

AISLAMIENTO, SELECCIÓN Y EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD
ENZIMÁTICA DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE PILAS DE COMPOSTAJE
DE RESIDUOS VERDES DE LA UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

MARÍA ANGÉLICA ANGARITA RANGEL
LESLY VIVIANA RODRÍGUEZ FLÓREZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA
2018

AISLAMIENTO, SELECCIÓN Y EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE PILAS DE
COMPOSTAJE DE RESIDUOS VERDES DE LA UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE
SANTANDER

MARÍA ANGÉLICA ANGARITA RANGEL
LESLY VIVIANA RODRÍGUEZ FLÓREZ

Trabajo de grado para optar por el título de INGENIERA QUÍMICA

DIRECTORA

VIVIANA SÁNCHEZ TORREZ

Ingeniera Química, Ph.D.

CODIRECTOR

EDGAR RICARDO OVIEDO OCAÑA

Ingeniero Sanitario, MSc, Ph.D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA

2018

DEDICATORIA

A Dios, por darme salud, sabiduría, entendimiento y la determinación para culminar ésta etapa importante de mi vida.
Con todo el amor a mi madre **Isabel** y mi padre **Rodolfo**, quienes han sido el motor a lo largo de mi vida. Gracias por inculcarme los valores necesarios para transitar en este mundo por el camino del bien, por todo su esfuerzo para que nunca me faltará nada, por sus consejos y apoyo incondicional en los momentos difíciles.

A mi hermana Silvia, por ser la mejor compañera que la vida pudo regalarme, a Aurita por sus cuidados y por estar pendiente de mí en todo momento, a William por su amor y paciencia, por escucharme cuando más lo necesité, haberte conocido fue una bendición.

A mis amigas y amigos, por los momentos agradables durante esta etapa, por sacarme siempre una sonrisa, a la Selección Femenina de Baloncesto (SFB) y de Fútbol (SFF) por los momentos compartidos.

LESLY V. RODRIGUEZ FLOREZ

A mi madre, por su fortaleza, ejemplo y amor. Gracias por la compañía y el camino recorrido, gracias madre por permitirme llamarte así.

A mi familia y amigos por creer en mí, gracias por estar presentes en todo momento.

Al personal de la Escuela de Ingeniería Química, el Decanato de Físicoquímicas y la Vicerrectoría Administrativa, por el cariño y apoyo incondicional.

A mis docentes, por su compromiso y dedicación durante mi proceso de formación, y en especial a los profesores Viviana Sánchez T., Dionisio A. Laverde C. y Julio A. Pedraza A., por la confianza depositada en mí.

MARÍA ANGÉLICA ANGARITA RANGEL

AGRADECIMIENTOS

A la escuela de Ingeniería química y la Universidad Industrial de Santander por la orientación en este proceso.

A los profesores Viviana Sánchez Torres y Edgar R. Oviedo Ocaña por el acompañamiento, orientación y respaldo como directores de este proyecto de investigación.

A la vicerrectoría de investigación y extensión por la financiación del proyecto 2354 “Evaluación de estrategias para mejorar el compostaje de residuos lignocelulósicos provenientes de residuos de verdes”, por el suministro de material y reactivos.

A la profesora Débora Alcida Nabarlatz y al MSc Rolando A. Acosta Fernández, del grupo de investigación INTERFASE, por la orientación, apoyo y disposición de reactivos, material y equipos.

Al Grupo de Investigación en Minerales, Biohidrometalurgia y Ambiente – GIMBA por la disponibilidad de los laboratorios, equipos y reactivos, y al Centro de Investigación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular – CIMBIN por la disponibilidad de equipos.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. OBJETIVOS	17
1.1 OBJETIVO GENERAL	17
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
2. MARCO TEORICO	18
2.1 RESIDUOS VERDES	18
2.2 COMPOSTAJE	18
2.2.1 Etapas del proceso de compostaje.	18
2.2.1.4 Maduración	19
2.2.2 Microorganismos en el proceso de compostaje.....	20
2.3 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	21
2.3.1 Amilasas.	22
2.3.2 Celulasas.	23
2.3.3 Xilanasas.	25
3. METODOLOGÍA	28
3.1 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS	28
3.2 SELECCIÓN DE CEPAS CON MAYOR POTENCIAL DE DEGRADACIÓN. ..	30
3.2.1 Evaluación preliminar de la actividad enzimática para amilasa, xilanasas y celulasas, de los microorganismos seleccionados.	30
3.2.2 Evaluación de los efectos del pH y la temperatura en la actividad enzimática para amilasa, xilanasas y celulasas.	31
4. RESULTADOS.....	33
4.1 AISLAMIENTO DE BACTERIAS DE LAS PILAS DE COMPOSTAJE	33

4.1.1 Pruebas colorimétricas para identificar microorganismos con potencial de degradación de almidón, CMC, xilano y compost.	35
4.1.2. Definición del medio de cultivo para el crecimiento y preservación de los microorganismos aislados	37
4.2 EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA AMILASA, XILANASA Y CELULASA.....	39
4.2.1 Crecimiento en medio líquido de las cepas seleccionadas.....	39
4.2.2 Evaluación preliminar de la actividad enzimática por la técnica de DNS. ...	41
4.2.3 Evaluación de los efectos del pH y la temperatura en la actividad enzimática para amilasa, xilanasas y celulasas.	44
4.2.4 Verificación de la actividad enzimática.	46
5. CONCLUSIONES	48
6. RECOMENDACIONES	49
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	50
BIBLIOGRAFÍA	56
ANEXOS	62

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Cambios de temperatura y p H en una pila de compost promedio.	20
Figura 2. Estructura de la molécula de amilosa.	22
Figura 3. Estructura de la molécula de amilopectina.....	22
Figura 4. Estructura química de la celulosa.	24
Figura 5. Estructura de la D-xilosa y el xilano.	26
Figura 6. Número de las cepas aisladas de las pilas de compostaje: a) Tratamiento 1, b) Tratamiento 2 y c) Tratamiento 3.....	33
Figura 7. Cultivo de microorganismos en medio sólido.....	34
Figura 8. Selección colorimétrica de cepas productoras de enzimas a) Almidón, b) CMC y c) Xilano.	35
Figura 9. Número de microorganismos seleccionados como cepas con potencial de degradación de almidón, CMC, xilano y compost por pruebas colorimétricas	36
Figura 10. DH/DC de microorganismos conservados para los sustratos: a) Almidón, b) CMC y c) Xilano.	38
Figura 11. Medida de la Densidad Óptica. a) Almidón, b) CMC y c) Xilano.	40
Figura 12. Actividad enzimática a) Sustrato almidón, b) Sustrato CMC y c) Sustrato xilano.	42
Figura 13. Efectos principales y de interacción del pH y la temperatura de las cepas con mayor actividad enzimática para los sustratos: a) almidón, b) CMC y c) xilano.	45
Figura 14. Cantidad de glucosa producida en la reacción enzimática.	46

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Tratamientos de compostaje utilizados para el muestreo.....	28
Tabla 2. Cepas con mejor actividad enzimática.	44
Tabla 3. Comparación de resultados por las técnicas de DNS y cromatografía HPLC.	47

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Cepas seleccionadas.	62
Anexo B. Curvas de calibración para determinar azúcares reductores por el método DNS.	63
Anexo C. Cromatograma HPLC para las cepas F1A8 Y F3X4	64

RESUMEN

TÍTULO: AISLAMIENTO, SELECCIÓN Y EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE PILAS DE COMPOSTAJE DE RESIDUOS VERDES DE LA UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER *

AUTORES: MARÍA ANGÉLICA ANGARITA RANGEL
LESLY VIVIANA RODRÍGUEZ FLÓREZ **

PALABRAS CLAVES: Residuos verdes, actividad enzimática, celulasa, amilasa, xilanasas.

DESCRIPCIÓN: El compostaje como alternativa de descomposición de los residuos verdes, es tema de interés en la industria por su importante efecto al contribuir a producciones eficientes y amigables con el medio ambiente. En el proceso de compostaje, de residuos verdes, la degradación del material es llevada a cabo por microorganismos secretadores de enzimas capaces de reducir compuestos lignocelulósicos hasta la obtención de un producto final utilizado principalmente como abono. El presente trabajo consistió en el aislamiento de microorganismos de pilas de compostaje de residuos verdes de la Universidad Industrial de Santander y una evaluación preliminar de la actividad enzimática para amilasas, celulasas y xilanasas de los microorganismos aislados. Las pilas fueron enmendadas nutricionalmente con residuos de alimentos y roca fosfórica para favorecer el crecimiento y actividad de los microorganismos. Se tomaron muestras de las pilas en cada etapa del proceso de compostaje haciendo crecer la población microbiológica para posteriormente seleccionar y aislar cepas con potencial de degradación de almidón, carboxymetilcelulosa (CMC) y xilano. A las cepas seleccionadas les fue evaluada la actividad enzimática por el método DNS. Se desarrolló un diseño experimental factorial completo 3^2 por duplicado con las tres bacterias que reportaron la mayor actividad enzimática, esto para evaluar los efectos del pH y la temperatura. Como técnica comparativa, se realizó cromatografía HPLC para la mejor cepa degradadora de almidón y CMC, a las mejores condiciones de pH y la temperatura. Se encontró que existe una amplia población microbiana con potencial de degradación de xilano con la mayor actividad enzimática registrada a un pH 8 y temperatura de reacción de 40°C.

* Proyecto de Grado. Modalidad de investigación.

** Facultad de ingenierías Físicoquímicas. Escuela de ingeniería Química. Directora: Viviana Sánchez Torres. Ingeniera Química, PhD. Codirector: Edgar Ricardo Oviedo Ocaña. Ingeniero Sanitario, MSc, PhD.

ABSTRACT

TITLE: ISOLATION, SELECTION AND EVALUATION ENZYMATHIC ACTIVITY PRELIMINARY OF MICROORGANISM ISOLATED OF PILES GREEN WASTES COMPOSTING OF THE INDUSTRIAL UNIVERSITY OF SANTANDER *

AUTHORS: MARÍA ANGÉLICA ANGARITA RANGEL
LESLY VIVIANA RODRÍGUEZ FLÓREZ **

KEY WORDS: Green waste, enzymatic activity, cellulase, amylase, xylanase.

DESCRIPTION: composting as green wastes decomposition alternative, is an interesting topic in the industry because of its important effect of contributing to efficient and environmentally friendly productions. During the green wastes composting process, the degradation of the material is carried out by microorganisms that secrete enzymes capable of reducing lignocellulosic compounds until obtaining a final product used mainly as fertilizer. This study consisted in the isolation of microorganisms from composting piles of green waste, from the Industrial University of Santander and a preliminary evaluation of the enzymatic activity for amylases, cellulases and xylanases of those microorganisms. The piles were amended nutritionally with food waste and phosphate rock to promote the microorganisms' growth and activity. Samples of the piles were taken at each stage of the composting process, growing the microbiological population to later select and isolate strains with degradation potential of starch, carboxymethylcellulose (CMC) and xylan. The enzymatic activity was evaluated by the DNS method to the selected strains. A complete factorial experimental design 3^2 was developed in duplicate with the three bacteria that reported the highest enzymatic activity, this to evaluate the effects of pH and temperature. As a comparative technique, HPLC chromatography was performed for the best starch degrading strain and CMC, at the best pH and temperature conditions. It was found that there is a large microbial population with degradation potential of xylan with the highest enzymatic activity registered at a pH of 8 and a reaction temperature of 40°C.

* Undergraduate work. Modality of investigation.

** Physical and Chemical Engineering Faculty. Chemical Engineering School. Director: Viviana Sánchez Torres. Chemical engineer, PhD. Codirector: Edgar Ricardo Oviedo Ocaña. Sanitary engineer, MSc, PhD.

INTRODUCCIÓN

En las últimas dos décadas la industria ha estado en búsqueda de alternativas de producción eficientes y amigables con el medio ambiente, promoviendo la necesidad de disminuir la explotación de los recursos naturales y de aprovechar los residuos industriales y urbanos de una mejor manera; debido a que estos con un tratamiento adecuado podrían contribuir en la cadena productiva del país [1]. Entre las alternativas se destaca la técnica de descomposición de materia orgánica llevada a cabo por microorganismos, conocida como compostaje. En general, el producto obtenido por medio de esta técnica es utilizado principalmente como abono con importantes beneficios como: reducción de la cantidad de residuos, regulación del pH en suelos y la producción de alimentos orgánicos sin contaminación por agroquímicos, promoviendo una cultura orientada hacia el desarrollo sostenible y consumo responsable [2]. En Colombia, esta práctica ha avanzado con la implementación de plantas de tratamiento de residuos en diferentes regiones del país. Por ejemplo, en la sabana de Bogotá se compostan residuos de flores, en los llanos Orientales residuos de palma africana, en el eje cafetero residuos de café y en el Valle del Cauca los residuos de las industrias azucareras [1].

Para el desarrollo de este trabajo se contó con un montaje de pilas de residuos verdes, instaladas en el marco del trabajo de grado titulado “Evaluación de la aplicación de estrategias operativas en el mejoramiento y optimización del proceso de compostaje de residuos verdes”, de la Escuela de Ingeniería Civil. Estas pilas fueron ubicadas en la zona de disposición de residuos de la Universidad Industrial de Santander, con el fin de evaluar el efecto de la implementación de compostaje en dos etapas y la enmienda nutricional con la adición de residuos de alimentos y roca fosfórica, en la calidad del producto final [3]. Por su parte, las enzimas o biocatalizadores, son proteínas capaces de acelerar ciertas reacciones químicas importantes en industrias como la licorera, panadera, textil, papelera, de aplicaciones ambientales, entre otras [4]. El aislamiento e identificación de

microorganismos productores de enzimas y el análisis de su actividad enzimática en procesos de compostaje, ha sido materia de estudio en los últimos años principalmente para entender la dinámica de bio-conversión de los residuos, y generar estrategias que mejoren el proceso con la adición de inóculos microbianos definidos. Por tal motivo, el trabajo presentado a continuación consiste en el aislamiento de microorganismos involucrados en el proceso de compostaje descrito anteriormente, la evaluación preliminar de la actividad enzimática para amilasas, celulasas y xilanasas. Este proyecto abre paso a la intención de evaluar a futuro si la inoculación con los microorganismos aislados disminuye el tiempo de descomposición de los residuos en el proceso de compostaje.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad enzimática de microorganismos aislados a partir de pilas de compostaje de residuos verdes de la Universidad Industrial de Santander.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.** Aislar microorganismos durante las etapas mesofílica y termofílica del proceso de compostaje de residuos verdes de la Universidad Industrial de Santander.
- 2.** Seleccionar las cepas con mayor potencial de degradación del material lignocelulósico.
- 3.** Realizar evaluación preliminar de la actividad enzimática para la amilasa, celulasa y xilanasas, de los microorganismos seleccionados.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 RESIDUOS VERDES

“Como residuos verdes se entienden residuos vegetales tales como pastos cortados, hojas secas y ramas, los que se generan como resultado del cultivo y mantenimiento de jardines, parques, espacios públicos, así como de la conservación de paisajes” [5].

