	+
	12	-	-

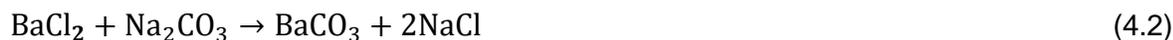
Es importante aclarar que no se realizó esterilización o algún tipo de tratamiento de inocuidad del material vegetal de clavel en ninguno de los montajes, lo cual permitió tener una aproximación del comportamiento de los aislamientos frente a las condiciones adversas que se presentan normalmente en la degradación en campo.

#### 4.2.4 Evaluación de la producción de CO<sub>2</sub>

Para el caso de los montajes en microcosmos se realizó la evaluación de la producción de CO<sub>2</sub> mediante respirometría. Se tomó el vial con la muestra de NaOH dentro de cada frasco del microcosmos para su titulación, y se reemplazó con un nuevo vial estéril con NaOH el cual fue ubicado nuevamente en la parte central del frasco. Se cambiaron las soluciones de hidróxido de sodio a los 7, 14, 21, 35 y 42 días.

La titulación se lleva a cabo con HCl 0,2 N, para esto, se agregó 0,1 mL de fenolftaleína como indicador de pH y 1 mL de BaCl<sub>2</sub> 0,05 M el cuál precipitó el carbono inorgánico como

BaCO<sub>3</sub> (Ecuación 4.2. Reacción cloruro de bario con carbonato de sodio). El resultado obtenido es el NaOH remanente que reacciona con HCl (Ecuación 4.3. Reacción Hidróxido de sodio con ácido clorhídrico).



Los gramos de CO<sub>2</sub> producidos en los viales se determinaron a partir de los gramos de NaOH que reaccionaron con éste (Ecuación 4.1. Reacción Dióxido de carbono con Hidróxido de sodio). Para conocer este valor, se hallaron las moles de HCl que reaccionaron con el NaOH (con base a los mL HCl gastados en la titulación (Ecuación 4.3) y a partir de esto se determinaron los gramos de NaOH que no reaccionaron con el CO<sub>2</sub>. Es decir, los gramos de NaOH que reaccionaron con el CO<sub>2</sub> corresponden a la diferencia entre los gramos iniciales (que se colocaron en el vial) y los gramos finales (que reaccionaron con HCl). Se utilizó la Ecuación 4.4 para determinar los mg de CO<sub>2</sub> producidos por gramo de residuo de clavel. En esta ecuación PM<sub>CO<sub>2</sub></sub> es el peso molecular del CO<sub>2</sub> y PM<sub>NaOH</sub> corresponde al peso molecular del NaOH.

$$\frac{\text{mgCO}_2}{\text{g residuos}} = (\text{g NaOH}_{\text{iniciales}} - \text{g NaOH}_{\text{reacción}}) \times \frac{\text{PM CO}_2}{\text{PM NaOH} \times 2} \times 1000 \times \frac{1}{\text{g residuos}} \quad (4.4)$$

La actividad biológica de degradación es proporcional al CO<sub>2</sub> producido por los microorganismos que ejercen la degradación.

#### 4.2.5 Obtención de extractos enzimáticos

Para la obtención de extractos enzimáticos se adicionaron 45 mL de buffer acetato (pH 5) a 5 gramos de material vegetal en proceso de degradación. Luego, se agitaron durante 5 horas. Se recuperaron 40 mL de suspensión, y se centrifugaron a 6.000 rpm por 20 minutos. El extracto enzimático corresponde al sobrenadante. Estos extractos fueron obtenidos de los montajes de microcosmos a partir de la semana 2 del inicio de la degradación, hasta la semana 5.

## 4.2.6 Determinación de actividades enzimáticas

Todas las actividades enzimáticas fueron determinadas espectrofotométricamente a partir de los extractos obtenidos anteriormente.

### ▪ **Actividad celulasa**

La actividad CMCasa (EC 3.2.1.4) fue monitoreada a 595 nm y se midió usando como sustrato carboximetilcelulosa (CMC) de baja viscosidad. La mezcla estaba compuesta de 1 mL de sustrato 1% (p/v) en solución buffer citrato de sodio 50 mM (pH 5,0) y 1 mL de muestra. La reacción fue incubada a  $28\pm 2^\circ\text{C}$  durante 3 horas y luego se llevó a baño maría a  $90\pm 2^\circ\text{C}$  por 15 minutos, luego, se dejó 5 minutos en hielo para detener la reacción. Se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue analizado por el método de Somogy-Nelson (Somogy, 1952) para determinar la concentración de azúcares reductores liberados luego de la reacción. El blanco estaba compuesto de 1 mL de buffer citrato de sodio 50 mM (pH 5,0). Una unidad de CMCasa se definió como la cantidad de enzima capaz de liberar  $1\ \mu\text{mol}$  de azúcares reductores equivalentes a glucosa por minuto.

### ▪ **Actividad lacasa**

La actividad de la lacasa (EC 1.10.3.2) se midió monitoreando el cambio en la absorbancia a 436 nm ( $436=29300\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ ) debido a la oxidación de ABTS [ácido 2,2' azino-bis-(3 etil benzotiazoline sulfato)] en solución buffer de acetato de sodio 60 mM (pH 4,5). El ensayo se realizó mezclando 100  $\mu\text{L}$  de buffer, 100  $\mu\text{L}$  de ABTS 0,5 mM y 800  $\mu\text{L}$  de muestra a temperatura ambiente. La formación de un radical verde se siguió espectrofotométricamente durante 3 minutos. El blanco estaba compuesto de 900  $\mu\text{L}$  de buffer y 100  $\mu\text{L}$  de ABTS 0.5 mM. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que permite la oxidación de 1  $\mu\text{mol}$  de ABTS por minuto (Tinoco et al., 2001).

### ▪ **Actividad manganeso peroxidasa (MnP)**

La actividad manganeso peroxidasa (EC 1.11.1.13), fue monitoreada por la oxidación de 2,6 dimetoxifenol a 468 nm ( $468=49600\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ ). La mezcla contenía 450  $\mu\text{L}$  de extracto enzimático, 500  $\mu\text{L}$  de DMP 10 mM en solución buffer de acetato de sodio 100 mM (pH 5), 50  $\mu\text{L}$  de sulfato de manganeso 0,4 mM y 30  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno 22 mM. La oxidación se siguió espectrofotométricamente durante 3 minutos. Debido a que la lacasa y la manganeso peroxidasa pueden oxidar el DMP, la actividad lacasa se restó de este experimento, realizando la misma mezcla pero en ausencia de peróxido de hidrógeno y de

manganeso. El blanco estaba compuesto de 450  $\mu\text{L}$  de buffer, 50  $\mu\text{L}$  de sulfato de manganeso, 30  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrógeno y 500  $\mu\text{L}$  de DMP. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que permite la oxidación de 1  $\mu\text{mol}$  de 2,6 dimetoxifenol por minuto (Santoyo et al., 2008).

#### 4.2.7 Caracterización de los residuos vegetales

Los residuos de clavel fueron caracterizados al inicio y al final del proceso de degradación (pasados 42 días) para todos los tratamientos. Se remitieron todas las muestras al Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia y allí fue donde se realizaron los ensayos de determinación de fibra en detergente ácido (FDA) y de determinación de lignina según la metodología de (Van Soest et al., 1991), con la finalidad de reportar el contenido de celulosa y lignina para cada muestra.

El grado de deslignificación se calculó de acuerdo con la ecuación 4.5, y el porcentaje de celulosa hidrolizado, de acuerdo con la ecuación 4.6. Los términos inicial y final corresponden a los contenidos antes y después del proceso de degradación del residuo de clavel con cada tratamiento.

$$\text{Grado de deslignificación (\%)} = \frac{(\text{lignina inicial} - \text{lignina final})}{\text{lignina inicial}} * 100 \quad (4.5)$$

$$\text{Celulosa hidrolizada (\%)} = \frac{(\text{celulosa inicial} - \text{celulosa final})}{\text{celulosa inicial}} * 100 \quad (4.6)$$

#### 4.2.8 Procesamiento de datos y análisis estadístico

Los resultados reportados fueron: celulosa (U/L), lacasa (U/L), manganeso peroxidasa (U/L), producción de  $\text{CO}_2$  (mg de  $\text{CO}_2$  / g de residuos de clavel) y productividad de  $\text{CO}_2$  (mg de  $\text{CO}_2$  / g de residuos de clavel / día).

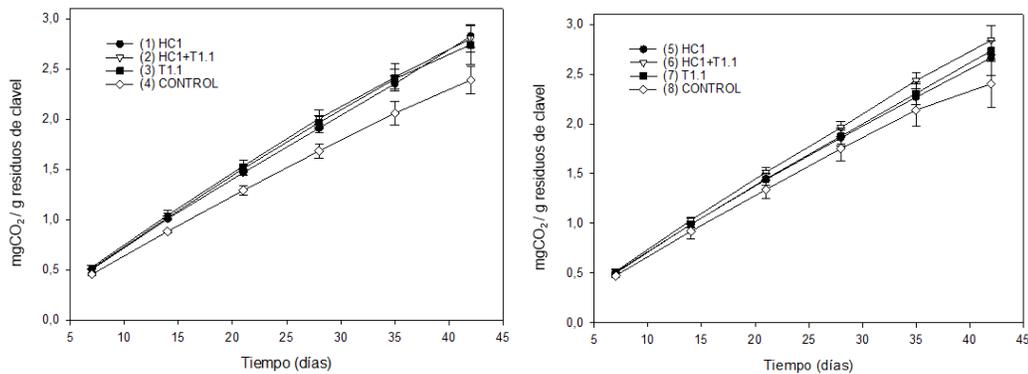
Se utilizaron los programas SigmaPlot edición 15 y GraphPad Prism 8 para la construcción de las gráficas. El análisis estadístico estableció si existían diferencias entre los tratamientos. Se utilizó una prueba ANOVA de un factor seguida de una prueba Post-Hoc de Tukey para comparación de medias con un nivel de confianza del 95%, en el programa estadístico IBM SPSS Statistics © 21.0.

## 4.3 Resultados y discusión

### 4.3.1 Evaluación del crecimiento microbiano mediante el seguimiento a la producción de CO<sub>2</sub>

La técnica de respirometría proporciona datos sobre la actividad microbiana en el sustrato. Haciendo seguimiento a la producción de CO<sub>2</sub> se puede tener una visión global de la actividad metabólica que está sucediendo dentro del microcosmos.

Como se observa en la Figura 4-1, la producción de CO<sub>2</sub> para todos los tratamientos estuvo en el rango de 0,5 a 3 mg CO<sub>2</sub>/g de residuos de clavel durante los 42 días de evaluación.



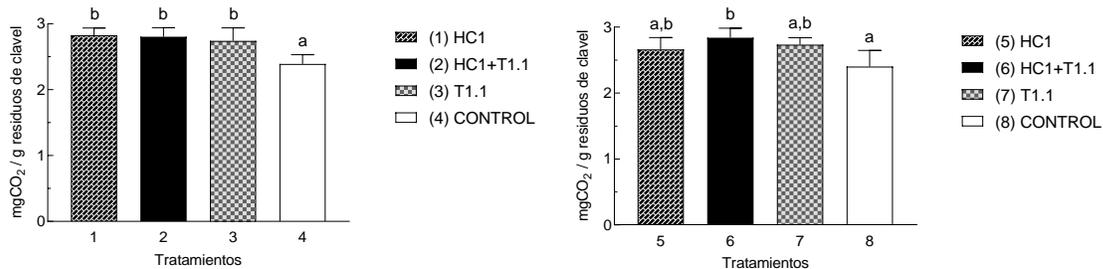
**Figura 4-1.** Cinéticas mg CO<sub>2</sub> / g residuos de clavel para microcosmos 1 y 2.

La tendencia en la producción de CO<sub>2</sub> es lineal y creciente para todos los casos. Parece ser que la producción de CO<sub>2</sub> continuará aumentando, ya que no se observó una fase de disminución de la producción de CO<sub>2</sub> en este tiempo, lo cual podría sugerir que la degradación completa de los residuos de clavel requiere más tiempo.

A grandes rasgos, se puede evidenciar que la producción de CO<sub>2</sub> en los controles sin inocular es menor comparada con los tratamientos. Estos controles presentan una producción constante de CO<sub>2</sub> la cual es consecuencia de la degradación de los microorganismos que ya venían incorporados en los residuos de clavel. Es probable que el haber fragmentado los residuos de clavel, aumentara la superficie expuesta facilitando el ataque por parte de los microorganismos e influyera en la velocidad del proceso. Se ha reportado que encontrar el tamaño óptimo de partícula puede llegar a duplicar la eficiencia

en la degradación (Nugrahini et al., 2022; Sánchez, 2009). Por lo que, a condiciones en campo donde no se corte el material, podría presentar menores rendimientos.

Otra característica para resaltar es que en los ensayos del microcosmos 2 (con HC1 líquido, producto del biorreactor), la producción de  $\text{CO}_2$  es ligeramente menor comparada con los tratamientos del microcosmos 1 de control (con HC1 de medio sólido). Esto era de esperarse, pues los conidios provenientes de medio sólido presentan mayor viabilidad con respecto a los producidos en medio líquido como se vio en los capítulos anteriores. Además, se puede ver que los máximos valores se obtienen al día 42, por lo que la Figura 4-2 permite visualizar si existió diferencia significativa entre tratamientos al finalizar el ensayo.



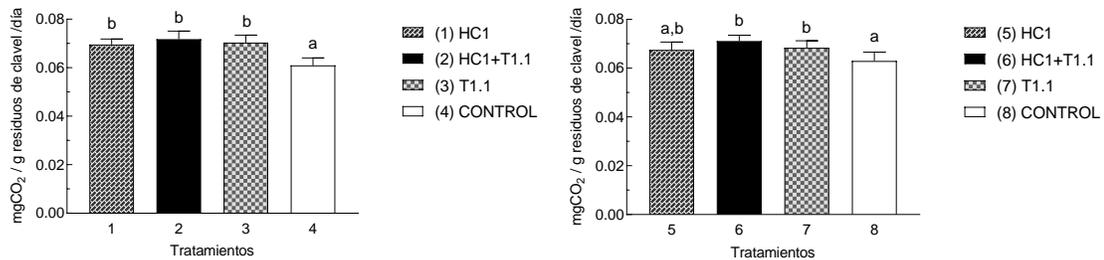
**Figura 4-2.** Producción de  $\text{mg CO}_2 / \text{g}$  residuos de clavel al día 42. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%).

Los resultados muestran que pesar de que el microcosmos 1 presenta mejores resultados, el microcosmos 2 se destaca por tener el mayor resultado con el uso del co-cultivo entre HC1 proveniente del biorreactor y T1.1 (tratamiento 6) obteniendo un valor de  $2,83 \pm 0,14 \text{ mg CO}_2 / \text{g}$  de residuos de clavel. La producción de  $\text{CO}_2$  para ambos montajes aumentó en un 17% con respecto al control sin inocular ( $2,40 \pm 0,24 \text{ mg CO}_2 / \text{g}$  de residuos de clavel). Esto tiene soporte literario al encontrarse que, un consorcio fúngico lignocelulolítico compatible se asocia frecuentemente con un mayor crecimiento colectivo y, por tanto, una mejor degradación del sustrato en comparación con la obtenida para cada hongo por separado (Xu & Hosen, 2010). Por otra parte, es un hecho conocido que una selección adecuada de las fuentes y la relación C/N promueven una buena actividad metabólica, además que la presencia de metabolitos como lípidos, vitaminas, aminoácidos y ácidos orgánicos estimulan el crecimiento microbiano (H. Chen, 2013; Sánchez, 2009). Lo que se

mencionó previamente podría estar relacionado con el aporte del medio líquido MBAP, al ser agregado al microcosmos y por esta razón, en esta evaluación se obtuvieron mejores resultados en el consorcio cuando se utilizó HC1 producto del reactor. Esto encuentra apoyo en el trabajo realizado por Castillo López y Domínguez Ordóñez (2019), donde destacan que la disponibilidad de carbohidratos, de proteínas degradables y el pH son factores que afectan el crecimiento microbiano en procesos de degradación vegetal.

En estudios de degradación del tamo de arroz utilizando los mismos microorganismos, se encontró que la menor producción de CO<sub>2</sub> la obtuvieron con el tratamiento de HC1 con un valor de 30,34±0,94 mg CO<sub>2</sub> / g tamo después de 47 días de degradación, en comparación con el tratamiento donde usaron T1.1, el cual tuvo una producción de 68,76±3,73 mg CO<sub>2</sub> / g de tamo de arroz. Contrario a lo que esperaban, el co-cultivo no les representó un aumento en la producción de CO<sub>2</sub>, sino que, se mantuvo similar al tratamiento con T1.1, con un valor de 65,81±3,37 mg CO<sub>2</sub> / g tamo de arroz (Pedraza-Zapata et al., 2017). Estos datos revelan que, primero, los valores de producción de CO<sub>2</sub> utilizando residuos de clavel fueron inferiores a los sistemas con tamo de arroz, y segundo, que el comportamiento es similar, obteniendo valores cercanos entre el tratamiento con T1.1 y el co-cultivo.

Por otro lado, se comparó la productividad de CO<sub>2</sub> (ver Figura 4-3). Los resultados reflejan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.



**Figura 4-3.** Productividad de mg CO<sub>2</sub> / g residuos de clavel en los microcosmos 1 y 2. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%).

El mejor resultado para los dos montajes se relacionó con los consorcios obteniendo valores de 0,071±0,003 mg CO<sub>2</sub> / g residuos de clavel / día y de 0,071±0,002 mg CO<sub>2</sub> / g

residuos de clavel / día para los tratamientos 2 y 6 respectivamente. La productividad para el microcosmos 1 se mejoró un 17% con respecto al control del tratamiento 4. Mientras que, la productividad para el microcosmos 2 aumentó un 13% con respecto al control del tratamiento 8. Sin embargo, los resultados también indican que no es muy diferente utilizar el consorcio, a utilizar sólo T1.1. Esto se puede relacionar nuevamente con los resultados obtenidos en el estudio de Pedraza y colaboradores en 2017, donde el co-cultivo de HC1 y T1.1 tuvieron valores cercanos, mientras que la tasa de producción de CO<sub>2</sub> más baja la obtuvieron con HC1 (0,72±0,09 mg CO<sub>2</sub> / g tamo de arroz / día).

