

**BIOSÍNTESIS DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS A PARTIR DE ACTINOMICETOS
OXIGÉNICOS AUTÓCTONOS UTILIZANDO LA TÉCNICA DE FERMENTACIÓN EN
SUSTRATO SÓLIDO**

LESLY JOHANNA GARCIA GENTIL

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2013**

**BIOSÍNTESIS DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS A PARTIR DE ACTINOMICETOS
OXIGÉNICOS AUTÓCTONOS UTILIZANDO LA TÉCNICA DE FERMENTACIÓN EN
SUSTRATO SÓLIDO**

LESLY JOHANNA GARCIA GENTIL

Proyecto de Grado para optar al título de Bióloga

Director

Rodrigo Torres Sáez

Doctor en Bioquímica y Biología Molecular

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
BUCARAMANGA
2013**

*A Dios,
por darme siempre fuerza para no decaer.*

*A mis queridos padres Luis José y Ruth,
a mi hermana Ana Karina,
por su gran amor y comprensión
y por su apoyo incondicional.*

*A mis sobrinos Simón y Samuel,
por alegrarme la vida.*

Lesly Johanna

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por su amor, apoyo y por tanta paciencia, por siempre creer en mí y por ser quienes lucharon por ayudarme en mi formación profesional, a mi hermana por su amistad.

Al profesor Rodrigo Torres, por su orientación y dirección en esta investigación, y por los conocimientos que me aportó.

Al Centro de Innovación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular (CINBIN) que me permitió hacer todos los experimentos necesarios en este proyecto y especialmente al Doctor Jorge Hernández por toda su colaboración y acogida en este centro de investigación.

A toda mi familia, a mi abuela Isolina, a mis tíos y tías, a todos mis primos, en especial a mi tío Manuel y tío Jesús, por su ayuda y su apoyo.

A José por su amistad y su ayuda.

A mis sobrinos Simón y Samuel, por siempre hacerme reír y alegrarme la vida.

TABLA DE CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	20
1. MARCO TEÓRICO	24
1.1. ACTINOMICETOS	24
1.1.1. Condiciones de crecimiento	25
1.1.2. Ecología y distribución	26
1.1.3. Clasificación de los actinomicetos	27
1.1.3.1. Phylum y clase <i>Actinobacteria</i>	28
1.1.3.2. Suborden <i>Streptomyicineae</i>	28
1.1.3.3. Familia <i>Streptomycetaceae</i>	29
1.1.3.4. Género <i>Streptomyces</i>	29
1.2. LIGNOCELULOSA	29
1.2.1. Salvado de trigo	30
1.2.2. Bagazo de caña	30
1.2.3. Raquis de Palma de Aceite	31
1.2.4. Estructura y composición de la celulosa	32
1.2.5. Estructura y composición de la hemicelulosa	34
1.2.6. Estructura y composición de la lignina	36
1.3. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LA LIGNOCELULOSA	36
1.4. MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE LIGNOCELULOSA	38
1.5. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA LIGNINA	39
1.6. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA HEMICELULOSA	40
1.7. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA CELULOSA	41
1.8. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LA ENZIMAS XILANASAS Y CELULASAS	44

1.9.	FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO (FSS)	46
2.	ANTECEDENTES	52
3.	METODOLOGÍA	56
3.1.	TOMA DE MUESTRA	56
3.2.	AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE ACTINOMICETOS DEGRADADORES DE LIGNOCELULOSA	56
3.3.	IDENTIFICACIÓN DEL ACTINOMICETO DEGRADADOR DE LIGNOCELULOSA	57
3.3.1.	Características macroscópicas	57
3.3.2.	Características microscópicas	57
3.4.	SUSTRATOS LIGNOCELULOSICOS	59
3.5.	PRETRATAMIENTO LOS SUSTRATOS LIGNOCELULOSICOS	59
3.6.	PRUEBAS DE FERMENTACIÓN SOBRE SUSTRATO SÓLIDO (FSS)	60
3.6.1.	Determinación cualitativa de la actividad celulolítica en fermentación en estado sólido	61
3.6.2.	Determinación cuantitativa de la actividad celulolítica y xilanasas en fermentación en estado sólido	62
3.6.2.1.	Obtención de extractos enzimáticos crudos	62
3.6.2.2.	Determinación de azúcares reductores	62
3.6.2.3.	Determinación de proteína extracelular	63
3.6.2.4.	Determinación de la actividad enzimática de Endo-β-1,4-Glucanasa (EC 3.2.1.4)	63
3.6.2.5.	Determinación de la actividad enzimática de Exo-β-1,4-Glucanasa (EC 3.2.1.91)	64
3.6.2.6.	Determinación de la actividad enzimática de β-Glucosidasa (EC 3.2.1.21)	64

3.6.2.7.	Determinación de la actividad enzimática de Endo- β -1,4-Xilanasas (EC 3.2.1.8)	64
3.6.2.8.	Porcentaje de Humedad	65
3.6.2.9.	Ph	65
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
4.1.	AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE ACTINOMICETOS DEGRADADORES DE LIGNOCELULOSA	66
4.2.	IDENTIFICACIÓN DE ACTINOMICETOS DEGRADADORES DE LIGNOCELULOSA	68
4.2.1.	Determinación cualitativa de la actividad celulolítica en fermentación en estado sólido.	69
4.3.	PRUEBAS DE FERMENTACIÓN SOBRE SUSTRATO SÓLIDO (FSS)	78
4.3.1.	Determinación cuantitativa de la actividad celulolítica y xilanasas en fermentación en estado sólido.	78
4.3.1.1.	Fermentación utilizando como sustrato salvado de trigo	78
4.3.1.2.	Fermentación utilizando como sustrato bagazo de caña	81
4.3.1.3.	Fermentación utilizando como sustrato raquis de palma	83
5.	CONCLUSIONES	100
6.	RECOMENDACIONES	102
	BIBLIOGRAFÍA	103
	ANEXOS	114

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Árbol filogenético de los organismos	28
Figura 2. Estructura de la lignocelulosa	31
Figura 3. Estructura química de la celulosa	33
Figura 4. Aspectos de la configuración y estructura de la celulosa. Tendencia del polímero lineal a extenderse totalmente (a y b) y asociarse después para formar microfibrillas (c) que a su vez se alinean con otras (d y e) para dar lugar a una fibra de celulosa (f) . (g) Orientación de las fibras en una capa de pared secundaria	33
Figura 5. Estructura del homopolisacárido de la celulosa cristalina y amorfa	34
Figura 6. Estructura del heteropolisacárido de la hemicelulosa	35
Figura 7. a. Estructura del xilano y los sitios donde actúan las enzimas xilanolíticas. b. Hidrólisis de xilo-olisacárido por β -xilosidasa	41
Figura 8. Representación esquemática de la hidrólisis de la celulosa amorfa y cristalina en el sistema de celulasas complejo (A) y no complejo (B)	42
Figura 9. Técnica de la laminilla	59

Figura 10. Montaje para las pruebas de fermentación sobre sustrato sólido	61
Figura 11. Crecimiento de <i>Streptomyces sp.</i> AO12 en fermentación en estado sólido	77
Figura 12. Cinética de Fermentación de <i>Streptomyces sp.</i> AO12 empleando como sustrato salvado de trigo, a 37°C y pH 7	79
Figura 13. Cinética de Biosíntesis de Endo- β -1,4-Glucanasa, Exo- β -1,4-Glucanasa, β -Glucosidasa y Endo- β -1,4-Xilanasa por <i>Streptomyces sp.</i> AO12 empleando como sustrato salvado de trigo, a 37°C y pH 7	79
Figura 14. Cinética de Fermentación de <i>Streptomyces sp.</i> AO12 empleando como sustrato bagazo de caña, a 37°C y pH 7	81
Figura 15. Cinética de Biosíntesis de Endo- β -1,4-Glucanasa, Exo- β -1,4-Glucanasa, β -Glucosidasa y Endo- β -1,4-Xilanasa por <i>Streptomyces sp.</i> AO12 empleando como sustrato bagazo de caña , a 37°C y pH 7	82
Figura 16. Cinética de Fermentación de <i>Streptomyces sp.</i> AO12 empleando como sustrato raquis de palma, a 37°C y pH 7	84
Figura 17. Cinética de Biosíntesis de Endo- β -1,4-Glucanasa, Exo- β -1,4-Glucanasa, β -Glucosidasa y Endo- β -1,4-Xilanasa por <i>Streptomyces sp.</i> AO12 empleando como sustrato raquis de palma, a 37°C y pH 7	84

- Figura 18.** Endo- β -1,4-Glucanasa. Actividad específica (AE) (U/g de sustrato) a los 5 y 10 días de fermentación en estado sólido para *Streptomyces sp.* AO12 en salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma 86
- Figura 19.** Exo- β -1,4-Glucanasa. Actividad específica (AE) (U/g de sustrato) a los 5 y 10 días de fermentación en estado sólido para *Streptomyces sp.* AO12 en salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma 87
- Figura 20.** β -Glucosidasa. Actividad específica (AE) (U/g de sustrato) a los 5 y 10 días de fermentación en estado sólido para *Streptomyces sp.* AO12 en salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma 88
- Figura 21.** Endo- β -1,4-Xilanasa. Actividad específica (AE) (U/g de sustrato) a los 5 y 10 días de fermentación en estado sólido para *Streptomyces sp.* AO12 en salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma 89
- Figura 22.** Valores máximos de actividad específica (AE) (U/g de sustrato), obtenidas para *Streptomyces sp.* AO12 utilizando salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma 91
- Figura 23.** Valores máximos de actividad específica (EA) (U/mg de proteína), obtenidas para *Streptomyces sp.* AO12 Utilizando salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma 95
- Figura 24.** Valores máximos de productividad específica (q_p) (U/g de sustrato \cdot día), obtenidas para

Streptomyces sp. AO12 utilizando salvado de trigo,
bagazo de caña y raquis de palma 98

Figura 25. Valores máximos de rendimiento de formación de proteína por sustrato ($Y_{p/s}$) (mg de proteína/g de sustrato), obtenidas para *Streptomyces sp.* AO12 en salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma 98

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Tipos de paredes celulares de actinomicetos	27
Tabla 2. Pretratamiento de los sustratos lignocelulósicos	60
Tabla 3. Capacidad celulolítica cualitativa de las cepas aisladas en medio basal salino de Mohagheghi et al. (1986) a pH 8, con salvado de trigo como única fuente de carbono y medio mineral basal de Crawford (1978) a pH 8, con CMC, α -celulosa y papel filtro Whatman No. 1 como fuente de carbono	67
Tabla 4. Descripción de las características macroscópicas y microscópicas de los actinomicetos degradadores de lignocelulosa	70
Tabla 5. Actividades celulolíticas cualitativas en fermentación en estado sólido de los actinomicetos degradadores de lignocelulosa	76
Tabla 6. Valores máximos de actividad específica (U/g de sustrato), productividad específica (U/g de sustrato \cdot día) y rendimiento de formación de proteína por sustrato (mg de proteína/g de sustrato), obtenidas para <i>Streptomyces sp.</i> AO12 utilizando salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma	90
Tabla 7. Comparación de actividades enzimáticas (U/ml) y actividades específicas (U/g) obtenidas por otros autores	94

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Composición del salvado de trigo	115
Anexo B. Composición del bagazo de caña de azúcar	116
Anexo C. Caracterización fisicoquímica de raquis de palma de aceite	117
Anexo D. Medios para aislamiento y selección de actinomicetos lignocelulósicos	118
Anexo E. Composición del medio mineral basal y condiciones iniciales en el proceso fermentativo en estado sólido utilizando salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma como sustratos	120
Anexo F. Composición del medio mineral basal modificado utilizado en el inóculo	121
Anexo G. Método colorimétrico del ácido dinitrosalicílico (DNS) de Miller, (1959)	122
Anexo H. Curva de calibración para determinación de concentración de glucosa por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS)	123
Anexo I. Curva de calibración para determinación de concentración de xilosa por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS)	124

Anexo J.	Método colorimétrico de Bradford, (1976)	125
Anexo K.	Curva de calibración para determinación de concentración de proteína extracelular por el método de Bradford	126
Anexo L.	Cálculos de las actividades enzimáticas de endo- β -1,4glucanasa (EC 3.2.1.4), exo- β -1,4-glucanasa (EC 3.2.1.91), β -1,4 glucosidasa (EC 3.2.1.21) y endo- β -1,4-xilanas (EC 3.2.1.8)	127
Anexo L.1.	Cálculo de las actividades enzimáticas de endo- β -1,4glucanasa (EC 3.2.1.4), exo- β -1,4-glucanasa (EC 3.2.1.91) y β -1,4 glucosidasa (EC 3.2.1.21)	127
Anexo L.2.	Cálculo de la actividad enzimática β -1,4-xilanas (EC 3.2.1.8)	128
Anexo M.	Ecuaciones utilizadas para la determinación de los parámetros cinéticos: Actividad enzimática específica (AE), productividad específica (q_p), y rendimiento de formación de proteína por sustrato ($Y_{p/s}$)	129
Anexo N.	Fórmula para el cálculo del porcentaje de humedad	130
Anexo O.	Resultados de las pruebas bioquímicas de caseína, tirosina, citrato, almidón, catalasa, malonato, urea, nitrato, gelatina, meso-inositol, fructosa, trealosa, glucosa, manosa, maltosa, lactosa, sucrosa, arabinosa, sorbitol, xilosa y salicina realizadas para la identificación del actinomiceto degradador de lignocelulosa seleccionado	131

Anexo P.	Resultados obtenidos en las pruebas de fermentación en estado sólido para <i>Streptomyces sp.</i> AO12. empleando como sustrato salvado de trigo	132
Anexo Q.	Resultados obtenidos en las pruebas de fermentación en estado sólido para <i>Streptomyces sp.</i> AO12. empleando como sustrato bagazo de caña	133
Anexo R.	Resultados obtenidos en las pruebas de fermentación en estado sólido para <i>Streptomyces sp.</i> AO12. empleando como sustrato raquis de palma	134

RESUMEN

TITULO: BIOSÍNTESIS DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS A PARTIR DE ACTINOMICETOS OXIGÉNICOS AUTÓCTONOS UTILIZANDO LA TÉCNICA DE FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO*.

AUTOR: LESLY JOHANNA GARCIA GENTIL**

PALABRAS CLAVES: Fermentación sobre sustrato sólido, Sustrato lignocelulósico, *Streptomyces sp.*, endoglucanasa, exoglucanasa, glucosidasa, endoxilanasas.

En este trabajo de investigación se evaluó la producción de enzimas celulolíticas durante la degradación de lignocelulosa por actinomicetos nativos oxigénicos en fermentación sobre sustrato sólido. Se aislaron 18 cepas de actinomicetos a partir de 5 muestras de suelo, y de abono del municipio de Ocaña, Norte de Santander. Las cepas fueron evaluadas en su capacidad celulolítica de forma cualitativa. Se identificó como *Streptomyces sp.* AO12, la cepa seleccionada como mejor degradadora de lignocelulosa. En los ensayos de fermentación sobre sustrato sólido con *Streptomyces sp.* AO12, se determinó la cantidad de proteína extracelular, azúcares reductores y la actividad de las enzimas endoglucanasa, exoglucanasa, glucosidasa y endoxilanasas utilizando raquis de palma, bagazo de caña y salvado de trigo.

En el sustrato salvado de trigo y raquis de palma se presentó una mayor actividad de la enzima endoxilanasas con 7,9 (U/ml) y 0,8 (U/ml) respectivamente. En el sustrato bagazo de caña se obtuvo una mayor actividad de la enzima endoglucanasa con 0,05 (U/ml). Se observó mayores valores de actividad específica de endoglucanasa (6,9 U/g de sustrato), exoglucanasa (0,7 U/g de sustrato), glucosidasa (0,8 U/g de sustrato) y endoxilanasas (47,9 U/g de sustrato) en salvado de trigo, comparado con bagazo de caña y raquis de palma. Se observó que las productividades específicas más altas se presentan en el residuo salvado de trigo, presentándose la máxima en endoxilanasas. Se presenta un mayor rendimiento de formación de proteína por sustrato en el salvado de trigo.

La enzima endoxilanasas presentó los mejores valores de actividad enzimática, actividad específica (AE), productividad específica (q_p) y rendimiento de formación de proteína por sustrato ($Y_{p/s}$) para *Streptomyces sp.* AO12 en fermentación en estado sólido con salvado de trigo y raquis de palma como fuente de carbono. El salvado de trigo fue el mejor sustrato para la producción de las enzimas celulasas y endoxilanasas. Las actividades enzimáticas de endoxilanasas, endoglucanasa, exoglucanasa y glucosidasa, varían significativamente dependiendo de los sustratos lignocelulósicos utilizados como fuente de carbono.

* Proyecto de grado

** Facultad de ciencias, Escuela de Biología, UIS, Director: RODRIGO TORRES SAEZ

ABSTRACT

TITLE: CELLULOLYTIC ENZYMES BIOSYNTHESIS FROM NATIVE OXYGENIC ACTINOMYCETES TECHNIQUE USING SOLID SUBSTRATE FERMENTATION*

AUTHOR: LESLY JOHANNA GARCIA GENTIL**

KEYWORDS: solid substrate fermentation, lignocellulosic substrate, *Streptomyces sp.*, endoglucanase , exoglucanase , glucosidase , endoxylanase.

In this research we evaluated the production of cellulolytic enzymes during lignocellulose degradation by native oxygenic fermenting actinomycetes on solid substrate. We isolated 18 strains of actinomycetes from 5 soil samples, and for payment of the municipality of Ocaña, Norte de Santander. The strains were evaluated on their ability cellulolytic qualitatively. It was identified as *Streptomyces sp.* AO12, selected as the best strain lignocellulose degrading. In tests on solid substrate fermentation with *Streptomyces sp.* AO12, we determined the amount of extracellular protein, reducing sugars and the activity of enzymes endoglucanase, exoglucanase, glucosidase and endoxylanase using palm rachis, bagasse and wheat bran.

In the substrate wheat bran and palm rachis showed higher endoxylanase enzyme activity with 7.9 (U/ml) and 0.8 (U/ml) respectively. The bagasse substrate obtained higher activity of endoglucanase enzyme with 0.05 (U/ml). Higher values observed endoglucanase specific activity (6.9 U/g substrate), exoglucanase (0,7 U/g substrate), glucosidase (0.8 U/g substrate) and endoxylanase (47.9 U/g substrate) in bran wheat compared to bagasse and palm rachis. It was observed that the higher specific productivities are shown in wheat bran residue, presenting the maximum endoxylanase. You have a higher yield per substrate protein formation in wheat bran.

The endoxylanase enzyme showed the best values of enzyme activity, specific activity (AE), specific productivity (q_p) and training performance of protein per substrate ($Y_{p/s}$) for *Streptomyces sp.* AO12 in solid state fermentation with wheat bran and palm rachis as a carbon source. Wheat bran the best substrate for the production of cellulase enzymes and endoxylanase. Endoxylanase enzyme activities, endoglucanase, exoglucanase and glucosidase vary significantly depending on lignocellulosic substrates used as carbon source.

* Thesis project

** Science Faculty, Biology School, UIS, Director: RODRIGO TORRES SAEZ

INTRODUCCIÓN

La lignocelulosa es el principal y más abundante componente de la biomasa producida por la fotosíntesis, formándose anualmente 200.000 millones de toneladas^{1,2}. A su vez, la utilización de la biomasa genera grandes cantidades de residuos lignocelulósicos durante las actividades agrícolas, madereras y del procesamiento industrial y artesanal de los alimentos. La disposición final de estos residuos es un problema que afecta al medio ambiente en todas las regiones del mundo. En muchos países se eliminan gran cantidad de residuos de las cosechas a través de la quema al aire libre, lo cual representa una amenaza a la salud pública y plantea un problema de polución³. Por otro lado, la biomasa lignocelulósica de los residuos agrícolas representa una fuente abundante de energía renovable y rentable que es subutilizado⁴. Estos residuos han sido objeto de muchas investigaciones en su utilización como sustrato en los procesos fermentativos, principalmente para la producción de biocombustibles y alimentos alternativos que aminoren los problemas derivados de la crisis energética, la escasez de alimento y la contaminación ambiental^{5 6}.

Actualmente, existen diferentes tratamientos para los residuos lignocelulósicos comprendiendo los tratamientos físicos como el picado, molido y empleo de vapor a presión; los tratamientos químicos con álcali y ácidos, siendo estos costosos y perjudiciales porque producen contaminación del medio ambiente; y los

¹ CUERVO et al. Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. En: Bio. Tecnología. 2009. Vol. 13, No. 3. 11-25 p.

² SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. En: Biotechnology Advances. 2009. Vol. 27; 185 p.

³ HESHAM M, A. & SAHAR A, E. *Actinomycetes* in rice straw decomposition. En: Waste Management. 2007. Vol. 27. No. 6; 850 p.

⁴ ADAV et. al. Label free quantitative proteomic analysis of secretome by *Thermobifida fusca* on different lignocellulosic biomass. En: J. of Proteomics. 2012. Vol. 75; 3694-3706 p.

⁵ KUMAR et. al. Xylanase production from an alkalophilic actinomycete isolate *Streptomyces* sp. RCK-2010, its characterization and application in saccharification of second generation biomass. En: Journal of Molecular Catalysis. 2012. Vol. 74. 170-177 p.

⁶ SONG, J. M. & WEI, D. Z. Production and characterization of cellulases and xylanases of *Cellulosimicrobium cellulans* grow in pretreated and extracted bagasse and minimal nutrient medium M9. En: Biomass and Bioenergy. 2010. Vol. 34. 1930-1934 p.

tratamientos biológicos que son una gran alternativa, incluyendo la digestión aeróbica y la digestión anaerobia que es utilizada para la producción de metano⁷.

Los materiales lignocelulósicos están compuestos principalmente por lignina, celulosa y hemicelulosa. Los tejidos lignificados resisten el ataque de los microorganismos, impidiendo la penetración de las enzimas destructivas en la pared celular, afectando también a la biodegradabilidad de la celulosa, hemicelulosa y de otros polímeros^{8,9}.

En la naturaleza, la descomposición de estos residuos es realizado por una variedad de hongos y bacterias que pueden degradar la lignocelulosa usando una serie de enzimas hidrolíticas y oxidativas¹⁰. Por muchos años, se han realizado estudios referentes a la degradación de lignocelulosa que comprenden hongos basidiomicetos y ascomicetos. No obstante, los actinomicetos (bacterias filamentosas) han demostrado ser indispensables en la descomposición aeróbica de compuestos orgánicos y son muy reconocidos por su aporte en la biodegradación de materia orgánica. Estos microorganismos son bien conocidos por su habilidad para descomponer moléculas complejas, particularmente componentes de la lignocelulosa, haciéndolos agentes importante en los procesos de descomposición^{11,12}.

⁷ KUMAR et al. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. En: J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2008. Vol. 35; 385-385 p.

⁸ HESHAM M, A. & SAHAR A, E. Op. cit. p. 850.

⁹ ADAV. et. al. Op. cit. p. 3694.

¹⁰ ELISASHVILI. et al. Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot *Basidiomycetes* isolated from the forest of Georgia. En: World J. Microbiol. Biotechnol. 2009. Vol. 25; 331-339 p.

¹¹ KAUSAR. et.al. Isolation and screening of potential actinobacteria for rapid composting of rice Straw. En: Biodegradation. 2011. Vol. 22. No. 2. 367-357 p.

¹² HESHAM M, A. & SAHAR A, E. Op. cit. p. 851.

Los actinomicetos presentan un crecimiento como hifas ramificadas, bien adaptado a la penetración y degradación de sustratos insolubles como la lignocelulosa¹³. Se han realizado estudios donde se demuestran que algunos actinomicetos tienen potencial para degradar lignocelulosa, probando ser grandes productores de una gran diversidad de enzimas extracelulares que permiten la biodegradación^{14,15}; esa habilidad puede ser primordial en la humificación y en aplicaciones biotecnológicas de la conversión de la lignocelulosa, siendo de una inmensa importancia ecológica¹⁶.

La diversidad enzimática de los actinomicetos les ha permitido intervenir en procesos como la degradación de macromoléculas complejas (almidón, quitina, hemicelulosa, celulosa, lignocelulosa, entre otros), presentes en tejidos vegetales y animales, formación de humus a partir de restos vegetales, transformación en abonos y en putrefacción. Se ha demostrado la degradación enzimática de celulosa por parte de actinomicetos aeróbicos aislados del suelo¹⁷. Debido a que la hemicelulosa está compuesta principalmente por xilano, también se ha encontrado actividad xilanasa en actinomicetos¹⁸. Aunque se ha demostrado que algunos actinomicetos tienen potencial para degradar lignocelulosa, la mayoría de los trabajos han utilizado medios líquidos, y poco se ha investigado de los actinomicetos en fermentación sobre sustrato sólido. Se necesita aumentar nuestro conocimiento en la degradación de lignocelulosa y la actividad lignocelulolítica de estos microorganismos.

¹³ FRANCO C, M. Evaluación de caracteres PGPR en Actinomicetos e Interacciones de estas Rizobacterias con hongos formadores de Micorizas. Granada, 2008, 261 h. Tesis doctoral. Universidad de Granada. Facultad de Ciencias. Departamento de Fisiología Vegetal.

¹⁴ HESHAM M, A. & SAHAR A, E. Op. cit. p. 851.

¹⁵ OTERO, J. V. Aislamiento, selección e identificación de actinomicetos, bacterias fotosintéticas no sulfurosas y bacterias ácido lácticas con potencial biofertilizante, a partir de suelos asociados al cultivo de plátano en la costa atlántica, colombiana. 2011, 141 h. Trabajo de grado (Magister en Ciencias). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología.

¹⁶ *Ibid.*, p. 12.

¹⁷ *Ibid.*, p. 12.

¹⁸ KUMAR, et al. 2012 Op. cit. p. 170-177.

El objetivo general de este trabajo de investigación fue evaluar la producción de enzimas celulolíticas durante la degradación de lignocelulosa por actinomicetos nativos oxigénicos en fermentación sobre sustrato sólido.

Como objetivos específicos se propusieron: Aislar y seleccionar cepas de actinomicetos oxigénicos degradadores de lignocelulosa; realizar pruebas de fermentación sobre sustrato sólido empleando actinomicetos oxigénicos degradadores de lignocelulosa; obtener extractos enzimáticos crudos a partir de los cultivos de fermentación sobre sustrato sólido; finalmente, se planteó determinar la actividad del complejo celulolítico y la enzima xilanasa de actinomicetos oxigénicos durante su crecimiento bajo condiciones de fermentación sobre sustrato sólido.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. ACTINOMICETOS

Los actinomicetos constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos formado por bacterias Gram positivas que se caracterizan por su capacidad de formar filamentos ramificados o hifas y esporas asexuales¹⁹. En su morfología general se parecen mucho a los hongos. Probablemente parte de esta similitud es consecuencia de la adaptación a los mismos hábitats. En un principio, se incluyeron a los actinomicetos entre los hongos, porque su morfología y desarrollo presentaban gran similitud, dotados de un micelio verdadero. Sin embargo, hoy en día, y dado su carácter procariótico, se sustenta muy bien su clasificación como bacterias. El orden de los Actinomycetales comprende 63 géneros, constituyendo aproximadamente del 20-60% de la población microbiana del suelo²⁰.

En la actualidad, los actinomicetos se encuentran incluidos en el dominio bacteria debido a varias razones: la pared celular está compuesta por peptidoglicano, el diámetro de sus hifas es inferior al de los hongos (0.5 a 2.0 μm), son sensibles a los antimicrobianos pero presentan resistencia a los antifúngicos y disposición de su material genético es típicamente procariótica, aunque se caracterizan por presentar un alto contenido de guanina y citosina en su ADN, encontrándose entre el rango de 51 a 78% (G+C). Estas bacterias son aerobias y algunas anaerobias, pudiéndose encontrar en animales o en el hombre; son heterótrofas, por lo cual pueden utilizar fuentes de carbono simples, complejas y compuestos moleculares

¹⁹ RICO, G. M. A. Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género *Azotobacter* y Actinomicetos aislados de cultivos de *Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753 (papa) cultivados en zonas altoandinas del Perú. 2009, 32 h. Tesis (Biólogo con Mención en Biología Celular y Genética). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas.