2.2 COMPOSTAJE

El compostaje es un proceso de descomposición de materia orgánica llevado a cabo por microorganismos aerobios, que tiene como finalidad la obtención de un producto estable de color oscuro y partículas finas denominado compost [6].

El compost, con mejores propiedades físico-químicas que el material original, es empleado en la agricultura y jardinería como abono, puede ser manipulado, almacenado, transportado y aplicado al suelo sin afectar el medio ambiente. El compostaje, se ha convertido en las últimas décadas en la alternativa tecnológica más utilizada para la reducción de residuos orgánicos en un 40% en peso y 50% en volumen [7], mejorando la permeabilidad en suelos arcillosos y favoreciendo la germinación de semillas al devolver los nutrientes a la tierra, que serán aprovechados por las plantas.

2.2.1 Etapas del proceso de compostaje. En condiciones óptimas, durante el proceso de compostaje los microorganismos generan calor al descomponer el Carbono (C), nitrógeno (N) y demás materia orgánica, este calor medible a través de las variaciones de temperatura a lo largo del tiempo permite clasificar el proceso en cuatro fases:

2.2.1.1 Mesófila. Con la materia orgánica a temperatura ambiente los microorganismos mesófilos (microorganismos que se desarrollan a temperaturas medias) se multiplican rápidamente y en pocos días e incluso en horas, la temperatura asciende hasta los 45 °C. Así mismo, la degradación de compuestos solubles como los azúcares en esta primera etapa, producen ácidos orgánicos que pueden bajar el pH hasta cerca de 4,0 o 4,5, en un tiempo de duración entre dos y ocho días para la fase [8].

2.2.1.2 Termófila. Cuando el material compostado alcanza temperaturas mayores a los 45 °C los microorganismos mesófilos son reemplazados por aquellos que crecen a mayores temperaturas, en su mayoría bacterias termófilas, que facilitan la degradación de fuentes de C más complejas como la celulosa y la lignina. La temperatura de compostaje en la etapa termófila se encuentra entre 65°C y 70°C, alcanzados en tiempos de 24 a 72 horas. Esta fase puede durar días o meses, dependiendo de las propiedades del material de partida, el tamaño de la pila, las condiciones del lugar y las condiciones ambientales; además, se le conoce como fase activa por la acelerada descomposición del material, también se lleva a cabo la higienización del compost, eliminando patógenos y semillas de maleza gracias a las altas temperaturas [9].

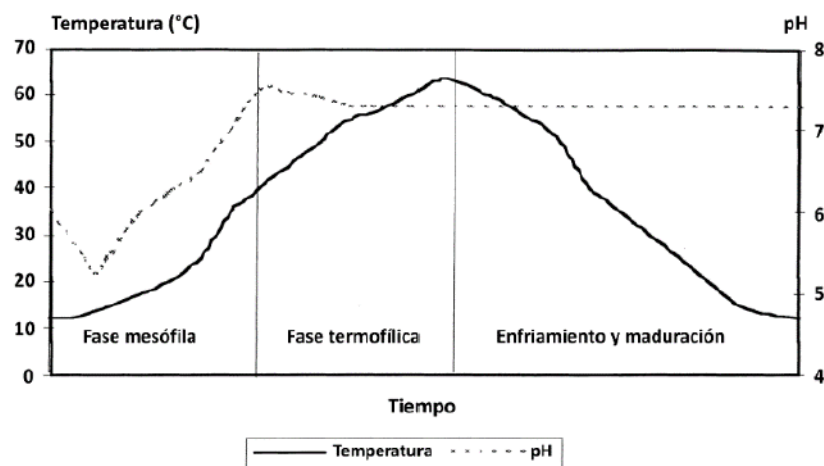
2.2.1.3 Enfriamiento. En esta fase la temperatura desciende por debajo de los 40°C, reduciendo la actividad microbiana, debido a la disminución de las fuentes de carbono en el material compostado. Aquí, los microorganismos mesófilos reinician su actividad y degradan los azúcares restantes, celulosa y hemicelulosa, durante varias semanas [8].

2.2.1.4 Maduración. En esta última fase los residuos orgánicos continúan descomponiéndose y se convierten en sustancias húmicas biológicamente estables, donde los ácidos orgánicos potencialmente tóxicos también se estabilizan. Este periodo puede durar de 1 a 12 meses a temperatura ambiente [9], con la finalidad

de garantizar un compost de calidad estable en temperatura y pH, que no represente amenaza alguna a plantas o suelo, a la hora de su aplicación.

En la Figura 1 se presentan las fases del proceso de compostaje en el tiempo en función de la temperatura y el pH

Figura 1. Cambios de temperatura y p H en una pila de compost promedio.



Fuente: CALDERÓN, Arley Y., MEDINA, Juan C. Evaluación de la aplicación de estrategias operativas en el mejoramiento y optimización del proceso de compostaje de residuos verdes. Trabajo de Grado Ingeniero Civil. Bucaramanga, Santander. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicomecánicas. 2018. 67 p.

2.2.2 Microorganismos en el proceso de compostaje. Los microorganismos que intervienen en el proceso de compostaje varían en función de aspectos como la temperatura, nutrientes, oxígeno, pH y humedad, entre otros. Por ello, el uso de técnicas de laboratorio convencionales, para optimizar este proceso, ha permitido caracterizar más de 70 especies de microorganismos [10] entre los que destacan los grupos de bacterias termofílicas como las *Bacillus*, examinadas para determinar la actividad de celulasas [11] usando carboximetilcelulosa (CMC) [12]. Las bacterias y hongos mesófilos también han sido objeto de estudio en la capacidad de degradación de residuos orgánicos; cepas como *Solibacillus Silvestris*, *Arthrobacter*

arilaitensis, Isoptericola variabilis y Acinetobacter calcoaceticus son capaces de hidrolizar el almidón [13] y el hongo Saccobolus saccoboloide registra actividad enzimática para celulasas, xilanasas y amilasas [14]. Cabe resaltar qué, las bacterias son las principales y primeras degradadoras de la materia orgánica, en relación a los hongos y actinomicetos presentes en el proceso [15].

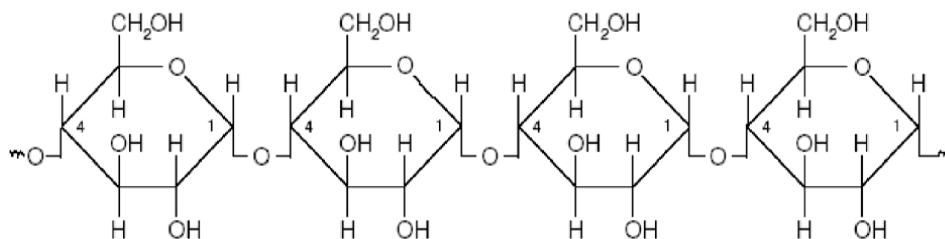
2.3 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La biomasa lignocelulósica es considerada como el principal recurso renovable prometedor en la tierra por su gran disponibilidad y propiedades químicas con valor biotecnológico. Entre los materiales constituidos principalmente por lignocelulosa en su pared celular, se encuentran los residuos agrícolas (cáscaras, paja, ramas, hojas, etc.), desechos industriales, desechos sólidos urbanos y domésticos, que ofrecen sustratos para el crecimiento de microorganismos productores de enzimas [16].

Henríquez y colaboradores en su estudio sobre la actividad enzimática en suelos plantean que “Las enzimas son un tipo especial de proteínas que se combinan con un sustrato específico y actúan para catalizar una reacción bioquímica, sin experimentar cambios en su estructura; en términos generales las enzimas son esenciales para la transformación de energía y el reciclaje de nutrientes. Debido a su naturaleza proteica pueden ser afectadas por factores ambientales como son la temperatura y el pH” [17]. Enzimas como las celulasas, xilanasas, ligninasas y amilasas, han sido usadas durante décadas en procesos biotecnológicos tales como textiles, detergentes, pulpa y papel, cervecería y vino, alimentos para animales, agricultura y por supuesto, con fines investigativos. Estas enzimas intervienen en la mayoría de los procesos y reacciones químicas en la naturaleza específicamente en el ciclo del nitrógeno, fósforo y carbono, siendo responsables de la formación de moléculas orgánicas [18].

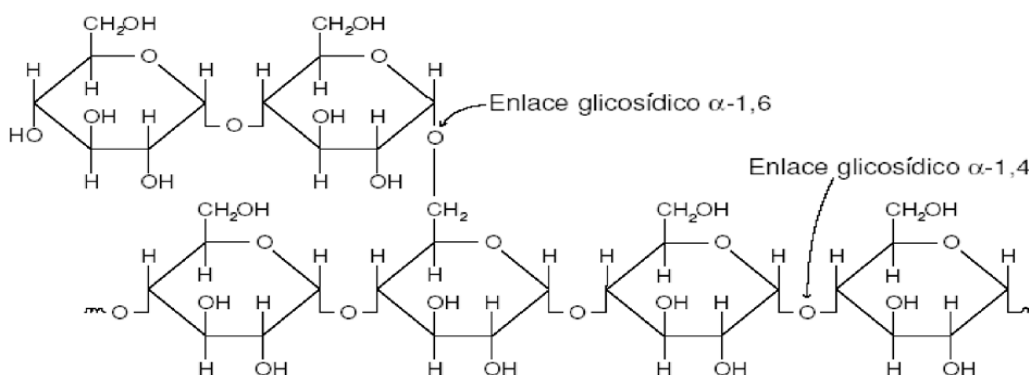
2.3.1 Amilasas. El almidón es un carbohidrato complejo digerible del grupo de los glucanos, formado en un 80% de amilopectina y en un 20% de amilosa, que a su vez se compone de monómeros de glucosa unidos por enlaces glucosídicos α 1-4 y α 1-6 como se observa en las Figuras 2 y 3. El almidón es la principal sustancia de reserva energética que poseen los vegetales. Proporciona el 70-80% de las calorías consumidas por los humanos al encontrarse en cereales como el arroz y el trigo, y en los tubérculos como la yuca, papa, plátano [19].

Figura 2. Estructura de la molécula de amilosa.



Fuente: AVILÉS RUIZ, Gladys. Segmentos de una molécula de amilosa. [Imagen]. Obtención y caracterización de un polímero biodegradable a partir del almidón de yuca. Ingeniería y ciencia. Colombia. Universidad EAFIT. 2006. Vol, 2. No, 4. p, 8.

Figura 3. Estructura de la molécula de amilopectina.



Fuente: AVILÉS RUIZ, Gladys. Segmentos de una molécula de amilopectina. [Imagen]. Obtención y caracterización de un polímero biodegradable a partir del almidón de yuca. Ingeniería y ciencia. Colombia. Universidad EAFIT. 2006. Vol, 2. No, 4. p, 9.

El almidón es hidrolizado por amilasas, ampliamente distribuidas en la naturaleza en el reino animal, vegetal y microbiano, divididas en endoamilasas y exoamilasas. Las α -amilasas son enzimas del tipo endoamilasas, que rompen los enlaces glicosídicos α -1,4 en el interior del sustrato, causando la formación de oligosacáridos lineales y ramificados con longitudes variables. Esta forma es una de las más populares y relevantes de amilasas industriales, usadas en sectores como: textil, papelería, panificación, fermentación, preparación de fármacos y producción de detergentes, aunque su principal aplicación es la producción de jarabes de glucosa, maltosa, maltotriosa, dextrina y/o fructosa [20] [21]. Por su parte, las exoamilasas como las β -amilasas hidrolizan la maltosa y las *glucoamilasas* que remueven unidades de glucosa, actuando desde los extremos no reductores de los polímeros de almidón [22].

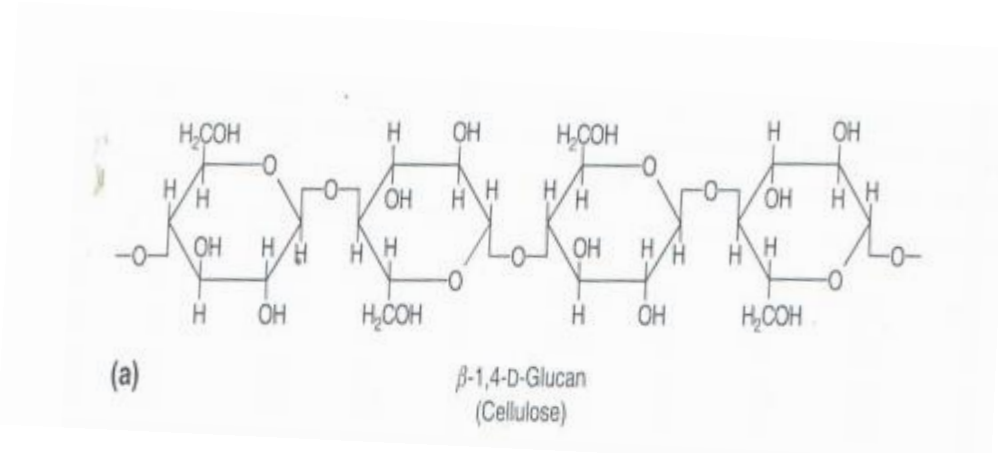
La fuente bacteriana para la producción de enzimas es la preferida industrialmente, pues presentan ventajas como: fácil disponibilidad, una económica producción en masa, estabilidad de operación, crecimiento rápido, medios de cultivo poco exigentes y los microorganismos se pueden manipular fácilmente para obtener la enzima deseada [23]. El crecimiento y la expresión enzimática están influenciados por la fuente de carbono y nitrógeno usados en el medio de cultivo; en el caso de las amilasas, frecuentemente se usa extracto de levadura, peptona y triptona como fuentes de nitrógeno, para incrementar la producción enzimática [23] [24]. Las α -amilasas bacterianas del género *Bacillus* como *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens*, se usan en procesos industriales debido a sus rangos de temperatura óptima (25-90 °C), resistencia a pH extremos (1,0-11,5) y altos niveles de expresión enzimática. [25].

2.3.2 Celulasas. La celulosa es el componente más abundante de la biomasa vegetal, la fuente de carbono renovable más abundante de la tierra. Se encuentra en las paredes celulares de las plantas y es sintetizada a través de la fotosíntesis.

Químicamente, la celulosa es un polisacárido lineal formado por varias moléculas de D-glucosa unidas por enlaces β -1,4-glucosídicos. El número de unidades de glucosa ($-\text{CH}_2\text{OH}$) dentro de la molécula puede ser entre cientos y miles, organizadas en cadenas largas y sin ramificaciones que se alternan arriba y abajo del plano de los anillos (Figura 4).

Las cadenas de celulosa están suficientemente empaquetadas para prevenir la penetración de enzimas y de moléculas pequeñas semejantes al agua, sin embargo, las estructuras más débiles de la molécula permiten el acceso de enzimas celolíticas y se hace susceptible a la hidrólisis [26].

Figura 4. Estructura química de la celulosa.



Fuente: HELDT, Hans-Walter. Plant Biochemistry and Molecular Biology. Oxford University Press. 1997. p. 7.