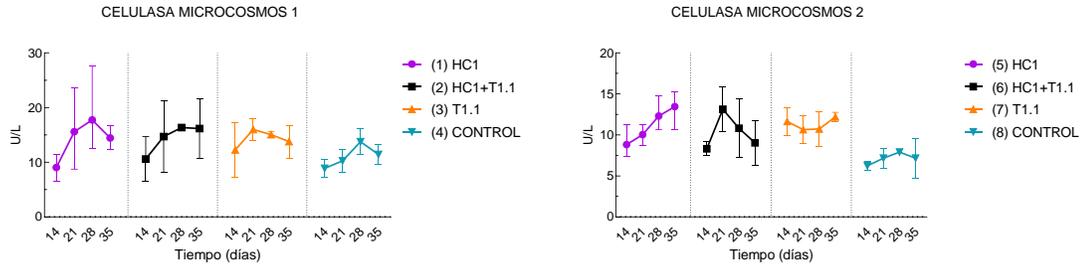
En síntesis, tanto los co-cultivos como los tratamientos que tenían únicamente T1.1 tienen la mayor producción y productividad de CO<sub>2</sub> lo que se traduciría en un mayor crecimiento microbiano. Se espera entonces, que estos ensayos sean los que presenten mayor actividad enzimática y presuntamente mejor capacidad degradadora de residuos de clavel, esperando que destaque el tratamiento 6, que contenía *Penicillium* sp. HC1 proveniente del biorreactor en medio MBAP VIT en conjunto con *Pleurotus ostreatus* T1.1, pues fue el que tuvo los mayores resultados.

### **4.3.2 Evaluación de la actividad celulolítica**

Las matrices vegetales de las flores contienen una cantidad significativa de celulosa, que es un componente estructural clave en las paredes celulares de las plantas. Para su descomposición, ciertos microorganismos secretan enzimas específicas llamadas celulasas. Estas enzimas tienen la capacidad de romper las cadenas de celulosa en unidades más pequeñas, como glucosa, que luego pueden ser utilizadas como fuente de energía para los microorganismos (Y. Zhang & Yamaura, 2020).

Es importante mencionar que para la determinación de la actividad celulolítica se empleó como sustrato de la reacción carboximetilcelulosa (CMC). Este sustrato es considerado para la determinación específica de endo-1,4-β-glucanasa (EG) (Ahmed et al., 2023; Sánchez Garibello, 2013). Por lo tanto, la cuantificación de las endoglucanasas se reporta en este trabajo como celulosas de manera general. Mediante el método de Nelson y Somogy se determinó la actividad celulolítica y se empleó la curva de calibración del Anexo B. La Figura 4-4 visualiza las cinéticas de actividad celulolítica para los tratamientos del 1 al 8, correspondientes a los ensayos de los microcosmos. Se puede observar una producción de celulasas con un comportamiento similar para todos los tratamientos. El

rango de actividad celulolítica que se obtuvo en esta investigación estuvo entre los 5 U/L y los 25 U/L aproximadamente.



**Figura 4-4.** Cinética de la actividad celulasa en los microcosmos 1 y 2.

Uno de los factores ampliamente discutidos es el efecto inhibitorio de la glucosa sobre las celulasas. Según el estudio de Stutzenberger y Lintz (1986), se observó que la glucosa a una concentración de 175 mM inhibió las endoglucanasas en un 27% para un sistema con *Pleurotus ostreatus*. Otros estudios se han enfocados en especies de *Penicillium* como *P. miczynskii* y *P. citrinum* para determinar las tasas de inhibición por glucosa en la hidrólisis de la celulosa, encontrando que dependen en gran medida de la unión productiva de la celulosa, la procesividad y las cargas superficiales del sustrato (Beitel & Knob, 2013; da Costa et al., 2018; Zhai et al., 2018). Lo anterior podría ayudar a explicar el comportamiento en las cinéticas de actividad celulolítica al generarse una producción y acumulación de azúcares reductores en las primeras semanas, y, por tanto, una inhibición reflejada en la disminución de celulasas en la última semana del seguimiento.

Existen otros factores que tienen influencia en la hidrólisis, entre los que se encuentra la concentración de sustrato, el grado de polimerización, la accesibilidad a la celulosa, la capacidad de adsorción, la cristalinidad, la concentración enzimática, entre otros (Espinosa Negrín et al., 2022; Sánchez Garibello, 2013). Esto quiere decir, que la actividad celulolítica probablemente fue inhibida de su producción óptima de celulasas por alguna condición anteriormente mencionada. Sumando a esto, se presume que debido a los olores generados los ensayos de microcosmos no tuvieron la aireación adecuada. Se recomienda entonces, revisar en el diseño la aireación, el pH, la competitividad con otros microorganismos que vienen con el sustrato y la influencia de los pesticidas contenidos en

los residuos de flores, ya que todas estas variables no fueron contempladas en este estudio.

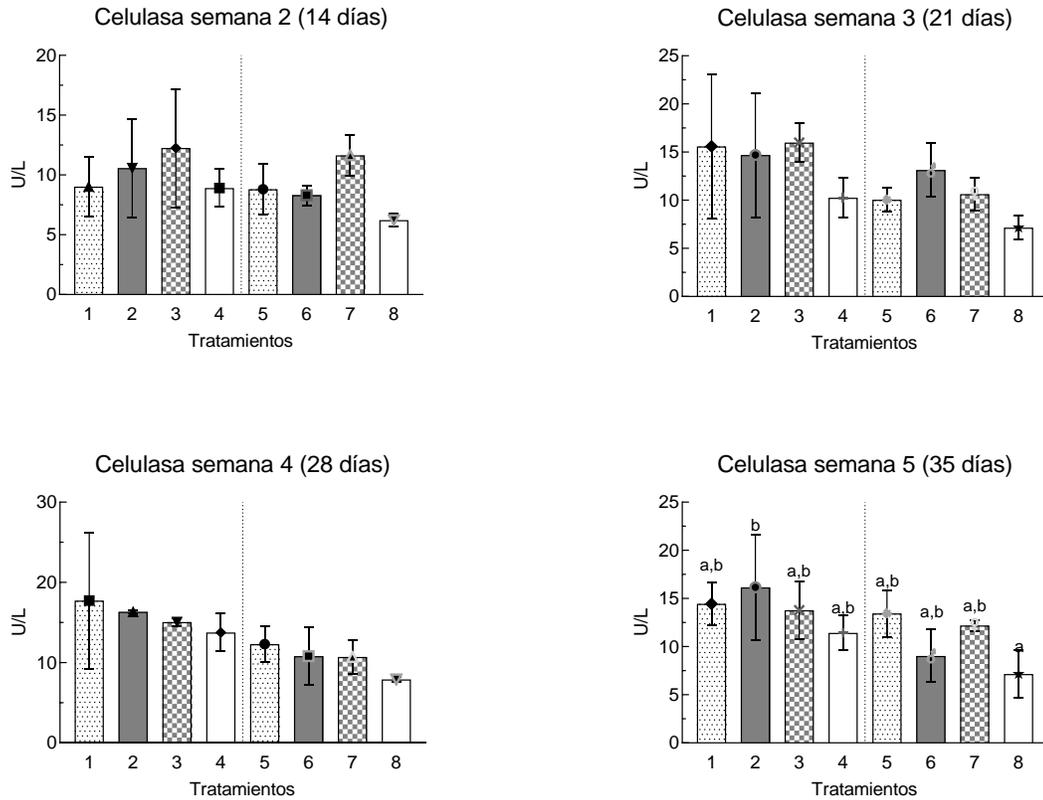
Es importante identificar la máxima producción enzimática en el complejo celulolítico debido a que este es un factor que puede influir en el sinergismo que presentan las enzimas cuando llevan a cabo la hidrólisis en cooperación. La máxima producción enzimática puede llevar a la saturación de los sitios de unión a sustrato, por este motivo establecer los perfiles de producción enzimática se hace necesario para determinar en qué punto podría ser más eficiente la degradación (Qi et al., 2023). Los datos de actividad máxima para esta enzima están organizados en la Tabla 4-2.

**Tabla 4-2.** Actividad celulasa máxima por ensayo. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%).

Microcosmos	Tratamiento	Número	Máxima actividad celulasa (U/L)	Tiempo de máxima actividad celulasa (días)
1 (HC1 de medio PDA)	HC1	1	17,73±8,49	28
	HC1+T1.1	2	16,33±0,18	28
	T1.1	3	15,98±2,04	21
	Control	4	13,75±2,38	28
2 (HC1 de producto del biorreactor Cap. 3)	HC1	5	13,44±2,41 <sup>b</sup>	35
	HC1+T1.1	6	13,13±2,77 <sup>b</sup>	21
	T1.1	7	12,19±0,56 <sup>ab</sup>	35
	Control	8	7,15±2,43 <sup>a</sup>	35

Como era de esperarse, la máxima actividad celulasa se obtuvo para el tratamiento con HC1 proveniente de medio PDA con un valor de 17,73±8,49 U/L. En general, los valores del microcosmos 1 fueron mayores a los encontrados en el microcosmos 2. Sin embargo, para HC1 producido en el biorreactor (tratamiento 5) también significó el mayor dato de actividad celulolítica dentro de este montaje con un valor de 13,44±2,41 U/L, un 87% más que el obtenido en su control (tratamiento 8), 7,15±2,43 U/L. Los co-cultivos entre HC1 y T1.1 muestran una cercanía a los datos obtenidos para los tratamientos que sólo tenían HC1. Por otro lado, el tiempo de máxima actividad celulasa se dio mayoritariamente a los 28 días para el microcosmos 1, mientras que, para el microcosmos 2 fue más común pasados 35 días.

La Figura 4-5 permite comparar las actividades enzimáticas por semana obtenidas para la celulasa para los tratamientos en microcosmos.



**Figura 4-5.** Actividad celulolítica por semanas. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%).

Como se puede observar, sólo en la semana 5 (pasados 35 días del inicio de la degradación) se presentan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, mostrando una marcada mejoría de la actividad celulolítica en los tratamientos inoculados con respecto a los de los controles. Esto es respaldado con lo obtenido en el estudio de degradación del tamo de arroz donde usaron los mismos microorganismos de interés, allí se dijo que, en cuanto a la actividad celulolítica, aunque HC1 presentó mayor actividad, no se observaron diferencias entre los tratamientos (Pedraza-Zapata et al., 2017).

Emplear un sustrato complejo como los residuos vegetales de clavel, los cuales están compuestos por polímeros recalcitrantes como la lignina que pueden dificultar el acceso a

la celulosa, demoran la degradación y pueden afectar los tiempos de actividad enzimática máxima (Qi et al., 2023; Quevedo-Hidalgo et al., 2014). Para este caso de estudio, la influencia de los pesticidas contenidos en los residuos vegetales del clavel también puede estar retrasando los tiempos óptimos debido al carácter xenobiótico de estas sustancias que puede interferir en los procesos metabólicos de crecimiento de los microorganismos y por tanto afectar en su actividad enzimática (Pereira et al., 2021).

Según el estudio de Sun y Cheng (2002), la adición de surfactantes, como el Tween-80® y el polietilén glicol epoxidado, mejora la conversión de la celulosa al disminuir la adsorción de las celulasas sobre la lignina. La unión hidrofóbica del surfactante con la lignina en la superficie del sustrato resulta en la liberación de las uniones no específicas de la enzima, lo cual promueve el proceso de hidrólisis (Eriksson et al., 2002; Ma et al., 2023; Tang et al., 2023). Lo anterior podría ayudar a sumar explicaciones de por qué los ensayos cuando se utilizó HC1 proveniente del medio sólido PDA (que además presentan conidios con mayor viabilidad) tuvieron actividades celulolíticas mayores, esto posiblemente causado por el uso de las soluciones salinas con Tween 80.

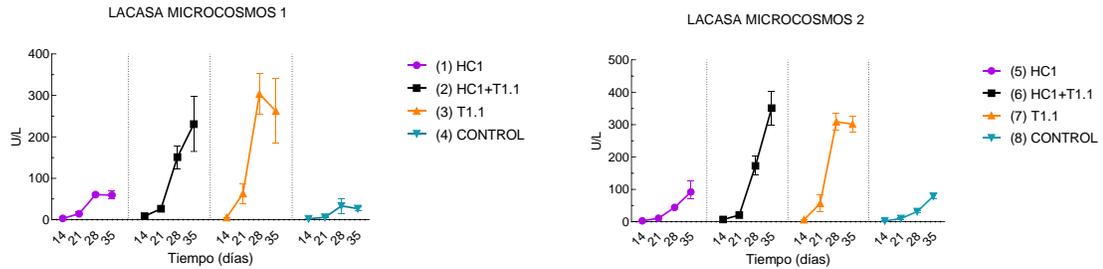
En resumen, la actividad celulolítica representó una diferencia entre los tratamientos hasta pasados 35 días desde el inicio de la degradación, destacando los ensayos con HC1 (incluyendo los consorcios) y reflejando un aumento en la actividad máxima de hasta 87% en contraste con la del control.

### **4.3.3 Evaluación de la actividad ligninolítica**

La actividad ligninolítica juega un papel esencial en la degradación de residuos vegetales de flores. Estos desechos, ricos en lignina, representan una fracción resistente y difícil de descomponer en la materia vegetal. Sin embargo, ciertos microorganismos, especialmente los HPB, producen enzimas que son capaces de descomponer y transformar la lignina en compuestos más simples y asimilable, lo que repercute en la ruptura de la matriz vegetal para lograr una degradación integral (Espinosa Negrín et al., 2022). Para cuantificar la actividad ligninolítica, se puede medir las enzimas específicas que participan en este proceso, las principales son: lacasa, peroxidasa, manganeso peroxidasa e hidrolasa. Este trabajo de investigación le hizo seguimiento a la actividad lacasa y manganeso peroxidasa.

**Evaluación de la actividad lacasa**

La Figura 4-6 muestra la cinética de la producción de enzimas lacasa para los ensayos de microcosmos durante el tiempo de estudio.



**Figura 4-6.** Cinética de lacasa en los microcosmos 1 y 2.

Los datos obtenidos a partir de la cuantificación de las enzimas lacasa permitieron evidenciar una tendencia creciente para todos los casos, sobresaliendo los ensayos en los que intervenía T1.1. Esta correlación positiva de la lacasa con el crecimiento del hongo T1.1 es respaldada por múltiples investigaciones. La obtención de lacasa con *P. ostreatus* ha sido investigada por fermentación sólida sobre residuos agroindustriales de paja de trigo, semillas de uva, residuos de banano, bagazo de caña, residuos herbales, cáscaras de mandarina, pulpa de manzana y de durazno, pulpa de café (Elisashvili et al., 2009; Jin et al., 2020; Qi et al., 2023; Sun & Cheng, 2002), así como también en residuos de floricultura en cultivo sumergido (Quevedo-Hidalgo et al., 2014). El reporte de actividad lacasa máxima para los ensayos de este capítulo aparece en la siguiente tabla.

**Tabla 4-3.** Actividad lacasa máxima por ensayo. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%).

Microcosmos	Tratamiento	Número	Máxima actividad lacasa (U/L)	Tiempo de máxima actividad lacasa (días)
1 (HC1 de medio PDA)	HC1	1	60,66±2,27 <sup>a</sup>	28
	HC1+T1.1	2	230,86±65,95 <sup>b</sup>	35
	T1.1	3	303,59±49,35 <sup>b</sup>	28
	Control	4	33,13±17,70 <sup>a</sup>	28

2 (HC1 de producto del biorreactor Cap. 3)	HC1	5	90,82±30,48 <sup>a</sup>	35
	HC1+T1.1	6	351,04±52,79 <sup>b</sup>	35
	T1.1	7	308,71±26,86 <sup>b</sup>	28
	Control	8	78,95±6,89 <sup>a</sup>	35

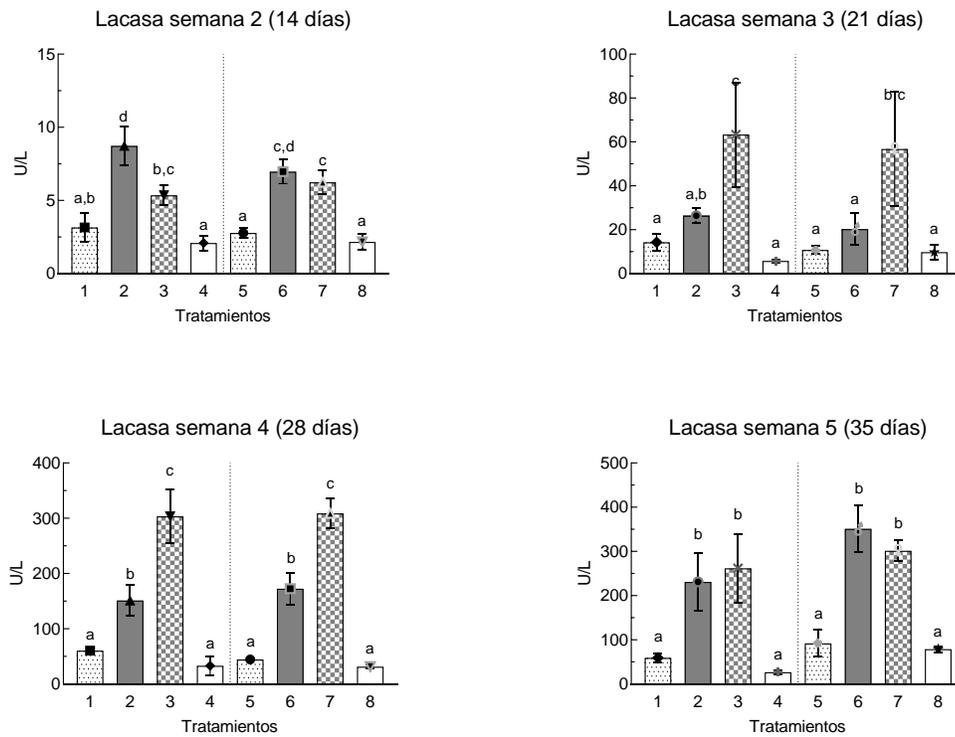
Como se mencionó anteriormente, los ensayos en los que intervino T1.1 tuvo respuestas positivas para la producción de lacasa. La máxima actividad lacasa se dio para el tratamiento 6, referente al ensayo en el que se inoculó tanto HC1 del biorreactor como T1.1, obteniendo un valor de 351,04±52,79 U/L, seguido del tratamiento 7 y 3 (ambos inoculados únicamente con T1.1) con valores de 308,71±26,86 U/L y 303,59±49,35 U/L respectivamente.

El hecho de que el mejor dato de actividad lacasa se diera para el consorcio HC1 – T1.1 tiene coherencia con la producción de CO<sub>2</sub> encontrada, además, este resultado puede estar respaldado por Dwivedi y colaboradores (2011) cuando evaluaron la producción de xilanas y lacasa por una cepa mutante de *Penicillium oxilacum* en monocultivo y en co-cultivo con *Pleurotus ostreatus* en diferentes sustratos lignocelulósicos. Sus hallazgos evidenciaron que las actividades xilanas y lacasa fueron mayores en co-cultivo que en cultivos axénicos. Otros autores como Monahan y colaboradores (2014) compararon la eficiencia del monocultivo fúngico con la de los co-cultivos en la designificación y sacarificación de residuos de cocina. En su trabajo describieron que el co-cultivo de *Trichoderma* spp. con hongos celulolíticos mejoró la actividad, mientras que, su asociación con otros hongos del género *Aspergillus* y *Pycnoporus* no produjo una buena actividad de degradación en comparación con los monocultivos correspondientes (K. et al., 2014). Por lo tanto, se puede concluir que el co-cultivo no siempre implica una mayor actividad de degradación, esta mejora depende de los organismos implicados y de las condiciones utilizadas durante el proceso de degradación.

