

Evaluación de las enzimas celulolíticas producidas por hongos nativos mediante fermentación en estado sólido (SSF) utilizando residuos de cosecha de caña de azúcar

Evaluation of cellulolytic enzymes produced by native fungi through solid state fermentation (SSF) using sugarcane harvesting residues

Janneth Escudero Agudelo*, Zunny Tatiana Daza Merchán**, Nicolás Javier Gil Zapata***, Oscar Yesid Mora Muñoz****

Resumen

Los residuos agrícolas de cosecha de caña de azúcar (RAC), se constituyen en una materia prima alternativa para la producción de etanol carburante, dado su contenido de celulosa próximo al 40%. El aprovechamiento de la celulosa depende de la aplicación de tratamientos fisicoquímicos o bioquímicos, que permitan la liberación de la glucosa y su posterior utilización en procesos fermentativos. La hidrólisis enzimática de estos residuos requiere un complejo celulolítico producido por microorganismos, comprendido por tres actividades enzimáticas: Endoglucanasas, Exoglucanasas y β -Glucosidasas. En el presente estudio, se evaluaron las enzimas celulolíticas producidas por dos hongos nativos del género *Aspergillus* spp., CH 2016 y CH 2001, mediante procesos de fermentación en estado sólido utilizando como sustrato RAC pre-tratados con organosolventes (deslignificado) y sin este pre-tratamiento. La cepa CH 2016 presentó la mayor actividad endoglucanasa 11,0773 U/mL en el sustrato sin pre-tratar el día siete de fermentación; esta misma cepa, en el sustrato deslignificado presentó la mayor actividad exoglucanasa (0,042 U/mL) y celulasa total (0,287 UPF/mL) en el día cinco de fermentación. La cepa CH 2001 presentó la mayor actividad β -glucosidasa (0,1778 U/mL) en el sustrato sin pre-tratar el día cinco de fermentación. Se observó que las variables sustrato y tiempo de fermentación, inciden en la expresión de las enzimas celulolíticas obteniendo en este trabajo extractos enzimáticos que pueden llevar a cabo una acción hidrolítica sinérgica sobre la celulosa.

Palabras clave: fermentación en estado sólido SSF, RAC, celulosa, enzimas celulolíticas, *Aspergillus* sp., APF.

Abstract

Sugarcane harvesting residues are considered as a raw material for fuel ethanol production due its high content of cellulose, around 40% DS. The use of cellulose depends of the application of physicochemical or biochemical treatments that allow the release of glucose and its subsequent uses in fermentation processes. The enzymatic hydrolysis of these residues requires a cellulolytic complex produced by microorganisms, including three enzymatic activities: Endoglucanases, β -Glucosidases and Exoglucanases. In the present study, cellulolytic enzymes produced by two native fungi *Aspergillus* spp., CH 2016 and CH 2001 was assessment, through of solid-state fermentation processes using as raw substrate RAC and pre-treated with organosolvents (delignified). Strain CH 2016 had the highest endoglucanase activity 11.0773 U/mL in the raw substrate on day seven of fermentation, the same strain, in the delignified substrate showed the highest activity

* Microbióloga Industrial y Ambiental. Estudiante en pasantía CENICAÑA. Cali, Colombia. janyudea12@gmail.com.

** Microbióloga Industrial M.Sc. Microbióloga Industrial. CENICAÑA. Cali, Colombia. tdaza@cenicana.org

*** Ingeniero Químico Ph.D. Director Programa de Fábrica. CENICAÑA. Cali, Colombia. njgil@cenicana.org

**** Microbiólogo Industrial. Investigador temporal. CENICAÑA. Cali, Colombia. mora.o@javeriana.edu.co

exoglucanasa (0.042 U/mL) and total cellulase (0.287 UPF/mL) on day five of fermentation. Strain CH 2001 got the highest β -glucosidase activity (0.1778 U/mL) in the substrate without pre-treatment on day 5 of fermentation. It was observed that the variables as substrate and fermentation time affected the expression of cellulolytic enzymes.

Key words: solid State Fermentation SSF, Sugarcane harvest residues, Cellulose, Cellulolytic enzymes, *Aspergillus* spp.

Recibido: octubre 28 de 2012

Aprobado: junio 22 de 2013

Introducción

El principal cultivo en el valle del Río Cauca (Colombia) es la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), el cual genera alrededor de cincuenta toneladas métricas por hectárea de residuos post-cosecha (Torres y Villegas, 2006). La utilización de estos residuos agrícolas de cosecha de caña de azúcar (RAC) como materia prima renovable, abundante, económica y poco contaminante para la producción de biocombustibles, como el etanol celulósico, es una alternativa que despierta cada día más interés dado su contenido de celulosa (alrededor del 40% en base seca). Para tener acceso a la fracción de celulosa, los RAC requieren un pre-tratamiento para separar las fracciones de lignina y hemicelulosa, y permitir que la celulosa esté accesible en la etapa posterior de hidrólisis o sacarificación (Rabelo, 2007). Estos pre-tratamientos pueden ser térmicos, químicos, físicos, biológicos o una combinación de estos, lo cual depende del grado de separación requerido y el propósito para el cual está destinado el proceso (Ramos, 2000).

Por varias décadas, la hidrólisis eficiente de materiales lignocelulósicos (ácida o enzimática) y la posterior fermentación de los azúcares obtenidos han sido un gran desafío. A pesar que la hidrólisis ácida de biomasa sea eficiente y relativamente de costo moderado, genera un alto impacto ambiental y conlleva a la generación de compuestos químicos que inhiben a los microorganismos encargados de realizar la posterior fermentación de los azúcares; por eso, la sacarificación enzimática ha cobrado ventaja y la producción de éstas enzimas es objeto de estudios actuales (Rabelo, 2007).