La celulasa es la enzima especializada en descomponer celulosa, compuesta estructuralmente de un dominio catalítico y un módulo de unión a carbohidratos. Esta enzima producida por algunos microorganismos, principalmente bacterias y hongos filamentosos mediante la hidrólisis química, convierte la molécula de celulosa en carbohidratos solubles que pueden pasar a través de su membrana celular [16].

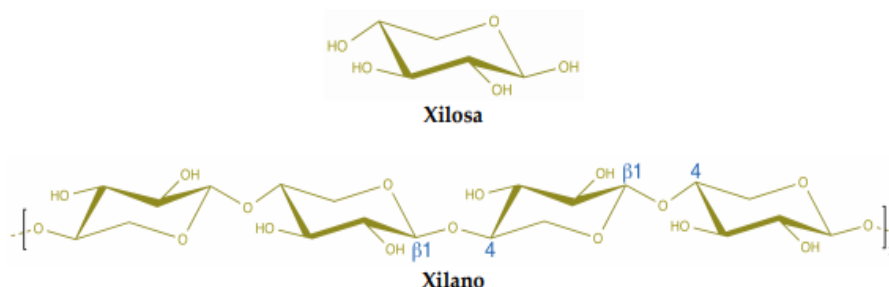
Las celulasas están compuestas por una mezcla de tres grupos de proteínas enzimáticas, entre ellas las *endoglucanasas* específicamente hidrolizando los enlaces β -1,4 glucosídicos y originando oligosacáridos de diferentes tamaños reduciendo el grado de polimerización de la cadena de celulosa. La actividad de las *endogluconasas* se mide frecuentemente sobre celulosa soluble con un alto grado de polimerización como es el caso de la carboximetilcelulosa (CMC), su medición puede ser basada en la reducción de la viscosidad del sustrato y/o en el incremento de extremos reductores que se determinan por técnicas que permiten medir azúcares reductores [26].

Otro grupo de enzimas son las *exoglucanasas* que actúan sobre los extremos libres de la celulosa liberando celobiosa como producto principal y glucosa en cantidades pequeñas. Finalmente está el grupo de las *β -glucosidasas* que hidrolizan los oligosacáridos solubles cortos y la celobiosa para llevarlas a monómeros de glucosa, la actividad de estas enzimas puede ser medida usando celobiosa la cual no es hidrolizada por las endogluconasas ni exogluconasas [27] [28] [29].

Entre las bacterias capaces de producir celulasas están: *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus*, entre otras [27].

2.3.3 Xilanasas. La hemicelulosa es el material orgánico renovable más abundante en la tierra después de la celulosa, constituido en más del 70% de su masa por xilano, este es un carbohidrato con una cadena principal de 70 a 200 monómeros de xilosa dependiendo del material vegetal, unidos por enlace β (1-4) y cadenas laterales de arabinosa α (1-3) o ácido glucorónico α (1-2) como se muestra en la figura 5 [30].

Figura 5. Estructura de la D-xilosa y el xilano.



Fuente: SAINZ POLO, María Ángela. Fórmulas de la D-xilosa y el xilano. Mecanismos moleculares de degradación de la pared celular vegetal: estructura y especificidad de xilanasas multidominio. Tesis doctoral. España. 2016. p, 17.

La degradación del xilano requiere de un complejo enzimático clasificado en dos tipos de enzimas, según la ruptura del xilano: *endoxilanasas* (β -1,4), que rompe los enlaces glucosídicos de la cadena principal del polímero, produciendo oligómeros de β -D xilopiranosil, y la *exo-xilosidasa* conocida como β -*xilosidasa*, que libera residuos de xilosa a partir de la xilobiosa y oligómeros producidos. La degradación de las cadenas laterales es llevada a cabo por α -L-arabinofuranosidasas, α -D-glucuronidasas, acetilxilano esterasas, ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico esterasas [31] [32]. El interés en la degradación de xilano incluye industrias como la alimenticia y de papel, empleando la endoxilanasas en panificación y el blanqueo de celulosa respectivamente [33].

Generalmente las xilanasas producidas por bacterias y hongos, lo hacen en presencia de cualquier residuo lignocelulósico, sin embargo su máxima expresión se logra tras la inducción de xilano o sustratos enriquecidos en este polisacárido (pulpa de madera, cascara de arroz, caña de azúcar, etc.) en el medio de cultivo; las bacterias de los géneros *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Micrococcus* y *Staphylococcus*, se encuentran involucrados en la producción de esta enzima, dedicándose esfuerzos en los últimos años al aislamiento de microorganismos termófilos por su producción de enzimas de mayor estabilidad [34]. La xilanasas actualmente son

producidas y comercializadas por países como Estados Unidos, Japón y Alemania entre otros, por su importancia biotecnológica [33].

La actividad de las enzimas puede ser medida por diferentes técnicas de forma cualitativa o cuantitativa, dentro de las cualitativas encontramos el lugol: una disolución de yodo molecular (I_2) y yoduro potásico (KI) en agua destilada que se usa como indicador de polisacáridos como almidones, glucógenos, ciertas dextrinas, entre otros; es una prueba que se observa visualmente por la formación de halos translucidos alrededor de las colonias de microorganismos inoculados. [35]. Por otro lado, el DNS una técnica utilizada para la cuantificación de azúcares reductores totales (ART) en la hidrólisis de polisacáridos usando ácido 3,5-dinitrosalicílico como indicador, los azúcares logran cuantificarse por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm [36].

3. METODOLOGÍA

El procedimiento realizado para el desarrollo de esta investigación tuvo tres etapas secuenciales: 1) Aislamiento de los microorganismos, 2) Selección de los microorganismos con potencial de degradación y 3) evaluación preliminar de la actividad enzimática para amilasa, celulasa y xilanas, determinando también el efecto del pH y temperatura de reacción para las tres mejores cepas en cada sustrato almidón, carboximetilcelulosa y xilano.

3.1 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

En esta etapa se contó con 3 tratamientos diferentes de pilas de compostaje (Tabla 1), cada uno por triplicado, ubicadas en las instalaciones de la Universidad Industrial de Santander. El compostaje en dos etapas corresponde a compostaje confinado y luego tradicional, con dos picos de temperatura y el compostaje en una etapa es el tradicional con un pico de temperatura [3].

Tabla 1. Tratamientos de compostaje utilizados para el muestreo.

	TRATAMIENTO 1	TRATAMIENTO 2	TRATAMIENTO 3	MASA [KG]
COMPOSICIÓN	Residuos verdes	Residuos verdes	Residuos verdes	96
	Residuos de	Residuos de	Residuos de	42
	alimentos crudos y	alimentos crudos	alimentos crudos y	36
	procesados	y procesados	procesados	
	Aserrín	Aserrín	Aserrín	26
	Roca fosfórica	Roca fosfórica	-	30
COMPOSTAJE	2 etapas	1 etapa	1 etapa	

El aislamiento de los microorganismos se llevó a cabo tomando muestras del centro de cada pila (20 cm respecto al diámetro y 30 cm respecto a la altura), en las etapas mesofílica, termofílica y maduración del proceso, almacenando las muestras a 4 °C, 40 °C y 4 °C respectivamente hasta su uso. El material lignocelulósico fue triturado en mortero de granito en medio estéril. A 90 ml de solución salina 0,9 M se agregaron 10 g de muestra macerada en matraz Erlenmeyer, uno por cada tratamiento de compost muestreado. Posteriormente se dejaron en agitación durante 30 min obteniendo una solución homogénea con la cual se prepararon diluciones sucesivas desde 10^{-1} hasta 10^{-10} .

El crecimiento de la población microbiológica se desarrolló en platos de agar como medio de cultivo. Se prepararon 6 medios sólidos con diferentes sustratos: carboximetilcelulosa sal sódica (CMC) (ALFA, USA), xilano de tusa de maíz peso molecular de 300-900 (Carbosynth, USA), almidón dulce comercial y el material puesto a compostar en las pilas T₁, T₂ y T₃.

El contenido nutritivo de los medios de cultivo en porcentaje peso volumen fue: 1,7% agar, 0,2% NaNO₃, 0,1% K₂HPO₄, 0,05% MgSO₄, 0,05% KCl, 0,2% fuente de carbono, 0,02% peptona cuando se usó CMC y 0,02% de extracto de levadura cuando se usó almidón, xilano y compost como fuentes de carbono [37]. Los platos de agar fueron inoculados con 100 µL de las diluciones 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} y 10^{-9} , y se incubaron durante 48 horas a temperatura ambiente para las muestras tomadas en la fase mesofílica y 50 °C para las muestras tomadas en la fase termofílica.

La identificación y selección de los microorganismos a aislar se hizo por inspección, escogiendo todas las cepas de características morfológicas diferentes en cada medio cultivado. Las cepas aisladas fueron sembradas con palillos estériles en un medio de cultivo sólido fresco, con el sustrato específico de origen. Los microorganismos aislados fueron puestos en incubación por 48 horas a temperatura ambiente para mesófilos y 50 °C para termófilos.

3.2 SELECCIÓN DE CEPAS CON MAYOR POTENCIAL DE DEGRADACIÓN.

A los microorganismos aislados les fue medido el diámetro de colonia (DC) a las 48 horas de incubación. A cada colonia se le agregaron gotas de lugol (0,32% yodo sublimado y 0,65% yoduro potásico, en agua destilada), esparciendo el reactivo de manera uniforme por todo el plato. Pasados 5 min, al observar claramente la formación de un halo amarillo alrededor de las colonias [38], se midió el diámetro del halo (DH) para cada una.

El valor del cociente DH/DC [39] fue calculado para cada una de las cepas probadas. Se seleccionaron todas aquellas que presentaron un valor del cociente igual o superior a 2,0, como microorganismos con potencial de degradación del sustrato correspondiente. Las cepas seleccionadas fueron puestas en crecimiento individualmente en nuevos medios de cultivo agar con su sustrato de origen, con el fin de obtener colonias aisladas puras. Este procedimiento se repitió dos veces más aumentando el criterio de selección, DH/DC, a valores iguales o superiores a 3,0 en la segunda selección, y a valores iguales o superiores a 4,0 en la tercera selección. Las cepas de los tratamientos T₁, T₂ y T₃, fueron escogidas con cocientes DH/DC iguales o superiores a 4,5, por su alta actividad. Con el fin de definir un medio de crecimiento y conservación, cada una de las cepas puras seleccionadas fueron probadas otra vez con lugol únicamente para CMC, xilano y almidón. Aquel medio en el que una cepa presentó un mayor valor DH/DC, comparado entre los 3 sustratos, fue escogido finalmente como medio de cultivo para el aislamiento y preservación de dicha cepa.

3.2.1 Evaluación preliminar de la actividad enzimática para amilasa, xilanasa y celulasa, de los microorganismos seleccionados. En tubos de ensayo se adicionaron 4 ml de medio de cultivo con la siguiente composición p/v: 0,2% NaNO₃, 0,34% KH₂PO₄, 0,56% Na₂HPO₄, 0,05% MgSO₄, 0,05% KCl, 0,5% fuente de carbono (almidón, xilano o CMC), 0,1% extracto de Levadura. El xilano fue producido por el grupo de investigación INTERFASE mediante auto hidrólisis a partir de pergamino de café [40]. Las cepas mesofílicas más un tubo de ensayo con medio

sin inóculo como control, se dejaron en incubación a temperatura ambiente y 180 rpm por un periodo de 72 horas; y los inoculados con cepas termofílicas y su respectivo control, fueron dejados en incubación a 50 °C por un periodo de 72 horas. El crecimiento bacteriano se evaluó mediante la densidad óptica (DO) a 600 nm en un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-VIS (Thermo Scientific, USA), Los cultivos fueron centrifugados en una microcentrifuga PRISM™ (Labnet, USA) a 13000 rpm durante 5 min y se separó el sobrenadante (solución enzimática).

La cuantificación de la actividad enzimática se realizó determinando la concentración de azúcares reductores liberados cuando la solución enzimática reaccionó con almidón, xilano y CMC, usando como agente reductor ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) [41]. Se hicieron curvas de calibración con xilosa y glucosa, y se determinó la concentración inicial de azúcares reductores en las soluciones enzimáticas. Para esto, se prepararon muestras con 150 µL de solución de muestra, 100 µL buffer de fosfatos y 200 µL DNS [39] (en p/v 1% DNS, 0,2% fenol, 0,05% sulfito de sodio anhidro y 1% hidróxido de sodio). Las muestras fueron llevadas a baño de agua hirviendo durante 5 min, agregando posteriormente 150 µL Sal de Rochell (40% p/v) y se llevaron a un baño de agua helada durante 1 min [42]. A continuación, se agregaron 2400 µL de agua destilada y se midió absorbancia a una longitud de onda de 540 nm.

La determinación de la actividad enzimática se realizó cambiando los 100 µL de buffer por 100 µL de sustrato (solución 1% p/v de almidón, xilano o CMC), con un tiempo de reacción de 60 min a 50 °C.

3.2.2 Evaluación de los efectos del pH y la temperatura en la actividad enzimática para amilasa, xilanasa y celulasa. Se evaluaron las tres mejores cepas para cada sustrato seleccionadas en la etapa anterior. Se planteó un diseño experimental factorial 32, con el pH y la temperatura como factores con sus respectivos niveles [6, 7, 8] y [40, 50, 60 °C]. Los experimentos fueron realizados por duplicado, midiendo la concentración de azúcares reductores en las soluciones enzimáticas y al reaccionar con el sustrato como se describió en la sección 3.2.1.

El análisis estadístico de los datos se realizó con ANOVA con el software minitab 18.

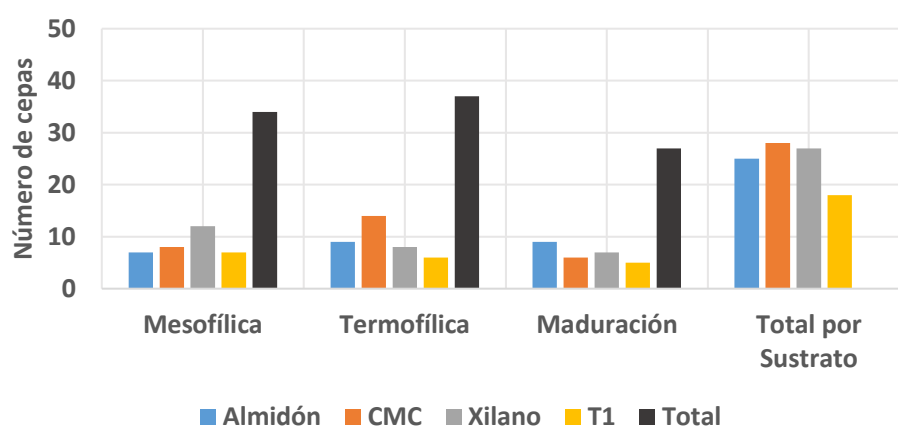
Para la validación del método DNS y verificación de la actividad enzimática, se realizó cromatografía HPLC en una columna Coregel 107H acoplada a un equipo UFLCLC 20AD (Shimadzu, Japón) para la mejor cepa de almidón y CMC, bajo las condiciones de pH y temperatura en las que se identificó mayor actividad enzimática en el análisis estadístico comparando la concentración de glucosa inicial con la obtenida luego de 60 min de reacción.