Es bueno recordar que a los residuos de clavel no se les hizo tratamiento de esterilización previo y que HC1 no está reportado como productor destacable de enzimas ligninolíticas. De hecho, en el estudio de la degradación del tamo de arroz, la actividad ligninolítica de HC1 fue nula, no se lograron detectar niveles de lacasa ni de MnP (Pedraza-Zapata et al., 2017). Luego, en el presente trabajo, los resultados para los tratamientos con HC1 fueron mayores que los obtenidos para los controles. Esto debió suceder, posiblemente, por la

interacción de HC1 con los otros microorganismos con la que venía el sustrato y probablemente también, por la interacción de estos con la solución de sales. Es importante tener presente que, los mecanismos de regulación enzimática involucran procesos globales (Gutiérrez-Rojas et al., 2015).

El tiempo de actividad lacasa máxima fue mayoritariamente a los 28 días para el microcosmos 1 (con HC1 del medio sólido) y a los 35 días para el microcosmos 2 (con HC1 del biorreactor). Los resultados en esta investigación muestran que el co-cultivo en ambos casos se demora en llegar a su actividad máxima en comparación con los monocultivos. De igual manera, es probable que debido al estrés ambiental que se le está causando a los hongos, al reemplazar totalmente la fuente de carbono por los residuos de flores, se generen complicaciones en la etapa inicial de adaptación y se limite o inhiba su crecimiento, y, por lo tanto, la producción de enzimas se retarde (Mukherjee & Ghorai, 2023). La Figura 4-7 permite comparar las actividades enzimáticas por semana obtenidas para la lacasa en los tratamientos de microcosmos.



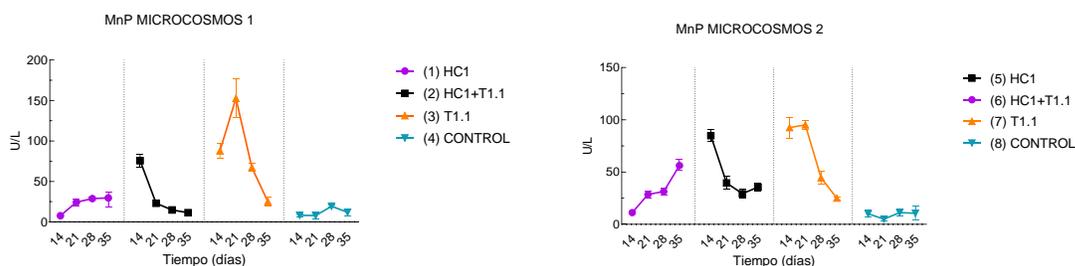
**Figura 4-7.** Actividad lacasa por semanas. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%).

Se logra observar que estos resultados tienen diferencias estadísticamente significativas para cada semana, resaltando que, desde el inicio de la degradación los tratamientos con T1.1, incluyendo los co-cultivos, presentaron mayor actividad en comparación con los que sólo contenían HC1 y los controles. Era de esperarse que se encontrara mayor actividad enzimática para estos ensayos y tiene congruencia con los datos obtenidos en la producción y productividad de CO<sub>2</sub>. Esto es positivo para entender la sinergia que hacen los hongos de estudio de este capítulo dentro del co-cultivo para realizar una degradación integral.

Las lacasas tienen una amplia especificidad de sustratos y son capaces de oxidar una gran cantidad de compuestos xenobióticos incluyendo tintes sintéticos, pesticidas, fenólicos clorinados e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Pereira et al., 2021; Quevedo-Hidalgo et al., 2014). Nuevamente, la interferencia de los pesticidas dentro de los residuos del clavel pudo tener influencia en la cinética enzimática, sin embargo, es de resaltar que esta enzima podría ayudar a degradar estos compuestos xenobióticos reduciendo los impactos ambientales por su introducción en los ecosistemas.

### Evaluación de la actividad manganeso peroxidasa (MnP)

La actividad de la manganeso peroxidasa (MnP) ha sido objeto de numerosos estudios relacionados con la degradación de material vegetal. Al igual que la lacasa, esta enzima tiene la capacidad para descomponer y oxidar la lignina. La Figura 4-8 muestra la cinética de la producción de enzimas manganeso peroxidasa (MnP) para los ensayos de degradación en los microcosmos.



**Figura 4-8.** Cinética de la actividad manganeso peroxidasa (MnP) en los microcosmos 1 y 2.

La cinética de la actividad MnP presenta una tendencia ascendente para los ensayos con HC1 y para el control. Mientras que, para los ensayos donde está involucrado T1.1 se presenta un comportamiento en descenso con el pasar de las semanas.

La Tabla 4-4 organiza la actividad MnP máxima para cada ensayo. De ahí, se puede determinar que el tratamiento con mayor actividad MnP fue el 3, en el cual se evaluó el efecto de T1.1, obteniéndose un valor de  $152,77 \pm 23,92$  U/L. El otro tratamiento con T1.1, el 7, confirma la producción de esta enzima con un valor máximo reportado de  $95,15 \pm 4,14$  U/L. Los siguientes ensayos con valores representativos de la MnP son los consorcios. Por otro lado, el tiempo de máxima actividad MnP se presentó para los co-cultivos en ambos casos a los 14 días.

**Tabla 4-4.** Actividad MnP máxima por ensayo. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%).

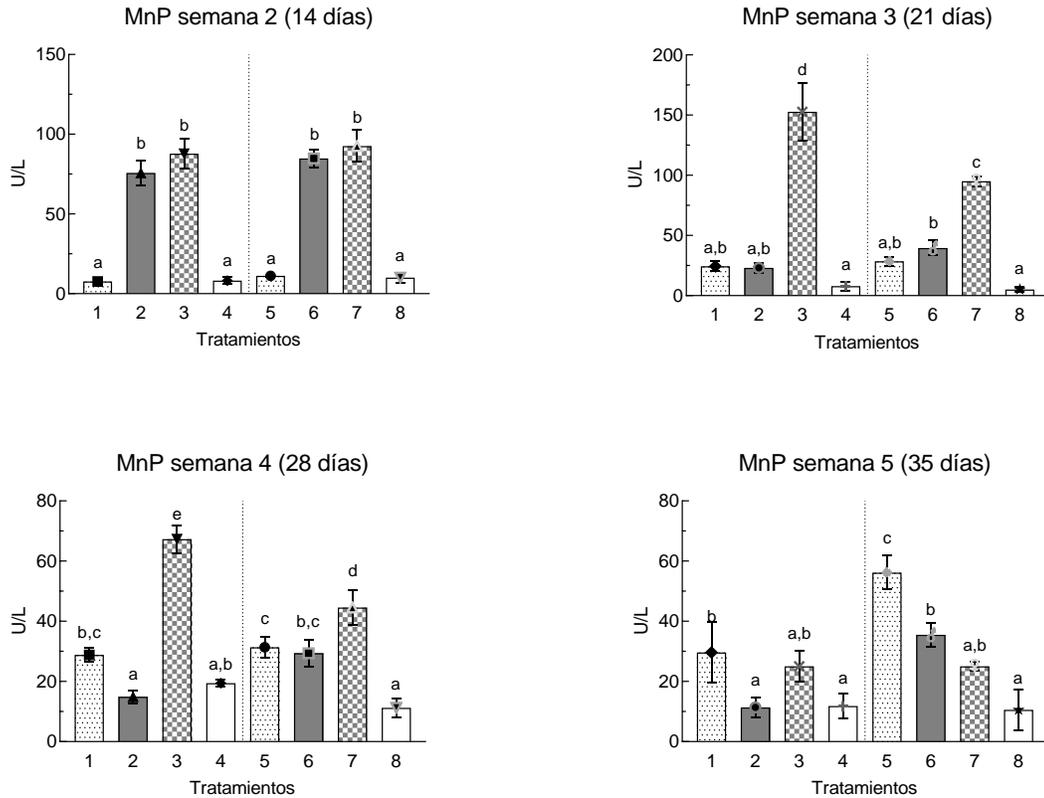
Microcosmos	Tratamiento	Número	Máxima actividad MnP (U/L)	Tiempo de máxima actividad MnP (Días)
1 (HC1 de medio PDA)	HC1	1	$29,66 \pm 9,96^a$	35
	HC1+T1.1	2	$75,73 \pm 7,92^b$	14
	T1.1	3	$152,77 \pm 23,92^c$	21
	Control	4	$19,42 \pm 1,22^a$	28
2 (HC1 de producto del biorreactor Cap. 3)	HC1	5	$56,17 \pm 5,57^b$	35
	HC1+T1.1	6	$84,75 \pm 5,75^c$	14
	T1.1	7	$95,15 \pm 4,14^c$	21
	Control	8	$11,23 \pm 3,08^a$	28

A pesar de que estos datos muestran, al igual que con la actividad lacasa, que los tratamientos con T1.1 tienen gran producción de MnP, estos ensayos difieren en el comportamiento: Mientras la lacasa aumentaba con el paso de las semanas, la manganeso peroxidasa se reducía. Es posible que para este caso de estudio la enzima MnP haya presentado algún tipo de inhibición más evidente para los tratamientos con T1.1 ya que la actividad lacasa estuvo en auge en momentos diferentes, por lo que todavía había lignina por degradar.

Según Bonnarne y Jeffries (1990), la actividad de la MnP incrementa con la concentración de Mn (II) cuando estudió *P. ostreatus*. Sin embargo, valores demasiado altos de Mn (II) tienen un efecto inhibitorio. Estos investigadores encontraron un máximo en la actividad MnP a 40 ppm de Mn (II) y efecto inhibitorio a 199 ppm (Bonnarme & Jeffries, 1990). Por otra parte, Baldrian y colaboradores (2005) reportaron que la actividad MnP fue afectada negativamente con la adición de Mn, Cu y Pb, y que, en el cultivo de *P. ostreatus*, la actividad MnP fue más baja en presencia de Mn que en su ausencia. Lo anterior justificaría la reducción de actividad MnP presentada en los tratamientos con T1.1. Es posible que los residuos de clavel, de por sí, ya contengan manganeso en su composición proveniente de los fertilizantes y/o plaguicidas, además de esto, la adición de iones manganeso en la solución de sales pudo aumentar la concentración de este elemento superando el valor óptimo para este sistema y generando inhibición de la MnP.

Otro resultado importante a resaltar es, que tanto para esta enzima MnP como para la lacasa, los ensayos con HC1 proveniente del biorreactor (tratamientos 5 y 6) presentaron mayor actividad enzimática en comparación con los tratamientos que usaban HC1 del medio sólido (tratamientos 1 y 2). Se presume que los compuestos que constituían el medio MBAP VIT al ser adicionados a los microcosmos en la inoculación de HC1, aportaron elementos estratégicos para promover la actividad ligninolítica de manera global en el sistema planteado. Una vez más, los valores de actividad MnP en los sistemas con HC1 corresponden seguramente a la actividad de los otros microorganismos asociados a la matriz vegetal, ya que HC1 por sí solo no sobresale por su actividad ligninolítica.

La Figura 4-9 permite comparar las actividades enzimáticas por semana obtenidas para la MnP en los tratamientos de microcosmos. Se logra observar que estos resultados tienen diferencias estadísticamente significativas para cada semana, llamando la atención que, en la semana 2 (14 días) existe una diferencia marcada entre los tratamientos con T1.1 (incluyendo el co-cultivo) y los demás tratamientos. Luego, a la semana 3 (21 días), sólo se mantiene la distinción para los tratamientos que contienen T1.1, por lo que, los consorcios (tratamientos 2 y 6) presentaron una reducción significativa de la actividad MnP de la semana 2 a la 3. Este comportamiento se mantuvo en la semana 4 (28 días). Finalmente, en la semana 5 (35 días) salen a destacar los tratamientos con HC1 mientras siguen en reducción la actividad MnP de los ensayos con T1.1.



**Figura 4-9.** Actividad MnP por semanas. Las letras iguales representan los grupos que no difieren significativamente según la prueba de Tukey (Significancia al 95%).

En resumen, como era de esperarse, T1.1 destacó por su actividad ligninolítica. La lacasa y MnP tuvieron puntos de máxima actividad en diferentes tiempos, por lo que se presume que hubo inhibición influencia por la carga bioquímica con la que venía el sustrato. Haciendo un balance general de la actividad enzimática, se puede concluir que cuando se lograron altos valores de actividad ligninolítica se logró dar pie al incremento de la actividad celulolítica. Esto es gracias, a que la degradación de la lignina permitió un acceso a la celulosa. Los resultados de la cuantificación del CO<sub>2</sub> se alinearon con la mayor actividad ligninolítica encontrada en los tratamientos con T1.1 y los co-cultivos, por lo que se espera que estos ensayos sean los que presenten mayor degradación de residuos de clavel.

#### 4.3.4 Evaluación de la degradación de residuos de clavel mediante la caracterización de material vegetal sometido a los tratamientos

Además de la evaluación enzimática y la generación de CO<sub>2</sub>, hay otros parámetros que pueden proporcionar detalles sobre la degradación que está ocurriendo en el sustrato. La identificación de los componentes estructurales presentes en la pared celular vegetal ofrece datos relevantes acerca del proceso de hidrólisis que se lleva a cabo durante la fermentación sólida. Al pasar las 5 semanas de degradación, se determinó la composición del contenido de celulosa y lignina de cada tratamiento. Los resultados brindados por el Laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad Nacional se organizaron y procesaron para ser mostrados en la Tabla 4-5.

**Tabla 4-5.** Composición de celulosa y lignina en la pared celular después de cada tratamiento

Montaje	Tratamiento	Celulosa (%) (BS)	Celulosa hidrolizada (%)	Lignina (%) (BS)	Grado de deslignificación (%)
Inicial	0	27,29	0	7,01	0
Microcosmos 1	1	32	5,46	13,2	2,08
	2	32	10,91	13,2	7,73
	3	31,1	12,54	11,3	20,20
	4	30,6	7,86	11,8	4,89
Microcosmos 2	5	29,5	36,31	10,5	43,08
	6	29,2	37,79	10	46,50
	7	32,1	32,52	10,4	45,10
	8	31	22,51	9,9	37,86
Campo	9	35,6	24,73	8,3	24,79
	10	32,5	19,83	8	15,42
	11	34,8	17,80	7,5	24,08
	12	35,8	11,69	8,2	5,61

BS= Base seca

Tal como se esperaba, los ensayos en co-cultivo y los ensayos con T1.1 fueron los que presentaron mayores valores en el grado de deslignificación, mientras que, para los porcentajes de celulosa hidrolizada destacan los tratamientos en donde se usó HC1 producto del bioreactor (microcosmos 2 y campo).

En el microcosmos 1, el tratamiento 3, asociado con T1.1 fue el que presentó mayor grado de deslignificación con un valor de 20,20%. Es razonable entonces, encontrar que este mismo tratamiento sea el que presentó el mayor porcentaje de celulosa hidrolizada, 12,54%, ya que, al irse degradando la lignina, se amplía el área expuesta y se posibilita el acceso a la celulosa (Sánchez, 2009). Para el caso del microcosmos 2, el tratamiento 6 (co-cultivo T1.1 con HC1 del biorreactor), fue el que presentó mayor grado de deslignificación con un valor de 46,50% y también el mayor porcentaje de celulosa hidrolizada, 37,79%. En lo que respecta al montaje en campo, sobresalen los resultados del tratamiento 9 (HC1 del biorreactor) con 24,79% de grado de deslignificación y 24,73% de celulosa hidrolizada. A su vez, el aumento del porcentaje de celulosa en todos los tratamientos con respecto a la muestra inicial se explica por el incremento de la deslignificación (Sánchez, 2009).

Los tratamientos que emplearon T1.1 mostraron principalmente los niveles más altos de deslignificación. La literatura reporta al *Pleurotus ostreatus* con 41% de grado de deslignificación en la degradación de cascarilla de arroz durante 60 días, también, consiguió un grado de deslignificación de 43,1% sobre raquis de palma en 30 días y de 34,6% en degradación de fibra de palma en 28 días (Ospina & Piñeros, 2007; Rojas, 2011; Taniguchi et al., 2005). Para el caso de los claveles, este trabajo obtiene grados de deslignificación menores a los reportados en otros sustratos.

Por otro lado, el tratamiento 1 (HC1 de medio sólido) no tuvo resultados positivos, sus porcentajes de celulosa hidrolizada y de deslignificación fueron inferiores a los del control. De la misma manera, los resultados del microcosmos 1 y 2 fueron contrarios a las expectativas, puesto que los análisis anteriores sobre producción de CO<sub>2</sub> y actividad enzimática daban indicios de que se tendrían mayores porcentajes de degradación en el microcosmos 1. Para esta investigación sólo se tomó en cuenta el contenido de lignina y celulosa de una muestra inicial al azar que sirvió para hacer los cálculos de degradación. Entonces, los resultados distintos a lo previsto podrían explicarse por la heterogeneidad de los residuos de clavel por su cantidad de hojas, de tallos gruesos y delgados, lo que representaría diferente composición inicial de lignocelulosas en cada muestra de estudio, y que, además, los residuos vegetales entre montajes pudieron coincidir con momentos diferentes en el cultivo donde se les aplicaba agroquímicos. Por lo anterior, una hipótesis de lo ocurrido puede asociarse a la posible presencia de plaguicidas y otros compuestos

de síntesis química contenidos en la matriz vegetal de los residuos que pudieron llegar a interferir en la degradación. Esto se explica en investigaciones de biorremediación en donde encontraron que hongos del género *Penicillium*, como *P. janthinellum*, tiene una buena capacidad de degradar plaguicidas organoclorados como la atrazina, creosota e hidrocarburos poliaromáticos (HPA) (Stamatiu Sánchez et al., 2015). También, Zhao (2010) demostró que *Penicillium oxalicum* degradó organofosforados en diferentes condiciones. Por lo que, el crecimiento y actividad enzimática de HC1 pudo asociarse a la degradación de estos componentes, en lugar de privilegiar la degradación de las lignocelulosas. Así mismo, se esperaba que hubiera un mejor rendimiento degradador en los co-cultivos del microcosmos 1, sin embargo, T1.1 también pudo reflejar crecimiento y actividad enzimática para la degradación de pesticidas organofosforados. *Pleurotus ostreatus* ha sido reportado como un fuerte degradador de estos compuestos xenobióticos y se ha demostrado que, a bajas concentraciones de organofosforados, la productividad podía ser muy elevada (Pereira et al., 2021; Qi et al., 2023).

Resaltan positivamente los resultados encontrados en los tratamientos con HC1 producto del biorreactor (5, 6, 9 y 10) debido a que presentaron los mayores porcentajes de celulosa hidrolizada. Lo anterior ayudaría a respaldar la presunta influencia que tiene la contribución del medio líquido MBAP VIT, por su aporte de lípidos, vitaminas, aminoácidos y ácidos orgánicos que estimulan el crecimiento microbiano, lo que aumentaría la actividad metabólica y, por lo tanto, ayudaría en la aceleración de la degradación de materiales vegetales (H. Chen, 2013; Sánchez, 2009).