Las celulasas es el nombre genérico que recibe el complejo enzimático celulolítico que, como su nombre lo indica, es capaz de hidrolizar la celulosa, homopolímero compuesto por unidades de glucosa unidas mediante un enlace glicosídico β -1,4. Las celulasas se diferencian de otras glicosil-hidrolasas por su habilidad de hidrolizar el enlace glicosídico β (1 \rightarrow 4); estas enzimas están clasificadas de acuerdo con su sitio de acción en el sustrato celulósico y se dividen en tres grandes grupos: Endoglucanasas (EnG) que cortan uniones de

fibra celulósica generando oligosacaridos de varias longitudes, Exoglucanasas o también conocidas como celobiohidrolasas (ExG) que actúan en regiones externas de celulosa liberando unidades de celobiosa, y las β -glucosidasas (BG) que hidrolizan celobiosa y oligosacaridos solubles en glucosa (Machado y Pereira Jr., 2010; Ângelo, 2004). Siendo la glucosa el resultado final de la acción degradativa del complejo celulolítico sobre el polímero de celulosa (Moore, 1998).

Los avances en la biotecnología industrial han permitido la producción de estas celulasas a partir de microorganismos mediante fermentación en estado sólido (SSF por sus siglas en inglés) porque ofrece numerosas ventajas como una tecnología más simple y con menores costos (Rodríguez y Sanromán, 2005; Hölker y Lenz, 2005; Hölker et al., 2004). De los microorganismos empleados, se destacan los hongos filamentosos que se caracterizan por la formación de hifas que les permiten colonizar matrices sólidas y ser más eficientes y competitivos por su gran potencial de secreción de enzimas hidrolíticas, su tolerancia a baja actividad del agua y su resistencia a condiciones de alta presión osmótica (Gutiérrez Rojas et al., 1995).

A pesar que los procesos de SSF son prometedores en cuanto a productividad y rentabilidad, para su aplicación con RAC se desconocen las condiciones de sustrato y de tiempo de fermentación que conlleven a obtener las mayores producciones de enzimas celulolíticas específicas, con el fin de obtener un coctel enzimático que comprenda todo el complejo celulolítico. En atención a los antecedentes y desconocimientos antes señalados, se planteó como objetivo evaluar las enzimas celulolíticas producidas por hongos nativos mediante SSF utilizando como sustrato RAC fragmentados mecánicamente y pre-tratados con organosolventes.

Materiales y métodos

Microorganismos

Se utilizaron dos hongos nativos del valle del Río Cauca, aislados a partir de biomasa de caña en des-

composición y seleccionados por su capacidad de producción de enzimas celulolíticas en medio de cultivo líquido (Arévalo, 2011; Bautista, 2011). Las cepas pertenecen al género *Aspergillus* spp., y fueron identificadas presuntivamente como *A. ochraceus* (CH 2001) y *A. niger* (CH 2016).

Adecuación y propagación de las cepas fúngicas. Con el fin de garantizar la pureza de las cepas de estudio, se realizaron cultivos desarrollados a partir de una espora simple para los hongos CH 2001 y CH 2016 (Cultivos monospóricos), a partir de los cuales se obtuvieron los cultivos necesarios para las fermentaciones realizadas. Para la obtención de los cultivos monospóricos se partió de repiques a partir de un cultivo en agar PDA (Agar Papa Dextrosa), se obtuvo una suspensión de esporas en agua destilada estéril y se realizaron diluciones seriadas en base 10, hasta alcanzar una concentración de esporas, que en agar agua permitiera obtener colonias fúngicas diferenciadas. Una de estas esporas se transfirió a agar PDA y se incubó durante siete días a 30°C. A partir de éste cultivo se realizaron los respectivos repiques y se conservaron a 4°C.

Sustratos

En este trabajo se emplearon como sustratos los RAC los cuales corresponden a hojas verdes, secas y cogollo. Los RAC fueron sometidos inicialmente a fragmentación mecánica. Posteriormente una parte de los RAC fueron sometidos a un proceso organosolvente con el fin de eliminar la lignina y gran parte de la hemicelulosa presente (RAC deslignificado).

Pre-tratamiento al sustrato. Para los RAC fragmentados mecánicamente, la muestra fue reducida de tamaño en un desfibrador Jeffco®, luego se dejaron secar las muestras al ambiente durante 7 días, tiempo en el cual se redujo la humedad a valores alrededor de 5,3% y se almacenaron en bolsas plásticas. Posteriormente, este residuo fue sometido a reducción de tamaño en un molino de martillos, tamizado hasta malla No. 20 mesh donde se alcanzó un tamaño de partícula inferior a 5 mm.

En el pre-tratamiento con organosolventes, los residuos se suspendieron en una solución de etanol al 50% (v/v) e hidróxido de sodio al 3% (v/v) a una relación sólido-líquido 1:8, dentro de un reactor de presión durante dos (2) horas a 160°C, condiciones establecidas por Daza *et al.* (2012).

La masa sólida obtenida (celulosa y parte de hemicelulosa), se lavó varias veces con agua destilada hasta alcanzar valores de sólidos solubles (%) cercano a

0,05 en el filtrado, con el fin de minimizar la presencia de posibles compuestos químicos que puedan inhibir la posterior fermentación. La pulpa obtenida se secó durante 3 días a 60°C, y finalmente fue tamizada separando la fracción de partícula inferior a 5 mm.