4. RESULTADOS

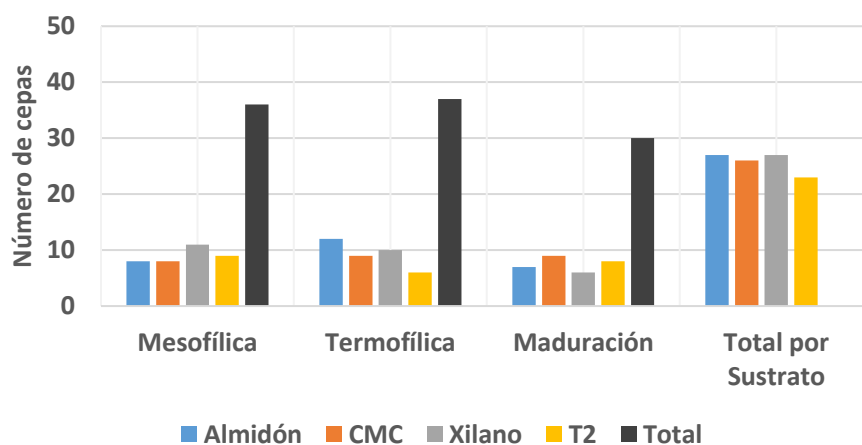
4.1 AISLAMIENTO DE BACTERIAS DE LAS PILAS DE COMPOSTAJE

Se aislaron 306 microorganismos con morfologías diferentes de los medios de cultivo con almidón, CMC, xilano y los tratamientos de compost T₁, T₂ y T₃, para cada una de las fases del proceso de compostaje. En la Figura 6 se observa el número de cepas identificadas en cada una de las pilas de compostaje.

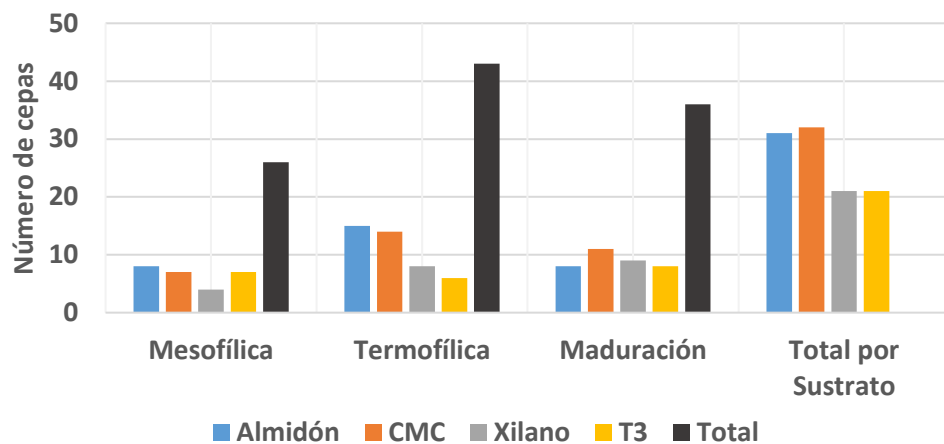
Figura 6. Numero de las cepas aisladas de las pilas de compostaje: a) Tratamiento 1, b) Tratamiento 2 y c) Tratamiento 3



a)



b)



c)

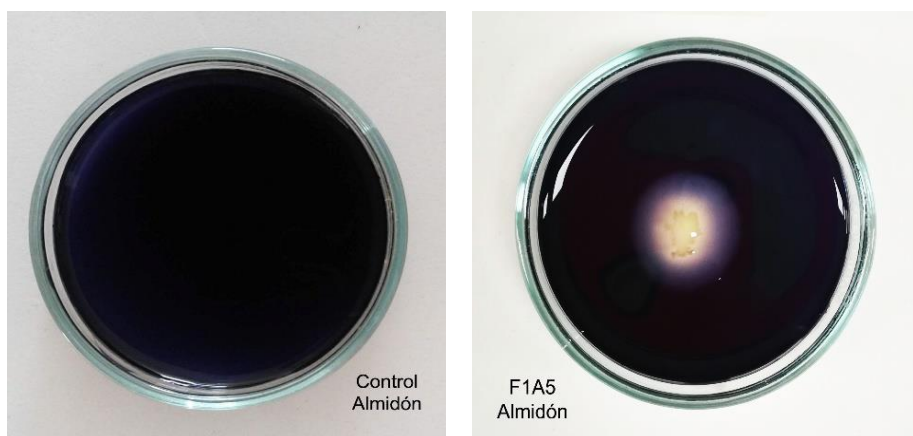
En términos generales, puede observarse que el crecimiento de la población microbológica con fuentes de carbono como almidón, CMC, xilano y compost, fue mayor en el tratamiento T₃ con un total de 105 cepas de las cuales 43 crecieron en la fase termofílica, en presencia de almidón y CMC principalmente. En los medios de cultivo en los cuales se utilizó compost como fuente de carbono, el crecimiento microbiano fue menor en relación al crecimiento en medios de cultivo con las otras fuentes de carbono. En la Figura 7 se observa, como ejemplo, una fotografía de placa Petri con medio de cultivo agar de donde se aislaron colonias diferentes.

Figura 7. Cultivo de microorganismos en medio sólido

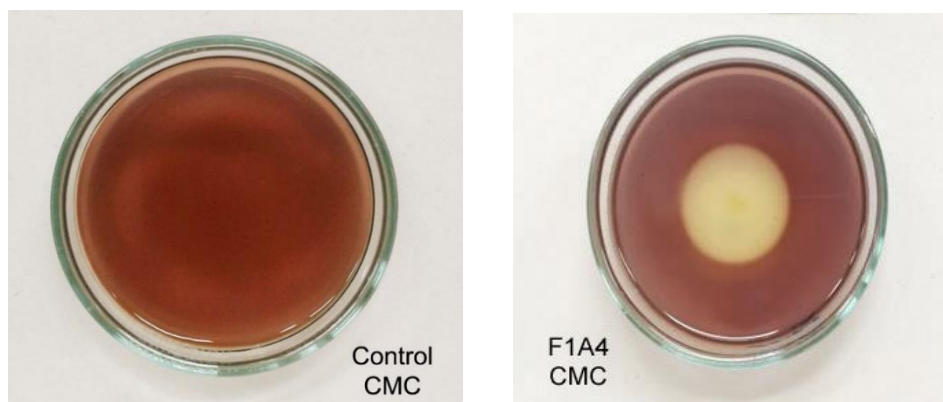


4.1.1 Pruebas colorimétricas para identificar microorganismos con potencial de degradación de almidón, CMC, xilano y compost. Todos los microorganismos identificados con morfologías diferentes, se probaron por tinción con lugol como se muestra en la Figura 8.

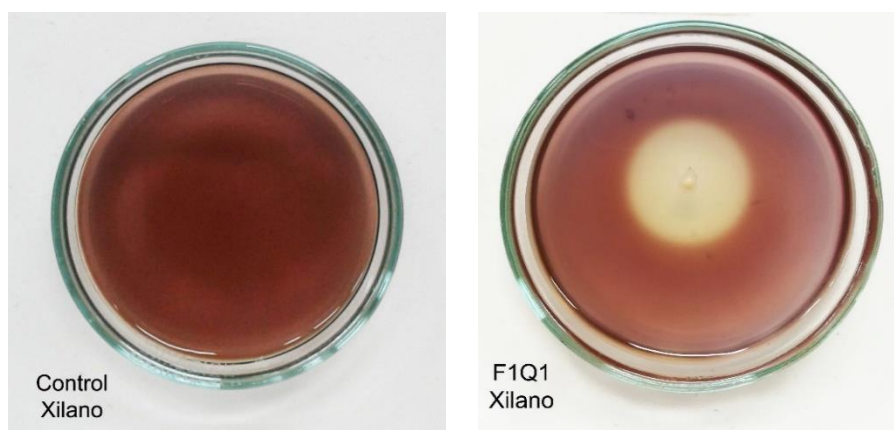
Figura 8. Selección colorimétrica de cepas productoras de enzimas a) Almidón, b) CMC y c) Xilano.



a)



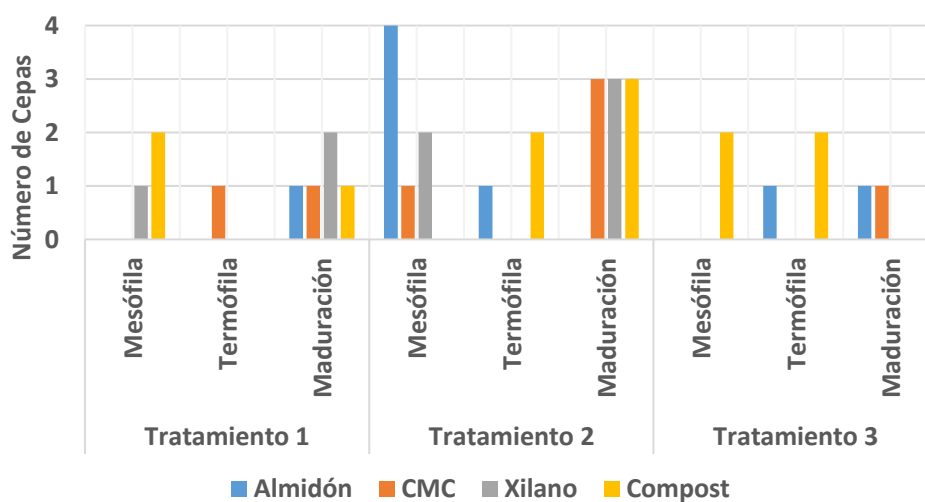
b)



c)

Los valores DH/DC obtenidos se encuentran entre 1 y 9, de las tres rondas de selección realizadas utilizando como criterio valores de DH/DC iguales o superiores a 2, 3 y 4 consecutivamente. El número de microorganismos finalmente seleccionados como cepas con potencial de degradación para almidón, CMC, xilano y compost, fue de 33 microorganismos diferentes provenientes de las diferentes pilas de compostaje como se muestra en la Figura 9.

Figura 9. Número de microorganismos seleccionados como cepas con potencial de degradación de almidón, CMC, xilano y compost por pruebas colorimétricas



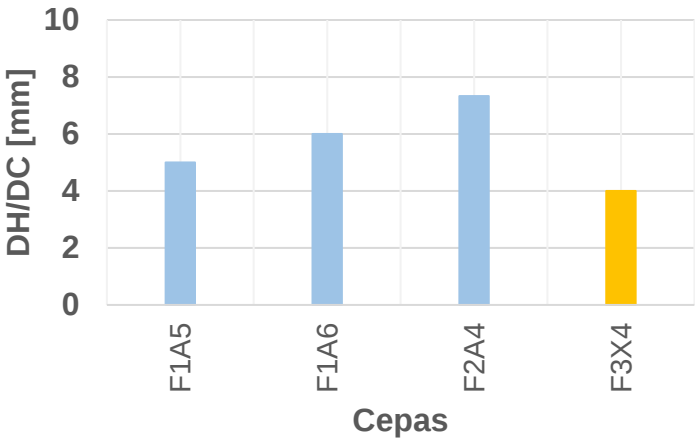
El mayor número de cepas con potencial de degradación de los sustratos estudiados, provienen de la pila de compostaje de tratamiento T₂, con 19 microorganismos en total; el número de microorganismos degradadores de compost (12 cepas), es mayor en relación al número de cepas degradadoras de almidón, CMC y xilano (8, 7 y 9 cepas respectivamente).

4.1.2. Definición del medio de cultivo para el crecimiento y preservación de los microorganismos aislados. Mediante pruebas colorimétricas con lugol, cada una de las cepas seleccionadas fue evaluada con los sustratos individuales: almidón, CMC y xilano, con el fin de seleccionar el sustrato en el que cada cepa tenga la mayor actividad enzimática (amilasas, celulasas, o xilanasas). Los valores DH/DC para cada cepa en cada sustrato diferente se presentan en el Anexo A. A cada microorganismo le fue asignado un nombre compuesto por números y letras donde la primera letra y número hacen referencia a la fase de la cual se aisló, siendo la fase mesofílica F1, la termofílica F2 y maduración F3; la tercera letra indica la fuente de carbono usada originalmente para el crecimiento, donde A se usa para almidón, C para CMC y X para xilano, y O, P y Q para los tratamientos T₁, T₂ y T₃ respectivamente. El último número o letra de la nomenclatura es un número aleatorio de conteo. Por ejemplo, la cepa con nombre F3X4, es una cepa de la fase de maduración (F3) que originalmente creció en xilano (X) y es la cepa número 4 de las seleccionadas de la fase 3 para xilano.

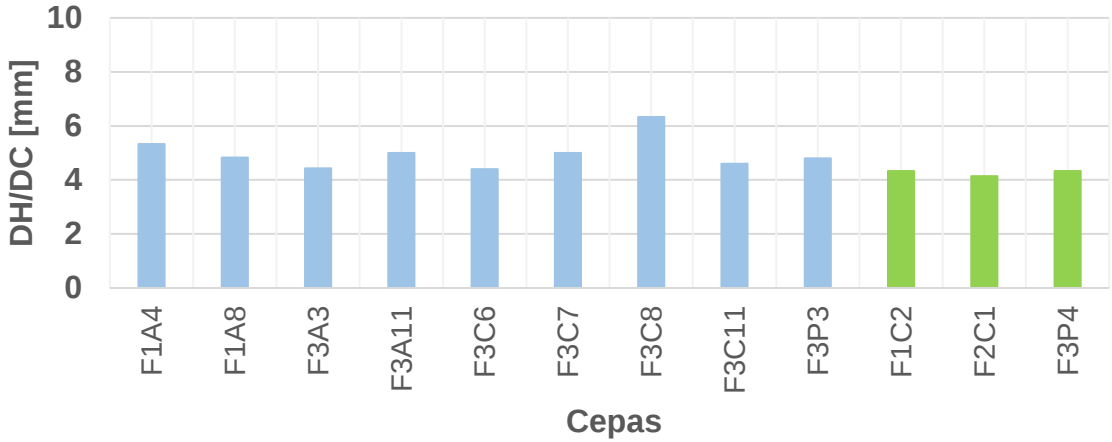
Se definió como medio de aislamiento y conservación para cada una de las cepas, aquel sustrato para el cual el valor DH/DC fue máximo; los microorganismos que presentaron valores similares para sustratos diferentes se aislaron y conservaron en ambos medios de cultivo. De esta forma, se conservan 4 cepas en almidón, 12 cepas en CMC y 17 cepas en xilano de las cuales, 4 presentan actividad de degradación similar en los otros medios. En la Figura 10 se presentan la distribución

de las cepas conservadas para cada uno de los sustratos resaltando con diferente color aquellas que muestran actividad para dos sustratos diferentes.