En concreto, la degradación de residuos de clavel con la aplicación de HC1 se ve acelerada con respecto al control y es favorecida en consorcio con T1.1, validando de esta manera el uso de estos bioinsumos para el sector floricultor. Adicionalmente, es posible que los sistemas estudiados estén promoviendo en simultáneo la biodegradación de compuestos xenobióticos que favorecerían el cuidado de los ecosistemas al reducir su incorporación al ambiente. Se pensaría que esto representaría una desventaja en esta investigación ya que reduciría la eficacia para degradar lignocelulosas, pero, en realidad, esta dualidad puede verse como un aspecto positivo que va alineado con la búsqueda de la salud de los suelos y la promoción de prácticas agrícolas más sostenibles. Se requiere ampliar los estudios de otros parámetros en la degradación para optimizar el sistema y entender de mejor manera los beneficios y limitaciones de esta tecnología.

## 4.4 Conclusiones

El diseño experimental de este capítulo de la investigación contempla el estudio del co-cultivo de *Penicillium* sp. HC1 junto con *Pleurotus ostreatus* T1.1 en una proporción 50:50 debido a que uno presenta actividad celulolítica mientras el otro lo complementa por su actividad ligninolítica, permitiendo así un estudio integral de la degradación de los residuos vegetales provenientes de cultivos de clavel.

En la cuantificación de la producción de CO<sub>2</sub>, se encuentra que todos los tratamientos presentan mayor actividad metabólica comparados con el control, este dato refleja la presunta mejora en la aceleración de la degradación de los residuos de clavel. Los co-cultivos obtienen los mejores resultados representando aumentos en la producción y productividad de CO<sub>2</sub> de hasta el 17% para las dos variables con respecto al control. La actividad celulolítica se retardó en manifestar diferencias. Pasados 35 días expresó diferencia significativa, destacándose los tratamientos con HC1 (incluyendo los co-cultivos) y reflejando un aumento en la actividad celulolítica máxima del 87% con respecto al control. Por otro lado, como era de esperarse, en la actividad ligninolítica destacaron los tratamientos con T1.1 (incluyendo los co-cultivos). La lacasa y la MnP tuvieron puntos de actividad máxima en diferentes tiempos por lo que se presume que hubo inhibición generada por la carga bioquímica con la que venía el sustrato. El balance general de la actividad enzimática permite afirmar que al alcanzar niveles elevados de actividad ligninolítica se favoreció el aumento de la actividad celulolítica.

Finalmente, la degradación de residuos de clavel se confirmó mediante el contenido de lignina y celulosa en la pared celular después de los tratamientos, obteniendo los mejores resultados en los ensayos en los que participó HC1 y en los co-cultivos con T1.1. Se estima que parte del crecimiento y actividad enzimática en general fueron asociados a la degradación de compuestos de síntesis química, lo cual, estaría alineado a los principios de sostenibilidad y salud de los suelos.

## 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

Los resultados obtenidos en el capítulo 2 indican que los ensayos con  $\text{CaCl}_2$  no tuvieron un efecto significativo en la producción de biomasa, conidios o su calidad en *Penicillium* sp. HC1 en medio de cultivo sumergido, por lo que se decidió continuar con el medio base sin modificaciones en la fuente de calcio. Luego, se evaluó la influencia de los casaminoácidos encontrándose resultados positivos. La concentración de 13 g/L de casaminoácidos en el medio líquido demostró mejorar la máxima producción de conidios y biomasa, al igual que mejoró la viabilidad y en algunos casos la tolerancia térmica. Sin embargo, debido a su alto costo, se investigó una alternativa utilizando un suplemento compuesto por aminoácidos al que se denominó aminoácidos de prueba (AP), los cuales respondieron en igual medida, mostrando mejoría en la viabilidad y productividad de los conidios, pero no resultaron favorables para la tolerancia térmica. Esto se resolvió cuando se añadió un conjunto de vitaminas al medio de cultivo, lo que resultó en un aumento del 64% tolerancia térmica en comparación con el control. Como resultado, se seleccionó el medio MBAP VIT para continuar con las pruebas en el biorreactor en el siguiente paso de la investigación.

En el capítulo 3, se validó y demostró la efectividad del medio de cultivo líquido MBAP VIT en biorreactor para la producción de *Penicillium* sp. HC1 ya que la producción de conidios y biomasa en todos los ensayos para evaluar la aireación resultaron mayores a los del control. Aquí se concluyó que, en este sistema de fermentación con un flujo de aire a 0,5 vvm no se garantiza estabilidad e integralidad estructural del organismo, por lo que no es recomendable. En cambio, la condición a 2,5 vvm mejoró la viabilidad, alcanzando un valor mayor al 90%, y también mejoró la tolerancia térmica de los conidios de *Penicillium* sp. HC1. Al finalizar esta etapa de la investigación, se seleccionó el producto de la fermentación en el biorreactor a una tasa de aireación de 2,5 vvm para continuar con los ensayos de degradación vegetal.

Por último, en el capítulo 4 se evaluó un sistema donde se contempla un co-cultivo entre *Penicillium* sp. HC1 y *Pleurotus ostreatus* T1.1, así como sus capacidades por separado para abordar la degradación de residuos de cultivos de clavel brindados por una empresa

con sede en Cundinamarca, aprovechando la actividad celulolítica y ligninolítica de cada organismo. En la cuantificación de la producción de CO<sub>2</sub>, todos los tratamientos mostraron buenos resultados en contraste con el control, lo cual indica mayor actividad metabólica, por lo tanto, mayor crecimiento microbial, lo que podría traducirse indirectamente a mayor actividad degradadora. Se obtuvieron los mejores resultados con los co-cultivos representados en el aumento del 17% tanto de la producción como de la productividad de CO<sub>2</sub> en comparación con el control. La actividad celulolítica presentó diferencias hasta el día 35, los ensayos con HC1, incluyendo los co-cultivos, reflejaron un aumento significativo de hasta el 87% en la actividad celulolítica máxima en comparación con el control. Por otro lado, los tratamientos con T1.1, incluyendo los co-cultivos, destacaron en la actividad ligninolítica. Se observó una posible inhibición enzimática presuntamente por la carga bioquímica del sustrato. Por último, se confirmó la aceleración en la degradación de residuos de clavel con la caracterización en cuanto a contenido de lignina y celulosa después de los tratamientos, y se encontró que los ensayos con HC1 (incluyendo el co-cultivo) presentan una buena degradación con respecto al control. De esta manera se valida la capacidad del bioinsumo para el sector floricultor.

En definitiva, se profundizó sobre los efectos y la influencia que tienen aditivos complejos como iones de calcio, casaminoácidos, aminoácidos ramificados, otros suplementos y vitaminas sobre la producción de *Penicillium* sp. HC1, así como también, se dio una ampliación del efecto que tiene la aireación en procesos de fermentación sumergida en tanque agitado, logrando mejoría en el diseño de sistemas de producción de bioinsumos. Este producto fue validado atendiendo un requerimiento agrícola del sector floricultor, el cual está actualmente en constante búsqueda de una alternativa para el manejo de sus residuos vegetales. Se logró demostrar en esta investigación la mejora en la aceleración de la degradación de residuos de clavel con el uso de *Penicillium* sp. HC1 producido bajo las mejores condiciones evaluadas en fermentación sumergida y se encontró que su efectividad se veía beneficiada en consorcio con *Pleurotus ostreatus* T1.1.

## 5.2 Recomendaciones

Con relación a la producción de *Penicillium* sp. HC1 en medios de cultivo sumergido se recomienda profundizar los estudios para:

- Evaluar los efectos que tienen los componentes de los AP como la creatina monohidratada y los aminoácidos de cadena ramificada (BCAA) buscando entender la influencia que tienen estos compuestos y encontrando las concentraciones óptimas para el crecimiento y calidad de los conidios generados por el microorganismo.
- Entender los mecanismos de influencia que tiene la tiamina, riboflavina, pantotenato de calcio, niacina, piridoxamina, ácido tiótico, ácido fólico, biotina y la vitamina B<sub>12</sub>, por separado, en conjunto y en diversas proporciones para determinar las concentraciones óptimas de producción de *Penicillium* sp. HC1 con conidios tolerantes a factores ambientales.
- Estudiar la relación de la aireación en conjunto con otros factores como la agitación, el pH, la geometría del fermentador, la tasa de esfuerzo cortante y la reología, para de esta manera, determinar integralmente un sistema equilibrado y óptimo que sea próspero para el crecimiento de *Penicillium* sp. HC1.
- Analizar los metabolitos generados durante la fermentación con el fin de identificar aquellos que tengan un efecto inductor, así como también, los que tengan un efecto inhibidor para la conidiación.

Con respecto a la evaluación del bioinsumo sobre la degradación de materiales lignocelulósicos se sugiere lo siguiente:

- Determinar las condiciones óptimas del sistema de degradación de residuos de clavel para escalas en campo.
- Caracterizar y evaluar la influencia de los pesticidas y otros agentes de síntesis química que puedan estar contenidos en la matriz vegetal de los residuos de clavel e interfieran en los procesos de degradación.

## Bibliografía

- Abdul Manan, M., & Webb, C. (2018). Estimating fungal growth in submerged fermentation in the presence of solid particles based on colour development. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(3), 618–627. <https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1440974>
- Adams, T. H., Wieser, J. K., & Yu, J.-H. (1998). Asexual Sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1), 35–54. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.1.35-54.1998>
- Ahmed, J., Taslim, A., Raihan, T., Sohag, Md. M. H., Hasan, M., Suhani, S., Qadri, F., & Azad, A. K. (2023). Characterization of an endo-beta-1,4 glucanase gene from paper-degrading and denim bio-stoning cellulase producing *Aspergillus* isolates. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 70(3), 1057–1071. <https://doi.org/10.1002/bab.2420>
- Albaek, M. O., Gernaey, K. V., Hansen, M. S., & Stocks, S. M. (2011). Modeling enzyme production with *Aspergillus oryzae* in pilot scale vessels with different agitation, aeration, and agitator types. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(8), 1828–1840. <https://doi.org/10.1002/bit.23121>
- Alfonso Moreno, F., Robayo Quintana, M., Ferrucho Rodríguez, L., & Vargas Oyola, M. (2016). Aprovechamiento de residuos vegetales de pétalos de rosas, tallos de girasol y vástago de plátano para la fabricación artesanal de papel. *INVENTUM*, 11(20), 71–82. <https://doi.org/10.26620/uniminuto.inventum.11.20.2016.71-82>
- Al-Snafi, P. D. A. E. (2017). Chemical contents and medical importance of *Dianthus caryophyllus*- A review. *IOSR Journal of Pharmacy (IOSRPHR)*, 07(03), 61–71. <https://doi.org/10.9790/3013-0703016171>
- Ardestani, F., Fatemi, S. A., Yakhchali, B., Hosseyni, M., & Najafpour, G. (2009). The Effects of Methionine and Acetate Concentrations on Mycophenolic Acid Production by *Penicillium brevicompactum* MUCL 19011 in Submerged Culture. *International Journal of Chemical, Materials and Biomolecular Sciences*, 2.
- Ardestani, F., & Marzban, A. (2012). L-isoleucine Effects on Yield and Productivity of a Batch Fermentation Process for Mycophenolic Acid Production by *Penicillium brevicompactum*. *World Applied Science Journal*, 20, 742–747.

- Asadollahzadeh, M., Mohammadi, M., & Lennartsson, P. R. (2023). Fungal biotechnology. En *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 31–66). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91872-5.00006-5>
- Asocolflores. (2022). *ASOCOLFLORES – BALANCE 2022: El fortalecimiento de la sostenibilidad, el reencuentro y la promoción marcaron este año para las flores de Colombia | Agricultura & Ganadería*.
- Bapat, P. M., Das, D., Sohoni, S. V, & Wangikar, P. P. (2006). Hierarchical amino acid utilization and its influence on fermentation dynamics: rifamycin B fermentation using *Amycolatopsis mediterranei*S699, a case study. *Microbial Cell Factories*, 5(1), 32. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-32>
- Barriga, M. (2007). *No te comas al mundo, las raíces de las flores: las deudas y los impactos de la floricultura en Colombia*.
- Basto, B., da Silva, N. R., Teixeira, J. A., & Silvério, S. C. (2022). Production of Natural Pigments by *Penicillium brevicompactum* Using Agro-Industrial Byproducts. *Fermentation*, 8(10), 536. <https://doi.org/10.3390/fermentation8100536>
- Basu, S. N., & Bhattacharyya, J. P. (1962). Studies on the Growth and Sporulation of Some Species of *Penicillium*. *Journal of General Microbiology*, 27(1), 61–73. <https://doi.org/10.1099/00221287-27-1-61>
- Beguín, H. (2010). *Tritirachium egenum*, a thiamine- and siderophore-auxotrophic fungal species isolated from a *Penicillium rugulosum*. *FEMS Microbiology Ecology*, 74(1), 165–173. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00929.x>
- Beitel, S. M., & Knob, A. (2013). *Penicillium miczynskii*  $\beta$ -glucosidase: A Glucose-Tolerant Enzyme Produced Using Pineapple Peel as Substrate. *Industrial Biotechnology*, 9(5), 293–300. <https://doi.org/10.1089/ind.2013.0016>
- Bernal Ruiz, S. M., & Gómez Sánchez, L. C. (2016). *Hidrólisis parcial de cascarilla de cebada mediante el uso de extracto enzimático producido por Penicillium sp. HC1 para la obtención de xilosa*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Berovič, M., Cimerman, A., Steiner, W., & Koloini, T. (1991). Submerged citric acid fermentation: rheological properties of *Aspergillus niger* broth in a stirred tank reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34(5), 579–581. <https://doi.org/10.1007/BF00167902>

- Bird, R. B., Stewart, W. E., & Lightfoot. (2002). *Transport Phenomena* (John Wiley and Sons Inc., Ed.; 2nd Ed.).
- Bockelmann, W., Portius, S., Lick, S., & Heller, K. J. (1999). Sporulation of *Penicillium camemberti* in Submerged Batch Culture. *Systematic and Applied Microbiology*, 22(3), 479–485. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(99\)80058-7](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(99)80058-7)
- Bonilla López, D. S. (2020). *Efecto de la incorporación de tamo de arroz degradado por Talaromyces sayulitensis HC1 y el enriquecimiento con nitrógeno sobre la germinación y el crecimiento de arroz y tomate*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Bonilla Rojas, M. P. (2021). *La maravilla del sector de la Floricultura*. ANEIA - Universidad de Los Andes. <https://agronegocios.uniandes.edu.co/2022/03/la-maravilla-del-sector-de-la-floricultura/>
- Bonnarme, P., & Jeffries, T. W. (1990). Mn(II) Regulation of Lignin Peroxidases and Manganese-Dependent Peroxidases from Lignin-Degrading White Rot Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(1), 210–217. <https://doi.org/10.1128/aem.56.1.210-217.1990>
- Boyle, J. (2005). Lehninger principles of biochemistry (4th ed.): Nelson, D., and Cox, M. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 33(1), 74–75. <https://doi.org/10.1002/bmb.2005.494033010419>
- Cadena Forero, D. M. (2022). *Cadena Forero, 2021. Incorporación de la economía circular en el sector floricultor de la sabana de bogotá en Colombia*. Universidad de La Sabana.
- Calderón Tenori, C. D., Porras Rey, L., Mena, F., Solano Díaz, K., & Arias Andrés, M. (2001). *Producción de enzimas ligninolíticas y biodegradación del herbicida diuron por hongos de la pudrición blanca colectados en Costa Rica, cultivados sobre rastrojo de piña*. Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas de la Universidad Nacional (IRETUNA).
- Canteri, H., & Ghou, M. (2015). Submerged Liquid Culture for Production of Biomass and Spores of *Penicillium*. <https://doi.org/10.1080/87559129.2015.1015136>, 31(3), 262–278. <https://doi.org/10.1080/87559129.2015.1015136>
- Carrillo, L. (2003). Los hongos de los alimentos y forrajes. *Universidad Nacional de Jujuy*.
- Ceniflores. (2023). *Sector Floricultor*. <https://ceniflores.org/sector-floricultor/>

- Chen, H. (2013). *Modern Solid State Fermentation*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6043-1>
- Chen, M., Wang, J., Lin, L., Xu, X., Wei, W., Shen, Y., & Wei, D. (2022). Synergistic Regulation of Metabolism by Ca<sup>2+</sup> /Reactive Oxygen Species in *Penicillium brevicompactum* Improves Production of Mycophenolic Acid and Investigation of the Ca<sup>2+</sup> Channel. *ACS Synthetic Biology*, 11(1), 273–285. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00413>
- Cho, Y. J., Hwang, H. J., Kim, S. W., Song, C. H., & Yun, J. W. (2002a). Effect of carbon source and aeration rate on broth rheology and fungal morphology during red pigment production by *Paecilomyces sinclairii* in a batch bioreactor. *Journal of Biotechnology*, 95(1), 13–23. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00445-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00445-X)
- Cho, Y. J., Hwang, H. J., Kim, S. W., Song, C. H., & Yun, J. W. (2002b). Effect of carbon source and aeration rate on broth rheology and fungal morphology during red pigment production by *Paecilomyces sinclairii* in a batch bioreactor. *Journal of Biotechnology*, 95(1), 13–23. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00445-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00445-X)
- Cliquet, S., & Jackson, M. A. (2005). Impact of carbon and nitrogen nutrition on the quality, yield and composition of blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 32(5), 204–210. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0232-3>
- Colombia CO. (2019). *Colombia CO*. En floricultura, la respuesta es Colombia.
- Cunningham, R., & López, G. (1994). Etanol de lignocelulósicos: tecnología y perspectivas. *Programa CYTED*.
- da Costa, S. G., Pereira, O. L., Teixeira-Ferreira, A., Valente, R. H., de Rezende, S. T., Guimarães, V. M., & Genta, F. A. (2018). *Penicillium citrinum* UFV1  $\beta$ -glucosidases: purification, characterization, and application for biomass saccharification. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 226. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1226-5>
- DANE, & DIRPEN. (2011). *Censo de Fincas Productoras de Flores En 28 municipios de la Sabana de Bogotá y Cundinamarca 2009*.
- Day, J. B., Mantle, P. G., & Shaw, B. I. (1980). Production of Verruculogen by *Penicillium estinogenum* in Stirred Fermenters. *Microbiology*, 117(2), 405–410. <https://doi.org/10.1099/00221287-117-2-405>

