

**HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE SUBPRODUCTOS LIGNOCELULÓSICOS  
GENERADOS DURANTE EL BENEFICIO DE LA PALMA ACEITERA PARA LA  
OBTENCIÓN DE JARABES FERMENTABLES.**

**INÉS HERNÁNDEZ CELI**

**FACULTAD DE SALUD  
ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA-DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS  
ESCUELA DE MEDICINA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS  
BUCARAMANGA  
2015**

**HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE SUBPRODUCTOS LIGNOCELULÓSICOS  
GENERADOS DURANTE EL BENEFICIO DE LA PALMA ACEITERA PARA LA  
OBTENCIÓN DE JARABES FERMENTABLES.**

**INÉS HERNÁNDEZ CELI**

**Tesis presentada como requisito para optar por el título de maestría en  
Ciencias Básicas Biomédicas**

**CLARA INÉS SÁNCHEZ SUÁREZ MSc. Microbiología  
Directora**

**DANIEL RICARDO MOLINA VELASCO Ph.D. Química  
Codirector**

**FACULTAD DE SALUD  
ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA- DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS  
ESCUELA DE MEDICINA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS  
BUCARAMANGA  
2015**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecimiento especial a mi tutora Clara Inés Sánchez Suárez, por su confianza, dedicación y paciencia durante el desarrollo de este trabajo. Por darme la oportunidad de compartir academia, trabajo y vida con la gran persona que es y la cual tiene mi total admiración.

Agradecimiento al profesor Daniel Ricardo Molina Velasco por la confianza, sus enseñanzas y por acompañarme en mi crecimiento profesional.

Agradezco a mi compañero, amigo y confidente Andrés Mauricio Rueda Rueda por enseñarme que todo puede ser peor y acompañarme de la mejor manera que sabe en esta experiencia.

En esta etapa de mi vida un total agradecimiento a mi familia en especial a mi mamá por su apoyo incondicional y a David por estar siempre ahí en los arduos días de trabajo.

Este trabajo se desarrolló gracias al apoyo del grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología y la financiación del proyecto “Aprovechamiento de los residuos del beneficio de la palma aceitera” adscrito a la vicerrectoría de investigación.

## **DEDICATORIA**

A Tata por su incondicional apoyo, por creer siempre en mí, este logro es de las dos.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	18
1 . MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE .....	21
1.1 BIOMASA LIGNOCELULÓSICA. ....	21
1.1.1 Generalidades.....	21
1.1.2 Uso de la biomasa lignocelulósica residual.....	22
1.1.3 Cultivo de Palma aceitera <i>Elaeis guineensis</i> en Colombia.....	23
1.2 CELULOSA. ....	24
1.3 HONGOS LIGNOCELULOLÍTICOS. ....	25
1.4 ENZIMAS CELULOLÍTICAS.....	28
1.4.1 Producción enzimática a partir de hongos.....	29
1.4.2 Hidrólisis enzimática celulolítica. ....	31
1.5 JARABES DE GLUCOSA.....	32
2 OBJETIVOS .....	34
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
3 METODOLOGÍA.....	35
3.1 SELECCIÓN DE MEDIO DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE HONGOS CELULOLÍTICOS.....	36
3.2 MUESTREO DE MATERIAL VEGETAL.....	36
3.3 AISLAMIENTO DE HONGOS FILAMENTOSOS.....	37
3.4 IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS.....	38
3.5 SELECCIÓN CUALITATIVA DE HONGOS FILAMENTOSOS CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA. ....	38
3.6 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS.....	39
3.7 CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA ESPECÍFICA PARA EXOGLUCANASA, ENDOGLUCANASA Y B- GLUCOSIDASA.....	40

3.8 SELECCIÓN DEL EXTRACTO CON MAYOR CAPACIDAD PARA LIBERAR AZÚCARES EN RESIDUO DE PALMA.....	41
3.9 DETERMINACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES ENZIMÁTICAS DEL EXTRACTO CON MAYOR CAPACIDAD DE LIBERACIÓN DE AZÚCARES EN RAQUIS Y FIBRA DE PALMA PARA LA PRODUCCIÓN DE JARABES FERMENTABLES.....	42
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
4.1 SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.....	43
4.2 MUESTREO DE MATERIAL VEGETAL.....	45
4.3 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS.....	46
4.4 SELECCIÓN CUALITATIVA DE HONGOS AISLADOS.....	48
4.5 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS.....	50
4.6 CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA ESPECÍFICA PARA EXO B- GLUCANASA, ENDO B- GLUCANASA Y B- GLUCOSIDASA.....	54
4.7 SELECCIÓN DEL EXTRACTO CON MAYOR CAPACIDAD PARA LIBERAR AZÚCARES EN SUBPRODUCTO DE PALMA.....	57
4.8 DETERMINACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES ENZIMÁTICAS DEL EXTRACTO SELECCIONADO PARA LA PRODUCCIÓN DE JARABES FERMENTABLES.....	61
5 CONCLUSIONES.....	67
6 RECOMENDACIONES.....	69
7 DIVULGACIÓN.....	70
BIBLIOGRAFÍA.....	71
ANEXOS.....	91

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de la lignocelulosa .....	22
<b>Figura 2.</b> Estructura química de la celulosa .....	24
<b>Figura 3.</b> Modelo de inducción celulasas en el hongo <i>Penicillium purpurogenum</i>	30
<b>Figura 4 .</b> Degradación enzimática de celulosa a glucosa .....	31
<b>Figura 5.</b> Diagrama de flujo de desarrollo metodológico .....	35
<b>Figura 6.</b> Disposición de material vegetal en caja de Petri.....	38
<b>Figura 7.</b> Hidrólisis de carboximetilcelulosa (CMC). .....	48

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Medio de cultivo agar palma (AP).....	44
<b>Tabla 2.</b> Composición química del material lignocelulósico molido .....	44
<b>Tabla 3.</b> Frecuencia relativa porcentual del número de hongos colectados .....	46
<b>Tabla 4.</b> Número y porcentaje de aislamientos identificados por claves taxonómicas.....	46
<b>Tabla 5.</b> Cuantificación de enzimas de los extractos EXLTMA 12, 16, 31, 32 y 39 .....	55
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de sacarificación de los EXTLMA 12, 16, 31, 32 y 39.....	59
<b>Tabla 7.</b> Representación de los niveles sobre los cuales se realizó la matriz del diseño .....	62
<b>Tabla 8.</b> Valores de P- para las variables de respuesta .....	63
<b>Tabla 9.</b> Combinación de factores que maximizan la obtención de azúcares a partir de raquis y fibra de palma con el extracto enzimático EXTLMA12. ....	65

..

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Selección de cepas con mayor halo de hidrólisis sobre CMC..	49
<b>Gráfico 2.</b> Actividad celulolítica total, de los aislamientos: LMA 12, LMA 16, LMA 31, LMA 32, LMA 39, en el periodo de 0 a 24 días.	51
<b>Gráfico 3.</b> Cuantificación de proteínas totales, de los aislamientos: LMA 12, LMA 16, LMA 31, LMA 32, LMA 39, en el periodo de 0 a 24 días.	52
<b>Gráfico 4.</b> Cuantificación de azúcares liberados por los extractos enzimáticos EXLTMA: 12, 16, 32, 32 y 39.	58
<b>Gráfico 5.</b> Cuantificación de glucosa liberada por los extractos enzimáticos EXLMA: 12, 16, 31, 32 y 39.	59
<b>Gráfico 6 .</b> Diagramas de Pareto estandarizado sobre las variables de respuesta; azúcares reductores liberados y glucosa.	62
<b>Gráfico 7.</b> Superficie de respuesta y contorno para la variable de respuesta azúcares totales.	63
<b>Gráfico 8.</b> Superficie de respuesta y contorno para la variable de respuesta glucosa	64

**Gráfico 9.** Obtención de azúcares totales utilizando 0,80 UPF \*ml<sup>-1</sup> y 0,160 UPF\*ml<sup>-1</sup> .....65

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo A.</b> Medios de cultivo.....	91
<b>Anexo B.</b> . Cuantificación de proteínas.....	94
<b>Anexo C.</b> Cuantificación de azúcares y glucosa .....	95
<b>Anexo D.</b> Determinación de actividad celulolítica total.....	96
<b>Anexo E.</b> Cepas fúngicas colectadas, con el código asignado para el manejo de laboratorio y la muestra de la cual fueron aisladas.....	98
<b>Anexo F.</b> Fotografías microscópicas y microscópicas de los géneros aislados. ...	99
<b>Anexo G.</b> Tamaño y halo de hidrólisis de los aislamientos evaluados cualitativamente .....	101

## GLOSARIO DE SIGLAS

AP: Agar palma

ASC: Agar salvado celulolítico

ATCC: Colección americana de tipo de cultivos

CAS: Corporación Autónoma de Santander

CD: Dominio catalítico

CBD: Dominio de unión a sustrato

DNS: Acido 3,5-dinitrosalicílico

DC: Diámetro de colonia

ED: Equivalente dextrosa

EXTLMA: Extracto enzimático de aislamiento en el laboratorio de micología Ascomycetos

FTCCC: Colección de cultivos del Centro de Investigaciones Pecuarias del instituto de Investigación para la Agricultura y el desarrollo de Malasia

Ha: Hectárea

HH: Halo de hidrólisis

IFO: Instituto para las fermentaciones Osaka

LMA: Laboratorio de micología Ascomycetos

MC: Medio de cultivo celulosa

MCMC: Medio de cultivo carboximetilcelulosa

MFS: Medio para fermentación en estado sumergido

PBS: Buffer fosfato salino

PDA: Agar papa dextrosa

p-NPG: p-Nitrophenyl  $\beta$ - D –glucopyranoside

t: Tonelada

## RESUMEN

**TÍTULO: HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE SUBPRODUCTOS LIGNOCELULÓSICOS GENERADOS DURANTE EL BENEFICIO DE LA PALMA ACEITERA PARA LA OBTENCIÓN DE JARABES FERMENTABLES\***

**AUTOR: INÉS HERNÁNDEZ CELI\*\***

**PALABRAS CLAVE:** Cepas fúngicas, celulasas, hidrólisis enzimática, sacarificación.

### DESCRIPCIÓN

Se realizó colecta de muestras de hojarasca, suelo, madera y macromicetos entre los municipios de Zapatoca y San Vicente de Chucuri en el departamento de Santander para el aislamiento de hongos con capacidad celulolítica.

El medio de cultivo para el aislamiento primario estuvo compuesto de raquis y fibra de palma como única fuente de carbono. Las cepas aisladas fueron identificadas por claves taxonómicas hasta género y sometidas a selección cualitativa; evaluando la capacidad de hidrólisis de carboximetilcelulosa (CMC) expuesto con rojo de congo 0,1% y NaCl 1M. Los principales resultados encontrados fueron: 42 aislamientos identificados como: 16 *Trichoderma* spp.; 15 *Aspergillus* spp.; 6 *Penicillium* spp.; 3 *Eupenicillium* spp.; 1 *Beauveria* spp. y 1 *Fusarium* spp. Cepas de las cuales; 41 presentaron capacidad hidrolítica sobre CMC evidenciado con un halo alrededor de la colonia.

A partir del tamaño del halo de hidrólisis se seleccionaron 20 cepas que posteriormente fueron sometidas a fermentación sumergida por 12 días para la obtención de extractos enzimáticos, sobre los cuales se evaluó; capacidad celulolítica total, proteínas totales, cuantificación de azúcares reductores y medición de pH.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de actividad celulolítica total; se seleccionaron 5 extractos que presentaron alrededor de 0,20 UPF\*ml<sup>-1</sup>, extractos en los cuales se realizó cuantificación de actividad específica exo β- glucanasa, endo β- glucanasa y β- glucosidasa y simultáneamente proceso de sacarificación en palma. Para finalmente seleccionar el extracto EXTLMA 12 como el de mayor capacidad hidrolítica.

Con el EXTLMA12 y un Diseño de Experimentos se determinaron las mejores condiciones de hidrólisis; 25 °C, pH 4,5, obteniendo 1,8 mg\*ml<sup>-1</sup> de azúcares totales a partir de 1,5 mg de palma usando relación 4: 6 extracto enzimático- buffer acetato.

\* Tesis

\*\* Universidad Industrial de Santander. Facultad de salud. Escuela de microbiología y Departamento de Ciencias Básicas de la Escuela de Medicina. Directora: Clara Inés Sánchez Suárez. Codirector: Daniel Ricardo Molina Velasco.

## ABSTRACT

**TÍTULO: ENZYMATIC HYDROLYSIS OF LIGNOCELLULOSIC RESIDUES FROM OIL PALM EXTRACTION FOR SYRUP FERMENTABLES OBTENTION \***

**AUTHOR: INÉS HERNÁNDEZ CELI\*\***

**KEYWORDS:** Fungal strains , cellulases, enzymatic hydrolysis , saccharification

### **DESCRIPTION:**

The isolation of fungi with cellulolytic capacity from samples of leaves, soil, wood and macromycetes was made between Zapatoca and San Vicente de Chucuri, towns in Santander state.

The culture medium for primary isolation consisted of rachis and palm fiber as carbon source, mainly. The isolates were identified by taxonomic keys until genus. The qualitative screening of isolations was based in ability hydrolyzing carboxymethylcellulose (CMC), exposed with 0.1% Congo red and 1M NaCl. The main results were: 42 isolates identified as: 16 *Trichoderma* spp; 15 *Aspergillus* spp.; 6 *Penicillium* spp.; 3 *Eupenicillium* spp.; 1 *Beauveria* spP and 1 *Fusarium* spp. 41 isolations showed hydrolytic capacity on CMC, with a halo around the colony.

Based in the hydrolysis zone size, 20 strains were selected for submerged fermentation by 12 days to obtain enzymatic extracts. The cellulolytic capacity, total proteins, reducing sugars and pH, of extracts was measured.

Five enzymatic extracts were select for reach 0.20 UPF \* ml<sup>-1</sup>, to these selections was made specific quantification of activities: exo-β- glucanase , β- glucanase and endo β- glucosidase and simultaneous saccharification in Palma. The extract EXTLMA 12 was finally selected by the highest hydrolytic capacity.

To the EXTLMA12 extract was made a design experiments and it determined the best hydrolysis conditions: 25 ° C, pH 4.5, 1.8 mg \* ml<sup>-1</sup>. Was possible obtain a total sugars from palm using 1.5 mg with ratio of 4: 6 Enzymatic extract- acetate buffer.

\* Thesis

\*\* Universidad Industrial de Santander. Facultad de salud. Escuela de microbiología y Departamento de Ciencias Básicas de la Escuela de Medicina. Directora: Clara Inés Sánchez Suárez. Codirector: Daniel Ricardo Molina Velasco

## INTRODUCCIÓN

El incremento en la demanda de energía ha promovido a nivel mundial la búsqueda de fuentes de energía renovable, principalmente la obtención de biocombustibles como: etanol derivado de la caña de azúcar o cereales y biodiesel a partir de soja, semillas y aceites vegetales (Jørgensen, 2007; Binod *et al.*, 2011; Cardona y Sánchez, 2007). En Colombia, el gobierno ha incentivado el cultivo de oleaginosas como *Elaeis guineensis* (Martinez *et al.*, 2005) para la producción de biocombustibles; alternativa que se ha visto afectada por la acumulación de biomasa residual (Sanchez, 2009; Howard, 2003).

Para los departamentos de Meta, Cesar y Santander, mayores cultivadores de palma africana del país (Fedepalma, 2013) el manejo de la biomasa residual ha presentado efectos perjudiciales e ineficientes para la industria; la disposición del material residual en cultivos ha tenido impactos negativos por el aumento de roedores, reptiles e insectos que propagan y ocasionan fitopatologías (Pallares *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2008), el requerimiento de maquinaria e infraestructura para la producción de compost (Gutiérrez *et al.*, 2009), gastos adicionales de energía, generación de emisiones producto de la combustión del material en las calderas; resultando un manejo ambientalmente inadecuado (Humboldt, 2000; Chavalparit *et al.*, 2006).

Cabe destacar que durante el proceso de extracción del aceite y de la almendra de esta agroindustria la generación de biomasa residual es alta (40,5%) (Fedepalma, 2013), por cada 100 toneladas (t) de fruto fresco se generan subproductos tales como: frutos vacíos (20 t), fibra (12 t), cascarilla (6 t), sólidos (2 t), cenizas (0,5 t) entre otros (Yang, 1996; Sulaiman *et al.*, 2011); material compuesto principalmente por celulosa (48,4%), hemicelulosa (28,5%) y lignina (22,9%) (Timiselma *et al.*, 2012).

Debido a las características estructurales y con el fin de aprovechar la biomasa, las grandes producciones han planteado pre-tratamientos físicos (reducción mecánica), fisicoquímicos (explosión por vapor, pirolisis) o químicos (hidrólisis alcalina, hidrólisis ácida) (Cardona *et al.*, 2010; Tomás-Pejó *et al.*, 2011; Cerveró *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2014) y así posterior al pre-tratamiento el material ha sido utilizado en industria papelera, en procesos de compostaje (Sridhar *et al.*, 2009; Alkoaik *et al.*, 2011), en alimentación para humanos y animales (Fedepalma, 2013) y en la obtención de jarabes de glucosa como sustrato para la producción de alcoholes carburantes (Al-zuhair *et al.*, 2013; Dwivedi *et al.*, 2009; Olofsson *et al.*, 2008).

Otra alternativa que se ha investigado es utilizar estos subproductos como materia prima en procesos biotecnológicos: empleando enzimas celulolíticas provenientes de hongos filamentosos de colecciones biológicas o aislamientos in situ (Prasertsan y Oi., 1992; Abdesahian *et al.*, 2011; Mun *et al.*, 2008) o implementando la hidrólisis con complejos enzimáticos comerciales (Cerveró *et al.*, 2010) para la obtención de jarabes fermentables usados en la producción de bioetanol de segunda generación (Shamsudin *et al.*, 2012; Bakar *et al.*, 2012).

Aunque la hidrólisis enzimática es planteada como la mejor alternativa para aprovechar biomasa lignocelulósica, el proceso se ha visto obstaculizado por el alto costo de los extractos enzimáticos. Durante el 2005 se estimó que Brasil; pionero en alcohol lignocelulósico en sur América, realizó importaciones de enzimas por valores cercanos a los 126.6 millones de dólares, razón por la cual es de gran interés la búsqueda de organismos productores de celulasas, que se postulen como fuente de enzimas, ayudando a disminuir costos de implementación del proceso y que permitan mejorar las condiciones ya existentes en el mercado (Bon y Ferrara, 2007).

Teniendo en cuenta la problemática nacional y el desaprovechamiento de los subproductos de la industria palmera en el país se considera interesante investigar

en la biodiversidad colombiana la búsqueda de cepas nativas, de las cuales se puedan obtener extractos enzimáticos que tengan la capacidad hidrolítica sobre la celulosa presente en la fibra y raquis de palma implementando una alternativa ambiental favorable en la disposición de este material y dando un valor agregado a la cadena de producción por la obtención de jarabes fermentables que sirvan como materia prima para la generación de biocombustibles (Lim, 2010).

Para ello se propone en esta investigación, aislar hongos nativos con capacidad celulolítica de los cuales se puedan obtener extractos enzimáticos que hidrolicen la celulosa presente en los subproductos de la industria palmera y así producir jarabes fermentables que sirvan como materia prima para la generación de biocombustibles.

Esta propuesta de investigación está enmarcada dentro del proyecto “Aprovechamiento de los residuos del beneficio de la Palma aceitera” donde se investigan diferentes aplicaciones de la biomasa de palma y la disposición final de los subproductos para dar un valor agregado.

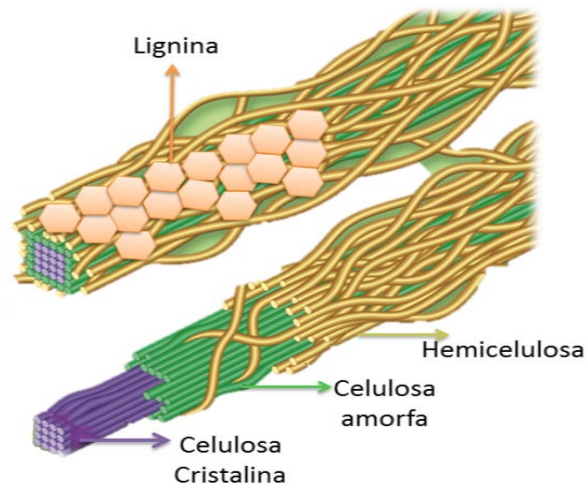
## 1 . MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

### 1.1 BIOMASA LIGNOCELULÓSICA.

**1.1.1. Generalidades.** El término biomasa se relaciona con la cantidad de materia orgánica proveniente de un proceso biológico; en la naturaleza se forma a partir de luz solar por medio de la fotosíntesis (Pérez *et al.*, 2002). Está compuesta principalmente por lignocelulosa, junto con pequeñas cantidades de pectina, proteínas, azúcares no estructurales, material nitrogenado, clorofila, ceras y ceniza (Burton *et al.*, 2010). Se puede clasificar en: biomasa natural, producida en los ecosistemas naturales; y biomasa residual, generada como subproducto durante el aprovechamiento de los sectores agrícola, forestal e industrial (Lozanoff *et al.*, 2007).