²⁰ FRANCO C, M. Op. cit., p. 32-37..

orgánicos tales como ácidos, azúcares, polisacáridos, lípidos, proteínas e hidrocarburos alifáticos²¹.

El interés por los actinomicetos comenzó a raíz del descubrimiento de la capacidad de estos microorganismos de producir antibióticos. De hecho, hoy en día, sigue siendo el grupo más prolífico en cuanto a producción de antibióticos y compuestos bioactivos. Aunque la búsqueda de compuestos bioactivos sigue en auge, el interés por los actinomicetos se ha diversificado y actualmente ocupa áreas de interés muy diversas. Pueden ser patógenos de plantas, de animales, de humanos, descomponen productos del caucho, creciendo incluso en el combustible usado para los aviones. En las estaciones depuradoras de aguas residuales producen espumas densas que llegan a obstruir las instalaciones. Este grupo de microorganismos tiene un enorme interés ecológico por la diversidad de hábitats que pueden colonizar²².

1.1.1. Condiciones de crecimiento. La adición de materia orgánica a los suelos estimula la multiplicación y actividad de los actinomicetos. Los suelos alcalinos y neutros resultan ser más favorables para el desarrollo de estas bacterias, encontrándose rangos de pH óptimo entre 6.5 y 8.0 para su actividad microbiana. No obstante, no es posible observarlos en suelos con pH por debajo de 5.0. Además, se desarrollan favorablemente en suelos bien aireados²³.

La mayoría de los actinomicetos son mesófilos y crecen entre 25°C a 30°C, mientras que a temperaturas inferiores a 5°C su crecimiento es prácticamente nulo. Sin embargo, es posible encontrar a temperaturas superiores a 55°C algunas especies termofílicas de *Streptomyces sp.*, *Thermomonospora sp.* y

²¹ Ibid., p. 37-38.

²² CUESTA A, G. Detección y caracterización por métodos fenotípicos y moleculares de micelata formadores de espumas en estaciones depuradoras de aguas residuales domésticas con sistemas de fangos activos. Valencia, 2004, 1-2 h. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Biotecnología.

²³ PRANCO C, M. Op. cit., p. 42.

Thermoactinomyces sp. Son capaces de crecer aunque el efecto de la alta temperatura posiblemente sea letal para el microorganismo si está acompañado de humedad²⁴.

Por otro lado, la mayoría de los actinomicetos crecen en medios de cultivo tales como agar nutritivo, observándose el crecimiento de las colonias de actinomicetos en medio sólido a partir de los 3 o 4 días de incubación, pero el desarrollo de un micelio aéreo maduro con esporas puede tardar hasta 7 días en desarrollarse²⁵.

1.1.2. Ecología y distribución. El suelo y los sustratos naturales son el mayor reservorio de actinomicetos, donde intervienen en los procesos de descomposición de la materia orgánica. Se encuentran en casi todos los tipos de suelo, aunque condiciones extremas como altas temperaturas, baja humedad y pH, disminuyen levemente la concentración de la población. Su número varía en gran proporción según el tipo de suelo, pero es común encontrarlos en suelos fértiles con concentraciones de 10^6 UFC.g⁻¹ de suelo seco.

Por lo general se aíslan cepas de actinomicetos en la superficie del suelo y entre 2 y 15 cm de profundidad, disminuyendo su concentración a mayores profundidades. El tamaño de la comunidad microbiana depende del tipo del suelo, particularmente de algunas de las características físicas, del contenido de materia orgánica y del pH del medio ambiente.

Los tres géneros más frecuentemente encontrados en el suelo son *Streptomyces*, *Nocardia* y *Micromonospora*. Se pueden encontrar también actinomicetos en aguas dulces y en sedimentos²⁶. Presentan un olor típico a suelo húmedo por la producción de un metabolito llamado geosmina. Adicionalmente, presentan una

²⁴ Ibid., p. 38.

²⁵ Ibid., p. 38.

²⁶ CUESTA A, G. Op. cit., p. 1.

actividad metabólica alta, producen terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares con las que son capaces de degradar la materia orgánica de origen vegetal y animal. Como la gran mayoría de bacterias que son abundantes en suelo, presentan un importante papel ecológico²⁷.

1.1.3. Clasificación de los actinomicetos. El estudio y clasificación de los actinomicetos se fundamenta en la división en diferentes secciones supragenéricas basándose principalmente en características quimiotaxonómicas, como el tipo de pared celular (Tabla 1), el tipo de peptidoglicano incluyendo azúcares e isómeros de ácidos diaminopimélico (DAP), el patrón de los ácidos grasos y de fosfolípidos de membrana, las menaquinonas y su grado de hidrogenación, contenidos y tipo de ácidos micólicos, y el porcentaje molar de relación Guanina – Citosina (mol% G+C) del ADN, la disposición de los conidios y la presencia o ausencia de esporangios²⁸.

Tabla 1. Tipos de paredes celulares de actinomicetos²⁹.

Tipo de pared celular	Isómero de ácido diaminopimélico	Glicina en el puente interpeptídico	Azúcares característicos ^a	Géneros representativos
I	L,L	+	NA	<i>Nocardioides</i> , <i>Streptomyces</i>
II	meso	+	NA	<i>Micromonospora</i> , <i>Pilimelia</i> , <i>Actinoplanes</i>
III	meso	-	NA	<i>Actinomadura</i> , <i>Frankia</i>
IV	meso	-	Arabinosa, galactosa	<i>Saccharomonospora</i> , <i>Nocardia</i>

^a NA: no aplicable, o bien no se detecta un azúcar diferencial.

Fuente: Franco, 2008.

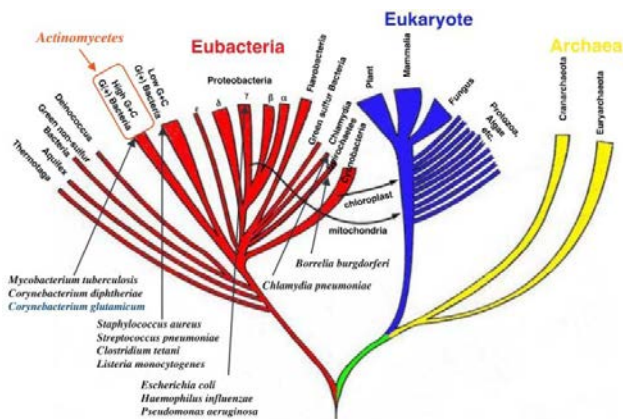
²⁷ FRANCO C, M. Op. cit., p. 43.

²⁸ Ibid., p. 44.

²⁹ Ibid., p. 39.

Filogenéticamente los actinomicetos forman una subdivisión de los organismos del dominio *Bacteria*, diferente de los formadores de endosporas y de los cocos Gram positivos (Figura 1).

Figura 1. Árbol filogenético de los organismos³⁰.



Fuente: Franco, 2008.

1.1.3.1. Phylum y clase *Actinobacteria*. La clase *Actinobacteria* está compuesta por los actinomicetos y sus parientes filogenéticos con un alto contenido de (G+C). Contiene cinco subclases, la más amplia de las cuales es la subclase *Actinobacteridae* compuesta a su vez por dos órdenes, *Actinomycetales* y *Bifidobacteriales*. El orden *Actinomycetales* se divide en 10 subórdenes. El suborden *Corynebacterineae* y el suborden *Streptomycineae* engloba los microorganismos estudiados en el presente trabajo.

1.1.3.2. Suborden *Streptomycineae*. Este suborden posee una sola familia: *Streptomycetaceae*.

³⁰ Ibid., p. 45.

1.1.3.3. Familia *Streptomycetaceae*. Está compuesta por tres géneros, el más importante de los cuales es *Streptomyces*, con géneros cuyas hifas aéreas se dividen en un solo plano para formar cadenas de 3 hasta 50 o más conidiosporas inmóviles, con una textura superficial que oscila entre lisa y espinosa y verrugosa. Todos ellos tienen una pared celular de tipo I y un contenido de (G + C) del 69 al 78 %. Los miembros reciben a menudo en conjunto el nombre de estreptomicetos (del Griego, *streptos*, doblados o torcidos; y *myces*, hongos).

1.1.3.4. Género *Streptomyces*. Es un género enorme; posee en torno a 500 especies. Los miembros de este género son aeróbicos estrictos, su pared celular es de tipo I, y forman cadenas de esporas inmóviles con una vaina fina y fibrosa. Los conidios de cadena a menudo están pigmentados y pueden ser de una textura lisa, peluda o espinosa. Normalmente se encuentran más de tres conidios por cadenas. Los estreptomicetos son muy importantes, tanto desde el punto de vista ecológico como médico. El hábitat natural de la mayoría de los estreptomicetos es el suelo, donde constituyen entre 1 y el 20 % de la población cultivable. De hecho, el olor a tierra mojada es en gran medida el resultado de la producción por los estreptomicetos de sustancias como la geosmina. Los estreptomicetos desempeñan además un papel importante en la mineralización. Son flexibles, desde el punto de vista nutricional, y pueden degradar sustancias resistentes como la peptina, lignina, quitina, queratina, látex y compuestos aromáticos³¹.

1.2. LIGNOCELULOSA

La lignocelulosa es el mayor componente de la biomasa, comprende alrededor de la mitad de la materia producida por la fotosíntesis y representa el más abundante recurso orgánico renovable en la naturaleza. Consiste de tres tipos de polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales están fuertemente entrelazados y

³¹ACTINOBIOTIC. The family *Streptomycetaceae*, part I: Taxonomy. [en línea]. <<http://actinobacteriology-fathiawwad.blogspot.com/2009/04/family-streptomycetaceae-part-i.html>> [citado en 14 de marzo de 2013]

químicamente unidos por fuerzas no covalentes y por enlaces cruzados covalentes (figura 2). Solamente una pequeña cantidad de la celulosa, hemicelulosa y lignina producidos son usados en la agricultura y el resto es considerado como desecho³². En el presente trabajo se utilizaron los residuos lignocelulósicos salvado de trigo, bagazo de caña de azúcar y raquis de palma de aceite. Estos tres residuos difieren en el porcentaje de celulosa, hemicelulosa y lignina.

1.2.1. Salvado de trigo. El salvado es el producto que queda al refinar los granos de los cereales. El salvado corresponde a lo que serían las capas externas del grano y más concretamente al pericarpio, con sus tres subcapas: epicarpio, mesocarpio y endocarpio (ricas en fibra y minerales), la testa (rica en vitaminas y enzimas) y la capa de aleurona (rica en proteínas y grasas). La composición del salvado de trigo se presenta en la Anexo A³³.

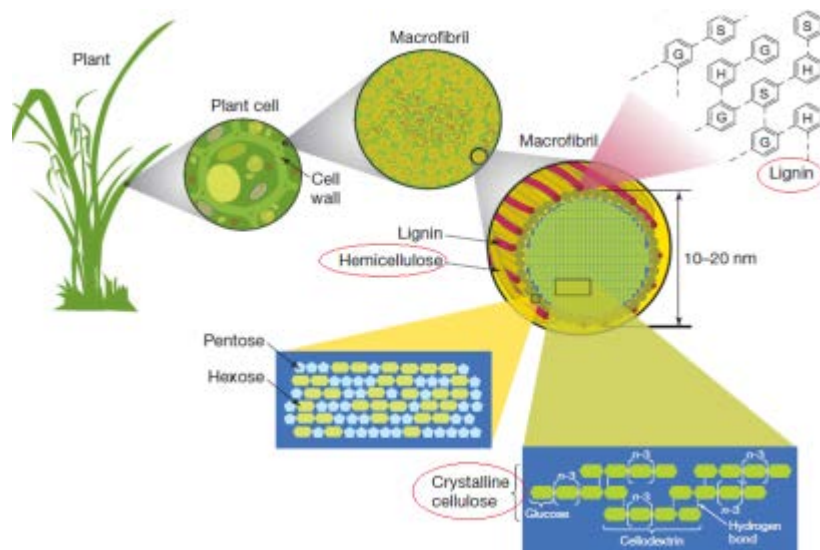
1.2.2. Bagazo de caña. Este es un residuo lignocelulósico del proceso de extracción de azúcar, el cual es abundante y de muy bajo costo. En Colombia, por ejemplo, la región del Valle del Cauca es la mayor productora de caña de azúcar y cuenta con aproximadamente 200000 Ha de este cultivo, siendo el bagazo el principal residuo de esta agroindustria. El bagazo de caña es un manojo de hebras fibrosas de la corteza, mezclada con haces de fibras y polvillo de médula que constituye aproximadamente el 15% de su peso. Por tratarse de un material lignocelulósico está compuesto principalmente de hemicelulosa, celulosa y lignina como se muestra en la Anexo B³⁴.

³² SANCHEZ, C. Op. cit., p. 185.

³³ El mundo de las plantas. Propiedades del salvado. [en línea]. < <http://www.botanical-online.com/salvado.htm>>. [citado en 14 de marzo de 2013].

³⁴ PEREIRA, H. X. I & ALBARRACÍN, C. J. D. Evaluación del proceso de producción de bioetanol de segunda generación a partir de residuos lignocelulósicos utilizando metodologías de análisis exergénico e integración de procesos. 2010, 82 h. Trabajo de grado (Ingeniero Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físicoquímicas.

Figura 2. Estructura de la lignocelulosa³⁵.



Fuente: Cuervo et al, 2009.

1.2.3. Raquis de Palma de Aceite. Colombia es un país agrícola y de las 4.058.471 hectáreas sembradas, 200 mil están dedicadas al cultivo de palma de aceite. En los próximos años se prevé un incremento significativo en el cultivo de palma, quizá debido al incentivo económico por parte del gobierno para estimular la producción de biocombustibles, en este caso el biodiesel. Colombia cuenta con excelentes recursos de biomasa generada de la extracción de aceite de palma, pues ocupa el quinto lugar como productor a nivel mundial, siendo evidente que se genere también una cantidad importante de los desechos de este proceso. En el anexo C, se presenta la caracterización fisicoquímica del raquis de palma de aceite³⁶.

³⁵ CUERVO et al. Op. cit., p. 13.

³⁶ AMARIS et al. Aprovechamiento del potencial energético de la biomasa residual obtenida de la extracción del aceite de palma en Colombia. 2009, 52 h. Trabajo de grado (Ingeniero Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Físicoquímicas.

1.2.4. Estructura y composición de la celulosa. La celulosa es el polímero más abundante en la naturaleza, altamente estable e insoluble en agua. Es el principal componente de la pared celular de las plantas: constituye el 50% del peso seco de la madera y en dependencia de su origen, puede tener un grado de polimerización de alrededor de 2000 a 25000 unidades de glucosa. Está compuesta por monómeros de D-glucosa unidos por enlaces glucosídicos β -1,4, que forman moléculas de celobiosa (dímero de glucosa unido por un enlace β -1,4), (Figura 3). Éstas, a su vez, se estructuran en filamentos de celulosa no ramificados. En la naturaleza, la celulosa no se encuentra como cadena sencilla; desde su síntesis se ordena en filamentos que forman las microfibrillas, con un diámetro de 5 a 15 nm. Estas fibrillas pueden contener desde 36 hasta más de 1200 filamentos de celulosa (Figura 4). La configuración del enlace β -glucosídico facilita que la celulosa forme cadenas largas y lineales unidas entre sí mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals, que forman una estructura cristalina y organizada resistente a la hidrólisis en ciertas áreas de la microfibrilla (Figura 5).

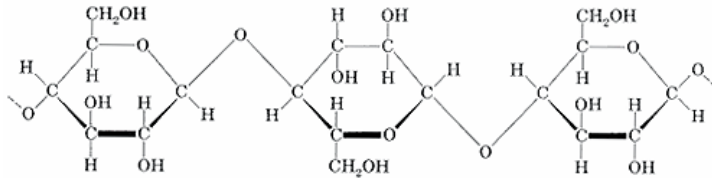
Las regiones cristalinas altamente organizadas están separadas por celulosa no organizada o amorfa que se presenta en pequeños porcentajes (de 5 a 20%). En esta última conformación, la celulosa es más susceptible a la degradación enzimática. La celulosa es un sustrato muy resistente, que se encuentra entrelazado, a su vez, con la hemicelulosa y la lignina, formando una estructura altamente resistente a la degradación, por lo que solo algunos organismos celulolíticos pueden hidrolizarla^{37, 38, 39}.

³⁷ QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E. & FOLCH-MALLOL, J. L. Proteínas que remodelan y degradan la pared celular vegetal: perspectivas actuales. *En*: Biotecnología Aplicada. 2011. Vol. 28. 195 p.

³⁸ SANCHEZ, C. Op. cit., p. 186.

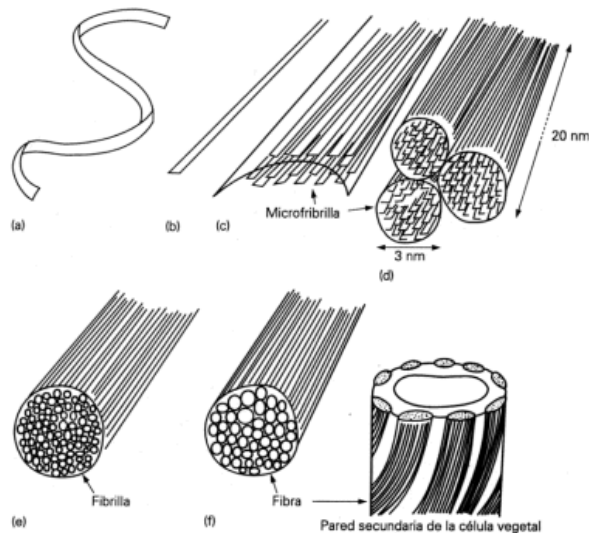
³⁹ CUERVO et al. Op. cit., p. 12.

Figura 3. Estructura química de la celulosa⁴⁰.



Fuente: Página web: Nicolas, 2009.

Figura 4. Aspectos de la configuración y estructura de la celulosa. Tendencia del polímero lineal a extenderse totalmente (a y b) y asociarse después para formar microfibrillas (c) que a su vez se alinean con otras (d y e) para dar lugar a una fibra de celulosa (f). (g) Orientación de las fibras en una capa de pared secundaria. Otras capas de pared secundaria tienen distintas orientaciones⁴¹.

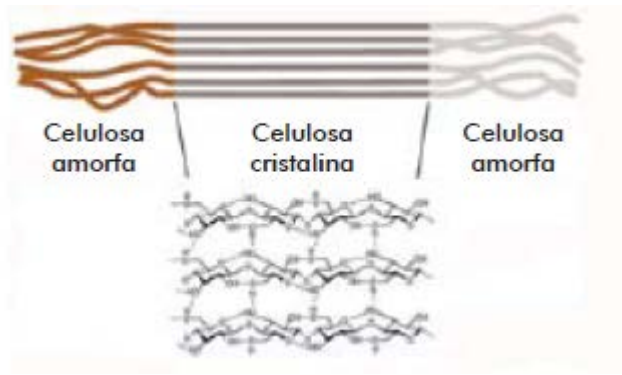


Fuente: Página web: Ifrán et al.

⁴⁰Consecuencias del uso de la madera. [en línea]. <http://consecuenciasdelusodelamadera.blogspot.com/2009/09/estructura-molecular-de-la-celulosa.html> [citado en 19 de marzo de 2013].

⁴¹IFRÁN et al. Composición química de los seres vivos. [en línea]. < <http://genomasur.com/lecturas/Guia02-1.htm> > [citado en 15 de marzo de 2013].

Figura 5. Estructura del homopolisacárido de la celulosa cristalina y amorfa. El arreglo de la celulosa en las zonas cristalinas se mantiene por los puentes de hidrógeno que se forman entre los filamentos. En las zonas amorfas existen dobleces y torsiones que impiden el arreglo ordenado⁴².



Fuente: Quiroz-Castañeda & Folch-Malloi, 2011.

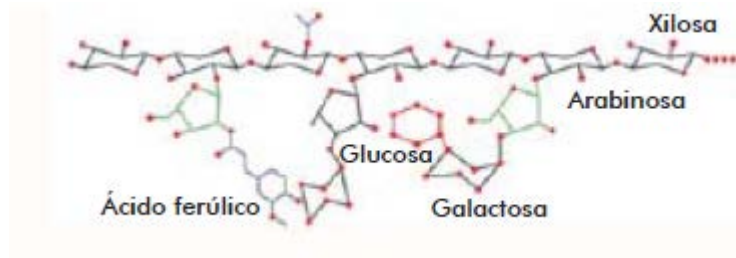
1.2.5. Estructura y composición de la hemicelulosa. La hemicelulosa constituye entre el 25 y el 30% del total del peso seco de la madera. Es un polímero complejo de heteropolisacáridos, formado principalmente por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) usualmente acetiladas que forman cadenas ramificadas, además de los azúcares ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico, unidos por enlaces glucosídicos β -1,4 y ocasionalmente por enlaces β -1,3. En contraste con la celulosa, la hemicelulosa posee ramificaciones laterales cortas formadas de distintos azúcares que la hacen menos recalcitrante (Figura 6). Se clasifica en xilanos, xiloglucanos, mananos, glucomananos y glucanos unidos por enlaces β -1,3 o β -1,4. El xilano es el componente más abundante en la hemicelulosa (constituye más del 70% de su composición) y está formado por la unión β -1,4 de unidades de D-xilosa. Puede tener diversas sustituciones, y originar los arabinoxilanos (si contiene arabinosa) presentes en los pastos, o los glucuronoxilanos y glucuronoarabinoxilanos (si contiene residuos glucosa y

⁴² QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E. & FOLCH-MALLOI, J. L. Op. cit., p. 195.

glucosaarabinosa, respectivamente) que son los principales componentes de la pared secundaria de las plantas dicotiledóneas. Además de la xilosa, los xilanos pueden contener arabinosa, ácido glucurónico o 4-O-metil éter-ácido glucurónico, ácido acético, ferúlico o ácidos p-coumáricos. La composición y frecuencia de las ramificaciones dependen del origen de la hemicelulosa. En los mananos y galactomananos de la hemicelulosa el esqueleto principal lo forman residuos de manosa unidos por enlaces β -1,4, y en los glucomananos, el esqueleto de manosa está ramificado aleatoriamente con residuos de manosa y glucosa. Las hemicelulosas tienen diferencias estructurales entre las especies y entre los tipos celulares de las plantas.

La función más importante de la hemicelulosa es que actúa como conexión entre la lignina y las fibras de celulosa, lo que otorga mayor rigidez a la red celulosa-hemicelulosa-lignina. La lignina y la hemicelulosa se mantienen unidas de manera predominante a través de enlaces del tipo éster entre la arabinosa de la hemicelulosa y los hidroxilos de la lignina, en tanto que la unión con la celulosa es a través de puentes de hidrógeno^{43, 44, 45}.

Figura 6. Estructura del heteropolisacárido de la hemicelulosa. Formada por pentosas (xilosa, arabinosa) y hexosas (glucosa, galactosa) y el ácido ferúlico. Esta composición varía de acuerdo con el origen y el tejido de la planta⁴⁶.



Fuente: Quiroz-Castañeda & Folch-Mallol, 2011.

⁴³ Ibid., p. 195-196.

⁴⁴ PRINSEN et al. Op. cit., p. 3-8.

⁴⁵ CUERVO et al. Op. cit., p. 13.

⁴⁶ QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E. & FOLCH-MALLOL, J. L. Op. cit., p. 195.

1.2.6. Estructura y composición de la lignina. La lignina es uno de los polímeros más abundantes en la naturaleza, después de la celulosa y la hemicelulosa. Es altamente resistente a la degradación química y biológica. Forma parte de la pared celular, confiriéndole soporte estructural, impermeabilidad y resistencia al ataque de microorganismos. La lignina y la hemicelulosa crean una matriz amorfa donde las fibras de celulosa están embebidas y protegidas de la degradación. Estructuralmente, la lignina es un heteropolímero irregular, insoluble y ramificado, formado por la polimerización de tres alcoholes aromáticos del tipo fenilpropano: alcohol coumarílico, coniferílico y sinapílico, unidos por enlaces C-C y enlaces del tipo éter entre los anillos aromáticos. Este polímero da rigidez y protege a los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa), además de que constituye del 20 al 30% de la madera de los árboles. El constituyente principal en las maderas suaves, es el alcohol coniferílico, y en las maderas duras: el alcohol coumarílico y el sinapílico. La lignina es el componente más difícil de degradar del material lignocelulósico. Ello limita su uso y la hidrólisis de los polisacáridos que protege. Son pocos los organismos que pueden mineralizarla ^{47,}
48, 49

1.3. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LA LIGNOCELULOSA

El principal objetivo para el uso del material lignocelulósico es tener acceso a la celulosa y hemicelulosa que se encuentran protegidas por la matriz de lignina. Los desechos lignocelulósicos se producen en grandes cantidades por la industria maderera, forestal y de jardines, así como en las actividades agrícolas. Estos desechos poseen un gran valor por su potencial aplicación en la elaboración de alimentos animales y para la obtención de biocombustibles. Sin embargo, la utilización tanto del azúcar de caña como del almidón de maíz para la producción de etanol crea mucha controversia debido a que compite con la producción de

⁴⁷ Ibid., p. 196.

⁴⁸ PRINSEN et al. Op. cit., p. 8-11.

⁴⁹ SANCHEZ, C. Op. cit., p. 186.

alimentos y es un proceso caro, lo que ha hecho difícil que el etanol sea competitivo en costos con los combustibles fósiles. Ello ha forzado la búsqueda de nuevas alternativas de materia prima para la elaboración de biocombustibles, por lo que los desechos lignocelulósicos son una posibilidad. La degradación de la biomasa lignocelulósica involucra la disponibilidad de la celulosa y la hemicelulosa, así como la subsecuente hidrólisis de estos polisacáridos en azúcares de 5 y 6 carbonos, que se convierten en etanol por procesos de fermentación.

En América Latina, la opción actual para la producción de biocombustibles es a partir de compuestos no celulósicos. Esta producción se ha incrementado en los últimos años, y países como Brasil, Colombia, Paraguay y Costa Rica, lo producen a partir de caña de azúcar y granos de trigo. El principal reto de la conversión de la biomasa en etanol es alcanzar los rendimientos que permitan hacerla competitiva, en cuanto a costos, con los combustibles usados actualmente. Para esto debe considerarse que los desechos lignocelulósicos poseen una matriz de lignina que protege a la celulosa y a la hemicelulosa de la degradación. Además, la celulosa posee regiones cristalinas que dificultan su hidrólisis. Es por esto que se emplean pretratamientos químicos y físicos como prerrequisito para la degradación. Las condiciones que se requieren son altas temperaturas y soluciones ácidas o básicas, lo que resulta costoso y en muchas ocasiones ineficiente. Además, durante los pretratamientos se producen compuestos inhibidores de la fermentación como furanos y compuesto fenólicos.

En la utilización de la biomasa con fines biotecnológicos, las expansinas (o proteínas con actividad expansina) son potencialmente útiles, pues permitirían optimizar el proceso de degradación del material celulósico, por su característica

de relajar la pared celular en condiciones ligeramente ácidas ($\text{pH} \leq 5.0$), de manera semejante a las condiciones en las que funcionan las celulasas⁵⁰.

1.4. MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE LIGNOCELULOSA

Los hongos basidiomicetos y las bacterias aerobias degradan el material celulósico a través de la producción de celulasas extracelulares. Entre este grupo se encuentran las bacterias del género *Cellulomonas* y *Streptomyces*, así como los hongos basidiomicetos responsables de la pudrición de la madera, que son los organismos más estudiados en esta área porque producen celulasas y actualmente dominan las aplicaciones industriales. Entre estos últimos se encuentran *Sclerotium rolfsii*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Volvariella volvacea*, *Schizophyllum commune*, *Pycnoporus sanguineus*, *Bjerkandera adusta*, y algunos ascomicetos como *Trichoderma reesei*, y especies de *Aspergillus*, y *Penicillium*. Los hongos y bacterias anaerobias degradan la celulosa a través de celulosomas, habitan en aguas residuales y en el rumen y el tracto intestinal de los animales herbívoros e insectos como escarabajos y termitas. Bacterias pertenecientes a este grupo son *Clostridium* y *Ruminococcus* y los hongos *Anaeromyces mucronatus*, *Caecomyces communis*, *Cyllamyces aberencis*, *Neocallimastix frontalis*, *Orpinomyces sp.* y *Piromyces sp.*^{51 52}.

Los *Actinomycetes* son bien conocidos por su habilidad para descomponer moléculas complejas, particularmente la lignocelulosa, siendo importantes agentes en el proceso de descomposición⁵³. Se han reportado diferentes especies de *Streptomyces* capaces de colonizar vesículas, fibras y células parenquimales. Las

⁵⁰ QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E. & FOLCH-MALLOL, J. L. Op. cit., p. 202-203.

⁵¹ CUERVO et al. Op. cit., p. 14-15.

⁵² QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E. & FOLCH-MALLOL, J. L. Op. cit., p. 196.

⁵³ HESHAM M, A. & SAHAR A, E. Op. cit., p. 850.

especies celulolíticas de *Streptomyces*, *Thermonospora*, *Thermobifida* y *Cellulosimicrobium* degradan la celulosa en un ambiente aeróbico^{54 55 56}.

La especies mesófilas del género *Streptomyces* también han sido muy estudiadas debido a su mayor abundancia en el suelo. La mayor parte de las investigaciones a partir de los años ochenta, se han basado en el estudio de las enzimas celulolíticas y sus mecanismos de acción, además, han sido objeto de manipulación genética. El género *Nocardia* no es muy abundante en la naturaleza; se han aislado y estudiado pocas especies lignocelulolíticas siendo todas mesófilas y neutrófilas, sin embargo, algunas de las especies estudiadas tienen la propiedad de degradar lignina, compuesto altamente resistente a la descomposición microbiana⁵⁷.

1.5. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA LIGNINA

El complejo sistema enzimático de las ligninasas está conformado por: peroxidasas, lacasas y oxidasas productoras de H₂O₂. Dentro de estas enzimas las lacasas y peroxidasas se definen como fenol oxidasas. Las reacciones catalizadas por estas enzimas son muy similares. Ellas oxidan compuestos fenólicos creando radicales fenoxilos, mientras que los compuestos no-fenólicos son oxidados a sus cationes radicales correspondientes. Entre las enzimas de tipo peroxidasa cabe destacar lignina peroxidasa (Li-P) y manganeso peroxidasa (Mn-P). Li-P cataliza una amplia variedad de reacciones, por ejemplo, rompimiento de enlaces β-O-4 éter y C_α-C_β de compuestos modelos diméricos de lignina.

Manganeso peroxidasa es también una glicoproteína perteneciente al grupo de las hemo-peroxidasas. La enzima actúa exclusivamente como una fenoloxidasas de

⁵⁴ STALIN et al. Op. cit., 258-262.

⁵⁵ ADAV et al. Op. cit., p. 3694-3706.

⁵⁶ SONG, J. M. & WEI, D. Z. Op. cit., p. 1930-1934.

⁵⁷ PIÑERO, J. & RIVAS, N. Op. cit., p. 413.

sustratos fenólicos usando Mn^{+2}/Mn^{+3} como un intermediario redox. Esta enzima está involucrada en la oxidación de fenoles y estructuras fenólicas de la lignina.

Algunas de las funciones industriales de esta enzima están relacionadas con los procesos de blanqueamiento de pulpa de madera, tratamiento de efluentes azucareros, decoloración y detoxificación de contaminantes ambientales⁵⁸.

1.6. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA HEMICELULOSA

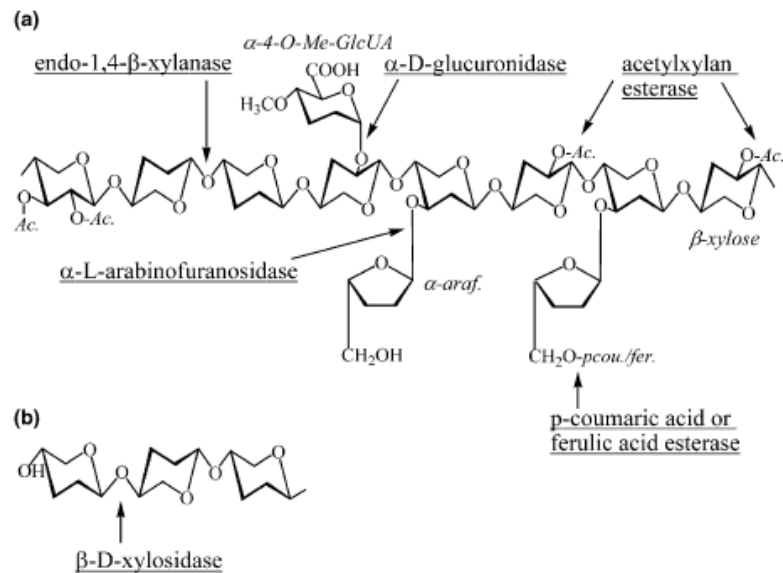
La hemicelulosa se biodegrada para formar azúcares monoméricos y ácido acético. El xilano es el principal carbohidrato de la hemicelulosa y su degradación completa requiere la acción cooperada de varias enzimas hidrolíticas como las xilanasas y otras accesorias. La mayoría de las hemicelulasas son glicósido hidrolasas; aunque algunas hemicelulasas son carbohidrato esterasas que hidrolizan los enlaces éster que unen al acetato o al ácido ferúlico con los azúcares ramificados.

Las xilanasas son las principales enzimas que participan en la degradación de la hemicelulosa. En este grupo se encuentran las **endoxilanasas (EC 3.2.1.8; endo-1,4-β-D-xilanasas)** que actúan sobre la cadena principal del polisacárido, rompen los enlaces entre las unidades de xilano, y liberan oligosacáridos. Las β-xilosidasas (EC 3.2.1.37; xilano 1,4-β-xilosidasa) liberan xilosa a partir del rompimiento del enlace de los oligosacáridos de xilano (Figura 7). La degradación de la hemicelulosa requiere también enzimas accesorias como las xilano esterasas, ferúlico y coumárico esterasas, α-arabinofuranosidasas y α-4-metil glucuronosidasas, entre otras, que actúan de manera sinérgica para hidrolizar eficientemente la hemicelulosa. Entre las hidrolasas también se agrupan unas

⁵⁸ QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E. & FOLCH-MALLOL, J. L. Op. cit., p. 199.

proteínas llamadas carbohidrato esterasas, que catalizan O y N deacetilaciones de sustratos como el xilano, la quitina y algunos peptidoglicanos^{59 60}.

Figura 7. a) Estructura de xilano y los sitios donde actúan las enzimas xilanólicas. El esqueleto del sustrato está compuesto de enlaces 1,4 β residuos xilosa. b) Hidrólisis de xilo-olisacárido por β-xilosidasa⁶¹.



Fuente: Suarez et al, 2010.

1.7. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA CELULOSA

La transformación de la celulosa por vía enzimática implica la acción de un sistema multienzimático, el complejo de celulasas, constituido básicamente por tres enzimas: **exoglucanasas**, **endoglucanasas** y **β-glucosidasas**; algunas de ellas se han cristalizado, lo que ha posibilitado deducir su estructura tridimensional.

⁵⁹ SUAREZ et al. Análisis de la funcionalidad y diversidad microbiana en suelos dedicados al cultivo de papa criolla (*Solanum phureja*) mediante una aproximación metanogénica. 2010, 42 h. Maestría en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.

⁶⁰ QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E. & FOLCH-MALLOL, J. L. Op. cit., p. 197-198.

⁶¹ SUAREZ et al. Op. cit., p. 41.

Las **exoglucanasas** o **celobiohidrolasas (CBH) (EC 3.2.1.74; 1,4-β-D-glucano-glucanohidrolasa)** actúan progresivamente sobre los extremos reductor y no reductor de las cadenas del polisacárido de celulosa, liberando celobiosa como principal producto. Estas enzimas representan del 40 al 70% del componente total del sistema de celulasas, y pueden hidrolizar la celulosa cristalina (Figura 8). Son enzimas monoméricas, con una masa molecular entre 50 y 65 kDa. La glicosilación en las exoglucanasas es muy baja (menor que el 12%) o nula, su pH óptimo de actividad catalítica es entre 4 y 5, y su temperatura óptima es de 37 a 60 °C, en dependencia de la enzima y el sustrato.

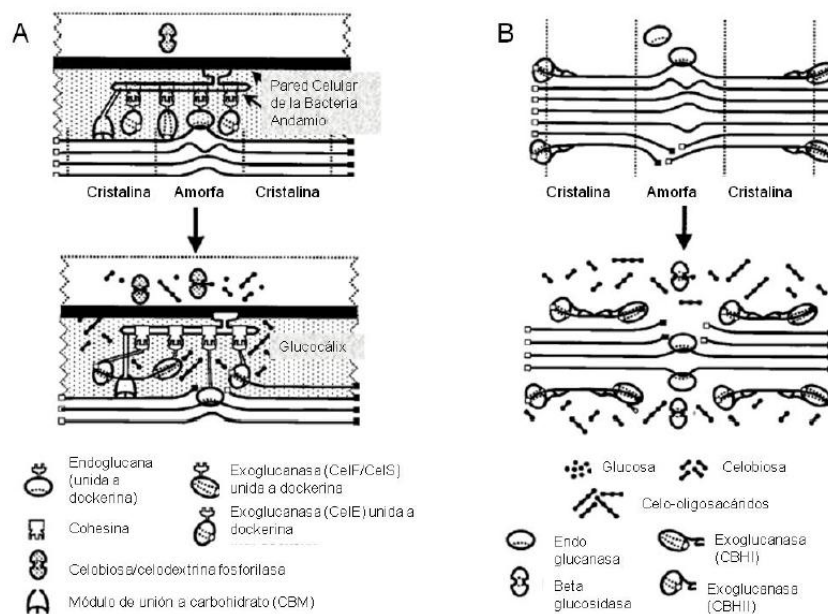
Las **endoglucanasas (EG) (EC 3.2.1.4; 1,4-β-Dglucano- 4-glucanohidrolasa)** escinden aleatoriamente en sitios amorfos internos de la cadena de celulosa, generando oligosacáridos de diferentes longitudes y nuevos extremos de la cadena, susceptibles de ser hidrolizados por exoglucanasas. Se considera que estas enzimas son las que inician el ataque azaroso en múltiples sitios internos de las regiones amorfas de la fibra de celulosa, y favorece la acción subsecuente de las celobiohidrolasas en los extremos reductor y no reductor recién creados. Las endoglucanasas son enzimas monoméricas, cuya masa molecular oscila entre 22 y 45 kDa. En general, las endoglucanasas no están glicosiladas; sin embargo, pueden contener una cantidad relativamente baja de carbohidratos (de 1 a 12%). El pH óptimo para la actividad endoglucanasa es entre 4 y 5. La temperatura óptima de las endoglucanasas oscila entre 50 y 70 °C.

Una hidrólisis exhaustiva de la celulosa también requiere de las **β-glucosidasas (BGL) (EC 3.2.1.21)**, que hidrolizan la celobiosa y liberan dos moléculas de glucosa, lo cual contribuye a proveer una fuente de carbono fácilmente metabolizable. Las β-glucosidasas pesan entre 35 y 640 kDa. Existen enzimas de aproximadamente 100 kDa que son monoméricas y también se han aislado enzimas homo-oligoméricas de la levadura *Rhodotorula minuta*. La mayoría de las

β -glucosidasas están glicosiladas. Tienen un pH óptimo entre 3.5 y 5.5, y una temperatura óptima en un intervalo de 45 y 75 °C.

Los sistemas enzimáticos de celulasas presentan una actividad colectiva mucho mayor que la suma de las actividades individuales de las enzimas, fenómeno conocido como sinergia. Los sistemas de celulasas no son solamente una acumulación de enzimas que representan los tres tipos, sino que actúan de manera coordinada para hidrolizar eficientemente la celulosa^{62, 63}.

Figura 8. Representación esquemática de la hidrólisis de la celulosa amorfa y cristalina en el sistema de celulasas complejo (A) y no complejo (B)⁶⁴.



Fuente: Cuervo et al, 2009.

⁶² Ibid., p. 39-40.

⁶³ QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E. & FOLCH-MALLOL, J. L. Op. cit., p. 197-198.

⁶⁴ CUERVO et al. Op. cit., p. 15.

1.8. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LA ENZIMAS XILANASAS Y CELULASAS.

Una de las aplicaciones más importantes de las xilanasas es en la industria de la pulpa y del papel. El pulpeo Kraft involucra el cocimiento alcalino de la pulpa para remover el 95% de la lignina presente en la madera. El 5% remanente le confiere a la pulpa el color café pardo oscuro. Por razones estéticas y para mejorar las propiedades del papel es necesario un paso de blanqueo, el cual tradicionalmente se ha llevado a cabo por un proceso multietapas, que utiliza cloro o dióxido de cloro. Los productos alternativos de estos compuestos químicos son sustancias orgánicas cloradas, algunas de las cuales son tóxicas, mutagénicas, persistentes y bioacumulativas que causan numerosos daños en los sistemas biológicos.

En los últimos diez años, la industria de la pulpa y el papel utiliza mezclas de xilanasas en el proceso de bioblanqueo, con esto se ha logrado realzar la brillantez de las pulpas y disminuir la cantidad de cloro utilizado en las etapas de blanqueo, además de resultar muy efectivas con respecto a los costos. Hoy en día, un número significativo de fábricas en todo el mundo utilizan el proceso completo de blanqueo con xilanasas. Además, se han introducido al mercado con éxito diferentes productos, incluyendo papeles para revistas y papeles con determinado tejido que son manufacturados con pulpas tratadas enzimáticamente.

Cabe señalar que es indispensable que la preparación de xilanasas esté completamente libre de celulasas, ya que esto traería serias implicaciones económicas en términos de pérdida de celulosa, calidad de la pulpa degradada y un incremento en los costos del tratamiento de efluentes. Las xilanasas, como las celulasas, también se usan en la industria alimentaria en la clarificación de jugos de frutas y vinos, licuefacción de mucílago de café; extracción de saborizantes y pigmentos, aceites de plantas y semillas; maceración de materia vegetal; acondicionamiento de piensos para aves y cerdos y en la industria de la

panificación, entre otras. En la industria de la panificación, las xilanasas, y especialmente las endo-1,4- β -xilanasas, se adicionan a la masa de pan para mejorar su calidad, obteniéndose productos de panadería con mejor textura y sabor. El efecto de las xilanasas es incrementar el volumen específico de los panes, sin provocar un efecto colateral negativo en el manejo de la masa. Este efecto sobre el mejoramiento del volumen del pan puede atribuirse a la distribución de agua desde la fase del pentosano hacia la del gluten, resultando eventualmente en un mejor horneado. Asimismo, se ha publicado recientemente que las arabinasas, β -L-arabinofuranosidasas, β -L-arabinofuranohidrolasas y esterases juegan un papel importante en la textura, calidad y propiedades sensoriales de los productos de panificación⁶⁵.

En la industria textil las celulasas juegan un papel muy importante en el desteñido de mezclilla ya que se usan para remover el color azul índigo y dar una apariencia de desteñido/deslavado (biostoning-biobleaching). Tradicionalmente el desteñido de este tipo de prendas se efectuaba con piedra pómez (stone wash). Una pequeña cantidad de enzima puede sustituir varios kilos de piedras. Con la reducción de las piedras se produce menos daño a las telas, menos desgaste de las lavadoras y menos polvo de piedra pómez en el ambiente de la lavandería.

El biostoning ha abierto nuevas posibilidades en el acabado de tela vaquera, aumentando la variedad de tratamientos de acabado. También ha incrementado la productividad del proceso de deslavado, ya que las lavadoras contienen menos piedras y más prendas. Por otro lado, las celulasas se añaden a los detergentes quita pelusas, la enzima degrada las microfibrillas que se separan parcialmente de las fibras principales, restituyendo a las fibras una superficie suave y a la prenda su color original. Dentro de la industria alimentaria, las celulasas se usan para favorecer la extracción y filtración de jugos de frutas o verduras, filtración de mostos, extracción de aceites comestibles, etc. Asimismo, se usan en la hidrólisis

⁶⁵ SUAREZ et al. Op. cit., p. 42.

parcial de materiales lignocelulósicos para mejorar la digestión de rumiantes. Por otra parte, los dominios de unión a celulosa se han usado con gran éxito sobre una matriz de celulosa para facilitar la purificación de proteínas recombinantes⁶⁶
67 .

1.9. FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO (FSS)

La fermentación en medio sólido, o también fermentación en estado sólido, se define como el crecimiento de microorganismos en medios sólidos o semisólidos en ausencia de agua libre. Las fermentaciones de estas características son aquellas en las cuales el sustrato no está disuelto ni en suspensión en un gran volumen de agua. La definición más general y reciente fue formulada por Viniegra-González en 1997, donde se plantea que "es un proceso microbiológico que ocurre comúnmente en la superficie de materiales sólidos que tienen la propiedad de absorber y contener agua, con o sin nutrientes solubles".

Esta técnica ha sido aplicada desde la antigüedad en la preparación de alimentos fermentados, como el koji en China que se obtiene por el cultivo del hongo *Aspergillus oryzae* sobre cereales cocidos, y en Japón es la base de la elaboración de sake, del teiupéh habitual en Indonesia. También suele utilizarse en la elaboración de aromas artificiales de alimentos. En la década de los años 70 se promovió con fuerza el estudio científico, con vistas a aprovechar las ventajas económicas de este tipo de fermentación⁶⁸ ⁶⁹ .

⁶⁶ Ibid., p. 40.

⁶⁷ ARGENBIO. Consejo Argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología. El cuaderno de por qué Biotecnología. Cuaderno No. 102. Celulosa y celulasas. [en línea]. ><http://www.porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1¬e=102>> [citado en 20 de marzo de 2013].

⁶⁸ ALI, H. KH. Q. & ZULKALI, M. M. D. Design aspects of bioreactors for solid-state fermentation: A review. En: Chem. Biochem. Eng. Q. 2011. Vol. 25. No. 2. 255 p.

⁶⁹ CHAVEZ. G, M. L.; RODRIGUEZ D, L. V. & AGUILAR, C. N. Aspectos básicos de la fermentación en medio sólido. Cienciacierta. 2009. No. 20. [en línea]. <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC20/CC20fermentacion.html> [citado en 21 de marzo de 2013].

Ventajas y desventajas de la fermentación en estado sólido comparada con el cultivo sumergido en líquido. Se consideran como ventajas los siguientes aspectos:

- Los medios de cultivo son simples, generalmente subproductos agrícolas que presentan un alto contenido de los nutrientes necesarios.
- La baja actividad del agua es de gran ayuda para evitar las contaminaciones, especialmente de bacterias y levaduras.
- La aireación forzada es facilitada por la porosidad del soporte, lo que permite una alta transferencia de oxígeno al microorganismo.
- El proceso de recobrado es simplificado. Algunos productos son utilizados integralmente como alimento animal, productos para el control biológico, etc.
- La concentración natural del sustrato permite utilizar reactores más pequeños en comparación con los utilizados en otro tipo de fermentación^{70,71}.

Entre las principales desventajas se encuentran:

- Su aplicación se limita a microorganismos que crecen en bajos contenidos de humedad.
- La extracción del calor metabólico puede ser un problema, sobre todo cuando se trabaja a gran escala y no se controla el proceso.

⁷⁰ ALI, H. KH. Q. & ZULKALI, M. M. D. Op. cit., p. 255.

⁷¹ CHAVEZ et al. Op. cit.

- La naturaleza sólida del sustrato trae problemas al medir los parámetros de la fermentación, tales como el pH, la temperatura, el contenido de humedad y la concentración de sustrato y productos.
- Muchos aspectos ingenieriles como el diseño de reactores y el escalado están muy poco caracterizados.
- El tiempo de fermentación es mayor debido a que generalmente se utilizan microorganismos que presentan bajas velocidades específicas de crecimiento^{72 73}.

Las condiciones ambientales, tales como la humedad, la actividad del agua, el pH, la temperatura, la concentración y disponibilidad del sustrato, la aireación, el tamaño de partículas y la forma de inoculación afectan significativamente el crecimiento y la formación de productos. En el cultivo líquido agitado, el control de las condiciones ambientales es relativamente simple, ya que estos sistemas son homogéneos desde el punto de vista de la concentración celular, nutrientes y productos. Sin embargo, se presentan serios problemas en los sistemas sólidos con el mezclado, la transferencia de oxígeno, el intercambio de calor y el control de la humedad y el pH, debido -principalmente- a la heterogeneidad y la consistencia del sistema^{74,75}.

La humedad del medio puede variar entre 30 y 80%, en dependencia del sólido utilizado, del microorganismo y el objetivo del proceso. La actividad del agua no sólo va a afectar el crecimiento del microorganismo que en el sistema se

⁷² ALI, H. KH. Q. & ZULKALI, M. M. D. Op. cit., p. 255-256.

⁷³ CHAVEZ et al. Op. cit.

⁷⁴ ALI, H. KH. Q. & ZULKALI, M. M. D. Op. cit., p. 255.

⁷⁵ CHAVEZ et al. Op. cit.

desarrolle, sino también los productos de interés obtenidos a partir del metabolismo de dicho microorganismo.

Hoy se reconoce que no es sólo la cantidad de agua presente en el sistema la que ejerce su influencia sobre la eficiencia del proceso, sino el carácter de las interacciones entre el agua y el medio sólido. Por eso no es contradictorio observar que un mismo microorganismo se desarrolle plenamente en dos sustratos diferentes con porcentajes de humedad bastante disímiles⁷⁶.

El pH es otra variable que afecta el desarrollo de los procesos de fermentación en estado sólido, al igual que lo hace en otro tipo de cultivos. Este se puede ver afectado por la secreción de ácidos, o algunos otros metabolitos durante el proceso. Hablando de la fermentación en medio sólido, el control es algo complicado más no imposible; la complejidad es debida a la ausencia de instrumentos capaces de medir el pH en la capa de líquido que rodea el sólido⁷⁷.

Al igual que para cualquier otro organismo, la temperatura es un factor importante en el crecimiento de estos, y también para que se lleven a cabo toda una serie de diversas y múltiples reacciones químicas, de manera que así puedan llevar a cabo todas sus actividades celulares. Este factor puede ser considerado como una variable crítica, debido a la alta concentración de sustrato por unidad de volumen y a la baja conductividad térmica del sistema heterogéneo sólido-líquido-gas, lo que favorece la acumulación del calor metabólico en el sistema y un aumento de la temperatura del cultivo.

Con el aumento de la temperatura se van a favorecer tres inconvenientes: la actividad microbiana se desacelera o se detiene; se deshidrata el medio sólido, y el metabolismo se desvía como un mecanismo de defensa ante el calor o ante la

⁷⁶ Ibid.

⁷⁷ Ibid.

deshidratación. En cuanto al medio de cultivo sobre el cual se desarrollaran los microorganismos, este debe tener todos los nutrientes necesarios de forma balanceada y con concentraciones adecuadas para favorecer el crecimiento del microorganismo ⁷⁸.

Al igual que en cualquier otro medio de cultivo, las relaciones entre algunos de sus elementos son de particular importancia; por ejemplo, carbono-nitrógeno y fósforo-oxígeno. En la mayoría de los procesos de fermentación en medio sólido participan microorganismos aerobios; es decir, que para que los microorganismos puedan crecer requieren de oxígeno, y es por esto que la aireación es un factor fundamental para el desarrollo del proceso.

La aireación se utiliza para suministrar el oxígeno necesario, extraer el dióxido de carbono formado, así como para extraer el calor metabólico formado, de manera que el flujo óptimo de aire debe tomar en consideración la naturaleza del microorganismo utilizado, los requerimientos de oxígeno para el crecimiento y/o la formación del producto deseado, la velocidad de generación de calor metabólico, la concentración crítica del dióxido de carbono y otros metabolitos volátiles, el espesor de la masa de sólido, entre otros.

La aireación en las fermentaciones en medio sólido es más fácil que las fermentaciones sumergidas, porque la superficie de contacto es mayor entre el aire y el líquido que está absorbido en las partículas.

El tamaño de partícula está muy ligado a la transferencia de masa en el sistema de fermentación en estado sólido, y para considerar este fenómeno se ha propuesto dividir el análisis en la transferencia de masa intrapartícula y la interpartícula. En el primer caso, influye más el tamaño y la forma del poro de la partícula, así como la porosidad, aunque también influye el tamaño de la partícula.

⁷⁸ Ibid.

En el segundo caso, el espacio interpartícula es lo más importante y es afectado por el tamaño de la partícula, su forma y la humedad. Otro aspecto que influye en la transferencia de masa durante el proceso, es el cambio de estructura de las partículas de sustrato resultado de la acción de los microorganismos. El tipo de inóculo en las fermentaciones en medio sólido puede ser de dos tipos fundamentales tanto a nivel laboratorio y a nivel industrial: esporas o micelio.

La fermentación en medio sólido ha aparecido como una tecnología potencial para la obtención de productos microbiológicos, los cuales son de utilidad en las industrias alimenticia, química y farmacéutica. La utilización de los residuos agro-industriales como sustratos en los procesos de fermentación en medio sólido proporcionan una alternativa de utilización, no obstante que parecían no tener aplicación alguna ⁷⁹.

⁷⁹ Ibid.

2. ANTECEDENTES

Desde los años 70 se han realizado estudios referentes a la capacidad degradativa y productiva de enzimas hidrolíticas que presentan los actinomicetos sobre un rango amplio de sustratos. Se ha demostrado que es frecuente encontrar especies con actividad celulolítica, con capacidad de producción de las enzimas endo- β -1,4-glucanasa, exo- β -1,4-glucanasa y β -1,4-glucosidasa, y hemicelulolíticas, como endo- β -1,4-xilanasa, entre muchas otras. Esa capacidad degradadora de celulosa y hemicelulosa encontrada en los actinomicetos, podría constituir un aspecto primordial en la humificación y aplicaciones biotecnológicas de la conversión de la lignocelulosa.

Zimmermann *et al.* (1988)⁸⁰, obtuvieron cepas de actinomicetos mesofílicos y termofílicos que lograron crecer en medios de cultivo conteniendo xilano de gramíneas y lignocelulosa, con actividades enzimáticas involucradas en la degradación de la hemicelulosa. Se detectaron actividades de las enzimas xilanasa, acetil esterasa y la α -arabinofuranosidasa, la cual fue dependiente del medio de cultivo. Además, se encontraron altos niveles de xilanasa en aislados pertenecientes a *Streptomyces*, *Actinomadura sp.* y *Saccharomonospora viridis*. *Streptomyces cyaneus* produjo una alta cantidad de arabinofuranosidasa, mientras que *S. cyaneus*, *S. viridis* y *Pseudonocardia thermophila* alcanzaron altos niveles de acetilesterasa.

Asimismo, Flores *et al.* (1997)⁸¹, llevaron a cabo la producción de xilanasa y β -xilosidasa en una cepa de *Streptomyces sp* utilizando para el crecimiento celular tres tipos de xilano, caña de azúcar y cáscara de limón como fuentes de carbono. A su vez, se caracterizaron las enzimas β -xilosidasa y la endoxilanasa, las cuales

⁸⁰ ZIMMERMANN *et al.* Xylanolytic enzyme activities produced by mesophilic and thermophilic actinomycetes grown on graminaceous xylan and lignocellulose. *En:* FEMS Microbiology Letters. 1988. Vol. 55; 181-186 p.