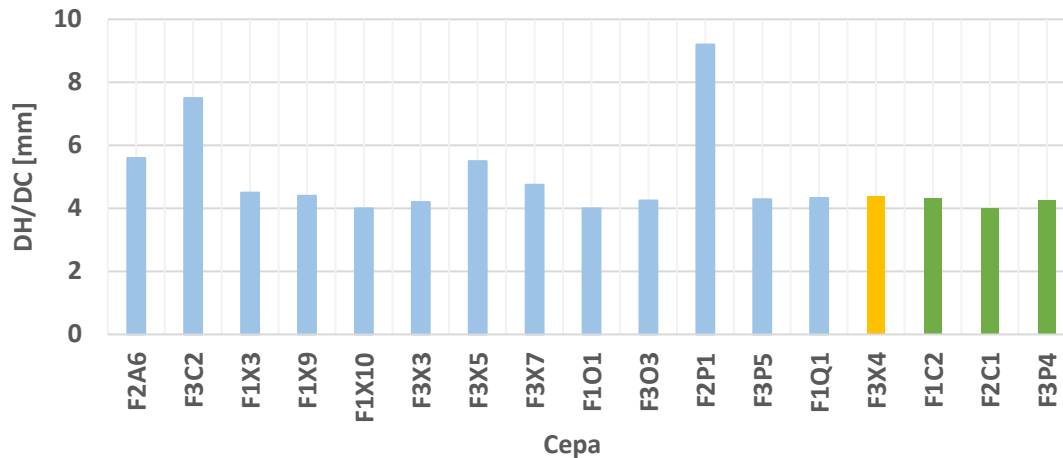
Figura 10. DH/DC de microorganismos conservados para los sustratos: a) Almidón, b) CMC y c) Xilano.



a)



b)



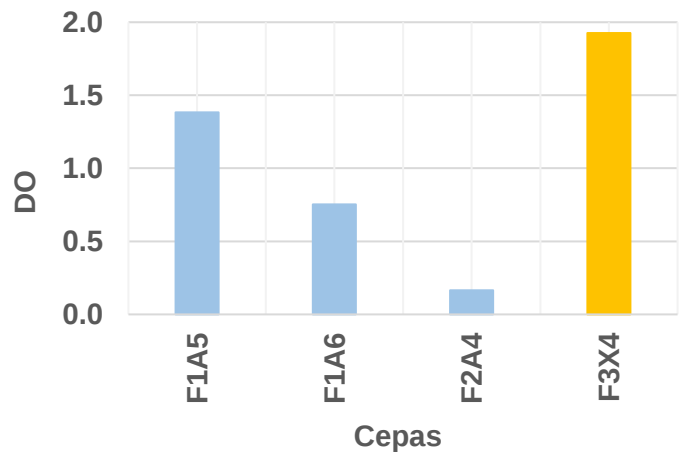
c)

El potencial de degradación es mayor para xilano y CMC, y menor para almidón como puede observarse en las Figura 10. Las cepas F3X4, F1C2, F2C1 Y F3P4 con actividad en xilano y otro sustrato, se comportan de manera similar con valores del DH/DC de 4 para ambos sustratos. La mayor actividad se registra en la cepa F2P1 en xilano con un DH/DC de 9.

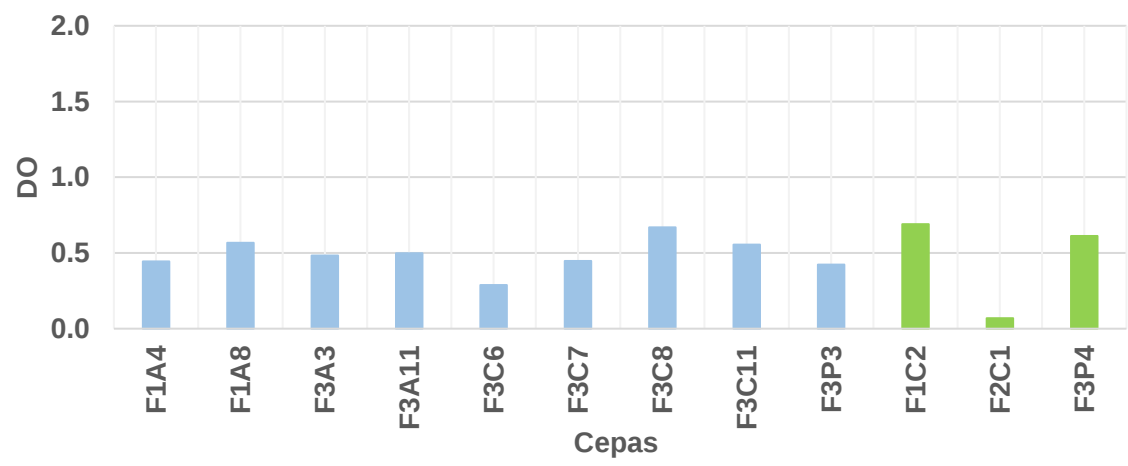
4.2 EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA AMILASA, XILANASA Y CELULASA.

4.2.1 Crecimiento en medio líquido de las cepas seleccionadas. A los cultivos líquidos, les fue medida la densidad óptica (DO) como indicador del crecimiento bacteriano. Los resultados son consignados en la Figura 11, para los sustratos almidón, CMC y xilano.

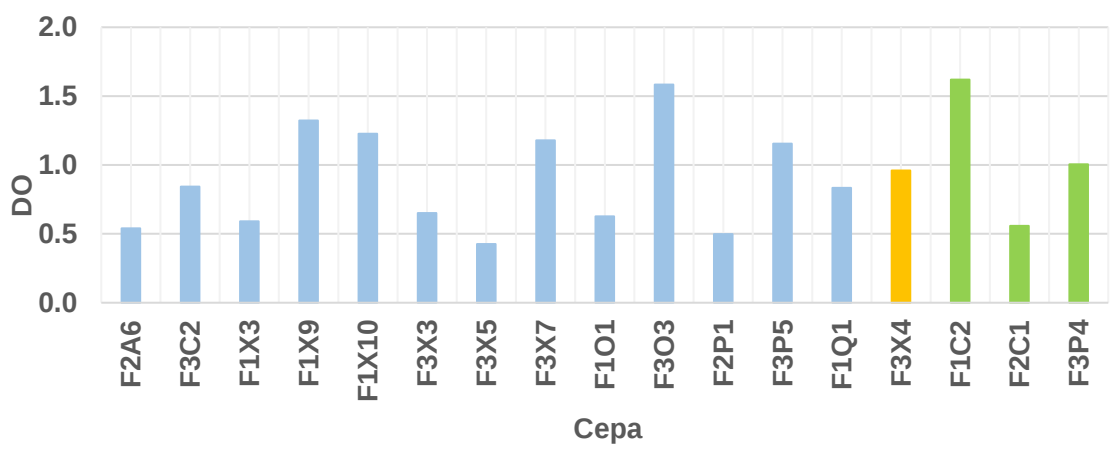
Figura 11. Medida de la densidad óptica. a) Almidón, b) CMC y c) Xilano.



a)



b)



c)

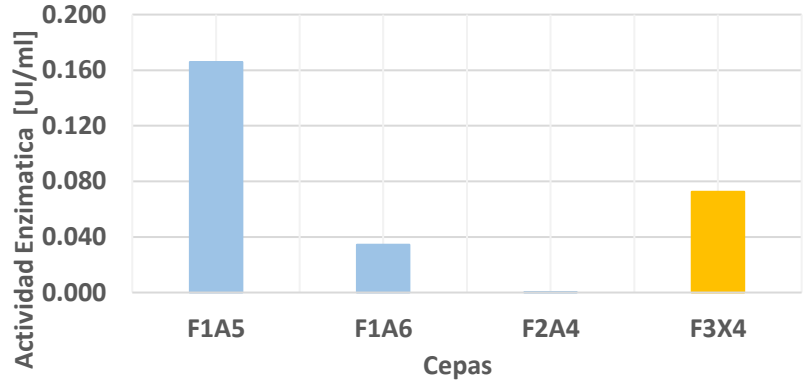
En la Figura 11a. Se observa que la cepa F3X4 muestra el mejor crecimiento en cultivo líquido y; la cepa F2A4 no crece con almidón como fuente de carbono. La densidad óptica de los cultivos líquidos de CMC es baja, como se observa en la Figura 11b. F1C2 y F3C8 son los microorganismos que más crecen y F2C1 no crece en presencia de dicho sustrato. De los 17 microorganismos cultivados en xilano, 7 presentan un alto crecimiento. Las cepas que registran los valores más altos de crecimiento son F1C2 y F3O3 con valores superiores a 1,5. Las cepas con los menores indicadores de crecimiento son F3X5 y F2P1 (Figura 11c).

Respecto al crecimiento de las cepas en los tres sustratos, se observa, que el mayor valor se registra en almidón para la cepa F3X4. En CMC las cepas presentan crecimientos bajos y en xilano el crecimiento es intermedio en relación a los otros sustratos. Entre los microorganismos con potencial de degradación de 2 sustratos distintos, se observa que F1C2, F2C1 Y F3P4 crecen mejor en xilano que en CMC.

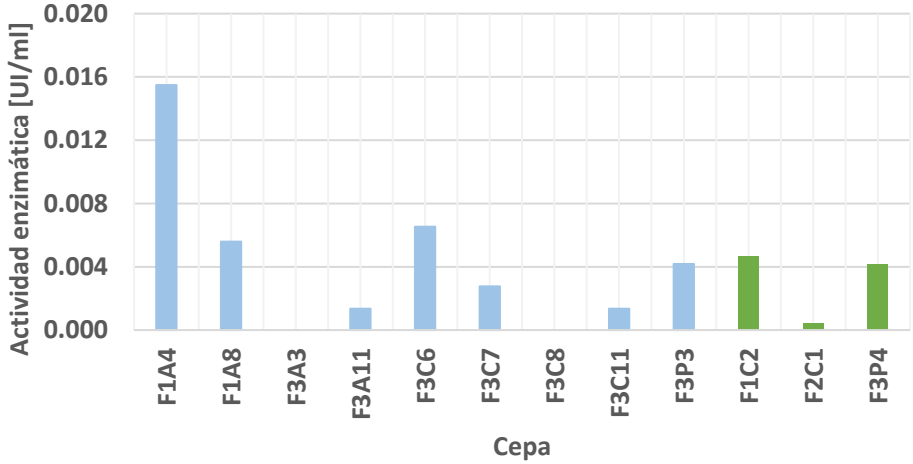
4.2.2 Evaluación preliminar de la actividad enzimática por la técnica de DNS.

Se determinó la cantidad de azúcares reductores producto de la reacción solución enzimática-sustrato por medio de las curvas de calibración respectivas presentadas en el Anexo B. La actividad enzimática se expresó en el sistema internacional en UI, unidad de actividad enzimática, refiriéndose a la cantidad de enzima que transforma un μmol de sustrato por minuto en condiciones estándar previamente establecidas por ml de enzima. En la Figura 12 se reporta la actividad enzimática de las cepas seleccionadas para cada sustrato.

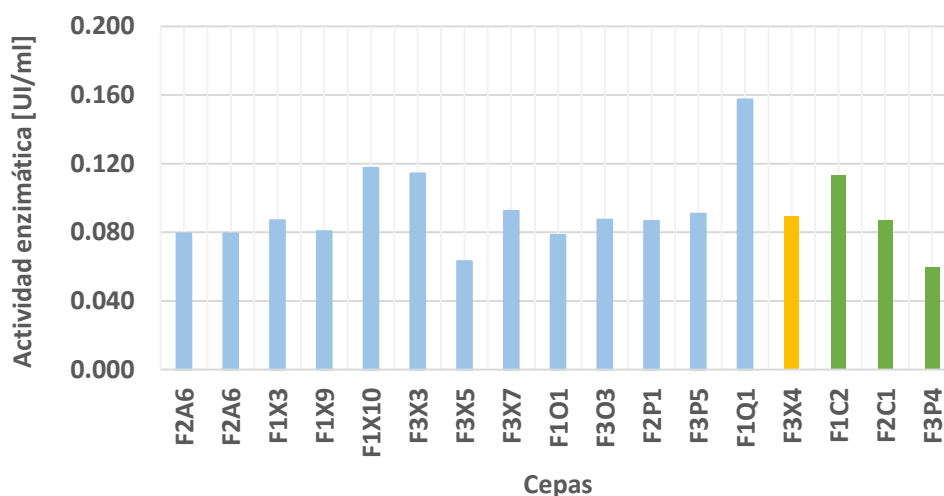
Figura 12. Actividad enzimática a) Sustrato almidón, b) Sustrato CMC y c) Sustrato xilano.



a)



b)



c)

La máxima actividad enzimática registrada para almidón se obtiene para la cepa F1A5 con un valor superior a los 0,16 UI/ml y la mínima actividad se registra en F2A4, sin actividad, como se evidencia en la Figura 12a. Según el valor de DO de la Figura 11a para la cepa F3X4 se esperaría que ésta reporte mayor actividad, sin embargo, se observa una actividad de 0,008 UI/ml por debajo de la máxima para este sustrato. La mayor actividad registrada para celulasas se obtiene de la cepa F1A4 cercana a los 0,016 UI/ml como se observa en la Figura 12b. Las demás cepas no registran actividad significativa respecto a F1A4. En general, la actividad enzimática en xilano registra mayores valores comparado con los otros sustratos, por ejemplo, F1Q1 se acerca a los 0,16 UI/ml y F1X10, F3X3 Y F1C2 se acercan a 0,12 UI/ml.

Para los microorganismos con potencial de degradación de 2 sustratos distintos puede observarse que: F3X4 muestra mayor actividad en almidón que en xilano; y F1A5, F1A6 y F2A4 registran mayor actividad en xilano que en CMC.

De los resultados de la evaluación preliminar de actividad enzimática, se escoge para cada sustrato la cepa con mayor actividad con el fin de evaluar el efecto del pH y temperatura. En la Tabla 2. Se resume el comportamiento de las 3 mejores cepas escogidas.

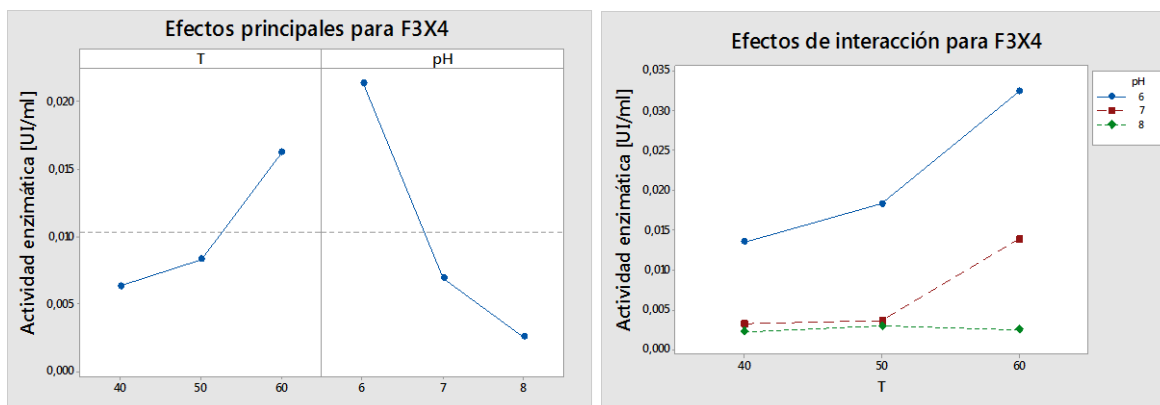
Tabla 2. Cepas con mejor actividad enzimática.