La lignocelulosa, principal componente de la biomasa es la estructura principal de la pared celular vegetal, su contenido varía dependiendo de la especie de planta, la edad y las condiciones de crecimiento (Carpita *et al.*, 2001). Está compuesta por polímeros estructurales, lignina, celulosa, y hemicelulosa, externamente se encuentra la lignina; red compleja formada por la polimerización de unidades fenil propano, constituyente no polisacárido unido por enlaces covalentes con la hemicelulosa; polisacárido complejo y heterogéneo compuesto de residuos monoméricos (D-glucosa, D-galactosa, D-xilosa, L-arabinosa, ácido D-manosa, D-glucurónico y 4-O-metil-D-ácido glucurónico). Entre la lignina y la hemicelulosa se encuentran fibrillas de celulosa incrustadas, conocidas como celulosa amorfa e internamente unas fibrillas compactas de celulosa cristalina; homo-polisacárido compuesto en su totalidad por moléculas de D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídicos, puentes hidrógeno y fuerzas de Van der Waals (Kirk, 1983; Rubin, 2008) ver (**Figura 1**).

**Figura 1.** Estructura de la lignocelulosa (Modificado de: US DOE. 2005. Genomics: GTL Roadmap, DOE/SC-0090, U.S. Department of Energy Office of Science. (p. 204))



La principal fuente de residuos lignocelulósicos son las agroindustrias (Sánchez, 2009) seguidas por la madera, la hierba forestal, los desechos y los residuos sólidos urbanos (Hu *et al.*, 2008).

**1.1.2 Uso de la biomasa lignocelulósica residual.** La lignocelulosa residual es una fuente de energía renovable; la cual sirve como sustrato para la obtención de bioetanol, ayudando a contrarrestar los efectos negativos en la seguridad alimentaria que ha sido controversial en el uso caña de azúcar, almidón de cereales, tubérculos (maíz, patatas) y oleaginosas, entre otros, para la producción de biocombustibles (Jørgensen, 2007). Adicionalmente proporciona una solución al exceso de biomasa residual que producen agroindustrias como: las productoras de cereales (Trigo, arroz, cebada avena, soja y maíz), empresas de procesamiento de frutas y verduras, extractoras de azúcar de caña, extractoras de aceites y oleaginosas (Nueces, semillas de algodón y aceitunas) y las fabricas madereras (Howard, 2003).

**1.1.3 Cultivo de Palma aceitera *Elaeis guineensis* en Colombia.** Colombia en la búsqueda de fuentes de energía renovable ha incentivado el cultivo de diferentes agroindustrias principalmente la palmera (Conpes 3510, 2008). Para finales del año 2012 en el territorio nacional se estimaron 452.435 hectáreas (ha) sembradas de palma (Fedepalma, 2013). Teniendo en cuenta que durante el año 2006, el país con 292.570 ha sembradas obtuvo 352.635 toneladas de biomasa residual (Fedepalma, 2011; Escalante *et al.*, 2006), la proporción de biomasa producida para finales el 2012 estuvo alrededor del doble de la reportada durante el 2006.

La palma de aceite o palma Africana (*Elaeis guineensis*) es una planta tropical, monoica de troncos solitarios, hojas pinnadas, con peciolos ligeramente espinosos, foliolos insertados irregularmente dando un aspecto plumoso, las flores masculinas y femeninas dan origen a frutos ovoides o alargados para conformar racimos compactos de 10 a 40 kilogramos de peso (Mora *et al.*, 1997; Obahiagbon, 2012).

El principal producto comercial de la palma aceitera es el aceite crudo el cual corresponde a un 43% del total de la producción, es extraído del mesocarpio del fruto (Yang, 1996) y es utilizado como materia prima para la producción de biodiesel por la trans-esterificación de los ácidos grasos o para consumo humano por medio de la refinación (Fedepalma, 2013).

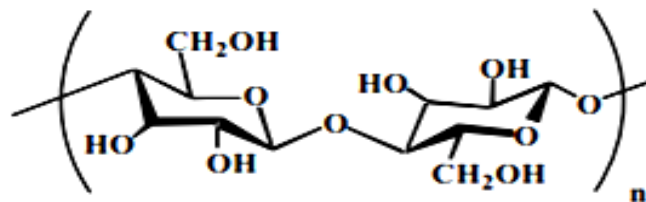
Durante la extracción del aceite se generan grandes cantidades de biomasa residual, representada en raquis o frutos vacíos (20%), cáscara (6%), fibra del mesocarpio (12%), cenizas (0.5%), sólidos (2%) y agua (20%) (Yang, 1996). Estructuralmente los subproductos del aprovechamiento están compuestos por celulosa, lignina y hemicelulosa (Gutiérrez *et al.*, 2009), su concentración varía dependiendo del subproducto, es así que los raquis contienen 48.4% de celulosa, 28.5% de hemicelulosa y 22.9% de lignina (Timilsema *et al.*, 2013); mientras que la fibra contiene 42.7–65% de celulosa, 17.1–33.5% de hemicelulosa y 13.2–

25.31% lignina (Shinoj *et al.*, 2011), siendo el componente mayoritario para los dos la celulosa.

## 1.2 CELULOSA.

La celulosa es un biopolímero lineal, homopolisacárido constituido por moléculas de D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos, insoluble en agua (Emsley y Steven, 1994) (**Figura 2**), es el principal constituyente de la membrana celular de las plantas maderables con un 40% de peso seco (Sjöström, 1993). La celulosa se agrupa en micro fibrillas unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals intermoleculares, formando una región cristalina insoluble y una región amorfa que es la de mayor susceptibilidad a la degradación enzimática (Hatakeyama y Hatakeyama, 2005).

**Figura 2.** Estructura química de la celulosa tomada de Hatakeyama y Hatakeyama, 2005



Para obtener la celulosa de las plantas, o de cualquier tipo de biomasa residual, se realizan pre-tratamientos los cuales se clasifican en: físicos (Millet, en 1976 citado por Sun *et al.*, 2002; Milosavljevic *et al.*, 1996), físico-químicos (Tabil *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 1998) químicos (Tomas-Pejo *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2009; Knill y Kennedy, 2003; Kumar *et al.*, 2009) y biológicos; caracterizados por someter el material lignocelulósico a la acción de microorganismos o sus enzimas, principalmente obtenidas de los hongos de la podredumbre blanca, marrón o blanda (Goodell *et al.*, 2002), que tienen la capacidad enzimática de

despolimerizar la lignina y la hemicelulosa para acceder a la celulosa y realizar su posterior hidrólisis para obtención de azúcares.

### **1.3 HONGOS LIGNOCELULOLÍTICOS.**

Los hongos y las bacterias son organismos capaces de degradar madera y otros materiales lignocelulósicos; para las bacterias es un proceso lento porque requieren condiciones óptimas de humedad y un daño mecánico para acceder al material por su carente capacidad de penetración (Kuhad *et al.*, 1997). Por otra parte, los hongos por su capacidad de penetración mecánica y química se perfilan como óptimos degradadores de material lignocelulósico y son los principalmente estudiados (Fan *et al.*, 1982; Tabil *et al.*, 2011)

Los hongos son organismos eucariotas, unicelulares o pluricelulares, nutricionalmente heterótrofos y quimiorganotrofos, toman sus nutrientes por absorción de unidades simples, las que obtienen a partir de la degradación enzimática extracelular de polímeros (Cepero *et al.*, 2012).

Estos organismos se caracterizan por presentar quitina como constituyente de la pared celular y ergosterol en la membrana celular (Sánchez, 2012). Estructuralmente presentan dos formas; filamentosa cuya unidad funcional son las hifas, las cuales tienen diferenciación entre las estructuras de reproducción y las estructuras somáticas y levaduriforme que se caracterizan por no presentar distinción entre cuerpo vegetativo (somático) y reproductivo. Algunos presentan estructuras de reproducción macroscópicas y su reproducción puede ser sexual y/o asexual (Petersen, 2012; Cepero *et al.*, 2012).

La taxonomía fúngica ha variado con los años, en la actualidad se presentan cinco divisiones: Chytridiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Basidiomycota y Ascomycota (Petersen, 2012).

Los hongos pertenecientes a las divisiones Basidiomycota y Ascomycota son considerados superiores porque tienen hifas septadas que impiden la pérdida de citoplasma en el rompimiento de su pared por la compartimentalización, por ello son más resistentes y tienen un papel importante en el ciclo del carbono actuando como descomponedores de la materia orgánica en el suelo (Gilbertson, 1980; Cepero *et al.*, 2012). Estos organismos tienen la capacidad de degradar material lignocelulósico por la producción de celulasas extracelulares (Lynd *et al.*, 2002).

La degradación del material lignocelulósico se conoce con el término de pudrición, puede ser de tres tipos: blanda, café y blanca. La pudrición blanda consiste en la hidrólisis de los polisacáridos del material celulósico y en la modificación de la lignina de manera limitada. Algunos microorganismos capaces de realizar esta degradación son: *Chaetomium cellulolyticum*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride (reesei)*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium janthinellum* y diferentes especies de *Paecilomyces*, entre otros (Hatakka y Hammel, 2010; Kuhad *et al.*, 1997)

La pudrición café se caracteriza por hidrolizar preferentemente la celulosa y la hemicelulosa, esto se puede dar en dos procesos; hidrolizando la estructura interna del polímero de forma aleatoria por endoenzimas o rompiendo el extremo no reductor de la molécula liberando oligómeros que van a ser degradados de modo sinérgico por el complejo de enzimas extracelulares tipo exoenzimas (Moore, 1998). Algunos organismos característicos son *Poria placenta*, *Tyromyces balsemeus*, *Gloeophyllum trabeum*, *Lentinus lepideus* y *Fomitopsis pinicola* (Hatakka y Hammel, 2010; Kuhad *et al.*, 1997).

La pudrición blanca es realizada por hongos de podredumbre blanca son los únicos que pueden degradar lignina, celulosa y hemicelulosa, atacan simultáneamente componentes de la pared celular erosionando regiones localizadas de las capas de la pared celular y se extienden a través de la pared celular secundaria y la lámina media, ocasionando agujeros en las paredes adyacentes. Los hongos de pudrición blanca que han sido estudiados principalmente son: *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Heterobasidium annosum*, *Phellinus pini*, *Pleurotus ostreatus*, (Hatakka y Hammel, 2010; Kuhad *et al.*, 1997).

Dentro de las aplicaciones de los hongos a nivel agroindustrial se encuentran la degradación de biomasa (Howard, 2003; Jorgense *et al.*, 2007; Sánchez, 2009) y el tratamiento de aguas residuales (Freitas *et al.*, 2009; Tian *et al.*, 2012; Leeuwen *et al.*, 2012; Kuijk *et al.*, 2015). Las investigaciones incluyen cepas comerciales y aislamientos de hongos in situ del material residual como: racimos vacíos, torta prensada, lodos obtenidos de extractoras de aceite de palma (Prasertsan *et al.*, 1992), cascarilla de arroz (Darmwal y Gaur, 1991), bagazo de caña (Ferrer *et al.*, 2011), entre otros.

En la investigación realizada por Prasertsan y Oi, 1992, utilizaron *Aspergillus niger* de la Colección Americana de tipo de Cultivos (ATCC), *Myceliophthora thermophila* cepa del Instituto para las Fermentaciones Osaka (IFO) y aislamientos del material lignocelulósico para obtener extractos enzimáticos, los cuales fueron usados en un proceso de sacarificación sobre torta de palma comparando su eficiencia con tres enzimas comerciales: meicellase, celulosin y sumyzyme, obteniendo como principal resultado que el extracto enzimático producto de un aislamiento local tuvo mayor sacarificación sobre la torta de palma sin tratar en comparación con los extractos enzimáticos comerciales.

#### 1.4 ENZIMAS CELULOLÍTICAS.

Las enzimas celulolíticas son hidrolasas, de origen fúngico o bacteriano, se diferencian de otras enzimas por su capacidad para hidrolizar enlaces  $\beta$ -1-4 glucosídicos presentes en celulosa, celulodextrinas solubles, carboximetilcelulosa, hidroxietil celulosa, entre otras (Lynd *et al.*, 2002).

Según su actividad enzimática se pueden clasificar en endoglucanasas o 1,4- $\beta$ -D-glucan-4-glucanohidrolasas (EC 3.2.1.4), cuando hidrolizan al azar sitios de la cadena de celulosa en su forma amorfa (carboximetilcelulosa y celooligosacáridos), generando oligosacáridos como glucosa, celobiosa y celotriosa; exoglucanasas cuando actúan sobre los extremos no reductor y reductor del polisacárido, dentro de estas las exoglucohidrolasas o 1,4- $\beta$ -D-glucanohidrolasas (EC 3.2.1.74) son exclusivas para los extremos no reductores y las celobiohidrolasas o 1,4- $\beta$ -D-glucancelobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) actúan tanto en enlaces de los extremos reductores como de los no reductores liberando celobiosa; y  $\beta$ -glucosidasas o glucohidrolasas (CE 3.2.1.21) que hidrolizan celobiosa y otros  $\beta$ -1,4 oligoglucósidos de cadena corta, como las celulodextrinas solubles, obteniendo glucosa libre como producto final (Maheshwari *et al.*, 2000; Binod *et al.*, 2011; Bhat y Bhat, 1997).

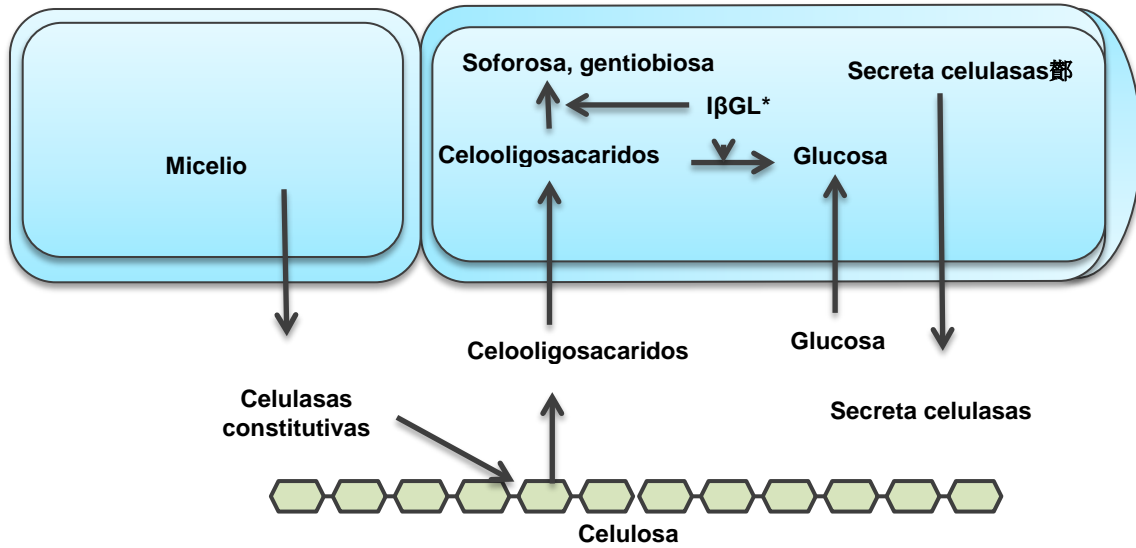
Las celulasas estructuralmente poseen un núcleo central que contiene un dominio catalítico (CD) activo unido por una región extendida o cola que contiene una región altamente glicosilada y uno o más dominios de unión a celulosa (CBD), los cuales sirven de anclaje para facilitar la accesibilidad al enlace glicosídico del centro activo (Esterbauer *et al.*, 1991). Las variaciones de la cadena polipeptídica, el carbono o nitrógeno terminal presentes en el CDB, es lo que permite la especificidad hacia los sustratos (Doheny *et al.*, 1999).

Las celulasas han sido ampliamente estudiadas debido a sus aplicaciones industriales. Por ejemplo, en la industria alimentaria y licorera se usa en la hidrólisis de polisacáridos para mejorar la absorción de agua en los cereales, en el

mejoramiento de la calidad de los alimentos fermentados, en sopas deshidratadas, en la producción de oligosacáridos como ingredientes de alimentos, en el mejoramiento de los procesos de producción de cerveza y vino reduciendo la viscosidad durante la fermentación. En la industria textil; para disminuir el exceso de tinte en los tejidos del denim, para suavizar el algodón, para eliminar del exceso de microfibrillas en el algodón, en el biopulido de algodón y telas. En la industria del papel; en la modificación de la fibra y destintado de fibras recicladas. En la industria agropecuaria para la producción en la planta de protoplastos fúngicos híbridos y mutantes para el control de enfermedades (Bhat, 2000) y en la conversión de biomasa residual de diferentes agro-industrias (Sanchez, 2009).

**1.4.1 Producción enzimática a partir de hongos.** En los hongos las enzimas celulolíticas son inducibles, sin embargo se ha demostrado que presentan enzimas basales unidas a la pared de las hifas o conidias, siendo estas enzimas las responsables de la formación de los inductores (Carle-Urioste *et al.*, 1997; Kubicek, 1981; Umile y Kubicek, 1986). La inducción enzimática de las celulasas comienza con las celobiohidrolasas y endoglucosidasas presentes en la superficie de las conidias y la pared del micelio; las enzimas degradan la celulosa en celooligosacaridos que posteriormente por medio de una  $\beta$ -glucosidasa son hidrolizados en glucosa o transglucosilados para la formación de inductores como la soforosa y gentiobiosa, entre otros (Suto y Tomita, 2001). Este ciclo continua hasta finalizar el sustrato o cuando la cantidad de glucosa supera la necesaria y actúa como represor de la síntesis de enzimas (Mandels y Reese, 1956), ver **(Figura 3)**.

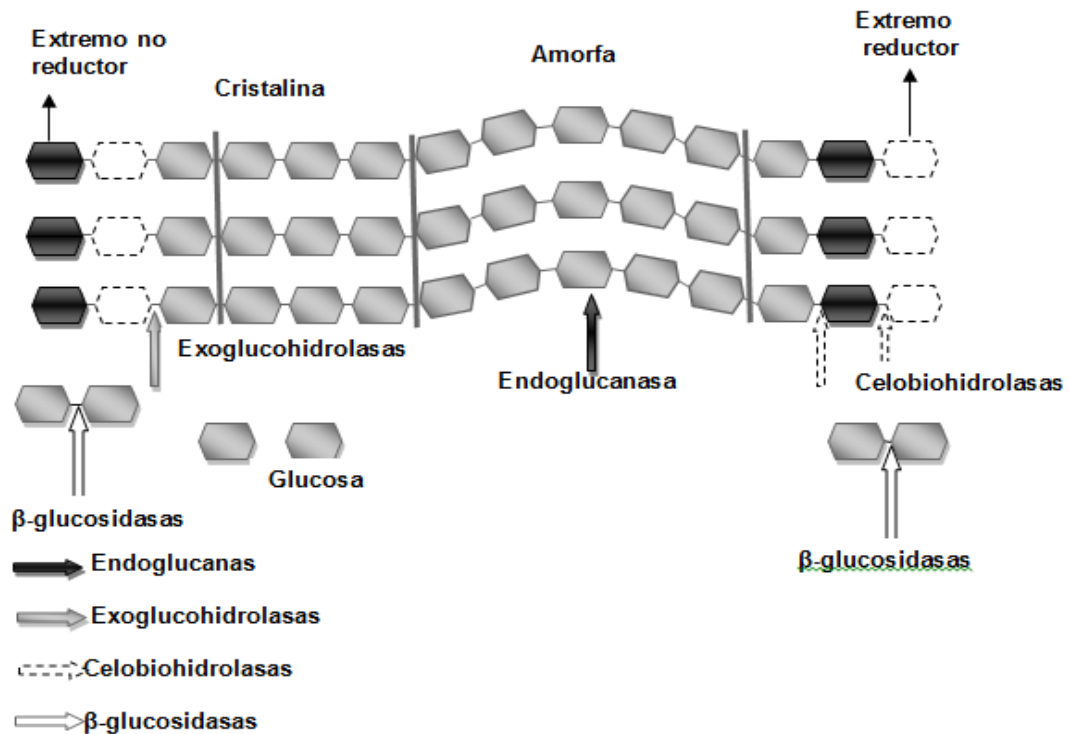
**Figura 3.** Modelo de inducción celulasas en el hongo *Penicillium purpurogenum*  
 \*I $\beta$ GL,  $\beta$ -glucosidasa intracelular (adaptado de Suto y Tomita, 2001)



Durante la obtención de enzimas celulolíticas se han utilizado cepas fúngicas de referencia y nativas. Se han empleado cepas de *Aspergillus niger* de la colección de cultivos del Centro de Investigaciones Pecuarias del instituto de Investigación para la Agricultura y el desarrollo de Malasia (FTCCC) sobre torta de palmiste para la producción de celulasas, presentando actividad alrededor de 244,53 U/g, (Abdeshahian *et al.*, 2011). Igualmente con cepas nativas se han obtenido enzimas a partir de *Aspergillus niger* y *Trichoderma sp*, empleadas sobre sólidos presentes en los efluentes y comparadas con enzimas comerciales, presentando mayor capacidad hidrolítica las enzimas obtenidas de las cepas fúngicas nativas (Mun *et al.*, 2008).