Los sustratos sin pre-tratar y deslignificado, fueron caracterizados siguiendo el método de Van Soest (1983).

Diseño estadístico

Para evaluar las actividades celulolíticas expresadas por los hongos nativos utilizados en los sustratos empleados en este estudio, se realizó un diseño experimental con bloques completos al azar, con un arreglo factorial 2 x 2 x 3 donde los factores son los hongos con dos niveles CH2001 y CH2016; los sustratos con dos niveles fragmentado mecánicamente y pre-tratado con organosolvente (deslignificado); y los días de fermentación con tres niveles 3, 5 y 7. Se realizaron tres repeticiones las cuales corresponden los bloques del diseño.

Desarrollo de la SSF

Suplementación con solución mineral. Con el fin de enriquecer la matriz sólida de celulosa, obtener una relación Carbono/Nitrógeno adecuada y proporcionar otros elementos nutricionales requeridos por el microorganismo, se suplementó los sustratos con una solución mineral (Crawford y McCoy, 1972; ajustada por Bautista, 2011) para estimular el crecimiento y la síntesis de enzimas. La composición por litro de la solución mineral fue: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 11,11 g, Extracto de levadura 0,555 g, NaH_2PO_4 7,377 g, KH_2PO_4 3,0 g, NaCl 0,222 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,222 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,0733 g.

Inoculación y puesta en marcha de la SSF. A partir de las cepas conservadas en PDA a 4°C, se realizaron repiques en placa en medio PDA fresco y se incubaron a 30 °C durante 7 días hasta obtener alta esporulación. Para obtener la suspensión de esporas se agregó al medio solución salina 0,85% p/v con Tween® 20 al 0,1% v/v y se hizo remoción mecánica de estas esporas. La suspensión de esporas para cada cepa se ajustó a una concentración entre $1\text{-}9 \times 10^7$ esporas/mL, mediante el recuento en cámara de Neubauer.

Luego de ajustar la concentración de inóculo, se procedió a añadir el 10% de la suspensión de esporas respecto al volumen de solución mineral requerido, por lo tanto se agregaron 12 mL de la solución mineral con el inóculo a cada caja de petri que contenía 3 g de sustrato ajustando a una relación sólido líquido de 1:4; con esto se alcanzó una humedad inicial de $80\% \pm 2$,

la cual se determinó como adecuada según estudio previo realizado por Bautista (2011).

Estas cajas inoculadas se incubaron durante siete días a 30°C de los cuales a los días 3, 5 y 7 se realizaron los respectivos análisis, siguiendo un modelo de fermentación en bandejas. Para mantener la humedad relativa (70% aprox.) se utilizó una cámara húmeda, la cual consistió en una bandeja plástica con agua destilada estéril en la incubadora.

Para los tratamientos con residuo fragmentado, fue necesario someterlo a lavados con etanol absoluto con un tiempo de contacto de 30 minutos y finalmente con agua destilada estéril, para minimizar la presencia de microbiota nativa. Adicionalmente a la solución mineral, se agregó cloranfenicol 0.1% p/v con el mismo fin.

Extracción enzimática

En los días de muestreo (3, 5 y 7) se tomó el sólido fermentado correspondiente a cada tratamiento (sustrato y hongo) y se mezcló con 24 mL del buffer de extracción (buffer citrato 0,05 M, pH= 4,8) en un erlenmeyer de 150 mL siendo esta una relación 1:8, se agitó en shaker a 200 r.p.m, durante 30 min. La mezcla se centrifugó a 4000 r.p.m durante 15 min a 4°C. Los sobrenadantes se conservaron a -20°C y corresponden a los extractos enzimáticos crudos. Las muestras para los respectivos análisis son nuevamente centrifugadas a 10000 r.p.m por 10 min a 4°C con el fin de obtener un sobrenadante libre de células (hifas y esporas) u otros detritus celulares.

Métodos analíticos

En los extractos crudos obtenidos después de la SSF se analizó la proteína soluble como medida indirecta de la producción de enzimas sintetizada por los microorganismos, expresada en mg/L; también se evaluó la actividad celulasa total como una aproximación a la presencia de actividad celulolítica la cual se expresa en UPF/mL. Igualmente se evaluó el complejo enzimático celulolítico comprendido por la EnG, ExG y BG, todas estas actividades expresadas en términos de U/mL, donde U es definida como una unidad internacional de actividad enzimática que corresponde a 1 μmol de producto liberado en la hidrólisis por min.

Determinación de proteína soluble

El contenido de proteína de los extractos enzimáticos se determinó por cuantificación de proteína soluble con azul de coomassie, de acuerdo al método de Bradford (1976) (variante micro) como medida indi-

recta de la producción de enzimas (celulasa) sintetizada por los microorganismos. Siguiendo el método de Bradford, se utilizó 300 μL del sobrenadante de cada una de las muestras a evaluar, a los cuales se les agregó 2700 μL del reactivo de Bradford, posteriormente se midió la absorbancia a 595 nm, usando como blanco el medio de cultivo sin inocular (Crawford y McCoy, 1972; ajustado por Bautista, 2011).

Determinación de la actividad celulasa total (APF)

La producción de enzimas celulolíticas (celulasa total) en una muestra se determinó mediante la cuantificación glucosa liberada cuando dicha muestra se expuso a papel filtro Whatman No.1, El procedimiento se realizó siguiendo la metodología propuesta por Ghose (1987).