SUSTRATO	CEPA	DH/DC	D.O.	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA [UI/ML]	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PROMEDIO [UI/ML]
ALMIDÓN	F3X4	4,00	1,926	0,0725	0,0909
	F1A5	5,00	1,383	0,1658	
	F1A6	6,00	0,756	0,0343	
CMC	F3C6	4,40	0,288	0,0065	0,0092
	F1A8	4,83	0,567	0,0056	
	F1A4	5,33	0,444	0,0155	
XILANO	F3X3	4,20	0,651	0,1143	0,1298
	F1Q1	4,33	0,843	0,1574	
	F1X10	4,00	1,227	0,1176	

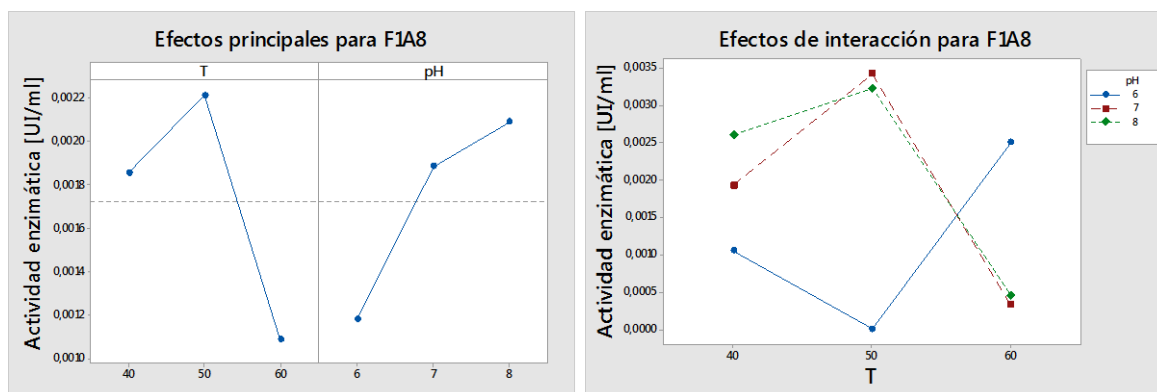
Puede observarse que la actividad enzimática a las mismas condiciones de temperatura, pH y tiempo de reacción (50 °C; 7,0 y 60 min), es mayor para las cepas de xilano en relación a las de almidón y CMC. F1A5 para almidón, F1A4 para CMC y todas las cepas de xilano registran la mejor actividad.

4.2.3 Evaluación de los efectos del pH y la temperatura en la actividad enzimática para amilasa, xilanasa y celulasa. Los efectos de pH y temperatura en la actividad enzimática se evaluaron mediante un diseño experimental factorial 32 con dos réplicas. Del análisis estadístico se determinaron los efectos principales y de interacción de los factores para las 9 mejores cepas. Se observó que las cepas con mayor actividad enzimática para cada sustrato y las condiciones específicas de reacción fueron: F3X4, para almidón, a pH 6 y temperatura de reacción de 60 °C. F1A8, para CMC a pH 7 y temperatura de reacción de 50 °C y F1Q1, para xilano, a pH 8 y temperatura de reacción de 60 °C, como se aprecia en la Figura 13.

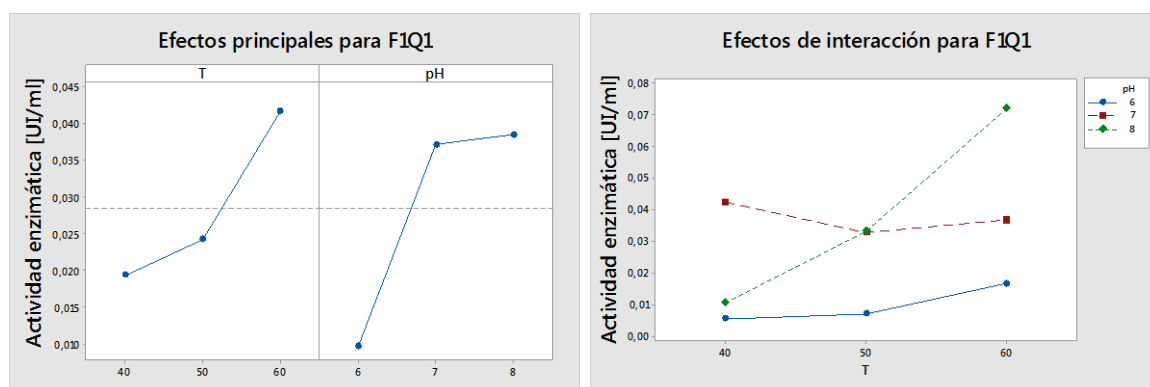
Figura 13. Efectos principales y de interacción del pH y la temperatura de las cepas con mayor actividad enzimática para los sustratos: a) almidón, b) CMC y c) xilano.



a)



b)

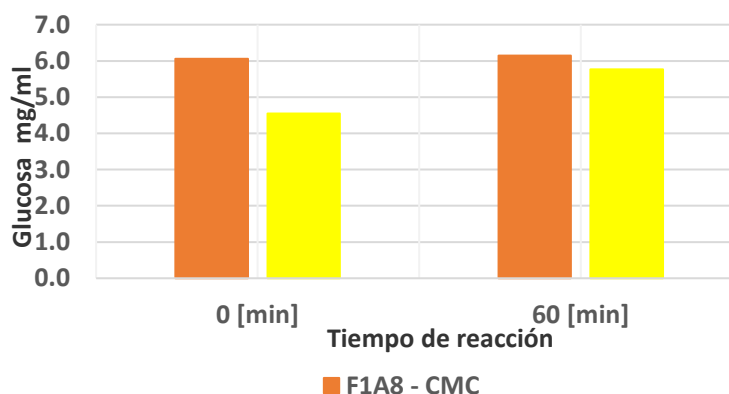


c)

Se observa que los efectos principales dependen del sustrato a degradar, por ejemplo, para almidón y xilano existe una mayor actividad a temperaturas altas, mientras que, para CMC a temperaturas altas no se registra actividad. Los valores de pH altos favorecen la actividad en CMC y xilano, y los bajos la actividad en almidón. Los efectos de interacción son significativos (cambios en las pendientes y curvatura de las líneas), y dependientes del sustrato a degradar. Los efectos de interacción permitieron identificar las condiciones específicas en las que se registra la mayor actividad enzimática en cada sustrato para cada cepa diferente.

4.2.4 Verificación de la actividad enzimática. La actividad enzimática para F3X4 y F1A8 se verificó por medio de la técnica de cromatografía HPLC. Del área bajo la curva de los cromatogramas y de la curva de calibración (Anexo C) se determinó la cantidad de glucosa en la muestra en el tiempo cero (en el momento de la adición del sustrato) y a los 60 min de reacción (Figura 14) a las condiciones de pH y temperatura seleccionadas en la etapa anterior. El procedimiento no es aplicado a la enzima F1Q1 para verificar la actividad en xilano, por no contar con disponibilidad del método y los patrones de calibración para xilosa.

Figura 14. Cantidad de glucosa producida en la reacción enzimática.



El aumento en la cantidad de glucosa después de 60 min de reacción, confirma la actividad de las cepas F1A8 y F3X4, con mayor actividad para F3X4 en almidón.

En la Tabla 3 se reporta la cantidad de azúcar en la muestra y las respectivas actividades enzimáticas de las cepas, comparando las dos técnicas.

Tabla 3. Comparación de resultados por las técnicas de DNS y cromatografía HPLC luego de 60 min de reacción.

TÉCNICA	DNS		HPLC	
	Producción de glucosa [mg/ml]	Actividad enzimática [UI/ml]	Producción de glucosa [mg/ml]	Actividad enzimática [UI/ml]
CEPA – SUSTRATO				
F3X4-ALM	0,901	0,083	1,218	0,1126
F1A8-CMC	0,1927	0,017	0,088	0,0081

Ambas técnicas arrojan resultados similares, es decir, presentan la misma tendencia en el aumento de las cantidades de azúcar confirmando la actividad enzimática de las cepas F3X4 y F1A8 para amilasas y celulasas respectivamente.

5. CONCLUSIONES

Las cepas seleccionadas por su potencial de actividad enzimática ($DH/DC > 4$) para amilasas, celulasas y xilanasas provienen principalmente con tratamiento T_2 mayoritariamente de la fase de maduración.

En cultivos líquidos se obtuvo en promedio un mayor crecimiento usando como fuente de carbono almidón ($D.O = 1,057$), seguido por el xilano ($D.O = 0,919$), y CMC ($D.O = 0.479$).

La actividad enzimática más alta registrada por sustrato de las mejores cepas seleccionadas corresponde a F3X4 (0,0325 UI/ml) a una temperatura de 60 °C y pH 6; F1A8 (0.0035 UI/ml) a 50 °C y pH 7; F1Q1 (0,07 UI/ml) A 60 °C y pH 8, para almidón, CMC y xilano respectivamente.

Los resultados obtenidos empleando el método colorimétrico con DNS fueron verificados cuantificando la producción de glucosa por HPLC

6. RECOMENDACIONES

Se debe realizar cromatografía HPLC para xilosa, ya que para este compuesto se reportó la mayor cantidad de azúcares reductores y, por ende, de actividad enzimática.

Será conveniente realizar un diseño de experimentos de 3 factores que permita evaluar los efectos principales y de interacción del pH, la temperatura y tiempo de reacción, en la actividad enzimática de las cepas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

[1] SALAMANCA, Sandra. Compostaje de residuos industriales en Colombia. Revista Técnicaña. Colombia. 2012. No, 28. pp, 13-18.

[2] UNIDAD ADMINISTRATIVA ESPECIAL DE SERVICIOS PUBLICOS (UAESP). Guía técnica para el aprovechamiento de residuos orgánicos a través de metodologías de compostaje y lombricultura. [En línea]. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. [Consultado: 10-15-2018]. Disponible en http://www.uaesp.gov.co/images/Guia-UAESP_SR.pdf

[3] CALDERÓN, Arley Y., MEDINA, Juan C. Evaluación de la aplicación de estrategias operativas en el mejoramiento y optimización del proceso de compostaje de residuos verdes. Trabajo de Grado Ingeniero Civil. Bucaramanga, Santander. Universidad Industrial de Santander. Facultad d Ingenierías Fisicomecánicas. 2018. 67 p.

[4] CARRERA, Jorge Eliecer. Producción y aplicación de enzimas industriales. [PDF]. Informe grupo de investigación Asubagroin. Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad del Cauca. Popayán (Colombia). Marzo 2003.

[5] Los residuos verdes como material de origen para elaborar compost [en línea]. BVSDE. [Consultado 2018-09-2]. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd48/residuosverdes/part1.pdf>.

[6] SANCHEZ DIAZ, Ignacio. Estudio técnico y económico de una planta de tratamiento de residuos vegetales en Getafe. Master Profesional en Ingeniería y Gestión Medioambiental. Madrid. Escuela de Organización Industrial EOI, 2011. 95p.

[7] VAN HEERDEN, I.; CRONJÉ, C., SWART, S., & KOTZÉ, Jan. Microbial, chemical and physical aspects of citrus waste composting. *Bio resource Technology*. Enero de 2002. Vol, 81. pp, 71-76.

[8] ROMAN, Pilar., MARTINEZ, María., y PANTOJA, Alberto. Fundamentos teóricos del compostaje. En: Manual del Compostaje del Agricultor: Experiencias en América Latina. Santiago de Chile (Chile). 2013. p, 21-43. E-ISBN 978-92-5-307845-5. [

[9] CHEN, L., de HARO MARTI, M., MOORE, A., & FALEN, C. Dairy Compost Production and Use in Idaho: The Composting Process. Universidad de Idaho. Idaho (EEUU). Junio de 2011. CIS 1179.

[10] TCHOBANOGLOUS, George, THEISEN, Hilary., & VIGIL, Samuel. Gestión integral de residuos sólidos. Madrid: McGraw Hill Interamericana. 1994.

[11] MAYENDE, Lungisa., WILHELMI, Brendan. & PLETSCHKE, Brett. Cellulases (CMCases) and polyphenol oxidases from thermophilic *Bacillus* spp. isolated from compost. *Soil Biology and Biochemistry*. 2006. Vol, 38. No, 9. pp, 2963-2966.

[12] DE MARCO, Évilin., HECK, Karina., MARTOS, Emerson., & VAN DER SAND, Sueli. Purification and characterization of a thermostable alkaline cellulase produced by *Bacillus licheniformis* 380 isolated from compost. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2017. Vol, 83. No, 3. pp, 2359-2370

[13] PASCON, Renata., BERGAMO, Rogério., ESPINELLI, Rafael., DE SOUZA, Elisangela., ASSIS, Diego., JULIANO, Luiz & VALLIM, Marcelo. Amilolytic Microorganism from São Paulo Zoo Composting: Isolation, Identification, and Amylase Production. *Enzyme Research*. 2011. Article ID 679624. pp, 1-8.

[14] DIORIO, Luis A., FORCHIASSIN, Flavia., PAPINUTTI, Víctor L y SUELDO, Viviana. Actividad enzimática y degradación de diferentes tipos de residuos orgánicos por *Saccobolus saccoboloides* (Fungi, Ascomycotina). *Revista Iberoamericana de Micología*. [En línea] 2003. Vol, 20. pp, 11-15. [Consultado: 2018-09-05]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v11n2/v11n2a12.pdf>

[15] CASTRO, Astrid J., MATA LLANA, Gonzalo M., & HERNANDEZ, Sonia. Comparación de la flora microbiana a partir de dos metodologías para el tratamiento de residuos sólidos domiciliarios en Garagoa, Boyaca. *Rev. Colombiana de Microbiología*. Diciembre 2009. Vol, XI. No, 2. pp.114-126 [consultado: 2018-09-06]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v11n2/v11n2a12.pdf>

[16] CERDA LLANOS, Alejandra. Sustainable carbohydrase production using organic wastes through solid-state fermentation: Operational strategies and microbial communities assessment. Tesis para optar por el grado de doctor (PhD). España. Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). Escuela de Ingeniería Química, Biológica y Ambiental. 2017. pp, 155.

[17] HENRIQUEZ, Carlos., URIBE, Lidieth., VALENCIANO, Arturo., y NOGALES, Rogelio. Actividad enzimática del suelo - Actividad enzimática del suelo - Deshidrogenasa, β -Glucosidasa, Fosfatasa y Ureasa- bajo diferentes cultivos. *Agronomía Costarricense*. San José (Costa Rica). 2014. Vol, 38. No, 1. p, 43-54. ISSN: 0377-9424.

[18] BHAT, M. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*. 2000. Vol, 18. No, 5. pp, 355-383

[19] HERNANDEZ, Jhon E., MEDINA, Oscar., HERNANDEZ, Angie L., & COHA, Pablo. Oxidación y caracterización fisicoquímica de almidón de sagú "Marantha Arundinacea" para la elaboración de bioplástico. *Revista Fuentes: El Reventón Energético*. 2017. Vol, 15. No, 1. pp, 19-29. Consultado: 2018-09-30. Disponible en: <http://bibliotecavirtual.uis.edu.co:2158/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=0&sid=bb5ae2b5-a976-4e50-a32d-b3190bad9b36%40sessionmgr4007>

[20] VAN DER MAAREL, Marc., VAN DER VEEN, Bart., UITDEHAAG, Joost., LEEMHUIS, Hans., & DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*. 2002. Vol, 94. pp, 137-155.

[21] GUPTA, Rani., GIGRAS, Paresh., MOHAPATRA, Harapriya., GOSWAMI, Vineet., & CHAUHAN, Bhavna. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*. New Delhi (India). 2003. Vol, 38. pp, 1599-1616.

[22] RICO, Yolanda. Producción, purificación y caracterización de una glucoamilasa de *Aspergillus niger*. *Revista Colombiana de Química*. [En línea]. Bogotá (Colombia): Universidad Nacional de Colombia. 1990. Vol, 19. No, 1. [Consultado: 2018-09-30]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/19303/1/15269-46356-1-PB.pdf>

- [23] CANALES MORMONTOY, Pamela., CHÁVEZ HIDALGO, Elizabeth., ZVALETA PESANTES, Amparo. Caracterización de bacterias halófilas productoras de amilasas aisladas de las salinas de San Blas de Junín. *Revista Colombiana de Biotecnología*. Universidad Nacional de Colombia. 2014. Vol, 16. No, 2. pp, 150-157.
- [24] PANDEY, Ashok. NIGAM, Poonam., SOCCOL, Carlos R., SOCCOL, Vanete., SINGH, Dalel., & MOHAN, Radjiskumar. Advances in microbial amylases. *Biotechnology Applied Biochemistry*. 2000. Vol, 31. No, 2. pp, 135-152.
- [25] MONTOR, J., OLVERA CARRANZA, C., REYES DUARTE, D., SACHMAN RUIZ, B., RAMIREZ COUTIÑO, L., & DEL MORAL, S. Caracterización bioquímica de AmiJ33, una amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* aislada de suelos cultivados con caña de azúcar en la región de Papaloapan. *Nova Scientia*. [En línea]. Universidad de la Salle Bajío. León (México). Mayo-octubre 2014. Vol, 6. No, 12. pp, 39-59. [Consultado: 2018-10-01]. Disponible: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=203330981003>
- [26] GAITAN, Diana María., PEREZ, Liliana Ibeth. Aislamiento y evaluación de microorganismos celulíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*dentranthema grandiflora*). Trabajo de grado microbiología industrial. Bogotá, D.C. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencia. 2007. pp, 81.
- [27] ALVAREZ, Claudia Lucía. Identificación y caracterización bioquímica, morfológica y molecular de microorganismos cultivables asociados a la rizosfera y al sustrato de plantas de vainilla. Tesis de maestría. Medellín. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Facultad de Ciencias. 2012. pp, 173.
- [28] SANCHEZ, Carmen. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology advances*. Elsevier [base de datos en línea]. 2009. Vol, 27. pp, 185-194. [Consultado: 2018-09-28]. Disponible en: <https://bibliotecavirtual.uis.edu.co:2191/science/article/pii/S0734975008001092>
- [29] ZHANG, Y., HIMMEL, Michael. & MIELENZ, Jonathan. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology advances*. Elsevier. 2006. Vol, 24. pp, 452-481.
- [30] MARTINEZ, Sixta., MARTINEZ, Paola., GONZALEZ Vicky Carolina., & HIGUERA, Blanca. Determinación in vitro de los patrones de inducción de una endo-

xilanasa (E.C.3.2.1.8) secretada por *fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. Purificación y caracterización parcial. *Revista Colombiana De Química*. 2012. Vol, 41. No, 3. pp, 359-376. [Base de datos en línea]. Consultado: 2018-09-29. Disponible en: <https://bibliotecavirtual.uis.edu.co:2171/docview/1677177924?accountid=29068>

[31] POLIZELI, M. RIZZATTI, A., MONTI, R., TERENCE, H., Jorge, J., & Amorim, D. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer. 2005. Vol, 67. pp, 577-591.

[32] SAINZ POLO, María Ángela. Mecanismos moleculares de degradación de la pared celular vegetal: estructura y especificidad de xilanasas multidominio. Tesis doctoral. Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Bioquímica y Biología molecular I. 2016. pp, 204.

[33] McCLEARY, Barry V, McGEOUGH, Paraic. A Comparison of Polysaccharide Substrates and Reducing Sugar Methods for the Measurement of endo-1,4- β -Xylanase. *Applied Biochemical Biotechnology*. Springer. Agosto 2015.

[34] COOPER, Bárbara L. Enzimas xilanolíticas bacterianas y sus aplicaciones industriales. *Revista Especializada en Ciencias de la Salud*. Mayo 2013. Vol, 16. No, 1. pp, 19-22.

[35] MARTÍN SÁNCHEZ, Manuela., MARTÍN SÁNCHEZ, María Teresa y PINTO, Gabriel. Reactivo de Lugol: Historia de su descubrimiento y aplicaciones didácticas. *Educación Química*. Universidad Nacional Autónoma de México. 2013. vol, 24. No, 1. pp, 31-36.

[36] BELLO GIL, Daniel., CARRERA BOCOURT, Emilia., y DIAZ MAQUEIRA, Yuset. Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5- dinitrosalicílico. *En: ICIDCA*. Mayo-Agosto 2006. Vol, XL. No, 2. pp, 45-50.

[37] CHAND, Ramesh., SALWAN, Richa., DHAR, Hena., DUTT, Som & GULATI, Arvind. A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Current Microbiol.* 2008. No, 57. Pp, 503-507.

[38] SANCHEZ TORRES, Viviana. Screening plates for protease, amylase, and cellulase activity. 2011.

[39] JUNG, Yu., MIN, Jang., HEO, Sun-Yeon., HONG, Won-Kyung., LEE, Sung-Mok., OH, Baek-Rock., PARK, Seung-Moon., SEO, Jeong-Woo., & KIM, Chul. Cellulolytic enzymes produced by a newly isolated soil fungus *Penicillium* sp. TG2 with potential for use in cellulosic ethanol production. *Renewable Energy* .20014. No 76, pp. 66-71.

[40] GUERRERO SERRANO, Jose Manuel. Evaluación de metodologías para la purificación de hidrolizados de biomasa lignocelulósica residual de la agroindustria colombiana. Tesis de Grado Ingeniero Químico. Bucaramanga, Santander. Universidad industrial de Santander. Escuela de Ingeniería Química. 2018.

[41] MILLER, Gail Lorenz. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *ANALYTICAL CHEMISTRY* .1959. No, 31. Pp, 426-428.

[42] Grupo de Investigación de Valorización de Residuos y Fuentes Agrícolas e Industriales para Sostenibilidad Enegetica. (INTERFASE). Protocolo de medición de azúcares reductores. Universidad Industrial de Santander. 2018.

BIBLIOGRAFÍA

ÁLVAREZ, Claudia Lucía. Identificación y caracterización bioquímica, morfológica y molecular de microorganismos cultivables asociados a la rizosfera y al sustrato de plantas de vainilla. Tesis de maestría. Medellín. Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Facultad de Ciencias. 2012. pp, 173.

BELLO GIL, Daniel., CARRERA BOCOURT, Emilia., y DÍAZ MAQUEIRA, Yuset. Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5- dinitrosalicílico. En: ICIDCA. Mayo-Agosto 2006. Vol, XL. No, 2. pp, 45-50.

BHAT, M. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*. 2000. Vol, 18. No, 5. pp, 355-383

CALDERÓN, Arley Y., MEDINA, Juan C. Evaluación de la aplicación de estrategias operativas en el mejoramiento y optimización del proceso de compostaje de residuos verdes. Trabajo de Grado Ingeniero Civil. Bucaramanga, Santander. Universidad Industrial de Santander. Facultad d Ingenierías Fisicomecánicas. 2018. 67 p.

CANALES MORMONTOY, Pamela., CHÁVEZ HIDALGO, Elizabeth., ZAVALETA PESANTES, Amparo. Caracterización de bacterias halófilas productoras de amilasas aisladas de las salinas de San Blas de Junín. *Revista Colombiana de Biotecnología*. Universidad Nacional de Colombia. 2014. Vol, 16. No, 2. pp, 150-157.

CARRERA, Jorge Eliecer. Producción y aplicación de enzimas industriales. [PDF]. Informe grupo de investigación Asubagroin. Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad del Cauca. Popayán (Colombia). Marzo 2003.

CASTRO, Astrid J., MATAALLANA, Gonzalo M., & HERNANDEZ, Sonia. Comparación de la flora microbiana a partir de dos metodologías para el tratamiento de residuos sólidos domiciliarios en Garagoa, Boyaca. *Rev. Colombiana de Microbiología*. Diciembre 2009. Vol, XI. No, 2. pp.114-126 [consultado: 2018-09-06]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v11n2/v11n2a12.pdf>

CERDA LLANOS, Alejandra. Sustainable carbohydrase production using organic wastes through solid-state fermentation: Operational strategies and microbial communities assessment. Tesis para optar por el grado de doctor (PhD). España. Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). Escuela de Ingeniería Química, Biológica y Ambiental. 2017. pp, 155.

CHAND, Ramesh., SALWAN, Richa., DHAR, Hena., DUTT, Som & GULATI, Arvind. A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Current Microbioly.* 2008. No, 57. Pp, 503-507.

CHEN, L., de HARO MARTI, M., MOORE, A., & FALEN, C. Dairy Compost Production and Use in Idaho: The Composting Process. Universidad de Idaho. Idaho (EEUU). Junio de 2011. CIS 1179.

COOPER, Bárbara L. Enzimas xilanolíticas bacterianas y sus aplicaciones industriales. *Revista Especializada en Ciencias de la Salud.* Mayo 2013. Vol, 16. No, 1. pp, 19-22.

DE MARCO, Évilin., HECK, Karina., MARTOS, Emerson., & VAN DER SAND, Sueli. Purification and characterization of a thermostable alkaline cellulase produced by *Bacillus licheniformis* 380 isolated from compost. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 2017. Vol, 83. No, 3. pp, 2359-2370

DIORIO, Luis A., FORCHIASSIN, Flavia., PAPINUTTI, Víctor L y SUELDO, Viviana. Actividad enzimática y degradación de diferentes tipos de residuos orgánicos por *Saccobolus saccoboloides* (Fungi, Ascomycotina). *Revista Iberoamericana de Micología.* [En línea] 2003. Vol, 20. pp, 11-15. [Consultado: 2018-09-05].

GAITÁN, Diana María., PEREZ, Liliana Ibeth. Aislamiento y evaluación de microorganismos celulíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*dentranthema grandiflora*). Trabajo de grado microbiología industrial. Bogotá, D.C. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencia. 2007. pp, 81.

GUERRERO SERRANO, Jose Manuel. Evaluación de metodologías para la purificación de hidrolizados de biomasa lignocelulósica residual de la agroindustria colombiana. Tesis de Grado Ingeniero Químico. Bucaramanga, Santander. Universidad industrial de Santander. Escuela de Ingeniería Química. 2018.

Grupo de Investigación de Valorización de Residuos y Fuentes Agrícolas e Industriales para Sostenibilidad Energética. (INTERFASE). Protocolo de medición de azúcares reductores. Universidad Industrial de Santander. 2018.

GUPTA, Rani., GIGRAS, Paresh., MOHAPATRA, Harapriya., GOSWAMI, Vineet., & CHAUHAN, Bhavna. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*. New Delhi (India). 2003. Vol, 38. pp, 1599-1616.

HENRÍQUEZ, Carlos., URIBE, Lidieth., VALENCIANO, Arturo., y NOGALES, Rogelio. Actividad enzimática del suelo - Actividad enzimática del suelo - Deshidrogenasa, β -Glucosidasa, Fosfatasa y Ureasa- bajo diferentes cultivos. *Agronomía Costarricense*. San José (Costa Rica). 2014. Vol, 38. No, 1. p, 43-54. ISSN: 0377-9424.

HERNANDEZ, Jhon E., MEDINA, Oscar., HERNANDEZ, Angie L., & COHA, Pablo. Oxidación y caracterización fisicoquímica de almidón de sagú "Marantha Arundinacea" para la elaboración de bioplástico. *Revista Fuentes: El Reventón Energético*. 2017. Vol, 15. No, 1. pp, 19-29. Consultado: 2018-09-30. Disponible en: <http://bibliotecavirtual.uis.edu.co:2158/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=0&sid=bb5ae2b5-a976-4e50-a32d-b3190bad9b36%40sessionmgr4007>

JUNG, Yu., MIN, Jang., HEO, Sun-Yeon., HONG, Won-Kyung., LEE, Sung- Mok., OH, Baek-Rock., PARK, Seung-Moon., SEO, Jeong-Woo., & KIM, Chul. Cellulolytic enzymes produced by a newly isolated soil fungus *Penicillium* sp. TG2 with potential for use in cellulosic ethanol production. *Renewable Energy* .20014. No 76, pp. 66-71.

Los residuos verdes como material de origen para elaborar compost [en línea]. BVSDE. [Consultado 2018-09-2]. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd48/residuosverdes/part1.pdf>.

MARTÍN SÁNCHEZ, Manuela., MARTÍN SÁNCHEZ, María Teresa y PINTO, Gabriel. Reactivo de Lugol: Historia de su descubrimiento y aplicaciones didácticas. *Educación Química*. Universidad Nacional Autónoma de México. 2013. vol, 24. No, 1. pp, 31-36.

MARTÍNEZ, Sixta., MARTÍNEZ, Paola., GONZÁLEZ Vicky Carolina., & HIGUERA, Blanca. Determinación in vitro de los patrones de inducción de una endo-xilanasa

(E.C.3.2.1.8) secretada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. Purificación y caracterización parcial. *Revista Colombiana De Química*. 2012. Vol, 41. No, 3. pp, 359-376. [Base de datos en línea]. Consultado: 2018-09-29. Disponible en: <https://bibliotecavirtual.uis.edu.co:2171/docview/1677177924?accountid=29068>

MAYENDE, Lungisa., WILHELMI, Brendan. & PLETSCHEKE, Brett. Cellulases (CMCase) and polyphenol oxidases from thermophilic *Bacillus* spp. isolated from compost. *Soil Biology and Biochemistry*. 2006. Vol, 38. No, 9. pp, 2963-2966.

McCLEARY, Barry V, McGEOUGH, Paraic. A Comparison of Polysaccharide Substrates and Reducing Sugar Methods for the Measurement of endo-1,4- β -Xylanase. *Applied Biochemical Biotechnology*. Springer. Agosto 2015.

MILLER, Gail Lorenz. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *ANALYTICAL CHEMISTRY*. 1959. No, 31. Pp, 426-428.

MONTOR, J., OLVERA CARRANZA, C., REYES DUARTE, D., SACHMAN RUIZ, B., RAMIREZ COUTIÑO, L., & DEL MORAL, S. Caracterización bioquímica de AmiJ33, una amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* aislada de suelos cultivados con caña de azúcar en la región de Papaloapan. *Nova Scientia*. [En línea]. Universidad de la Salle Bajío. León (México). Mayo-octubre 2014. Vol, 6. No, 12. pp, 39-59. [Consultado: 2018-10-01]. Disponible: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=203330981003>

PANDEY, Ashok. NIGAM, Poonam., SOCCOL, Carlos R., SOCCOL, Vanete., SINGH, Dalel., & MOHAN, Radjiskumar. Advances in microbial amylases. *Biotechnology Applied Biochemistry*. 2000. Vol, 31. No, 2. pp, 135-152.

PASCON, Renata., BERGAMO, Rogério., ESPINELLI, Rafael., DE SOUZA, Elisangela., ASSIS, Diego., JULIANO, Luiz & VALLIM, Marcelo. Amilolytic Microorganism from São Paulo Zoo Composting: Isolation, Identification, and Amylase Production. *Enzyme Research*. 2011. Article ID 679624. pp, 1-8.

POLIZELI, M. RIZZATTI, A., MONTI, R., TERENCE, H., Jorge, J., & Amorim, D. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer. 2005. Vol, 67. pp, 577-591.

RICO, Yolanda. Producción, purificación y caracterización de una glucoamilasa de *Aspergillus niger*. *Revista Colombiana de Química*. [En línea]. Bogotá (Colombia): Universidad Nacional de Colombia. 1990. Vol, 19. No, 1. [Consultado: 2018-09-30]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/19303/1/15269-46356-1-PB.pdf>

ROMÁN, Pilar., MARTÍNEZ, María., y PANTOJA, Alberto. Fundamentos teóricos del compostaje. *En: Manual del Compostaje del Agricultor: Experiencias en América Latina*. Santiago de Chile (Chile). 2013. p, 21-43. E-ISBN 978-92-5-307845-5.

SAINZ POLO, María Ángela. Mecanismos moleculares de degradación de la pared celular vegetal: estructura y especificidad de xilanasas multidominio. Tesis doctoral. Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Bioquímica y Biología molecular I. 2016. pp, 204.

SALAMANCA, Sandra. Compostaje de residuos industriales en Colombia. *Revista Técnicaña*. Colombia. 2012. No, 28. pp, 13-18.

SÁNCHEZ, Carmen. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology advances*. Elsevier [base de datos en línea]. 2009. Vol, 27. pp, 185-194. [Consultado: 2018-09-28]. Disponible en: <https://bibliotecavirtual.uis.edu.co/2191/science/article/pii/S0734975008001092>

SÁNCHEZ DÍAZ, Ignacio. Estudio técnico y económico de una planta de tratamiento de residuos vegetales en Getafe. Master Profesional en Ingeniería y Gestión Medioambiental. Madrid. Escuela de Organización Industrial EOI, 2011. 95p.

SÁNCHEZ TORRES, Viviana. Screening plates for protease, amylase, and cellulase activity. 2011.

TCHOBANOGLIOUS, George, THEISEN, Hilary., & VIGIL, Samuel. Gestión integral de residuos sólidos. Madrid: McGraw Hill Interamericana. 1994.

UNIDAD ADMINISTRATIVA ESPECIAL DE SERVICIOS PUBLICOS (UAESP). Guía técnica para el aprovechamiento de residuos orgánicos a través de metodologías de compostaje y lombricultura. [En línea]. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. [Consultado: 10-15-2018]. Disponible en http://www.uaesp.gov.co/images/Guia-UAESP_SR.pdf

VAN DER MAAREL, Marc., VAN DER VEEN, Bart., UITDEHAAG, Joost., LEEMHUIS, Hans., & DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*. 2002. Vol, 94. pp, 137-155.

VAN HEERDEN, I.; CRONJÉ, C., SWART, S., & KOTZÉ, Jan. Microbial, chemical and physical aspects of citrus waste composting. *Bio resource Technology*. Enero de 2002. Vol, 81. pp, 71-76.

ZHANG, Y., HIMMEL, Michael. & MIELENZ, Jonathan. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology advances*. Elsevier. 2006. Vol, 24. pp, 452-481.

ANEXOS

Anexo A. Cepas seleccionadas.

Tabla A1. Valores DH/DC para las cepas seleccionadas.

CEPA	ALMIDÓN	CMC	XILANO
F1A4	4,33	5,33	4,29
F1A5	5,00	4,33	4,00
F1A6	6,00	4,33	3,50
F1A8	4,00	4,83	2,11
F2A4	7,33	0,98	1,00
F2A6	3,60	1,00	5,60
F3A3	4,25	4,43	2,60
F3A11	3,50	5,00	3,29
F1C2	3,17	4,33	4,33
F2C1	1,86	4,14	4,00
F3C2	2,75	4,00	7,50
F3C6	1,86	4,40	1,80
F3C7	2,60	5,00	2,83
F3C8	1,50	6,33	2,83
F3C11	1,89	4,60	3,33
F1X3	1,71	2,57	4,50
F1X9	3,00	1,83	4,40
F1X10	2,20	3,67	4,00
F3X3	0,00	3,00	4,20
F3X4	4,00	0,00	4,40
F3X5	3,25	4,25	5,50
F3X7	2,80	0,50	4,75
F1O1	2,10	2,33	4,00
F3O3	2,33	3,20	4,25
F2P1	0,00	0,81	9,20
F3P3	3,25	4,80	4,00
F3P4	3,11	4,33	4,25
F3P5	3,14	3,67	4,29
F1Q1	2,57	2,86	4,33

Anexo B. Curvas de calibración para determinar azúcares reductores por el método DNS.

Figura B1. Curva de calibración glucosa.

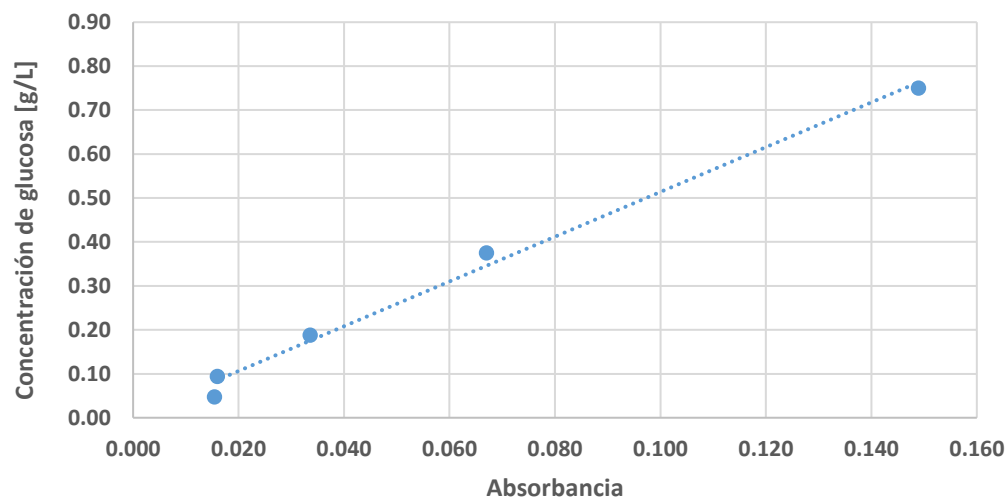
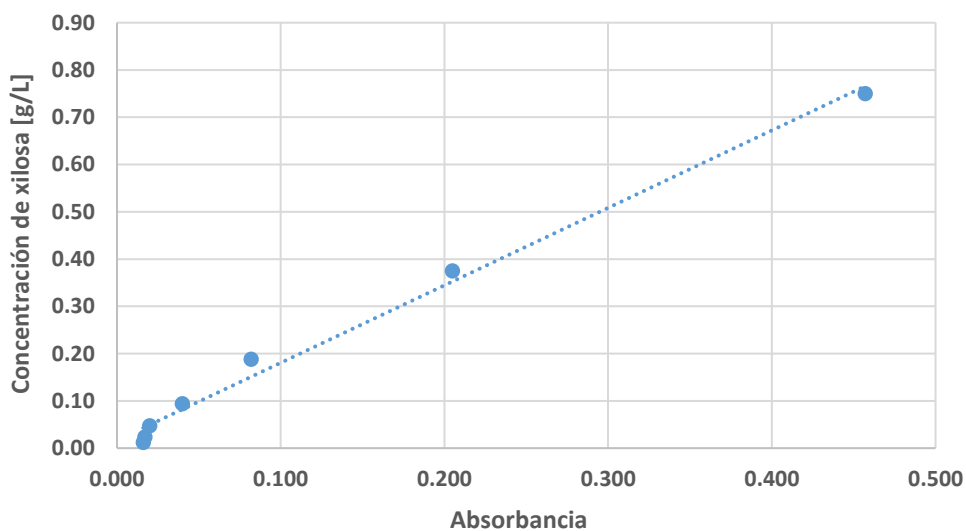


Figura B2. Curva de calibración xilosa.



Anexo C. Cromatograma HPLC para las cepas F1A8 Y F3X4

Figura 1. Producción de glucosa de la cepa F1A8 en el tiempo cero de reacción.

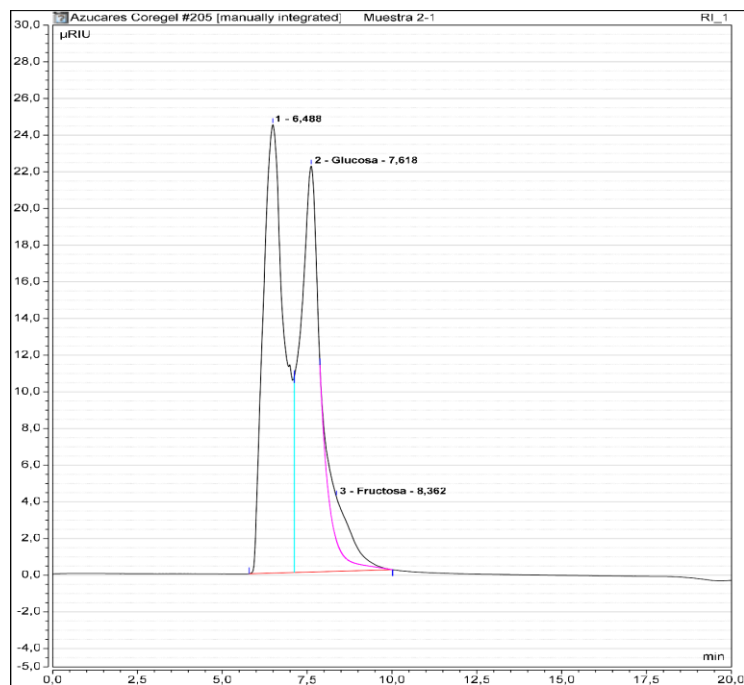


Figura 2. Producción de glucosa de la cepa F1A8 en 60 minutos de reacción.

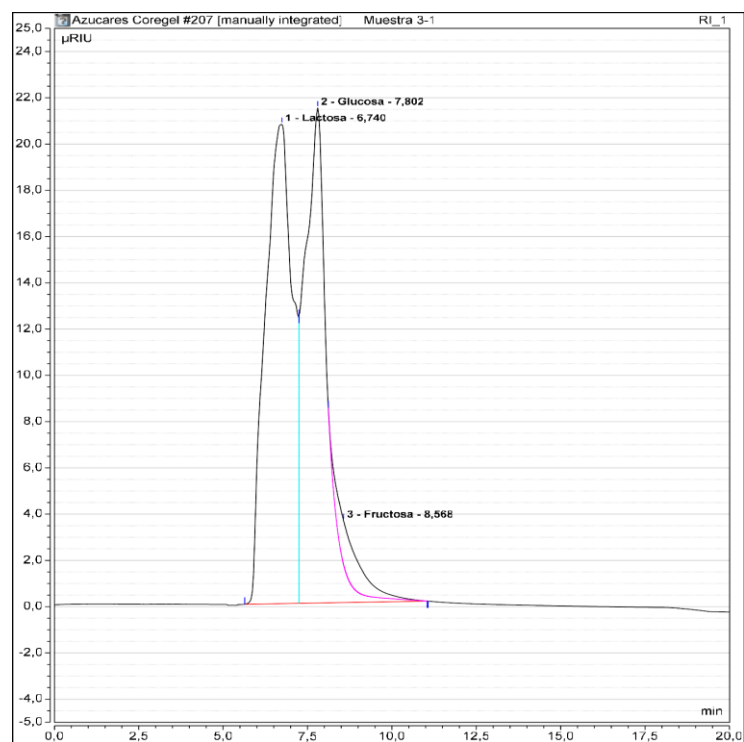


Figura 3. Producción de glucosa de la cepa F3X4 en el tiempo cero de reacción.

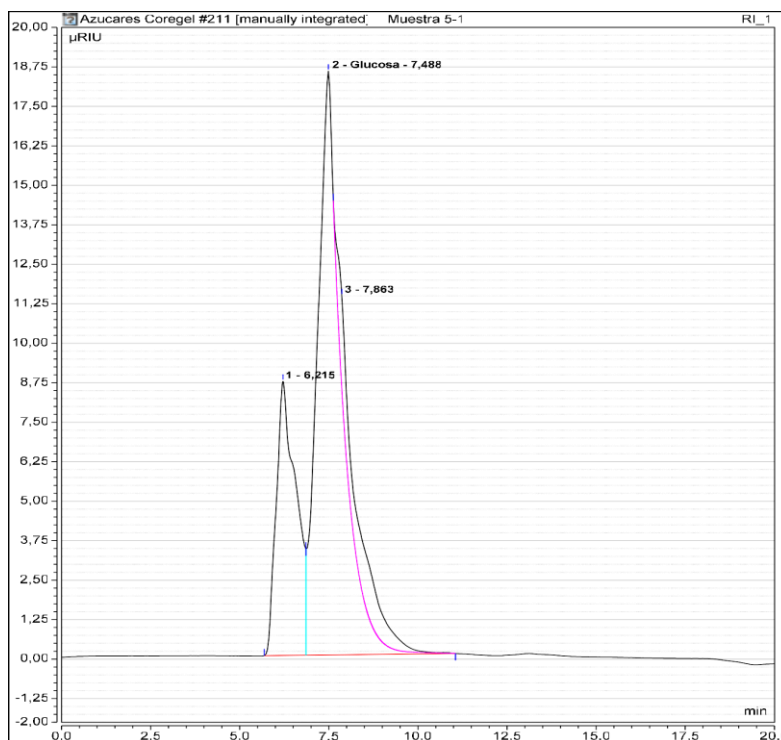


Figura 4. Producción de glucosa de la cepa F3X4 en 60 minutos de reacción.