**1.4.2 Hidrólisis enzimática celulolítica.** La celulosa es hidrolizada por la actividad sinérgica de tres enzimas; las endoglucanasas van a ligarse al azar sobre las microfibrillas de celulosa en las regiones amorfas, produciendo la rotura de los enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos, generando extremos no reductores y reductores que serán reconocidos por las exoglucanasas que específicamente reconocerán el extremo no reductor por medio de las exoglucohidrolasas y el extremo reductor y no reductor por medio de las celobiohidrolasas liberando unidades de celobiosa o pequeños oligómeros, sobre los cuales actuara hidrolizando los enlaces  $\beta$ -1,4 las enzimas  $\beta$ -glucosidasas dejando libre moléculas de glucosa, producto de la actividad sinérgica (Dashtban *et al.*, 2009) ver (Figura 4).

**Figura 4 .**Degradación enzimática de celulosa a glucosa (Modificado de Pérez *et al.*, 2002)



## 1.5 JARABES DE GLUCOSA.

Los jarabes de D-glucosa son una mezcla acuosa de D-glucosa, maltosa y otros oligosacáridos llamados dextrinas, los cuales se clasifican según la equivalencia de dextrosa (ED): siendo el porcentaje en peso de glucósidos reductores presentes en el jarabe con respecto al peso de sólidos totales del oligosacárido, propuesto por Sánchez, 2002, citado por (Ruiz, 2009)

Dependiendo de la equivalencia de dextrosa su clasificación es la siguiente:

- Jarabe tipo I del 20 -38% de azúcares
- Jarabe tipo II 38 – 58% de azúcares
- Jarabe tipo III 58-73% de azúcares
- Jarabe tipo IV > 73 % de azúcares

Los jarabes fermentables son los pertenecientes al grupo III, del 58-73% de azúcares.

Con el sustrato de interés y demás subproductos lignocelulósicos se han hecho diferentes estudios con hidrólisis enzimática para la obtención de jarabes fermentables entre ellos: Cerveró *et al.*, 2010 realizaron hidrólisis enzimática de torta de palmiste pretratada y sin tratar con enzimas comerciales para producción de jarabes fermentable y posteriormente etanol. Se demostró que la torta de palmiste era materia prima promisoría para la producción de bioetanol; obteniendo alrededor del 75% de polisacáridos contenidos en la torta, sin necesidad de pre tratamiento.

Bakar *et al.*, 2012, obtuvo azúcares fermentables usando como sustrato racimos de frutos vacíos con extracto de celulasas de *Trichoderma asperellum* y *Aspergillus fumigatus* y un coctel de estos dos, alcanzando una producción de azúcares reductores alrededor de 8,37 g/L con el uso del coctel enzimático.

Shamsudin *et al.*, 2012, investigaron la producción de azúcares a partir de los frutos vacíos sometidos a explosión por vapor durante la extracción y una posterior molienda. Obteniendo como principal resultado una mayor producción de azúcares en los frutos vacíos sin tratar, lo cual les permitió concluir que no es necesario el uso de sustancias químicas para generar una mayor disposición de la celulosa en el material.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Obtener jarabes fermentables por medio de la degradación enzimática de los subproductos lignocelulósicos generados durante el beneficio de la palma aceitera.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Aislar y seleccionar hongos filamentosos para la obtención de extractos enzimáticos capaces de hidrolizar celulosa y subproductos generados del beneficio de la palma aceitera.

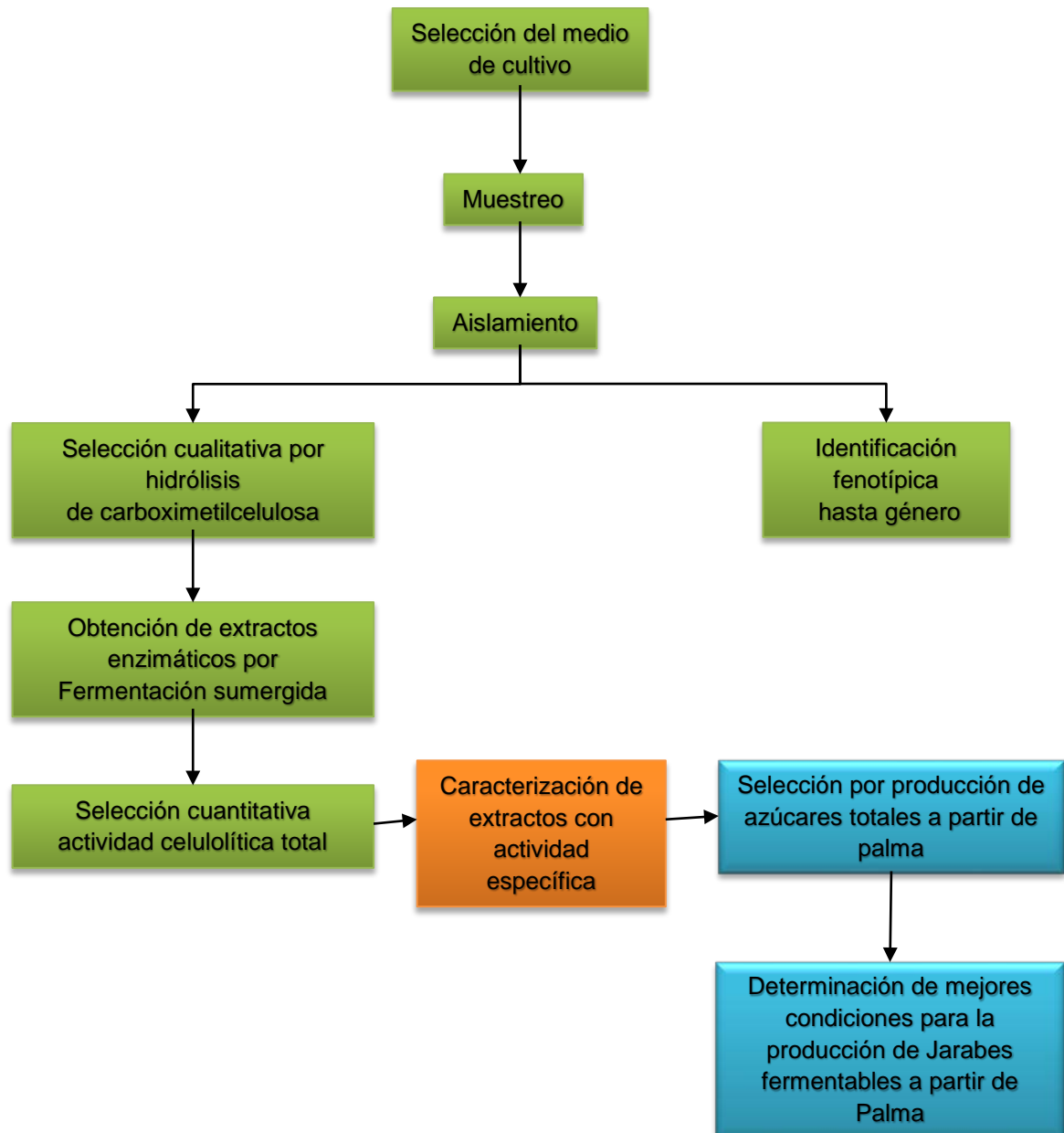
Seleccionar los extractos con mayor actividad enzimática celobiohidrolítica, endoglucolítica y  $\beta$ - glucosídica

Producir jarabes fermentables a partir de los residuos lignocelulósicos con extractos enzimáticos de hongos nativos.

### 3 METODOLOGÍA

En la **Figura 5** se presenta el esquema de desarrollo de la metodología realizada.

**Figura 5.** Diagrama de flujo de desarrollo metodológico



### **3.1 SELECCIÓN DE MEDIO DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE HONGOS CELULOLÍTICOS.**

La fuente de carbono usada fue material lignocelulósico proveniente de raquis y mesocarpio del fruto, el cual tiene pre-tratamiento de explosión con vapor de agua y trituración; esta muestra fue proporcionada por Industrias Acuña Ltda. Al material se le realizó cuantificación de lignina, hemicelulosa y celulosa en el Laboratorio de Forrajes de la Universidad de Antioquía bajo la metodología de extracción por FiberCap.

Para la formulación del medio de cultivo denominado (AP) agar palma el material fue tamizado en un tamaño de poro entre 3 mm y 5 mm, posteriormente fue molido, los demás elementos y micro elementos se determinaron por revisión bibliográfica.

### **3.2 MUESTREO DE MATERIAL VEGETAL.**

Las muestras fueron recolectadas en el camino de Lengerke (Santander) con el correspondiente permiso en Investigación en Biodiversidad Biológica emitido por la Corporación Autónoma de Santander (CAS) bajo el marco de la resolución 00000816 del 17 de septiembre de 2013.

Se realizó un muestreo de tipo aleatorio discrecional. Los factores que se tuvieron en cuenta fueron:

- Para las muestras de suelo y hojarasca: profundidad entre 5 y 10 centímetros, evidencia de humedad.
- Para las muestras de madera: presencia de micelio y características relacionadas con pudrición por hongos.
- Para las muestras de macromicetos: colonización en la madera.

Todas las muestras fueron recolectadas en bolsas Ziploc®, transportadas en cavas de icopor y refrigeradas a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

Las muestras se procesaron en el Laboratorio 404 del Edificio de Investigaciones del Parque Tecnológico Guatiguará, bajo normas de bioseguridad, manejo de muestras de hongos en cabina de bioseguridad IIA y controles de contaminación ambiental.

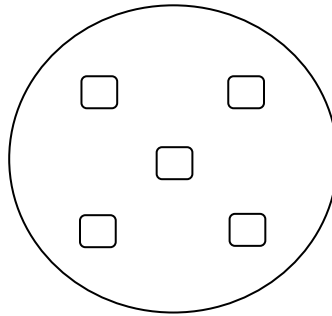
### **3.3 AISLAMIENTO DE HONGOS FILAMENTOSOS.**

La madera y los macromicetos fueron procesados de acuerdo a lo propuesto por Saldarriaga y Pineda, 2001 modificado por la autora de la siguiente manera: la madera y los macromicetos por separado se cortaron en trozos de aproximadamente 0.5 cm a 1 cm, los trozos obtenidos fueron sometidos a un proceso de desinfección con hipoclorito de sodio a 5000 ppm durante un minuto, se removió el exceso de hipoclorito con dos lavados con agua destilada estéril y se eliminó el exceso de agua colocando el material en papel de filtro estéril. El material fue dispuesto en el medio de cultivo propuesto en el ítem 3.1 (AP) como muestra la **Figura 6**, el procedimiento se realizó por duplicado para cada muestra.

La hojarasca y el suelo se procesaron de acuerdo a lo propuesto por Sylvia, 2005 así: se pesaron 10 gramos del material se llevaron a 90 ml con buffer fosfato salino (PBS), la mezcla se agitó durante 10 minutos y posteriormente se realizaron diluciones seriadas y siembra en superficie de 100 µl de las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  por triplicado para cada muestra.

Al medio de cultivo de aislamiento primario se le añadió rosa de Bengala 0.05 g/L para restringir el desarrollo de hongos filamentosos de crecimiento rápido (Zygomycota) y cloranfenicol 0.1 g/L para inhibir el crecimiento bacteriano.

**Figura 6.** Disposición de material vegetal en caja de Petri 100x15



Los medios de cultivo fueron incubados a temperatura ambiente (28°C) durante 8 días, revisando diariamente el crecimiento. Las colonias se repicaron en el medio de cultivo palma hasta obtener cultivos puros.

#### **3.4 IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS.**

Las colonias fueron repicadas en agar papa dextrosa (PDA) (Anexo A) para promover esporulación y corroborar su pureza, se incubaron a 25° C, durante 8 días, posterior a ello se realizó montaje entre lamina y laminilla con azul de lactofenol para observar al microscopio estructuras somáticas o reproductivas características de las cepas fúngicas, adicionalmente para la observación de estructuras se realizó microcultivo (Sánchez, 2012) y siembra en agar agua (Cañedo y Ames, 2004)

Se identificaron los hongos hasta género usando las claves taxónomicas de Barnett & Hunter, 1972; Samson *et al.*, 2011, y los documentos del Fungal Biodiversity Centre, entre otros.

#### **3.5 SELECCIÓN CUALITATIVA DE HONGOS FILAMENTOSOS CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA.**

Para la selección cualitativa se utilizó el protocolo propuesto por Teather y Wood, 1982, para lo cual los aislamientos se cultivaron en agar salvado celulolítico (ASC) (Anexo A) (Mandels y Reese, 1957), se incubaron durante 7 días a 25°C. Para la

selección se dispuso un disco de 0,5 mm de las cepas sobre medio de cultivo con carboximetilcelulosa (MCMC) (Anexo A), las cajas fueron incubadas a 25 °C durante 7 días aproximadamente.

Para evidenciar la hidrólisis de la carboximetilcelulosa, al finalizar el tiempo de incubación se adicionaron 2 ml de solución de rojo de congo al 0,1% y se colocó en agitación a 80 rpm durante 15 minutos, posteriormente se realizaron dos lavados con cloruro de sodio (NaCl) 1M durante 15 minutos a 80 rpm (Teather y Wood, 1982).

Las variables de respuesta fueron la formación de un halo alrededor de la colonia, y el diámetro de crecimiento. Los hongos que presentaron mayor formación de halo fueron seleccionados para la evaluación cuantitativa.

### **3.6 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS.**

Se realizó un pre- inculo en 50 ml de medio de cultivo celulosa (MC) (Anexo A) (Ahamed y Vermette, 2009), al cual se adicionó el volumen que correspondía a  $10^7$  esporas/mililitro del aislamiento a evaluar y se incubó a 28 °C, 150 rpm, durante 3 días en un agitador orbital Excella E24 (Ahamed y Vermette, 2008).

Posteriormente se realizó el montaje de la fermentación en estado sumergido (MFS) (Anexo A) para lo cual se prepararon 10 erlenmeyer con capacidad para 250 ml, a ocho se les agregaron 4 ml del pre-inculo y dos fueron blancos de fermentación. Los erlenmeyer fueron incubados a 28 °C, 150 rpm, durante 12 días. La obtención de los extractos se realizó por duplicado a los 0, 4, 8 y 12 días de la fermentación para los erlenmeyer inoculados y a los 4 y 12 días para los blancos de fermentación (Ahamed y Vermette, 2008)

La obtención de los extractos consistió en aumentar el pH de la fermentación a 7 con la adición de buffer fosfato 50 mM pH 8 a cada uno de los erlenmeyer, siguiendo el protocolo propuesto por Singh *et al.*, 2003 y Lim *et al.*, 2013,

incubándolos nuevamente por 24 horas, bajo las mismas condiciones de agitación y temperatura.

Posteriormente el contenido de los erlenmeyer se recolectó en tubos falcón de 50 ml estériles y se mezcló vigorosamente en vórtex a 1500 rpm durante 15 minutos, el contenido de cada uno de los tubos se filtró y centrifugó a 9000 rpm, durante 20 minutos a 4°C. A cada sobrenadante se le midió concentración total de proteínas, (Anexo B), concentración de azúcares (Anexo C), pH y actividad celulolítica total (Anexo D). (Gottschalk *et al.*, 2010; Ghose, 1987; Percival *et al.*, 2009)

Los extractos con mayor actividad celulolítica total fueron seleccionados para continuar con el proceso.

### **3.7 CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA ESPECÍFICA PARA EXOGLUCANASA, ENDOGLUCANASA Y B- GLUCOSIDASA.**

A los extractos seleccionados se les caracterizaron las actividades enzimáticas específicas exo  $\beta$ -glucanasa, endo  $\beta$ -glucanasa, y  $\beta$  -glucosidasa.

Para la actividad exo  $\beta$ -glucanasa se usó como sustrato una solución de Avicel® 1,25 %(peso/volumen) con buffer acetato de sodio 0,1M pH 4,8. Se mezclaron 400  $\mu$ l de extracto enzimático con 1600  $\mu$ l de solución de Avicel®, se incubó a 50°C por un periodo de 2 horas, la reacción se detuvo por choque térmico en hielo, se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos para precipitar las partículas de Avicel®, al sobrenadante se le cuantificaron los azúcares liberados por la metodología de determinación de azúcares reductores por ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959; Ghose, 1987; Percival *et al.*, 2009).

Para la actividad endo  $\beta$ - glucanasa se usó como sustrato solución de carboximetilcelulosa al 2% (peso/volumen) con buffer citrato 50mM pH 4,8. Se mezclaron 500  $\mu$ l de extracto enzimático con 500  $\mu$ l de solución de carboximetilcelulosa, se incubó a 50°C durante 30 minutos y se cuantificó la liberación de

azúcares por la metodología de DNS (Gottschalk *et al.*, 2010; Percival *et al.*, 2009).

La actividad  $\beta$ -glucosidasa se determinó usando como sustrato una solución de 4-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopyranoside (pNPG) 5mM en buffer acetato de sodio 0,1M pH 4,8. Se mezclaron 300 $\mu$ l de sustrato con 650  $\mu$ l de buffer acetato 0,1M pH 4,8 y 50  $\mu$ l de extracto enzimático, la mezcla se incubó a 50 °C durante 30 minutos, se detuvo la reacción cambiando el pH con la adición de 1300 $\mu$ l de carbonato de sodio 0.5 M y finalmente se realizó lectura a 400nm (Ghose, 1987; Percival *et al.*, 2009).

### **3.8 SELECCIÓN DEL EXTRACTO CON MAYOR CAPACIDAD PARA LIBERAR AZÚCARES EN RESIDUO DE PALMA.**

A los extractos seleccionados se les evaluó la capacidad de hidrolizar la celulosa presente en el raquis y fibra del fruto. Este material tuvo pre-tratamiento de explosión con vapor de agua y trituración; el material fue tamizado en un diámetro de 3 a 5 mm, un gramo del material se colocó en tubos falcón de 50 ml, se esterilizó una vez con vapor húmedo en autoclave por 15 minutos a 121 °C. Posteriormente se le adicionaron 2 ml del extracto enzimático a evaluar disuelto en 18 ml de buffer acetato estéril 50 mM pH 5, la mezcla se incubó en un baño María a 50 °C (Bakar *et al.*, 2012; Cervero *et al.*, 2010; Kassim *et al.*, 2011).

Para cada extracto se realizó toma de muestra destructiva por duplicado a las 0, 6, 12, 24 y 36 horas, con un blanco para cada hora de muestra. Las muestras fueron centrifugadas a 9000 rpm durante 20 minutos. Al sobrenadante obtenido se le determinaron concentración de azúcares por la técnica de DNS descrita en el punto 3.7 y glucosa total por la metodología de glucosa oxidasa (Anexo C).

### **3.9 DETERMINACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES ENZIMÁTICAS DEL EXTRACTO CON MAYOR CAPACIDAD DE LIBERACIÓN DE AZÚCARES EN RAQUIS Y FIBRA DE PALMA PARA LA PRODUCCIÓN DE JARABES FERMENTABLES.**

Al extracto con mejores resultados en la metodología descrita previamente se le realizó un diseño de experimentos multifactorial con una réplica, las variables independientes analizadas fueron: pH (4 a 7) y temperatura (25 a 65°C). Se usó el programa *Statgraphics®* Centurion XVI.I para el análisis de los resultados. Las variables de respuesta para el diseño de experimentos fueron la concentración de azúcares totales y de glucosa.

Finalmente se evaluó la relación enzima/sustrato con los mejores parámetros obtenidos.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.