Determinación del complejo enzimático celulolítico

La presencia de enzimas celulolíticas (endo-β-glucanasa; exo-β-glucanasa; y β-glucosidasa) en una muestra se determinó mediante la cuantificación de la liberación de glucosa cuando dicha muestra se expuso en una solución de carboximetilcelulosa (CMC), celulosa microcristalina (Avicel); y la liberación de p-nitrofenol a partir de p-nitrofenil-β-D glucopiranosido (NP) respectivamente. Siguiendo la metodología propuesta por Ghose (1987), se leyó absorbancia a 540 nm para las actividades enzimáticas celulolíticas endoglucanasa (EnG) y Exoglucanasa (ExG); para la actividad enzimática celulolítica β-glucosidasa (B-G) se siguió la metodología propuesta por Ghose y Bisaria (1987) y se leyó la absorbancia a 400 nm.

Análisis estadístico de los datos

El modelo lineal que se siguió para el análisis de los datos, se describe a continuación:

$$Y_{ijkl} = \mu + R_i + H_j + S_k + D_l + (H * S)_{jk} + (H * D)_{jl} + (S + D)_{kl} + (H * S * D)_{jkl}$$

Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico SAS versión 11.0.

Resultados y discusión

Caracterización de los sustratos

La composición de los RAC utilizados en el presente estudio según sus carbohidratos estructurales en tér-

minos de celulosa, hemicelulosa, lignina y cenizas, se encuentra en la tabla 1.

Tabla 1. Carbohidratos estructurales de los sustratos utilizados

Sustrato	Carbohidratos estructurales (%)			
	Celulosa	Hemicelulosa	Lignina	Cenizas
Molido	32,9	27,9	8,9	3,9
Deslignificado	83,8	9,7	1,5	0,03

Los valores no presentados en la tabla 1, corresponden a extractivos u otros compuestos no determinados con el método Van Soest. Se observan diferencias en los dos procesos de pre-tratamiento a los cuales fueron sometidos los RAC (tabla 1), donde el sustrato deslignificado presentó un mayor porcentaje de celulo-

sa y menor de lignina y hemicelulosa, quedando dicha celulosa aparentemente más accesible y equivalente a la mayor fuente de carbono para los microorganismos; a diferencia del sustrato molido, en que el porcentaje de celulosa a pesar de ser más alto que los demás carbohidratos, no se constituye como fuente de carbono mayoritaria disponible para los microorganismos, quedando también hemicelulosa y otros polisacáridos disponibles para estos.

Desarrollo de la SSF

Siguiendo el diseño de experimentos, se realizaron las SSF respectivas para cada tratamiento y estas se monitorearon mediante un seguimiento microscópico donde se observaron las diferencias presentadas en los días de interés (3, 5, 7). Este procedimiento se realizó con la ayuda de un estereomicroscopio y los resultados se muestran en la figura 1.