⁸¹ FLORES *et al.* β -xylosidase and xylanase characterization and production by *Streptomyces sp.* CH-M-1035. *En:* Letters in Applied Microbiology. 1997. Vol. 24; 410-416 p.

presentaron un pH óptimo de 6,0 y 5,0, y una temperatura óptima de 50°C y 60°C, respectivamente. El nivel más alto de la actividad β -xilosidasa fue obtenida cuando *Streptomyces sp.* creció en xilano de pino, mientras que la máxima producción de endoxilanasas fue en cáscara de limón.

Por otro lado, Tuncer et al. (1999)⁸², llevaron a cabo una investigación donde se estudió la producción de enzimas lignolíticas, endo-1,4- β -xilanasas, endo-1,4- β -glucanasas y peroxidasa durante el crecimiento de *Thermomonospora fusca* BD25 en un medio basal salino y extracto de levadura. El efecto de condiciones medioambientales (concentración de oxígeno disuelto, pH y temperatura) fueron también investigados en bio-reactores. La alta actividad enzimática fue generalmente obtenida después de 48-96 horas de incubación a 50°C en un medio basal salino conteniendo xilano y extracto de levadura.

Posteriormente, Tuncer, (2000)⁸³, desarrolló cultivos con la cepa *Thermomonospora fusca* BD25 para producir relativamente altos niveles de endoxilanasas en diferentes tipos de xilano. La actividad relativa de endoxilanasas permaneció entre 68% y 72% a un pH de 8,0, y presentó un rango de actividad entre pHs de 6,5 a 9,5.

Ramírez & Cocha, (2003)⁸⁴, determinaron la actividad de las enzimas endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas de 10 cepas de actinomicetos. Las cepas *Streptomyces sp.* 7CMC10 y 11CMC1 mostraron los mayores valores de actividad específica por proteína con 20,14 UI/mg y 9,55 UI/mg de endoglucanasas, respectivamente. Del mismo modo, se demostró la presencia de la enzima exoglucanasa en la cepa de *Streptomyces sp.* 7CMC10 (2,61 UI/mg).

⁸² TUNCER et al., Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a *Thermomonospora fusca* BD25. En: Enzyme and Microbial Technology. 1999. Vol. 25; 38-47 p.

⁸³TUNCER, M. Characterization of Endoxylanase Activity From *Thermomonospora fusca* BD25. En: Turk J. Biol. 2000. Vol. 24; 737-752 p.

⁸⁴ RAMÍREZ, P. & COCHA, J. M. Enzymatic degradation of cellulose for thermophilic actinomycete: isolation, characterization and cellulolytic determination. En: Rev. Peru. Biol. 2003. Vol.10, No.1; 67-77 p.

En otro trabajo, Piñero & Rivas, (2004)⁸⁵, llevaron a cabo un trabajo donde se aisló un actinomiceto celulolítico, termófilo moderado y acidófilo a partir de estiércol de pollo. Este microorganismo creció en sustratos celulósicos como la carboximetilcelulosa, avicel y polvo de celulosa. El actinomiceto fue identificado como *Nocardia spp.* Los análisis mediante microscopía óptica mostraron la capacidad del micelio para absorberse y crecer sobre las fibras de celulosa de la tira de papel filtro.

Hesham & Sahar, (2007)⁸⁶, realizaron una investigación donde aislaron actinomicetos del suelo y examinaron su actividad celulolítica usando tiras de papel filtro y paja de arroz como sustratos. En este estudio, se identificaron cuatro cepas; *Kibdelosporangium philippinense*, *Micromonospora chalcea*, *Streptomyces roseflavus* y *Nocardiodes fulvus*. Luego estas cepas fueron evaluadas en su capacidad para degradar eficientemente piezas de paja de arroz previamente secas y pesadas. Estas cepas fueron capaces de degradar eficientemente piezas de paja de arroz en condiciones estáticas y de agitación como única fuente de carbono en un medio mínimo, después de 4, 8 y 12 semanas de incubación, causando una pérdida de peso seco significativa entre 50 y 60 % en condiciones de laboratorio.

Song & Wei, (2010)⁸⁷, llevaron a cabo un trabajo utilizando bagazo de caña como fuente de carbono en fermentación en estado líquido para producir enzimas celulasas y xilanasas usando *Cellulosimicrobium cellulans*. La degradación del bagazo indica que la capacidad lignocelulolítica del *C. cellulans* disminuyó un 26% en el contenido de hemicelulosa y 10% en el contenido de celulosa a las 96 horas de fermentación. En este estudio fueron predominantes las xilanasas sobre las celulasas.

⁸⁵ PIÑERO, B. J. & RIVAS, N. Aislamiento y caracterización de una cepa de actinomiceto celulolítico, termófilo moderado y acidófilo. *En*: Revista Científica, FVC-LUZ. 2004. Vol. 15; No. 5; 412-418 p.

⁸⁶ HESHAM M, A. & SAHAR A, E. Op. cit. p. 850-853 .

⁸⁷ SONG, J. M. & WEI, D. Z. Op. cit. p 1930-1934.

Rathnan & Ambili, (2011)⁸⁸, aislaron una cepa de actinomiceto a partir de residuos de frutas identificada como *Streptomyces sp.* Se produjo la enzima celulasa en fermentación en estado sólido usando residuo de frutas como sustrato, observándose una alta producción de celulasas a un pH 5 y a una temperatura de 40°C.

Stalin et. al. (2012)⁸⁹, determinaron la producción de celulasa y xilanasa en una cepa de *Streptomyces clavuligerus* aislada de sedimentos marinos en fermentación de estado sólido, utilizando como medio de cultivo salvado de trigo, harina de soya y avena, incubado a una temperatura de 40°C por 7 días. Presentando una alta actividad enzimática en un rango de pH de 8-9 con un rango de temperaturas de 40 a 55°C.

⁸⁸ RATHNAN, R. K. & AMBILI, M. Cellulase enzyme production by *Streptomyces sp.* using fruit waste as substrate. En: Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 2011. Vol. 5. No. 12. 1114-1118 p.

⁸⁹ STALIN et al. Ecofriendly application of cellulase and xylanase producing marine *Streptomyces clavuligerus* as enhancer in biogas production from waste. En: African Journal of Environmental Science and Technology. 2012. Vol. 6, No. 6; 258-262 p.

3. METODOLOGÍA

La presente investigación se llevó a cabo en el Centro de Innovación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular (CINBIN) sede UIS-Guatiguará.

3.1. TOMA DE MUESTRA

Se colectaron diferentes muestras de suelo, gallinaza, lombrinaza y bovinaza del municipio de Ocaña, Norte de Santander. Se recolectaron mediante el uso de espátulas estériles y bolsas plásticas de cierre hermético. Las muestras fueron preservadas en refrigeración a 4 °C hasta su requerimiento.

3.2. AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE ACTINOMICETOS DEGRADADORES DE LIGNOCELULOSA

Se tomaron 20 gramos de cada muestra, se sometieron a calentamiento húmedo (70 °C) por 15 minutos, para reducir la carga microbiana. Se preparó un homogenizado tomando 10 gramos de la muestra tratada con calor húmedo y 240 ml de agua destilada estéril y se agitó mecánicamente durante 30 minutos. Se realizaron diluciones seriadas del homogenizado de $1/10^2$ a $1/10^8$. A continuación, se llevaron a cabo siembras en superficie de las diluciones $1/10^6$, $1/10^7$, $1/10^8$ en el medio de aislamiento para actinomicetos (Difco), agar lignocelulosa (salvado de trigo como fuente de carbono) (Ver anexo D), colocando 0,1 ml de la dilución en el centro de la caja de petri y extendiéndola con una espátula Driglaski hasta que la muestra se absorbiera completamente en el medio. Finalmente, se incubaron a temperatura ambiente y a 37° C por 7 días, continuando repiques sucesivos con el fin de obtener aislados de actinomicetos.

Las cepas aisladas fueron evaluadas en su capacidad celulolítica de forma cualitativa, según su crecimiento en medio basal salino de Mohagheghi et al. (1986)⁹⁰ a pH 8, con salvado de trigo como única fuente de carbono y medio mineral basal de Crawford (1978)⁹¹ a pH 8, con carboximetilcelulosa (CMC), α -celulosa y papel filtro Whatman No. 1 como fuente de carbono (Ver anexo D), y controles sin inoculación para cada medio, siendo incubadas a temperatura ambiente y a 37°C durante 7 días. Se observó el crecimiento de las cepas de forma cualitativa, así como la temperatura óptima de crecimiento celular.

También se realizaron pruebas cualitativas en fermentación en estado sólido utilizando salvado de trigo como sustrato a 37°C, por 10 días. ...Ver sección 3.6.1....

3.3. IDENTIFICACIÓN DEL ACTINOMICETO DEGRADADOR DE LIGNOCELULOSA

Las 18 cepas aisladas fueron caracterizadas macroscópica y microscópicamente para identificarlas como actinomicetos.

3.3.1. Características macroscópicas. Se observaron las características de crecimiento a nivel macroscópico de las cepas crecidas en agar para actinomicetos. Se tuvo en cuenta: color, forma, borde, aspecto, superficie, pigmento difusible al medio, color del haz y del envés entre otros.

3.3.2. Características microscópicas. Se utilizó la técnica de la laminilla punzando el medio de cultivo, que es un método eficaz para determinar algunas

⁹⁰ MOHAGHEGHI et al., Isolation and characterization of *Acidothermus cellulolyticus* gen. nov., sp. nov., a new genus of thermophilic, acidophilic, cellulolytic bacteria. En: Int. J. Syst. Bacteriol. 1986. Vol. 36; p. 435-443.

⁹¹ CRAWFORD, D. L. Lignocellulose decomposition by selected *Streptomyces* strains. En: Appl. Environ. Microbiol. 1978. Vol. 35; p. 1041-1045.

características morfológicas de los actinomicetos y así permitir su identificación⁹². Las cepas aisladas se sembraron en forma de estrías separadas en agar para actinomicetos y se incubaron a 37°C durante tres días, se incrustó una laminilla estéril en el medio de cultivo de tal forma que atravesara las estrías hechas con el microorganismo, de forma vertical y se llevó a incubar de nuevo durante 3 o 4 días. La colonia aislada comienza a crecer sobre la laminilla después del tiempo de incubación (Ver figura 9). Se realizó tinción Gram y azul de lactofenol. Se tuvo en cuenta el tipo de micelio, vegetativo (fragmentado, no fragmentado) o aéreo (Conidias simples, dobles o en cadenas largas o cortas). Se utilizó la metodología del Manual de determinación bacteriológica de Bergey (1994)⁹³.

La identificación a nivel de género de la cepa de actinomiceto seleccionada como mejor degradadora de lignocelulosa se realizó teniendo en cuenta las características morfológicas y bioquímicas en la colonia.

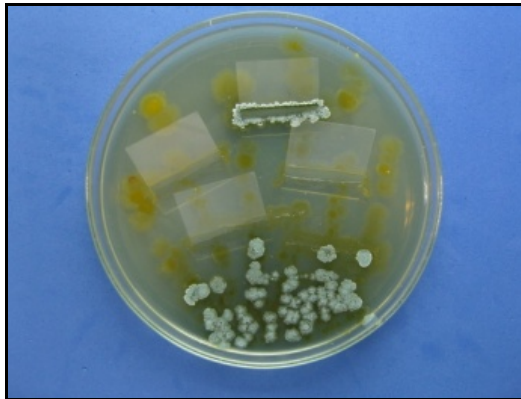
La confirmación final se realizó mediante las pruebas bioquímicas de caseína, tirosina, citrato, almidón, catalasa, malonato, urea, nitrato, gelatina, *m*-inositol, fructosa, trehalosa, glucosa, manosa, maltosa, lactosa, sucrosa, arabinosa, sorbitol, xilosa y salicina.

Una vez aislada e identificada la cepa de actinomicetos seleccionada se realizó siembras de la cepa pura en medios líquidos y sólidos para su conservación en nevera a -70°C.

⁹² HOLT et al. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th Edition. Baltimore, USA: Williams and Wilkens Company, 1994. 608 p.

⁹³ Ibid.

Figura 9. Técnica de la laminilla.



Fuente: Autora del proyecto.

3.4. SUSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS

Se recolectaron muestras de raquis de Palma de Aceite y bagazo de caña de azúcar, procedentes de agroindustrias de la región, y muestras de salvado de trigo de tipo comercial, para los ensayos de fermentación en estado sólido. Estos materiales fueron seleccionados, por disposición en el sector y por su composición elemental.

3.5. PRETRATAMIENTO DE LOS SUSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS

A todos los sustratos lignocelulósicos se les realizó un pretratamiento previo a su utilización en los estudios de fermentación en sustrato sólido para la producción de enzimas (Ver Tabla 2).

Tabla 2. Pretratamiento de los sustratos lignocelulósicos.

Sustrato	Pretratamiento
Salvado de trigo	Tamizado entre mallas 32/16
Bagazo de caña	Cortado, secado al aire, molienda en molino de cuchilla utilizando malla de 2 mm, tamizado entre mallas 32/16 y nuevamente lavado con agua caliente, secado final en estufa a una temperatura de 80°C.
Raquis de Palma de Aceite	

Fuente: Autora del proyecto.

El diámetro de partícula utilizado se encuentra en un rango entre 0,5 (32 mesh) y 1 mm (16 mesh).

3.6. PRUEBAS DE FERMENTACIÓN SOBRE SUSTRATO SÓLIDO (FSS)

Las pruebas de fermentación sobre sustrato sólido se realizaron en frascos de vidrio de 500 ml, cubiertos con algodón y gasa para evitar la contaminación. Se agregaron 6 g de sustrato lignocelulósico (salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma), se agregó medio mineral basal (MBS) a un pH de 7 (Ver anexo E), hasta alcanzar una humedad del 80%, Posteriormente, se esterilizó el medio sólido en autoclave. (Ver Figura 10).

Figura 10. Montaje para las pruebas de fermentación sobre sustrato sólido.



Fuente: Autora de proyecto.

3.6.1. Determinación cualitativa de la actividad celulolítica en fermentación en estado sólido. Para el inóculo se utilizaron las cepas que presentaron capacidad celulolítica en medios líquidos, se sembraron en medio mineral basal, suplementado con extracto de levadura y sacarosa (Ver anexo F), y se hicieron crecer hasta alcanzar una concentración aproximada de 6 a 9×10^8 microorganismos por mL. Este inóculo fue agregado a los biorreactores estériles equivalente a un 10% p/v.

Las pruebas cualitativas de la fermentación en estado sólido se realizaron en biorreactores provistos con salvado de trigo como única fuente de carbono. Los volúmenes de medio mineral basal adicionado al sustrato y del inóculo fueron calculados a fin de alcanzar una humedad final del 80%, contando con un control sin inocular. Los cultivos fueron mantenidos bajo condiciones estáticas e incubados a temperatura ambiente y a 37°C , durante 10 días.

3.6.2. Determinación cuantitativa de la actividad celulolítica y xilanasas en fermentación en estado sólido. Las pruebas cuantitativas se realizaron de la misma forma que en la determinación cualitativa, pero se utilizaron los sustratos lignocelulósicos, salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma, bajo condiciones estáticas e incubados a 37°C, durante 10 días en un baño termostático (Mettler), todos los montajes y mediciones se realizaron por triplicado, junto con un control el cual se llevó a iguales condiciones de fermentación pero sin inóculo inicial. No se mostró el error entre las réplicas porque siempre fueron menor de 3%.

3.6.1.1. Obtención de extractos enzimáticos crudos. Los cultivos fueron extraídos a los 0, 5 y 10 días de incubación de los biorreactores, se sacó el residuo del frasco y se pesó 4 gramos, se maceró en un mortero por 15 min y se adicionó 32 ml de buffer acetato de sodio 0,05 M (pH 4,8). Luego se agitó a 300 rpm por una hora en un agitador orbital (Hanna). Posteriormente, se centrifugó a 5.000 rpm por 60 minutos en una centrifuga de tubos (Kubota 6500). El sobrenadante se filtró a través de papel filtro Whatman No. 1. Estos se conservaron a -20° C hasta su requerimiento.

3.6.1.2. Determinación de azúcares reductores. La determinación de azúcares reductores se realizó a través del método colorimétrico del ácido dinitrosalicílico (DNS) de Miller, (1959)⁹⁴ (ver anexo G), se determinó al extracto enzimático crudo y a cada ensayo enzimático. Este método se seleccionó por ser rápido y reproducible.

La determinación de azúcares reductores se obtuvo a partir de la recta obtenida al realizar la curva de calibración (Ver anexos H y I) que correlaciona la absorbancia medida a 540 nm con la concentración de glucosa y xilosa.

⁹⁴ MILLER, G. Use of Dinitrosalicylic acid Reagent For Determination of Reducing Sugars. *En: Analytical Chemistry*. 1959. Vol. 31; 426-429 p.

3.6.1.3. Determinación de proteína extracelular. La determinación de las proteínas secretadas por los microorganismos y que se encuentran en el extracto enzimático se realizó mediante el método colorimétrico de Bradford (1976)⁹⁵ (ver anexo J). Este método se utilizó por ser rápido, reproducible y sensible para cuantificar proteínas, sin presentar interferencias por la presencia de aminoácidos y carbohidratos en el medio de cultivo.

La concentración de proteína se obtuvo a partir de la ecuación de la recta obtenida al realizar la curva de calibración (Ver anexo K) que correlaciona la concentración de Albúmina de Suero Bovino (BSA) con la absorbancia a 595 nm.

3.6.1.4. Determinación de la actividad enzimática de Endo- β -1,4-Glucanasa (EC 3.2.1.4). La actividad de la enzima se determinó de acuerdo con Stutzenberger (1972)⁹⁶. La determinación de la actividad se realizó utilizando 960 μ l de solución compuesta por CMC al 1% (p/v) en buffer acetato de sodio 0,05 M (pH 4,8) como sustrato. A esta solución se le adicionó 40 μ l extracto enzimático y la actividad fue seguida espectrofotométricamente durante 30 minutos a 50°C por el aumento de la absorbancia a 540 nm. Se midió la liberación de azúcares reductores por el método ácido dinitrosalicílico de Miller (1959)⁹⁷. La actividad fue expresada en unidades internacionales (U), considerando como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de glucosa por minuto (ver anexo L.1.).

⁹⁵ BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. En: Anal. Biochem. 1976. Vol. 72; 248-254 p.

⁹⁶ STUTZENBERGER, F. J. Cellulolytic activity of *Thermomonospora curvata*: Nutritional requirements for cellulase production. En: Applied Microbiology. 1972. Vol. 24, No. 1; 77-82 p.

⁹⁷ MILLER, G. Op. cit.

3.6.1.5. Determinación de la actividad enzimática de Exo- β -1,4-Glucanasa (EC 3.2.1.91). La actividad exoglucanasa se determinó según Stutzenberger (1972)⁹⁸ y Ceroni y Gutiérrez-Correa (1988)⁹⁹. El ensayo consistió en colocar en un tubo de ensayo 50 mg de papel filtro Whatman No. 1, con 960 μ l de buffer acetato de sodio 0,05 M (pH 4,8), y se le añadió 40 μ l de extracto enzimático. La actividad fue seguida durante 60 minutos a 50°C, se determinó la liberación de azúcares reductores por el método de Miller (1959)¹⁰⁰. La actividad fue expresada en unidades internacionales (U), considerando como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de glucosa por minuto (ver anexo L.1.).

3.6.1.6. Determinación de la actividad enzimática de β -Glucosidasa (EC 3.2.1.21). La actividad glucosidasa se determinó según Bernier & Stutzenberger (1989)¹⁰¹. Para la determinación de la actividad se utilizó 910 μ l de salicina 10 mM en buffer acetato de sodio 0,05 M (pH 4,8) como sustrato y 90 μ l de extracto enzimático; la actividad fue seguida por 30 minutos a 50°C, mediante la determinación de azúcares reductores. La actividad fue expresada en unidades internacionales (U), considerando como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de glucosa por minuto (ver anexo L.1.).

3.6.1.7. Determinación de la actividad enzimática de Endo- β -1,4-Xilanasas (EC 3.2.1.8). La actividad xilanasas fue determinada según Berrocal et al. (1997)¹⁰². Se mezcló 990 μ l de solución xilano al 1% (p/v) en buffer acetato de sodio 0,05 M (pH 4,8) y 10 μ l de extracto enzimático, la actividad fue seguida por 30 minutos a 50°C. La unidad de xilanasas (U) se define como la cantidad de enzima que

⁹⁸ STUTZENBERGER, F. J. Op. cit.

⁹⁹ CERONI, A. & GUTIERREZ-CORREA, M. Producción de celulasas por hongos: estudios cinéticos en hongos silvestres. En: Boletín de Lima. 1988. Vol. 55; 13-20 p.

¹⁰⁰ MILLER, G. Op. cit.

¹⁰¹ BERNIER, R. & STUTZENBERGER, F. Stabilization of *Thermomonospora curvata* b-glucosidase by a low molecular weight intracellular factor. En: Lett. Appl. Microbiol. 1989. Vol. 8; 9-13 p.

¹⁰² BERROCAL et. al. Solubilisation and mineralisation of [14C]lignocellulose from wheat straw by *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 during growth in solid-state fermentation. En: Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997. Vol. 48; 379-384 p.

produce carbohidratos reductores con un poder reductor correspondiente a 1 micromol de xilosa de xilano por minuto (ver anexo L.2.).

Para el cálculo de actividad enzimática se restó los valores obtenidos del blanco, ya que el extracto enzimático puede contener azúcares. Para cada enzima se realizaron los respectivos cálculos, actividad enzimática (U/ml), actividad específica (AE) (U/g), actividad específica (U/mg de proteína), productividad específica (q_p) (U/g.día) y rendimiento de formación de proteína por sustrato ($Y_{p/s}$) (mg/g), los cuales fueron calculados de acuerdo con las ecuaciones mostradas en el anexo M.

3.6.1.8. Porcentaje de Humedad. Se pesó entre 1 g de sustrato en una caja de petri seca y previamente tarada. Se secó en estufa a 105°C por 12 horas. Una vez fría se pesó y se determinó el porcentaje de humedad (Ver anexo N).

3.6.1.9. pH. Se determinó con un pHmetro de mesa (Hanna). Se tomó 1 g de muestra y añadió 10 ml de agua destilada, agitamos durante 1 hora en agitador magnético y se midió el pH, con el equipo previamente calibrado con las soluciones buffer.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE ACTINOMICETOS DEGRADADORES DE LIGNOCELULOSA

Se realizó aislamiento de 5 muestras (dos de suelo, y de abono como gallinaza, lombrinaza y bovinaza) del municipio de Ocaña, Norte de Santander. Se aislaron 15 cepas de las muestras de abono y 3 cepas de muestras de suelo. Las colonias presuntivas de actinomicetos fueron identificadas teniendo en cuenta las características microscópicas y macroscópicas que los diferencia de las bacterias no filamentosas y los hongos.

Las 18 cepas aisladas fueron evaluadas en su capacidad celulolítica de forma cualitativa, según su crecimiento en medio basal salino de Mohagheghi et al. (1986)¹⁰³ a pH 8, con salvado de trigo como única fuente de carbono, a temperatura ambiente y a 37°C, usando un Medio mineral basal de Crawford (1978)¹⁰⁴ a pH 8, con Carboximetilcelulosa (CMC) y α -celulosa y papel filtro Whatman No. 1 como fuente de carbono a 37°C. Los resultados del crecimiento se presentan en la tabla 3.

Se observó que en medio basal salino con salvado de trigo a temperatura ambiente, 15 cepas no lograron crecimiento y solo 2 cepas lograron un buen crecimiento, mientras que a 37°C, en 11 cepas no se observó crecimiento y 7 cepas presentaron un muy buen crecimiento.

Las cepas que lograron un buen crecimiento en medio líquido (Medio basal salino, Mohagheghi et al. (1986)) con salvado de trigo como fuente de carbono fueron AA8, A03, AO6, AO12, TC1, TC2, LO4.

¹⁰³ MOHAGHEGHI et al. Op. cit.

¹⁰⁴ CRAWFORD, D. L. Op. cit.

Tabla 3. Capacidad celulolítica cualitativa de las cepas aisladas en medio basal salino de Mohagheghi et al. (1986) a pH 8, con salvado de trigo como única fuente de carbono y medio mineral basal de Crawford (1978) a pH 8, con CMC, α -celulosa y papel filtro Whatman No. 1 como fuente de carbono.

CEPAS	MEDIOS de CULTIVO				
	Medio basal salino (Mohagheghi et al., 1986) Salvado de trigo (pH 8)		Medio Mineral Basal (Crawford, 1978)		
	Temperatura ambiente	37 °C	Papel (pH 8)	α -celulosa (pH 8)	CMC (pH 8)
			37°C	37°C	37°C
AA1	R	N.O.	R	R	B
AA4	N.O.	N.O.	R	N.O.	B
AA8	N.O.	MB	R	N.O.	MB
AO1	N.O.	N.O.	R	B	MB
AO2	N.O.	N.O.	MB	B	MB
AO3	N.O.	MB	R	MB	MB
AO4	B	N.O.	MB	R	MB
AO6	N.O.	MB	R	R	B
AO8	N.O.	N.O.	R	R	B
AO10	N.O.	N.O.	R	N.O.	MB
AO12	B	MB	MB	B	MB
AO13	N.O.	N.O.	B	R	MB
TC1	N.O.	MB	MB	MB	MB
TC2	N.O.	MB	R	N.O.	B
TC3	N.O.	N.O.	E	N.O.	E
LO3	N.O.	N.O.	MB	MB	R
LO4	N.O.	MB	R	N.O.	MB
LO5	N.O.	N.O.	MB	B	E

MB: Muy buena; B: Buena; R: Regular, E: Escasa, N.O.: No observable.

Fuente: Autora del proyecto.

En medio mineral basal con papel Whatman No.1, todas las cepas lograron crecimiento, con 6 cepas presentando un muy buen crecimiento. En α -celulosa como fuente de carbono, en solo en 3 cepas se observó un muy buen crecimiento. Y en CMC como fuente de carbono, todas las cepas lograron crecer en el medio, y 10 cepas presentaron un muy buen crecimiento.

Las cepas presentaron un mejor crecimiento en presencia de CMC como fuente de carbono, ya que es un derivado soluble de celulosa y es más fácil para los microorganismos metabolizarlo. Con papel Whatman No.1 como se sustrato, se logró ver crecimiento microbiano, el cual mejor que α -celulosa, ya que este tipo de sustato presenta una forma más cristalina de celulosa, y por consiguiente, más difícil de utilizar para los microorganismos.

4.2. IDENTIFICACIÓN DE ACTINOMICETOS DEGRADADORES DE LIGNOCELULOSA

La caracterización macroscópica de los 18 aislados se realizó teniendo en cuenta color, forma, borde, aspecto, superficie de las colonias, pigmento difusible al medio, color del haz y del envés, entre otros. Unas colonias presentaron un olor a suelo húmedo, característica representativa de este grupo microbiano por la capacidad de producción de geosmina; estas características fueron determinantes para su identificación como cepas de actinomicetos¹⁰⁵.

Para la caracterización microscópica se tuvo en cuenta el tipo de micelio, vegetativo (fragmentado, no fragmentado) o aéreo (conidias simples, dobles o en cadenas largas o cortas). Los actinomicetos aislados presentaron filamentos delgados, ramificados, algunos largos y otros cortos que se fragmentaban en unidades más pequeñas.

¹⁰⁵ FRANCO C, M. Op. cit. 96 p.

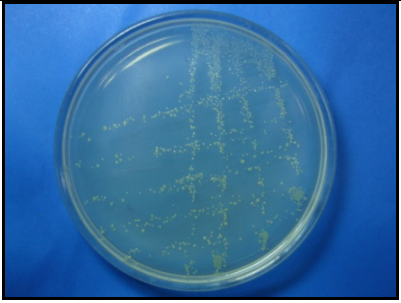
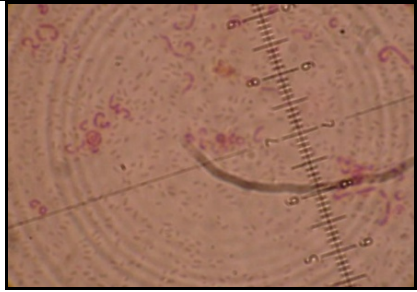
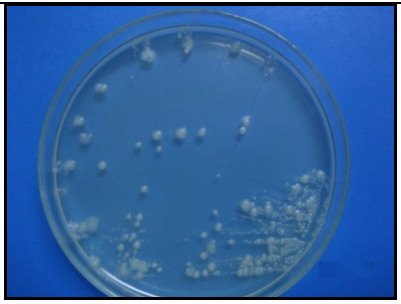
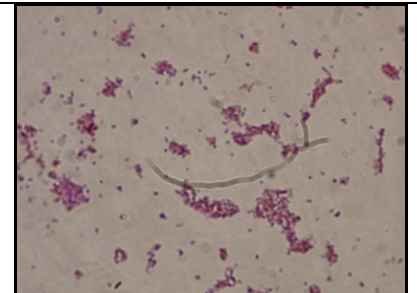
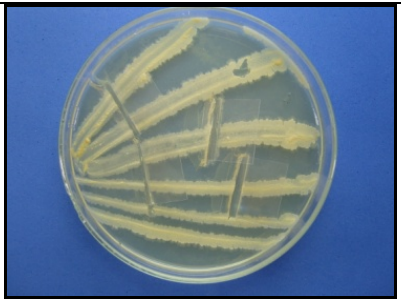
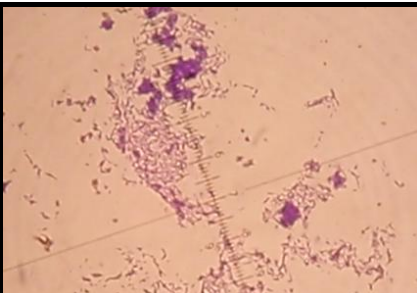
A continuación se presenta en la tabla 4, las 18 cepas de actinomicetos con su descripción de las características macroscópicas crecidas en medio agar para actinomicetos y las características microscópicas en tinción de Gram.


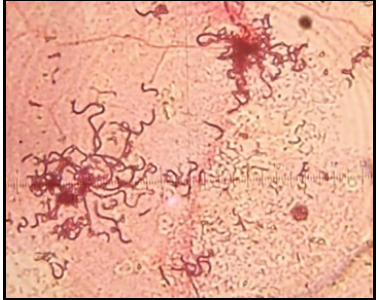


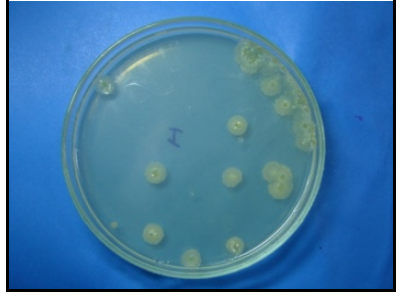
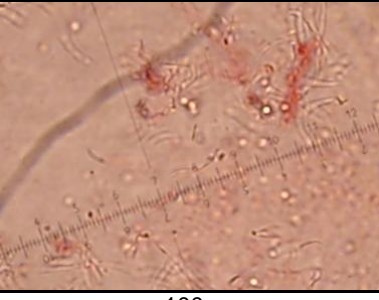
Las características macroscópicas y microscópicas de los actinomicetos descritas en la tabla 4 fueron comparadas con las características descritas por el Manual de determinación bacteriológica de Bergey (1994)¹⁰⁶ para comprobar que las cepas fueran actinomicetos.




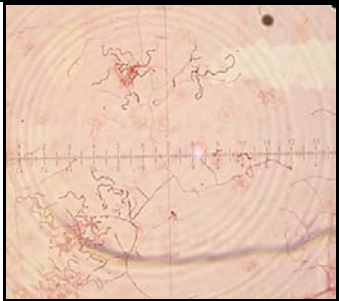
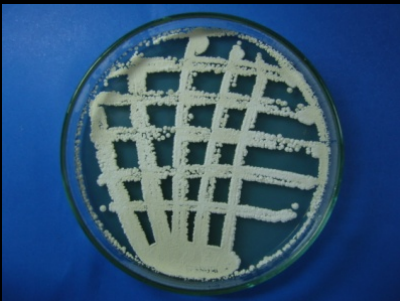
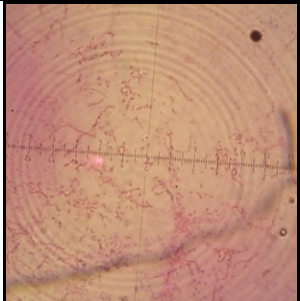
4.2.1. Determinación cualitativa de la actividad celulolítica en fermentación en estado sólido. En la tabla 5 se presentan las actividades cualitativas en fermentación en estado sólido con salvado de trigo como fuente de carbono de las 18 cepas de actinomicetos.


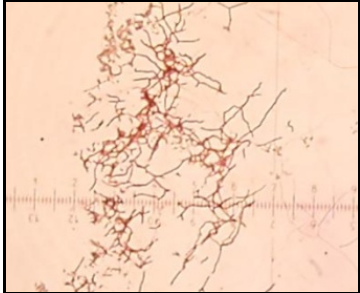

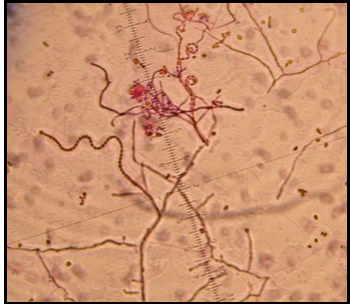
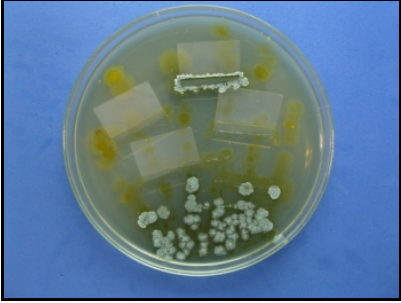
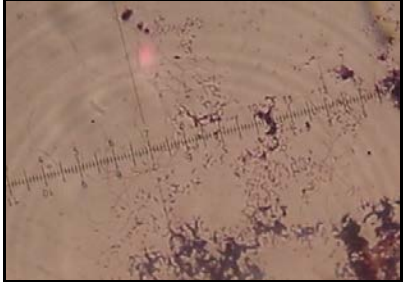
¹⁰⁶ HOLT et al., Op. cit.

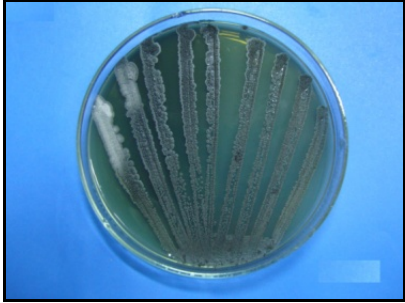
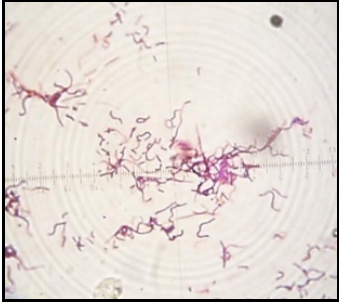

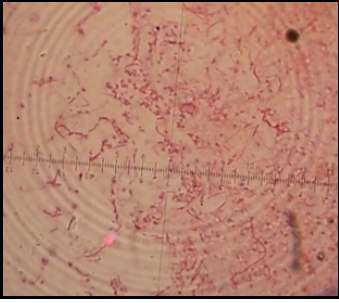

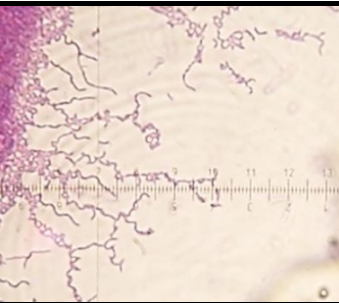
Tabla 4. Descripción de las características macroscópicas y microscópicas de las cepas de actinomicetos degradadores de lignocelulosa


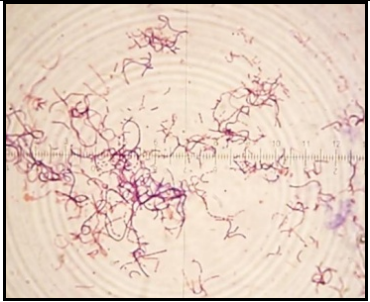

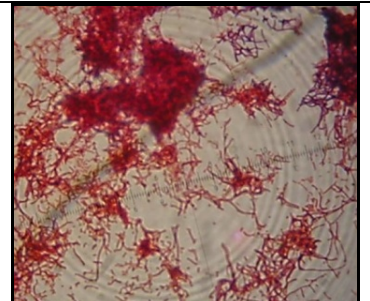
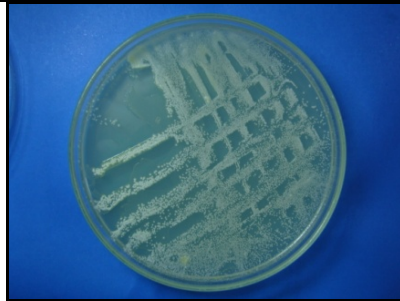
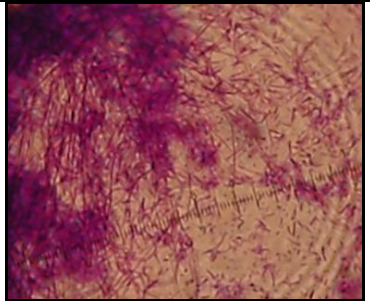
CEPA	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS
<p>Actinomiceto AA1</p>	<p>Colonia de superficie lisa, consistencia blanda, aspecto brillante, forma elevada convexa, borde regular, color amarillo, reverso de la colonia color amarillo.</p> 	<p>Cadenas cortas de conidios con terminación en curvas, pocos filamentos. Gram variable.</p>  <p>100x</p>
<p>Actinomiceto AA4</p>	<p>Colonia de superficie lisa, consistencia dura, aspecto opaca, forma elevada convexa, borde irregular, color blanco, reverso de la colonia color blanco.</p> 	<p>Conidios sencillos, pocos filamentos. Gram positiva.</p>  <p>100x</p>
<p>Actinomiceto AA8</p>	<p>Colonia de superficie rugosa, consistencia blanda, aspecto opaca, forma plana, borde irregular filamentososo, color amarillo, reverso de la colonia color amarillo.</p> 	<p>Cadenas cortas de conidios, pocos filamentos. Gram positiva.</p>  <p>40x</p>

<p>Actinomiceto AO1</p>	<p>Colonia de superficie rugosa, consistencia dura, de apariencia pulverulenta, aspecto opaca, forma elevada convexa, borde irregular filamentoso, color blanco, reverso de la colonia color amarillo, presenta un olor a suelo húmedo.</p> 	<p>Micelio vegetativo no fragmentado, micelio aéreo fragmentado presentando cadenas de conidios en espiral. Gram positiva.</p>  <p>100x</p>
<p>Actinomiceto AO2</p>	<p>Colonia des superficie lisa, consistencia dura, aspecto opaca, forma plana, borde regular, color amarillo, reverso de la colonia de color amarillo.</p> 	<p>Cadena corta de conidios, pocos filamentos. Gram variable.</p>  <p>100x</p>
<p>Actinomiceto AO3</p>	<p>Colonia de superficie rugosa, consistencia dura, apariencia pulverulenta, aspecto opaco, forma elevada mamelonada, borde irregular filamentoso, color amarillo que al pasar el tiempo se torna blanca, reverso de la colonia de color amarillo, presenta un olor a suelo húmedo.</p> 	<p>Cadenas cortas de conidios, pocos filamentos. Gram variable.</p>  <p>100x</p>
<p>Actinomiceto AO4</p>	<p>Colonia de superficie rugosa, consistencia dura, apariencia pulverulenta, aspecto opaca, forma</p>	<p>Micelio vegetativo no fragmentado, micelio aéreo fragmentado con formaciones de conidios en espiral.</p>

	elevada papilar, borde irregular filamentoso, color blanco, reverso de la colonia de color amarillo, presenta un olor a suelo húmedo.	Gram variable.
		 100x
Actinomiceto AO6	Colonia de superficie rugosa, consistencia dura, apariencia pulverulenta, aspecto opaca, forma elevada convexa, borde irregular filamentoso, color naranja blancuzco, reverso de la colonia de color naranja, presenta un olor a suelo húmedo.	Micelio vegetativo no fragmentado, micelio aéreo fragmentado con formaciones de conidios en espiral. Gram positiva.
		 100x
Actinomiceto AO8	Colonia de superficie rugosa, consistencia dura, apariencia pulverulenta, aspecto opaca, forma elevada convexa, borde regular, color blanca, reverso de la colonia de color amarillo, presenta un olor a suelo húmedo.	Micelio vegetativo no fragmentado, micelio aéreo fragmentado con formaciones de conidios cortas con terminaciones curvas. Gram positiva.
		 100x
Actinomiceto AO10	Colonia de superficie rugosa, consistencia dura, apariencia pulverulenta, aspecto opaca, forma plana, borde irregular filamentoso, color crema que al pasar el tiempo se	Micelio fragmentado, con cadenas de conidios cortas. Gram variable.

	torna blanca, reverso de la colonia de color amarillo.	
		 40x
Actinomiceto AO12	Colonia de superficie rugosa, consistencia dura, apariencia pulverulenta, aspecto opaca, forma elevada papilar, borde irregular festoneado, color amarillo que al pasar el tiempo se torna blanca, reverso de la colonia de color café claro, presenta un olor a suelo húmedo.	Micelio vegetativo no fragmentado, micelio aéreo fragmentado, con formaciones de espirales y tortuosa. Gram positiva.
		 100x
Actinomiceto AO13	Colonia de superficie rugosa, consistencias dura, apariencia pulverulenta, aspecto opaca, forma elevada mamelonada, borde irregular filamentososa, color naranja que al pasar el tiempo se torna gris verdoso, reverso de la colonia de color verde azulado, presenta un olor a suelo húmedo y pigmento difusible al medio.	Micelio vegetativo no fragmentado, micelio aéreo fragmentado, Gram positiva.
		 100x
Actinomiceto TC1	Colonia de superficie rugosa, consistencia dura, apariencia pulverulenta, aspecto opaca, forma	Micelio vegetativo no fragmentado, micelio aéreo fragmentado, con cadenas de conidios curvas y en

	elevada mamelonada, borde irregular filamentoso, color gris que al pasar el tiempo se torna blanco, reverso de la colonia de color negro, presenta un olor a suelo húmedo y pigmento difusible al medio.	espirales. Gram positiva.
		 100x
Actinomiceto TC2	Colonia de superficie rugosa, consistencias blanda, aspecto opaca, forma plana, borde regular, color blanco amarillento, reverso de la colonia de color amarillo.	Poco micelio fragmentado, cadenas cortas de conidios. Gram variable.
		 100x
Actinomiceto TC3	Colonia de superficie rugosa, consistencia blanda, aspecto opaca, forma elevada convexa, borde irregular filamentosa, color amarillo crema, reverso de la colonia de color amarillo.	Micelio vegetativo no fragmentado, micelio aéreo fragmentado, con formación de conidios en espiral y tortuoso. Gram positiva.
		 100x
Actinomiceto LO3	Colonia de superficie lisa, consistencia dura, apariencia pulverulenta, aspecto opaca, forma elevada convexa, regular, color beige que al pasar el tiempo se torna gris blancuzco, reverso de la colonia de	Micelio vegetativo no fragmentado, micelio aéreo fragmentado, con formaciones de conidios en espiral. Gram positiva.

	<p>color negro, presenta un olor a suelo húmedo y pigmento difusible al medio.</p> 	 <p>100x</p>
Actinomiceto LO4	<p>Colonia de superficie lisa, consistencia dura, apariencia pulverulenta, aspecto opaca, forma plana, borde irregular filamentososa, color blanco amarillento que al pasar el tiempo se torna blanco, reverso de la colonia de color amarillo.</p> 	<p>Micelio muy fragmentado, cadenas cortas de conidios. Gram variable.</p>  <p>100x</p>
Actinomiceto LO5	<p>Colonia de superficie lisa, consistencia blanda, aspecto opaca, forma plana, borde regular, color blanco, reverso de la colonia de color amarillo.</p> 	<p>Micelio muy fragmentado, cadenas corta de conidios. Gram positiva.</p>  <p>100x</p>

Fuente: Autora del proyecto.

Tabla 5. Actividades celulolíticas cualitativa en fermentación en estado sólido de los actinomicetos degradadores de lignocelulosa.

CEPAS	MEDIO DE CULTIVO
	Medio basal salino (MBS) (Mohagheghi et al., 1986)
	Salvado de trigo (pH 7) a 37°C
Actinomiceto AA1	B
Actinomiceto AA4	N.O.
Actinomiceto AA8	R
Actinomiceto A01	R
Actinomiceto A02	N.O.
Actinomiceto A03	R
Actinomiceto A04	N.O.
Actinomiceto A06	R
Actinomiceto A08	R
Actinomiceto A010	N.O.
Actinomiceto A012	B
Actinomiceto A013	R
Actinomiceto TC1	B
Actinomiceto TC2	R
Actinomiceto TC3	R
Actinomiceto LO3	B
Actinomiceto LO4	B
Actinomiceto LO5	B

Fuente: Autora del proyecto.

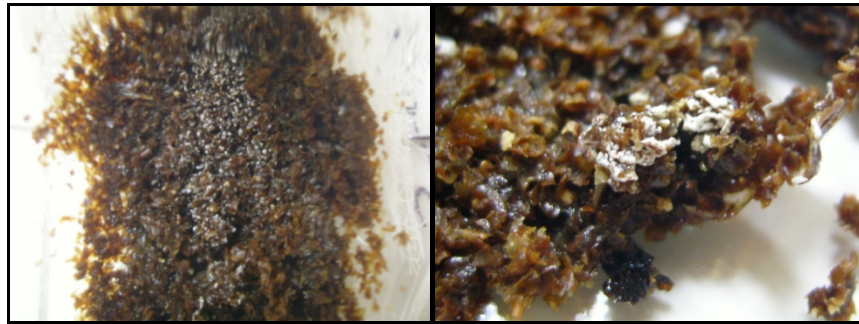
MB: Muy buena; B: Buena; R: Regular, E: Escasa, N.O.: No observable.

De las 18 cepas analizadas, 14 cepas de actinomicetos lograron crecer por fermentación en estado sólido, 8 presentaron un crecimiento regular y 6 cepas, AA1, AO12, TC1, LO3, LO4, LO5, lograron un buen crecimiento.

Para las pruebas cuantitativas de fermentación en estado sólido, se seleccionó la cepa AO12, ya que presentó un buen crecimiento en la fermentación en estado

sólido (Ver figura 11). Esta cepa presentó un muy buen crecimiento en el medio basal salino con salvado de trigo como fuente de carbono y en el medio mineral basal con papel Whatman No. 1 y CMC como fuente de carbono.

Figura 11. Crecimiento de *Streptomyces sp.* AO12 en fermentación en estado sólido.



Fuente: Autora del proyecto.

La cepa seleccionada AO12 fue identificada a nivel de género como *Streptomyces sp.*, para su identificación se evaluó su comportamiento metabólico mediante la valoración por pruebas bioquímicas (anexo O). La identificación de la cepa se realizó de acuerdo con el Manual de Sistemática Bacteriológica de Bergey¹⁰⁷ teniendo en cuenta las pruebas bioquímicas y las características macroscópicas y microscópicas del microorganismo.

El género *Streptomyces*, es catalasa positiva, presenta movilidad positiva, es Gram positiva, presenta características como la fragmentación del micelio aéreo y la formación de cadenas de conidias en forma de cocos o bacilos en disposición de espiral.

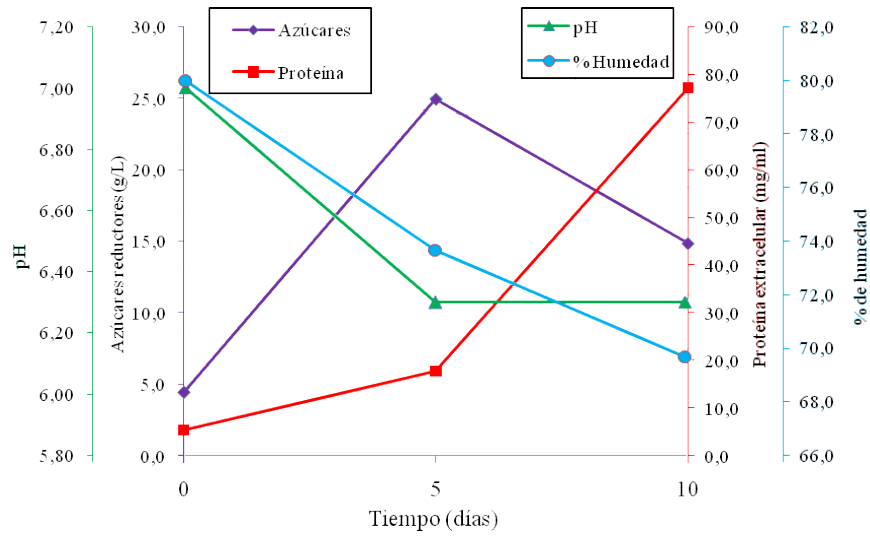
¹⁰⁷ HOLT et al. 1989. Bergey's Manual of Systematic Bacterology. Vol. 4. Baltimore, USA: William & Wilkins, 1989.

4.3. PRUEBAS DE FERMENTACIÓN SOBRE SUSTRATO SÓLIDO (FSS)

4.3.1. Determinación cuantitativa de la actividad celulolítica y xilanasa en fermentación en estado sólido. Se determinó la actividad enzimática de Endo- β -1,4-Glucanasa, Exo- β -1,4-Glucanasa, β -Glucosidasa y Endo- β -1,4-Xilanasa en fermentación en estado sólido durante un tiempo de 10 días, utilizando como sustrato salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma, a la cepa de actinomicetos *Streptomyces sp.* AO12. El medio de cultivo y las condiciones iniciales del proceso fermentativo se encuentran en el anexo E.

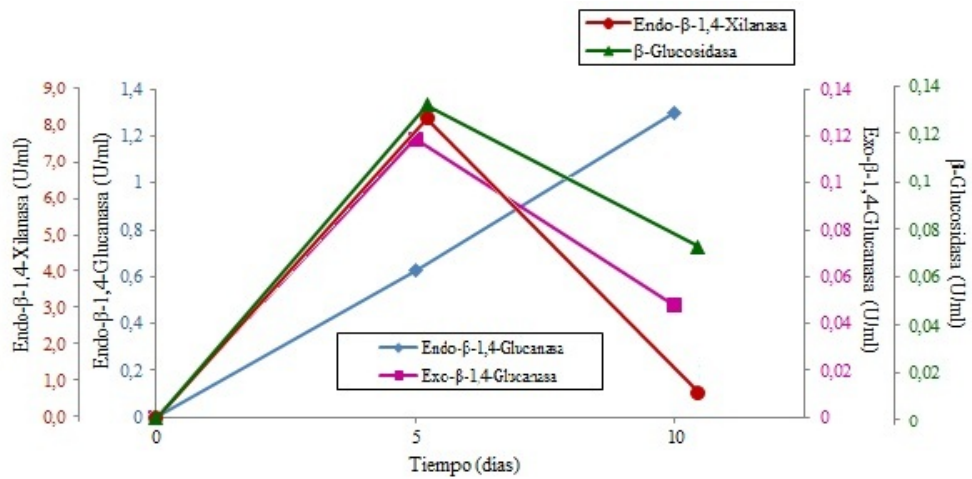
4.3.1.1. Fermentación utilizando como sustrato salvado de trigo. En las Figuras 12 y 13 se muestran los azúcares reductores, proteína extracelular, pH, porcentaje de humedad y las actividades enzimáticas de Endo- β -1,4-Glucanasa, Exo- β -1,4-Glucanasa, β -Glucosidasa y Endo- β -1,4-Xilanasa para *Streptomyces sp.* AO12, durante un tiempo de 10 días empleando como sustrato salvado de trigo. En el anexo P se presentan las tablas de valores de las figuras anteriormente mencionadas.

Figura 12. Cinética de Fermentación de *Streptomyces sp.* AO12 empleando como sustrato salvado de trigo, a 37°C y pH 7.



Fuente: Autora del proyecto.

Figura 13. Cinética de Biosíntesis de Endo- β -1,4-Glucanasa, Exo- β -1,4-Glucanasa, β -Glucosidasa y Endo- β -1,4-Xilanasa por *Streptomyces sp.* AO12 empleando como sustrato salvado de trigo, a 37°C y pH 7.



Fuente: Autora del proyecto.

En la Figura 12, se observa que la proteína extracelular aumenta durante 10 días de fermentación alcanzando un valor de 77,3 (mg/ml). Los azúcares reductores presentan un máximo de 24,9 (g/L) a los 5 días, y hay una reducción a los 10 días de fermentación, sugiriendo que los microorganismos consumieron el azúcar libre contenido en el sustrato durante la primera fase de crecimiento. Se muestran también las variaciones de pH durante el cultivo, el cual se redujo durante los 10 días de fermentación presentándose un mínimo de 6,3 debido a la posible liberación de ácidos orgánicos durante el crecimiento del microorganismo. El porcentaje de humedad se redujo hasta un valor de 69,7%, probablemente debido a la evaporación del agua contenida en el medio durante la incubación.

En la Figura 13 se puede observar que la actividad de la enzima endoglucanasa excretada por *Streptomyces sp.* AO12 aumentó durante los 10 días de cultivo, presentando un valor máximo de 1,3 (U/ml). Por otro lado, las enzimas exoglucanasa, β -glucosidasa y endoxilanasas, presentaron un máximo a los 5 días de fermentación, alcanzando valores de 0,1 (U/ml), 0,1 (U/ml) y 7,9 (U/ml), respectivamente, para luego disminuir su actividad drásticamente. De las cuatro enzimas, la que presentó mayor actividad fue la endoxilanasas, mientras que las enzimas que presentaron la más baja actividad fueron la exoglucanasa y β -glucosidasa. Esta alta producción de endoxilanasas en salvado de trigo puede ser debido a los bajos contenidos de lignina y sílice que presenta este sustrato sólido, el cual ha sido reportado como un sustrato adecuado para la producción de xilanasas y para los microorganismos usados en este estudio^{108, 109}.

El comportamiento de los azúcares reductores concordaron con las actividades expresadas de exoglucanasa, β -glucosidasa y endoxilanasas, las cuales presentaron un máximo a los 5 días de fermentación, con una disminución a los

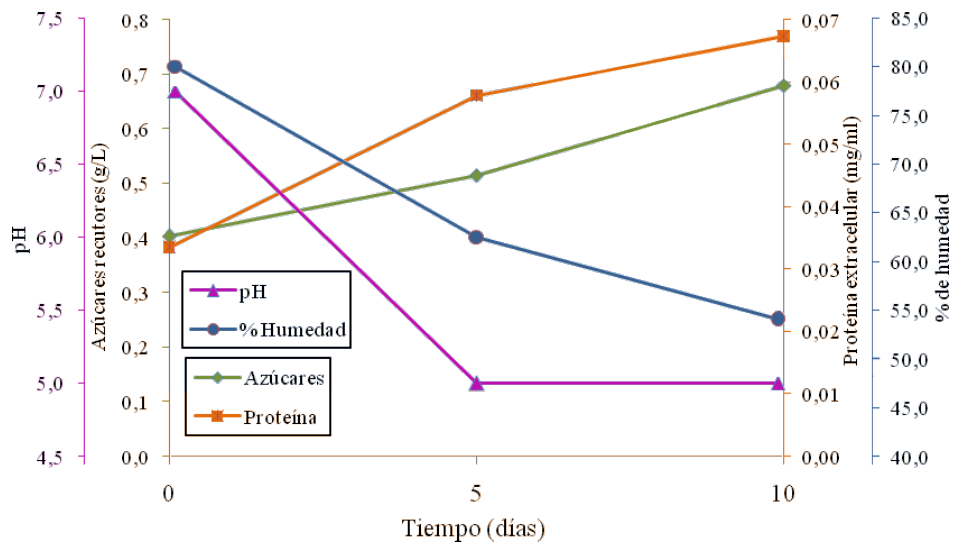
¹⁰⁸ GUPTA, U & KAR, R. Optimization and scale up of cellulase free endo xylanase production by solid state fermentation on corn cob and by immobilized cells of a thermotolerant bacterial isolate. En: Jordan Journal of Biological Sciences. 2008. Vol. 1, No. 3; 131 p.

¹⁰⁹ KUMAR et. al. 2012. Op. cit., p. 172.

10 días, los cual podría deberse a una reducción de humedad en el medio sólido o por la caída del pH.

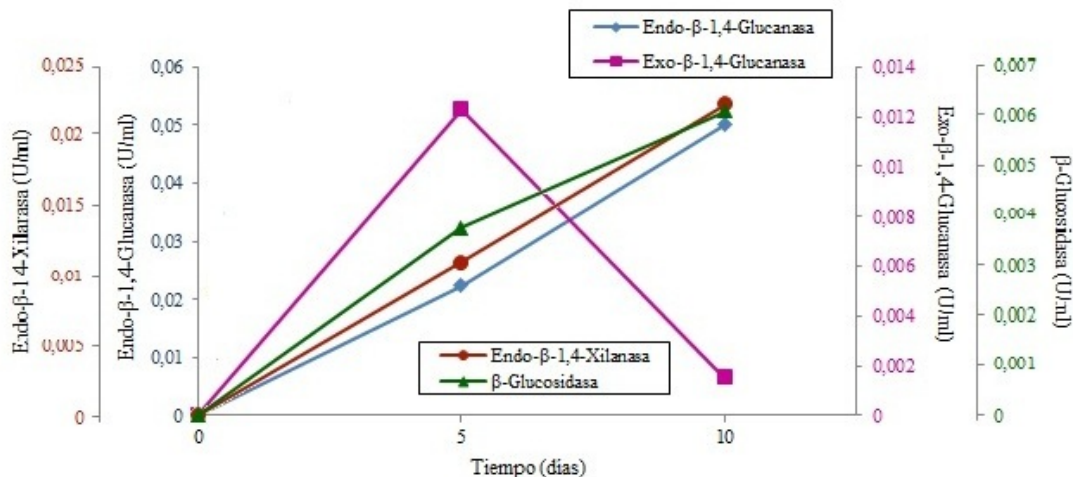
4.3.1.2. Fermentación utilizando como sustrato bagazo de caña. Las figuras 14 y 15 muestran el comportamiento de *Streptomyces sp.* AO12 para un periodo fermentativo de 10 días utilizando bagazo de caña como sustrato lignocelulósico. En el anexo Q, se presentan las tablas de valores de las figuras antes mencionadas.

Figura 14. Cinética de Fermentación en Sustrato sólido de *Streptomyces sp.* AO12 empleando como sustrato bagazo de caña, a 37°C y pH 7.



Fuente: Autora del proyecto.

Figura 15. Cinética de Biosíntesis de Endo- β -1,4-Glucanasa, Exo- β -1,4-Glucanasa, β -Glucosidasa y Endo- β -1,4-Xilanasa para *Streptomyces* sp. AO12 empleando como sustrato bagazo de caña, a 37°C y pH 7.



Fuente: Autora del proyecto.

En la figura 14 se observa un aumento de azúcares reductores durante los 10 días de fermentación presentando un valor máximo de 0,7 (g/L). La proteína extracelular también presenta un aumento durante los 10 días de fermentación, y presenta un valor máximo de 0,07 (mg/ml). El pH baja a 5 a los 5 días de fermentación, manteniéndose igual a los 10 días. Esto se debe posiblemente a la producción de ácidos orgánicos durante la fermentación. El porcentaje de humedad baja hasta 54,1%, posiblemente como consecuencia de la evaporación del agua durante la fermentación.

En la figura 15, se presenta un aumento de actividad enzimática de exoglucanasa presenta durante los 5 primeros días de fermentación, alcanzando un valor máximo de 0,01 (U/ml). Los valores de actividad enzimática de endoglucanasa, β -glucosidasa y endoxilanasa aumentaron durante los 10 días de

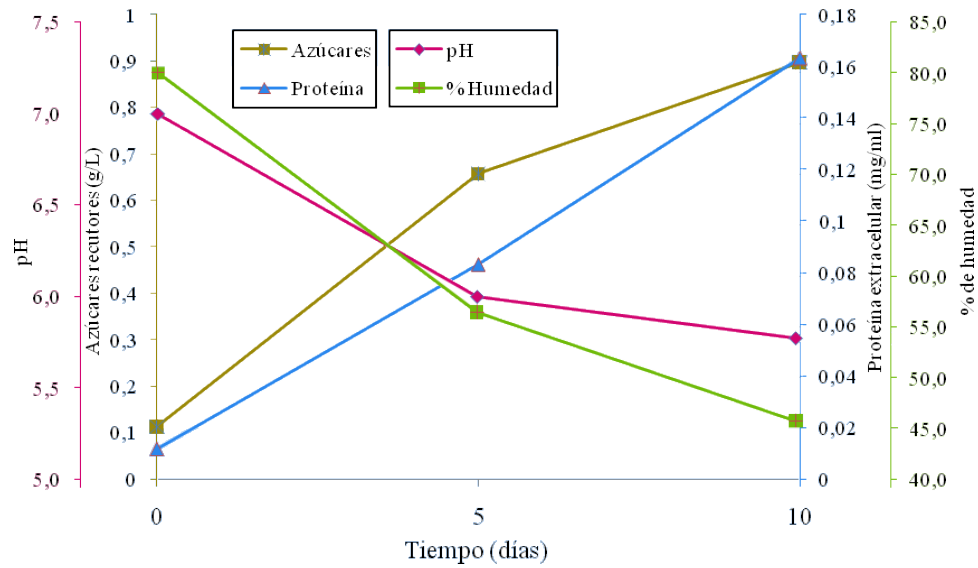
fermentación, presentando valores máximos de 0,05 (U/ml), 0,006 (U/ml) y 0,02 (U/ml), respectivamente. Las actividad de las enzimas endoglucanasa, β -glucosidasa y endoxilanasas concuerdan con los valores de azúcares reductores y proteína extracelular que aumentan durante los 10 días de fermentación, mientras que las actividades enzimáticas no se vieron afectadas por la reducción de pH, ni de humedad. La enzima endoglucanasa es la que presentó mayor actividad y la enzima β -glucosidasa es la que presentó menor actividad enzimática. Una posible razón de las bajas actividades enzimáticas presentadas en el bagazo de caña se deba a que es un residuo con una alta porosidad, lo que provoca que haya muy poca agua disponible para el microorganismo¹¹⁰. Además, es un residuo que posee un porcentaje más alto de lignina, lo cual hace más difícil su potencial de biodegradación¹¹¹.

4.3.1.3. Fermentación utilizando como sustrato raquis de palma. En las figuras 16 y 17, se muestran los azúcares reductores, proteína extracelular, pH, porcentaje de humedad y las actividades enzimáticas de Endo- β -1,4-Glucanasa, Exo- β -1,4-Glucanasa, β -Glucosidasa y Endo- β -1,4-Xilanasas para *Streptomyces sp.* AO12, durante un tiempo de 10 días empleando como sustrato raquis de palma. Y en el anexo R se presentan las tablas de valores de las figuras anteriormente mencionadas.

¹¹⁰ GAITAN B, D. M. & PEREZ P, L. T. Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Bogotá, 2007, 114 p. Trabajo de grado (Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias.

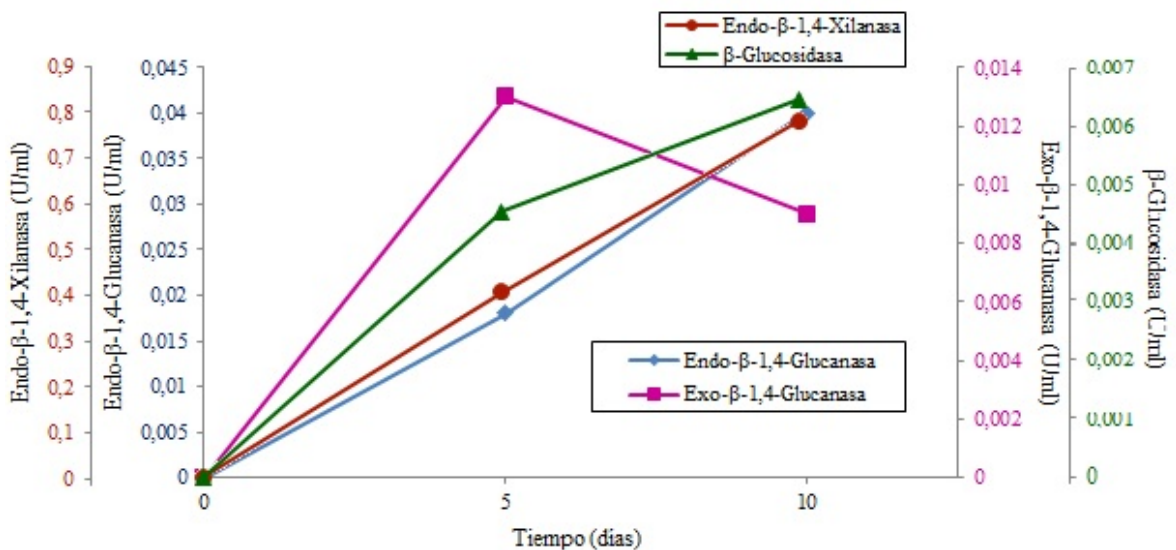
¹¹¹ PEREIRA, H. X. I & ALBARRACÍN, C. J. D. Op. cit., p. 82.

Figura 16. Cinética de Fermentación para *Streptomyces sp.* AO12 empleando como sustrato raquis de palma, a 37°C y pH 7.



Fuente: Autora del proyecto.

Figura 17. Cinética de Biosíntesis de Endo- β -1,4-Glucanasa, Exo- β -1,4-Glucanasa, β -Glucosidasa y Endo- β -1,4-Xilanasa para *Streptomyces sp.* AO12 empleando como sustrato raquis de palma, a 37°C y pH 7.



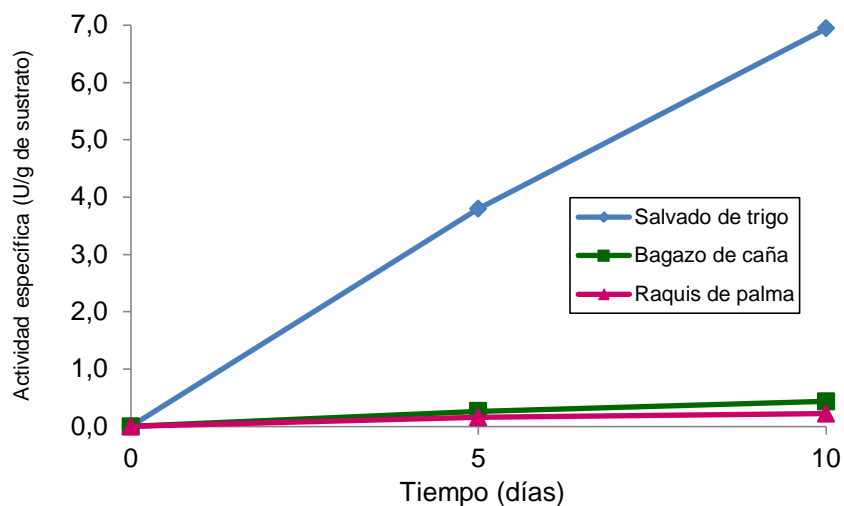
Fuente: Autora del proyecto.

En la figura 16, la proteína extracelular aumenta durante los 10 días de fermentación, presentando un máximo de 0,2 (mg/ml). Los azúcares reductores también presentan un aumento durante los 10 días de fermentación con un máximo de 0,9 (g/L). El pH disminuye durante los 10 días de fermentación, observándose un mínimo de 5,8. Esto es debido posiblemente a la liberación de ácidos orgánicos por el crecimiento del microorganismo. El porcentaje de humedad baja durante los 10 días de fermentación, presentando un valor mínimo de 45,7%, debido a la evaporación de agua.

En la figura 17, la enzima exoglucanasa presenta un aumento de su actividad enzimática durante los primero 5 días de fermentación, con un máximo de 0,01 (U/ml) y una disminución posterior a los 10 días. En la actividad enzimática de endoglucanasa se observó un aumento sostenido durante los 10 días de fermentación, con un máximo de 0,04 (U/ml), mientras que la actividad enzimática de β -glucosidasa presenta un máximo a los 10 días de fermentación alcanzando un valor de 0,006 (U/ml). En la enzima endoxilanasas, se observó un aumento de su actividad durante los 10 días de fermentación, presentando un valor máximo de 0,8 (U/ml). Las actividades de las enzimas endoglucanasa, β -glucosidasa y endoxilanasas concuerdan con los valores de azúcares reductores y proteína extracelular, y no se vieron afectadas por la reducción de pH ni de humedad. El raquis de palma es el sustrato que contiene más lignina de los 3 residuos utilizados, presentando hasta un 48 % de lignina¹¹², haciendo más difícil la degradación de celulosa y hemicelulosa. La enzima con mayor actividad enzimática fue la endoxilanasas, y la de menor actividad fue la β -glucosidasa.

¹¹² AMARIS et al. Op. cit., p. 52.

Figura 18. Endo- β -1,4-Glucanasa. Actividad específica (AE) (U/g de sustrato) a los 5 y 10 días de fermentación en estado sólido para *Streptomyces sp.* AO12 en salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma.



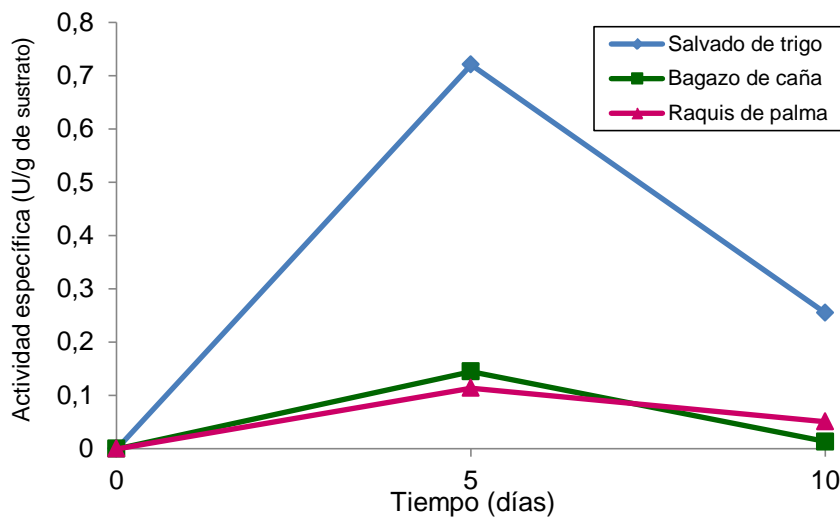
Fuente: Autora del proyecto.

En la figura 18 se presenta la actividad específica de la enzima endo- β -1,4-Glucanasa en salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma como sustratos. Se puede observar que la actividad específica de la enzima endoglucanasa en el sustrato salvado de trigo presenta un gran aumento que llega a un máximo de (6,9 U/g de sustrato) de sustrato a los 10 días de fermentación, mientras que en el sustrato bagazo de caña se observa un pequeño aumento durante los 10 días de fermentación, con un valor máximo de 0,4 (U/g de sustrato), en el sustrato raquis de palma, también se presenta un pequeño aumento durante los 10 días de fermentación, presentando un máximo de 0,2 (U/g de sustrato).

En el sustrato salvado de trigo se observan valores de actividad específica para la enzima endoglucanasa muy altos con respecto a los otros dos sustratos, seguido del sustrato bagazo de caña y el raquis de palma que es el sustrato que presenta menores actividades específicas, debido a que los residuos bagazo de caña y

raquis de palma contienen más contenido de lignina que el salvado de trigo, haciendo más difícil acceder a la celulosa^{113 114 115} (ver anexos A, B y C).

Figura 19. Exo- β -1,4-Glucanasa. Actividad específica (AE) (U/g de sustrato) a los 5 y 10 días de fermentación en estado sólido para *Streptomyces sp.* AO12 en salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma.



Fuente: Autora del proyecto.

En la figura 19, se presenta la actividad específica de la enzima exo- β -1,4-Glucanasa en salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma como sustratos. Se puede observar una actividad específica de exoglucanasa en el sustrato salvado de trigo presentando un máximo de 0,7 (U/g de sustrato) a los 5 días de fermentación y una disminución a los 10 días. En el sustrato bagazo de caña se presenta un leve aumento de actividad específica con un máximo de 0,1 (U/g de sustrato) a los 5 días de fermentación. En el sustrato raquis de palma se observa un leve aumento de la actividad específica durante los 5 primeros días de fermentación con un máximo de 0,1 (U/g de sustrato). Se presentaron mayores

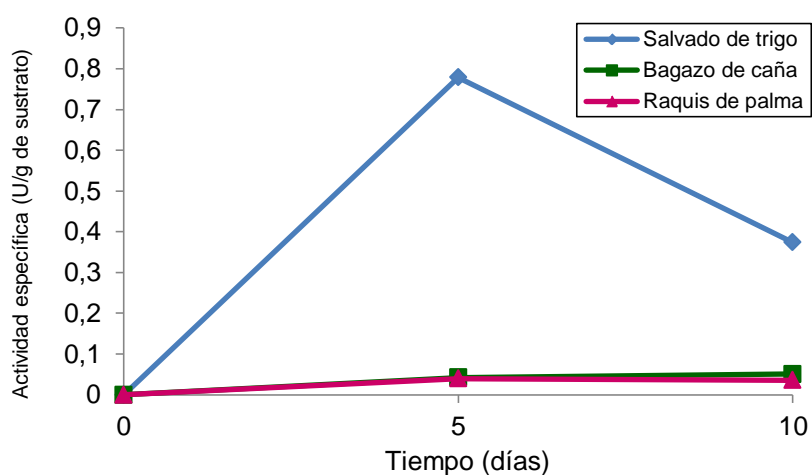
¹¹³ El mundo de las plantas. Propiedades del salvado de trigo. Op. cit.

¹¹⁴ PEREIRA, H. X. I. & ALBARRACIN, C. J. D. Op. cit.

¹¹⁵ AMARIS et al. Op cit.

valores de actividad específica para el sustrato salvado de trigo, con respecto al sustrato bagazo de caña y raquis de palma, los cuales muestran actividades menores, observándose el menor valor a los 10 días de fermentación en bagazo de caña.

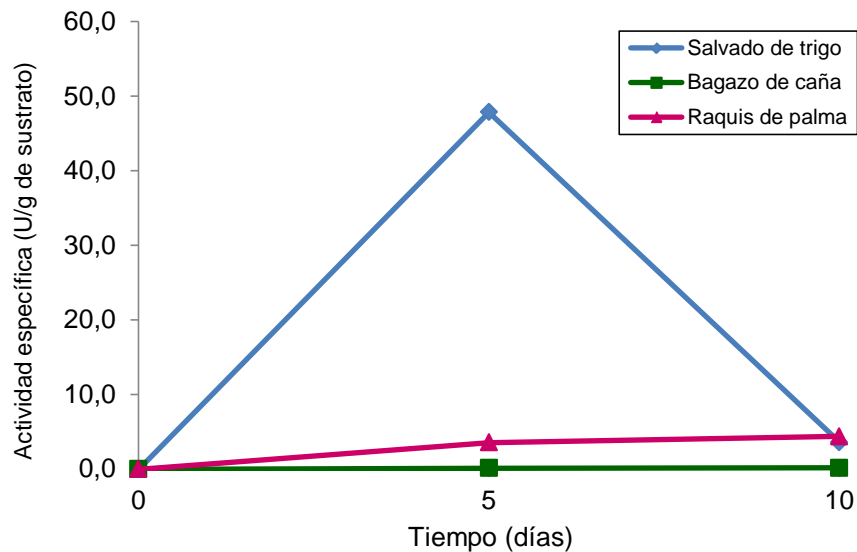
Figura 20. β -Glucosidasa. Actividad específica (AE) (U/g de sustrato) a los 5 y 10 días de fermentación en estado sólido para *Streptomyces sp.* AO12 en salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma.



Fuente: Autora del proyecto.

En la figura 20, se presenta la actividad específica de la enzima β -glucosidasa en salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma como sustratos. Se puede observar que la actividad específica en el sustrato salvado de trigo alcanza un valor máximo de 0,8 (U/g de sustrato) a los 5 días de fermentación. La actividad específica en el sustrato bagazo de caña presentó valores bajos durante los 10 días de fermentación, observándose un máximo de 0,05 (U/g de sustrato) a los 10 días de fermentación. En el sustrato raquis de palma se presenta un leve aumento a los 5 días de fermentación de 0,04 (U/g de sustrato), manteniéndose la misma actividad a los 10 días de fermentación. Se presentan mayores actividades específicas en el salvado de trigo, comparado con el bagazo de caña y raquis de palma.

Figura 21. Endo- β -1,4-Xilanasas. Actividad específica (AE) (U/g de sustrato) a los 5 y 10 días de fermentación en estado sólido para *Streptomyces sp.* AO12 en salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma.



Fuente: Autora del proyecto.

En la figura 21, se presenta la actividad específica de la enzima endo- β -1,4-Xilanasas en salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma como sustratos. Se observa que la actividad específica de endoxilanasas, en el sustrato salvado de trigo presenta un aumento de actividad durante los 5 primeros días de fermentación, logrando un máximo de 47,9 (U/g de sustrato), disminuyendo drásticamente a los 10 días de fermentación. En el sustrato bagazo de caña, se presenta un leve aumento de actividad específica durante los 10 días de fermentación, alcanzando un máximo de 0,2 (U/g de sustrato). En el sustrato raquis de palma se presenta un aumento de la actividad específica durante los 10 días, presentándose un máximo de 4,4 (U/g de sustrato). Se observa una mayor actividad específica en el sustrato salvado de trigo, seguido de raquis de palma y con menor actividad específica se presenta el sustrato bagazo de caña.

La reducción en la actividad específica de endoxilanasa después de los 5 días de fermentación en salvado de trigo, puede ser por que la glucosa y la celobiosa inhiben la actividad enzimática¹¹⁶, o la reducción en la producción de endoxilanasa después del período óptimo probablemente es debido al agotamiento de nutrientes disponibles para los microorganismos¹¹⁷.

Tabla 6. Valores máximos de actividad específica (U/g de sustrato), actividad específica (U/mg de proteína), productividad específica (U/g de sustrato · día) y rendimiento de formación de proteína por sustrato (mg de proteína/g de sustrato), obtenidas para *Streptomyces sp.* AO12 utilizando salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma.

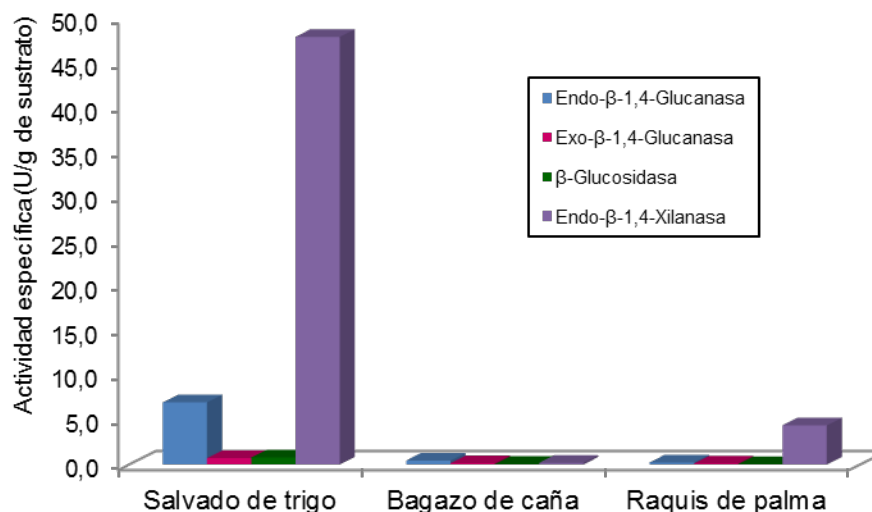
ENZIMA	SUSTRATO	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/g de sustrato)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/mg de proteína)	PRODUCTIVIDAD ESPECÍFICA (U/g de sustrato · día)	RENDIMIENTO DE FORMACIÓN DE PROTEÍNA POR SUSTRATO (mg de proteína/g de sustrato)
Endo-β-1,4-Glucanasa	Salvado de trigo	6,9	0,09	0,8	0,99
	Bagazo de caña	0,4	0,66	0,05	0,28
	Raquis de palma	0,2	0,28	0,03	0,48
Exo-β-1,4-Glucanasa	Salvado de trigo	0,7	0,02	0,1	0,55
	Bagazo de caña	0,1	0,33	0,03	0,20
	Raquis de palma	0,1	0,14	0,02	0,19
β-Glucosidasa	Salvado de trigo	0,8	0,22	0,1	0,36
	Bagazo de caña	0,05	0,14	0,008	0,06
	Raquis de palma	0,04	0,06	0,008	0,29
Endo-β-1,4-Xilanasas	Salvado de trigo	47,9	0,32	9,6	1,22
	Bagazo de caña	0,2	0,47	0,02	0,09
	Raquis de palma	4,4	1,41	0,7	1,47

Fuente: Autora del proyecto.

¹¹⁶ RODRIGUEZ G, I. & PIÑEROS C, Y. Op. cit. 35-42 p.

¹¹⁷ GUPTA, U & KAR, R Op. cit. 129-134 p.

Figura 22. Valores máximos de actividad específica (AE) (U/g de sustrato), obtenidas para *Streptomyces sp.* AO12 utilizando salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma.



Fuente: Autora del proyecto.

En la figura 22, se observan los valores máximos de actividad específica (AE) en los tres sustratos utilizados. La enzima endoxilanasas presenta una alta actividad específica (47,9 U/g de sustrato) en el sustrato salvado de trigo comparada con las enzimas endoglucanasa, exoglucanasa y β-glucosidasa, de igual manera, en el sustrato raquis de palma se presenta la enzima endoxilanasas con mayor actividad comparadas con las otras enzimas. Estos resultados concuerdan con los trabajos de Rodríguez & Piñeros, (2007), donde utilizan racimos de palma de aceite en fermentación en estado sólido con *Trichoderma viride*¹¹⁸. A su vez, Stalin et al. (2012), utilizaron una mezcla de residuos lignocelulósicos con *Streptomyces sp*¹¹⁹ y Song & Wei, (2012), llevaron a cabo la fermentación de bagazo en cultivo sumergido con el actinomiceto *Cellulosimicrobium cellulans*¹²⁰, donde se observa la actividad xilanasas bastante predominante sobre las actividades celulasas.

¹¹⁸ RODRIGUEZ G, I. & PIÑEROS C, Y. Op. cit. 35-42 p.

¹¹⁹ STALIN et al. Op.cit. 258-262 p.

¹²⁰ SONG, J. M. & WEI, D. Z. Op. cit., 1930-1934 p.

Las cuatro enzimas presentaron mayor actividad específica en el sustrato salvado de trigo comparado con los otros dos sustratos, y se presenta una alta actividad específica de la enzima endoxilanasas en salvado de trigo. Este resultado fue obtenido también por Kamble & Jadhav, (2012), quienes evaluaron la enzima endoxilanasas en fermentación en estado sólido con diferentes sustratos lignocelulósicos con el actinomiceto *Cellulosimicrobium sp.*, resultando el salvado de trigo como el mejor sustrato para la producción de la enzima endoxilanasas con actividad específica de 1,09 (U/g de sustrato)¹²¹. Kumar et al. (2012) también obtuvieron el salvado de trigo como el mejor sustrato para la producción de endoxilanasas en condiciones sumergidas con *Streptomyces sp.*, con una actividad específica de 303,33 (U/mg de proteína)¹²². Esto se debe a que el salvado de trigo contiene xilano y proteína, que sirve como una buena fuente de carbono y un nutriente completo conteniendo varios azúcares solubles y nitrógeno para los microorganismos¹²³. Por otro lado, debido a que el salvado de trigo es el sustrato que contiene menos cantidad de lignina, lo hace más fácil para el microorganismo obtener glucosa y xilosa del residuo¹²⁴. Debido a la abundancia y la renovabilidad del salvado de trigo, este puede ser un buen sustrato y un soporte de estado sólido para la producción de xilanasas. Lorea, (2008), en fermentación en estado sólido presenta actividades específicas con bagazo de caña, utilizando *Pleurotus ostreatus*, observándose una actividad específica de endoxilanasas de 5,79 (U/g de sustrato)¹²⁵, siendo esta mayor que la obtenida en el presente trabajo. Esto se debe esencialmente a que los Basidiomycetos producen de manera constitutiva mayores niveles las enzimas degradadoras de lignocelulósicos que los

¹²¹ KAMBLE, R. D. & JADHAV, A. R. Optimization and scale up of cellulase-free xylanase production in solid state fermentation on wheat bran by *Cellulosimicrobium sp.* MTCC 10645. En: Jordan Journal of Biological Sciences. 2012. Vol. 5, No. 4. 289-294 p.

¹²² KUMAR et al. 2012. Op. cit.

¹²³ KAMBLE, R. D. & JADHAV, A. R. Op. cit. 289-294 p.

¹²⁴ KUMAR et al. 2012. Op. cit.

¹²⁵ LOERA, C. O. Efecto de la tipificación del bagazo de caña sobre el perfil de producción de enzimas lignocelulolíticas de *Pleurotus ostreatus*. 2008. 151 h. Tesis Doctoral (Doctor en Biotecnología). Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México.

actinomicetes. En otros trabajos con actinomicetos en fermentación en estado sólido, pero utilizando otros residuos diferentes a los evaluados en el presente trabajo también se obtuvieron altas actividades.

En la tabla 7, se presenta la comparación de los valores de actividad enzimática y actividades específicas en el presente trabajo con otros trabajos realizados.

En el sustrato bagazo de caña, la actividad específica más alta se presentó en la enzima endoglucanasa, con una actividad específica de endoxilanasas más baja comparadas con los otros residuos, debido posiblemente a la composición del residuo en lignina, celulosa y xilano, así como su porosidad, todo lo cual afectó la producción de proteína. En la tabla 6 se presentan los valores máximos de actividad específica en los tres sustratos.

En los tres sustratos analizados en el presente trabajo, la enzima celulasas que presentó mayor actividad específica fue la enzima endoglucanasa, seguida de la enzima exoglucanasa en bagazo de caña y raquis de palma, excepto en salvado de trigo que fue la enzima glucosidasa. La presencia de la β -glucosidasa evita la inhibición de las otras dos enzimas, su acción enzimática, por tanto, es ventajosa¹²⁶. Posiblemente esta sea la razón por la que dan mayores actividades en salvado de trigo que en los otros residuos; además, el salvado de trigo contiene menor cantidad de lignina, hemicelulosa y celulosa.

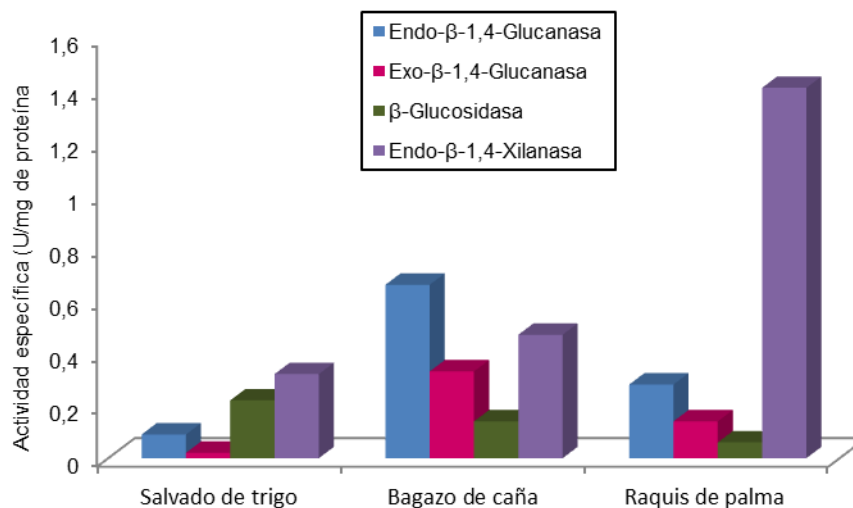
¹²⁶ RAMÍREZ, P. & COHA, J. M. Op. cit. 67-77 p.

Tabla 7. Comparación de actividades específica (U/mg de proteína) y actividades específicas (U/g) obtenidas por otros autores.

Endo-β-1,4-Glucanasa				
SUSTRATO	ACTIVIDAD ESPECIFICA (U/mg de proteína)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (U/g)	MICROORGANISMO	REFERENCIA
Fermentación sobre sustrato sólido				
Salvado de trigo	0,09	6,9	<i>Streptomyces sp. AO12</i>	En el presente trabajo
Bagazo de caña	0,66	0,4		
Raquis de palma	0,28	0,2		
Exo-β-1,4-Glucanasa				
Fermentación sobre sustrato sólido				
Salvado de trigo	0,02	0,7	<i>Streptomyces sp. AO12</i>	En el presente trabajo
Bagazo de caña	0,33	0,1		
Raquis de palma	0,14	0,1		
β-Glucosidasa				
Fermentación sobre sustrato sólido				
Salvado de trigo	0,22	0,8	<i>Streptomyces sp. AO12</i>	En el presente trabajo
Bagazo de caña	0,14	0,05		
Raquis de palma	0,06	0,04		
Endo-β-1,4-Xilanasa				
Fermentación sobre sustrato sólido				
Salvado de trigo	0,32	47,9	<i>Streptomyces sp. AO12</i>	En el presente trabajo
Bagazo de caña	0,47	0,2		
Raquis de palma	1,41	4,4		
Salvado de trigo	-	1,091	<i>Cellulosimicrobium sp.</i>	Kamble & Jadhav, (2012)
Bagazo de caña	-	5,79	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Loera, (2008)
Fermentación líquida				
Salvado de trigo	303,33	-	<i>Streptomyces sp.</i>	Kumar et al., (2012)

Fuente: Autora del proyecto.

Figura 23. Valores máximos de actividad específica (U/mg de proteína), obtenidas para *Streptomyces sp.* AO12 utilizando salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma.



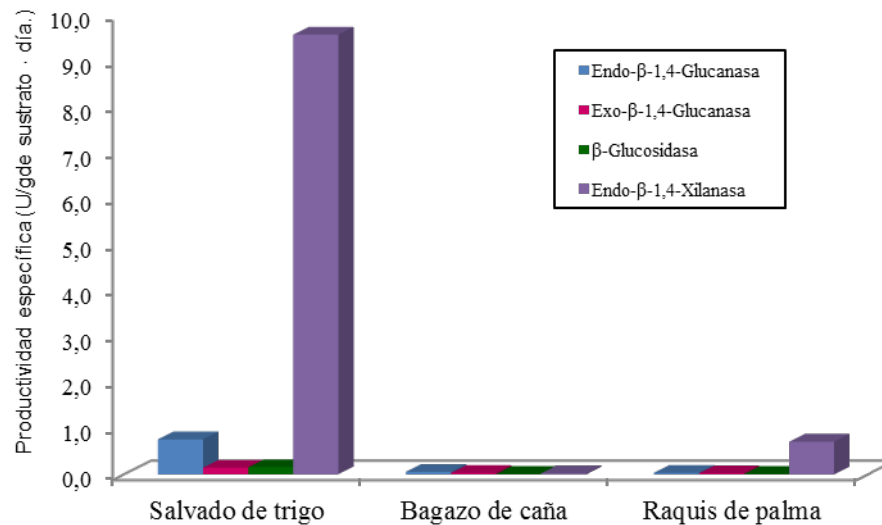
Fuente: Autora del proyecto.

En la figura 23, se presentan los valores máximos de actividad específica (U/mg de proteína) de las cuatro enzimas en los tres sustratos utilizados. Se observa una mayor actividad específica de endoxilanasas de 1,41 (U/mg de proteína) en el residuo raquis de palma, seguida de la actividad específica de endoglucanasa de 0,66 (U/mg de proteína) en bagazo de caña, la enzima exoglucanasa en el sustrato salvado de trigo fue la que presentó menor actividad específica con 0,02 (U/mg de proteína). En general, el residuo salvado de trigo fue el que presentó menores actividades específicas de las cuatro enzimas, seguido del residuo raquis de palma. En el residuo salvado de trigo y raquis de palma, la enzima endoxilanasas es la que presenta mayor actividad específica, a diferencia del residuo bagazo de caña, que es la endoglucanasa la que presenta mayor actividad.

Kumar et al, (2012), presenta una actividad específica 303,33 (U/mg de proteína) de la endoxilanasas en fermentación líquida con salvado de trigo como sustrato con

Streptomyces sp., siendo esta mucho mayor que las obtenidas en el presente trabajo¹²⁷.

Figura 24. Valores máximos de productividad específica (q_p) (U/g de sustrato · día), obtenidas para *Streptomyces sp.* AO12 utilizando salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma.



Fuente: Autora del proyecto.

En la figura 24, se presentan los valores máximos de productividad específica (q_p) de las cuatro enzimas en los tres residuos utilizados. Se observa una mayor productividad específica de endoxilanasas de 9,6 (U/g de sustrato · día) en salvado de trigo, seguida de endoglucanasa en salvado de trigo con una productividad específica de 0,8 (U/g de sustrato · día) y una productividad específica de endoxilanasas en raquis de palma de 0,7 (U/g de sustrato · día). Las cuatro enzimas presentan una mejor productividad específica en el sustrato salvado de trigo, presentándose productividades específicas más bajas en el sustrato bagazo

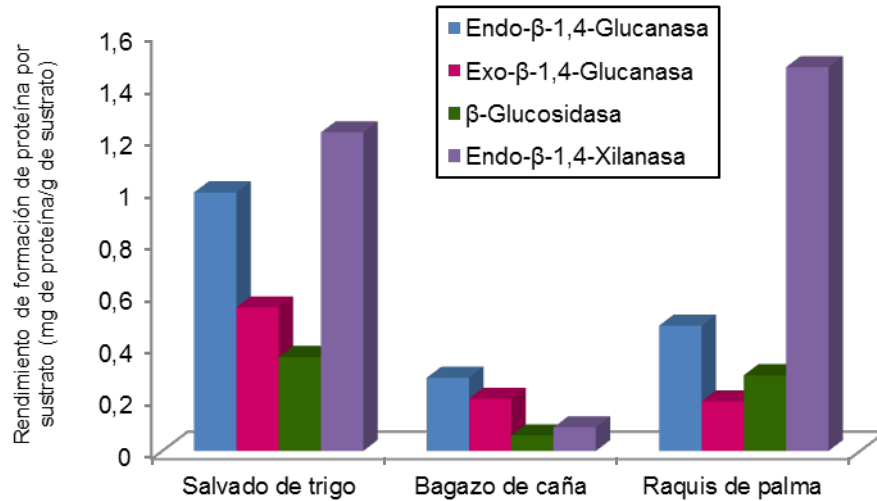
¹²⁷ Kumar et al, 2012. Op. cit.

de caña, como en raquis. Se observa en raquis de palma la tercera mejor productividad específica en endoxilanasas, la cual es 13.7 veces menor que la productividad específica de endoxilanasas en salvado de trigo. En la tabla 6 se presentan los valores máximos de productividad específica en los tres sustratos.

Teniendo en cuenta que la productividad específica (q_p) es el parámetro cinético adecuado para evaluar o comparar la capacidad de la cepa para producir un determinado metabolito, al comparar los resultados obtenidos utilizando salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma, es de destacar que se obtuvieron mayores valores de actividad específica y productividad específica para la enzima endoxilanasas. Se observó que las productividades más altas se presentan en el residuo salvado de trigo, esto posiblemente se deba a las diferencias en la composición química (menor contenido de lignina) y factores físicos (porosidad del sustrato) que pueden favorecer la producción de estas enzimas (ver anexos A,B,C).

Los aspectos mencionados anteriormente nos indican que la producción de estas enzimas por bacterias filamentosas es altamente dependiente de la composición del sustrato.

Figura 25. Valores máximos de rendimiento de formación de proteína por sustrato ($Y_{p/s}$) (mg de proteína/g de sustrato), obtenidas para *Streptomyces sp.* AO12 en salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma.



Fuente: Autora del proyecto.

En la figura 25, se presenta los valores máximos de rendimiento de formación de proteína por sustrato ($Y_{p/s}$). Se observa un rendimiento de formación de proteína por sustrato ($Y_{p/s}$) en el sustrato salvado de trigo un mayor $Y_{p/s}$ en la enzima endoxilanasa con 1,22 (mg de proteína/g de sustrato), seguido de la enzima endoglucanasa con 0,99 (mg de proteína/g de sustrato), la enzima que presenta menor $Y_{p/s}$ es la enzima β -glucosidasa. En el sustrato bagazo de caña, las cuatro enzimas presentan bajos valores de $Y_{p/s}$, observándose un mayor $Y_{p/s}$ de la enzima endoglucanasa con 0,28 (mg de proteína/g de sustrato), seguida de la enzima exoglucanasa con 0,20 (mg de proteína/g de sustrato). En el sustrato raquis de palma, se observa un mayor valor de $Y_{p/s}$ para la enzima endoxilanasa con 1,47 (mg de proteína/g de sustrato), seguida de la enzima endoglucanasa con 0,48 (mg de proteína/g de sustrato). En la tabla 6, se presentan los valores máximos de rendimiento de formación de proteína por sustrato en los tres residuos utilizados.

El sustrato que presenta mayor rendimiento de formación de proteína por sustrato ($Y_{p/s}$) es el salvado de trigo, seguido del sustrato raquis de palma, observándose que el sustrato bagazo de caña es el residuo que presenta menores valores de $Y_{p/s}$ comparado con los otros dos residuos. Esto se debe posiblemente a la composición de los residuos en lignina hemicelulosa y celulosa. Hay que considerar que la susceptibilidad de la celulosa a la hidrólisis enzimática está afectada significativamente por los rasgos estructurales de los materiales celulósicos, que incluyen: grado de acumulación de agua, orden molecular, contenido de material asociado como la lignina, estructura capilar de las fibras de celulosa, área superficial, además del rasgo sugerido como el más importante: cristalinidad¹²⁸.

En general, la endoxilanasas fue bastante predominante sobre las celulasas, la degradación de xilano fue superior que la celulosa, los microorganismos con alta actividad xilanasas y baja actividad celulasas pueden ser útiles para el bioblaqueamiento en la industria del papel, para no perder la celulosa durante el tratamiento¹²⁹.

¹²⁸ GAITAN B, D. M. & PEREZ P, L. T. Op. cit.

¹²⁹ GUPTA, U & KAR, R Op. cit. 129-134 p.

5. CONCLUSIONES

Se encontraron actinomicetos autóctonos degradadores de lignocelulosa en muestras de suelo, gallinaza, lombrinaza y bovinaza del municipio de Ocaña, Norte de Santander.

Se observó que la cepa aislada *Streptomyces sp.* AO12 presentó un mejor crecimiento cualitativo en medios sumergidos con diferentes tipos de celulosa y salvado de trigo; y en fermentación en estado sólido con salvado de trigo como fuente de carbono.

Se observó con la cepa *Streptomyces sp.* AO12 la producción de las enzimas endo- β -1,4-xilanasas, endo- β -1,4-glucanasas, exo- β -1,4-glucanasas y β -glucosidasas, durante la fermentación sobre sustrato sólido de salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma.

La actividad enzimática de endo- β -1,4-xilanasas fue predominante sobre las actividades de endo- β -1,4-glucanasas, exo- β -1,4-glucanasas y β -glucosidasas cuando se utilizó salvado de trigo y raquis de palma como fuente de carbono en fermentación en estado sólido.

La actividad enzimática de endo- β -1,4-glucanasas fue predominante sobre las actividades de endo- β -1,4-xilanasas, exo- β -1,4-glucanasas y β -glucosidasas en bagazo de caña como fuente de carbóno en fermentación en estado sólido.

El salvado de trigo fue el mejor sustrato para la producción de las enzimas endo- β -1,4-xilanasas, endo- β -1,4-glucanasas, exo- β -1,4-glucanasas y β -glucosidasas.

Las actividades enzimáticas de endo- β -1,4-xilanasas, endo- β -1,4-glucanasas, exo- β -1,4-glucanasas y β -glucosidasas, variaron significativamente dependiendo de los sustratos lignocelulósicos utilizados como fuente de carbono. Esto se debe a que varían en características como grado de acumulación de agua, orden molecular, contenido de material asociado como la lignina, estructura capilar de las fibras de celulosa, área superficial, y el más importante: cristalinidad.

El salvado de trigo fue el sustrato que presentó mayores valores de rendimiento de formación de proteína por sustrato ($Y_{p/s}$).

La enzima endo- β -1,4-xilanasas presentó los mejores valores de actividad específica (AE), productividad específica (q_p) y rendimiento de formación de proteína por sustrato ($Y_{p/s}$) para *Streptomyces sp.* AO12 en fermentación en estado sólido con salvado de trigo y raquis de palma como fuente de carbono.

6. RECOMENDACIONES

Se recomienda estudiar la variación de los factores ambientales que afectan la degradación de la lignocelulosa como nitrógeno disponible, la temperatura, aireación, humedad, y pH, sobre el crecimiento y la producción de las enzimas endo- β -1,4-xilanasas, endo- β -1,4-glucanasas, exo- β -1,4-glucanasas y β -glucosidasas, en actinomicetos durante la fermentación sobre sustrato sólido.

Se recomienda evaluar el efecto de las diferentes sales (cloruro de amonio, nitrato de sodio, nitrato de amonio) en el medio de cultivo, usando otros medios basales salinos para la obtención de enzimas endo- β -1,4-xilanasas, endo- β -1,4-glucanasas, exo- β -1,4-glucanasas y β -glucosidasas, en actinomicetos.

Se recomienda estudiar el efecto de otros residuos lignocelulósicos como sustrato en fermentación sobre sustrato sólido en la producción de enzimas endo- β -1,4-xilanasas, endo- β -1,4-glucanasas, exo- β -1,4-glucanasas y β -glucosidasas en actinomicetos.

BIBLIOGRAFÍA

ABDEL-AZIZ, M. S.; TALKHAN, F. N.; FADEL, M.; ABOUZIED, A. A. & ABDEL-RAZIK, A. S. Improvement of xylanase production from *Streptomyces pseudogriseolus* via UV mutagenesis. En: Aust. J. Basic & Appl. Sci. 2011. Vol. 5, No. 5; 1045-1050 p.

ACTINOBACTERIOLOGY. The family *Streptomycetaceae*, part I: Taxonomy. [en línea]. <http://actinobacteriology-fathiawwad.blogspot.com/2009/04/family-streptomycetaceae-part-i.html> [citado en 14 de marzo de 2013]

ADAV, S. S.; HWEE, C. E. S.; RAVINDRAN, A.; DUTTA, B. & KWAN, S. S. Label free quantitative proteomic analysis of secretome by *Thermobifida fusca* on different lignocelulosic biomass. En: J. of Proteomics. 2012. Vol. 75; 3694-3706 p.

ALI, H. KH. Q. & ZULKALI, M. M. D. Design aspects of bioreactors for solid-state fermentation: A review. En: Chem. Biochem. Eng. Q. 2011. Vol. 25. No. 2; 255-266 p.

AKHAVAN S, A.; GHAZI, S. & AKHAVAN S, M. Cost-effective production and optimization of alkaline xylanase by indigenous *Bacillus mojavensis* AG137 fermented on agricultural waste. En: Enzyme Research. 2011. 1-9 p.

AMARIS, R. O. L; MIRANDA, C. I. J. & ESCALANTE, H. H. Aprovechamiento del potencial energético de la biomasa residual obtenida de la extracción del aceite de

palma en Colombia. 2009, 52 h. Trabajo de grado (Ingeniero Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas.

ARGENBIO. Consejo Argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología. El cuaderno de por qué Biotecnología. Cuaderno No. 102. Celulosa y celulasas. [en línea]. ><http://www.porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1¬e=102>> [citado en 20 de marzo de 2013].

BERNIER, R. & STUTZENBERGER, F. Stabilization of *Thermomonospora curvata* b-glycosidase by a low molecular weight intracellular factor. En: Lett. Appli. Microbiol. 1989. Vol. 8; 9-13 p.

BERROCAL, M. M.; RODRÍGUEZ, J.; BALL, A. S.; PÉREZ, M. I. & ARIAS, M. E. Solubilisation and mineralisation of [¹⁴C]lignocellulose from wheat straw by *Streptomyces cyaneus* CECT 3335 during growth in solid-state fermentation. En: Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997. Vol. 48; 379-384 p.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. En: Anal. Biochem. 1976. Vol. 72; 248-254 p.

CERONI, A. & GUTIERREZ-CORREA, M. Producción de celulasas por hongos: estudios cinéticos en hongos silvestres. En: Boletín de Lima. 1988. Vol. 55. 13-20 p.

CHAVEZ. G, M. L.; RODRIGUEZ D, L. V. & AGUILAR, C. N. Aspectos básicos de la fermentación en medio sólido. Cienciacierta. 2009. No. 20. [en línea]. <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC20/CC20fermentacion.html> [citado en 21 de marzo de 2013].

Consecuencias del uso de la madera. [en línea]. <<http://consecuenciasdelusodelamadera.blogspot.com/2009/09/estructura-molecular-de-la-celulosa.htm>> [citado en 19 de marzo de 2013].

COSTA, M.; TORRES, M.; MAGARIÑOS, H. & REYES, A. Producción y purificación parcia de enzimas hidrolíticas de *Aspergillus ficuum* en fermentación sólida sobre residuos agroindustriales. En: Rev. Colomb. Biotecnol. 2010. Vol. 12, No. 2; 163-175 p.

CRAWFORD, D. L. Lignocellulose decomposition by selected *Streptomyces* strains. En :Appl. Environ. Microbiol. 1978. Vol. 35 ; 1041-1045 p.

CUERVO, L.; FOLCH, J. L. & QUIROZ, R. E. Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. En: Bio. Tecnología. 2009. Vol. 13, No. 3; 11-25 p.

CUESTA A, G. Detección y caracterización por métodos fenotípicos y moleculares de mycolata formadores de espumas en estaciones depuradoras de aguas residuales domésticas con sistemas de fangos activos. Valencia, 2004, 251 h. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Biotecnología.

ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E.; TSIKLAURI, N.; METREVELI, E.; KHARDZIANI, T. & AGATHOS, S. N. Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot *Basidiomycetes* isolated from the forest of Georgia. En: World J. Microbiol. Biotechnol. 2009. Vol. 25; 331-339 p.

El mundo de las plantas. Propiedades del salvado. [en línea]. <<http://www.botanical-online.com/salvado.htm>>. [citado en 14 de marzo de 2013].

FENG, Y.; JIANG, J. & ZHU, L. Recent developments in activities, utilization and sources of cellulase. En: Forestry Studies in China. 2009. Vol. 11, No. 3; 202-207 p.

FLORES, M. E.; PÉREZ, R. & HUITRÓN, C. β -Xylosidase and xylanase characterization and production by *Streptomyces* sp. CH-M-1035. En: Letters in Applied Microbiology. 1997. Vol. 24; 410-416 p.

FRANCO C, M. Evaluación de caracteres PGPR en Actinomicetos e Interacciones de estas Rizobacterias con hongos formadores de Micorrizas. Granada, 2008, 261 h. Tesis doctoral. Universidad de Granada. Facultad de Ciencias. Departamento de Fisiología Vegetal.

GAITAN B, D. M. & PEREZ P, L. T. Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Bogotá, 2007, 114 p. Trabajo de grado (Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias.

GUPTA, U & KAR, R. Optimization and scale up of cellulase free endo xylanase production by solid-state fermentation on corncob and by immobilized cells of a thermotolerant bacterial isolate. En: Jordan Journal of Biological Sciences. 2008. Vol. 1, No. 3; 129-134 p.

HESHAM M, A. & SAHAR A, E. Actinomycetes in rice straw decomposition. En: Waste Management. 2007. Vol. 27, No. 6; 850-853 p.

HOLT, J.G.; KREVY, H.S.; SNEATHE, R.H.A. & WILLIAMS, S.T. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th Edition. Baltimore, USA: Williams and Wilkens Company, 1994.

HOLT, P. G.; WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M. E. & HOLT, J. G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 4. Baltimore, USA: William & Wilkins, 1989.

IFRÁN, S. D.; FERNANDEZ, N. E. & MÁRQUEZ, S. Composición química de los seres vivos. [en línea]. < <http://genomasur.com/lecturas/Guia02-1.htm>> < [citado en 15 de marzo de 2013].

IRFAN, M.; SAFDAR, A.; SYED, Q. & NADEEN, M. Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production and activity. En: Turk. J. Biochem. 2012. Vol. 37, No. 3. 287-293 p.

KAMBLE, R. D. & JADHAV, A. R. Optimization and scale up of cellulase-free xylanase production in solid state fermentation on wheat bran by *Cellulosimicrobium sp.* MTCC 10645. En: Jordan Journal of Biological Sciences. 2012. Vol. 5, No. 4. 289-294 p.

KAUSAR, H.; SARIAH, M.; SAUD, H. M.; ALAM, M. Z. & ISMAIL, M. R. Isolation and screening of potential actinobacteria for rapid composting of rice straw. En: Biodegradation. 2011. Vol. 22, No. 2; 367-357 p.

KUMAR, A.; GUPTA, R.; SHRIVASTAVA, B.; PAL, P. Y. & CHANDER, K. R. Xylanase production from an alkalophilic actinomycete isolate *Streptomyces sp.* RCK-2010, its characterization and application in saccharafication of second generation biomass. En: Journal of Molecular Catalysis. 2012. Vol. 74; 170-177 p.

KUMAR, R.; SINGH, S. & SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. En: J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2008. Vol. 35; 385-385 p.

KOSTYLEV, M. & WILSON, D. Synergistic interactions in cellulose hydrolysis. En: Biofuels. 2012. Vol.3, No.1; 61-70 p.

LOERA, C, O. Efecto de la tipificación del bagazo de caña sobre el perfil de producción de enzimas lignocelulolíticas de *Pleurotus ostreatus*. 2008. 151 h. Tesis Doctoral (Doctor en Biotecnología). Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México.

LULEY, C. J. Identificación del tipo de pudrición de la madera y hongos xilófagos en árboles urbanos. [en línea]. <<http://www.isahispana.com/treecare/articles/decay-fungi.aspx>> [citado en 15 de marzo de 2013].

MANJARRES, K.; PIÑEROS, Y. & RODRIGUEZ-SANDOVAL, E. Evaluación del complejo enzimático producido mediante el cocultivo de *Aspergillus sp.* y *Trichoderma sp.* en fase sólida sobre residuo de palma. En: Bioagro. Vol. 23, No. 1; 19-26 p.

MILLER, G. Use of Dinitrosalicylic acid Reagent For Determination of Reducing Sugars. En: Analytical Chemistry. 1959. Vol. 31; 426-429 p.