- de Carvalho, C. C. C. R. (2016). *Fungi in Fermentation and Biotransformation Systems*. 525–541. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-29137-6\\_21](https://doi.org/10.1007/978-3-319-29137-6_21)
- de Castro Coêlho, M., da Câmara Rocha, J., Augusto Santos, F., Carlos Ramos Gonçalves, J., Maria de Vasconcelos, S., Cristina Soares de Lima Grisi, T., Florentino de Melo Santos, S., Antônio Machado de Araújo, D., & Campos Teixeira de Carvalho-Gonçalves, L. (2021). Use of agroindustrial wastes for the production of cellulases by *Penicillium* sp. FSDE15. *Journal of King Saud University - Science*, 33(6), 101553. <https://doi.org/10.1016/J.JKSUS.2021.101553>
- Detroy, R. W., DeMarini, D. M., & Stil, P. E. (1978). Mycoviruses of *Penicillium stoloniferum*: influence of carbon-nitrogen nutrition upon replication. *Northern Regional Research Center, Agricultural Research Service, U. S. Department of Agriculture, Peoria, IL, U. S. A.*, 947–953.
- Dietsch, R., Jakobs-Schönwandt, D., Grünberger, A., & Patel, A. (2021). Desiccation-tolerant fungal blastospores: From production to application. *Current Research in Biotechnology*, 3, 323–339. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2021.11.005>
- Dijksterhuis, J., & Samson, R. A. (2002). Food and Crop Spoilage on Storage. En *Agricultural Applications* (pp. 39–52). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-03059-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-662-03059-2_3)
- Durán Sequeda, D. E. (2017). *Evaluación de la fuente, concentración y relación de carbono nitrógeno (C:N) sobre la formación de conidios de Penicillium sp. HC1 en medio líquido*.
- Dyer, P. S., & O’Gorman, C. M. (2011a). A fungal sexual revolution: *Aspergillus* and *Penicillium* show the way. *Current Opinion in Microbiology*, 14(6), 649–654. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.10.001>
- Dyer, P. S., & O’Gorman, C. M. (2011b). A fungal sexual revolution: *Aspergillus* and *Penicillium* show the way. *Current Opinion in Microbiology*, 14(6), 649–654. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.10.001>
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., Khardziani, T., & Agathos, S. N. (2009). Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forests of Georgia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(2), 331–339. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9897-x>

- Eriksson, T., Börjesson, J., & Tjerneld, F. (2002). Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(3), 353–364. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00134-5](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00134-5)
- Espinosa Negrín, A. M., López González, L. M., & Casdelo Gutiérrez, N. L. (2022). Pretratamientos aplicados a biomásas lignocelulósicas: una revisión de los principales métodos analíticos utilizados para su evaluación. *Revista Cubana de Química*, 34 (1), 87–110.
- Fernandes, T. V., Klaasse Bos, G. J., Zeeman, G., Sanders, J. P. M., & van Lier, J. B. (2009). Effects of thermo-chemical pre-treatment on anaerobic biodegradability and hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100(9), 2575–2579. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.012>
- Florverde. (2022). *Florverde 25 años trabajando por la sostenibilidad*. Florverde Sustainable Flowers.
- Foster, J. W., McDaniel, L. E., Woodruff, H. B., & Stokes, J. L. (1945). Microbiological Aspects of Penicillin. *Journal of Bacteriology*, 50(3), 365–368. <https://doi.org/10.1128/jb.50.3.365-368.1945>
- Foster, J. W., Woodruff, H. B., & McDaniel, L. E. (1946). Microbiological Aspects of Penicillin. *Journal of Bacteriology*, 51(4), 465–478. <https://doi.org/10.1128/jb.51.4.465-478.1946>
- Frisvad, J. C. (2015). Taxonomy, chemodiversity, and chemoconsistency of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* species. *Frontiers in microbiology*, 5(DEC). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2014.00773>
- Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Larsen, T. O., & Samson, R. A. (2004). Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. En *IN MYCOLOGY* (Vol. 49).
- Frisvad, J. C. (1985). Creatine sucrose agar, a differential medium for mycotoxin producing terverticillate *Penicillium* species. *Letters in Applied Microbiology*, 1(6), 109–113. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1985.tb01500.x>
- García Castillo, C. (2015). *Evaluación del efecto de la luz sobre la morfología, el crecimiento y la conidiogénesis de Penicillium sp. HC1* [Tesis de pregrado en microbiología]. Pontificia Universidad Javeriana.

- García, D. A. (2019). *Producción sostenible en el sector floricultor colombiano*. Semillero de Investigación Desarrollo Sostenible. Fundación Universitaria de la Cámara de Comercio de Bogotá.
- García Mora, A. E. (2006). *Estudio de la degradación de residuos lignocelulósicos derivados del procesamiento industrial del cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.)*. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2006/egg216e/doc/egg216e.pdf>
- García-Rico, R. O., Martín, J. F., & Fierro, F. (2011). Heterotrimeric G $\alpha$  protein Pga1 from *Penicillium chrysogenum* triggers germination in response to carbon sources and affects negatively resistance to different stress conditions. *Fungal Genetics and Biology*, 48(6), 641–649. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.11.013>
- García-Soto, M. J., Botello-Alvarez, E., Jiménez-Islas, H., Navarrete-Bolaños, J. L., Barajas-Conde, E., Rico-Martínez, R., Guevara-González, R. G., & Torres-Pacheco, I. (2006). *Growth morphology and hydrodynamics of filamentous fungi in submerged cultures*.
- Germec, M., & Turhan, I. (2023). Effect of pH control and aeration on inulinase production from sugarbeet molasses in a bench-scale bioreactor. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13(6), 4727–4739. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01436-7>
- Gomes, D. G., Coelho, E., Silva, R., Domingues, L., & Teixeira, J. A. (2023). Bioreactors and engineering of filamentous fungi cultivation. En *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 219–250). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91872-5.00018-1>
- Gupta, R., Mehta, G., Khasa, Y. P., & Kuhad, R. C. (2011). Fungal delignification of lignocellulosic biomass improves the saccharification of cellulose. *Biodegradation*, 22(4), 797–804. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9404-6>
- Gutiérrez, I., Villamil, A., Aguirre Morales, M., Reyes-Pineda, E., Lemos-Gordo, S., Méndez-Pedraza, J., Núñez-Arbeláez, Á., Parra-Fajardo, L., Alfonso-Piragua, A., Avendaño-Herrera, D., Melgarejo, L. M., Camelo, C., & Rodríguez, J. (2012). *Estimación de poblaciones de microorganismos ligninolíticos y celulolíticos y actividad de  $\beta$ -Glucosidasa en agrosistemas de arroz*. (pp. 89–107).
- Gutiérrez Rojas, I. (2017). *Evaluación del efecto de condiciones de cultivo sobre la conidiogénesis en *Penicillium* sp. (HC1)*.

- Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N., & Montoya, D. (2015). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.009>
- Hadley, G., & Harrold, C. E. (1958). The Sporulation of *Penicillium notatum* Westling in Submerged Liquid Culture. *Journal of Experimental Botany*, 9(3), 408–417. <https://doi.org/10.1093/jxb/9.3.408>
- Harvey, L. M., McNeil, B., Berry, D. R., & White, S. (1998). Autolysis in Batch Cultures of *Penicillium Chrysogenum* at Varying Agitation Rates. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(6), 446–458. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(97\)00234-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(97)00234-2)
- Heath, I. B. (1995). Integration and regulation of hyphal tip growth. *Canadian Journal of Botany*, 73(S1), 131–139. <https://doi.org/10.1139/b95-236>
- Houbraken, J., Kocsubé, S., Visagie, C. M., Yilmaz, N., Wang, X.-C., Meijer, M., Kraak, B., Hubka, V., Bensch, K., Samson, R. A., & Frisvad, J. C. (2020). Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in Mycology*, 95, 5–169. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.05.002>
- Houbraken, J., & Samson, R. A. (2011). Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. *Studies in Mycology*, 70, 1–51. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.70.01>
- Howard, R. L., Abotsi, E., Jansen, van R. E. L., & Howard, S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), 602–619. <https://doi.org/10.5897/AJB2003.000-1115>
- Ibba, M., Taylor, S. J. C., Weedon, C. M., & Mantle, P. G. (1987). Submerged Fermentation of *Penicillium paxilli* Biosynthesizing Paxilline, a Process Inhibited by Calcium-induced Sporulation. *Microbiology*, 133(11), 3109–3119. <https://doi.org/10.1099/00221287-133-11-3109>
- Icontec. (2023). *Certificación Florverde*.
- Idárraga, P., & Callejas, P. (2011). Catálogo de plantas vasculares. Análisis florístico de la vegetación del Departamento de Antioquia. *Series Biodiversidad y Recursos Naturales. Universidad de Antioquia, Missouri Botanical Garden & Oficina de planeación departamental de la gobernación de Antioquia, II*.

- Ijadpanahsaravi, M., Punt, M., Wösten, H. A. B., & Teertstra, W. R. (2021). Minimal nutrient requirements for induction of germination of *Aspergillus niger* conidia. *Fungal Biology*, *125*(3), 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.11.004>
- Inch, J. M. M., Humphreys, A. M., Trinci, A. P. J., & Gillespie, A. T. (1986). Growth and blastospore formation by *Paecilomyces fumosoroseus*, a pathogen of brown planthopper (*Nilaparvata lugens*). *Transactions of the British Mycological Society*, *87*(2), 215–222. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(86\)80023-7](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(86)80023-7)
- Issaly, N., Chauveau, H., Aglevor, F., Fargues, J., & Durand, A. (2005). Influence of nutrient, pH and dissolved oxygen on the production of *Metarhizium flavoviride* Mf189 blastospores in submerged batch culture. *Process Biochemistry*, *40*(3–4), 1425–1431. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.029>
- Jackson, M. A., Macguire, M. R., Lacey, L. A., & Wraight, S. P. (1997). Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycological Research*, *101*(1), 35–41., *101*, 35–41.
- Jackson, M. A., & Schisler, D. A. (1992). The Composition and Attributes of *Colletotrichum truncatum* Spores Are Altered by the Nutritional Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*(7), 2260–2265. <https://doi.org/10.1128/aem.58.7.2260-2265.1992>
- Jin, Z., Hou, Q., & Niu, T. (2020). Effect of cultivating *Pleurotus ostreatus* on substrates supplemented with herb residues on yield characteristics, substrates degradation, and fruiting bodies' properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *100*(13), 4901–4910. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10551>
- Jung, B., Kim, S., & Lee, J. (2014). Microcycle Conidiation in Filamentous Fungi. *Mycobiology*, *42*(1), 1–5. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2014.42.1.1>
- K., M., R.R., R., K., M., C., L. A., & N., G. (2014). Effect of co-culturing of cellulolytic fungal isolates for degradation of lignocellulosic material. *Journal of Yeast and Fungal Research*, *5*(3), 31–38. <https://doi.org/10.5897/JYFR2014.0134>
- Kirk, T. K., & Farrell, R. L. (1987). Enzymatic “Combustion”: The Microbial Degradation of Lignin. *Annual Review of Microbiology*, *41*(1), 465–501. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.002341>

- Kobori, N. N., Mascarín, G. M., Jackson, M. A., & Schisler, D. A. (2015). Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biology*, *119*(4), 179–190. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.12.005>
- Krull, R., Wucherpennig, T., Esfandabadi, M. E., Walisko, R., Melzer, G., Hempel, D. C., Kampen, I., Kwade, A., & Wittmann, C. (2013). Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. *Journal of biotechnology*, *163*(2), 112–123. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2012.06.024>
- Lange, M., & Peiter, E. (2020). Calcium Transport Proteins in Fungi: The Phylogenetic Diversity of Their Relevance for Growth, Virulence, and Stress Resistance. *Frontiers in Microbiology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03100>
- Larroche, C., & Gros, J. B. (1997). Special transformation processes using fungal spores and immobilized cells. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, *55*, 179–220. <https://doi.org/10.1007/BFB0102066>
- Ma, Q., Zhou, W., Du, X., Huang, H., & Gong, Z. (2023). Combined dilute sulfuric acid and Tween 80 pretreatment of corn stover significantly improves the enzyme digestibility: Synergistic removal of hemicellulose and lignin. *Bioresource Technology*, *382*, 129218. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129218>
- Macías Camacho, J. G. (2017). *Modelo macro cinético de la producción de conidios en fermentación sumergida por lotes a partir de Penicillium pinophilum*.
- Maiorano, A. E., da Silva, E. S., Perna, R. F., Ottoni, C. A., Piccoli, R. A. M., Fernandez, R. C., Maresma, B. G., & de Andrade Rodrigues, M. F. (2020). Effect of agitation speed and aeration rate on fructosyltransferase production of *Aspergillus oryzae* IPT-301 in stirred tank bioreactor. *Biotechnology Letters*, *42*(12), 2619–2629. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-03006-9>
- Malloch, D., & Cain, R. F. (1972). The Trichocomataceae: Ascomycetes with *Aspergillus*, *Paecilomyces*, and *Penicillium* imperfect states. *Canadian Journal of Botany*, *50*(12), 2613–2628. <https://doi.org/10.1139/B72-335>
- Martínez, Á. T., Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, M. J., del Río, J. C., & Gutiérrez, A. (2009). Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. *Current Opinion in Biotechnology*, *20*(3), 348–357. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.05.002>

- Martínez Benítez, E. (2003). *Estudio de especies micotoxígenas del genero Penicillium: Penicillium verrucosum Dierckx*. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Mejía Rivera, C. del M. (2021). *Evaluación de lignina como precursor para el desarrollo de electrodos de supercondensadores*. Universidad Pontificia Bolivariana.
- Méndez Zavala, A., Contreras Esquivel, J. C., Lara Victoriano, F., Rodríguez Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2007). Producción fungica de un pigmento rojo empleando la cepa xerofílica *Penicillium purpurogenum* GH-2. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6, 267–273.
- Mendonça Maciel, M. J., Castro e Silva, A., & Telles Ribeiro, H. C. (2010). Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: a review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(6), 0–0. <https://doi.org/10.2225/vol13-issue6-fulltext-2>
- Minagricultura. (2020). *Cadena de Flores, Follajes y Ornamentales*.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2020). *Informe de rendición de cuentas 2019 - 2020*.
- Montero, H., Vera, M., & García, A. (2019). *Síntesis de los indicadores asociados a la generación de residuos*.
- Montero Sánchez, H. F., & Quintero Cardoso, J. (2010). Guías de buenas prácticas ambientales para cultivos de flores y ornamentales. *Asocoflores y MAVDT*.
- Morton. (1961). The induction of sporulation in mould fungi. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 153(953), 548–569. <https://doi.org/10.1098/rspb.1961.0018>
- Moss, M. O. (1987). Morphology and Physiology of *Penicillium* and *Acremonium*. En *Penicillium and Acremonium* (pp. 37–71). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1986-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1986-1_2)
- Mukherjee, S., & Ghorai, S. (2023). Fungal biology. En *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 67–104). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91872-5.00017-X>
- Nugrahini, A. D., Kurniawan, M. P., & Kinasih, D. A. (2022). Development of lignocellulose-based bioethanol from chrysanthemum flower waste

- (Chrysanthemum sp.). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 963(1), 012017. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/963/1/012017>
- Ospina, A., & Piñeros, Y. (2007). *Estudio de la producción de ligninasas a partir del cultivo de Pleuoruts sp. sobre residuos de palma, efecto del pH y la temperatura*. Universidad Jorge Tadeo Lozano.
- Paixão, F. R. S., Fernandes, É. K. K., & Pedrini, N. (2019). *Thermotolerance of Fungal Conidia* (pp. 185–196). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-23045-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-030-23045-6_6)
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, 22(3), 189–259. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.09.005>
- Park, H. S., & Yu, J. H. (2012). Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. *Current Opinion in Microbiology*, 15(6), 669–677. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2012.09.006>
- Pascual, S., Melgarejo, P., & Magan, N. (1997). Induction of submerged conidiation of the biocontrol agent *Penicillium oxalicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48(3), 389–392. <https://doi.org/10.1007/s002530051068>
- Patel, G., Patil, M. D., Soni, S., Khobragade, T. P., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2016). Production of mycophenolic acid by *Penicillium brevicompactum*—A comparison of two methods of optimization. *Biotechnology Reports*, 11, 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.07.003>
- Pazout, J., & Schroder, P. (1988). Microcycle Conidiation in Submerged Cultures of *Penicillium cyclopium* Attained without Temperature Changes. *Microbiology*, 134(10), 2685–2692. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-10-2685>
- Pedraza-Zapata, D. C., Sánchez-Garibello, A. M., Quevedo-Hidalgo, B., Moreno-Sarmiento, N., & Gutiérrez-Rojas, I. (2017). Promising cellulolytic fungi isolates for rice straw degradation. *Journal of Microbiology*, 55(9), 711–719. <https://doi.org/10.1007/S12275-017-6282-1/METRICS>
- Pereira, P. C. G., Parente, C. E. T., Carvalho, G. O., Torres, J. P. M., Meire, R. O., Dorneles, P. R., & Malm, O. (2021). A review on pesticides in flower production: A push to reduce human exposure and environmental contamination. *Environmental Pollution*, 289, 117817. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117817>

- Pirt, S. J., & Callow, D. S. (1959). Continuous-Flow Culture of the Filamentous Mould *Penicillium Chrysogenum* and the Control of its Morphology. *Nature*, *184*(4683), 307–310. <https://doi.org/10.1038/184307a0>
- Pitt, D., & Mosley, M. J. (1986). Oxidation of carbon sources via the tricarboxylic acid cycle during calcium-induced conidiation of *Penicillium notatum*. *Antonie van Leeuwenhoek*, *52*(6), 467–482. <https://doi.org/10.1007/BF00423408>
- Pitt, & Poole, P. C. (1981). Calcium-induced conidiation in *Penicillium notatum* in submerged culture. *Transactions of the British Mycological Society*, *76*(2), 219–230. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(81\)80142-8](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(81)80142-8)
- Pitt, & Hocking, A. D. (2009). Fungi and food spoilage. En *Fungi and Food Spoilage*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>
- Podrepšek, G. H., Knez, Ž., & Leitgeb, M. (2023). Industrial production of enzymes for use in animal-feed bioprocessing. En *Valorization of Biomass to Bioproducts* (pp. 349–387). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822887-6.00019-X>
- Porto de Souza Vandenberghe, L., Wedderhoff Herrmann, L., de Oliveira Penha, R., Murawski de Mello, A. F., Martínez-Burgos, W. J., Magalhães Junior, A. I., de Souza Kirnev, P. C., de Carvalho, J. C., & Soccol, C. R. (2022). Engineering aspects for scale-up of bioreactors. En *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 59–85). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91167-2.00002-2>
- Prinsen, P. (2010). *Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas* [Tesis de maestría en Estudios Avanzados en Química]. Universidad de Sevilla.
- Procolombia. (2019). *Procolombia. Exportaciones Turismo Inversión Marca País. ¿Cómo funciona el sector floricultor en Colombia?*
- Punt, M., Teertstra, W. R., & Wösten, H. A. B. (2022). *Penicillium roqueforti* conidia induced by L-amino acids can germinate without detectable swelling. *Antonie van Leeuwenhoek*, *115*(1), 103–110. <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01686-5>
- Qi, J., Zhang, X., Zhou, Y., Zhang, C., Wen, J., Deng, S., Luo, B., Fan, M., & Xia, Y. (2023). Selectively enzymatic conversion of wood constituents with white and brown