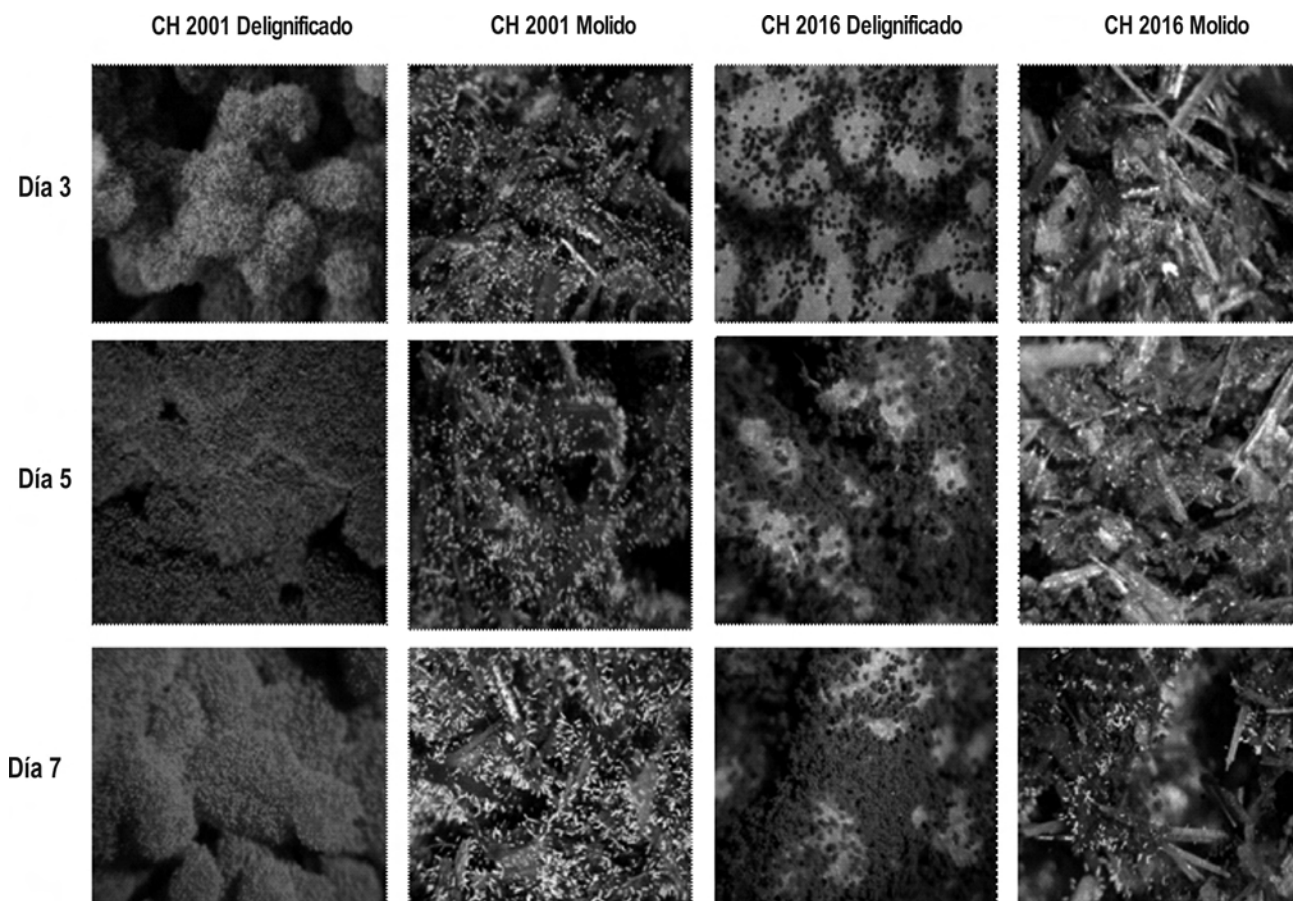


Figura 1. Micrografía del seguimiento de la colonización de los hongos sobre los sustratos deslignificado y molido (Estereomicroscopio 4x)

La colonización de los hongos en ambos sustratos aumentó con los días de fermentación, se evidencia que el crecimiento se presentó en los dos sustratos formándose micelios densos hacia el séptimo día de fermentación; se puede inferir que la concentración de inóculo fue adecuada ya que se ve colonización en todos los casos y crecimiento visible de los hongos desde el tercer día de fermentación.

Determinación de actividades enzimáticas celulolíticas

El análisis estadístico permitió comparar cada actividad de manera individual mostrando diferencias entre los valores de actividad enzimática expresada para cada hongo en los sustratos evaluados, todos los valores se presentaron con un nivel de significancia de 0,05. En la figura 2 se encuentran condensados los resultados de las tres repeticiones realizadas.

La mayor actividad EnG registrada ($11,0773 \pm 4,28$ U/mL), fue expresada por el hongo CH 2016 en el sus-

trato molido al séptimo día de fermentación, seguida del hongo CH 2001 al quinto día de fermentación en el mismo sustrato ($10,9340 \pm 0,56$ U/mL). Valores que difieren significativamente de los obtenidos con los dos hongos en el sustrato deslignificado ($p < 0,001$). En la figura 2 se observan las diferencias entre las condiciones evaluadas. Lo anterior indica que la actividad EnG es notoriamente afectada por el tipo de sustrato evaluado, indicando que la actividad celulolítica de los microorganismos es específica para cada sustrato celulósico a evaluar.

Estudios relacionados reportan actividades EnG similares como es el caso de Sukumaran *et al.* (2009) quienes encontraron una actividad de 6,77 U/mL utilizando el hongo *Aspergillus niger* MTCC 7956 con salvado de trigo como sustrato y Aguiar (2008) quien utilizando bagazo de caña de azúcar pre-tratado con 2% H_2O_2 + 1,5% NaOH, reporta en esta misma actividad un valor de 5,58 U/mL; indicando estos reportes que los resultados obtenidos son satisfactorios y que los RAC molidos como sustrato permiten una mayor