Durante la búsqueda de nuevas cepas con capacidad celulolítica se han realizado investigaciones en las cuales se utiliza como fuente de carbono en el medio de cultivo, el material residual a hidrolizar, por ejemplo, el bagazo de caña, el raquis o la fibra de palma, la cascarilla de arroz, entre otras, con esta metodología se han obtenido aislamientos con actividad celulolítica comparable con las de cepas comerciales (Prasertsan *et al.*, 1992, Bakar *et al.*, 2012, Gautam *et al.*, 2010; Prasertsan y Oi, 1992).

En consideración a estos hallazgos, se diseñó el medio de aislamiento primario denominado “agar palma” (AP) (**Tabla 1**), para el cual se usó la celulosa presente en el mesocarpio y raquis de palma como fuente de carbono en una concentración equivalente al 1% de celulosa (ver **Tabla 2**). Así mismo, la selección de las fuentes de nitrógeno y microelementos para el medio se basó en las concentraciones y los compuestos indicados en literatura como adecuados para el desarrollo de microorganismos celulolíticos y demostrados en el aumento de la producción de enzimas celulolíticas (Mandels y Weber, 1969; Mandels y Reese, 1956; Reczey *et al.*, 1996; Gautam *et al.*, 2010). Según Peculyte *et al.*, 2014 y Olsson *et al.*, 2003, esta estrategia favorece la selección inicial de los microorganismos degradadores de interés y la proporción de celulosa promueve el crecimiento micelial del hongo; factor reportado por influir en la producción enzimática. (Ahamed y Vermette, 2009).

**Tabla 1.** Medio de cultivo agar palma (AP) usado para aislamiento primario.

<b>Medio de cultivo palma AP</b>	
<b>Composición</b>	<b>Cantidad g * L<sup>-1</sup></b>
Residuo lignocelulósico molido	47,77
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	0.4
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.3
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.05
CoCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0.0037
MnSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	0.0016
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.0014
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	0.4
Urea	0.3
Peptona	0.75
Extracto de levadura	0.2
Rosa de Bengala	0.05
Cloranfenicol	0.5
Agar- agar	15

**Tabla 2.** Composición química del material lignocelulósico molido usado como fuente de carbono.

<b>Composición</b>	<b>Cantidad</b>
Lignina	16,44 %
Celulosa	41,17 %
Hemicelulosa	8,3%
Material Intracelular	34,09%

Un factor crítico que induce o promueve la producción enzimática celulolítica es la fuente de carbono, por ello se han utilizado sustratos sintéticos como: el papel de filtro Whatman®, celulosa microcristalina (Avicel®), carboximetilcelulosa, solka floc (Mandels y Weber, 1969; Juhász *et al.*, 2005) y naturales como: cascarilla de arroz y salvado (Delabona *et al.*, 2012; Deswal *et al.*, 2011) entre otros, reportando los últimos como los de mayor interés por la disminución de costos y adicionalmente porque los hongos en su producción enzimática extracelular tienen la facultad de inducir diferentes isoenzimas dependiendo del sustrato, el pH y la temperatura entre otras condiciones, que pueden influir en la obtención de enzimas con mayor especificidad hidrolítica sobre el sustrato de interés (Barr *et al.*, 1996).

Un segundo factor crítico en la selección son las fuentes de nitrógeno entre las cuales se han estudiado extracto de levadura, peptona, urea, hidrolizado de caseína, nitrato de amonio y nitrato de sodio, para finalmente determinar que la combinación de peptona, urea y extracto de levadura es la que tiene mayor influencia sobre la capacidad hidrolítica (Gautam *et al.*, 2010; Mandels y Weber, 1969). Por último la composición de los micro elementos es fundamental para el crecimiento y desarrollo micelial de los hongos a aislar parámetro mencionado anteriormente como importante para la producción enzimática (Mandels y Reese, 1956).

#### **4.2 MUESTREO DE MATERIAL VEGETAL.**

Se recolectaron un total de diez muestras; una de suelo, dos de hojarasca, seis de madera y una de hongos macromicetos en la colecta se evidenció una recuperación de hongos filamentosos con posible capacidad celulolítica, en las muestras de madera y macromicetos con una frecuencia del 95.2%, en contraste con la escasa recuperación para muestra de suelo y hojarasca 4,76% y 0%, respectivamente; lo último debido al abundante crecimiento de bacterias a las 24 horas de incubación en esta muestra (ver **Tabla 3**).

Los criterios de selección de las muestras, usados durante la colecta han sido reportados con resultados favorables en el aislamiento de cepas fúngicas con alta producción enzimática; principalmente el muestreo en suelo y madera en descomposición (Inuwa, 2013; Damaso *et al.*, 2012; Narasimha *et al.*, 2014). Al igual que se ha demostrado que la profundidad con que se tome la muestra del material (suelo, madera, residuos de bagazo, arroz entre otros) y la desinfección previa de este, ayuda a que se aislen microorganismos capaces de degradar y no, mesófilos del ambiente (Ferrer *et al.*, 2011; Chaparro *et al.*, 2009).

Con respecto a otros estudios el nivel de recuperación de los aislamientos fue selectivo para hongos celulolíticos; 42 de 10 muestras muy similar a Ferrer *et al.*, 2011, estos resultados son atribuidos al uso de celulosa como única fuente de

carbono en el medio de aislamiento primario, ya que para Inuwa, 2013 y Delabona *et al.*, 2012 el uso de PDA les permitió la recuperación de 110 cepas, de las cuales solo 7 presentaron actividad celulolítica considerable. Por consiguiente en este estudio se evidencia que el medio primario de crecimiento es un buen método de selección para microorganismos celulolíticos.

**Tabla 3.** Frecuencia relativa porcentual del número de hongos colectados según la muestra.

<b>Muestra</b>	<b>Número de aislamientos</b>	<b>Frecuencia relativa porcentual</b>
Madera	22	52.38%
Macromicetos	18	42.85%
Suelo	2	4.76%
Hojarasca	0	0%

#### **4.3 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS.**

Las 42 cepas fúngicas aisladas pertenecen a la división Ascomycota, se identificaron bajo las claves taxonómicas propuestas, en 5 géneros diferentes: *Trichoderma* spp. 16 cepas; *Aspergillus* spp. 15; *Penicillium* spp. 6, *Eupenicillium* spp 3, *Beauveria* spp. 1 y *Fusarium* spp. 1 (ver **Tabla 4**). En el Anexo E se describen el origen y el código asignado para cada aislamiento en el laboratorio y en el Anexo F. se presentan fotografías macroscópicas y microscópicas para cada género fúngico aislado.

**Tabla 4.** Número y porcentaje de aislamientos identificados por claves taxonómicas

<b>Identificación Convencional</b>	<b>Número</b>	<b>Porcentaje</b>
<i>Trichoderma</i>	16	41%
<i>Aspergillus</i>	15	35,7%
<i>Penicillium</i>	6	15,4%
<i>Eupenicillium</i>	3	7,7%
<i>Beauveria</i>	1	2,6%

En la identificación de hongos por claves taxonómicas es importante observar estructuras somáticas y de reproducción que permitan llegar a una nomenclatura, esto se logra principalmente con el montaje en microcultivo y siembra en agar agua, técnicas en las cuales se someten los hongos a condiciones de humedad y estrés por nutrientes; ambientes que conllevan al desarrollo de estructuras morfológicas características. Cabe destacar que este tipo de identificación se considera adecuada hasta género, ya que para llegar a una identificación por especie se recomienda tener en cuenta aspectos biológicos y moleculares (Cepero *et al.*, 2012). Sin embargo para estudios de colecta de hongos con fines investigativos o para uso biotecnológico esta metodología de identificación es un recurso de fácil acceso y económico, reportado por diferentes autores (Pérez *et al.*, 2010; Sharma y Sumbali, 2014; Sridevi y Charya, 2011).

En su mayoría los géneros aislados e identificados en esta investigación han sido descritos por otros autores en colecta de hongos con capacidad enzimática celulolítica (Chandel *et al.*, 2013; Naveenkumar y Thippeswamy, 2013; Darmwal y Gaur, 1991; Vilches, 2002), con la excepción del género *Beauveria* spp, que no se ha descrito con esta actividad. Los demás géneros colectados: *Trichoderma* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. y *Penicillium* spp., han sido descritos ampliamente por presentar genes que codifican para enzimas celulolíticas y han sido usados industrialmente en la obtención de celulasas (Hatakka y Hammel, 2010; Saloheimo *et al.*, 2000; Murali *et al.*, 1994).

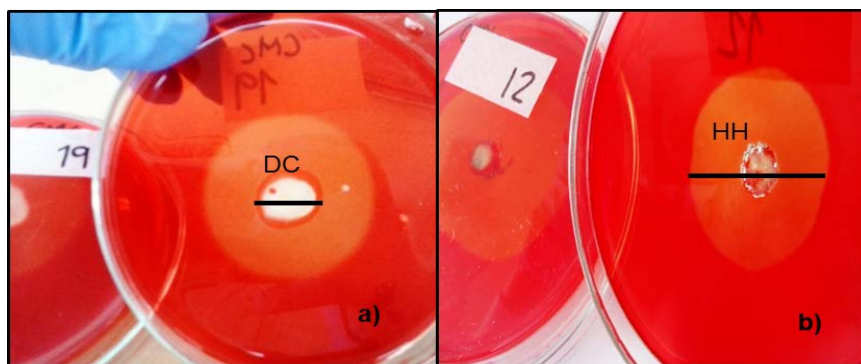
Con respecto a los aislamientos del género *Trichoderma* spp cabe resaltar que algunas cepas fueron obtenidas de las muestras de macromicetos, este fenómeno se ha visto asociado al parasitismo que tiene este género fúngico sobre los hongos de la división Basidiomycota descrito en cultivos para consumo y aislamientos en investigación (Schubert *et al.*, 2008; Cudris, 2011; Colavolpe *et al.*, 2014).

#### 4.4 SELECCIÓN CUALITATIVA DE HONGOS AISLADOS.

El cultivo de las cepas en carboximetilcelulosa (CMC) permitió el tamizaje cualitativo de la capacidad enzimática celulolítica debido a la afinidad que tiene el colorante rojo de congo por los enlaces  $\beta$ 1-4, al ocurrir hidrólisis de CMC por la cepa fúngica evaluada, el colorante no se une en la zona de degradación y se observa un halo al aclarar la tinción con cloruro de sodio (Teather y Wood, 1982).

Durante el proceso de tamizaje las cepas se repicaron por duplicado en agar CMC como fuente de carbono y el medio de cultivo base propuesto en el ítem 4.1. El periodo de incubación fue dependiente de la velocidad de crecimiento radial de cada género fúngico; para el género *Trichoderma* spp. tres días, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. y *Eupenicillium* spp. 5 días y el aislamiento correspondiente al género *Beauveria* spp. 7 días, al final del periodo de incubación se midió el diámetro de la colonia (DC) y el halo de hidrólisis (HH) (ver **Figura 7**).

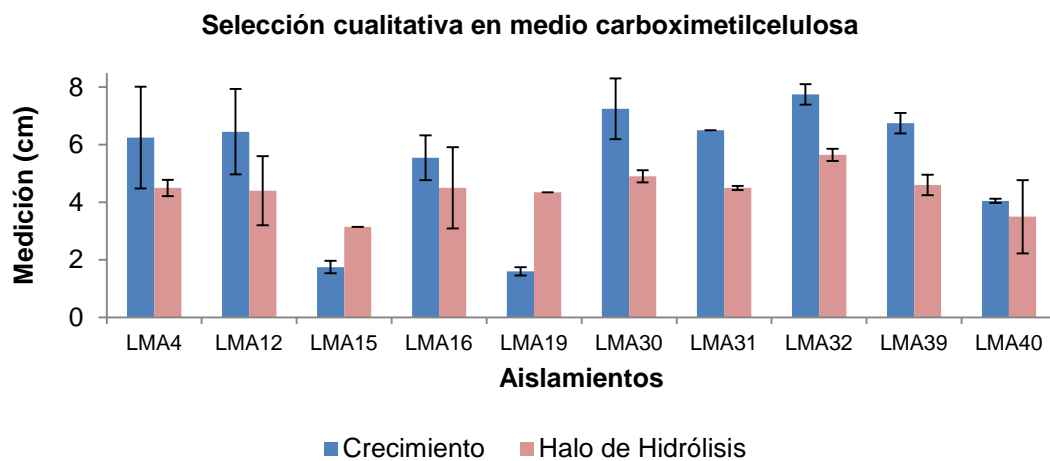
**Figura 7.** Hidrólisis de carboximetilcelulosa (CMC), demostrada con adición de rojo de congo 0,1% y revelada con NaCl 1 M. En la figura se indica a) Evidencia de diámetro de crecimiento (DC) del aislamiento LMA 19 *Beauveria* spp. y b) Evidencia del halo de hidrólisis en carboximetilcelulosa,(HH) del aislamiento LMA 12 *Trichoderma* spp.



El 97,6 % de los aislamientos presentaron hidrólisis, por consiguiente para seleccionar las cepas se tuvo en cuenta el tamaño del halo de hidrólisis; criterio indicado en investigaciones similares que evidenciaron que a mayor tamaño de

halo, mayor obtención de enzimas extracelulares (Sharma y Sumbali, 2014; Shahriarinour *et al.*, 2011). En el **Gráfico 1** se presenta la medida de los halos de hidrólisis para los 10 aislamientos del laboratorio de micología Ascomycetos (LMA) que presentaron un mayor tamaño.

**Gráfico 1.** Selección de las 10 cepas con mayor halo de hidrólisis sobre CMC, pertenecientes a los géneros *Trichoderma* spp. LMA 4, LMA 12, LMA 16, LMA 30, LMA31, LMA 32, LMA 39, LMA 40; *Aspergillus* spp.: LMA 15 y *Beauveria* spp: LMA 19. Se observa el diámetro de crecimiento y halo de hidrólisis.



Los aislamientos correspondientes al género *Trichoderma* spp en su mayoría presentaron la mayor capacidad hidrolítica sobre CMC, a pesar de que el tamaño del halo no superó el diámetro de crecimiento. No obstante cabe destacar que para los aislamientos LMA12, LMA 16, LMA 30 y LMA 39 el halo de hidrólisis estuvo alrededor de los 5 cm; tamaño de halo bastante amplio comparado con lo hallado en otros estudios que reportan medidas de 1,3 cm de halo (Naveenhumad y Thippeswamy, 2013; Narasimha *et al.*, 2014) y representativo comparado con estudios que reportan halos de 9 cm para este género fúngico (Khokhar *et al.*, 2012). Adicionalmente cepas como *Beauveria* spp. LMA19, *Penicillium* spp. LMA29, LMA9 y *Aspergillus* spp. LMA15 y LMA 2 presentaron un halo de hidrólisis mayor con respecto al diámetro de crecimiento de la colonia.

Teniendo en cuenta los tamaños de los halos se seleccionaron 20 aislamientos para evaluación cuantitativa correspondiente a las denominadas en el laboratorio como LMA 2, LMA4, LMA 9, LMA 12, LMA 14, LMA 15, LMA 16, LMA 17, LMA 18, LMA 23, LMA 29, LMA 30, LMA 31, LMA 32, LMA 33, LMA 34, LMA 36, LMA 39, LMA 40 y LMA 41. En el anexo G se describen el tamaño de los halos de hidrólisis y el diámetro de crecimiento. Los resultados del análisis cualitativo permitieron confirmar que el medio AP usado para el aislamiento primario ayudo en la selección de hongos con capacidad celulolítica.

#### **4.5 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS.**

Las condiciones para obtener enzimas celulolíticas a partir de cepas fúngicas se han estudiado ampliamente, desde las características fisiológicas de cada género fúngico hasta los posibles sustratos de fermentación que favorecen una mayor producción y recuperación enzimática. No obstante es necesario adaptar las condiciones al sustrato utilizado y a los microorganismos evaluados, por consiguiente durante el proceso de obtención de extractos se tuvieron en cuenta diferentes factores como: usar extracto de salvado como medio de cultivo para los aislamientos a evaluar al igual que se realizó sobre la selección cualitativa, realizar inoculación en rejilla de las cepas sobre el medio y obtener los extractos por las metodologías propuestas por Singh *et al.*, 2003 y Lim *et al.*, 2013.

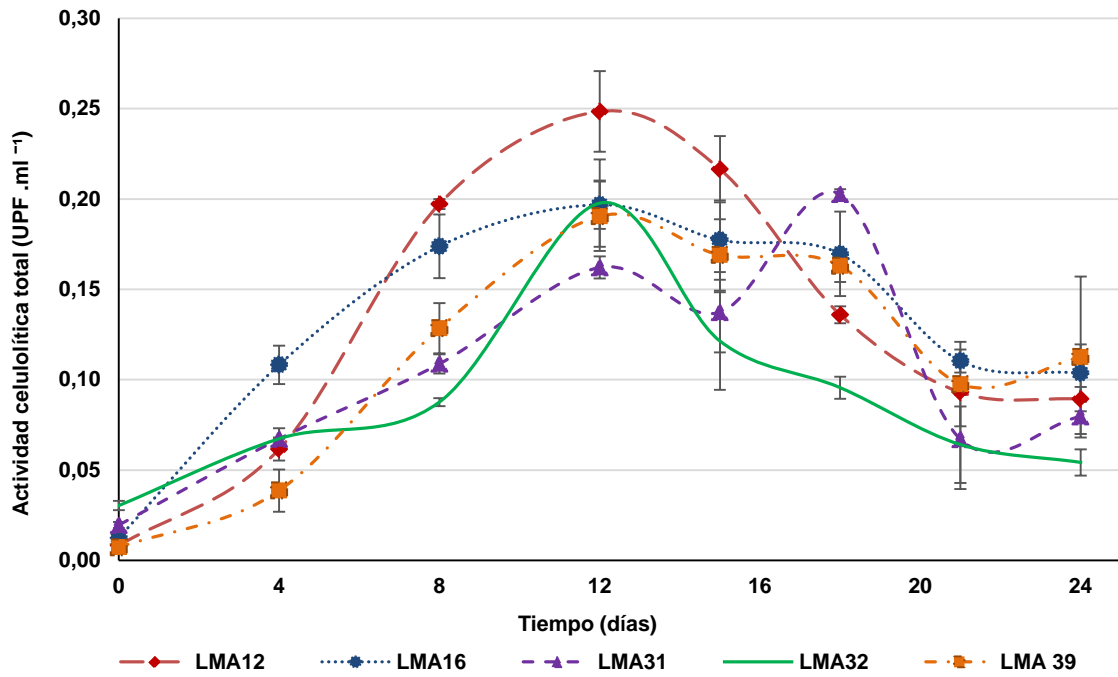
De esta manera el primer factor influyó estimulando la producción enzimática celulolítica por medio de la celulosa; principal componente del salvado (Howard, 2003; Delanoba *et al.*, 2014). El segundo factor garantizó un crecimiento radial extensivo de las cepas que permitió la recuperación de propágulos de  $10^7 \text{ml}^{-1}$ ; cantidad de inóculo reportada por favorecer en medio líquido enriquecido la formación de bolas fúngicas con filamentos extensos, estructuras que benefician la producción de enzimas en sustrato sólido e insoluble (Ahamed y Vermette, 2009; Domingues *et al.*, 2000; Cui *et al.*, 1998). Adicionalmente esta metodología ayudo a obtener un inóculo homogéneo evitando sesgo al momento de analizar y reproducir los resultados.

Finalmente el tercer factor con el cambio de pH y la agitación por un periodo de 24 horas, logró cambios en la estructura y afinidad de la enzima por el sustrato permitiendo su mayor recuperación (Singh *et al.*, 2003).

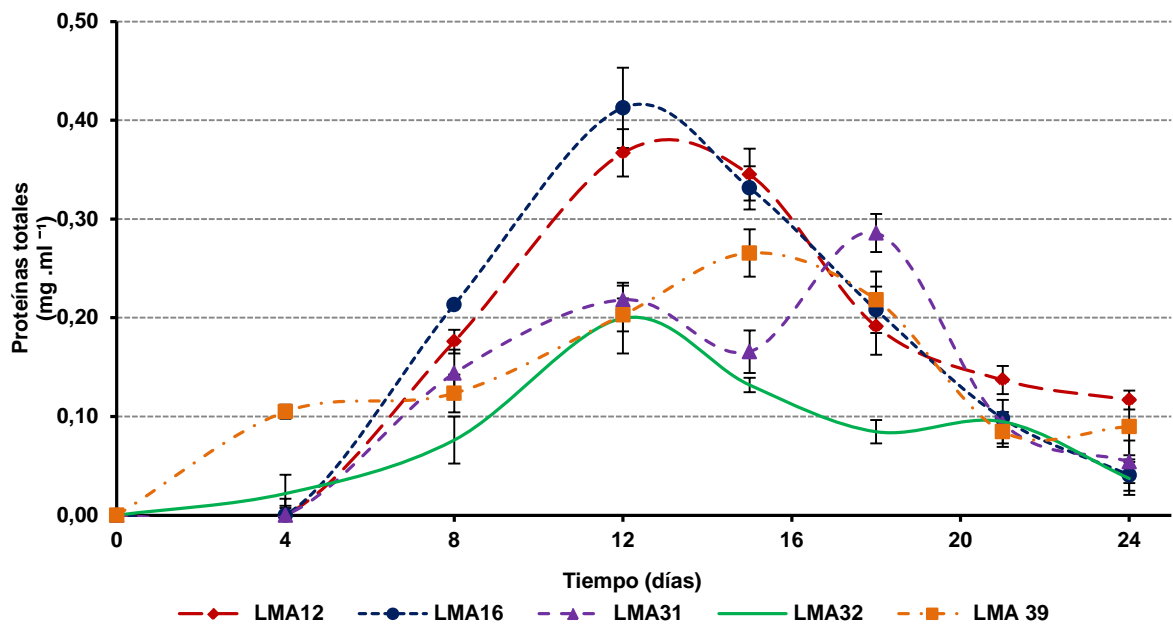
Por consiguiente las 20 cepas seleccionadas en el ítem 4.4 fueron sometidas a las mismas condiciones: crecimiento en agar extracto de salvado, crecimiento en medio líquido enriquecido con glucosa y Avicel® y fermentación sumergida usando papel de filtro Whatman® N° 1 como fuente de carbono y el medio base del ítem 4.1. Las fermentaciones se realizaron durante un periodo de 24 días y se obtuvieron muestras los días 0, 4, 8, 12, 15, 18, 21 y 24. Por último se retiró la biomasa por filtración y centrifugación para evaluar en el extracto obtenido actividad celulolítica total, cuantificar proteínas totales y azúcares liberados y realizar medición de pH.

Durante la obtención de los extractos enzimáticos únicamente los aislamientos LMA, 12, LMA 16, LMA 31, LMA 32 y LMA 39; pertenecientes al género fúngico *Trichoderma* spp presentaron actividad celulolítica total mayor a 0,20 UPF\*ml<sup>-1</sup>, producción de proteínas alrededor de 0,20 mg\*ml<sup>-1</sup> y liberación de azúcares mayor a 34 mg\*ml<sup>-1</sup>. En el **Gráfico 2** se presenta la actividad celulolítica total y en el **Gráfico 3** la concentración de proteínas totales de estos extractos enzimáticos.

**Gráfico 2.** Actividad celulolítica total, de los aislamientos: LMA 12, LMA 16, LMA 31, LMA 32, LMA 39; pertenecientes al género *Trichoderma* spp., en el periodo de 0 a 24 días, usando 50 mg de papel de filtro Whatman N 1, en 1 ml de buffer citrato 50 mM pH 4,8, con 500µl de extracto enzimático. La variable de respuesta fueron los azúcares liberados en 60 minutos, cuantificados por la metodología de DNS.



**Gráfico 3.** Cuantificación de proteínas totales, de los aislamientos: LMA 12, LMA 16, LMA 31, LMA 32, LMA 39; pertenecientes al género *Trichoderma* spp., en el periodo de 0 a 24 días, usando como reactivo, Bradford 1 ml y 20 $\mu$ l de extracto enzimático.



En el gráfico 2 se pudo evidenciar el día de fermentación en el cual cada aislamiento tuvo un mayor nivel de producción enzimática; para el LMA12, LMA 16, LMA 39 y LMA 32 el día 12 y para el LMA 31 el día 18, teniendo en cuenta que los niveles de actividad y los periodos de obtención para todas las 5 cepas fueron similares, se seleccionaron los 5 extractos enzimáticos mencionados.

Los resultados obtenidos al ser comparados con otras investigaciones; presentaron mayor producción enzimática total respecto a lo reportado por Prasertsan y Oi, 1992 que no superó la producción enzimática de  $0,20 \text{ UPF} \cdot \text{ml}^{-1}$ . No obstante se lograron obtener cuantificaciones similares a las reportadas por autores como Maheswari *et al.*, 1993, Umikalson *et al.*, 1997, Howard *et al.*, 2003 y Shahriarinour *et al.*, 2011 que presentaron niveles entre  $0,10$  y  $0,40 \text{ UPF} \cdot \text{ml}^{-1}$  y sin embargo cantidades muy bajas comparadas con estudios reportados por Gautam *et al.*, 2010, Singhanian *et al.*, 2010 y Gottschalk *et al.*, 2010 que presentan entre  $9$  y  $16 \text{ UPF} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Estas diferencias son atribuibles a factores que son predisponentes en la actividad enzimática tales como: características de pretratamiento, composición y variedad de los sustratos utilizados en el proceso de fermentación (Ferrer *et al.*, 2011) y adicionalmente a la aplicación de diferentes metodologías para obtener los extractos (Gottschalk *et al.*, 2010).

Cabe resaltar que se tuvieron en cuenta las mejores condiciones reportadas para obtención de extractos enzimáticos, sin embargo los niveles de actividad celulolítica total obtenidos no fueron altos, se consideró que factores como el uso de papel de filtro, pudo afectar la producción enzimática debido a la falta de estimulación de diferentes isoenzimas dependientes del sustrato, (Barr *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2012).

De igual forma el haber empleado la metodología de fermentación sumergida pudo disminuir la producción enzimática en comparación con la fermentación en estado sólido. A pesar de que se trató de implementar, la metodología no permitió mayor

recuperación de extractos enzimáticos; debido a que las cepas utilizaron el sustrato como soporte para un posterior proceso de esporulación (Mrudula y Murugammal, 2011; Hansen *et al.*, 2015).

Es importante mencionar que se tuvo en cuenta lo reportado por diferentes autores; sobre aprovechar los sustratos naturales como el raquis de palma para incrementar la producción enzimática (Ferrer *et al.*, 2011; Bakar *et al.*, 2012; Gautam *et al.*, 2010), sin embargo en esta investigación el proceso de recuperación en el sustrato fue mínimo, se atribuye el fenómeno a tres factores: primero; la naturaleza fibrosa del material dificulta el proceso de mezcla y precipitación. Segundo; el proceso de adsorción ocurrido entre la enzima y el sustrato durante la hidrólisis puede ser difícilmente reversible (Gan *et al.*, 2003). Tercero; la composición del sustrato empleado se caracteriza por tener lípidos, ácidos fenólicos y compuestos furfúricos que inhiben y retrasan la producción enzimática celulolítica (Tengborg *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2011; Berrin *et al.*, 2014; Bakar *et al.*, 2012).

#### **4.6 CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS ENZIMÁTICOS CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA ESPECÍFICA PARA EXO B- GLUCANASA, ENDO B- GLUCANASA Y B- GLUCOSIDASA.**

Se sometieron los aislamientos seleccionados en el ítem 4.5 a fermentación para obtener 100 ml de extracto enzimático (EXTLMA) en el día de mayor actividad enzimática. A los extractos obtenidos se les determinó actividad enzimática específica para endo- $\beta$ -glucanasa, exo- $\beta$ -glucanasa y  $\beta$ -glucosidasa. La cuantificación de las enzimas endo- $\beta$ -glucanasa, exo- $\beta$ -glucanasa se basó en el principio de estimación de la cantidad de glucosa liberada a partir de una solución de carboximetilcelulosa (CMC) y celulosa microcristalina (Avicel®) respectivamente y para la cuantificación de  $\beta$ -glucosidasa se evaluó la liberación

de p-nitrofenol a partir de p-nitrofenil-β-D glucopiranosido (pNPG) (Ghose, 1987; Percival *et al.*, 2009).

La liberación de azúcares fue cuantificada por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) a 540 nm y la liberación de p-nitrofenol a 400nm para la actividad enzimática celulolítica β-glucosidasa. Los resultados se presentan en la **Tabla 5** y están expresados en unidades enzimáticas (U) por litro las cuales se definen como; micro moles de azúcares por litro liberadas en un minuto.

Para realizar el informe de los resultados se utilizó la formula descrita a continuación:

$$\text{Actividad enzimática} = \Delta Ab \cdot vt / \epsilon \cdot t \cdot vm \cdot b$$

Ab: absorbancia

vt: volumen final de la reacción (litros)

ε : coeficiente de extinción molar (M<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup>)

t: tiempo (minutos)

vm: volumen muestra (litros)

b: paso de celda (cm)

**Tabla 5.** Cuantificación de enzimáticas de los extractos EXLTMA 12, 16, 31, 32 y 39 para celulasas totales y celulasas específicas exo β- glucanasa, endo β- glucanasa y β- glucosidasa con cuantificación de proteínas.

Extracto enzimático	Actividad celulolítica (UPF* l <sup>-1</sup> )	Endo β 1-4 glucanasa (U * l <sup>-1</sup> )	Exo β 1-4 glucanasa (U * l <sup>-1</sup> )	β- 1-4 glucosidasa (U * l <sup>-1</sup> )	Proteínas (mg * l <sup>-1</sup> )
<b>EXLTMA 12</b>	0,26 ± 0,01	142,7 ± 6	13,7 ± 0,2	68,5 ± 2	0,34 ± 0,02
<b>EXLTMA 16</b>	0,19 ± 0,01	154 ± 2	16,1 ± 0,5	56,4 ± 1,5	0,40 ± 0,05
<b>EXLTMA 31</b>	0,20 ± 0,01	130,9 ± 0,4	7,4 ± 2,6	38,2 ± 1,5	0,28 ± 0,02
<b>EXLTMA32</b>	0,19 ± 0,02	117 ± 2	ND	ND	0,20 ± 0,02
<b>EXLTMA39</b>	0,19 ± 0,01	150 ± 2	3,3 ± 1	55,7 ± 4,2	0,20 ± 0,03

ND= No detectable

De acuerdo a los resultados se comprobó que las actividades celulolítica totales y la cantidad de proteínas fueron reproducibles con respecto a los niveles mencionados en el ítem 4,5. Así mismo que el extracto enzimático del aislamiento LMA 16 presentó el complejo enzimático con mayor proporción para las tres enzimas seguido del extracto enzimático del aislamiento LMA 12 y LMA 39 con una menor proporción para las exo  $\beta$  1-4 glucanasa.

Cabe destacar que los resultados obtenidos durante la caracterización enzimática de los aislamientos de *Trichoderma* spp., difieren a lo descrito en la literatura para este género fúngico; descrito principalmente por presentar producción de endoglucanasas y exoglucanasas (Goyal *et al.*, 1991; Juhász *et al.*, 2005) y en algunas ocasiones proporciones de  $\beta$ -glucosidasas alrededor de 8 U\*ml<sup>-1</sup> (Berrin *et al.*, 2014), lo contrario a lo encontrado en esta investigación con 68 U\*ml<sup>-1</sup> para esta enzima en el aislamiento LMA 12.

Igualmente se compararon los niveles de actividades enzimáticas obtenidos en esta investigación respecto a otros reportes, para ello se tuvo en cuenta que la metodología y las unidades fueran similares. En esta comparación se evidencia que los resultados obtenidos (tabla 5) presentan mayores actividades enzimáticas con respecto a Gautam *et al.*, 2010 y Gomathi *et al.*, 2012; Agudelo *et al.*, 2013 que obtuvieron niveles de enzimas exo  $\beta$ - glucanasa, endo  $\beta$ - glucanasa y  $\beta$ -glucosidasa inferiores a 2 U\*ml<sup>-1</sup>. Se obtuvieron niveles comparables con extractos comerciales reportados en Singhanian *et al.*, 2010 y niveles muy bajos comparadas con Gottschalk *et al.*, 2010 que alcanzaron niveles de 20000 U\*l<sup>-1</sup> de endo  $\beta$ -glucanasa. Sin embargo es preciso resaltar que las actividades enzimáticas varían según la metodología empleada y la naturaleza química y estructural del sustrato usado (Bansal *et al.*, 2009; Deswal *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012).

Fue importante establecer los perfiles enzimáticos de los extractos a usar, principalmente para dilucidar el sinergismo que presentan las enzimas cuando

realizan el proceso de hidrólisis, con el fin de establecer el uso combinado de extractos que permitan obtener un complejo enzimático con mayor capacidad hidrolítica (Gan *et al.*, 2003; Bansal *et al.*, 2009).

#### **4.7 SELECCIÓN DEL EXTRACTO CON MAYOR CAPACIDAD PARA LIBERAR AZÚCARES EN SUBPRODUCTO DE PALMA.**

En la sacarificación sobre sustratos lignocelulósicos se tienen en cuenta principalmente dos factores: las características del sustrato y las condiciones de hidrólisis. En esta investigación se tuvo en cuenta para el sustrato un tamaño de partícula entre 3 y 5 mm, con un 40% de celulosa libre y para el proceso de hidrólisis condiciones de pH 5, temperatura 50°C en baño maría por un periodo de 36 horas.

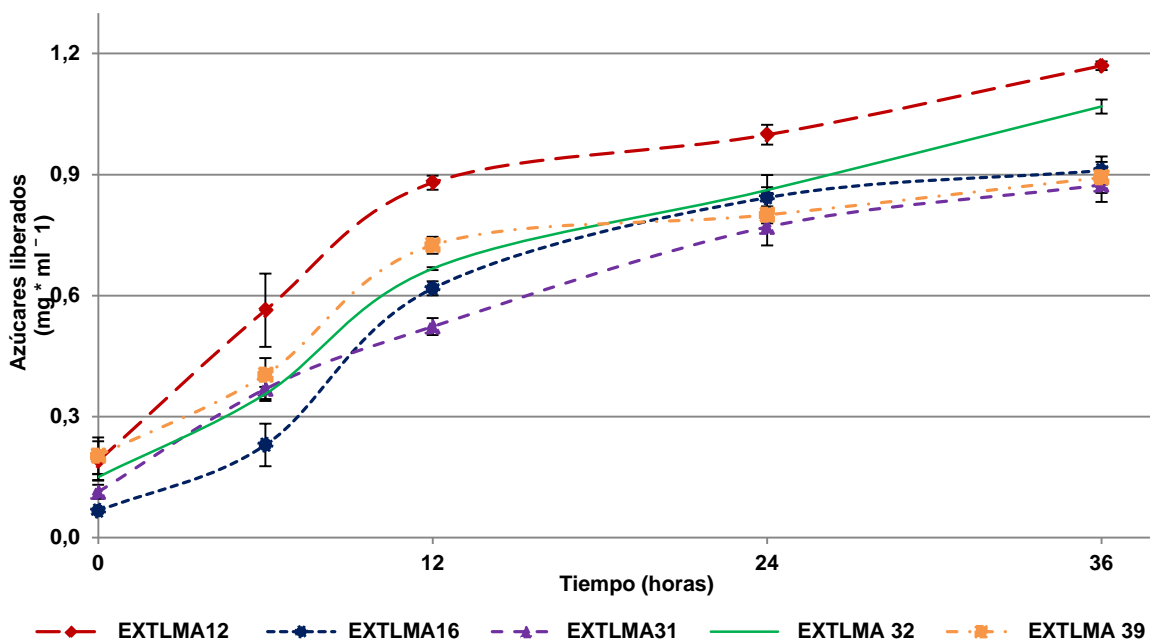
Las circunstancias mencionadas del sustrato han sido reportadas por favorecer una mayor superficie de contacto con la enzima y una proporción de celulosa libre promisorio para la obtención de jarabes fermentables (Mun *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2014; Shamsudin *et al.*, 2012; Karmakar y Ray, 2011). Adicionalmente es importante mencionar que la cantidad de celulosa libre obtenida en el sustrato usado es similar a los reportes que realizaron pre-tratamiento con hidrólisis ácida, alcalina, explosión con vapor y tratamiento mecánico pre –hidrólisis enzimática, por lo tanto el material fue sometido únicamente a un proceso de esterilización con vapor de agua para evitar posibles contaminaciones que interfirieran con los resultados.

Con respecto a las condiciones de hidrólisis; se ha establecido que los factores que influyen en la actividad enzimática son los niveles de pH y temperatura por potenciar la afinidad (Binod *et al.*, 2011; Bakar *et al.*, 2012; Cervero *et al.*, 2010; Kassim *et al.*, 2011). Igualmente cabe resaltar que también se tuvo en cuenta la agitación como variable en la hidrólisis, sin embargo los autores difieren en las condiciones, por lo que fue necesario realizar un barrido a 0, 100 y 200 rpm,

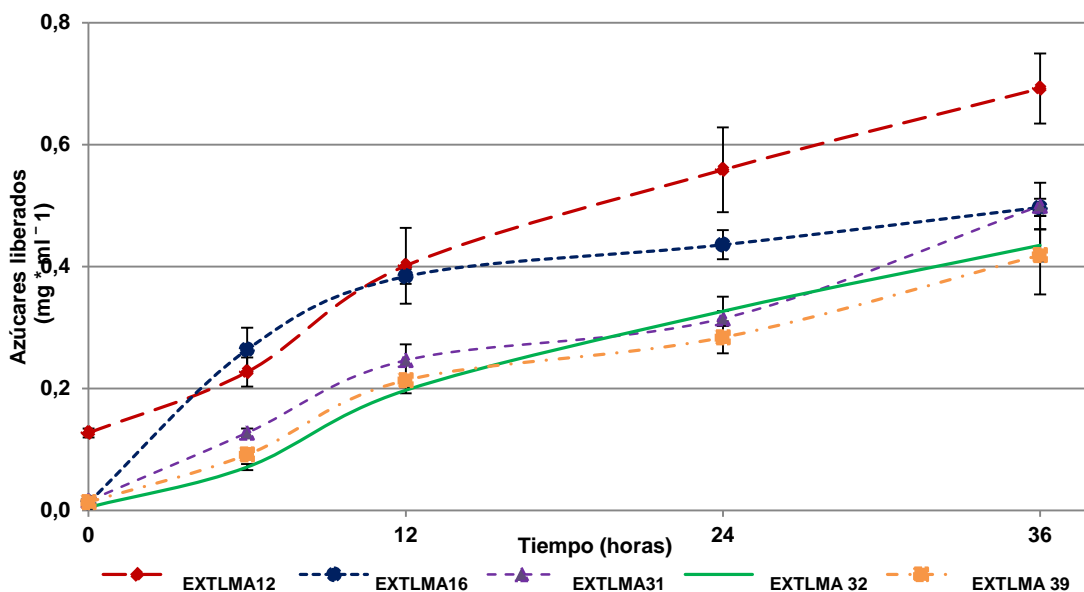
determinando que esta variable no influía en la actividad. Finalmente el tiempo de hidrólisis se determinó realizando un barrido de liberación de azúcares en el tiempo; concluyendo que entre las 36 y 48 horas de incubación ocurre la mayor proporción de sacarificación.

Teniendo en cuenta lo anterior, los cinco extractos que presentaron mayor actividad celulolítica total fueron sometidos a un proceso de sacarificación sobre la palma. En el **Gráfico 4** se presenta la cuantificación de azúcares liberados durante el proceso y en el **Gráfico 5** la cuantificación de glucosa liberada.

**Gráfico 4** Cuantificación de azúcares liberados por los extractos enzimáticos EXLTMA: 12, 16, 32, 32 y 39, usando 125  $\mu\text{l}$  del sobrenadante del proceso de hidrólisis con 125  $\mu\text{l}$  de DNS, los resultados están expresados en  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ , los cuales se correlacionaron con la curva de calibración ajustada con concentraciones de glucosa conocidas.



**Gráfico 5.** Cuantificación de glucosa liberada por los extractos enzimáticos EXLMA: 12, 16, 31, 32 y 39, usando 10 µl de sobrenadante del proceso de sacarificación y 1000 µl de reactivo. Los resultados están expresados en mg \* ml<sup>-1</sup>, se determinaron teniendo en cuenta el patrón de Glucosa oxidasa



Adicionalmente se evaluó el rendimiento del proceso de hidrólisis, calculando el porcentaje de sacarificación de cada uno de los extractos, usando la fórmula propuesta por Ghose, 1987 y utilizada por diferentes autores (Karmakar y Ray, 2011; Mahmud *et al.*, 2013). En la **Tabla 6** se presentan los resultados.

% sacarificación= (mg\*ml<sup>-1</sup> de azúcares reductores\*0,9\*100) / (mg\*ml<sup>-1</sup> de sustrato inicial)

**Tabla 6.** Porcentaje de sacarificación de los EXLMA 12, 16, 31, 32 y 39. 36 horas de incubación a 50 °C y pH 5.0 de temperatura en baño maría.

Extracto enzimático	% Sacarificación
EXLMA12	5,1 ± 0,05
EXLMA16	4,0 ± 0,1

<b>EXLTMA31</b>	3,8 ± 0,1
<b>EXLTMA32</b>	4,7 ± 0,1
<b>EXLTMA39</b>	3,9 ± 0,1

En los resultados presentados en el gráfico 4 y 5 se evidenció que a partir de un gramo de palma sumergida, utilizando 0,40 UPF\* ml<sup>-1</sup> disueltas en 18 ml de buffer acetato, el EXLTMA12 liberó la mayor cantidad de azúcares totales correspondiente a 1,17 mg\*ml<sup>-1</sup> y 0,692 mg\*ml<sup>-1</sup> de glucosa. Por consiguiente fue seleccionado para seguir con la búsqueda de las mejores condiciones enzimáticas de hidrólisis y aumentar la eficiencia en el proceso.

Es importante mencionar que a la hora de confrontar los resultados con otras investigaciones fue necesario tener en cuenta que las UPF evaluadas fueran las mismas y que las condiciones de hidrólisis fueran similares, teniendo en cuenta lo planteado los niveles de azúcares hallados son 5 veces menores que lo reportado por Bakar *et al.*, 2012, las diferencias se atribuyeron; al haber empleado un tamaño de partícula mayor y a no haber realizado mezcla de extractos enzimáticos.

De acuerdo con los resultados obtenidos no es posible determinar la eficiencia del proceso por las bajas concentraciones (Karmakar y Ray, 2011; Shafiei *et al.*, 2010), sin embargo se considera que el porcentaje de lignina y hemicelulosa influyeron en el proceso de hidrólisis de la celulosa; razón por la cual es necesario aplicar un pretratamiento con lacasas y xilanasas para mejorar el porcentaje de sacarificación (Al-zuhair *et al.*, 2013), igualmente tener en cuenta el bajo nivel de UPF de los extractos para usar un mayor volumen del extracto enzimático sobre el sustrato (Salcedo *et al.*, 2011; Prasertsan y Oi, 1992) (Karmakar y Ray, 2011).

Finalmente relacionando los resultados con los perfiles enzimáticos de los extractos utilizados (ver tabla 5), los bajos niveles de sacarificación también pudieron estar asociados al mecanismo hidrolítico de las endo  $\beta$ -glucanasas que utilizan su estructura de unión a sustrato principalmente sobre celulosa amorfa, razón por lo cual se esperaría que actué mejor sobre sustratos con menor proporción de lignina y con un grado menor de cristalinidad. Atribuyendo el déficit de enzima exo  $\beta$ -glucanasa en los extractos; como un factor predisponente para la falta de eficiencia en el proceso de hidrólisis debido a su especificidad por la hidrólisis de celulosa cristalina. (Bansal *et al.*, 2009; Percival *et al.*, 2006).

#### **4.8 DETERMINACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES ENZIMÁTICAS DEL EXTRACTO SELECCIONADO PARA LA PRODUCCIÓN DE JARABES FERMENTABLES.**

Las enzimas celulolíticas presentan mayor efecto hidrolítico a pH 5 y a 50 °C (Singhania *et al.*, 2010), sin embargo se han encontrado extractos con condiciones óptimas diferentes (Howard *et al.*, 2003). Por consiguiente fue necesario evaluar el efecto que tienen estos dos factores sobre las variables de respuesta: producción de azúcares totales y glucosa en el extracto enzimático EXTLMA12 seleccionado en el ítem 4.7.

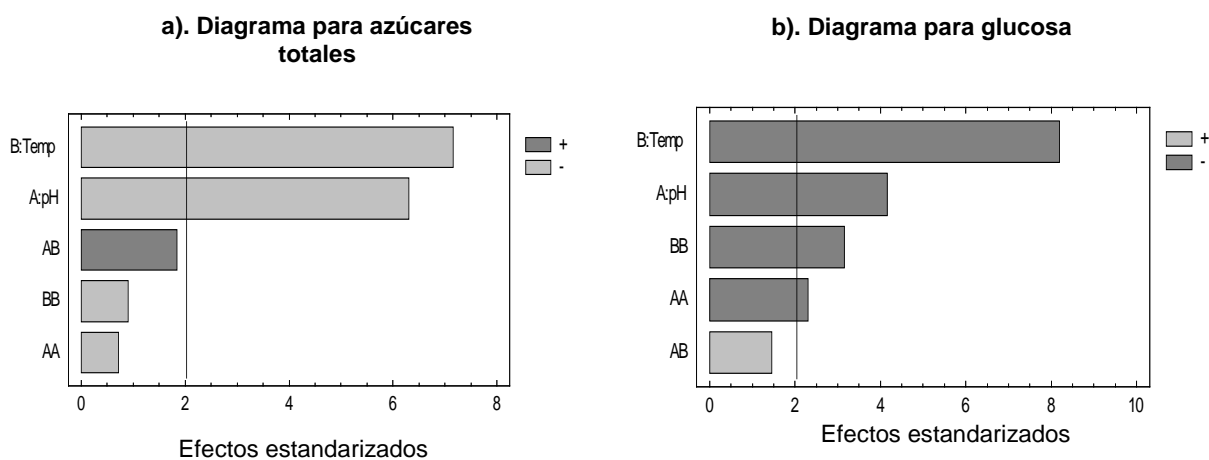
Para ello se realizó un diseño de experimentos de 2 factores; temperatura y pH, con 5 y 4 niveles respectivamente con una réplica, para un total de 40 experimentos. Se utilizó el programa estadístico Statgraphics® para el análisis.

Los resultados permitieron determinar la influencia de diferentes rangos de temperatura y pH sobre la liberación de azúcares y glucosa. En la **tabla 7**, se presentan los niveles utilizados para alimentar la matriz del diseño y en el **gráfico 6** los resultados expresados en un diagrama de Pareto.

**Tabla 7.** Representación de los niveles sobre los cuales se realizó la matriz del diseño

<b>Temperatura</b>	<b>Niveles</b>	-1	-0,5	0	0,5	1
	<b>Valor experimental</b>	25	35	45	55	65
<b>pH</b>	<b>Niveles</b>	-1	-0,33	0,33	1	
	<b>Valor experimental</b>	4	5	6	7	

**Gráfico 6 .**Diagramas de Pareto estandarizado sobre las variables de respuesta. a) Diagrama para azúcares reductores liberados. b) Diagrama para glucosa.



En el gráfico 6 se presenta en forma decreciente el grado de significancia que tuvieron los dos factores y sus combinaciones sobre las variables de respuesta, en este caso la temperatura y el pH tuvieron un efecto significativo sobre las dos variables; ambas con efectos negativos para los azúcares totales y glucosa, con valores de p menores a 0,05 (ver **Tabla 8.**) para un nivel confianza del 95%.

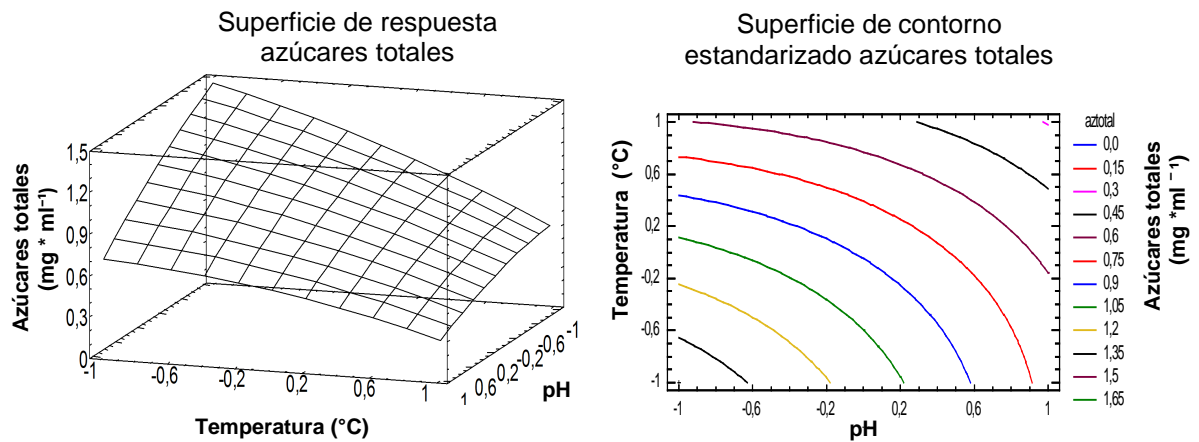
Con respecto a las combinaciones de los factores hay efecto significativo sobre la variable de respuesta glucosa de los efectos de temperatura –temperatura (BB) y en menor proporción pH-pH (AA).

**Tabla 8.** Valores de P- para las variables de respuesta

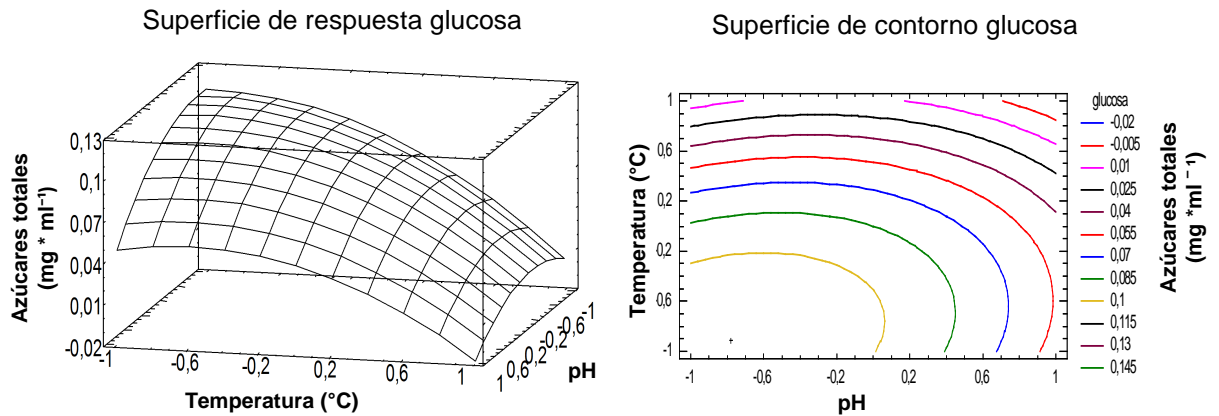
Variable	P-Valor azúcares totales	P-Valor glucosa
A:pH	0,0000	0,0002
B:Temp	0,0000	0,0000
AA	0,4783	0,0276
AB	0,0748	0,1545
BB	0,3721	0,0035

Adicionalmente en el **Gráfico 7** se presenta la superficie de respuesta dilucidada para la obtención de azúcares y en el **Gráfico 8** respecto a la obtención de glucosa.

**Gráfico 7.** Superficie de respuesta y contorno para la variable de respuesta azúcares totales.



**Gráfico 8.** Superficie de respuesta y contorno para la variable de respuesta glucosa



En los gráficos 7 y 8 se muestra la superficie de respuesta y el contorno cómo se comportan las variables de respuesta respecto a los factores empleados. Para la temperatura, la producción de azúcares y glucosa fue mayor a los 25 °C, sin presentar decaimiento en la respuesta; sin embargo para procesos de hidrólisis enzimática en el laboratorio y pruebas piloto futuras, el hallazgo de un extracto con hidrólisis a temperatura ambiente; es un aporte de gran interés para el proceso por la disminución en los costos de producción (Bon y ferrara, 2007).

Con respecto al pH; los efectos sobre las variables de respuesta fueron como lo reportado por la literatura con un pH de 4 para la obtención de azúcares totales y de 4,3 para glucosa (ver **Tabla 9**).

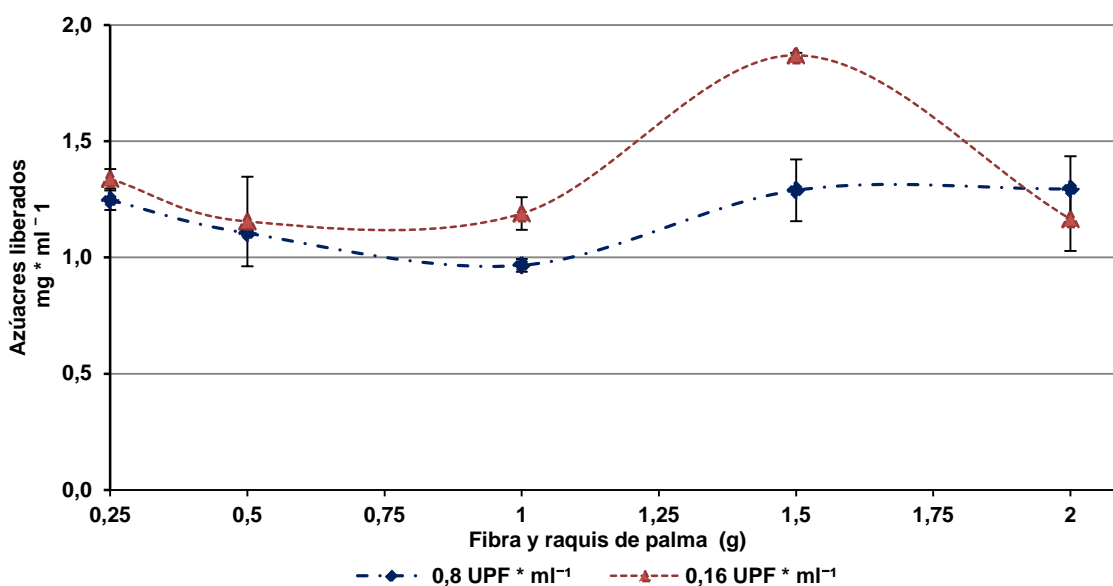
Cabe destacar que el proceso enzimático propuesto no es viable a temperaturas altas y pH básicos, el rendimiento en la obtención de azúcares y glucosa desciende de manera drástica.

**Tabla 9.** Combinación de factores que maximizan la obtención de azúcares a partir de raquis y fibra de palma con el extracto enzimático EXTLMA12.

Respuesta	Factor	Bajo	Alto	Mayor hidrólisis	Valor experimental
<b>Azúcares totales</b>	pH	-1	1	-1	4
	Temperatura	-1	1	-1	25
<b>Glucosa</b>	pH	-1	1	-0,78	4,3
	Temperatura	-1	1	-0,91	26

Finalmente para evaluar la relación enzima- sustrato se realizaron los ensayos bajo las condiciones reportadas en la tabla 9, los resultados encontrados se presentan en el **Gráfico 9**.

**Gráfico 9.** Obtención de azúcares totales utilizando 0,80 UPF \*ml<sup>-1</sup> y 0,160 UPF\*ml<sup>-1</sup>



Los resultados obtenidos del proceso de sacarificación bajo las condiciones óptimas del extracto y la determinación de la relación enzima-sustrato, permitió aumentar la cantidad de azúcares totales liberados desde 1,17 mg\*ml<sup>-1</sup> hasta 1,8 mg\*ml<sup>-1</sup> usando 1.5 gramos del sustrato y 0,16 UPF\* ml<sup>-1</sup> de extracto enzimático.

Considerando diferentes investigaciones que obtuvieron extractos enzimáticos a partir de cepas nativas con el fin de utilizarlas en procesos de sacarificación (Bakar *et al.*, 2012; Mun *et al.*, 2008; Singh, 2009) se obtuvo un gran número de cepas con actividad celulolítica que pueden ser evaluadas bajo diferentes condiciones para mejorar la obtención de extractos enzimáticos.

Adicionalmente los extractos enzimáticos obtenidos tuvieron capacidad para hidrolizar sustratos celulolíticos, el déficit en la producción de jarabes fermentables se centra en los factores que no se tuvieron en cuenta sobre las características del sustrato y su naturaleza lignocelulósica.

## 5 CONCLUSIONES

El medio de cultivo agar palma (ACP) permitió el aislamiento del 97,6 % de cepas con actividad de hidrólisis de carboximetilcelulosa identificadas como:

*Trichoderma* spp. (41%)

*Aspergillus* spp. (35,7%)

*Penicillium* spp. (15,4%)

*Eupenicillium* spp. (7,7%)

*Beauveria* spp. (2,6%)

*Fusarium* spp (2,6%).

Las actividades específicas exo  $\beta$ - glucanasa, endo  $\beta$ - glucanasa y  $\beta$ - glucosidasa para los extractos seleccionados:

<b>Extracto enzimático</b>	<b>Endo <math>\beta</math> 1-4 glucanasa (U*ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>Exo <math>\beta</math> 1-4 glucanasa (U*ml<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>\beta</math>- 1-4 glucosidasa (U*ml<sup>-1</sup>)</b>
<b>EXLMA 12</b>	✓	✓	✓
<b>EXLMA 16</b>	✓	✓	✓
<b>EXLMA 31</b>	✓	✓	✓
<b>EXLMA32</b>	✓	X	X
<b>EXLMA39</b>	✓	✓	✓

El extracto enzimático obtenido a partir del hongo identificado como *Trichoderma* LMA12, presentó mayor actividad celulolítica sobre residuos de palma durante el tiempo de evaluación y bajo las condiciones experimentales establecidas.

Las mejores condiciones experimentales para la producción de azúcares totales y glucosa por parte del extracto identificado como LM12 son pH 4,3, temperatura 25 °C, sin agitación, condiciones favorables para la industria por la disminución en los costos de sacarificación.

## 6 RECOMENDACIONES

Para investigaciones afines se recomienda:

- Con respecto a las cepas:

Realizar ensayos con otros medios de fermentación para la obtención de enzimas a partir de las cepas del género *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. y *Beauveria* spp.

- Con respecto al sustrato:

Realizar pre-tratamiento biológico o con enzimas para disminuir el porcentaje de lignina aun presente en el sustrato.

- Con respecto a los extractos enzimáticos:

Probar otras técnicas de extracción de enzimas en el sustrato.

Combinar los extractos con mejores actividades específicas exo  $\beta$ - glucanasa, endo  $\beta$ - glucanasa y  $\beta$ - glucosidasa

Usar inductores para la producción enzimática.

Realizar ensayos de estabilidad térmica de los sustratos antes de realizar procesos de sacarificación

## 7 DIVULGACIÓN

Nombre del evento: 36th Symposium Biotechnology for Fuels and Chemicals

Fecha y lugar: Abril 28-Mayo 1, Clearwater Beach, FL USA

Producto asociado: Isolation and selection native fungi with cellulolytic activity

Nombre del evento: VIII Congreso Latinoamericano de micología

Fecha y lugar: Noviembre 4 -7, Medellin, Colombia

Producto asociado: Selección cualitativa de hongos ascomicetos con actividad celulolítica aislados en Zapatoca, Santander.

## BIBLIOGRAFÍA

Abdeshahian, P., Samat, N., Hamid, A. *et al.* Solid substrate fermentation for cellulase production using palm kernel cake as a renewable lignocellulosic source in packed-bed bioreactor. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2011, vol. 16, p. 238-244.

Agudelo, J., Daza, Z., Gil, N. *et al.* Evaluación de las enzimas celulolíticas producidas por hongos nativos mediante fermentación en estado sólido (SSF) utilizando residuos de cosecha de caña de azúcar. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2013, vol. 15, p. 1-12

Ahamed, A. and Vermette, P. Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. 2008, vol. 42, p. 41–46

Ahamed, A. and Vermette, P. Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production. *Bioresource Technology*. 2009, vol.100, p. 5979–5987

Alkoaik, F., Khalil, A. y Alqumajan, T. Performance evaluation of a static composting system using date palm residues. *Middle. East Journal of Scientific Research*. 2011, vol. 7, p. 692-983.

Al-zuhair, S., Ahmed, K., Abdulrazak, A. *et al.* Synergistic effect of pretreatment and hydrolysis enzymes on the production of fermentable sugars from date palm

lignocellulosic waste. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2013, vol. 19, p. 413–415

Bakar, N., Zanirun, Z., Abd-Aziz, S. *et al.* Production of fermentable sugars from oil palm empty fruit bunch using crude cellulose cocktails with *Trichoderma asperellum* UPM1 and *Aspergillus fumigatus* UPM2 for bioethanol production. *BioResources*. 2012, vol. 7, p. 3627-3639.

Bansal, P., Hall, M., Realff, M. *et al.* Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotechnology Advances*. 2009, vol. 27, p. 833–848

Barnett, H. y Hunter, B. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 3 ed. *Burgess Publishing Company*. 1972, p. 238

Barr, B., Hsieh, Y., Ganem, B. *et al.* Identification of Two Functionally Different Classes of Exocellulases. *Biochemistry*. 1996, vol. 35, p. 586-592

Berrin, J., Herpoel-Gimbert, I., Lopes, N. *et al.* Use of Cellulases from *Trichoderma reesei* in the Twenty-First Century—Part II: Optimization of Cellulolytic Cocktails for Saccharification of Lignocellulosic Feedstocks. Chapter 18. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. 2014, p. 263–280

Bhat, M. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*. 2000, vol. 18, p. 355–383

Bhat, M. y Bhat, S. Cellulose degrading enzymes and their potential Industrial applications. *Biotechnology Advances*. 1997, vol.15, p. 583-620

Binod, P., Janu, K., Sindhu, R. *et al.* Hydrolysis of lignocellulosic biomass for bioethanol production, Chapter 10. *Academic press. biofuels: alternative feedstocks and conversion processes*. 2011, p. 229-240.

Bon, E. y Ferrara, M. Bioethanol production via enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *The Role of Agricultural Biotechnologies for Production of Bioenergy in Developing Countries*. FAO. 2007, p. 2-11.

Burton, R., Gidley, M. y Fincher, G. Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nature Chemical Biology*. 2010, vol. 6, p. 724-732.

Bradford, M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1974, vol. 72, p. 248-254.

Cañedo, C y Ames T. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. *Centro Internacional de la papa (CIP)*. Peru. 2004

Cardona, C. y Sánchez, O. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*. 2007, vol. 98, p. 2415–2457

Cardona, C., Quintero, J. y Paz, I. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technology*. 2010, vol. 101, p. 4754–4766.

Carle-Urioste, J., Escobar, J., El-Gogary, S. *et al.* Cellulase Induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. *The journal of biological chemistry*. 1997, vol. 272, no. 15, p. 10169–10174.

Carpita, N., Tierney, M. y Campbell, M. Molecular biology of the plant cell wall: searching for the genes that define structure, architecture and dynamics. *Plant Molecular Biology*. 2001, vol. 47, p. 1–5.

Cepero, M., Restrepo, S., Franco, A. *et al.* Biología de Hongos. Universidad de los Andes. Ediciones *Uniandes*. 2012, p. 3-12

Cerveró, J., Skovgaard, P., Felby, C. *et al.* Enzymatic hydrolysis and fermentation of palm kernel press cake for production of bioethanol. *Enzyme and Microbial Technology*. 2010, vol. 46, p. 177–184.

Chandel, K., Jandaik, S., Kumari, V. *et al.* Isolation, Purification and Screening of Cellulolytic Fungi from Mushroom Compost for Production of Enzyme (Cellulase). *International Journal of Current Research*. 2013, vol. 5, p. 222-229.

Chaparro, D., Rosas, D. y Varela, A. Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera (Quindío, Colombia). *Rev. Iberoam Micol.* 2009, vol. 26, no. 4, p. 238–243

Chavalparit, O., Rulkens, W., Mol, A. *et al.* Options for environmental sustainability of the crude palm oil industry in Thailand through enhancement of industrial ecosystems. *Environment, Development and Sustainability*. 2006, vol. 8, p. 271–287

Colavolpe, M. Jaramillo, S. y Albertó, E. Efficiency of treatments for controlling *Trichoderma spp* during spawning in cultivation of lignicolous mushrooms. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2014, vol. 45, no. 4, p. 1263-1270.

Conpes 3510. Consejo Nacional de Política Económica y Social. Departamento Nacional de Planeación. República de Colombia. 2008

Cudris, N. Caracterización de la microbiota contaminante del cultivo de *Lentinula edodes* (shiitake) en diferentes residuos agroforestales. Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá. 2011

Cui, Y., Van der Lans, R. y Luyben, K. Effects of Dissolved Oxygen Tension and Mechanical Forces on Fungal Morphology in Submerged Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. 1998, vol. 57, p. 409-419.

Damaso, M., Terzi, S., Farias, A. *et al.* Selection of Cellulolytic Fungi Isolated from Diverse Substrates. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2012, vol. 55, p. 513-520.

Darmwal, N. y Gaur, A. Isolation of Cellulolytic Fungi for Cellulase and Protein Production from Rice Straw. *Zentralbl. Mikrobiol.* 1991, vol. 146, p. 467-470

Dashtban, M., Schraft, H. y Qin W. Fungal Bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. *International Journal of Biological Sciences*. 2009, vol. 5, p. 578-595.

Delabona, P., Buzon, R. Codima, C. *et al.* Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. *Biomass and Bioenergy*. 2012, vol. 37, p. 243-250

Deswal, D., Pal Khosa, Y., Chander, R. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis* sp. RCK2010 under solid state fermentation. *Bioresource Technology*. 2011, vol. 102, p. 6065–6072

Dwivedi, P., Alavalapati, J. y Lal, P. Cellulosic ethanol production in the United States: Conversion technologies, current production status, economics, and

emerging developments. *Energy for Sustainable Development*. 2009, vol. 13, p. 174–182.

Doheny, J., Jarvis, E., Guarna, M. *et al.* Cellulose as an inert matrix for presenting cytokines to target cells production and properties of a stem cell factor–cellulose-binding domain fusion protein. *Biochemical Society*. 1999, vol. 339, p. 429-434

Domingues, F., Queiroz, J. Cabral, J. *et al.* The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000, vol. 26, p. 394–401

Emsley, A. y Steven, G. Kinetics and mechanisms of the low-temperature degradation of cellulose. *Cellulose*. 1994, vol. 1, p. 26-56

Escalante, H. Orduz, J. Zapata, H. *et al.* Atlas del Potencial Energético de la Biomasa Residual en Colombia. 2006. ISB N: 978-9 58-8504-59-9

Esterbauer, H., Hayn, M., Abuja, P. *et al.* Structure of Cellulolytic Enzymes. Chapter 23. *American Chemical Society*. 1991, p. 301-312

Fan, L., Lee, Y., Gharpuray, M. The Nature of Lignocellulosics and Their Pretreatments for Enzymatic Hydrolysis. *Advances in Biochemical Engineering*. 1982, vol. 23, p. 157-187.

Fedepalma. Anuario estadístico 2011. La agroindustria de la palma de aceite en Colombia y en el mundo 2006-2010. 2011.

Fedepalma. Anuario estadístico. 2013. La agroindustria de la palma de aceite en Colombia y en el mundo 2008- 2012. 2013.

Ferreira, N., Margeot, A., Blanquet, S. *et al.* Use of Cellulases from *Trichoderma reesei* in the Twenty-First Century—Part I: Current Industrial Uses and Future Applications in the Production of Second Ethanol Generation. Chapter 17. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. 2014, p. 254-256.

Ferrer, Y., León, Marta., Michelena, G. *et al.* Selección de hongos aislados de bagazo de caña con actividad celulasa sobre celulosa cristalina para posibles aplicaciones industriales. *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar Ciudad de La Habana, Cuba ICIDCA*. 2011, vol. 45, p. 3-12

Freitas, A., Ferreira, F., Costa, A. *et al.* Biological treatment of the effluent from a bleached kraft pulp mill using basidiomycete and zygomycete fungi. *Science of the Total Environment*. 2009, vol. 407, p. 3282–3289.

Gan, Q., Allen, S., Taylor, G. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modelling. *Process Biochemistry*. 2003, vol. 38, p. 1003-1018.

Gautam, P., Bundela, P., Pandey, A. *et al.* Optimization of the medium for the production of cellulase by the *Trichoderma viride* using submerged fermentation. *International journal of environmental sciences*. 2010. vol. 1, p. 656-665. ISSN 0976 – 4402.

Gilbertson, R. Wood- Rotting fungi of North American. *Mycological Society of America*. 1980, vol. 72, p. 1103-1327

Gomathi, D., Muthulakshmi, C., Guru D. *et al.* Submerged fermentation of wheat bran by *Aspergillus flavus* for production and characterization of carboxy methyl cellulose. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012, p. S67-S73.

Goodell, B., Qian, Y., Jellison, J., *et al.* Lignocellulose oxidation by low molecular weight metal-binding compounds isolated from wood degrading fungi: A comparison of brown rot and white rot systems and the potential application of chelator-mediated Fenton reactions. *Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*. 2002, vol. 21, p. 33-47

Gottschalk, L., Oliveira, R. y Da Silva, E. Cellulases, xylanases,  $\beta$ -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biochemical Engineering Journal*. 2010, vol. 51, p. 72–78.

Goyal, A., Ghosh, B. y Eveleigh, D. Characteristics of Fungal Cellulases. *Bioresource Technology*. 1991, vol. 36, p. 37-50.

Gutiérrez, L., Sánchez, O. y Cardona, C. Process integration possibilities for biodiesel production from palm oil using ethanol obtained from lignocellulosic residues of oil palm industry. *Bioresource Technology*. 2009, vol. 100, p. 1227–1237.

Ghose, T. Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem, IUPAC*. 1987, vol. 59, p. 257—268.

Hansen, G., Lübeck, M., Frisvad J. *et al.* Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. *Process Biochemistry*. Artículo Impreso. 2015, PRBI-10432, p.15.

Hatakka, A. y Hammel, K. Fungal Biodegradation of Lignocelluloses. *Industrial Applications*. 2010, vol. 10, p. 319-340

Hatakeyama, T. y Hatakeyama, H. Thermal Properties of Green Polymers and Biocomposites, Chapter 3. Hot Topics in Thermal Analysis and Calorimetr *Kluwer academic publishers*. 2005, vol. 4, p. 39-130.

Howard, R., Abotsi, E., Rensburg, J. *et al.* Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*. 2003, vol. 2, p. 602-619.

Hu, G., Hertmann, J y Rojas, O. Feedstock pretreatment strategies for producing ethanol from Wood, bark, and forest residues. *BioResources*. 2008, vol. 3, p. 270-294

Humboldt, A. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt. Incentivos económicos perversos para la conservación de la biodiversidad: El caso de la palma africana. Síntesis. *Boletín 21*. Colombia. 2000.

Inuwa, M. Screening of Fungi Isolated from Environmental Samples for Xylanase and Cellulase Production. *ISRN Microbiology*. 2013, Article ID 283423, p. 7.

Jørgensen, H., Kristensen, J y Felby, C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels. Bioprod. Bioref.* 2007, vol. 1, p. 119–134

Juhász, T., Szengyel, Z., Réczey, K. *et al.* Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry*. 2005, vol. 40, p. 3519–3525.

Karmakar, M. y Ray, R. Saccharification of agro wastes by the Endoglucanase of *Rhizopus oryzae*. *Annals of Biological Research*. 2011, vol 2, no. 1, p. 201-208.

Kassim, M., Bakar, N., Kheang, L. *et al.* Influence of solid Loading concentrations, Inoculums Size and Nitrogen Sources on Ethanol Production from Empty Fruit Bunches (EFB) Hidrolysate in separate Hydrolysis and fermentation (SHF). *Research Journal of Applied Sciences*. 2011, vol. 6, no. 5, p. 310-319

Khokhar, I., Saleem, M., Mushtaq, S. *et al.* Isolation and Screening of Highly Cellulolytic Filamentous Fungi. *J. Appl. Sci. Environ. Manage.* 2012, vol. 16, no. 3, p. 223 - 226

Kim, Y., Ximenes, E., Mosier, N. *et al.* Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. *Enzyme and Microbial Technology*. 2011, vol. 48, p. 408–415

Kirk, K. Degradation and Conversion of Lignocelluloses. Chapter 11. *The filamentous fungi. technology*. London. 1983, vol. 4, p. 266-295.

Knill, C. y Kennedy, J. Degradation of cellulose under alkaline conditions. *Carbohydrate Polymers*. 2003, vol. 51, p. 281–300

Kubicek, C. Release of carboxymethyl-Cellulase and  $\beta$ -glucosidase from cell walls of *Trichoderma reesei*. *European J Appl Microbiol Biotechnol*. 1981, vol. 13, p. 226-231

Kuhad, R., Singh, A. y Eriksson, K. Microorganisms and Enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 1997, vol. 57, p. 45-125

Kuijk, S., Sonnenberg, A., Baars, J. *et al.* Fungal treated lignocellulosic biomass as ruminant feed. *Biotechnology Advances*. 2015, vol. 33, p. 191–202

Kumar, P., Barrett, D., Delwiche, M. *et al.* Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel roduction. *American Chemical Society*. 2009, vol. 48, p. 3713–3729

Leeuwen, J., Rasmussen, M., Sankaran, C. *et al.* Fungal Treatment of Crop Processing Wastewaters with Value-Added Co-Products. Sustainable Bioenergy and Bioproducts. *Green Energy and Technology*. 2012, p. 13-44.

Lim, J. A case study on palm empty fruit bunch as energy feedstock. *SEGi Review*. 2010, vol. 3, p. 3-15. ISSN 1985-5672

Lim, S., Lee, Y., y Kang, H. Efficient Recovery of Lignocellulolytic Enzymes of Spent Mushroom Compost from Oyster Mushrooms, *Pleurotus spp.*, and Potential Use in Dye Decolorization. *Mycobiology*. 2013, vol. 41, no. 4, p. 214-220

Lozanoff, J., Heinichen, S., Marchi, G. *et al.* Bioenergía: Revisión de energías emergentes. *Observatorio de Políticas Públicas*. 2007, p. 84.

Lynd, L. Weimer, P., Zyl, W. y Pretorius, I. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2002, vol. 66 no. 3, p. 506–577.

Mahmud, N., Baharuddin, A. Bahrin, E. Enzymatic Saccharification of Oil Palm Mesocarp Fiber (OPMF) Treated with Superheated steam. *BioResources*. 2013, vol. 8, p. 1320- 1331

Mandels, M. y Reese E. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *Journal of Bacteriology*. 1956, vol. 3, p. 269-278.

Mandels, M. y Weber, J. The Production of Cellulases. Cellulases and their Applications. Chapter 23. *Food Microbiology Division, US Army Natick Laboratories*. 1969, p. 391–414

Maheswari, D., Jahan, H., Paul, J. *et al.* Wheat straw, a potential substrate for cellulase production using *Trichoderma reesei*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1993, vol. 9, p. 120-121.

Maheshwari, R., Bharadwaj, G. y Bhat, M. Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2000, vol. 64, no. 3, p. 461–488.

Martínez, H. Salazar, M., Barrios, C. *et al.* La cadena de las oleaginosas en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Documento de Trabajo No. 62. *Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agroclimas Colombia*. 2005.

Miller, G. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical chemistry*. 1959, vol. 31, no. 3, p. 426-428.

Milosavljevic, I., Oja, V. y Suuberg, E. Thermal effects in cellulose pyrolysis: relationship to char formation processes. *American chemical society*. 1996, vol. 35, p. 653-662.

Mora, J. Weber, J. y Clemen, C. Peach palm. *Bactris gasipaes* Kunth. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 20. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ *International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy*. 1997, p. 14.

Mun, W., Rahman, A., Abd-aziz, S. *et al.* Enzymatic hydrolysis of palm oil mill effluent solid using mixed cellulases from locally isolated fungi. *Research Journal of microbiology*. 2008, vol. 3, no. 6, p. 474-481.

Murali, H., Mohan, M., Manja, K. *et al.* Short Note: Cellulolytic activity of four *Fusarium spp.* *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 1994, vol.10, p.407

Mrudula, S. y Murugammal, R. Production of cellulase by *Aspergillus niger* under submerged and solid state fermentation using coir waste as a substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2011, vol. 42, p. 1119-1127

Narasimha, P., Babu, B., Radhaiah, A. *et al.* Screening, Identification and Isolation of Cellulolytic fungi from soils of Chittoor District, India. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*. 2014, vol.3, no. 7, p. 761-771

Naveenkumar, K. y Thippeswamy. Isolation and screening of potential cellulolytic fungi from Areca nut husk waste. *Int J Curr SCI. ISSN 2250-1770*. 2013, vol.8. p. E125-132

Obahiagbon, F. A review: Aspects of the African oil palm (*Elaeis guineensis* jaq.) and the implications of its bioactives in Human Health. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2012, vol. 2, no 3, p. 106-119

Olofsson, K., Bertilsson, M. y Lidén, G. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*. 2008, vol. 1, p. 7.

Olsson, L., Christensen, T., Hansen, K. *et al.* Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003, vol. 33, p. 612–619

Pallares, C., Aldana, J., Calvache, H. *et al.* Análisis del comportamiento y comunicación química intraespecífica en *Strategus aloeus* (L.) (Coleoptera, Scarabaeidae - Dynastinae). *Palmas*. 2000, vol. 21, p. 185-194.

Peciulyte, A., Anasontzis, G., Karlström, K. *et al.* Morphology and enzyme production of *Trichoderma reesei* Rut C-30 are affected by the physical and structural characteristics of cellulosic substrates. *Fungal Genetics and Biology*. 2014, vol. 72, p. 64–72

Petersen J. The Kingdom of Fungi. Princeton University Press. Denmark. 2012, p. 265. ISBN 978-0-691-15754-2

Perez, J., Muñoz, J., Rubia, T. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int Microbiol*. 2002, vol. 5, p. 53-63.

Pérez, Y., Bocourt<sup>1</sup>, Rebollido, R., Martínez, J. Aislamiento e identificación de hongos en compost elaborado a partir de residuos sólidos urbanos. *Agro Sur* 2010, vol. 38, no. 1, p. 1-7.

Percival, Y., Hong, J. y Ye, X. Cellulase Assays, chapter 14. Humana Press. *Biofuels Methods and Protocols. Mol Biol*. 2009, vol. 581, p. 213-231.

Percival, Y., Himmel, M. y Mielenz, J. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*. 2006, vol. 24, p. 452–481.

Prasertsan, P. and Ol, S. Production of cellulolytic enzymes from fungi and use in the saccharification of palm cake and palm fibre. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1992, vol. 8, p. 536-538.

Prasertsan, P., H-kittikul, A. y Chitmanee, B. Isolation and selection of cellulolytic fungi from palm oil mill effluent. *World journal of microbiology and biotechnology*. 1992, vol. 8, p. 614-617.

Reczey, K., Szengyel, Z., Eklund, R. *et al.* Cellulase production by *T. Reesei*. *Bioresource Technology*. 1996, vol. 57, p. 25-30

Rodríguez, M. y Hoof, B. El desempeño ambiental del sector palmicultor colombiano: una década de avances y un futuro promisorio. *Revista Palmas-Fedepalma*. 2003, vol. 24, no. 3, p. 69-86.

Rubin, E. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*. 2008, vol. 454, p. 841-845

Ruiz, M. Obtención de jarabes de glucosa a partir de almidón de yuca por medio de hidrólisis enzimática, para ser usados como sustrato en la producción de bioetanol. Tesis para optar por el título de Química. Facultad de ciencias. Universidad Industrial de Santander. Colombia. 2009.

Saldarriaga, Y. y Pineda, F. Manual de Micología Aplicada. Editorial Universidad de Antioquia. Colombia. 2001, p. 69-73.

Saloheimo, A. Aro, N., Ilmén, M. *et al.* Isolation of the *ace1* Gene Encoding a Cys2-His2 Transcription Factor Involved in Regulation of Activity of the Cellulase Promoter *cbh1* of *Trichoderma reesei*. *J. Biol. Chem.* 2000, vol. 275, p. 5817-5825

Salcedo, J. López, J. Flórez, L. Evaluación de enzimas para la hidrólisis de residuos (hojas y Cogollos) de la cosecha caña de azúcar. *DYNA.* 2011, vol. 78, p. 1-8.

<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/dyna/rt/printerFriendly/18079/48744>.

Samson, R., Varga, J., Frisvad, J. Taxonomic Studies on the genus *Aspergillus*. An institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences. *Studies in mycology.* 2011, p. 69.

Sánchez, C. Métodos de Cultivos de Hongos: Guía práctica N° 3. Laboratorio de Micología, Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad Industrial de Santander. 2012, p. 5

Sánchez, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances.* 2009, vol. 27, p. 185–194.

Shafiei, M., Karimi, K. y Taherzadeh, M. Palm Date Fibers: Analysis and Enzymatic Hydrolysis. *Int. J. Mol. Sci.* 2010, vol. 11, p. 4285-4296.

Shahriarinour, M., Wahab, M., Ariff, A. *et al.* Screening, Isolation and Selection of Cellulolytic Fungi from Oil Palm Empty Fruit Bunch Fibre. *Biotechnology.* 2011, vol. 10, p. 108-113

Shamsudin, S., Shah, U., Zainudin, H. Effect of steam pretreatment on oil palm empty fruit bunch for the production of sugars. *Biomass and bioenergy*. 2012, vol. 36, p. 280-288

Sharma, S. y Sumbali, G. Isolation and screening of cellulolytic fungal species associated With lower denomination currency notes, circulating in Jammu city (india). *International Journal of Recent Scientific Research Research*. 2014, vol. 5, p. 596-600

Shinoj, S., Visvanathan, R., Panigrahi, S. *et al.* Oil palm fiber (OPF) and its composites: A review. *Industrial Crops and Products*. 2011, vol. 33, p. 7-22.

Singh, A., Abdullah, N. y Vikineswary, S. Optimization of extraction of bulk enzymes from spent mushroom compost. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2003, vol. 78, p. 743–752

Singhania, R., Sukumaran, R., Patel, A. *et al.* Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*. 2010, vol. 46, p. 541–549

Sjöström, E. Wood chemistry, fundamentals and applications. *Academic Press*. 1993, p. 54. San Diego

Sridevi, B. y Singara, M. Isolation, identification and screening of potential cellulase-free xylanase producing fungi. *African Journal of Biotechnology*. 2011, vol. 10, no. 22, p. 4624-4630

Sridhar, M. and AdeOluwa, O. Palm Oil Industry Residues. Chapter 18. Springer. *Biotechnology for Agro-industrial Residues utilization*. 2009, p. 341-355. Paris. Nigan, P. and Pandey, A.

Studies in Micology en:  
<http://www.cbs.knaw.nl/publications/CBSPublicationDetails.aspx?Rec=1061>

Sulaiman, F., Abdullah, N., Gerhauser, H. *et al.* An outlook of Malaysian energy, oil palm industry and its utilization of wastes as useful resources. *Biomass and bioenergy*. 2011, vol.35, p. 3775- 3786.

Sun, T. y Cheng, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. 2002, vol. 83, p. 1–11

Suto, M. y Tomita, F. Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2001, vol. 92, p. 305-311.

Sylvia, D., Fuhrmann, J., Hartel, P., *et al.* Principles and Applications of Soil Microbiology. Pearson-Prentice Hall. New Jersey. 2005, p. 640. ISBN 0-13-094117-4

Tabil, L., Adapa P. y Kashaninejad, M. Biomass Feedstock Pre-Processing– Part 1: Pre-Treatment, Chapter 18. *Biofuel's Engineering Process Technology*. Bernardes, M. 2011, p. 411-438.

Teather, R. and Wood, P. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rument. *Applied and Environmental Microbiology*. 1982, vol. 43, no. 4, p. 777-780

Tengborg, C., Galbe, M., Zacchi, G. Reduced inhibition of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. *Enzyme and Microbial Technology*. 2001, vol. 28, p. 835–844.

Tian, X., Fang, Z. y Guo, F. Impact and prospective of fungal pre-treatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2012, vol. 6, p. 335–350.

Timilsena, Y., Abeywickrama, C., Rakshit, S. *et al.* Effect of different pretreatments on delignification pattern and enzymatic hydrolysability of miscanthus, oil palm biomass and typha grass. *Bioresource Technology*. 2013, vol. 135, p. 82–88.

Tomás-Pejó, E., Alvira, P., Ballesteros, M. *et al.* Pretreatment technologies for lignocellulose-to-bioethanol conversión. Chapter 7. *Biofuels- Alternative feedstocks and conversion processes*. 2011, p. 149- 174. ISBN: 978-0-12-385099-7.

Torres, G., Sarria, G., Varón, F. Evidencias circunstanciales de la asociación de especies de la familia Tettigoniidae con el desarrollo de lesiones iniciales de la pudrición del cogollo de la Palma de aceite. *Palmas, edición limitada*. 2008, vol. 29, p. 53-61.

Umikalsan, M. Ariff, A., Zulkifli, H. *et al.* The treatment of oil palm empty fruit bunch Fibre for subsequent use as substrate for Cellulase production by *Chaetomium globosum* kunze. *Bioresource Technology*. 1997, vol. 62, p.1-9

Umile, C. y Kubicek, C. A constitutive, plasma-membrane bound  $\beta$ -glucosidase in *Trichoderma reesei*. *FEMS. Microbiology*. 1986, vol. 34, p. 291-295

Vilches P. L. Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaras. Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2002.

Wang, W., Yuan, T., Wang, K. *et al.* Statistical optimization of cellulase production by the brown rot fungi, *Fomitopsis palustris*, and its application in the enzymatic hydrolysis of LHW-pretreated woody biomass. *Process Biochemistry*. 2012, vol. 47, p. 2552–2556

Wang, Z. Bay, H. y Chew, K. *et al.* High-loading oil palm empty fruit bunch saccharification using cellulases from *Trichoderma koningii* MF6. *Process Biochemistry*. Article in press. 2014.

Yang, B. Industrial processes and waste characterization. *Resources, Conservation and Recycling*. 1996, vol 16, p. 93-112.

Zheng, Y., Lin, H. y Tsao, G. Pretreatment for Cellulose Hydrolysis by Carbon Dioxide Explosion. *Biotechnol. Prog.* 1998, vol 14, p. 890-896.

Zheng, Y., Pan, Z., Zhang, R. *et al.* D.Enzymatic saccharification of dilute acid pretreated saline crops for fermentable sugar production. *Applied Energy*. 2009, vol. 86, p. 2459–2465

## ANEXOS

### Anexo A. Medios de cultivo.

- **Medio de cultivo patata-glucosa Merck**

#### Preparación

En un Erlenmeyer de capacidad de 2 litros disolver 39 gramos de agar patata-glucosa en 1 L de agua destilada y mezclar bien. Calentar agitando frecuentemente y dejar hervir durante un minuto para disolver completamente el polvo. Esterilizar en autoclave entre 118 y 121 °C durante 15 minutos. Servir en cajas de Petri 100 x 15 a  $\pm 40$  °C.

- **Agar salvado celulolítico (ASC)**

Salvado	175 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.4 g/ L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g/ L
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	0.4 g/L
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.3 g /L
FeSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.05 g / L
CoCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0.0037 g / L
MnSO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	0.0016 g / L
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0.0014 g / L
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	0.4 g / L
Urea	0.3 g/ L
Peptona	0.75 g/ L
Extracto de levadura	0.2 g / L
Cloranfenicol	0.5 g / L
Agar- agar	15 g / L

- **Medio de cultivo con carboximetilcelulosa (MCMC) (Mandels y Reese, 1957)**

Carboximetilcelulosa sodium salt	
Low viscosity	10 g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.4 g/ L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2 g/ L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.4 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3 g /L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05 g / L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0037 g / L
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.0016 g / L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0014 g / L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.4 g / L
Urea	0.3 g/ L
Peptona	0.75 g/ L
Extracto de levadura	0.2 g / L
Agar- agar	15 g / L

- **Medio de cultivo celulosa (MC) (Modificado de Ahamed y Vermette, 2009)**

Celulosa microcristalina Avicel®	10 g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.4 g/ L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2 g/ L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.4 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3 g /L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05 g / L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0037 g / L
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.0016 g / L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0014 g / L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.4 g / L
Glucosa	10 g / L
Urea	0.3 g/ L
Peptona	0.75 g/ L
Extracto de levadura	0.2 g / L
Agar- agar	15 g / L

- **Medio de cultivo celulosa- fermentación sumergida (MCFS)** (Modificado de Ahamed y Vermette, 2008)

Papel de filtro Whatman	10 g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.4 g/ L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2 g/ L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.4 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3 g /L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05 g / L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0037 g / L
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.0016 g / L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0014 g / L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.4 g / L
Urea	0.3 g/ L
Peptona	0.75 g/ L
Extracto de levadura	0.2 g / L

## **Anexo B. . Cuantificación de proteínas.**

- Determinación de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976)
  1. Se realiza una curva de calibración con albumina de suero bovino como patrón tomando concentraciones entre 0,050 y 2 mg\*ml<sup>-1</sup>.
  2. Se utiliza como reactivo azul brillante de Coomassie G-250. Se lee en un espectrofotómetro a 595 nm y se realiza ajuste por el método de mínimos cuadrados.
  3. Los patrones y las muestras se procesan adicionando en un tubo 20 µl de patrón o extracto enzimático según corresponda, se agrega 1000 µl del reactivo de Bradford, se mezcla y se realiza lectura.

### Anexo C. Cuantificación de azúcares y glucosa

- Determinación de concentración de azúcares totales de los extractos enzimáticos por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, G., 1959).

Se realiza una curva de calibración con glucosa como patrón tomando concentraciones entre 0.1 y 2 mg\*ml<sup>-1</sup>

Se utiliza como reactivo ácido 3,5 dinitrosalicílico. Se lee en un espectrofotómetro a 540 nm y se realiza ajuste por el método de mínimos cuadrados.

Los patrones y las muestras se procesan adicionando 500 µl del extracto enzimático, 500 µl de DNS. Se tapa el tubo y se lleva a agua en hervor durante 5 minutos.

Finalizados los 5 minutos, se lleva el tubo a choque térmico con hielo.

Finalmente se adiciona a cada tubo 5 ml de agua destilada y se leer en espectrofotómetro.

- Determinación de glucosa por el método de glucosa oxidasa

Se utiliza el reactivo del Kit para determinación de glucosa de Byosistem el cual contiene: Fosfatos 100 mmol/L, fenol 5 mmol/L, glucosa oxidasa > 10 U/mL, peroxidasa > 1U/mL, 4-aminoantipirina 0,4 mmol/L, pH 7,5

El patrón es proporcionado por el Kit con una concentración de 100 mg/dL

Los patrones y las muestras se procesan adicionando 10 µl del patrón o del sobrenadante de sacarificación según corresponda en 1000µl de reactivo. Se incuba por un periodo de 10minutos.

Finalizado el tiempo se lee a 400 nm en espectrofotómetro.

Los resultados son expresados en mg\*dL<sup>-1</sup> por m e  
(Absorbancia muestra/ Absorbancia patrón) x Concentración patrón =  
Concentración muestra.

## **Anexo D. Determinación de actividad celulolítica total.**

### **Equipos**

Balanza

Plancha con calentamiento y termómetro

Espectrofotómetro

Micropipeta

Estufa

### **Materiales y reactivos:**

Tubos de vidrio con 50 mg de papel de filtro Whatman N° 1 (26 círculos de sacabocados)

Buffer citrato 50 mM pH 4,8

Ácido 3,5-dinitrosalicílico DNS

Agua destilada

Puntas de 1000 µl

Vaso de vidrio

Jarra metálico

Hielo

### **•Procedimiento**

Colocar la plancha con calentamiento a 85 °C y el termómetro a 50 °C. Sobre la plancha colocar un vaso de precipitado con 300 ml de agua, en el interior el termómetro y dejar calentar hasta lograr la temperatura de 50°C.

Colocar en los tubos de vidrio 26 círculos de papel de filtro Whatman N°1.

Adicionarle a los tubos 1 ml de Buffer citrato 50 mM pH 4,8

Sumergir los tubos en el agua que previamente fue calentada a 50 °C.

Una vez lograda la temperatura en los tubos adicionar 500 µl del extracto enzimático e incubar durante 1 hora.

Culminado el tiempo. Tomar 500 µl de la reacción del punto 5 y llevarlos a un tubo de vidrio resistente al calor.

Al tubo que contiene los 500 µl de la reacción agregarle 500 µl de DNS Colocarle tapa al tubo y llevarlo a agua en hervor durante 5 minutos.

Finalizado los 5 minutos, llevar el tubo del punto 7 a un recipiente con hielo.


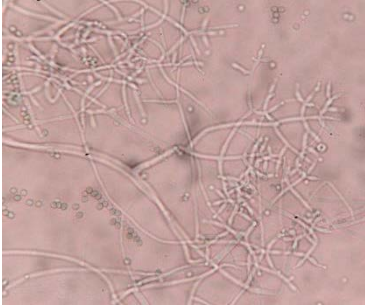

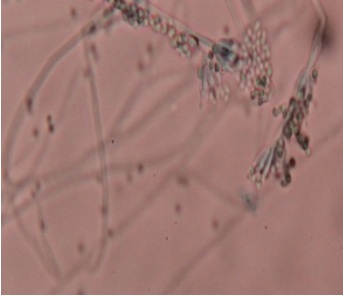
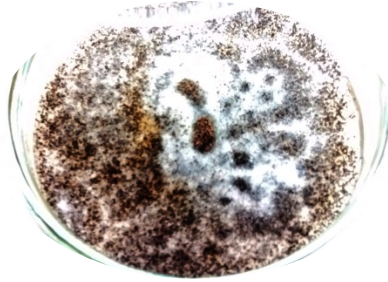
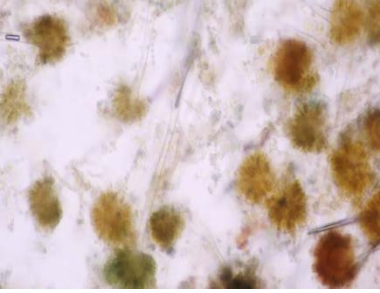
Finalmente adicionar a cada tubo 5 ml de agua destilada y leer en espectrofotómetro a 540 nm. La variable de respuesta serán las unidades de Papel de filtro por mililitro (UPF/mL) determinadas por la fórmula propuesta por Ghose, 1987.

**Anexo E. Cepas fúngicas colectadas, con el código asignado para el manejo de laboratorio y la muestra de la cual fueron aisladas**

<b>Código</b>	<b>Muestra</b>	<b>Aislamiento</b>
LMA 1	Madera	<i>Aspergillus</i>
LMA 2	Madera	<i>Aspergillus</i>
LMA 3	Madera	<i>Aspergillus</i>
LMA 4	Madera	<i>Trichoderma</i>
LMA 5	Madera	<i>Penicillium</i>
LMA 6	Madera	<i>Penicillium</i>
LMA 7	Madera	<i>Fusarium</i>
LMA 8	Suelo	<i>Aspergillus</i>
LMA 9	Macromicetos	<i>Penicillium</i>
LMA 10	Madera	<i>Trichoderma</i>
LMA 11	Madera	<i>Aspergillus</i>
LMA 12	Macromicetos	<i>Trichoderma</i>
LMA 13	Madera	<i>Eupenicillium</i>
LMA 14	Madera	<i>Trichoderma</i>
LMA 15	Madera	<i>Aspergillus</i>
LMA 16	Madera	<i>Trichoderma</i>
LMA 17	Madera	<i>Eupenicillium</i>
LMA 18	Madera	<i>Trichoderma</i>
LMA19	Suelo	<i>Beauveria</i>
LMA 20	Macromicetos	<i>Aspergillus</i>
LMA 21	Macromicetos	<i>Aspergillus</i>
LMA 22	Macromicetos	<i>Aspergillus</i>
LMA 23	Madera	<i>Trichoderma</i>
LMA 24	Macromicetos	<i>Trichoderma</i>
LMA 25	Macromicetos	<i>Aspergillus</i>
LMA 26	Suelo	<i>Aspergillus</i>
LMA 27	Madera	<i>Trichoderma</i>
LMA 28	Madera	<i>Eupenicillium</i>
LMA 29	Macromicetos	<i>Penicillium</i>
LMA 30	Macromicetos	<i>Trichoderma</i>
LMA 31	Madera	<i>Trichoderma</i>
LMA 32	Macromicetos	<i>Trichoderma</i>
LMA 33	Madera	<i>Trichoderma</i>
LMA 34	Macromicetos	<i>Trichoderma</i>
LMA 35	Macromicetos	<i>Aspergillus</i>
LMA 36	Macromicetos	<i>Aspergillus</i>
LMA 37	Madera	<i>Trichoderma</i>
LMA 38	Macromicetos	<i>Aspergillus</i>
LMA 39	Macromicetos	<i>Trichoderma</i>
LMA 40	Madera	<i>Trichoderma</i>
LMA 41	Macromicetos	<i>Penicillium</i>
LMA 42	Macromicetos	<i>Penicillium</i>

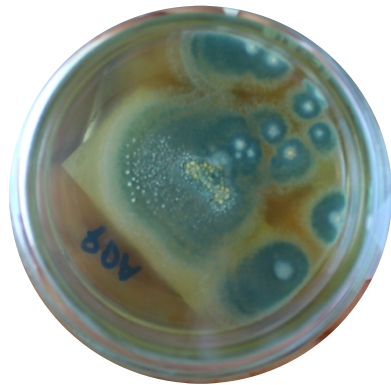
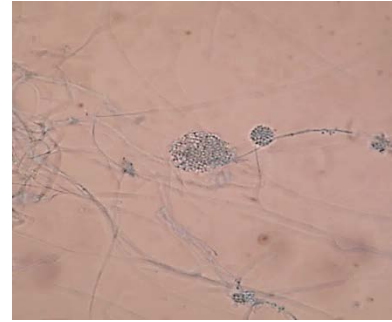
**LMA** : Laboratorio de Micología, Ascomycetos

**Anexo F. Fotografías microscópicas y macroscópicas de los géneros aislados.**

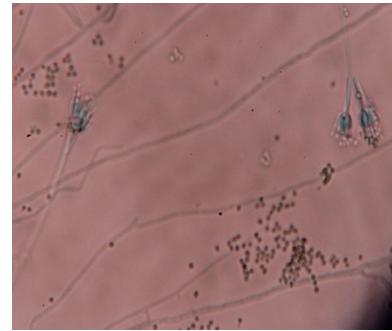
<b>Género fúngico</b>	<b>Características microscópicas</b>
 <p data-bbox="477 821 688 852"><i>Trichoderma</i> spp</p>	
 <p data-bbox="485 1333 680 1365"><i>Penicillium</i> spp</p>	
 <p data-bbox="482 1753 686 1785"><i>Aspergillus</i> spp</p>	



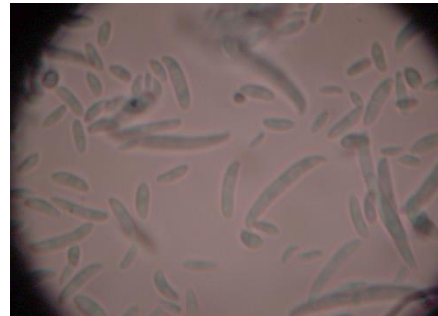
*Beauveria* spp.



*Eupenicillium* spp.



*Fusarium* spp.



**Anexo G. Tamaño y halo de hidrólisis de los aislamientos evaluados cualitativamente.**

<b>Código</b>	<b>Aislamiento</b>	<b>Hidrolisis (cm)</b>	<b>Crecimiento(cm)</b>
LMA 1	<i>Aspergillus</i>	2	1,35
LMA 2	<i>Aspergillus</i>	3,35	2,3
LMA 3	<i>Aspergillus</i>	2,5	2,1
LMA 4	<i>Trichoderma</i>	4,5	6,25
LMA 5	<i>Penicillium</i>	2	1,65
LMA 6	<i>Penicillium</i>	2,55	2,05
LMA 7	<i>Fusarium</i>	2,75	2,75
LMA 8	<i>Aspergillus</i>	1,85	1,5
LMA 9	<i>Penicillium</i>	2,9	1,5
LMA 10	<i>Trichoderma</i>	3,35	5,1
LMA 11	<i>Aspergillus</i>	1,75	1,2
LMA 12	<i>Trichoderma</i>	4,4	6,5
LMA 13	<i>Eupenicillium</i>	1,9	1,35
LMA 14	<i>Trichoderma</i>	3,2	3
LMA 15	<i>Aspergillus</i>	3,15	1,75
LMA 16	<i>Trichoderma</i>	4,5	5,55
LMA 17	<i>Eupenicillium</i>	2,25	1,9
LMA 18	<i>Trichoderma</i>	3,15	4,2
LMA19	<i>Beauveria</i>	4,35	1,6
LMA 20	<i>Aspergillus</i>	2,85	2,65
LMA 21	<i>Aspergillus</i>	2	1,55
LMA 22	<i>Aspergillus</i>	2,1	2,1
LMA 23	<i>Trichoderma</i>	4,5	6,35
LMA 24	<i>Trichoderma</i>	3,85	6,05
LMA 25	<i>Aspergillus</i>	2,2	2,15
LMA 26	<i>Aspergillus</i>	2,3	2,1
LMA 27	<i>Trichoderma</i>	3,05	3,7
LMA 28	<i>Eupenicillium</i>	2,55!	2,2
LMA 29	<i>Penicillium</i>	3,45	1,9
LMA 30	<i>Trichoderma</i>	4,9	7,25
LMA 31	<i>Trichoderma</i>	4,5	6,5
LMA 32	<i>Trichoderma</i>	5,65	7,75
LMA 33	<i>Trichoderma</i>	4,1	3,85
LMA 34	<i>Trichoderma</i>	2,4	2,05
LMA 35	<i>Aspergillus</i>	0	1,8
LMA 36	<i>Aspergillus</i>	2,45	2,25

---

<b>LMA 37</b>	<i>Trichoderma</i>	3,65	3,2
<b>LMA 38</b>	<i>Aspergillus</i>	2,25	1,9
<b>LMA 39</b>	<i>Trichoderma</i>	4,6	6,75
<b>LMA 40</b>	<i>Trichoderma</i>	3,5	4,05
<b>LMA 41</b>	<i>Penicillium</i>	2,9	1,7
<b>LMA 42</b>	<i>Penicillium</i>	3,15	2,8

---