MOHAGHEGHI, A.; GROHMANN, K.; HIMMEL, M.; LEIGHTON, L. & UPDEGRAFF, D. M. Isolation and characterization of *Acidothermus cellulolyticus* gen. nov., sp. nov., a new genus of thermophilic, acidophilic, cellulolytic bacteria. En: Int. J. Syst. Bacteriol., 1986. Vol. 36; 435-443 p.

MUSSATTO, S. I. & TEIXEIRA, J. A. Lignocellulose as raw material in fermentation processes. En: Current Research Technology and Education in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.

OTERO, J. V. Aislamiento, selección e identificación de actinomicetos, bacterias fotosintéticas no sulfurosas y bacterias ácido lácticas con potencial biofertilizante, a partir de suelos asociados al cultivo de plátano en la costa atlántica, colombiana. 2011, 141 h. Trabajo de grado (Magister en Ciencias). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología.

PELAEZ-ACERO, A.; MENESES-MAYO, M.; MIRANDA-ROMERO, A.; AYALA-MARTINEZ, M.; CROSBY-GALVAN, M. M.; LOERA-CORRAL, O. & MEGIAS-RIVAS, M. D. Enzimas fibrolíticas producidas por fermentación en estado sólido para mejorar los ensilajes de caña de azúcar. En: Agrociencia. 2011. Vol. 45; 675-685 p.

PEREIRA, H. X. I & ALBARRACÍN, C. J. D. Evaluación del proceso de producción de bioetanol de segunda generación a partir de residuos lignocelulósicos utilizando metodologías de análisis exergénico e integración de procesos. 2010, 82 h. Trabajo de grado (Ingeniero Químico). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas

PIÑERO, B. J. & RIVAS, N. Aislamiento y caracterización de una cepa de actinomiceto celulolítico, termófilo moderado y acidófilo. En: Revista Científica, FVC-LUZ. 2004. Vol. 15, No. 5; 412-418 p.

PRINSEN, P.; GUTIERREZ, A. & DEL RIO, J. C. C Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas. 2010, 82 h. Trabajo fin de Master. Estudios Avanzados en Química. Universidad de Sevilla. Departamento de Biotecnología Vegetal.

QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E. & FOLCH-MALLOL, J. L. Proteínas que remodelan y degradan la pared celular vegetal: perspectivas actuales. En: Biotecnología Aplicada. 2011. Vol. 28; 194-204 p.

RAMÍREZ, P. & COHA, J. M. Enzymatic degradation of cellulose for thermophilic actinomycetes: isolation, characterization and cellulolytic determination. En: Rev. Peru. Biol. 2003. Vol.10, No.1; 67-77 p.

RATHNAN, R. K. & AMBILI, M. Cellulase enzyme production by *Streptomyces sp.* using fruit waste as substrate. En: Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 2011. Vol. 5, No. 12; 1114-1118 p.

RICO, G. M. A. Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del género *Azotobacter* y Actinomicetos aislados de cultivos de *Solanum tuberosum* Linnaeus, 1753 (papa) cultivados en zonas altoandinas del Perú. 2009, 152 h. Tesis (Biólogo con Mención en Biología Celular y Genética). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas.

RODRIGUEZ G, I. & PIÑEROS C, Y. Producción de complejos enzimáticos celulolíticos mediante el cultivo en fase sólida en *Trichoderma sp.* sobre los racimos vacíos de palma de aceite como sustrato. En: Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. 2007. Vol. 14, No. 2; 35-42 p.

SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. En: Biotechnology Advances. 2009. Vol. 27; 185-194 p.

SHARMA, P.; GUPTA, N. & WOLDESENBET, F. Statistical optimization of the production of a cellulase-free, thermo-alkali-stable, salt-and solvent-tolerant xylanase from *Bacillus halodurans* by solid state fermentation. En: Arch. Appl. Sci. Res. 2012. Vol. 4, No. 1; 524-535 p.

SONG, J. M. & WEI, D. Z. Production and characterization of cellulases and xylanases of *Cellulosimicrobium cellulans* grow in pretreated and extracted bagasse and minimal nutrient medium M9. En: Biomass and Bioenergy. 2010. Vol. 34; 1930-1934 p.

STUTZENBERGER, F. J. Cellulolytic Activity of *Thermomonospora curvata*: Nutritional Requirements for Cellulase Production. En: Applied Microbiology. 1972. Vol. 24, No. 1; 77-82 p.

STALIN, T.; SATHYA, P. B. & SELVAM, K. Ecofriendly application of cellulase and xylanase producing marine *Streptomyces clavuligerus* as enhancer in biogas production from waste. En: African Journal of Environmental Science and Technology. 2012. Vol. 6. No. 6; 258-262 p.

SUAREZ, S. Y. A; GARCIA, B. J. C. & URIBE, V. D. Análisis de la funcionalidad y diversidad microbiana en suelos dedicados al cultivo de papa criolla (*Solanum*

phureja) mediante una aproximación metanogénica. 2010, 128 h. Maestría en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.

TUNCER, M; BALL, A. S; ROB, A. & WILSON, M. T. Optimization of extracellular lignocellulolytic enzyme production by a *Thermomonospora fusca* BD25. En: Enzyme and Microbial Technology. 1999. Vol. 25;38-47 p.

TUNCER, M. Characterization of Endoxylanase Activity From *Thermomonospora Fusca* BD25. En: Turk J. Biol. 2000. Vol. 24; 737-752 p.

ZIMMERMANN, W.; WINTER, B. & BRODA, P. Xylanolytic enzyme activities produced by mesophilic and thermophilic actinomycetes grown on graminaceous xylan and lignocellulose. En: FEMS Microbiology Letters. 1988. Vol. 55; 181-186 p.

ANEXOS

Anexo A. Composición del salvado de trigo.

Elemento o Compuesto	Salvado de trigo crudo 100 gr
Agua	9,89 g
Grasa	4,25 g
Proteína	15,55 g
Hidratos de carbono	64,51 g
Fibras	42,8 g
Potasio	1182 mg
Fósforo	1013 mg
Hierro	10,57 mg
Sodio	2 mg
Magnesio	611 mg
Calcio	73 mg
Cobre	0,998 mg
Cinc	7,27 mg
Manganeso	11,500 mg
Vitamina C	0,0 mg
Vitamina A	0 mg
Vitamina B1 (Tiamina)	0,523 mg
Vitamina B2 (Riboflavina)	0,577 mg
Vitamina B3 (Niacina)	13,578 mg
Vitamina B6 (Piridoxina)	1,303 mg
Vitamina E	2,320 mg
Ácido fólico	79 mcg
Celulosa	16,9 %
Hemicelulosa	35,2 %
Lignina	7,8 %

Anexo B. Composición del bagazo de caña de azúcar.

Análisis Físico (%)		Análisis final (%)	
Humedad	50	Carbono	23
Fibra	48	Hidrógeno	3
Sólidos solubles	2	Oxígeno	23
Total	100	Cenizas	2
Análisis químico (%)		Humedad	49
Celulosa	45	Total	100
Hemicelulosa	26	Análisis físico fibroso (%)	
Lignina	21	Fibras verdaderas	55
Cenizas	3	Pared celular	20
Otras sustancias orgánicas	5	Médula	20
Total	100	Otros fibrosos	5
		Total	100

Anexo C. Caracterización fisicoquímica de raquis de palma de aceite.

TIPO DE ANÁLISIS	UNIDADES	RAQUIS DE PALMA
Análisis básico		
Humedad	% p/p	59,13
Sólidos totales	% p/p	40,87
Análisis próximo en base seca		
Material volátil MV	% p/p	82,56
Carbono fijo CF	% p/p	7,85
Cenizas	% p/p	9,58
Análisis último en base seca		
Carbono orgánico total	% p/p	49,73
Hidrógeno	% p/p	5,72
Oxígeno	% p/p	34,06
Nitrógeno	% p/p	0,90
Azufre	% p/p	0,05
Análisis bromatológico		
Grasa	% p/p	0,41
Proteína	% p/p	5,59
Celulosa	% p/p	37,64
Hemicelulosa	% p/p	4,69
Lignina	% p/p	48,42
Otros parámetros		
Sólidos volátiles totales SVT	% p/p	36,95
Materia orgánica	% p/p	85,73
Relación C/N	Adimensional	55,62
Análisis energético en base seca		
Poder calorífico inferior	Kj/kg	17484,69

**Anexo D. Medios para aislamiento y selección de actinomicetos
lignocelulósicos.**

Agar para aislamiento de actinomicetos (DIFCO)

Componentes	Cantidad
Agar base para aislamiento de actinomicetos (Difco)	22 g
Glicerol	5,0 ml
Agua destilada	1000 ml

Agregar al agua el agar, calentar y dejar hervir por 1 minuto, agregar 5 ml de glicerol. Autoclavar por 15 minutos.

Medio basal salino (MBS) (Mohagheghi et al., 1986)

Componentes	Cantidad
Extracto de levadura	0,5 g
KH_2PO_4	1,0 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
NH_4Cl	1,0 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
Agua destilada	1000 ml

Medio Mineral Basal (Crawford, 1978)

Componentes	Cantidad
NaCl	1,0 g
KCl	0,5g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,4 g
CaCl ₂ .6H ₂ O	0,1 g
NH ₄ Cl	0,3 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Na ₂ SO ₄	0,2 g
Casaminoácidos	0,5 g
Agua destilada	1000 ml

Agar lignocelulosa: Medio basal salino (Mohagheghi et al., 1986) o medio mineral basal (Crawford, 1978), con 10 g/l de lignocelulosa (salvado de trigo, CMC, α -celulosa), 50 mg de papel filtro Whatman No. 1 y 25 g/l de agar.

A todos los medios se le agregó Nistatina (100 UI/ml). Para los medios líquidos se elimina la adición de agar.

Anexo E. Composición del medio mineral basal y condiciones iniciales en el proceso fermentativo en estado sólido utilizando salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma como sustratos.

MEDIO MINERAL BASAL (Crawford, 1978)	
Compuesto	Unidades (g/L)
Sustrato lignocelulósico	*
Extracto de levadura	0,5
KH_2PO_4	1,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2
NH_4Cl	1,0
$\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2

CONDICIONES INICIALES	
pH inicial	7
Humedad inicial	80%
Temperatura	37 °C

*Se emplearon concentraciones de 250 g/L de salvado de trigo, bagazo de caña y raquis de palma.

**Anexo F. Composición del medio mineral basal modificado utilizado en el
inoculo.**

MEDIO MINERAL BASAL (Crawford, 1978)	
Compuesto	Unidades (g/L)
Sacarosa	20
Extracto de levadura	5,5
KH_2PO_4	1,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,2
NH_4Cl	1,0
$\text{NaHPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2

pH 7

Anexo G. Método colorimétrico del ácido dinitrosalicílico (DNS) de Miller, (1959).

Preparación del reactivo DNS

Pesar 8 g de NaOH y disolverlos en 250 mL de agua destilada y 150 g tartrato de sodio y potasio.

Agregar 5 g de DNS bajo calentamiento.

Aforar a 500 mL con agua destilada.

Almacenar a temperatura ambiente y proteger de la luz.

Procedimiento

Agregar 1 mL de reactivo a 1 mL de muestra usando tubos tapa rosca.

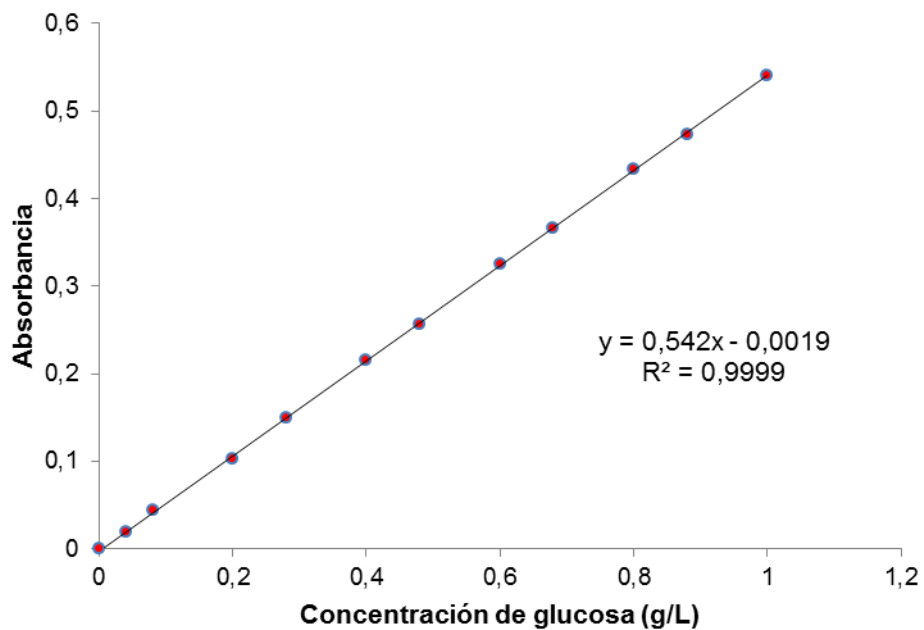
Poner a ebullición por 5 minutos en baño con agua.

Detener la reacción en un baño con hielo.

Agregar 10 mL con agua destilada y dejar en reposo por 15 minutos.

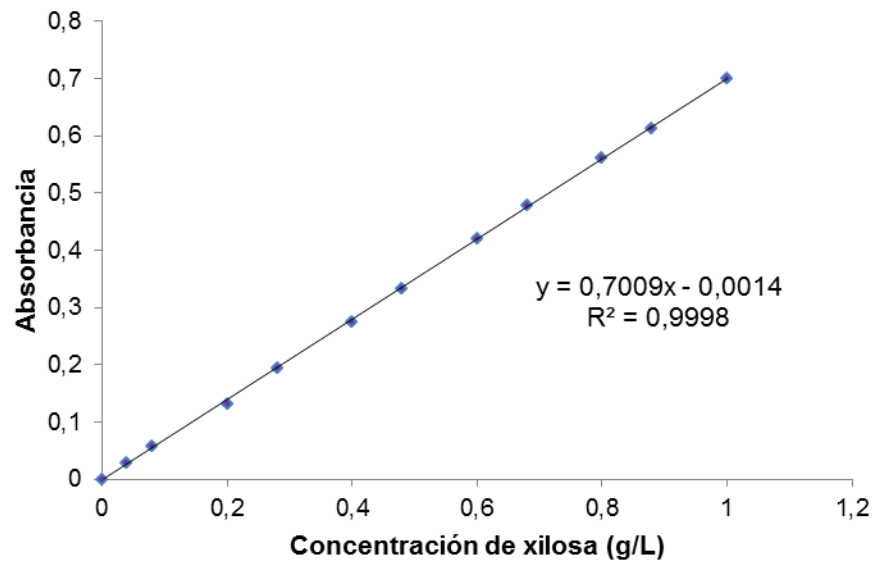
Medir la absorbancia óptica a 540 nm contra un blanco obtenido con el procedimiento anterior, pero agregando agua destilada en lugar de muestra.

Anexo H. Curva de calibración para determinación de concentración de glucosa por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS).



$$\text{Concentración de glucosa (g/L)} = \frac{\text{Absorbancia} + 0,0019}{0,542}$$

Anexo I. Curva de calibración para determinación de concentración de xilosa por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS).



$$\text{Concentración de xilosa (g/L)} = \frac{\text{Absorbancia} + 0,0014}{0,7009}$$

Anexo J. Método colorimétrico de Bradford, (1976).

Reactivo de Bradford

Pesar y disolver 100 mg de azul de coomasie G-25 en 50 mL de etanol.

Agregar lentamente con agitación 100 mL de ácido fosfórico al 85%.

Diluir la solución resultante a un volumen final de 1 L.

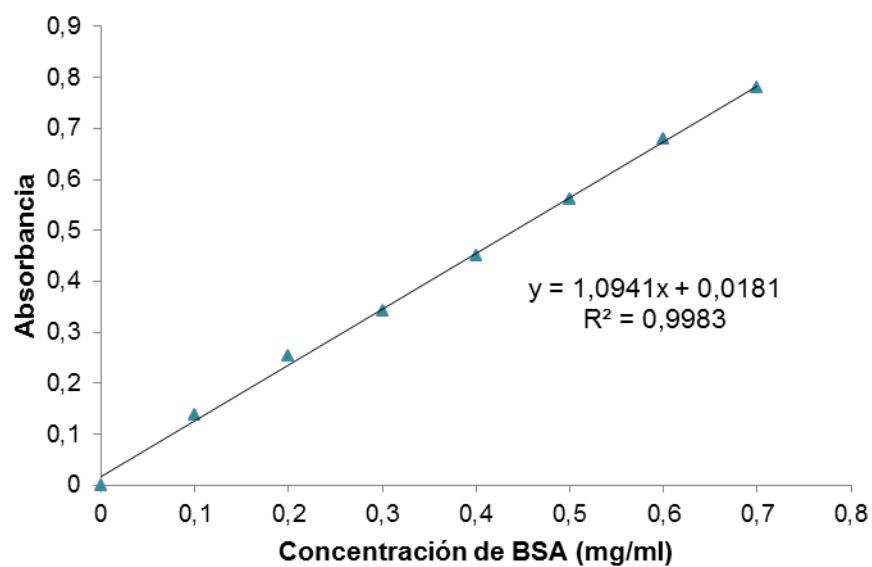
Almacenar en un frasco oscuro y papel aluminio y en nevera.

Procedimiento

Agregar 2,5 mL de reactivo de Bradford a 250 μ L de muestra de solución de proteína en un rango entre 0,1 y 1 mg/mL.

Mezclar y esperar 2 minutos para leer la absorbancia a 595 nm contra un blanco de reactivo preparado con agua destilada.

Anexo K. Curva de calibración para determinación de concentración de proteína extracelular por el método de Bradford.



$$\text{Concentración de proteína (mg/ml)} = \frac{\text{Absorbancia} - 0,018}{1,0941}$$

Anexo L. Cálculos de las actividades enzimáticas de endo-β-1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4), exo-β-1,4-glucanasa (EC 3.2.1.91), β-1,4 glucosidasa (EC 3.2.1.21) y endo-β-1,4-xilanasa (EC 3.2.1.8).

Anexo L.1. Cálculo de las actividades enzimáticas de endo-β-1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4), exo-β-1,4-glucanasa (EC 3.2.1.91) y β-1,4 glucosidasa (EC 3.2.1.21).

$$\text{Actividad enzimática (U/ml)} = \frac{\text{g de glucosa}}{\text{L x min}} \times \frac{1\text{L}}{\text{P.M. glucosa}} \times \frac{\text{Vol. Total (ml)}}{10^3 \text{ ml}} \times \frac{10^6 \mu\text{moles}}{\text{Vol. enzima}}$$

Donde:

U = Cantidad de enzima necesaria para transformar 1 μmol de sustrato en un minutos (μmoles/minuto).

P.M. xilosa = Peso molecular de la glucosa (180,16 g/mol).

Vol. Total = Vol. de la enzima + Vol. del sustrato (ml)

Anexo L.2. Cálculo de la actividad enzimática β -1,4-xilanasasa (EC 3.2.1.8).

$$\text{Actividad enzimática (U/ml)} = \frac{\text{g de xilosa}}{\text{L x min}} \times \frac{1\text{L}}{\text{P.M. xilosa}} \times \frac{\text{Vol. Total (ml)}}{10^3 \text{ ml}} \times \frac{10^6 \mu\text{moles}}{\text{Vol. enzima}}$$

Donde:

U = Cantidad de enzima necesaria para transformar 1 μmol de sustrato en un minutos ($\mu\text{moles/minuto}$).

P.M. xilosa = Peso molecular de la xilosa (150,13 g/mol).

Vol. Total = Vol. de la enzima + Vol. del sustrato (ml)

Anexo M. Ecuaciones utilizadas para la determinación de los parámetros cinéticos: Actividad enzimática específica (AE), productividad específica (q_p), y rendimiento de formación de proteína por sustrato ($Y_{p/s}$).

Parámetro cinético	Ecuación	Unidades
AE	$\frac{U}{L \times \text{min}} \times \frac{\text{Vol. Buffer extracción (L)}}{\text{g. sust. seco}}$	U/g
AE	$\frac{\text{Actividad volumétrica}}{\text{Concentración de proteína}}$	U/mg
q_p	$\frac{(U/g)}{\text{Tiempo (días)}}$	U/g.día
$Y_{p/s}$	$\frac{\text{mg de proteína /L}}{\text{g sustrato seco}}$	mg/g

Donde:

U: Unidad enzimática ($\mu\text{moles/min}$)

AE: actividad enzimática específica

q_p : productividad específica

$Y_{p/s}$: rendimiento de formación de proteína por sustrato

Anexo N. Fórmula para el cálculo del porcentaje de humedad.

$$\text{Porcentaje de humedad} = \frac{\text{Peso húmedo} - \text{Peso seco}}{\text{Peso seco}} \times 100$$

Anexo O. Resultados de las pruebas bioquímicas de caseína, tirosina, citrato, almidón, catalasa, malonato, urea, nitrato, gelatina, meso-inositol, fructosa, trealosa, glucosa, manosa, maltosa, lactosa, sucrosa, arabinosa, sorbitol, xilosa y salicina realizadas para la identificación del actinomiceto degradador de lignocelulosa seleccionado.

CEPA	PRUEBAS BIOQUÍMICAS									
	Caseina	Tirosina	Citrato	Almidón	Catalasa	Malonato	Motilidad	Urea	Nitrato	Gelatina
AO12	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-

CEPA	PRUEBAS BIOQUÍMICAS											
	Meso-Inositol	Fructosa	Trealosa	Glucosa	Manosa	Maltosa	Lactosa	Sucrosa	Arabinosa	Sorbitol	Xilosa	Salicina
AO12	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+

Anexo P. Resultados obtenidos en las pruebas de fermentación en estado sólido para *Streptomyces sp.* AO12. empleando como sustrato salvado de trigo.

Azúcares reductores (g/L), proteína extracelular (mg/ml), pH y porcentaje de humedad.

TIEMPO DE INCUBACIÓN (días)	AZUCARES REDUCTORES (g/L)	PROTEINA EXTRACELULAR (mg/ml)	pH	% DE HUMEDAD
0	4,4	5,5	7	80
5	24,9	17,8	6,3	73,7
10	14,9	77,3	6,3	69,7

Actividad enzimática (U/ml), actividad específica (U/g de sustrato), actividad específica (U/mg de proteína), productividad específica (U/g de sustrato · día) y rendimiento de formación de proteína por sustrato (mg de proteína/g de sustrato) de Endo- β -1,4-Glucanasa, Exo- β -1,4-Glucanasa, β -Glucosidasa y Endo- β -1,4-Xilanasas para *Streptomyces sp.* AO12. empleando como sustrato salvado de trigo.

ENZIMA	TIEMPO DE INCUBACION (días)	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (U/ml)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/g de sustrato)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/mg de proteína)	PRODUCTIVIDAD ESPECÍFICA (U/g de sustrato · día)	RENDIMIENTO DE FORMACIÓN DE PROTEÍNA POR SUSTRATO (mg de proteína/g de sustrato)
Endo- β -1,4-Glucanasa	0	0	0	0	0	0
	5	0,6	3,8	0,09	0,8	0,99
	10	1,3	6,9	0,02	0,7	0,91
Exo- β -1,4-Glucanasa	0	0	0	0	0	0
	5	0,1	0,7	0,02	0,1	0,55
	10	0,05	0,2	0,01	0,02	0,35
β -Glucosidasa	0	0	0	0	0	0
	5	0,1	0,8	0,02	0,1	0,36
	10	0,07	0,4	0,22	0,04	0,13
Endo- β -1,4-Xilanasas	0	0	0	0	0	0
	5	7,9	47,9	0,32	9,6	0,87
	10	0,7	3,6	0,02	0,4	1,22

Anexo Q. Resultados obtenidos en las pruebas de fermentación en estado sólido para *Streptomyces sp.* AO12. empleando como sustrato bagazo de caña.

Azúcares reductores (g/L), proteína extracelular (mg/ml), pH y porcentaje de humedad.

TIEMPO DE INCUBACIÓN (días)	AZUCARES REDUCTORES (g/L)	PROTEINA EXTRACELULAR (mg/ml)	pH	% DE HUMEDAD
0	0,4	0,03	7	80
5	0,5	0,06	5	62,5
10	0,7	0,07	5	54,1

Actividad enzimática (U/ml), actividad específica (U/g de sustrato), actividad específica (U/mg de proteína), productividad específica (U/g de sustrato · día) y rendimiento de formación de proteína por sustrato (mg de proteína/g de sustrato) de Endo- β -1,4-Glucanasa, Exo- β -1,4-Glucanasa, β -Glucosidasa y Endo- β -1,4-Xilanasas para *Streptomyces sp.* AO12. empleando como sustrato bagazo de caña.

ENZIMA	TIEMPO DE INCUBACION (días)	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (U/ml)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/g de sustrato)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/mg de proteína)	PRODUCTIVIDAD ESPECÍFICA (U/g de sustrato · día)	RENDIMIENTO DE FORMACIÓN DE PROTEÍNA POR SUSTRATO (mg de proteína/g de sustrato)
Endo- β -1,4-Glucanasa	0	0	0	0	0	0
	5	0,02	0,3	0,66	0,05	0,09
	10	0,05	0,4	0,08	0,04	0,28
Exo- β -1,4-Glucanasa	0	0	0	0	0	0
	5	0,01	0,1	0,33	0,03	0,20
	10	0,001	0,01	0,02	0,001	0,19
β -Glucosidasa	0	0	0	0	0	0
	5	0,003	0,04	0,09	0,008	0,06
	10	0,006	0,05	0,14	0,005	0,05
Endo- β -1,4-Xilanasas	0	0	0	0	0	0
	5	0,01	0,1	0,33	0,02	0,08
	10	0,02	0,2	0,47	0,02	0,09

Anexo R. Resultados obtenidos en las pruebas de fermentación en estado sólido para *Streptomyces sp.* AO12. empleando como sustrato raquis de palma.

Azúcares reductores (g/L), proteína extracelular (mg/ml), pH y porcentaje de humedad para

TIEMPO DE INCUBACIÓN (días)	AZÚCARES REDUCTORES (g/L)	PROTEÍNA EXTRACELULAR (mg/ml)	pH	% DE HUMEDAD
0	0,1	0,01	7	80
5	0,7	0,08	6	56,4
10	0,9	0,2	5,8	45,7

Actividad enzimática (U/ml), actividad específica (U/g de sustrato), actividad específica (U/mg de proteína), productividad específica (U/g de sustrato · día) y rendimiento de formación de proteína por sustrato (mg de proteína/g de sustrato) de Endo- β -1,4-Glucanasa, Exo- β -1,4-Glucanasa, β -Glucosidasa y Endo- β -1,4-Xilanasa para *Streptomyces sp.* AO12. empleando como sustrato raquis de palma.

ENZIMA	TIEMPO DE INCUBACION (días)	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (U/ml)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/g de sustrato)	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (U/mg de proteína)	PRODUCTIVIDAD ESPECÍFICA (U/g de sustrato · día)	RENDIMIENTO DE FORMACIÓN DE PROTEÍNA POR SUSTRATO (mg de proteína/g de sustrato)
Endo- β -1,4-Glucanasa	0	0	0	0	0	0
	5	0,02	0,1	0,28	0,03	0,41
	10	0,04	0,2	0,1	0,02	0,48
Exo- β -1,4-Glucanasa	0	0	0	0	0	0
	5	0,01	0,1	0,14	0,02	0,19
	10	0,009	0,05	0,02	0,005	0,17
β -Glucosidasa	0	0	0	0	0	0
	5	0,004	0,04	0,06	0,008	0,15
	10	0,006	0,04	0,02	0,004	0,29
Endo- β -1,4-Xilanasa	0	0	0	0	0	0
	5	0,4	3,5	1,41	0,7	1,26
	10	0,8	4,4	0,74	0,4	1,47