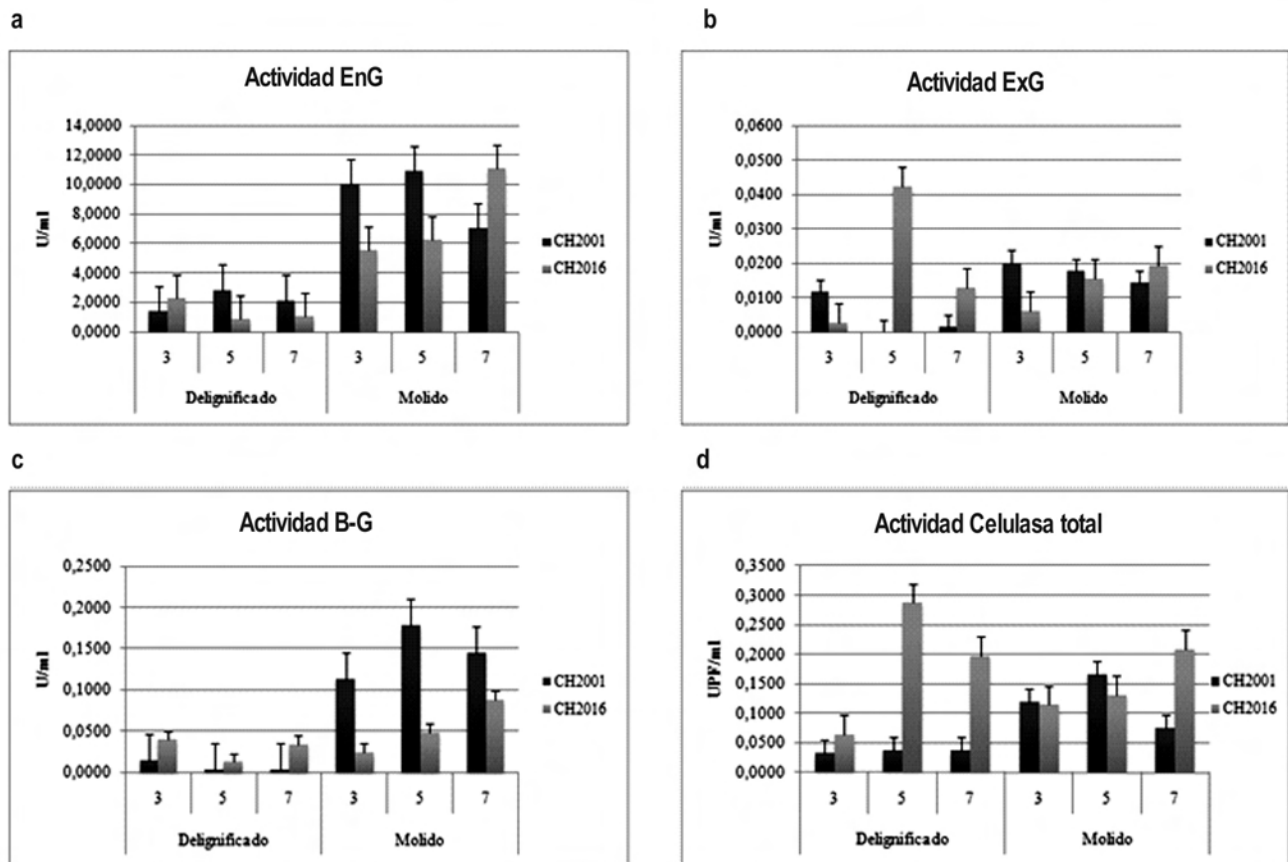


Figura 2. Actividades enzimáticas celulolíticas obtenidas en los extractos crudos de la SSF de los hongos CH 2001 y CH 2016 en los sustratos deslignificado y molido. (a) Endoglucanasa; (b) Exoglucanasa; (c) β -glucosidasa; (d) Celulasa total.

obtención de esta enzima bajo las condiciones evaluadas en este estudio.

La mayor actividad ExG ($0,042 \pm 0,04$ U/mL) se obtuvo con el hongo CH 2016 en el quinto día de fermentación a partir del sustrato deslignificado, diferenciándose significativamente de los demás tratamientos evaluados ($p=0,03$). Vale la pena resaltar éste valor, puesto que para los demás niveles evaluados las actividades fueron menores a 0,02, lo cual permite señalar que el sustrato deslignificado favorece la expresión de esta enzima.

Estudios realizados por Ramírez y Cocha (2003) encontraron la mayor actividad ExG $0,33$ U/mL al tercer día de fermentación utilizando actinomicetos celulolíticos termófilos, sin embargo los microorganismos empleados son diferentes, por lo que la expresión enzimática también es notablemente diferente.

Con relación a la actividad B-G se presentaron diferencias significativas entre los sustratos y los hongos evaluados, registrándose actividades superiores al utilizar sustrato molido ($p<0,001$), encontrando que la mayor actividad registrada ($0,1778 \pm 0,01$ U/mL) fue expresada por el hongo CH 2001 el quinto día de fermentación en el sustrato molido. Como se puede observar en la figura 2, esta actividad aumenta del día tres al día cinco, cuando presenta su mayor expresión, sin embargo para el séptimo día, el valor disminuye, lo cual puede ser debido a un posible efecto de represión enzimática asociado a la acumulación de la glucosa producto de ésta actividad o a una baja presencia de celobiosa, que inhibe la expresión de la enzima β -glucosidasa (Aguar, 2010).

El hongo CH 2001 registró mayor actividad B-G en el sustrato molido, presentando diferencias significativas entre casi todas las demás combinaciones; un estudio realizado por Sukumaran *et al.* (2009), reporta una actividad B-G de $0,22$ U/mL a partir de *Trichoderma reesei* RUT C30 utilizando como sustrato salvado de trigo, siendo estos resultados comparables con los obtenidos en este trabajo. Aguar (2010) afirma que varias especies de *Aspergillus sp.*, producen altos niveles de β -glucosidasa, la cual se considera muy importante en el proceso de sacarificación, debido a que la acumulación de celobiosa (degradada por la B-G) en el medio puede causar inhibición de la EnG y ExG, perjudicando el sinergismo entre estas enzimas, lo que resulta en una disminución del rendimiento del proceso de sacarificación. Todo esto lleva a pensar que los resultados obtenidos bajo estas condiciones son importantes al momento de decidir formar un coctel enzimático del complejo celulolítico.

En cuanto a la actividad celulasa total, se encontró la mayor APF ($0,287 \pm 0,35$ UPF/mL) con el hongo CH 2016 al quinto día en el sustrato deslignificado, seguido de este mismo hongo en sustrato molido al séptimo día con una APF ($0,208 \pm 0,06$ UPF/mL) sin presentarse diferencias significativas entre estos. En la figura 2 se observan los resultados de esta actividad.

No se encontraron diferencias significativas entre los sustratos para esta actividad pero sí hubo diferencias entre los dos hongos evaluados, donde el hongo CH 2016 al quinto día presentó diferencias significativas con el hongo CH 2001 en los días evaluados; se presentaron diferencias significativas para el hongo CH 2016 durante los días tres y cinco de fermentación en el sustrato deslignificado. Vilches (2002), reportó una actividad APF de $0,073$ U/mL a partir de *Aspergillus sp.*, siendo los resultados de este estudio mayores al mencionado. Sin embargo, Vilches (2002) cultivó el hongo en medio Czapeck líquido con papel filtro 0,5% como única fuente de carbono con agitación periódica por lo que las condiciones de trabajo fueron diferentes. Por el contrario, otros trabajos reportan APF muchos mayores como el caso de Rodríguez y Piñeros (2007) que reportan comparaciones de otros trabajos donde obtuvieron valores APF de 9,88 y 8,38 U/mL de dos mutantes de *T. reesei* QMY-1 y MCG 80 cultivados en fase sólida sobre paja de trigo pretratada con NaOH y explosión por vapor; estas APF superan las encontradas en este estudio pero se resalta que ellos utilizaron cepas mutantes que han sido modificadas para producir celulasas y los tratamientos fueron diferentes.