- rot fungi. *Industrial Crops and Products*, 199, 116703. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116703>
- Quevedo Hidalgo, B. E. (2011). *Evaluación de la degradación de residuos de floricultura para la obtención de azúcares con el uso de tres hongos lignocelulolíticos*. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/9578>
- Quevedo-Hidalgo, B., Narváez-Rincón, P. C., Pedroza-Rodríguez, A. M., & Velásquez-Lozano, M. E. (2014). Production of lignocellulolytic enzymes from floriculture residues using *Pleurotus ostreatus*. *Universitas Scientiarum*, 20(1), 117. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC20-1.eple>
- R, K. C., M, Y. A., M, A. M., V, R. O., & Ch, L. C. (2017). Residuos agroindustriales su impacto, manejo y aprovechamiento. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 9(S1), 122–132. <https://doi.org/10.24188/RECIA.V9.NS.2017.530>
- Rangel Ortega, S. X. (2012). *Estudio del efecto de enzimas ligninolíticas y celulolíticas obtenidas del hongo Pleurotus ostreatus sobre una gramínea forrajera tropical*.
- Reddy, A. S. N., Ali, G. S., Celesnik, H., & Day, I. S. (2011). Coping with Stresses: Roles of Calcium- and Calcium/Calmodulin-Regulated Gene Expression. *The Plant Cell*, 23(6), 2010–2032. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.084988>
- Refai, M., Abo El-Yazid, H., & Tawakkol, W. (2015). *The genus Penicillium A guide for historical, classification and identification of penicilli, their industrial applications and detrimental effects*. <https://matteroffactsblog.wordpress.com/.../ancient-egyptians-used-pencil...>
- Rengifo, L. R., Rosas, P., Méndez, N., Ludeña, Y., Sirvas, S., Samolski, I., & Villena, G. K. (2022). Comparison of Pigment Production by Filamentous Fungal Strains under Submerged (SmF) and Surface Adhesion Fermentation (SAF). *Journal of Fungi*, 9(1), 48. <https://doi.org/10.3390/jof9010048>
- Rho, Y. T. (2011). Effects of carbon and nitrogen sources on immunosuppressant mycophenolic acid fermentation by *Penicillium brevi-compactum*. *The Korean Journal of Microbiology*.
- Roberto-López, N. D. (2013). Composición química y evaluación de degradabilidad de residuos tóxicos de un núcleo ensilado a base de desechos de clavel. *CIENCIA Y AGRICULTURA*, 10(1), 9. <https://doi.org/10.19053/01228420.2823>

- Rodríguez, D., & Romero, K. (2014). *Evaluación del efecto de inductores sobre la conidiogénesis de Penicillium sp. HC1 en medio líquido* [Tesis de pregrado microbiología]. Pontificia Universidad Javeriana .
- Rodríguez Porcel, E. M., Casas López, J. L., Sánchez Pérez, J. A., Fernández Sevilla, J. M., & Chisti, Y. (2023). Effects of pellet morphology on broth rheology in fermentations of *Aspergillus terreus*. *Biochemical Engineering Journal*, 26(2–3), 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.04.011>
- Rodríguez Sánchez, I. J., & Rodríguez Alfonso, M. A. (2017). *Evaluación in vitro de actividades directas de promoción de crecimiento vegetal de Penicillium sp. HC1*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Rojas, L. (2011). *Evaluación de pre-tratamientos biológicos y térmicos previos a la hidrólisis enzimática de fibra prensada de palma, para la producción de azúcares fermentables*. [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional de Colombia.
- Roncal, T., & Ugalde, U. (2003). Conidiation induction in *Penicillium*. *Research in Microbiology*, 154(8), 539–546. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00168-2](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00168-2)
- Roy, A., Kumar, A., Baruah, D., & Tamuli, R. (2021). Calcium signaling is involved in diverse cellular processes in fungi. *Mycology*, 12(1), 10–24. <https://doi.org/10.1080/21501203.2020.1785962>
- Saha, B. C. (2004). *Lignocellulose Biodegradation and Applications in Biotechnology* (B. C. Saha & K. Hayashi, Eds.; Vol. 889). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-2004-0889>
- Samson, R. A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J. C., & Andersen, B. (2010). *Food and Indoor Fungi*. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. <https://pure.knaw.nl/portal/en/publications/food-and-indoor-fungi>
- Samson, R. A., Yilmaz, N., Houbraken, J., Spierenburg, H., Seifert, K. A., Peterson, S. W., Varga, J., & Frisvad, J. C. (2011). Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Studies in Mycology*, 70, 159–183. <https://doi.org/10.3114/sim.2011.70.04>
- Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27(2), 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>

- Sánchez Garibello, A. M. (2013). *Evaluación de la degradación del tamo de arroz por hongos celulolíticos aislados de suelos de cultivo de arroz*. Universidad Nacional de Colombia.
- Sánchez Rodríguez, L. (2012). *Evaluación cuantitativa de la degradación del tamo de arroz empleando microorganismos nativos lignocelulolíticos*. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
- Santos, A. L. F., Kawase, K. Y. F., & Coelho, G. L. V. (2011). Enzymatic saccharification of lignocellulosic materials after treatment with supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 56(3), 277–282. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2010.10.044>
- Santos Díaz, A. M., Grijalba Bernal, E. P., Torres Torres, L., & Uribe Gutiérrez, L. A. (2022). *Plaguicidas microbianos: control y aseguramiento de calidad*. Corporación colombiana de investigación agropecuaria - AGROSAVIA. <https://doi.org/10.21930/agrosavia.manual.7405125>
- Santos Ríos, E. G. (2021). *Aprovechamiento de los residuos generados en la industria de la floricultura para la producción de etanol y furfural*.
- Santos-Ebinuma, V. C., Roberto, I. C., Simas Teixeira, M. F., & Pessoa, A. (2013). Improving of red colorants production by a new *Penicillium purpurogenum* strain in submerged culture and the effect of different parameters in their stability. *Biotechnology Progress*, 29(3), 778–785. <https://doi.org/10.1002/btpr.1720>
- Santoyo, F., González, A. E., Terrón, M. C., Ramírez, L., & Pisabarro, A. G. (2008). Quantitative linkage mapping of lignin-degrading enzymatic activities in *Pleurotus ostreatus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(2), 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.11.007>
- Scervino, J. M., Papinutti, V. L., Godoy, M. S., Rodriguez, M. A., Della Monica, I., Recchi, M., Pettinari, M. J., & Godeas, A. M. (2011). Medium pH, carbon and nitrogen concentrations modulate the phosphate solubilization efficiency of *Penicillium purpurogenum* through organic acid production. *Journal of Applied Microbiology*, 110(5), 1215–1223. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04972.x>
- Schisler, D. A. (1991). Influence of Nutrition During Conidiation of *Colletotrichum truncatum* on Conidial Germination and Efficacy in Inciting Disease in *Sesbania exaltata*. *Phytopathology*, 81(4), 458. <https://doi.org/10.1094/Phyto-81-458>

- Seydametova, E., & Zainol, N. (2021). Morphological, physiological, biochemical and molecular characterization of statin-producing *Penicillium* microfungi isolated from little-explored tropical ecosystems. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100044. <https://doi.org/10.1016/J.CRMICR.2021.100044>
- Shora, H., Metwally, M., & Zaki, M. (2021). Optimization of L-glutaminase production by *Penicillium chrysogenum*. *THE EGYPTIAN JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY (Botany)*, 17(2), 157. <https://doi.org/10.5455/egyjeb.20211118082536>
- Singh, R. S., Chauhan, K., & Pandey, A. (2019). Influence of aeration, agitation and process duration on fungal inulinase production from paneer whey in a stirred tank reactor. *Bioresource Technology Reports*, 8, 100343. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100343>
- Singhal, V., & Rathore, V. S. (2001). Effects of Zn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> on growth, lignin degradation and ligninolytic enzymes in *Phanerochaete chrysosporium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(3), 235–240. <https://doi.org/10.1023/A:1016617025769>
- Somogy, M. (1952). Notes on sugar determination. *The Journal of Biological Chemistry*, 195, 19–23.
- Spalding, D. H., & Lieberman, M. (1965). Factors affecting the production of ethylene by *Penicillium digitatum*. *Plant Physiology*, 40(4), 645–648. <https://doi.org/10.1104/pp.40.4.645>
- Stamatiu Sánchez, K., Alarcón, A., Ferrera Cerrato, R., Nava Díaz, C., Sánchez Escudero, J., Cruz Sánchez, J. S., & Castillo, M. de P. (2015). Tolerancia de hongos filamentosos a endosulfán, clorpirifós y clorotalonil en condiciones in vitro. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 31.
- Su, Y. C. (1983). Fermentative Production of Ankapigments (Monascus-pigments). *Korean Journal of Applied Microbiology and Bioengineering*, 11, 325–337.
- Sun, Y., & Cheng, J. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- Swain, S. S., Rout, Y., Sahoo, P. B., & Nayak, S. (2023). Microbial perspectives for the agricultural soil health management in mountain forests under climatic stress. *En*

- Understanding Soils of Mountainous Landscapes* (pp. 59–90). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95925-4.00006-6>
- Tang, Z.-Y., Li, L., Tang, W., Shen, J.-W., Yang, Q.-Z., Ma, C., & He, Y.-C. (2023). Significantly enhanced enzymatic hydrolysis of waste rice hull through a novel surfactant-based deep eutectic solvent pretreatment. *Bioresource Technology*, *381*, 129106. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.129106>
- Taniguchi, M., Suzuki, H., Watanabe, D., Sakai, K., Hoshino, K., & Tanaka, T. (2005). Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *100*(6), 637–643. <https://doi.org/10.1263/jbb.100.637>
- Tibasosa Rodríguez, G. (2014). *Evaluación del efecto de fuentes de carbono y de nitrógeno sobre la conidiogénesis de Penicillium sp. HC1 en medio sólido y líquido*.
- Tinoco, Pickard, & Vazquez-Duhalt. (2001). Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Letters in Applied Microbiology*, *32*(5), 331–335. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00913.x>
- Tisi, R., Rigamonti, M., Groppi, S., & Belotti, F. (2016). Calcium homeostasis and signaling in fungi and their relevance for pathogenicity of yeasts and filamentous fungi. *AIMS Molecular Science*, *3*(4), 505–549. <https://doi.org/10.3934/molsci.2016.4.505>
- Tlecuitl-Beristain, S., Viniegra-González, G., Díaz-Godínez, G., & Loera, O. (2010). Medium Selection and Effect of Higher Oxygen Concentration Pulses on *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* Conidial Production and Quality. *Mycopathologia*, *169*(5), 387–394. <https://doi.org/10.1007/s11046-009-9268-7>
- Torres-García, D., Gené, J., & García, D. (2022). New and interesting species of *Penicillium* (Eurotiomycetes, Aspergillaceae) in freshwater sediments from Spain. *MycKeys*, *86*, 103–145. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.86.73861>
- Ugalde, U. O., & Pitt, D. (1986). Calcium uptake kinetics in relation to conidiation in submerged cultures of *Penicillium cyclopium*. *Transactions of the British Mycological Society*, *87*(2), 199–203. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(86\)80021-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(86)80021-3)

- Ugalde, U. O., Virto, M. D., & Pitt, D. (1990). Calcium binding and induction of conidiation in protoplasts of *Penicillium cyclopium*. *Antonie van Leeuwenhoek*, *57*(1), 43–49. <https://doi.org/10.1007/BF00400335>
- Ugalde, U., & Pitt, D. (1983). Morphology and calcium-induced conidiation of *Penicillium cyclopium* in submerged culture. *Transactions of the British Mycological Society*, *80*(2), 319–325. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(83\)80016-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(83)80016-3)
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science*, *74*(10), 3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Vargas Corredor, Y. A., & Pérez Pérez, L. I. (2018). Aprovechamiento de residuos agroindustriales para el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, *14*(1), 59–72. <https://doi.org/10.18359/rfcb.xxxx>
- Vargas Rodríguez, Á. A., & Romero Gutiérrez, C. C. (2009). *Evaluación del efecto de la aplicación de un residuo vegetal de crisantemo degradado por Pleurotus ostreatus en un proceso de compostaje en microcosmos*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Villarreal Usaquén, K. N. (2022). Estrategias de contribución al desarrollo sostenible en el sector floricultor colombiano. *Universidad Militar Nueva Granada. Facultad de Ingeniería*.
- Visagie, C. M., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., Seifert, K. A., Varga, J., Yaguchi, T., & Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology*, *78*(1), 343–371. <https://doi.org/10.1016/J.SIMYCO.2014.09.001>
- Vogl, C., Klein, C. M., Batke, A. F., Schweingruber, M. E., & Stolz, J. (2008). Characterization of Thi9, a Novel Thiamine (Vitamin B1) Transporter from *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(12), 7379–7389. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708275200>
- Vrabl, P., Fuchs, V., Pichler, B., Schinagl, C. W., & Burgstaller, W. (2012). Organic Acid Excretion in *Penicillium ochrochloron* Increases with Ambient pH. *Frontiers in Microbiology*, *3*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00121>

- Wang, H., Chen, Q., Zhang, S., & Lu, L. (2021). A Transient Receptor Potential-like Calcium Ion Channel in the Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*. *Journal of Fungi*, 7(11), 920. <https://doi.org/10.3390/jof7110920>
- Warren, S. J., Keshavarz-Moore, E., Shamlou, P. A., Lilly, M. D., Thomas, C. R., & Dixon, K. (1995). Rheologies and morphologies of three actinomycetes in submerged culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 45(1), 80–85. <https://doi.org/10.1002/bit.260450111>
- Wu, W., Li, P., Huang, L., Wei, Y., Li, J., Zhang, L., & Jin, Y. (2023). The Role of Lignin Structure on Cellulase Adsorption and Enzymatic Hydrolysis. *Biomass*, 3(1), 96–107. <https://doi.org/10.3390/biomass3010007>
- Xu, H., & Hosen, Y. (2010). Effects of soil water content and rice straw incorporation in the fallow season on CH<sub>4</sub> emissions during fallow and the following rice-cropping seasons. *Plant and Soil*, 335(1–2), 373–383. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0426-y>
- Yepes Maya, D. M., & Chejne Janna, F. (2012). *Gasificación de biomasa residual en el sector floricultor, caso: Oriente Antioqueño* Gasification of waste biomass in the flower industry, case: Eastern Antioquia.
- Zambrano Arcentales, M. A. (2017). *Formación de un complejo enzimático lignocelulolítico a partir de hongos de pudrición de la madera para hidrolizar paja de trigo*. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/144760>
- Zeidler, G., & Margalith, P. (1973). Modification of the sporulation cycle in *Penicillium digitatum* (Sacc.). *Canadian Journal of Microbiology*, 19(4), 481–483. <https://doi.org/10.1139/m73-077>
- Zhai, R., Hu, J., & Saddler, J. N. (2018). The inhibition of hemicellulosic sugars on cellulose hydrolysis are highly dependant on the cellulase productive binding, processivity, and substrate surface charges. *Bioresource Technology*, 258, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.12.006>
- Zhang, Y., & Yamaura, K. (2020). Transcriptome Analysis of White-Rot Fungi in Response to Lignocellulose or Lignocellulose-Derived Material Using RNA Sequencing Technology. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 11(08), 355–368. <https://doi.org/10.4236/abb.2020.118025>

- 
- Zhang, Y.-H. P., & Lynd, L. R. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*, *88*(7), 797–824. <https://doi.org/10.1002/bit.20282>
- Zhou, Y., Han, L.-R., He, H.-W., Sang, B., Yu, D.-L., Feng, J.-T., & Zhang, X. (2018). Effects of Agitation, Aeration and Temperature on Production of a Novel Glycoprotein GP-1 by *Streptomyces kanasensis* ZX01 and Scale-Up Based on Volumetric Oxygen Transfer Coefficient. *Molecules*, *23*(1), 125. <https://doi.org/10.3390/molecules23010125>



## A. Anexo: Medios de cultivo

### Medio caldo arroz

Componente	Concentración [g/L]
Harina de arroz	20
Triptosa	5
Sacarosa	15

pH = 6,0

### Medio base - MB

Componente	Concentración [g/L]
Sacarosa	20
NH <sub>4</sub> Cl	2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
KCl	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
CaCO <sub>3</sub>	0,5
Harina de arroz	2,8
Solución de microelementos	0,1
Aceite de silicona	0,3

pH = 5,5 – 6,0

### Solución de microelementos

Componente	Concentración [g/L]
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	5
Ácido bórico	3
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,01

CuSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,15
MnSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,45
CoCl <sub>2</sub> o CoSO <sub>4</sub>	0,2

En solución 0,1 N de HCl

### Medios para la evaluación del calcio

Componente	1 [g/L]	2 [g/L]	3 [g/L]
Sacarosa	20	20	20
NH <sub>4</sub> Cl	2	2	2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5	0,5	0,5
KCl	0,5	0,5	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	1	1
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>6</b>
Harina de arroz	2,8	2,8	2,8
Solución de microelementos	0,1	0,1	0,1
Aceite de silicona	0,3	0,3	0,3
pH = 5,5 – 6,0			

### Medios para la evaluación de casaminoácidos

#### MAC – E1

Componente	Concentración [g/L]
<b>Glucosa</b>	<b>8</b>
<b>Casaminoácidos</b>	<b>1,3</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,3
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,4
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,014
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,016
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,05

CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,037
Tiamina	0,5
Riboflavina	0,5
Pantotenato	0,5
Niacina	0,5
Piridoxamina	0,5
Ácido tiótico	0,5
Ácido fólico	0,05
Biotina	0,05
Vitamina B <sub>12</sub>	0,05

**MBC – E1**

Componente	Concentración [g/L]
<b>Glucosa</b>	<b>8</b>
<b>Casaminoácidos</b>	<b>1,3</b>
NH <sub>4</sub> Cl	2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
KCl	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
CaCO <sub>3</sub>	0,5
Harina de arroz	2,8
Solución de microelementos	0,1
Aceite de silicona	0,3
pH = 5,5 – 6,0	

**MAC – E2**

Componente	Concentración [g/L]
<b>Glucosa</b>	<b>8</b>
<b>Casaminoácidos</b>	<b>13</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,3
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,4

ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,014
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,016
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,05
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,037
Tiamina	0,5
Riboflavina	0,5
Pantotenato	0,5
Niacina	0,5
Piridoxamina	0,5
Ácido tiótico	0,5
Ácido fólico	0,05
Biotina	0,05
Vitamina B <sub>12</sub>	0,05

**MBC – E2**

Componente	Concentración [g/L]
<b>Glucosa</b>	<b>8</b>
<b>Casaminoácidos</b>	<b>13</b>
NH <sub>4</sub> Cl	2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
KCl	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
CaCO <sub>3</sub>	0,5
Harina de arroz	2,8
Solución de microelementos	0,1
Aceite de silicona	0,3
pH = 5,5 – 6,0	

**MBAP**

Componente	Concentración [g/L]
Glucosa	8
<b>Aminoácidos de prueba</b>	<b>13</b>
NH <sub>4</sub> Cl	2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5

KCl	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
CaCO <sub>3</sub>	0,5
Harina de arroz	2,8
Solución de microelementos	0,1
Aceite de silicona	0,3

---

pH = 5,5 – 6,0

---

### MBC VIT

Componente	Concentración [g/L]
<b>Glucosa</b>	<b>8</b>
<b>Casaminoácidos</b>	<b>13</b>
NH <sub>4</sub> Cl	2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
KCl	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
CaCO <sub>3</sub>	0,5
Harina de arroz	2,8
Solución de microelementos	0,1
Aceite de silicona	0,3
<b>Tiamina</b>	<b>0,5</b>
<b>Riboflavina</b>	<b>0,5</b>
<b>Pantotenato</b>	<b>0,5</b>
<b>Niacina</b>	<b>0,5</b>
<b>Piridoxamina</b>	<b>0,5</b>
<b>Ácido tiótico</b>	<b>0,5</b>
<b>Ácido fólico</b>	<b>0,05</b>
<b>Biotina</b>	<b>0,05</b>
<b>Vitamina B<sub>12</sub></b>	<b>0,05</b>

---

pH = 5,5 – 6,0

---

### MBAP VIT

Componente	Concentración [g/L]
<b>Glucosa</b>	<b>8</b>
<b>Aminoácidos de prueba</b>	<b>13</b>
NH <sub>4</sub> Cl	2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5
KCl	0,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
CaCO <sub>3</sub>	0,5
Harina de arroz	2,8
Solución de microelementos	0,1
Aceite de silicona	0,3
<b>Tiamina</b>	<b>0,5</b>
<b>Riboflavina</b>	<b>0,5</b>
<b>Pantotenato</b>	<b>0,5</b>
<b>Niacina</b>	<b>0,5</b>
<b>Piridoxamina</b>	<b>0,5</b>
<b>Ácido tiótico</b>	<b>0,5</b>
<b>Ácido fólico</b>	<b>0,05</b>
<b>Biotina</b>	<b>0,05</b>
<b>Vitamina B<sub>12</sub></b>	<b>0,05</b>
pH = 5,5 – 6,0	

### Medios para la evaluación de la degradación

#### Medio salvado de trigo

Componente	Concentración [g/L]
Glucosa	20
Triptosa	5
Extracto de levadura	2
Sulfato de magnesio	3,07
Salvado de trigo	20
Agar - Agar	20
pH = 6,0	

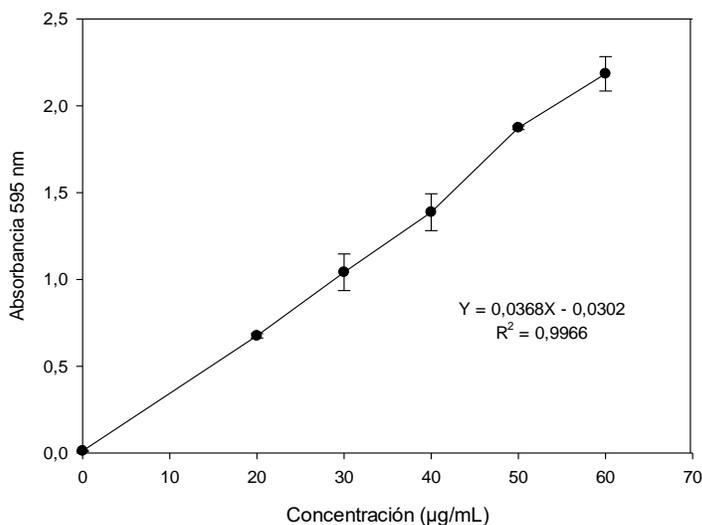
**Solución de sales para microcosmos**

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,83 g/L
KCl	0,30 g/L
FeSO <sub>4</sub>	0,005 g/L
MnSO <sub>4</sub>	1,56 mg/L
ZnSO <sub>4</sub>	1,40 mg/L
Tween 80	0,20 mL/L

pH = 6,0

## B. Anexo: Curva de calibración Nelson y Somogy

Para la elaboración de la curva de calibración se prepara una solución madre de glucosa 100 µg/mL a partir de la cual se realizan diluciones. A cada una de ellas, se agregan las soluciones de Somogy I y II, se pasan a baño maría de 90°C por media hora y luego se agrega la solución de Nelson, se deja en oscuridad por 24 horas y finalmente se toman los datos de la absorbancia. Se grafican los resultados obtenidos y se hace la regresión lineal correspondiente obteniendo la ecuación de absorbancia (Y) en términos de la concentración de glucosa (X).



La ecuación despejada para la curva obtenida con los reactivos utilizados es

$$\text{Concentración glucosa } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}\right) = \frac{\text{Abs} + 0,0302}{0,0368} \quad (1.1)$$

## C. Anexo: Resultados de la caracterización de las muestras de residuos de clavel después de los tratamientos

### Resultados tratamiento 0

ANÁLISIS	REPORTE	REPORTE	ANÁLISIS	REPORTE	REPORTE
	(Base húmeda)	(Base seca)		(Base húmeda)	(Base seca)
<b>MATERIA SECA (%)<sup>1</sup></b>	<b>12.9</b>		DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE LA MS (%) <sup>4</sup>		
NITROGENO (%) <sup>1</sup>			DIGESTIBILIDAD <i>IN SITU</i> DE LA MS (%)		
PROTEÍNA CRUDA (Nx6.25) (%) <sup>1</sup>			DIGESTIBILIDAD EN PEPSINA 0.2 (%)		
NITROGENO NO PROTEICO (%PC) <sup>2</sup>			CALCIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO SOLUBLE (%PC) <sup>2</sup>			FOSFORO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDA (%) <sup>2</sup>			POTASIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDN (%) <sup>2</sup>			MAGNESIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDN (%PC) <sup>2</sup>			SODIO (%) <sup>1</sup>		
FIBRA CRUDA (%) <sup>1</sup>			MANGANESO (mg/kg) <sup>1</sup>		
FIBRA EN DETERGENTE NEUTRO (%) <sup>3</sup>			CROMO (%) <sup>1</sup>		
<b>FIBRA EN DETERGENTE ACIDO (%)<sup>3</sup></b>	<b>4.4</b>	<b>34.3</b>	ZINC (mg/kg) <sup>1</sup>		
<b>LIGNINA (%)<sup>3</sup></b>	<b>0.9</b>	<b>7.01</b>	COBRE (mg/Kg) <sup>1</sup>		
HEMICELULOSA (%) <sup>3</sup>			COBALTO (mg/Kg) <sup>1</sup>		
EXTRACTO ETereo (%) <sup>1</sup>			HIERRO (mg/Kg) <sup>1</sup>		
CENIZAS (%) <sup>1</sup>			ENERGIA BRUTA (Mcal/kg)		
pH			AZUFRE		

#### REFERENCIAS

- 1 AOAC 1996. Official Methods of analysis of the Association of Analytical Chemists, (14 th ed)
- 2 Animal Feed Science and Technology (1996) 57:347-348
- 3 Journal of Dairy Science (1991) 74:3583-3597
- 4 Tilley and Terry, 1963. Modificado por la Universidad de Nebraska, Manual de Laboratorio Universidad de Nebraska
- 5 Manual de métodos fisicoquímicos para el control de calidad de la leche y sus derivados. ICONTEC  
ND= No detectable

### Resultados tratamiento 1

ANÁLISIS	REPORTE	REPORTE	ANÁLISIS	REPORTE	REPORTE
	(Base húmeda)	(Base seca)		(Base húmeda)	(Base seca)
<b>MATERIA SECA (%)<sup>1</sup></b>	<b>10.4</b>		DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE LA MS (%) <sup>4</sup>		
NITROGENO (%) <sup>1</sup>			DIGESTIBILIDAD <i>IN SITU</i> DE LA MS (%)		
PROTEÍNA CRUDA (Nx6.25) (%) <sup>1</sup>			DIGESTIBILIDAD EN PEPSINA 0.2 (%)		
NITROGENO NO PROTEICO (%PC) <sup>2</sup>			CALCIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO SOLUBLE (%PC) <sup>2</sup>			FOSFORO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDA (%) <sup>2</sup>			POTASIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDN (%) <sup>2</sup>			MAGNESIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDN (%PC) <sup>2</sup>			SODIO (%) <sup>1</sup>		
FIBRA CRUDA (%) <sup>1</sup>			MANGANESO (mg/kg) <sup>1</sup>		
FIBRA EN DETERGENTE NEUTRO (%) <sup>3</sup>			CROMO (%) <sup>1</sup>		
<b>FIBRA EN DETERGENTE ACIDO (%)<sup>3</sup></b>	<b>4.7</b>	<b>45.2</b>	ZINC (mg/kg) <sup>1</sup>		
<b>LIGNINA (%)<sup>3</sup></b>	<b>1.4</b>	<b>13.2</b>	COBRE (mg/Kg) <sup>1</sup>		
HEMICELULOSA (%) <sup>3</sup>			COBALTO (mg/Kg) <sup>1</sup>		
EXTRACTO ETereo (%) <sup>1</sup>			HIERRO (mg/Kg) <sup>1</sup>		
CENIZAS (%) <sup>1</sup>			ENERGIA BRUTA (Mcal/kg)		
pH			AZUFRE		

#### REFERENCIAS

- 1 AOAC 1996. Official Methods of analysis of the Association of Analytical Chemists, (14 th ed)
- 2 Animal Feed Science and Technology (1996) 57:347-348
- 3 Journal of Dairy Science (1991) 74:3583-3597
- 4 Tilley and Terry, 1963. Modificado por la Universidad de Nebraska, Manual de Laboratorio Universidad de Nebraska
- 5 Manual de métodos fisicoquímicos para el control de calidad de la leche y sus derivados. ICONTEC  
ND= No detectable

## Resultados tratamiento 2

ANÁLISIS	REPORTE	REPORTE	ANÁLISIS	REPORTE	REPORTE
	(Base húmeda)	(Base seca)		(Base húmeda)	(Base seca)
<b>MATERIA SECA (%)<sup>1</sup></b>	<b>9,8</b>		DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE LA MS (%) <sup>4</sup>		
NITROGENO (%) <sup>1</sup>			DIGESTIBILIDAD <i>IN SITU</i> DE LA MS (%)		
PROTEINA CRUDA (Nx6.25) (%) <sup>1</sup>			DIGESTIBILIDAD EN PEPSINA 0.2 (%)		
NITROGENO NO PROTEICO (%PC) <sup>2</sup>			CALCIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO SOLUBLE (%PC) <sup>2</sup>			FOSFORO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDA (%) <sup>2</sup>			POTASIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDN (%) <sup>2</sup>			MAGNESIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDN (%PC) <sup>2</sup>			SODIO (%) <sup>1</sup>		
FIBRA CRUDA (%) <sup>1</sup>			MANGANESO (mg/kg) <sup>1</sup>		
FIBRA EN DETERGENTE NEUTRO (%) <sup>3</sup>			CROMO (%) <sup>1</sup>		
<b>FIBRA EN DETERGENTE ACIDO (%)<sup>3</sup></b>	<b>4,4</b>	<b>45,2</b>	ZINC (mg/kg) <sup>1</sup>		
<b>LIGNINA (%)<sup>3</sup></b>	<b>1,3</b>	<b>13,2</b>	COBRE (mg/Kg) <sup>1</sup>		
HEMICELULOSA (%) <sup>3</sup>			COBALTO (mg/Kg) <sup>1</sup>		
EXTRACTO ETereo (%) <sup>1</sup>			HIERRO (mg/Kg) <sup>1</sup>		
CFNIZAS (%) <sup>1</sup>			ENERGIA BRUTA (Mcal/kg)		
pH			AZUFRE		

## REFERENCIAS

- 1 AOAC 1996. Official Methods of analysis of the Association of Analytical Chemists, (14 th ed)
  - 2 Animal Feed Science and Technology (1996) 57:347-348
  - 3 Journal of Dairy Science (1991) 74:3583-3597
  - 4 Tilley and Terry, 1963. Modificado por la Universidad de Nebraska, Manual de Laboratorio Universidad de Nebraska
  - 5 Manual de métodos fisicoquímicos para el control de calidad de la leche y sus derivados. ICONTEC
- ND= No detectable

## Resultados tratamiento 3

ANÁLISIS	REPORTE	REPORTE	ANÁLISIS	REPORTE	REPORTE
	(Base húmeda)	(Base seca)		(Base húmeda)	(Base seca)
<b>MATERIA SECA (%)<sup>1</sup></b>	<b>9,9</b>		DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE LA MS (%) <sup>4</sup>		
NITROGENO (%) <sup>1</sup>			DIGESTIBILIDAD <i>IN SITU</i> DE LA MS (%)		
PROTEINA CRUDA (Nx6.25) (%) <sup>1</sup>			DIGESTIBILIDAD EN PEPSINA 0.2 (%)		
NITROGENO NO PROTEICO (%PC) <sup>2</sup>			CALCIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO SOLUBLE (%PC) <sup>2</sup>			FOSFORO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDA (%) <sup>2</sup>			POTASIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDN (%) <sup>2</sup>			MAGNESIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDN (%PC) <sup>2</sup>			SODIO (%) <sup>1</sup>		
FIBRA CRUDA (%) <sup>1</sup>			MANGANESO (mg/kg) <sup>1</sup>		
FIBRA EN DETERGENTE NEUTRO (%) <sup>3</sup>			CROMO (%) <sup>1</sup>		
<b>FIBRA EN DETERGENTE ACIDO (%)<sup>3</sup></b>	<b>4,2</b>	<b>42,4</b>	ZINC (mg/kg) <sup>1</sup>		
<b>LIGNINA (%)<sup>3</sup></b>	<b>1,1</b>	<b>11,3</b>	COBRE (mg/Kg) <sup>1</sup>		
HEMICELULOSA (%) <sup>3</sup>			COBALTO (mg/Kg) <sup>1</sup>		
EXTRACTO ETereo (%) <sup>1</sup>			HIERRO (mg/Kg) <sup>1</sup>		
CFNIZAS (%) <sup>1</sup>			ENERGIA BRUTA (Mcal/kg)		
pH			AZUFRE		

## REFERENCIAS

- 1 AOAC 1996. Official Methods of analysis of the Association of Analytical Chemists, (14 th ed)
  - 2 Animal Feed Science and Technology (1996) 57:347-348
  - 3 Journal of Dairy Science (1991) 74:3583-3597
  - 4 Tilley and Terry, 1963. Modificado por la Universidad de Nebraska, Manual de Laboratorio Universidad de Nebraska
  - 5 Manual de métodos fisicoquímicos para el control de calidad de la leche y sus derivados. ICONTEC
- ND= No detectable

## Resultados tratamiento 4

ANALISIS	REPORTE	REPORTE	ANALISIS	REPORTE	REPORTE
	(Base húmeda)	(Base seca)		(Base húmeda)	(Base seca)
<b>MATERIA SECA (%)</b> <sup>1</sup>	<b>10,6</b>		DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE LA MS (%) <sup>4</sup>		
NITROGENO (%) <sup>1</sup>			DIGESTIBILIDAD <i>IN SITU</i> DE LA MS (%)		
PROTEINA CRUDA (Nx6.25) (%) <sup>1</sup>			DIGESTIBILIDAD EN PEPSINA 0.2 (%)		
NITROGENO NO PROTEICO (%PC) <sup>2</sup>			CALCIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO SOLUBLE (%PC) <sup>2</sup>			FOSFORO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDA (%) <sup>2</sup>			POTASIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDN (%) <sup>2</sup>			MAGNESIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDN (%PC) <sup>2</sup>			SODIO (%) <sup>1</sup>		
FIBRA CRUDA (%) <sup>1</sup>			MANGANESO (mg/kg) <sup>1</sup>		
FIBRA EN DETERGENTE NEUTRO (%) <sup>3</sup>			CROMO (%) <sup>1</sup>		
<b>FIBRA EN DETERGENTE ACIDO (%)</b> <sup>3</sup>	<b>4,5</b>	<b>42,4</b>	ZINC (mg/kg) <sup>1</sup>		
<b>LIGNINA (%)</b> <sup>3</sup>	<b>1,2</b>	<b>11,8</b>	COBRE (mg/Kg) <sup>1</sup>		
HEMICELULOSA (%) <sup>3</sup>			COBALTO (mg/Kg) <sup>1</sup>		
EXTRACTO ETereo (%) <sup>1</sup>			HIERRO (mg/Kg) <sup>1</sup>		
CENIZAS (%) <sup>1</sup>			ENERGIA BRUTA (Mcal/kg)		
pH			AZUFRE		

## REFERENCIAS

- 1 AOAC 1996. Official Methods of analysis of the Association of Analytical Chemists, (14 th ed)
  - 2 Animal Feed Science and Technology (1996) 57:347-348
  - 3 Journal of Dairy Science (1991) 74:3583-3597
  - 4 Tilley and Terry, 1963. Modificado por la Universidad de Nebraska, Manual de Laboratorio Universidad de Nebraska
  - 5 Manual de métodos fisicoquímicos para el control de calidad de la leche y sus derivados. ICONTEC
- ND= No detectable

## Resultados tratamiento 5

ANALISIS	REPORTE	REPORTE	ANALISIS	REPORTE	REPORTE
	(Base húmeda)	(Base seca)		(Base húmeda)	(Base seca)
<b>MATERIA SECA (%)</b> <sup>1</sup>	<b>7,6</b>		DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE LA MS (%) <sup>4</sup>		
NITROGENO (%) <sup>1</sup>			DIGESTIBILIDAD <i>IN SITU</i> DE LA MS (%)		
PROTEINA CRUDA (Nx6.25) (%) <sup>1</sup>			DIGESTIBILIDAD EN PEPSINA 0.2 (%)		
NITROGENO NO PROTEICO (%PC) <sup>2</sup>			CALCIO (% C%) <sup>1</sup>		
NITROGENO SOLUBLE (%PC) <sup>2</sup>			FOSFORO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDA (%) <sup>2</sup>			POTASIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDN (%) <sup>2</sup>			MAGNESIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDN (%PC) <sup>2</sup>			SODIO (%) <sup>1</sup>		
FIBRA CRUDA (%) <sup>1</sup>			MANGANESO (mg/kg) <sup>1</sup>		
FIBRA EN DETERGENTE NEUTRO (%) <sup>3</sup>			CROMO (%) <sup>1</sup>		
<b>FIBRA EN DETERGENTE ACIDO (%)</b> <sup>3</sup>	<b>3,0</b>	<b>40,0</b>	ZINC (mg/kg) <sup>1</sup>		
<b>LIGNINA (%)</b> <sup>3</sup>	<b>0,8</b>	<b>10,5</b>	COBRE (mg/Kg)1LD 0,010		
HEMICELULOSA (%) <sup>3</sup>			COBALTO (mg/Kg)1LD 0,01		
EXTRACTO ETereo (%) <sup>1</sup>			HIERRO (mg/Kg) <sup>1</sup>		
CENIZAS (%) <sup>1</sup>			ENERGIA BRUTA (Mcal/kg)		
pH			AZUFRE		

## REFERENCIAS

- 1 AOAC 1996. Official Methods of analysis of the Association of Analytical Chemists, (14 th ed)
  - 2 Animal Feed Science and Technology (1996) 57:347-348
  - 3 Journal of Dairy Science (1991) 74:3583-3597/Lignina en ácido sulfurico
  - 4 Tilley and Terry, 1963. Modificado por la Universidad de Nebraska, Manual de Laboratorio Universidad de Nebraska
  - 5 Manual de métodos fisicoquímicos para el control de calidad de la leche y sus derivados. ICONTEC
- ND= No detectable

## Resultados tratamiento 6

ANALISIS	REPORTE	REPORTE	ANALISIS	REPORTE	REPORTE
	(Base húmeda)	(Base seca)		(Base húmeda)	(Base seca)
MATERIA SECA (%) <sup>1</sup>	7,5		DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE LA MS (%) <sup>4</sup>		
NITROGENO (%) <sup>1</sup>			DIGESTIBILIDAD <i>IN SITU</i> DE LA MS (%)		
PROTEINA CRUDA (Nx6.25) (%) <sup>1</sup>			DIGESTIBILIDAD EN PEPSINA 0.2 (%)		
NITROGENO NO PROTEICO (%PC) <sup>2</sup>			CALCIO (% C%) <sup>1</sup>		
NITROGENO SOLUBLE (%PC) <sup>2</sup>			FOSFORO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDA (%) <sup>2</sup>			POTASIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDN (%) <sup>2</sup>			MAGNESIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDN (%PC) <sup>2</sup>			SODIO (%) <sup>1</sup>		
FIBRA CRUDA (%) <sup>1</sup>			MANGANESO (mg/kg) <sup>1</sup>		
FIBRA EN DETERGENTE NEUTRO (%) <sup>3</sup>			CROMO(%) <sup>1</sup>		
FIBRA EN DETERGENTE ACIDO (%) <sup>3</sup>	2,9	39,2	ZINC (mg/kg) <sup>1</sup>		
LIGNINA (%) <sup>3</sup>	0,7	10,0	COBRE (mg/Kg)1LD 0,010		
HEMICELULOSA (%) <sup>3</sup>			COBALTO (mg/Kg)1LD 0,01		
EXTRACTO ETereo (%) <sup>1</sup>			HIERRO (mg/Kg) <sup>1</sup>		
CENIZAS (%) <sup>1</sup>			ENERGIA BRUTA (Mcal/kg)		
pH			AZUFRE		

## REFERENCIAS

- 1 AOAC 1996. Official Methods of analysis of the Association of Analytical Chemists, (14 th ed)
  - 2 Animal Feed Science and Technology (1996) 57:347-348
  - 3 Journal of Dairy Science (1991) 74:3583-3597/Lignina en ácido sulfurico
  - 4 Tilley and Terry, 1963. Modificado por la Universidad de Nebraska, Manual de Laboratorio Universidad de Nebraska
  - 5 Manual de métodos fisicoquímicos para el control de calidad de la leche y sus derivados. ICONTEC
- ND= No detectable

## Resultados tratamiento 7

ANALISIS	REPORTE	REPORTE	ANALISIS	REPORTE	REPORTE
	(Base húmeda)	(Base seca)		(Base húmeda)	(Base seca)
MATERIA SECA (%) <sup>1</sup>	7,4		DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE LA MS (%) <sup>4</sup>		
NITROGENO (%) <sup>1</sup>			DIGESTIBILIDAD <i>IN SITU</i> DE LA MS (%)		
PROTEINA CRUDA (Nx6.25) (%) <sup>1</sup>			DIGESTIBILIDAD EN PEPSINA 0.2 (%)		
NITROGENO NO PROTEICO (%PC) <sup>2</sup>			CALCIO (% C%) <sup>1</sup>		
NITROGENO SOLUBLE (%PC) <sup>2</sup>			FOSFORO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDA (%) <sup>2</sup>			POTASIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDN (%) <sup>2</sup>			MAGNESIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDN (%PC) <sup>2</sup>			SODIO (%) <sup>1</sup>		
FIBRA CRUDA (%) <sup>1</sup>			MANGANESO (mg/kg) <sup>1</sup>		
FIBRA EN DETERGENTE NEUTRO (%) <sup>3</sup>			CROMO(%) <sup>1</sup>		
FIBRA EN DETERGENTE ACIDO (%) <sup>3</sup>	3,2	42,5	ZINC (mg/kg) <sup>1</sup>		
LIGNINA (%) <sup>3</sup>	0,8	10,4	COBRE (mg/Kg)1LD 0,010		
HEMICELULOSA (%) <sup>3</sup>			COBALTO (mg/Kg)1LD 0,01		
EXTRACTO ETereo (%) <sup>1</sup>			HIERRO (mg/Kg) <sup>1</sup>		
CENIZAS (%) <sup>1</sup>			ENERGIA BRUTA (Mcal/kg)		
pH			AZUFRE		

## REFERENCIAS

- 1 AOAC 1996. Official Methods of analysis of the Association of Analytical Chemists, (14 th ed)
  - 2 Animal Feed Science and Technology (1996) 57:347-348
  - 3 Journal of Dairy Science (1991) 74:3583-3597/Lignina en ácido sulfúrico
  - 4 Tilley and Terry, 1963. Modificado por la Universidad de Nebraska, Manual de Laboratorio Universidad de Nebraska
  - 5 Manual de métodos fisicoquímicos para el control de calidad de la leche y sus derivados. ICONTEC
- ND= No detectable

## Resultados tratamiento 8

ANALISIS	REPORTE	REPORTE	ANALISIS	REPORTE	REPORTE
	(Base húmeda)	(Base seca)		(Base húmeda)	(Base seca)
<b>MATERIA SECA (%)</b> <sup>1</sup>	<b>8,8</b>		DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE LA MS (%) <sup>4</sup>		
NITROGENO (%) <sup>1</sup>			DIGESTIBILIDAD <i>IN SITU</i> DE LA MS (%)		
PROTEINA CRUDA (Nx6.25) (%) <sup>1</sup>			DIGESTIBILIDAD EN PEPSINA 0,2 (%)		
NITROGENO NO PROTEICO (%PC) <sup>2</sup>			CALCIO (% C%) <sup>1</sup>		
NITROGENO SOLUBLE (%PC) <sup>2</sup>			FOSFORO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDA (%) <sup>2</sup>			POTASIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDN (%) <sup>2</sup>			MAGNESIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDN (%PC) <sup>2</sup>			SODIO (%) <sup>1</sup>		
FIBRA CRUDA (%) <sup>1</sup>			MANGANESO (mg/kg) <sup>1</sup>		
FIBRA EN DETERGENTE NEUTRO (%) <sup>3</sup>			CROMO (%) <sup>1</sup>		
<b>FIBRA EN DETERGENTE ACIDO (%)</b> <sup>3</sup>	<b>3,6</b>	<b>40,9</b>	ZINC (mg/kg) <sup>1</sup>		
<b>LIGNINA (%)</b> <sup>3</sup>	<b>0,9</b>	<b>9,9</b>	COBRE (mg/Kg)1LD 0,010		
HEMICELULOSA (%) <sup>3</sup>			COBALTO (mg/Kg)1LD 0,01		
EXTRACTO ETereo (%) <sup>1</sup>			HIERRO (mg/Kg) <sup>1</sup>		
CENIZAS (%) <sup>1</sup>			ENERGIA BRUTA (Mcal/kg)		
pH			AZUFRE		

## REFERENCIAS

- 1 AOAC 1996. Official Methods of analysis of the Association of Analytical Chemists, (14 th ed)
  - 2 Animal Feed Science and Technology (1996) 57:347-348
  - 3 Journal of Dairy Science (1991) 74:3583-3597/Lignina en ácido sulfúrico
  - 4 Tilley and Terry, 1963. Modificado por la Universidad de Nebraska, Manual de Laboratorio Universidad de Nebraska
  - 5 Manual de métodos fisicoquímicos para el control de calidad de la leche y sus derivados. ICONTEC
- ND= No detectable

## Resultados tratamiento 9

ANALISIS	REPORTE	REPORTE	ANALISIS	REPORTE	REPORTE
	(Base húmeda)	(Base seca)		(Base húmeda)	(Base seca)
<b>MATERIA SECA (%)</b> <sup>1</sup>	<b>22,2</b>		DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE LA MS (%) <sup>4</sup>		
NITROGENO (%) <sup>1</sup>			DIGESTIBILIDAD <i>IN SITU</i> DE LA MS (%)		
PROTEINA CRUDA (Nx6.25) (%) <sup>1</sup>			DIGESTIBILIDAD EN PEPSINA 0,2 (%)		
NITROGENO NO PROTEICO (%PC) <sup>2</sup>			CALCIO (% C%) <sup>1</sup>		
NITROGENO SOLUBLE (%PC) <sup>2</sup>			FOSFORO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDA (%) <sup>2</sup>			POTASIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDN (%) <sup>2</sup>			MAGNESIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDN (%PC) <sup>2</sup>			SODIO (%) <sup>1</sup>		
FIBRA CRUDA (%) <sup>1</sup>			MANGANESO (mg/kg) <sup>1</sup>		
FIBRA EN DETERGENTE NEUTRO (%) <sup>3</sup>			CROMO (%) <sup>1</sup>		
<b>FIBRA EN DETERGENTE ACIDO (%)</b> <sup>3</sup>	<b>9,7</b>	<b>43,9</b>	ZINC (mg/kg) <sup>1</sup>		
<b>LIGNINA (%)</b> <sup>3</sup>	<b>1,8</b>	<b>8,3</b>	COBRE (mg/Kg)1LD 0,010		
HEMICELULOSA (%) <sup>3</sup>			COBALTO (mg/Kg)1LD 0,01		
EXTRACTO ETereo (%) <sup>1</sup>			HIERRO (mg/Kg) <sup>1</sup>		
CENIZAS (%) <sup>1</sup>			ENERGIA BRUTA (Mcal/kg)		
pH			AZUFRE		

## REFERENCIAS

- 1 AOAC 1996. Official Methods of analysis of the Association of Analytical Chemists, (14 th ed)
  - 2 Animal Feed Science and Technology (1996) 57:347-348
  - 3 Journal of Dairy Science (1991) 74:3583-3597/Lignina en ácido sulfúrico
  - 4 Tilley and Terry, 1963. Modificado por la Universidad de Nebraska, Manual de Laboratorio Universidad de Nebraska
  - 5 Manual de métodos fisicoquímicos para el control de calidad de la leche y sus derivados. ICONTEC
- ND= No detectable

## Resultados tratamiento 10

ANALISIS	REPORTE	REPORTE	ANALISIS	REPORTE	REPORTE
	(Base húmeda)	(Base seca)		(Base húmeda)	(Base seca)
MATERIA SECA (%) <sup>1</sup>	28,2		DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE LA MS (%) <sup>4</sup>		
NITROGENO (%) <sup>1</sup>			DIGESTIBILIDAD <i>IN SITU</i> DE LA MS (%)		
PROTEINA CRUDA (Nx6.25) (%) <sup>1</sup>			DIGESTIBILIDAD EN PEPSINA 0,2 (%)		
NITROGENO NO PROTEICO (%PC) <sup>2</sup>			CALCIO (% C) <sup>1</sup>		
NITROGENO SOLUBLE (%PC) <sup>2</sup>			FOSFORO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDA (%) <sup>2</sup>			POTASIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDN (%) <sup>2</sup>			MAGNESIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDN (%PC) <sup>2</sup>			SODIO (%) <sup>1</sup>		
FIBRA CRUDA (%) <sup>1</sup>			MANGANESO (mg/kg) <sup>1</sup>		
FIBRA EN DETERGENTE NEUTRO (%) <sup>3</sup>			CROMO (%) <sup>1</sup>		
FIBRA EN DETERGENTE ACIDO (%) <sup>3</sup>	11,4	40,5	ZINC (mg/kg) <sup>1</sup>		
LIGNINA (%) <sup>3</sup>	2,3	8,0	COBRE (mg/Kg)1LD 0,010		
HEMICELULOSA (%) <sup>3</sup>			COBALTO (mg/Kg)1LD 0,01		
EXTRACTO ETereo (%) <sup>1</sup>			HIERRO (mg/Kg) <sup>1</sup>		
CENIZAS (%) <sup>1</sup>			ENERGIA BRUTA (Mcal/kg)		
pH			AZUFRE		

## REFERENCIAS

- 1 AOAC 1996. Official Methods of analysis of the Association of Analytical Chemists, (14 th ed)
  - 2 Animal Feed Science and Technology (1996) 57:347-348
  - 3 Journal of Dairy Science (1991) 74:3583-3597/Lignina en ácido sulfúrico
  - 4 Tilley and Terry, 1963. Modificado por la Universidad de Nebraska, Manual de Laboratorio Universidad de Nebraska
  - 5 Manual de métodos fisicoquímicos para el control de calidad de la leche y sus derivados. ICONTEC
- ND= No detectable

## Resultados tratamiento 11

ANALISIS	REPORTE	REPORTE	ANALISIS	REPORTE	REPORTE
	(Base húmeda)	(Base seca)		(Base húmeda)	(Base seca)
MATERIA SECA (%) <sup>1</sup>	24,8		DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE LA MS (%) <sup>4</sup>		
NITROGENO (%) <sup>1</sup>			DIGESTIBILIDAD <i>IN SITU</i> DE LA MS (%)		
PROTEINA CRUDA (Nx6.25) (%) <sup>1</sup>			DIGESTIBILIDAD EN PEPSINA 0,2 (%)		
NITROGENO NO PROTEICO (%PC) <sup>2</sup>			CALCIO (% C) <sup>1</sup>		
NITROGENO SOLUBLE (%PC) <sup>2</sup>			FOSFORO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDA (%) <sup>2</sup>			POTASIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDN (%) <sup>2</sup>			MAGNESIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDN (%PC) <sup>2</sup>			SODIO (%) <sup>1</sup>		
FIBRA CRUDA (%) <sup>1</sup>			MANGANESO (mg/kg) <sup>1</sup>		
FIBRA EN DETERGENTE NEUTRO (%) <sup>3</sup>			CROMO (%) <sup>1</sup>		
FIBRA EN DETERGENTE ACIDO (%) <sup>3</sup>	10,5	42,3	ZINC (mg/kg) <sup>1</sup>		
LIGNINA (%) <sup>3</sup>	1,9	7,5	COBRE (mg/Kg)1LD 0,010		
HEMICELULOSA (%) <sup>3</sup>			COBALTO (mg/Kg)1LD 0,01		
EXTRACTO ETereo (%) <sup>1</sup>			HIERRO (mg/Kg) <sup>1</sup>		
CENIZAS (%) <sup>1</sup>			ENERGIA BRUTA (Mcal/kg)		
pH			AZUFRE		

## REFERENCIAS

- 1 AOAC 1996. Official Methods of analysis of the Association of Analytical Chemists, (14 th ed)
  - 2 Animal Feed Science and Technology (1996) 57:347-348
  - 3 Journal of Dairy Science (1991) 74:3583-3597/Lignina en ácido sulfúrico
  - 4 Tilley and Terry, 1963. Modificado por la Universidad de Nebraska, Manual de Laboratorio Universidad de Nebraska
  - 5 Manual de métodos fisicoquímicos para el control de calidad de la leche y sus derivados. ICONTEC
- ND= No detectable

## Resultados tratamiento 12

ANALISIS	REPORTE	REPORTE	ANALISIS	REPORTE	REPORTE
	(Base húmeda)	(Base seca)		(Base húmeda)	(Base seca)
MATERIA SECA (%) <sup>1</sup>	25,9		DIGESTIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE LA MS (%) <sup>4</sup>		
NITROGENO (%) <sup>1</sup>			DIGESTIBILIDAD <i>IN SITU</i> DE LA MS (%)		
PROTEINA CRUDA (Nx6.25) (%) <sup>1</sup>			DIGESTIBILIDAD EN PEPSINA 0,2 (%)		
NITROGENO NO PROTEICO (%PC) <sup>2</sup>			CALCIO (% C) <sup>1</sup>		
NITROGENO SOLUBLE (%PC) <sup>2</sup>			FOSFORO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDA (%) <sup>2</sup>			POTASIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDN (%) <sup>2</sup>			MAGNESIO (%) <sup>1</sup>		
NITROGENO LIGADO A FDN (%PC) <sup>2</sup>			SODIO (%) <sup>1</sup>		
FIBRA CRUDA (%) <sup>1</sup>			MANGANESO (mg/kg) <sup>1</sup>		
FIBRA EN DETERGENTE NEUTRO (%) <sup>3</sup>			CROMO (%) <sup>1</sup>		
FIBRA EN DETERGENTE ACIDO (%) <sup>3</sup>	11,4	44,0	ZINC (mg/kg) <sup>1</sup>		
LIGNINA (%) <sup>3</sup>	2,1	8,2	COBRE (mg/Kg)1LD 0,010		
HEMICELULOSA (%) <sup>3</sup>			COBALTO (mg/Kg)1LD 0,01		
EXTRACTO ETHEREO (%) <sup>1</sup>			HIERRRO (mg/Kg) <sup>1</sup>		
CENIZAS (%) <sup>1</sup>			ENERGIA BRUTA (Mcal/kg)		
pH			AZUFRE		

## REFERENCIAS

- 1 AOAC 1996. Official Methods of analysis of the Association of Analytical Chemists, (14 th ed)
  - 2 Animal Feed Science and Technology (1996) 57:347-348
  - 3 Journal of Dairy Science (1991) 74:3583-3597/Lignina en ácido sulfúrico
  - 4 Tilley and Terry, 1963. Modificado por la Universidad de Nebraska, Manual de Laboratorio Universidad de Nebraska
  - 5 Manual de métodos fisicoquímicos para el control de calidad de la leche y sus derivados. ICONTEC
- ND= No detectable

Tiempo de retención de la muestra: 6 meses a partir de la emisión del presente reporte.

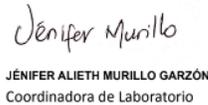
Consideración: Los datos reportados por este laboratorio solo podrán ser usados con fines de investigación.

APROBADO POR



JUAN E. CARULLA FORNAGUERA  
Director de Laboratorio

ELABORADO POR



JÉNIFER ALIETH MURILLO GARZÓN  
Coordinadora de Laboratorio

Este informe expresa fielmente el resultado de los análisis realizados sobre la muestra recibida. No podrá ser reproducido parcial ni totalmente, excepto cuando se haya obtenido previamente permiso escrito por parte del laboratorio que lo emite. Los resultados contenidos en el presente informe, se refieren al momento y condiciones en que se realizaron los análisis y son emitidos exclusivamente con fines de investigación. El laboratorio que lo emite no se responsabiliza de los perjuicios que puedan derivarse del uso inadecuado de los resultados entregados.