Como se mencionó anteriormente, se evaluó la proteína soluble como medida indirecta de la producción de enzimas sintetizada por los microorganismos, la figura 3 muestra los resultados.

La mayor proteína soluble para el hongo CH 2016 se obtuvo al séptimo día en el sustrato molido y para el hongo CH 2001 se obtuvo en el tercer día en el mismo sustrato ($39,19 \pm 34$ y $26,90 \pm 46$ mg/L, respectivamente). Según estos resultados, se podría asociar la producción de enzimas de los hongos con las actividades enzimáticas expresadas; en el caso específico de la actividad EnG y B-G donde sus mayores resultados se dieron en el sustrato molido, al igual que la proteína soluble, es probable que el microorganismo haya necesitado trabajar más activamente para la producción de estas enzimas, según estos resultados.

Cabe resaltar, que las características físico-químicas de cada sustrato según el pre-tratamiento afectó directamente el comportamiento de las actividades enzimá-

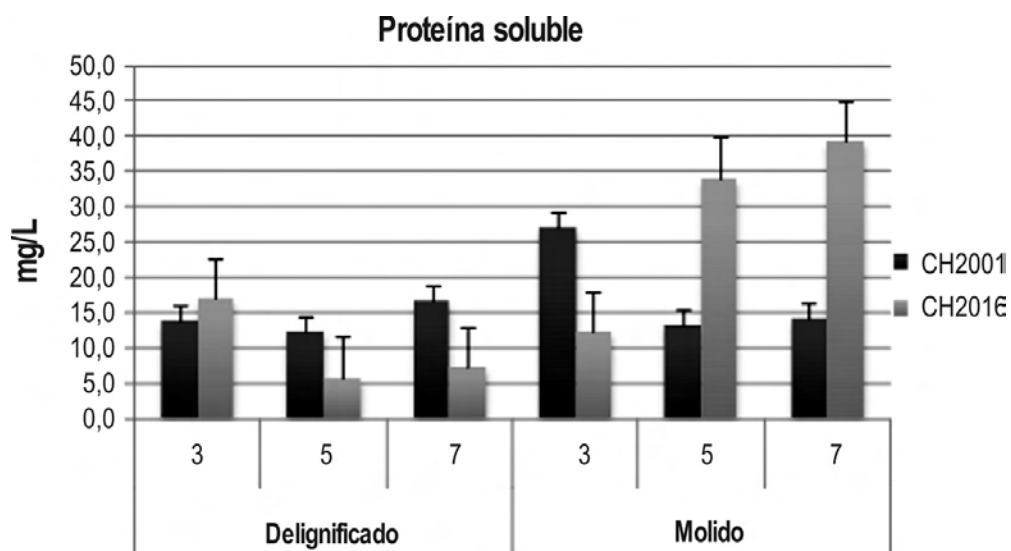


Figura 3. Proteína soluble en el extracto crudo de la SSF con los hongos CH 2001 y CH 2016 en los sustratos deslignificado y molido.

ticas del complejo celulolítico, por lo que podríamos concluir que el complejo enzimático depende del tipo de sustrato utilizado, el microorganismo y las condiciones de cultivo.

Se determinó la cantidad de enzima expresada por cada gramo de materia seca, a partir de la celulosa total (UPF/gMS). No se encontraron diferencias significativas entre los sustratos pero sí entre los hongos ($p=0,05$), donde el hongo CH 2016 expresó mayor canti-

dad de enzima celulolítica en la mayoría de los casos como puede apreciarse en la figura 4.

En el sustrato deslignificado se registró la mayor actividad enzimática celulolítica por cada gramo materia seca utilizada; sin embargo, en los resultados de las actividades celulolíticas (EnG, ExG y B-G), se encontró que en el sustrato molido se dio la mayor expresión de la actividad EnG y B-G. Estos resultados sugieren la posibilidad de conformar un coctel enzimático que

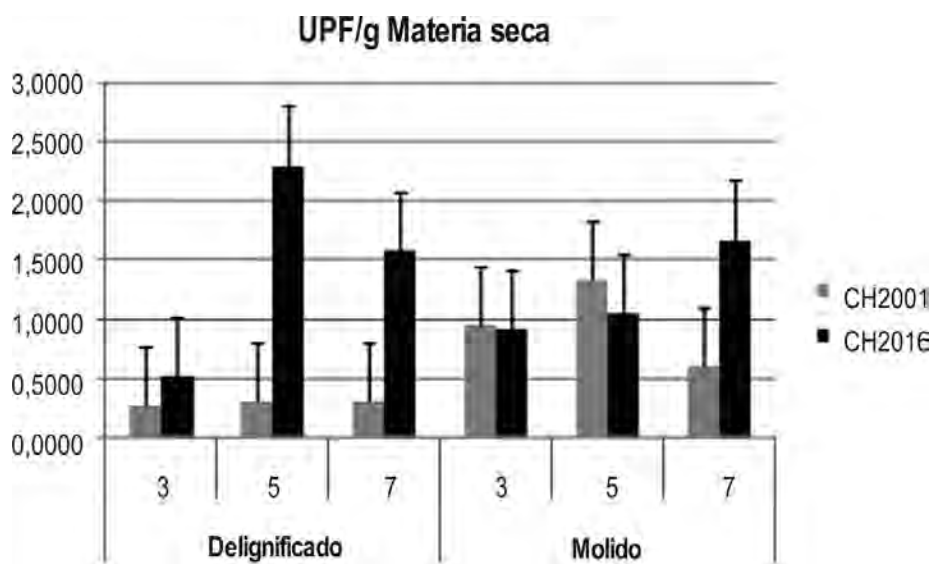


Figura 4. Actividad enzimática celulolítica sobre papel filtro encontrada por cada gramo de sustrato utilizado con los hongos CH 2001 y CH 2016 en la SSF (Resultados promedio de tres repeticiones).

comprenda todo el complejo celulolítico a partir de los mayores resultados de cada enzima, el hongo CH 2016 es promisorio y que la elección del sustrato depende de actividad celulolítica específica.

Conclusiones

Se detectaron todas las actividades enzimáticas del complejo celulolítico utilizando RAC fragmentados mecánicamente y pre-tratados con organosolventes bajo las condiciones y los hongos evaluados.

La SSF utilizando como sustrato RAC molidos, permiten la secreción de mayores concentraciones de enzimas EnG y B-G; mientras que RAC deslignificados con organosolventes permiten la secreción de mayores concentraciones de enzimas ExG y celulasa total bajo las condiciones evaluadas en este estudio.

Se observó que las variables sustrato y tiempo de fermentación, inciden en la expresión de las enzimas celulolíticas obteniendo en este trabajo extractos enzimáticos que pueden llevar a cabo una acción hidrolítica sinérgica sobre la celulosa.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación de la Caña de Azúcar de Colombia CENICAÑA y al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por la financiación y así permitir el desarrollo de esta investigación.

Referencias bibliográficas

Aguiar J.M. 2008. Análise enzimática de fungos lignocelulíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

Aguiar, C. M. 2010. Hidrólise enzimática de resíduos lignocelulósicos utilizando celulasas produzidas pelo fungo *Aspergillus niger*. Disertación Doctoral. Brasil: Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Ângelo R.S., 2004. Enzimas hidrolíticas. En Esposito E. y Azevedo J.I. *Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Universidade de Caixas do Sul. p. 263-285.

Arévalo Rodríguez A.L., 2011. *Evaluación de la actividad celulolítica de microorganismos aislados a partir de fuentes de biomasa lignocelulósica*. Tesis Ingeniería Biotecnológica. Cúcuta, Colombia: Universidad Francisco de Paula Santander; Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente.

Bautista Carrillo J. A., 2011. *Evaluación de la actividad enzimática de hongos nativos por fermentación en estado sólido utilizando residuos de cosecha de caña de azúcar delignificados*. Tesis Ingeniería Biotecnológica. Cúcuta, Colombia: Universidad Francisco de Paula Santander; Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente.

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.

Crawford D.L. y McCoy E., 1972. Cellulases of *Thermomonospora fusca* and *Streptomyces thermodiasticus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 24: 150-152.

Daza Merchán Z.T., Socarrás Díaz J.I., Hernández A.F., Gil N.J., Duran J.F. 2012. Avances en la producción de etanol y xilitol a partir de residuos de caña de azúcar. *Memorias Congreso ATALAC-Tecnicaña*. Cali, Colombia.

Ghose T.K. 1987. Measurement of cellulase activities.. *Pure and Applied Chemistry*. 59(2): 257-268.

Ghose T.K. y Bisaria, V.S. 1987. Measurement of hemicellulase activities. Part 1: Xylanases. *Pure and Applied Chemistry*. 59 (12): 1739-1752.

Gutiérrez Rojas M., Auria R., Benet J.C. y Revah S. 1995. A mathematical model for solid state fermentation of mycelial fungi on inert support. *Chemical Engineering Journal*. 60: 189-198.

Hölker U. y Lenz, J. 2005. Solid-state fermentation-are there any biotechnological advantages?. *Current Opinion in Microbiology*. 8: 301-306.

Hölker U., Höfer M. y Lenz, J., 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64: 175-186.

Machado de Castro A. y Pereira Jr N. 2010. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*. 33 (1): 181-188.

Moore D. 1998. *Fungal Morphogenesis*. New York, United States of America: Cambridge University Press.

Rabelo S.C. 2007. Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar. Disertación Maestría. Brasil: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas.

Ramírez, P. y Coha, J.M. 2003. Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Revista Peruana de Biología*. 10 (1): 67-77.

Ramos L.P. 2000. Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agro-industriais. *Centro de Pesquisa em Química Aplicada*, Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná.

Rodríguez C.S. y Sanromán M.A. 2005. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*. 22(3): 211-219.

Rodríguez G. I. y Piñeros C.Y. 2007. Producción de complejos enzimáticos celulolíticos mediante el cultivo en fase sólida de *Trichoderma* sp. sobre los racimos vacíos de palma de aceite como sustrato. *Vitae*. 14(2): 35-42.

Sukumaran R.K., Singhania R.R., Matthew G.M. y Pandey A. 2009. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. *Renewable Energy*. 34(2): 421-424.

Torres J. y Villegas F. 2006. Sistemas de manejo de residuos y efectos en la producción. *Serie Técnica-Cenicaña*. 35 (3).

Van Soest P.J. 1963. Use of detergents in the Analysis of fibrous feeds. I. Preparation of fiber residues of low nitrogen content. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*. 46(5):825 - 829.

Vilches Paz L. 2002. Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz. Tesis Biología. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas.