UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE AISLAMIENTOS MICROBIANOS CELULOLÍTICOS Y LIGNOLÍTICOS, Y SU APLICACIÓN EN LA DEGRADACIÓN DE TAMO DE ARROZ (*Oryza sativa*)

Diana Catalina Pedraza Zapata

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Posgrado Interfacultades en Microbiología
Bogotá, Colombia
2014

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE AISLAMIENTOS MICROBIANOS CELULOLÍTICOS Y LIGNOLÍTICOS, Y SU APLICACIÓN EN LA DEGRADACIÓN DE TAMO DE ARROZ (*Oryza sativa*)

Diana Catalina Pedraza Zapata

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en ciencias microbiología

Directora:

MSc., Nubia Moreno Sarmiento

Codirectora:

cPh.D., Ivonne Gutierrez Rojas

Línea de Investigación:

Bioinsumos

Grupo de Investigación:

Bioprocesos y Bioprospección

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Posgrado Interfacultades en Microbiología

Bogotá, Colombia

2014

“Aprender sin pensar es inútil, pensar sin aprender es peligroso”

Confucio

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional de Colombia y el posgrado interfacultades en microbiología. A la ingeniera Nubia Moreno y la profesora Ivonne Gutiérrez por sus enseñanzas, dedicación y servirme de guías en el desarrollo de este trabajo. A la Dra. Zulma Suárez por sus enseñanzas durante el desarrollo del proyecto. A la Dra. Balkys Quevedo por abrirme las puertas durante los días de paro. A la profesora Martha Fontanilla y demás profesores que contribuyeron a mi proceso de formación. A mis compañeros de laboratorio por su amistad y ayuda durante el desarrollo experimental. A Socorro Prieto por su apoyo emocional y administrativo, a David y a mi familia por su apoyo y compañía.

Resumen

Con el fin de seleccionar microorganismos con actividad ligninocelulolitica para la degradación de tamo de arroz, en este trabajo se evaluaron 8 microorganismos previamente aislados (7.1, 8, 4.5, 4.5', 9, T1.1, H1, 7.4) a los cuáles se les realizaron pruebas cualitativas y cuantitativas. Con los resultados obtenidos, se escogieron los mejores microorganismos celulolíticos y ligninolíticos para realizar la evaluación de la actividad enzimática (endoglucanasa, exoglucanasa, β-glucosidasa, xilanasa, lacasa, manganeso peroxidasa) en medio líquido, variando la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno, con la finalidad de seleccionar el microorganismo ligninolítico y el microorganismo celulolítico más efectivo en la producción de estas enzimas. Una vez escogidos, se procedió a realizar la evaluación de la degradación en tamo de arroz en condiciones de invernadero, encontrando una rápida colonización de los microorganismos, e inducción de la actividad enzimática celulolítica y/o ligninolítica.

Palabras clave: Tamo de arroz, actividad enzimática, degradación, enzimas ligninocelulolíticas

Abstract

To select microorganisms with lignocellulolytic activity for degradation of rice straw, 8 previously isolated microorganisms were evaluated in this work (7.1, 8, 4.5, 4.5', 9, T1.1, H1, 7.4) with qualitative and quantitative tests. With the obtained results, the best cellulolytic and ligninolytic microorganisms were chosen to carry out the evaluation of enzyme activity (endoglucanase, exoglucanase, β-glucosidase, xylanase, laccase, manganese peroxidase) in liquid medium, varying the carbon source and the nitrogen source. In order to select the most effective ligninolytic and cellulolytic microorganism in the production of these enzymes. Once chosen, proceeded to carry out the evaluation of the degradation in rice straw under greenhouse conditions, finding a rapid colonization of microorganisms, and induction of cellulolytic and ligninolytic activity.

Keywords: Rice straw, enzymatic activity, biodegradation, lignocellulosic enzymes.

Contenido

Pág.

Resumen ..... **IX**

Lista de figuras ..... **XIII**

Lista de tablas ..... **XV**

Lista de Símbolos y abreviaturas ..... **XVI**

Introducción **1**

1. Marco teórico **3**
1.1 El arroz 3
1.1.1 Generalidades del arroz 3
1.1.2 Tamo de arroz 4
1.2 Materiales lignocelulósicos 5
1.2.1 Celulosa 6
1.2.2 Hemicelulosa 7
1.2.3 Lignina 8
1.3 Microorganismos asociados a la degradación de tamo de arroz 10
1.4 Enzimas ligninocelulolíticas 11
1.4.1 Celulasas 11
1.4.2 Xilanasas 13
1.4.3 Enzimas ligninolíticas 14
1.5 Antecedentes 16
1.6 Objetivos 18
1.6.1 Objetivo general 18
1.6.2 Objetivos específicos 18

2. Metodología **19**
2.1 Obtención de los microorganismos 19
2.2 Selección de los microorganismos 19
2.2.1 Evaluación cualitativa de la producción de celulasas 20
2.2.2 Evaluación cualitativa de la producción de enzimas ligninolíticas 20
2.2.3 Ensayo de respirometría sobre tamo de arroz 20
2.3 Determinación de la actividad ligninocelulolítica 22
2.3.1 Actividad de celulasas 22
2.3.2 Actividad de xilanasas 23
2.3.3 Determinación de la actividad ligninolítica 23
2.3.4 Análisis estadístico 24

2.4 Capacidad de degradación de los microorganismos seleccionados en invernadero....24
2.4.1 Evaluación de la actividad enzimática....25
2.4.2 Evaluación de la respirometría en invernadero....25

3. Resultados y discusión: Selección de los microorganismos....27
3.1 Evaluación cualitativa de la producción de celulasas....27
3.2 Evaluación cualitativa de la producción de ligninasas....29
3.3 Ensayo de respirometría en tamo de arroz....30
3.4 Conclusión del primer objetivo....32

4. Resultados y discusión: Determinación de la actividad ligninocelulolítica....33
4.1 Actividad enzimática del aislamiento 7.1....33
4.1.1 Determinación de la actividad de celulasas....33
4.1.2 Determinación de la actividad de xilanasa....38
4.2 Actividad enzimática del aislamiento T1.1....39
4.2.1 Determinación de la actividad de celulasas....39
4.2.2 Determinación de la actividad de xilanasa....43
4.2.3 Determinación de la actividad de ligninasa....44
4.3 Conclusión del segundo objetivo....45

5. Resultados y discusión: capacidad de degradación de los aislamientos seleccionados en invernadero....47
5.1 Prueba de respirometría....50
5.2 Actividad enzimática....51
5.3 Conclusión tercer objetivo....55

6. Conclusiones y recomendaciones....56
6.1 Conclusiones....56
6.2 Recomendaciones....56

A. Anexo: Medios de cultivo....59

B. Anexo: Curvas de calibración actividad enzimática....61

C. Anexo: Gráficas actividad celulasa 7.1....62

D. Anexo: Gráficas actividad celulasa T1.1....65

E. Anexo: Gráficas actividad xilanasa....68

F. Anexo: Gráficas actividad de ligninasa....69

G. Anexo: Productividad de la actividad celulolítica en *Penicillium* sp. H1....70

H. Anexo: Actividad enzimática invernadero....71

Bibliografía....73

Lista de figuras

Pág.

Figura 1- 1: Distribución de la lignocelulosa (Modificado de Menon & Rao, 2012) 6
Figura 1- 2: Estructura de la celulosa (Kumar, *et al*., 2008) 7
Figura 1- 3: Estructura del Xilano (Chávez, *et al*., 2006) 8
Figura 1- 4: Precursores de la lignina (Granda, *et al*., 2005) 8
Figura 1- 5: Molécula de lignina (Granda, *et al*., 2005) 9
Figura 1- 6: Degradación de la celulosa (modificado de Aro, *et al*., 2005) 12
Figura 1- 7: Dominio de unión a celulosa y dominio catalítico (modificado de Xi, *et al*., 2013) 13
Figura 1- 8: Sitio de acción de las xilanasas en el Xilano (modificado de Chávez, 2006) 14
Figura 1- 9: Ciclo catalítico de las peroxidasas (Ruíz & Martínez, 2009) 15

Figura 2- 1: Montaje respirometría. 21
Figura 2- 2: Reacciones respirometría. 21
Figura 2- 3: Montaje para la evaluación en invernadero 25

Figura 3- 1: Halos de hidrólisis producidos por cada aislamiento. 27
Figura 3- 2: Halo de hidrólisis en mm por la producción de enzimas celulasas. 28
Figura 3- 3: Evaluación cualitativa de producción de enzimas ligninolíticas. 29
Figura 3- 4: Ensayo de respirometría en tamo de arroz 30
Figura 3- 5: Evaluación de respirometría en tamo de arroz 31

Figura 4- 1: Actividad endo-1,4-β-glucanasa 7.1 34
Figura 4- 2: Actividad exo-1,4-β-glucanasa 7.1 35
Figura 4- 3: Actividad β-glucosidasa 7.1 36
Figura 4- 4: Área bajo la curva actividad xilanasa 7.1 38
Figura 4- 5: Actividad endoglucanasa T1.1 39
Figura 4- 6: Actividad exoglucanasa T1.1 40
Figura 4- 7: Actividad β-glucosidasa T1.1 41
Figura 4- 8: Área bajo la curva actividad xilanasa 43
Figura 4- 9: Actividad Lacasa 44
Figura 4- 10: Actividad Manganeso peroxidasa 44

Figura 5- 1: Crecimiento sobre el residuo. 47
Figura 5- 2: Microscopía electrónica 48

Figura 5- 3: Determinación de lignina, celulosa y hemicelulosa 49
Figura 5- 4: Determinación de carbono orgánico y nitrógeno total en el suelo. 50
Figura 5- 5: Resultados respirometría en invernadero..... 51
Figura 5- 6: Actividad Exo-1,4-β-glucanasa en invernadero 52
Figura 5- 7: Actividad Endo-1,4-β-glucanasa en invernadero 52
Figura 5- 8: Actividad 1,4-β-glucosidasa en invernadero..... 53
Figura 5- 9: Actividad Xilanasa en invernadero 53
Figura 5- 10: Actividad Lacasa en invernadero 54
Figura 5- 11: actividad Manganeso peroxidasa en invernadero 54

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1- 1: Clasificación taxonómica del arroz (Plants Database USDA, NRCS, 2012).... 4
Tabla 1- 2: Aislamientos seleccionados..... 17

Tabla 2- 1: Microorganismos a evaluar..... 19
Tabla 2- 2: Tratamientos para la determinación de enzimas celulolíticas 22

Tabla 4- 1: Análisis de varianza de la actividad endo-1,4-β-glucanasa 7.1..... 34
Tabla 4- 2: Análisis de varianza de la actividad exo-1,4-β-glucanasa 7.1..... 35
Tabla 4- 3: Análisis de varianza de la actividad 1,4-β-glucosidasa 7.1 36
Tabla 4- 4: Análisis de varianza de la actividad endo1,4-β-glucanasa T1.1..... 39
Tabla 4- 5: Análisis de varianza de la actividad exo1,4-β-glucanasa T1.1..... 40
Tabla 4- 6: Análisis de varianza de la actividad 1,4-β-glucosidasa T1.1 41

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos

Símbolo	Término
ABTS	Ácido 2,2’ azino-bis-(3 etil benzatiazolin sulfato)
DMP	2,6-Dimetoxifenol
DNS	ácido 3,5-dinitrosalicilico
HCl	Ácido clorhídrico
H_2O	Agua
$BaCO_3$	Carbonato de Bario
Na_2CO_3	Carbonato de sodio
cm	Centímetros
$BaCl_2$	Cloruro de Bario
NaCl	Cloruro de sodio
Cu	Cobre
CO_2	Dióxido de Carbono
g	Gramos
ha	Hectárea
NaOH	Hidróxido de sodio
Kg	Kilogramos
Mn	Manganeso
µl	Microlitro
µmol	Micromol
ml	Mililitros
mm	Milimetros
mM	Milimolar
M	Molar
nm	Nanómetros
N	Normal
Fe^{+4}=O	Oxiferril
P/V	Peso/Volúmen
Ton	Tonelada

Abreviaturas

Símbolo	Término
ABTS	Ácido 2,2’ azino-bis-(3 etil benzatiazolin sulfato)
DMP	2,6-Dimetoxifenol
DNS	ácido 3,5-dinitrosalicilico
HCl	Ácido clorhídrico
H_2O	Agua
$BaCO_3$	Carbonato de Bario
Na_2CO_3	Carbonato de sodio
cm	Centímetros
$BaCl_2$	Cloruro de Bario
NaCl	Cloruro de sodio
Cu	Cobre
CO_2	Dióxido de Carbono
g	Gramos
ha	Hectárea
NaOH	Hidróxido de sodio
Kg	Kilogramos
Mn	Manganeso
µl	Microlitro
µmol	Micromol
ml	Mililitros
mm	Milimetros
mM	Milimolar
M	Molar
nm	Nanómetros
N	Normal
$Fe^{+4}=O$	oxiferril
P/V	Peso/Volúmen
Ton	Tonelada

Introducción

El sector agrícola, constituye una de las divisiones económicas más importantes a nivel mundial, En Colombia, este sector es el segundo creador de empleo después del sector de servicios sociales, comunales, y personales, además de generar el 14% del producto interno bruto (MADR, 2004).

Entre los productos agrícolas más abundantes en el país, se encuentra el arroz, siendo Colombia, el segundo país productor de arroz en América Latina y el Caribe (FAO, 2004). Adicionalmente, este cultivo, es uno de los cultivos más importantes del país, encontrándose como el tercero en extensión después del café y el maíz.

Después de la cosecha del arroz, en el campo quedan residuos derivados de las hojas, tallos y demás productos que no son de consumo humano, los cuales, en su conjunto reciben el nombre de tamo de arroz, estos productos, tienen una tasa de degradación lenta, generando problemas para el agricultor debido a la dificultad de su manejo; mundialmente la producción de este residuo es de 650 a 975 millones de toneladas al año (Kadam, 2000).

Entre los usos que se le han dado al tamo de arroz se encuentra la producción de hongos comestibles, fibra para papel, alimentación animal, y la producción de etanol (Kadam, *et al*., 2000; Abril, *et. al.* 2009). Sin embargo, para poder darle estos usos al residuo, es necesario realizar pretratamientos químicos o biológicos, además de realizar la recolección, transporte y almacenamiento del mismo, generando un aumento en los costos de estos procesos y siendo insuficientes para su eliminación, utilizando en estas medidas únicamente el 0,6% del residuo producido en el mundo (Kadam, 2000).

El manejo que se le da a estos residuos en el campo es de dos tipos: la quema, el cual es un método rápido y poco costoso, y la incorporación del tamo en el suelo. La quema en el campo, fue el manejo más común entre los agricultores, debido a que es una forma rápida de eliminación del producto (Kadam, *et al*., 2000), dando como resultado el retorno de nutrientes al suelo, eliminación de patógenos y semillas malas hierbas (Kadam, *et al*., 2000; Abril, *et. al.* 2009). Sin embargo, este procedimiento también resulta en la eliminación de microorganismos benéficos para el cultivo, disminuye la capa vegetal, y genera grandes cantidades de gases de invernadero como dióxido de carbono, metano y monóxido de carbono, entre otros, se ha calculado que se generan 13 toneladas de dióxido de carbono por cada 2.5 toneladas de tamo quemado (Kadam, *et al*., 2000; Abril, *et. al.* 2009). Por esta razón ésta práctica ha ido disminuyendo y prohibiéndose en diferententes partes del mundo, en Colombia, a partir del decreto 948 de 1995 se estableció la regulación ambiental para las quemas abiertas realizadas para este tipo de residuos, y fue modificado por el decreto 2107 de 1995, estableciendo que las quemas abiertas estarán controladas y sujetas a las reglas establecidas por el Ministerio del Medio Ambiente.

Actualmente la práctica más común en Colombia es la incorporación del tamo, este proceso genera retorno de nutrientes en el suelo, y no genera costos adicionales para los agricultores. Sin embargo debido a la dificultad en la degradación de estos residuos, el proceso al incorporarlo en el campo es muy demorado, generando proliferación de patógenos y producción de metano en el proceso, adicionalmente el tiempo entre siembra aumenta mientras este producto es degradado. Recientemente se han propuesto diferentes opciones en el manejo de tamo de arroz entre las que se encuentra la preparación de compost, esta técnica facilita la degradación del residuo con aporte de nutrientes en el suelo (Goyal, *et. al*. 2009) sin embargo, requiere de procedimientos adicionales (como adecuación de un lugar para el proceso, y traslado del tamo).

Los residuos vegetales como el tamo de arroz se caracterizan por tener entre sus componentes lignina, celulosa y hemicelulosa, estos componentes pueden ser degradados por diversos microorganismos, principalmente hongos, siendo los más estudiados los Basidiomycetes y los Ascomycetes. Estos microorganismos son capaces de producir gran cantidad de enzimas ligninolíticas y celulolíticas respectivamentes que les permiten utilizar estos residuos como fuente de carbono durante el proceso de degradación.

Debido a la necesidad de mejorar las prácticas agrícolas, en los últimos tiempos, se han buscado alternativas que lleven al aprovechamiento de los recursos, con disminución en los costos y el fortalecimiento de procesos más amigables con el medio ambiente, convirtiendo a la agricultura en un sistema de desarrollo económico capaz de soportar las necesidades alimenticias del mundo sin generar efectos colaterales sobre el medio ambiente y los ecosistemas.

Teniendo en cuenta las características anteriores en el manejo del tamo de arroz, se han llevado a cabo algunos estudios utilizando microorganismos capaces de degradar el tamo de arroz directamente en el campo, esta técnica, convierte el residuo en productos más simples, que al integrarse al suelo, generan el retorno de nutrientes en el suelo disminuyendo el uso de fertilizantes químicos, así mismo la producción de contaminantes en el proceso va a disminuir, convirtiéndose en un proceso sostenible. En Colombia, Cuevas, 2010, encontró retorno de nutrientes en el suelo al agregar microorganismos como parte del tratamiento del tamo de arroz *in situ*.

Con el objetivo de encontrar una alternativa viable que pueda reemplazar la quema del tamo de arroz, y hacer más eficiente la incorporación del tamo en el campo, el grupo de investigación de bioprocesos y bioprospección del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, en conjunto con la empresa Biocultivos S.A. aisló y seleccionó microorganismos con actividad ligninocelulolítica, para ser investigados por su posible actividad sobre el tamo de arroz *in situ*.

En este proyecto se pretende evaluar los aislamientos ligninocelulolíticos seleccionados previamente por el grupo de investigación, evaluando la actividad enzimática que presentan y el efecto de la aplicación de estos microorganismos directamente en el tamo de arroz bajo condiciones de invernadero, como un inicio para su posible aplicación en campo.

1. Marco teórico

1.1 El arroz

El arroz es uno de los principales productos de consumo en el mundo, gracias a sus características nutritivas se considera de vital importancia para la seguridad alimentaria especialmente en países con altos índices de desnutrición, debido a que representa el 27% del consumo de energía y 20% del consumo de proteínas alimenticias; es el alimento básico de 17 países de Asia y del Pacífico, 8 países de África, 7 países de América Latina y el Caribe, y 1 del Cercano Oriente (FAO, 2004).

Los principales productores de este grano son China e India con un 51% de la producción mundial, seguidos por Indonesia, Bangladesh, Vietnam, Tailandia, Brasil y Japón (FAO, 2004). Es considerado uno de los cultivos más antiguos del planeta, iniciando hace 10000 años en las regiones húmedas de Asia. Encontrando incluso referencias de su consumo en la literatura China desde el año 3000 a.c. (Fedearroz, 2012).

En Colombia, el arroz es uno de los cultivos más importantes, siendo el tercer producto en extensión después del café y el maíz. Este cultivo se desarrolla en 21 departamentos y 215 municipios, desde la Guajira hasta el Valle del Cauca, y desde Chocó hasta Arauca, generando el 48% del empleo en estos municipios (Fedearroz, 2010). El área de siembra para el primer semestre de 2013 fue de 293.179 ha de arroz mecanizado y su producción fue de 852.190 toneladas (DANE, 2013). Durante el primer semestre de 2013, los departamentos que presentaron mayor área sembrada fueron Casanare, Meta, Tolima y Huila, respectivamente, siendo Casanare el departamento con un mayor área sembrada (32%), mientras que el departamento del Tolima presentó la mayor área cosechada correspondiente al 33,8% de la cosecha nacional (DANE, 2013).

1.1.1 Generalidades del arroz

El arroz es una planta monocotiledónea, se caracteriza por tener sus hojas en forma de lámina plana. El tamaño de la planta varía de 40 cm (enanas) hasta más de 7 metros (flotantes). Los órganos de la planta son considerados como vegetativos y florales (o reproductores): los primeros se componen de las raíces, los tallos y las hojas, mientras que los segundos se componen de las flores y la semilla (Franquet, 2004). Esta planta es perteneciente a la división Magnoliophyta, que incluye plantas con flores, y semillas envueltas como una concha, pertenece a la familia Poaceae, y orden Cyperales, que incluye a los granos y cereales (Tabla 1-1).

Entre las condiciones de crecimiento de la planta se encuentra que el cultivo de arroz es producido mayormente en climas húmedos tropicales, puede sembrarse desde el nivel del mar hasta los 2500 msnm y dependiendo la zona puede ser secano o inundado. Para que se lleve a cabo la germinación de las semillas es necesario una temperatura óptima entre los 30 a 35°C, y para su crecimiento 23°C (Franquet, 2004). Las temperaturas extremas pueden afectar el rendimiento del grano, de esta forma, cuando la temperatura es baja se ve limitada la tasa de crecimiento y desarrollo de la planta, por el contrario, cuando la temperatura es muy alta se genera estrés térmico sobre la planta. Otro factor importante en el cultivo de arroz es el agua y la humedad en el cultivo, ya que es esencial para mantener un adecuado manejo de los nutrientes, malezas y enfermedades, si las condiciones son de secano la lluvia es un factor crítico (Chaudhary *et al*., 2003).

Tabla 1- 1: Clasificación taxonómica del arroz (Plants Database USDA, NRCS, 2012)

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Super división	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Subclase	Commelinidae
Orden	Cyperales
Familia	Poaceae
Genero	*Oryza* L.
Especie	*Oryza sativa* L.

1.1.2 Tamo de arroz

Durante la cosecha del arroz se generan diversos residuos que no son de utilidad para el agricultor, el conjunto de estos residuos es llamado tamo de arroz y comprende los tallos y las hojas de la planta, los cuales constituyen aproximadamente el 50% de peso seco de la planta de arroz (Kausar *et al*., 2010).

Se ha reportado que la producción mundial de este residuo, se encuentra entre 650 a 975 millones de toneladas al año (Mohan *et al*., 2012), de los cuales el 0,6% se dispone para alimentación animal, producción de fibra de papel, producción de hongos comestibles, y producción de bioetanol, estos usos requieren recoger el tamo de arroz del campo, transportarlo, y la necesidad de un sitio para su almacenaje, lo que genera costos adicionales para los agricultores, además de pérdidas de nutrientes en el campo (Kadam *et al*., 2000); En Colombia, las variedades de arroz sembradas producen en promedio entre 6-8 toneladas por hectárea al año de materia seca de tamo de arroz, lo que se traduce en alrededor de 3 ton/ha de carbono y 50 kg/ha de nitrógeno al ser incorporado en el suelo (Garcés & Ospina, 2009). Otros nutrientes que se encuentran presentes en este residuo son potasio, calcio, manganeso, sílice, hierro, cobre, y magnesio, los cuales van a quedar disponibles para las plantas una vez este material sea degradado. El fósforo en el tamo de arroz se encuentra en una proporción muy baja

debido a que se encuentra principalmente en las semillas (Garcés & Ospina, 2009). Entre los principales componentes de los residuos vegetales se encuentran la celulosa, hemicelulosa, lignina, azúcares simples, aminoácidos, ácidos alifáticos, entre otros (Garcés y Ospina, 2009). Siendo los más abundantes en el tamo de arroz la celulosa (35-40%), la hemicelulosa (25-30%), y la lignina (10-15%) (Mohan *et al*., 2012), materiales que hacen difícil su degradación.

El residuo que es dejado en el campo puede ser tratado de dos formas, la primera es la quema en el campo y la segunda la incorporación en el suelo:

- Quema en campo: la quema en campo se realiza de 4 a 5 días después de la cosecha cuando está lo suficientemente seco para su quema, este es el método más barato y rápido para la disposición de los residuos, adicionalmente ayuda con el control de patógenos en el suelo y la proliferación de malas hierbas (Kadam *et al*., 2000). Sin embargo, genera grandes emisiones de gases invernadero como dióxido de carbono y monóxido de carbono que pueden ser perjudiciales para el medio ambiente.
- Incorporación en el suelo: este método genera retorno de nutrientes al suelo, sin embargo, debido a la demora en la degradación del residuo, el proceso es más lento por lo cual se puede generar proliferación de patógenos y emisiones de metano produciendo contaminación, y aumentando el tiempo entre siembras para los agricultores (Zhang *et al*., 2013).

1.2 Materiales ligninocelulósicos

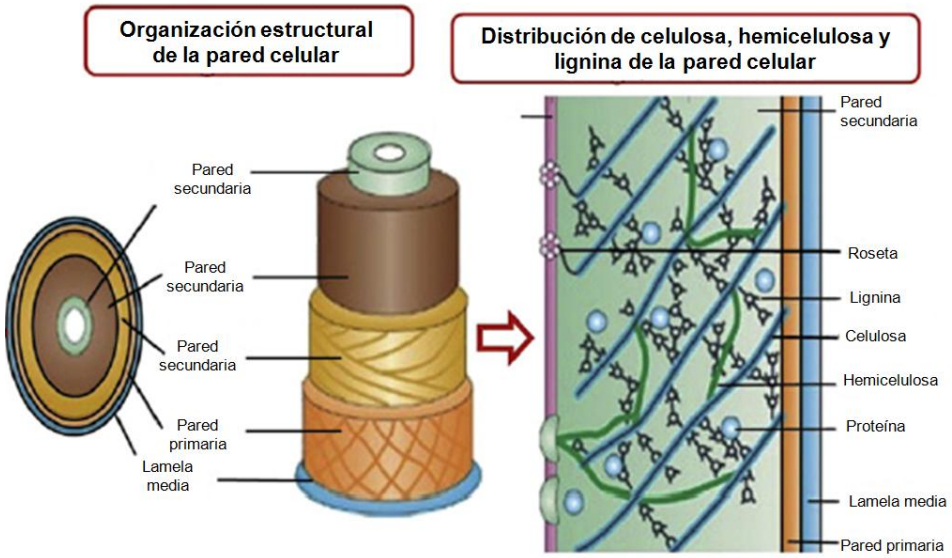
Los materiales ligninocelulósicos, son el recurso orgánico más abundante en el suelo, por consiguiente, representan la mayor parte de los residuos de cosecha provenientes de la agricultura, estos materiales son poco utilizados y son considerados generalmente como desechos, siendo degradados en la naturaleza únicamente por algunos microorganismos (Montoya, 2008; Sánchez, 2009).

La ligninocelulosa es el principal componente de la biomasa de la planta y está compuesta por tres tipos de polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales se encuentran conformando la pared celular de las plantas. Por lo general esta pared se divide en primaria (conformada por pectinas, proteínas, celulosa y hemicelulosa) y secundaria (conformada por celulosa y bajo contenido de pectinas), ésta última a su vez se divide en pared secundaria 1, pared secundaria 2 y pared secundaria 3, siendo la pared secundaria 2 la más gruesa y la que contiene la mayor parte de la celulosa. Por otro lado, la lignina se encuentra principalmente en la lamela media (conformada por pectinas) la cual se une a las células adyacentes. En la figura 1-1 se observa la conformación de la pared celular y la distribución de celulosa, hemicelulosa y lignina en ésta (Menon & Rao, 2012).

Las microfibrillas de la celulosa se unen a la hemicelulosa, la lignina, y otros polímeros de carbohidratos asociándose en forma de macrofibrillas y formando una estructura compleja que conduce a la estabilidad del material y le confiere resistencia estructural a la planta, dando como resultado una difícil degradación del material (Chang *et al*., 2011; Chen *et al*., 2011). La lignina se asocia con polisacáridos, como la hemicelulosa por

medio de enlaces covalentes, confiriéndole una barrera protectora a la celulosa e impidiendo su degradación (Van Dyk & Pletschke, 2012).

Figura 1- 1: Distribución de la lignocelulosa (Modificado de Menon & Rao, 2012)

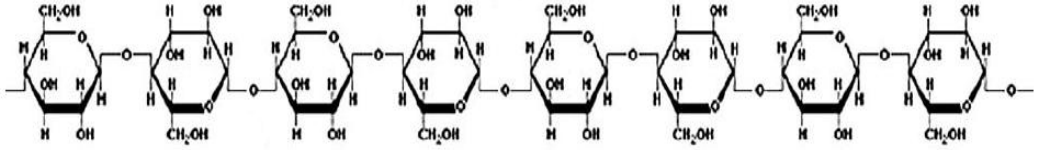


1.2.1 Celulosa

La celulosa puede ser producida por algunos animales y bacterias, además de ser el principal componente de la biomasa de la planta, este polímero compone aproximadamente del 35 al 50% de peso seco de la planta, en pocos casos como el algodón, la celulosa puede encontrarse cerca a un estado puro, pero en la mayoría de los casos se encuentra formando una matríz con la hemicelulosa y la lignina y esta matriz de interacción varía dependiendo el tipo de célula vegetal y la madurez (Lynd *et al*., 2002).

La celulosa es un biopolímero lineal compuesto por varias moléculas de D-glucosa unidas por enlaces glicósidicos β-1,4 (Figura 1-2). Estas cadenas de glucosa (30 unidades de glucosa aproximadamente) están unidas por puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo dando origen a las protofibrillas, las cuales a su vez se unen y dan origen a las microfibrillas, estas últimas se ensamblan entre ellas formando las fibras de celulosa que son entrelazadas por interacciones no covalentes con la hemicelulosa y la lignina (Martínez *et al*., 2008; Van Dyk & Pletschke, 2012).

Figura 1- 2: Estructura de la celulosa (Kumar *et al*., 2008)



Las microfibrillas se organizan en forma paralela y se pueden encontrar dos regiones, la cristalina en donde las moléculas de glucosa están organizadas, y la amorfa donde se encuentran desorganizadas. En la región cristalina los componentes moleculares de las microfibrillas están organizados de forma compacta por puentes de hidrógeno, la unidad básica está formada por ocho moléculas de celobiosa arregladas en capas de moléculas paralelas por medio de interacciones débiles entre los átomos de glucosa adyacentes. La célulosa cristalina es insoluble en la mayoría de los solventes incluyendo el agua (Martínez *et al*., 2008; Montoya, 2008). Por su parte la región amorfa también es conocida como celulosa *para*- cristalina, está compuesta por microfibrillas que contienen torceduras o regiones vacías que permiten la formación de microporos, volviéndola menos compacta y permitiendo la penetración de moléculas grandes, como el agua y enzimas (Martínez *et al*., 2008; Montoya, 2008).

1.2.2 Hemicelulosa

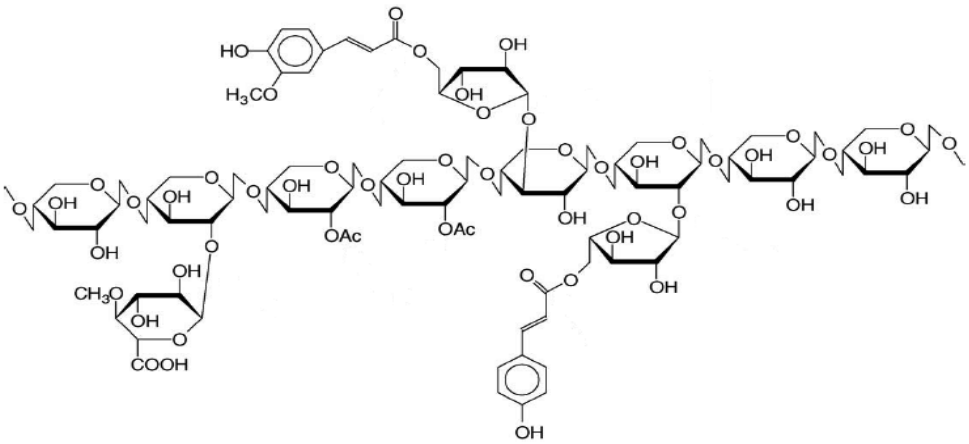
La hemicelulosa es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, al contrario de la celulosa su estructura no es homogénea. Está formado por polímeros de diversas pentosas (D-xilosa, y L-arabinosa), hexosas (D- manosa, D-glucosa, D-galactosa), y azúcares ácidos (ácido glucurónico y ácido galacturónico). Los heteropolisacáridos que conforman la hemicelulosa forman una cadena plana de azúcares unidos casi siempre por enlaces β-1,4 y es altamente ramificada con sustituyentes de diferentes tipos, generalmente de un solo azúcar de longitud (Montoya 2008; Martínez *et al*., 2008).

Las hemicelulosas se pueden clasificar en dos tipos, manano y xilano. El manano, contiene azúcares como la glucosa, manosa y galactosa, su composición es variable encontrando en maderas duras glucomananos y en maderas blandas galactomananos y galactoglucomananos, estas últimas contienen un mayor contenido de manano (Van Dyk & Pletschke, 2012).

El xilano es la hemicelulosa más abundante en la naturaleza, se encuentra principalmente en maderas duras y plantas herbáceas, constituye aproximadamente del 30-35% del peso seco de las plantas (Van Dyk & Pletschke, 2012). Consiste en un heteroglicano formado por una cadena lineal de unidades β-D-xilopiranosil con uniones β-1,4 y sustituyentes unidos a la cadena principal por enlaces glicosídicos o éster, estos sustituyentes son generalmente acetato, metilglucoranato y L-arabinofuranosa (Figura 1-3). Los grupos acetilo son los responsables de la solubilidad del xilano en el agua, y dependiendo de la fuente de xilano la cantidad de estos sustituyentes varía, por lo tanto, en maderas duras se encuentra gran cantidad de glucoranato y baja cantidad de arabinosa con altos niveles de acetilación, en maderas blandas, el xilano no es acetilado y contiene L-arabinofuranosa unido por enlaces α-1,3-glicosídicos, mientras que en plantas herbáceas como el arroz contienen gran cantidad de arabinosa (Montoya,

2008;Chávez *et al*., 2006; Van Dyk & Pletschke, 2012). En la pared celular de la planta, el xilano se encuentra formando una capa superpuesta por medio de puentes de hidrógeno con la celulosa y se enlaza de forma covalente con la lignina para formar la compleja estructura ligninocelulolítica (Van Dyk & Pletschke, 2012).

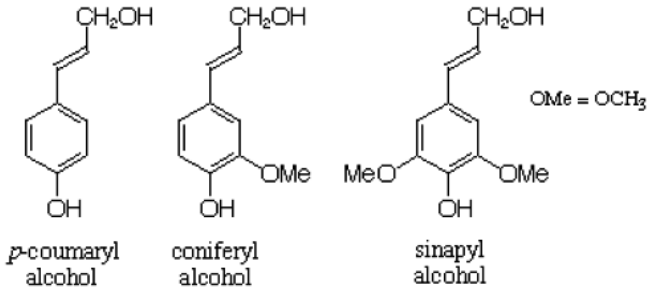
Figura 1- 3: Estructura del Xilano (Chávez *et al*., 2006)



1.2.3 Lignina

La lignina, el tercer polímero más abundante en la naturaleza, le provee a la planta rigidez y protección contra el ataque de diferentes microorganismos. Éste polímero está conformado por unidades de fenilpropano cuyos precursores son tres alcoholes aromáticos (monolignoles), alcohol sinapílico, alcohol coniferílico, y alcohol *p*-cumarílico (Figura 1-4), la polimerización se inicia por la oxidación enzimática de estos monómeros a radicales fenoxi, y estos últimos pueden reaccionar unos con otros de diferentes formas. La presencia de los tres precursores monoméricos varía dependiendo de la especie vegetal, el tipo de tejido, y su localización en la pared celular, lo que en conjunto da origen a una gran variabilidad en la estructura de la lignina (Montoya, 2008; Buranov & Mazza, 2008).

Figura 1- 4: Precursores de la lignina (Granda, *et al*., 2005)

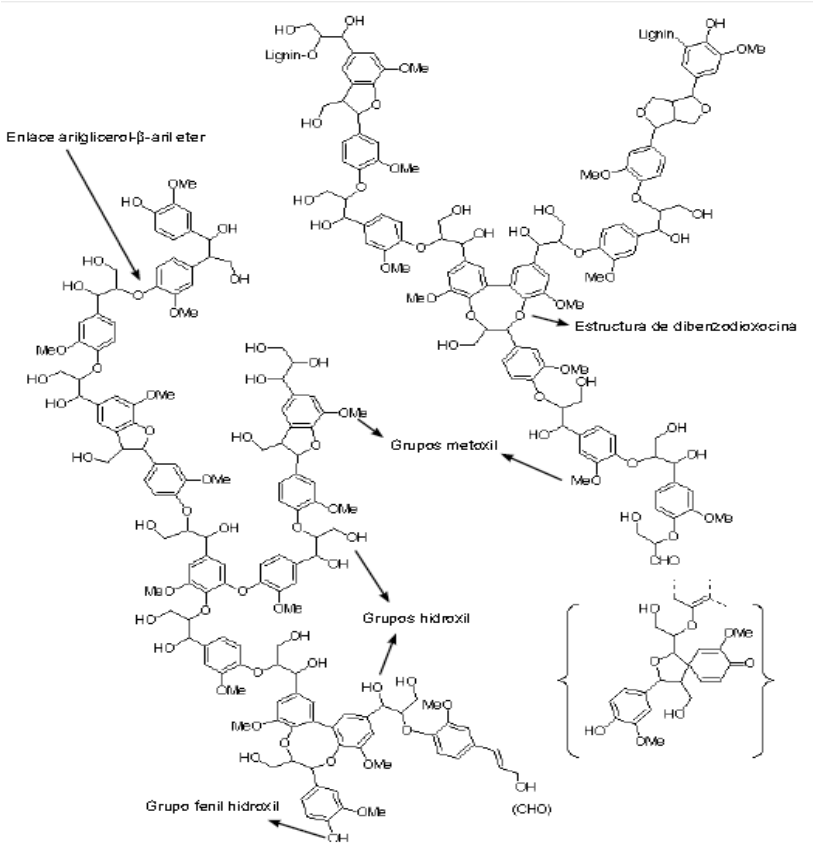


Estos radicales, se unen por medio de diversos enlaces covalentes, principalmente éter, los cuales forman del 40-60% de las uniones que conforman la lignina, siendo el principal el enlace β-O-4 (β-aril éter), aunque se pueden formar también enlaces α-O-4, β-5, β-1,

entre otros (Figura 1-5). Los respectivos constituyentes aromáticos de los alcoholes en el polímero son el Guayacil (G) (originado del alcohol coniferílico), Siringil (S) (originado del alcohol sinapílico), y *p*-hidroxifenil (H) (originado del alcohol *p*-cumarílico) (Buranov & Mazza, 2008), durante este proceso, se forma una única unidad de lignina, la cual varía dependiendo la especie vegetal, es decir, la lignina de madera blanda, está formada por unidades equivalentes de G y S, en la lignina de madera dura predominan las unidades de G y finalmente la lignina de herbáceas (no leñosa) contiene unidades de G, S y H (Buranov & Mazza, 2008). En el tamo de arroz, estas tres unidades se encuentran en cantidades significativas siendo 15% H, 54% G, y 40% S, por lo cual es llamada *p*-hidroxifenil–guayacil–siringil lignina (Buranov & Mazza, 2008).

Las unidades de lignina no se pueden oxidar por oxidoreductasas de bajo potencial redox (como las peroxidasas que producen las plantas durante el proceso de polimerización), debido a su naturaleza aromática, la variedad de enlaces que presenta entre las unidades y su naturaleza hidrofóbica, por lo tanto solo un pequeño grupo de peroxidasas (extracelulares, no específicas) producidas por hongos ligninolíticos, son capaces de degradar los compuestos que representan las estructuras de la lignina (Buranov & Mazza, 2008).

Figura 1- 5: Molécula de lignina (Granda *et al*., 2005)



1.3 Microorganismos asociados a la degradación de tamo de arroz

Debido a su carácter recalcitrante, solo algunos organismos como bacterias y hongos son capaces de producir las enzimas necesarias para utilizar el material ligninocelulítico como fuente de carbono y energía. Estos organismos pueden dividirse en dos grupos, el primero comprende microorganismos anaerobios habitantes del tracto gastrointestinal de animales herbívoros, donde las bacterias forman un complejo asociado a la célula llamado celulosoma para la degradación del material, en este grupo se pueden encontrar géneros como *Clostridium* y *Ruminococcus.* El segundo grupo, es el conformado por microorganismos aerobios habitantes de los suelos, este grupo, comprende los microorganismos de interés para la degradación de los residuos de cosecha como el tamo de arroz (Martínez *et al*., 2008).

Dentro de los microorganismos de interés en la degradación de los residuos, se encuentran algunas bacterias (actinomicetos) y hongos (ascomicetos y basidiomicetos), se cree que la habilidad de estos microorganismos para degradar eficientemente la ligninocelulosa se debe al crecimiento micelial, el cual les permite el transporte de nutrientes hasta las zonas deficientes de estos en el residuo que constituye la fuente de carbono (Malherbe & Cloete, 2002).

Existen dos tipos de sistemas enzimáticos extracelulares que pueden ser producidos por estos microorganismos para acceder al residuo, el primero son las hidrolasas responsables de la degradación de los polisacáridos como la celulosa, y el segundo es el sistema oxidativo ligninolítico que rompe los anillos de la lignina. Estos sistemas enzimáticos, convierten los componentes insolubles en compuestos solubles fácilmente asimilables (Malherbe & Cloete, 2002).

Los ascomicetos, son ampliamente reconocidos por su capacidad de producir enzimas para la degradación de celulosa y hemicelulosa, entre los más reconocidos se encuentran especies de los géneros *Aspergillus, Penicillium*, y *Trichoderma*, dentro de este último, la especie *Trichoderma reesei*, ha sido el modelo durante muchos años para el estudio de este tipo de enzimas y es utilizado comercialmente para la producción de celulasas y hemicelulasas (Sánchez, 2009). En cuanto a los actinomicetos, se ha encontrado que algunas especies del género *Streptomyces* son capaces de producir el sistema enzimático extracelular para la hidrólisis de celulosa y xilano (Chater *et al*., 2010)

Los organismos productores de enzimas ligninolíticas son especialmente los basidiomicetos, estos organismos también son conocidos como hongos de podredumbre blanca por su capacidad de colonización y degradación de materiales ligninocelulolíticos, dentro de los géneros más reconocidos y estudiados se encuentran *Phanerochaete* y *Pleurotus*, la especie más estudiada ha sido *Phanerochaete chrysosporium* el cual se caracteriza por tener ampliamente desarrollado el sistema oxidativo ligninolítico y adicionalmente presentar el sistema de hidrolasas, es decir, presenta todo el sistema enzimático (Malherbe & Cloete, 2002).

1.4 Enzimas ligninocelulolíticas

Como ya se ha mencionado, debido a la insolubilidad de la lignina, la celulosa, y la hemicelulosa, la degradación de estos materiales ocurre extracelularmente, encontrándose dos tipos de sistemas enzimáticos: uno hidrolítico, y un único sistema ligninolítico oxidativo. La mayoría de estas enzimas tienen un dominio de unión al sustrato y un dominio catalítico, su síntesis está sujeta a mecanismos de regulación, siendo inducida por el sustrato adecuado y reprimida por azúcares como la glucosa (Montoya, 2008).

1.4.1 Celulasas

El complejo de enzimas celulolíticas está conformado principalmente por tres tipos: endoglucanasa (EC 3.2.1.4), exoglucanasa (EC 3.2.1.91) y β-glucosidasa (EC 3.2.1.21), estas enzimas actúan sinérgicamente para la degradación de la celulosa. Las más estudiadas han sido las celulasas producidas por los hongos aeróbicos, entre estas, el centro de estudio ha sido el complejo enzimático de *Trichoderma reesei* (Lynd *et al*., 2002). El sinergismo de estas enzimas se atribuye a la forma endo-exo de cooperatividad, aunque se ha encontrado sinergismo exo-exo en el proceso de degradación de la celulosa a glucosa, la cinética de la hidrólisis enzimática, debe incluir la adsorción, inactivación e inhibición de estas enzimas, y para que la hidrólisis sea completa, el sistema debe contener éstas 3 enzimas en proporciones adecuadas (Saha, 2004).

- ***Endo-1,4-β-glucanasas***

Son las responsables de la despolimerización iniciando el ataque por los sitios internos de la cadena de la celulosa en las regiones amorfas (Figura 1-6), generando terminaciones en la cadena y abriendo sitio para el ataque de las exoglucanasas. Estas enzimas, también son llamadas carboximetilcelulasas por el sustrato artificial que se utiliza para su detección (Lynd *et al.,* 2002; Sánchez, 2009). Se ha encontrado, que *Trichoderma reesei* es capaz de producir cinco endoglucanasas (EGI, EGII, EGIII, EGIV y EGV) (Saha, 2004).

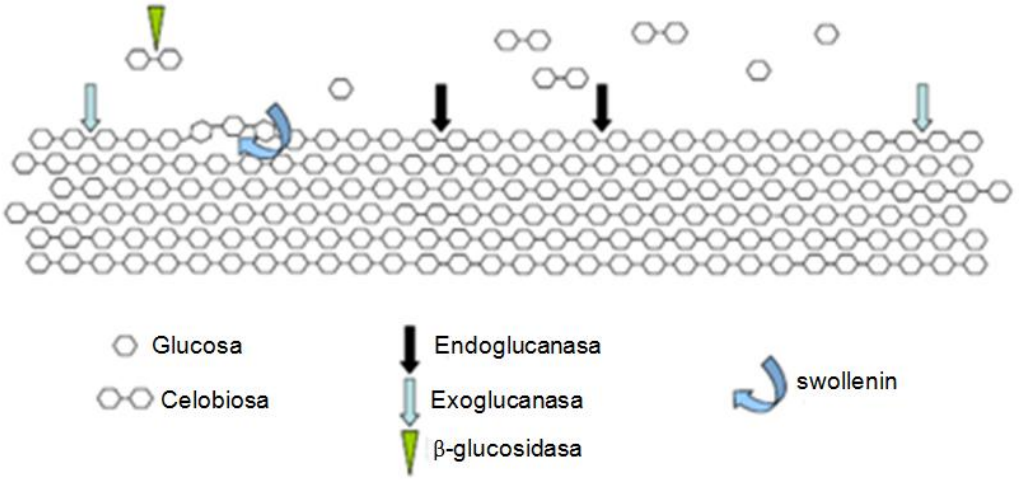
- ***Exo-1,4-β-glucanasas***

Estas enzimas son el mayor componente del sistema celulolítico de hongos. Actúan sobre los extremos reductores o no reductores de las cadenas de la celulosa (Figura 1-6) liberando glucosa (glucanohidrolasas) o celobiosa (celobiohidrolasas). En *T. reesei*, se ha encontrado la producción de dos celobiohidrolasas (CBHI y CBHII), CBHI actúa sobre los extremos reductores de la cadena de celulosa cristalina, y CBHII, actúa sobre los extremos no reductores (Lynd *et al.,* 2002).

- ***1,4-β-glucosidasas***

Las β-glucosidasas, hidrolizan la celobiosa y en algunos casos oligosacáridos a glucosa (Figura 1-6). Estas enzimas son generalmente las responsables de la regulación de todo el proceso celulolítico, siendo un factor de limitación de velocidad en la actividad endoglucanasa y exoglucanasa durante la hidrólisis de la celulosa, siendo estas inhibidas por la celobiosa. Así mismo la inhibición de las β-glucosidasas se genera por la presencia de glucosa. Se ha encontrado que en el sistema celulolítico de *T. reesei* hay producción de dos β-glucosidasas (BglI y BglII) (Lynd *et al.,* 2002; Saha, 2004).

Figura 1- 6: Degradación de la celulosa (modificado de Aro, *et al*., 2005)

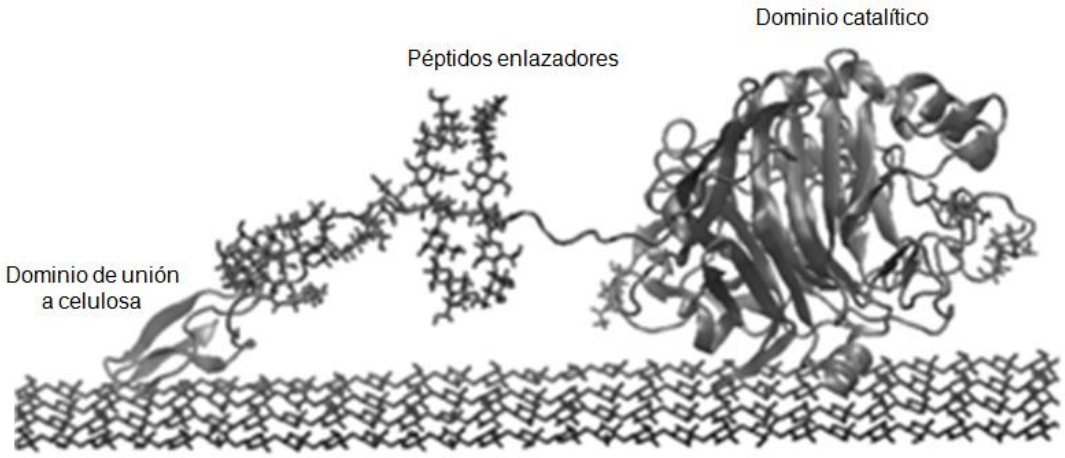


La reacción de hidrólisis catalizada por las glicosil hidrolasas se realiza a través de un mecanismo ácido/base que envuelve dos residuos, el primero actúa como un catalizador general y realiza un ataque ácido sobre el enlace, protonando el oxígeno del enlace glucosídico, el segundo, actúa como un nucleófilo que interactúa con el carbono anomérico intermediario para las enzimas de retención, o promueve la formación de un ión OH^- a partir de una molécula de agua para las enzimas inversoras. La reacción de retención implica un mecanismo de dos pasos en el que se produce la transferencia de protones desde y hacia un átomo de oxígeno en el centro anomérico. Por otro lado las reacciones de inversión tienen una única sustitución, siendo un solo residuo de aminoácido responsable de la transferencia de protones (Kulkarni *et al*., 1999).

La especificidad de las exoglucanasas y las endoglucanasas está determinada por sus sitios activos, las endoglucanasas, contienen hendiduras abiertas, mientras que en las exoglucanasas el sitio activo de la enzima está cubierto por bucles largos (formando un túnel), por lo tanto, las exoglucanasas tienen una estructura modular compuesta por un dominio catalítico y un dominio de unión a celulosa (CBD), estos últimos, son estructuralmente definidos y se vinculan al N- o C- terminal del dominio catalítico, los dos dominios, están separados por varios péptidos enlazadores que están fuertemente glicosilados (Figura 1-7) (Linder & Teeri, 1997; Levy & Shoseyov, 2002; Saha, 2004); En el sitio catalítico, el bucle se somete a grandes movimientos, dando lugar a su apertura, una vez abierto, se realiza un ataque hacía el polímero de celulosa, atrapando una cadena de celulosa en el interior del túnel, la cuál va a sufrir una enhebración (por medio

de puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals) y secuencialmente se va a hidrolizar una unidad de celobiosido a la vez a partir de esta cadena (Figura 1-7) (Linder & Teeri, 1997; Levy & Shoseyov, 2002; Saha, 2004).

Figura 1- 7: Dominio de unión a celulosa y dominio catalítico (modificado de Xi, *et al*., 2013)



1.4.2 Xilanasas

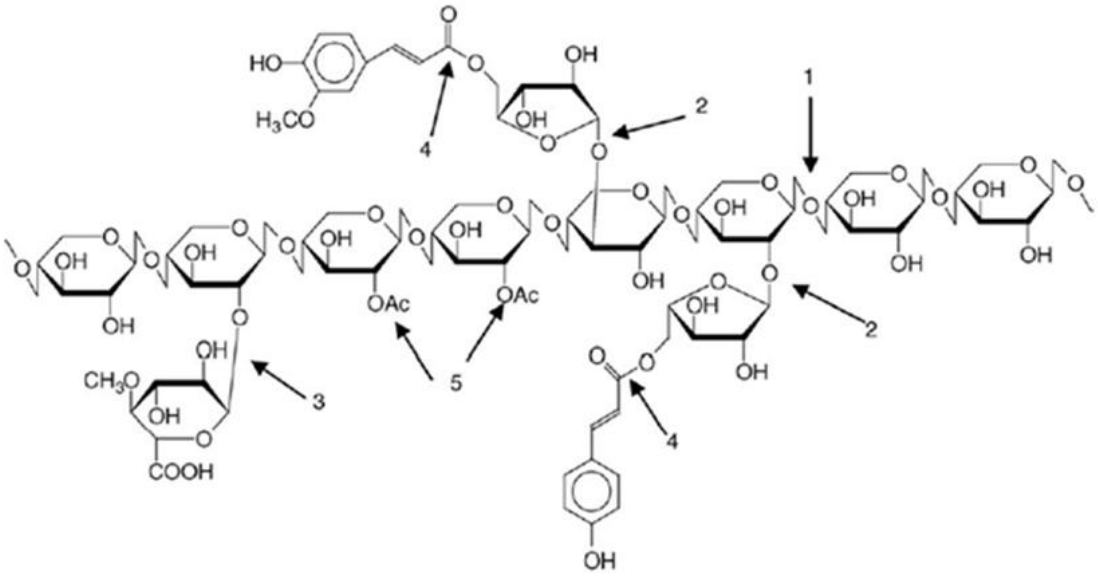
El xilano tiene una composición más variada en comparación con la celulosa, por lo tanto se requiere de un mayor número de enzimas para su hidrólisis, estas enzimas pueden ser glicosil hidrolasas o esterasas de carbohidratos, y así mismo pueden dividirse en enzimas despolimerizantes, las cuales cortan la cadena principal de la xilosa y enzimas que eliminan los sustituyentes o cadenas laterales (Van Dyk & Pletschke, 2012; Saha, 2004).

Las principales enzimas en la degradación del xilano son las endoxilanasas (Figura 1-8), las cuales hidrolizan la cadena principal del xilano produciendo una mezcla de xilooligosacáridos, y la β-xilosidasa la cual libera la xilosa a partir de los oligosacáridos formados (Chávez, *et al*. 2006). Las enzimas accesorias que complementan la degradación del xilano son: α.L- arabinofuranosidasa (remueve la L-arabinofuranosa de las cadenas laterales), α-D-glucuronidasa (hidroliza los residuos de metilglucuronato), acetil xilano esterasas (hidrolizan los enlaces éster entre las unidades de xilosa del xilano y el ácido acético) y esterasas feluricas y *p*-cumáricas (hidrolizan las respetivas uniones de ácidos aromáticos a los residuos arabinofuranósidos) (Saha, 2004; Chávez *et al*. 2006).

Se ha comprobado la acción sinérgica que se presenta entre las endoxilanasas y las β-xilosidasas con algunas de las enzimas de las cadenas laterales, las cuales deben ser disociadas para que la columna principal de xilano pueda ser hidrolizada, así mismo, algunas de las cadenas laterales solo pueden ser disociadas a partir de xilooligosacáridos, por lo tanto para estas, es necesario una hidrólisis parcial del xilano. La estructura general del xilano es más compleja que la celulosa, y requiere de varias enzimas con especificidad diferente, sin embargo, gracias a que no forma una estructura

cristalina, este compuesto es más accesible a la hidrólisis enzimática (Saha, 2004). La reacción de hidrólisis que es catalizada por estas enzimas es el mecanismo ácido – base explicado en el punto 1.4.1 Las xilanasas por lo general presentan un mecanismo de doble desplazamiento que implica una enzima glicosil intermedia (Kulkarni *et al*., 1999).
En general, las xilanasas tienen un solo dominio catalítico, aunque se ha encontrado en algunos microorganismos dos dominios catalíticos, así mismo aunque los CBDs no tienen afinidad por el xilano, se ha encontrado la presencia de estos en algunas xilanasas, y otras hemicelulasas, y en algunos casos han sido reportados dominios de unión a xilano (Linder & Teeri, 1997; Kulkarni *et al*., 1999).

Figura 1- 8: Sitio de acción de las xilanasas en el Xilano (modificado de Chávez, 2006)



1. endoxilanasas **2**. α-L-arabinofuranosidasas **3**. glucuronidasas **4**. feruloil y cumaroil esterasas **5**. Acetil xilano esterasas

1.4.3 Enzimas ligninolíticas

Los microorganismos ligninolíticos no son capaces de utilizar la lignina como su única fuente de energía y carbono, estos microorganismos dependen de los polisacáridos más digeribles de los sustratos ligninocelulolíticos, por esto, la principal razón para la degradación de la lignina es dejar expuestos estos polisacáridos. Se sabe que en la mayoría de los microorganismos, la degradación de la lignina se produce bajo limitación de nutrientes, es decir que el hongo evita sintetizar los componentes descomponedores que son caros metabólicamente cuando hay disponibilidad de sustratos más accesibles (Hammel, 1997). La degradación de la lignina es un proceso oxidativo que es llevado a cabo principalmente por los hongos de podredumbre blanca, los cuales deben emplear mecanismos inusuales para la degradación y depende de la generación de radicales libres de la lignina (Hammel, 1997). Entre las enzimas que llevan a cabo este proceso, se encuentran las peroxidasas (Lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP), Peroxidasa versátil) y la lacasa.

- ***Peroxidasas***

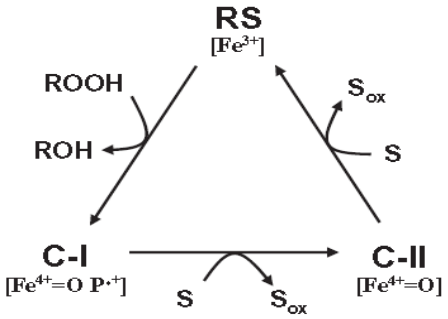
Estas enzimas contienen un grupo hemo en el sitio activo de la enzima y son dependientes de peróxido de hidrógeno para su funcionamiento. El ciclo catalítico de estas enzimas envuelve 3 reacciones (Figura 1-9), la primera reacción se da en el sitio activo de la enzima con el peróxido de hidrógeno donde se obtiene agua y la oxidación de dos proteínas férricas dando lugar a la formación del compuesto I, el cual está formado por un oxiferril (Fe^{+4}=O) y 1 radical catiónico. Este compuesto I se reduce por la acción del sustrato dando lugar al compuesto II, en donde el radical catiónico es reducido a su estado natural, el compuesto II se reduce nuevamente por el sustrato hasta obtener nuevamente el estado férrico^{3+}. El sustrato que va a ser oxidado durante el ciclo catalítico depende de la peroxidasa que esté actuando sobre la lignina es decir compuestos aromáticos fenólicos o compuestos aromáticos no fenólicos (Ruíz & Martínez, 2009).

La lignina peroxidasa (LiP; EC 1.11.1.14), oxida compuestos aromáticos de alto potencial redox, principalmente compuestos diacilglicerol éter no fenólicos de la lignina y compuestos fenólicos como el alcohol veratrílico. La oxidación de los sustratos se da por la transferencia de electrones, formando radicales intermedios (radicales fenoxi), los cuales se someten a reacciones no enzimáticas. Las LiP son capaces de oxidar sustratos no fenólicos aromáticos, sin la participación de mediadores (Dashtban *et al*., 2010; Ruíz & Martínez, 2009).

La manganeso peroxidasa (MnP; EC 1.11.1.13), se caracteriza porque necesita como co-sustrato Mn^{2+} para completar su ciclo catalítico. Durante este ciclo, el compuesto I puede ser reducido por Mn^{2+} y otros sustratos fenólicos, mientras que el compuesto II únicamente puede ser reducido por Mn^{2+}, el cual es oxidado a Mn^{3+} (producto altamente oxidante), este último, forma un complejo con el ácido oxálico secretado por el hongo, formando quelantes capaces de difundirse en la estructura de la pared celular y actuar como oxidantes de compuestos fenólicos produciendo radicales reactivos como peroxil, y superoxido, que pueden ser usados como fuente de peróxido en ausencia de peróxido de hidrógeno (Dashtban *et al*., 2010; Ruíz & Martínez, 2009).

La peroxidasa versátil (VP; 55), posee capacidad híbrida, es decir que tiene la capacidad de llevar a cabo su ciclo catalítico oxidando sustratos como el Mn^{2+} y el alcohol veratrílico, por lo tanto puede oxidar compuestos fenólicos y no fenólicos. El grupo hemo se encuentra al interior de la proteína y tiene acceso al medio externo a través de dos canales el primer canal funciona como el canal de la enzima LiP y el segundo, es dónde se da la oxidación de Mn^{2+} (Dashtban *et al*., 2010; Ruíz & Martínez, 2009).

Figura 1- 9: Ciclo catalítico de las peroxidasas (Ruíz & Martínez, 2009)



- ***Lacasas (EC 1.10.3.2)***

Las lacasas, son oxireductasas glicosiladas, estas enzimas, utilizan el oxígeno molecular para oxidar compuestos aromáticos. Las lacasas, contienen en su estructura varios átomos de cobre (Cu^{2+}), los cuales se encuentran organizados en tres tipos (cobre tipo I, cobre tipo II, cobre tipo III). La reacción de estas enzimas consta de cuatro oxidaciones del sustrato que se generan en el cobre tipo I, el cual transfiere electrones al cobre tipo II y cobre tipo III, en este último es donde se reduce el oxígeno a agua.
Las reacciones de oxidación, forman radicales libres que actúan como sustratos intermedios para las otras enzimas, estos mediadores, pueden dejar el sitio de la enzima y reaccionar con otros sustratos, la lacasa también puede descarboxilar los ácidos fenólicos y metoxifenólicos y atacar los grupos metoxilo mediante desmetilación (Sánchez 2006; Dashtban *et al*., 2010).

1.5 Antecedentes

En el tamo de arroz se han llevado a cabo diversas investigaciones con el fin de encontrar microorganismos capaces de producir enzimas ligninocelulolíticas para diversas aplicaciones industriales encontrando producción de celulasas en *Phanerochaete chrysosporium* (Munir *et al*., 2007), *Aspergillus niger* (Mohan, 2012), *Trichoderma reesei* (Sun *et al*., 2008), *Acremonium cellulolyticus* (Hideno *et al*., 2011), *Penicillium chrysogenum* (Saber *et al.*, 2010); ligninasas en *Streptomyces psammoticus* (Niladevi *et al*., 2007), *Pleurotus ostreatus* (Taniguchi *et al*., 2005), y Xilanasas en *Aspergillus niger* (Mohan, 2012), *Acremonium cellulolyticus* (Hideno *et al*., 2011), *Penicillium oxalicum* (Liao *et al*., 2012). Así mismo se han realizado estudios para determinar la degradación de tamo de arroz, Kausar *et al*., 2010, evaluaron un consorcio microbiano con *Trichoderma viride y Aspergillus niger* para compost de tamo de arroz, encontrando pérdida de celulosa, hemicelulosa y lignina en el tamo de arroz con gallinaza en los 60 días de evaluación; Xu & Yang, 2010 evaluaron la degradación de este residuo con *Streptomyces griseorubens*, durante 50 días, encontrando perdida de celulosa, lignina y hemicelulosa; Umasaravanan *et al*., 2011, realizaron fermentación sólida para observar la degradación durante 21 días de lignocelulosa en bagazo de caña y tamo de arroz con *Aspergillus tamarii,* encontrando pérdida de lignina y celulosa de 29,5% y 6,2% respectivamente.

En Colombia, Fedearroz, ha realizado estudios en campo durante los últimos años para la evaluación de la degradación de tamo de arroz *in situ* y el aporte de nutrientes donde Gárces & Ospina, 2009, encontraron disminución de peso seco del tamo de arroz durante 25 días con la inoculación en campo de *Trichoderma viride*; Cuevas, 2010, encontró que la inoculación de *Trichoderma* sp. en campo, mejora el contenido de materia orgánica del suelo; Castilla, 2013, encontró aumento en el contenido nutricional del suelo en campo al incorporar el tamo de arroz tratado con el hongo *Trichiderma* sp.

Con el fin de generar un producto para la degradación de tamo de arroz en campo, el grupo de investigación de bioprocesos y bioprospección, realizó el aislamiento de 436 bacterias, 55 hongos celulolíticos y 3 hongos ligninolíticos, a partir de muestras de rizosfera provenientes de suelo de arroz de Tolima y Meta, y muestras de residuos de palma provenientes de Guainía y Vichada, a los cuales les realizaron pruebas cualitativas en agar celulosa y agar lignina (Resultados sin publicar), seleccionando 9 aislamientos

fúngicos y 1 aislamiento bacteriano, por su actividad ligninolítica ó celulolítica (Tabla 1-2). Posteriormente se realizaron ensayos en microcosmos con los aislamientos 9, 8, T11, 5.1.1 y 5.2.1 sobre tamo de arroz, evaluando la producción de CO_2 durante 30 días, y obteniendo que el aislamiento 9 presentó una mayor producción de CO_2. Posterior a este tiempo el tamo tratado se incorporó con suelo proveniente de cultivos de arroz y se utilizó para el crecimiento de arroz (variedad F733) en condiciones de invernadero, mostrando buenos resultados en la longitud y peso seco de tallo y raíz, especialmente en el tratamiento con el aislamiento 9 (Sánchez, 2011). Finalmente se realizó la identificación por claves taxonómicas y molecular de estos microorganismos (Tabla 1-2).

Tabla 1- 2: Aislamientos seleccionados.

Código	Procedencia	Actividad	Microorganismo
H1	SR - Tolima	Celulolítica	*Penicillium* sp.
7.4	SR y C – Guainía y Vichada	Celulolítica	*Penicillium* sp.
7.5	SR y C - Guainía y Vichada	Celulolítica	*Penicillium* sp.
7.5’	SR y C Guainía y Vichada	Celulolítica	*Penicillium* sp.
8	SR y C – Guainía y Vichada	Celulolítica	*Trichoderma* sp.
7.1	SR - Tolima	Celulolítica	*Streptomyces* sp.
9	SR – Tolima	Celulolítica	*Paecilomyces* sp.
T1.1	SR - Tolima	Ligninolítica	*Pleurotus* sp.
5.2.1	RD – Guainía y Vichada	Ligninolítica	*Bionectria ochroleuca*
5.1.1	SR y C – Guainía y Vichada	Ligninolítica	*Psathyrella candolleana*

SR suelo rizosférico, C corteza, RD raíz en descomposición

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo general

Evaluar la actividad enzimática de aislamientos microbianos celulolíticos y ligninolíticos, y su aplicación en la degradación de tamo de arroz.

1.6.2 Objetivos específicos

- Seleccionar aislamientos microbianos con potencial para la degradación de tamo de arroz.
- Determinar la actividad celulolítica (endoglucanasa, exoglucanasa, β-glucosidasa), xilanolítica y/o ligninolítica (manganeso peroxidasa y lacasa) de los aislamientos seleccionados.
- Evaluar la capacidad de degradación de los aislamientos microbianos seleccionados sobre tamo de arroz, bajo condiciones de invernadero.

2. Metodología

2.1 Obtención de los microorganismos

Los aislamientos que se evaluaron en este trabajo fueron proporcionados por el laboratorio de fermentaciones del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN), éstos (Tabla 2-1) se seleccionaron previamente por su actividad celulolítica y/o lignolítica (Punto 1.5) y se almacenaron en discos de agar a 4ºC.

Tabla 2- 1: Microorganismos a evaluar

Código	**Aislamiento**
H1	*Penicillium* sp.
7.4	*Penicillium* sp.
7.5	*Penicillium* sp.
7.5'	*Penicillium* sp.
8	*Trichoderma* sp.
9	*Paecilomyces* sp.
T1.1	*Pleurotus ostreatus*
7.1	*Streptomyces* sp.

La reactivación de cada aislamiento, se realizó en medio PDA con una incubación de 8 días a 25°C. Después de este tiempo, se realizó el banco de cada aislamiento para lo cual se tomó un disco de agar PDA y se suspendió en 1 ml de agua destilada estéril (el banco se realizó con 50 discos de agar de cada aislamiento). Se conservó a 4°C hasta su reactivación.

2.2 Selección de los microorganismos

Para alcanzar el objetivo uno se llevaron a cabo dos ensayos en donde se evaluó la capacidad de los aislamientos para la producción de enzimas celulolíticas y/o ligninolíticas y posteriormente la capacidad de éstas de utilizar el tamo de arroz como única fuente de carbono, dando como resultado la producción de dióxido de carbono. A partir de los resultados obtenidos en este objetivo se seleccionaron los aislamientos (celulolítico y ligninolítico) para continuar con los siguientes objetivos.

2.2.1 Evaluación cualitativa de la producción de celulasas

Se reactivo cada microorganismo en medio PDA, y se incubó a 25°C por 8 días, posteriormente se realizó una suspensión de 10^6 esporas/ml utilizando solución salina al 0,85%. Para el aislamiento T1.1 la suspensión utilizada fue de 10^6 UFC/ml. Se realizó un pozo de 5 mm en el centro de una caja de Petri con agar carboximetil celulosa (Anexo A), donde se agregaron 50µl de la solución de esporas en agar agua 1% de cada uno de los aislamientos, por triplicado. Como control negativo se utilizó *Escherichia coli* ATCC 25922 y como control positivo la enzima comercial de *Trichoderma reesei* ATCC 26921. Se incubó por 7 días a 25°C y se reveló agregando 4 ml de rojo congo al 2% por 15 minutos, y posteriormente 4 ml de NaCl 1M por 15 minutos (Kasana *et al*., 2008), las cajas se llevaron a 4°C por 24 horas y se procedió a realizar la lectura. Se evidenció la formación de un halo de hidrólisis alrededor de la colonia como resultado de la degradación de la CMC en el medio, ya que el colorante forma complejo con los polisacáridos del medio. El diámetro de los halos producidos de cada uno de los aislamientos fue medido en milímetros, y se estableció tomando cuatro mediciones de cada halo y restando el halo de la colonia. El análisis estadístico se realizó por medio de ANOVA y las diferencias significativas entre los tratamientos se obtuvieron con la prueba de Scheffé.

2.2.2 Evaluación cualitativa de la producción de enzimas ligninolíticas

Para la obtención de los inóculos se realizó el mismo procedimiento que se describió en el punto anterior (2.2.1), el medio utilizado para la determinación de la producción de enzimas ligninolíticas fue el medio lignina suplementado con guayacol (Anexo A), las lecturas positivas se determinaron por la formación de un halo rojizo generado por la oxidación del guayacol catalizada por las peroxidasas producidas en el medio. Para la evaluación en medio lignina se utilizó como control positivo *Pleurotus ostreatus* y como control negativo *E. coli* ATCC 25922.

2.2.3 Ensayo de respirometría sobre tamo de arroz

El ensayo se realizó utilizando frascos de vidrio de 600 ml con tapa rosca, en el centro del frasco se adhirió un tubo PVC de 1 pulgada como contenedor central, en éste se colocó un vial con capacidad de 30 ml (Figura 2-1). En cada frasco se agregaron 8 g de tamo cortado (2-3 cm de largo) y se esterilizó el montaje. Finalmente se agregaron 30 ml de NaOH 0.2 N en el vial ubicado en el contenedor central, éste último se utilizó como trampa para la determinación de la producción de CO_2 (Sánchez, 2011).

Figura 2- 1: Montaje respirometría.

Frascos de vidrio con contenedor central

Para realizar el montaje, cada frasco se hidrató con 5 ml de solución de sales (Sánchez, 2011) y se agregaron 10 ml del microorganismo a evaluar en una concentración de 10^6 esporas/ml en solución salina al 0.85% y 10^6 UFC/ml para el T11. Se preparó un control abiótico sin inocular. Los frascos fueron incubados durante 60 días a 25°C (Sánchez, 2011). Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

Para la evaluación de la producción de CO_2, cada dos días se procedió a tomar el vial con la muestra de NaOH para su titulación, y se reemplazó con un nuevo vial estéril con NaOH el cual fue ubicado nuevamente en el contenedor central. La titulación se llevo a cabo con HCl 0,2N, para esto, se agregó 0,1ml de fenolftaleína como indicador de pH y 1ml de $BaCl_2$ el cuál precipita el carbono inorgánico como $BaCO_3$ (Figura 2-2b) (Critter *et al*., 2004). El resultado obtenido es el NaOH remanente que reacciona con el HCl (Figura 2-2c).

Los gramos de CO_2 producidos en los viales se determinaron a partir de los gramos de NaOH que reaccionaron con éste (Figura 2-2a). Para conocer este valor, se hallaron los moles de HCl que reaccionaron con el NaOH (con base a los ml HCl gastados en la titulación- Figura 2-2c) y a partir de esto se determinaron los gramos de NaOH que no reaccionaron con el CO_2. Es decir, los gramos de NaOH que reaccionaron con el CO_2, corresponden a la diferencia entre los gramos iniciales (que se colocaron en el vial) y los gramos finales (que reaccionaron con el HCl).

A partir de la cantidad de CO_2 producida durante los 60 días, se halló la velocidad de producción de CO_2, y a partir de esta se realizó el análisis estadístico ANOVA y la prueba de Tukey para establecer diferencias entre los tratamientos.

Figura 2- 2: Reacciones respirometría.

a $CO_2 + 2NaOH \rightarrow Na_2CO_3 + H_2O$

b $BaCl_2 + Na_2CO_3 \rightarrow BaCO_3 + 2NaCl$

c $NaOH + HCl \rightarrow NaCl + H_2O$

a. Reacción Dióxido de carbono con Hidóxido de sodio. b. Reacción cloruro de bario con carbonato de sodio. c. Reacción Hidróxido de sodio con ácido clorhídrico

2.3 Determinación de la actividad ligninocelulolítica

Para alcanzar el objetivo 2, se llevó a cabo un montaje en medio líquido inductor de enzimas celulasas, xilanasas y ligninasas para cuantificar la posible actividad enzimática de los microorganismos a evaluar.

2.3.1 Actividad de celulasas

El montaje realizado se llevó a cabo utilizando el medio base (Mandels & Weber, 1969) (Anexo A), con 12 tratamientos diferentes variando la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno para la inducción de estas enzimas (Tabla 2-2). Los montajes se realizaron en Erlenmeyer de 250 ml con 90 ml del medio base (con la fuente de carbono y nitrógeno) a pH 6, y 10 ml del inóculo, la suspensión establecida para el inóculo fue de 10^6 esporas/ml para el aislamiento celulolítico y 10^6 UFC/ml para el aislamiento ligninolítico, previamente crecidos en agar PDA por 8 días a 25°C. Los tratamientos se realizaron por triplicado y se incubaron a 28°C, 100 rpm, durante 10 días. A partir del cuarto día, se procedió a tomar muestra cada dos días para la determinación de la actividad, sacando una muestra de 8 ml de cada Erlenmeyer, las cuales fueron centrifugadas a 10000 rpm por 15 minutos y se utilizó el sobrenadante para la determinación de la actividad enzimática.

Tabla 2- 2: Tratamientos para la determinación de enzimas celulolíticas

Carbono (10g/L)	Nitrógeno (5g/L)
Glucosa	$(NH_4)_2SO_4$
	Extracto de levadura
	$(NH_4)_2SO_4$ + Extracto de levadura
	Sin nitrógeno
CMC	$(NH_4)_2SO_4$
	Extracto de levadura
	$(NH_4)_2SO_4$ + Extracto de levadura
	Sin nitrógeno
Tamo de arroz	$(NH_4)_2SO_4$
	Extracto de levadura
	$(NH_4)_2SO_4$ + Extracto de levadura
	Sin nitrógeno

- ***Actividad endo-1,4-β-glucanasa***

Se tomaron 500µl de la muestra con 500µl de carboximetil celulosa de baja viscosidad (2% p/v) como sustrato, en buffer citrato 50 mM (pH 5,0) y se incubó a 40°C por 60 minutos, se realizaron 4 réplicas por cada muestra. La técnica utilizada para la actividad enzimática fue DNS para la determinación de azúcares reductores, en términos de equivalentes de glucosa (Anexo B) (Quevedo, 2011; Jiang, 2011; Miller, 1959), para el cual se realizaron 3 repeticiones por cada réplica. La absorbancia utilizada para la lectura fue de 540 nm. La unidad de actividad endoglucanasa se definió como la cantidad de enzima que libera 1µmol de azúcares reductores por minuto.

- ***Actividad exo-1,4-β-glucanasa***

Se tomaron 100µl de la muestra con 400µl de *p*-nitrofenil-β-D-celobiosido (PNPC, Sigma) 5mM M como sustrato en buffer acetato de sodio 50 mM (pH 5,0) y se incubaron a 40°C por 60 minutos, se realizaron 3 réplicas por cada muestra. Para detener la reacción, se adicionaron 250µl de carbonato de sodio 0,5 M. La actividad enzimática se calculó con *p*-nitrofenol como estándar (Anexo B). La absorbancia utilizada para la lectura fue de 400 nm. La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de *p*-nitrofenol por minuto (Quevedo, 2011; Jiang, 2011; Valášková & Baldrian, 2006).

- ***Actividad 1,4-β-glucosidasa***

Se tomaron 100µl de la muestra con 400µl de *p*-nitrofenil-β-D-glucósido (PNPG, Sigma) 5 mM como sustrato en buffer acetato de sodio 50 mM (pH 5,0) y se incubaron a 40°C por 60 minutos, se realizaron 3 réplicas por cada muestra. Para detener la reacción, se adicionaron 250µl de carbonato de sodio 0,5 M. La absorbancia utilizada para la lectura fue de 400 nm. La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de *p*-nitrofenol por minuto (Quevedo, 2011; Jiang, 2011; Valášková & Baldrian, 2006).

2.3.2 Actividad de xilanasas

El montaje realizado para la determinación de la actividad de xilanasa se llevó a cabo utilizando el medio base (Mandels & Weber, 1969), con 4 tratamientos utilizando como fuente de carbono tamo de arroz y variando la fuente nitrógeno (Tabla 2-2). Los montajes se realizaron como se indica en el punto 2.3.1.

Para la determinación de la actividad de xilanasa, se tomaron 500µl de la muestra con 500µl de xilano (1% p/v) como sustrato, en buffer citrato 50 mM (pH 5,0) y se incubó a 40°C por 60 minutos, se realizaron 4 réplicas por cada muestra. La cantidad de azúcares reductores liberados se determinó con la técnica de DNS con xilosa como estándar (Anexo B) (Jorgensen & Olsson, 2006), para el cual se realizaron 3 repeticiones por cada réplica. La absorbancia utilizada para la lectura fue de 540 nm. La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de azúcares reductores por minuto.

2.3.3 Determinación de la actividad ligninolítica

El montaje utilizado para la determinación de la actividad ligninolítica se llevó a cabo como se describe en el punto 2.3.1, utilizando tamo de arroz como fuente de carbono y variando la fuente de nitrógeno (Tabla 2-2). Se realizó la cuantificación de la actividad lacasa y la actividad manganeso peroxidasa para el microorganismo ligninolítico seleccionado.

- ***Actividad Lacasa***

Para la determinación de la actividad lacasa, se tomaron 100 µl de buffer acetato de sodio 60 mM (pH 4,5) con 100 µl de ABTS (ácido 2,2' azino-bis-(3 etil benzatiazolin

sulfato)) y 800 µl de la muestra. La medición se realizó monitoreando el cambio en la absorbancia por la formación de un radical verde que se siguió durante 3 minutos cada 3 segundos. La absorbancia utilizada en la lectura fue 436 nm, se realizaron 4 réplicas por cada muestra. La unidad de la actividad lacasa se definió como la cantidad de enzima que permite la oxidación de 1µmol de ABTS por minuto (Quevedo, 2011).

- ***Actividad Manganeso Peroxidasa***

Para la determinación de la actividad manganeso peroxidasa se llevaron a cabo dos reacciones. En la primera se tomaron 450µl de la muestra, 50µl de sulfato de manganeso, 30µl de peróxido de hidrógeno, y 500µl de DMP (2,6-Dimetoxifenol) preparado con buffer acetato de sodio 100mM (pH5). En la segunda reacción, se tomaron 450µl de la muestra, 80µl de buffer acetato de sodio 100mM, y 500µl de DMP. En la primera reacción están actuando las enzimas que se encuentran en el medio que fueron producidas por el microorganismo (Lacasa y manganeso peroxidasa). Por otro lado, en la segunda reacción al no agregar el peróxido de hidrógeno y sulfato de manganeso, la reacción dada pertenece a las lacasas presentes en el medio, por lo tanto, el resultado de la actividad enzimática fue determinado por la resta entre estas dos reacciones. La actividad MnP se determinó por el cambio en la absorbancia a 468nm correspondiente a la oxidación de Mn^{+2} a Mn^{+3} durante 3 minutos con mediciones cada 10 segundos, se realizaron 4 réplicas por cada muestra. Una unidad de la actividad MnP se define como la cantidad de enzima que oxida 1µmol de DMP por minuto. (Quevedo, 2011).

2.3.4 Análisis estadístico

El análisis realizado para la actividad de enzimas celulasas fue ANOVA multivariado con el programa Design Expert®, a partir del área bajo la curva de los tratamientos. Para la actividad xilanasa y la actividad ligninolítica se halló área bajo la curva y se realizó análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey (α=0,05) en el programa GraphPad Prism.

2.4 Capacidad de degradación de los microorganismos seleccionados en invernadero

Para alcanzar el objetivo 3 se realizó un ensayo en microcosmos con los microorganismos seleccionados donde se determinó el cambio en la composición de lignina y celulosa en el tamo de arroz, así como la degradación por parte de los microorganismos.

El ensayo se llevó a cabo en cajas de plástico con tapa de 6 litros de capacidad, en las cuales se colocó una capa de 600g de suelo estéril proveniente de una finca arrocera de Ibagué, y 50g de tamo de arroz cortado 3-6 cm de largo (Figura 2-3). Los tratamientos a evaluar se realizaron por triplicado de la siguiente forma: 1. Microorganismo ligninolítico,

2. Micoorganismo celulolítico, 3. Consorcio ligninolítico – celulolítico, 4. Control abiótico. El inóculo utilizado fue 10^6 conidios/ml para el microorganismo celulolítico y 10^6 UFC/ml para el microorganismo ligninolítico. Para el tratamiento con el consorcio, los dos microorganismos fueron inoculados al mismo tiempo, el inóculo total para todos los tratamientos fueron 62 ml. El ensayo se mantuvo durante 50 días en los cuales se tomó una muestra inicial del tamo de arroz y una muestra final que fue evaluada en el laboratorio de nutrición animal de la Universidad Nacional de Colombia para la determinación de celulosa, hemicelulosa, y lignina presentes en cada una de las muestras. Así mismo se tomó una muestra final de suelo para la determinación del contenido de nitrógeno y carbono orgánico después del tratamiento, evaluado en el laboratorio de aguas y suelos de la Universidad Nacional de Colombia. Por último, para observar el cambio en el residuo durante el tiempo del experimento se llevó a cabo microscopía electrónica de barrido al día 0, 30, y 50. Durante el experimento se tomaron muestras para la evaluación de la actividad enzimática y así mismo se realizó un ensayo de respirometría.

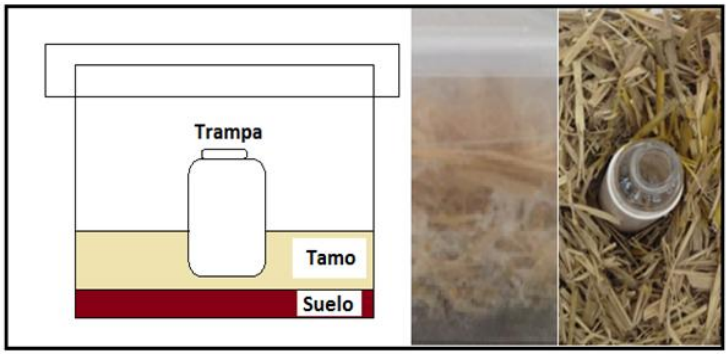
2.4.1 Evaluación de la actividad enzimática

Para determinar la actividad enzimática sobre el residuo, se tomaron cada 8 días 2g de tamo de cada uno de los montajes a los cuales se les agregó 20 ml de buffer citrato (pH 5) (Brijwani, *et al.*, 2010), y se agitó a 150rpm durante 6 horas a 25°C. Para la obtención del extracto, la muestra se centrifugó a 5000rpm durante 20 minutos y nuevamente a 3000rpm por 15 minutos. Una vez obtenido el extracto se midió la actividad enzimática endoglucanasa, exoglucanasa, β-glucosidasa, xilanasa, lacasa, y manganeso peroxidasa para cada una de las muestras utilizando la metodología descrita en el punto 3.3.1.

2.4.2 Evaluación de la respirometría en invernadero

Para la evaluación de la respirometría se colocó un tubo de PVC como contenedor en el centro de la caja, y dentro de este, un vial de vidrio con 20ml de NaOH 1N como trampa para la determinación de la producción de CO_2 (Figura 2-3). La medición de la respirometría se realizó según la metodología descrita en el punto 2.2.3, la concentración de HCl utilizada para la titulación fue 1N. Las mediciones se realizaron cada 3 días durante los 50 días del ensayo.

Figura 2- 3: Montaje para la evaluación en invernadero



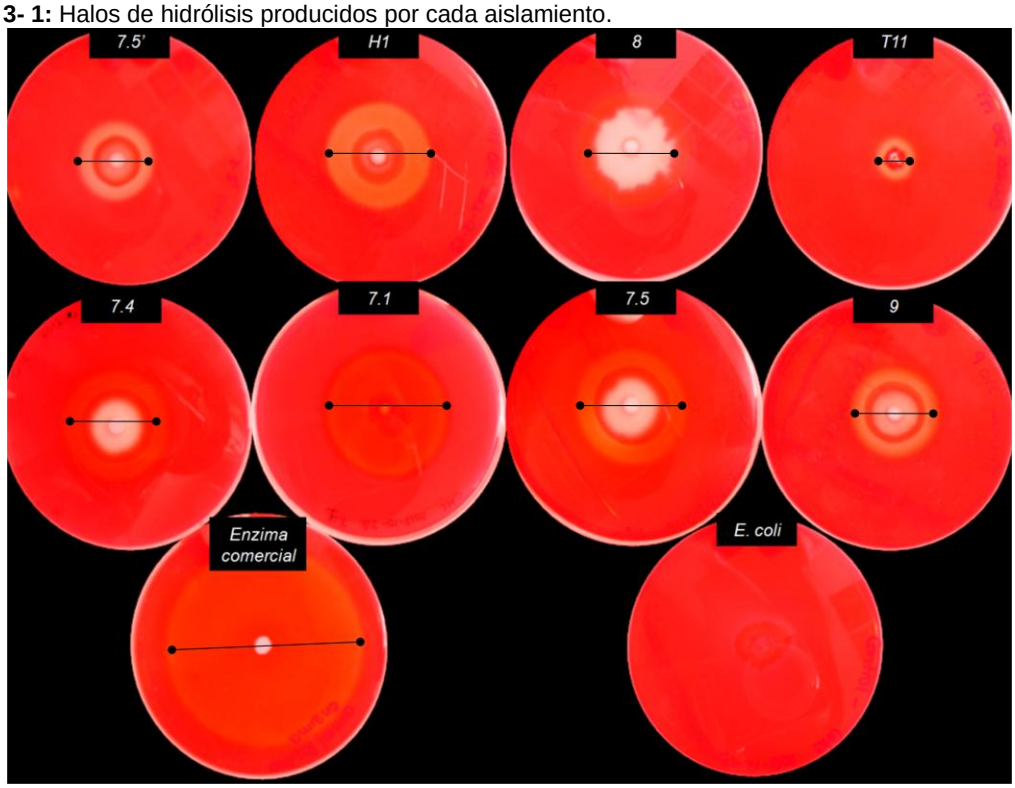
3. Resultados y discusión: Selección de los microorganismos

A los microorganismos seleccionados inicialmente por ser celulolíticos o ligninolíticos, se les realizaron pruebas cualitativa y cuantitativa para continuar con los aislamientos más representativos.

3.1 Evaluación cualitativa de la producción de celulasas

Como se observa en la figura 3-1, todos los aislamientos presentaron halos de hidrólisis por la producción de enzimas celulolíticas, destacándose el 7.1 y el H1 por el tamaño de sus halos, el control positivo utilizado fue la enzima comercial de *Trichoderma reseei* ATCC 26921 el cuál se utilizó como un control del medio.

Figura 3- 1: Halos de hidrólisis producidos por cada aislamiento.

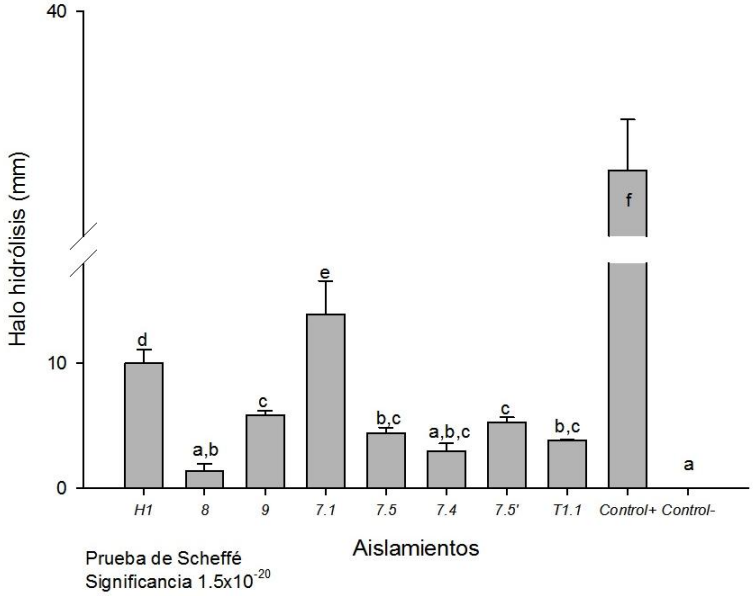


Se observa el halo de hidrólisis alrededor de la colonia generado por la producción de celulasas

En la evaluación cualitativa de la producción de enzimas celulasas, los aislamientos 8, 9, 7.4, 7.5, 7.5' y T1.1 presentaron halos de hidrólisis menores a los demás aislamientos, siendo los aislamientos 8 y 7.4 los que presentaron el diámetro más pequeño y no tienen diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo (Figura 3-2). Los aislamientos 9, 7.5, 7.5' y T1.1 presentaron halos entre 4-6 mm de diámetro, estos aislamientos corresponden a géneros como *Paecilomyces*, *Penicillium*, y *Pleurotus*, de los cuales, en el género *Paecilomyces* han sido reportadas algunas especies capaces de producir estas enzimas como *Paecilomyces themophila* y *Paecilomyces inflatus* (Kluczek-Turpeinen *et al*., 2005; Yang *et al*., 2009), aunque no se encuentran muchos reportes de este género. Por otro lado, el género *Penicillium* ha sido estudiado por su capacidad de producir enzimas celulolíticas en muchas especies como *P. janthinellu*m, *P. brasilianum, P. funiculosum* y *P. oxalicum,* entre otros (Jorgensen & Olsson 2006; Machado *et al*. 2010; Singhvi *et al*., 2011; Liao *et al*., 2012). Y por último el género *Pleurotus*, que aunque ha sido reportado como productor de enzimas celulasas (Elisashvili *et al*. 2008; Khalil *et al*., 2011), es más conocido por su capacidad de producción de enzimas ligninolíticas.

Los aislamientos H1 y 7.1 fueron los que presentaron un mayor halo de hidrólisis al utilizar como fuente de carbono carboximetil celulosa (Figura 3-2). El aislamiento H1 pertenece al género *Penicillium*, como ya se escribió anteriormente este género es conocido por su capacidad de producción de enzimas celulasas, el aislamiento 7.1 pertenece al género *Streptomyces,* en el cuál se han encontrado reportes de especies productoras de enzimas celulasas (Saratale *et al*., 2012; Rathnan & Ambili, 2011) y algunas lacasas (Niladevi *et al*., 2009; Lu *et al*., 2013), siendo este aislamiento el que presentó el mayor halo de hidrólisis. Cabe decir, que el sustrato carboximetil celulosa es celulosa amorfa por lo cual esta prueba está reflejando principalmente la producción de endoglucanasas.

Figura 3- 2: Halo de hidrólisis en mm por la producción de enzimas celulasas.



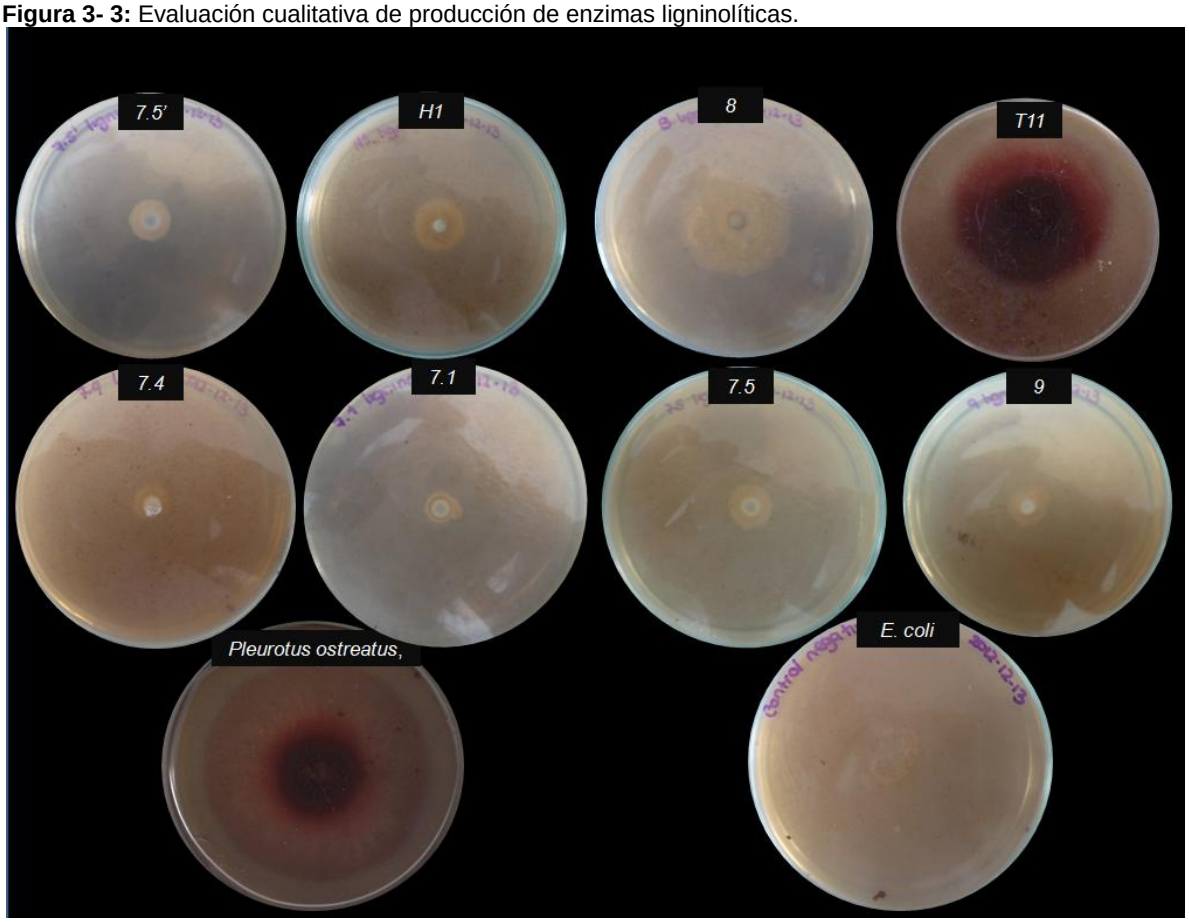
El control positivo utilizado corresponde a la celulasa comercial de *Trichoderma reesei* ATCC26921 utilizado como control del medio y el control negativo utilizado fue *E. coli* ATCC 25922

3.2 Evaluación cualitativa de la producción de ligninasas

Como se observa en la figura 3-3, de los ocho microorganismos que se evaluaron en esta prueba, el aislamiento T1.1 es el único capaz de producir enzimas ligninolíticas. En esta prueba, se observa la oxidación del guayacol a tetraguayacol por la acción de las peroxidasas que se encuentran en el medio al ser producidas por el microorganismo, en el medio se observa la aparición de un halo rojizo como resultado de esta oxidación, el cual se observó únicamente en el control positivo (*Pleurotus ostreatus*) y en el aislamiento T1.1.

El T1.1 fue identificado como *Pleurotus ostreatus,* esta especie es un basidiomiceto ampliamente reconocido como degradador de materiales lignocelulósicos, y ha sido utilizado en diversas investigaciones con tamo de arroz y otro tipo de residuos para la degradación de éstos y / o obtención de las enzimas (Reddy *et al*. 2003; Elisashvili *et al*., 2008).

Figura 3- 3: Evaluación cualitativa de producción de enzimas ligninolíticas.



3.3 Ensayo de respirometría en tamo de arroz

En el ensayo de respirometría en tamo de arroz se evalúo la capacidad de utilización del tamo como única fuente de carbono para cada uno de los aislamientos. Como se observa en la figura 3-4, todos los aislamientos presentaron crecimiento sobre tamo de arroz, principalmente los tratamientos inoculados con T1.1 y H1 en los cuales, durante los 60 días de tratamiento, se observó un rápido crecimiento en comparación con los demás aislamientos.

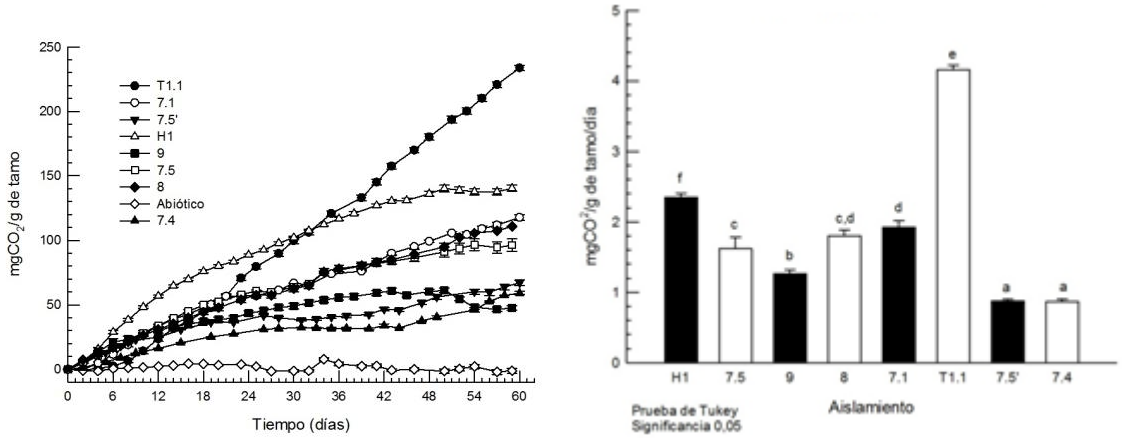
Figura 3- 4: Ensayo de respirometría en tamo de arroz

En la figura se observa el crecimiento de cada uno de los microorganismos sobre tamo de arroz al día 30 de tratamiento.

En la figura 3-5 se muestra la producción (mg) de CO_2 por gramo de tamo producida durante los 60 días de tratamiento, donde se pueden observar cinco grupos (Figura 3-5a), el primero es el control abiótico, el cual no presentó producción de CO_2 durante el

tiempo de evaluación, el segundo son los aislamientos 7.4, 7.5' y 9, los cuales mostraron una producción entre los 45-60 mg CO_2/g de tamo presentando la menor producción de CO_2. El tercer grupo son los aislamientos que mostraron una producción entre 95-120 mg CO_2/g tamo, en este grupo se encuentran los aislamientos 7.5, 8 y 7.1, siendo el 7.1 el que presentó la mayor producción en este grupo. El cuarto grupo es el H1 y el quinto el T1.1, los cuales presentaron 140 mg CO_2/g y 233 mg CO_2/g, respectivamente. A partir de las gráficas (Figura 3-5a), se obtuvo la producción de mg CO2 / g tamo / día (Figura 3-5b), donde se muestra que la velocidad de producción es menor en los tratamientos 7.5' y 7.4, seguidos por 9, 7.5, 8 y 7.1 respectivamente. Los tratamientos H1 y T1.1 presentaron una alta velocidad de producción de CO_2 en comparación con los otros tratamientos, destacándose el T1.1 que generó 4,15 mg CO_2/ g tamo/ día.

Figura 3- 5: Evaluación de respirometría en tamo de arroz



a. Producción de mg CO_2 durante los 60 días de evaluación. b. Velocidad de producción (mg de CO_2/g tamo/día) obtenido a partir de las pendientes de la gráfica anterior.

Los resultados obtenidos en este ensayo muestran que los aislamientos H1 y T1.1 presentaron los mejores resultados sobre tamo de arroz, estos dos microorganismos pertenecen a géneros estudiados por su capacidad de degradación de residuos de cosecha.Tal como se mencionó anteriormente, el género *Pleurotus* tiene la capacidad de producir enzimas ligninolíticas, lo que le permite degradar el residuo y utilizarlo como fuente carbono, en un estudio realizado, se encontró que el pretratamiento de tamo de arroz con *Pleurotus ostreatus* disminuía el contenido de lignina y celulosa 30% y 32% respectivamente a los 24 días de tratamiento en el residuo (Taniguchi *et al*., 2005), siendo este microorganismo de interés para ser evaluado en la degradación de este tipo de residuos. Por otro lado, el género *Penicillium* es estudiado principalmente para la producción de celulasas y xilanasas en diversas aplicaciones industriales. El tercer aislamiento que presentó resultados satisfactorios en la prueba de respirometría, fue el 7.1, el género *Streptomyces* ha sido reportado para la degradación de residuos, ya que algunas especies tienen la capacidad de producir enzimas celulasas y/o xilanasas, Abdulla & El-Shatoury, 2007, evaluaron la degradación de tamo de arroz al aplicar este microorganismo en condiciones de laboratorio, encontrando pérdida de peso del residuo, adicionalmente, el aislamiento 7.1 fue el que presentó mejores resultados en la prueba cualitativa para la producción de celulasas.

Los 5 aislamientos restantes, presentaron una menor capacidad de usar el tamo de arroz como fuente de carbono, comparado con los tres aislamientos mencionados

anteriormente. Adicionalmente, estos microorganismos fueron aislados de residuos de palma, a diferencia del T1.1, 7.1, y H1, lo cual pudo presentar una desventaja de adaptación al ser evaluados.

3.4 Conclusión del primer objetivo

Con base a los resultados obtenidos en las pruebas cualitativas y el ensayo de respirometría sobre tamo de arroz, se decidió continuar trabajando con los aislamientos T11, H1 y 7.1, siendo los tres aislamientos que presentaron mejores resultados en estas pruebas. Por lo tanto se seleccionó como aislamiento ligninolítico el T1.1, y como celulolíticos H1 y 7.1 para continuar con el siguiente objetivo.

4. Resultados y discusión: Determinación de la actividad ligninocelulolítica

Para la determinación de la actividad ligninocelulolítica se evaluaron los aislamientos 7.1 y T1.1, el aislamiento H1 no fue evaluado, ya que la determinación de la actividad se realizó en el marco de otro proyecto (Sánchez, 2013).

4.1 Actividad enzimática del aislamiento 7.1

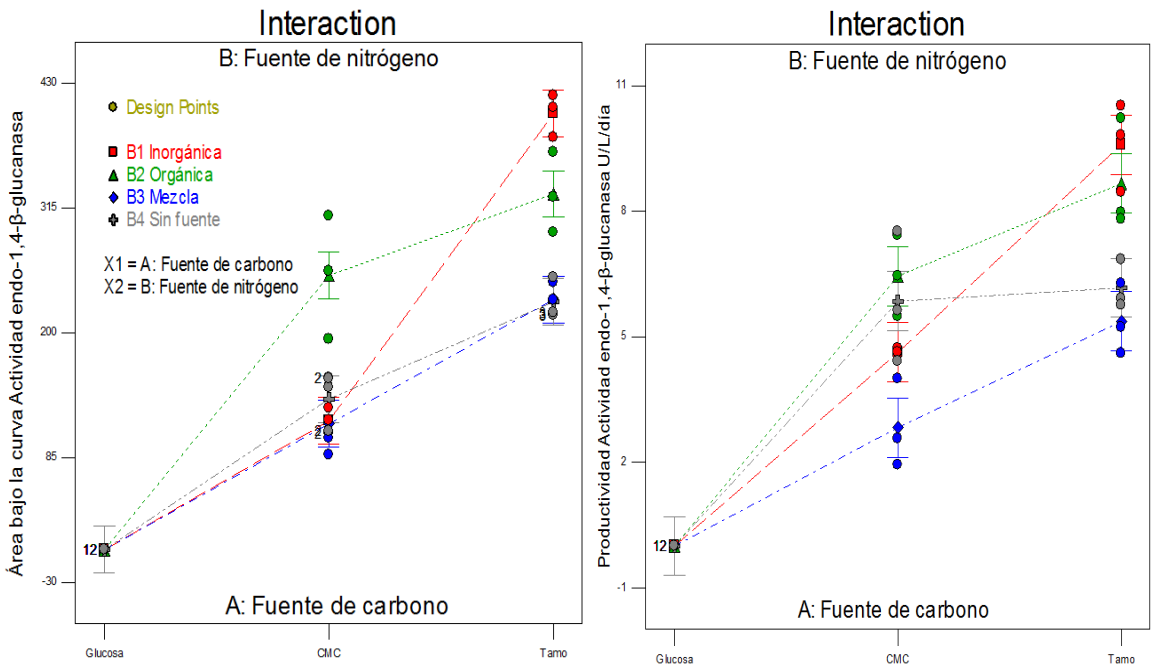
Para el aislamiento 7.1 se realizó la evaluación de la actividad celulolítica (endoglucanasas, exoglucanasas, β-glucosidasas) y xilanolítica.

4.1.1 Determinación de la actividad de celulasas

Para la evaluación de la actividad celulolítica, se determinó el área bajo la curva de cada una de las cinéticas de la actividad enzimática obtenida (Anexo C), y la productividad definida como la actividad máxima dividida en el día en que ésta se presentó. A partir de estos parámetros, se procedió a realizar un análisis de varianza multivariado para establecer el efecto de cada una de las variables evaluadas (fuente de carbono y fuente de nitrógeno), así como el efecto de la interacción de éstas.

Para comenzar, se observan los resultados obtenidos para la actividad endoglucanasa, el análisis de varianza realizado para el diseño, muestra que el modelo y cada una de las variables y la interacción de estas tienen un efecto significativo (Tabla 4-1). En la figura 4-1a, se observa el área bajo la curva para cada una de las variables, donde la mayor área se encontró usando como fuente de carbono tamo de arroz con fuente inorgánica de nitrógeno. Por el contrario, cuando la fuente de carbono utilizada fue CMC, la mayor actividad se presentó con la fuente orgánica de nitrógeno. Al observar la productividad (Figura 4-1b), nuevamente la mayor actividad se observó con el tamo de arroz como fuente de carbono, sin embargo, la fuente de nitrógeno orgánica y la fuente de inorgánica presentaron la misma actividad, siendo menor la productividad presentada por la mezcla.

Figura 4- 1: Actividad endo-1,4-β-glucanasa 7.1



A. área bajo la curva y B. Productividad

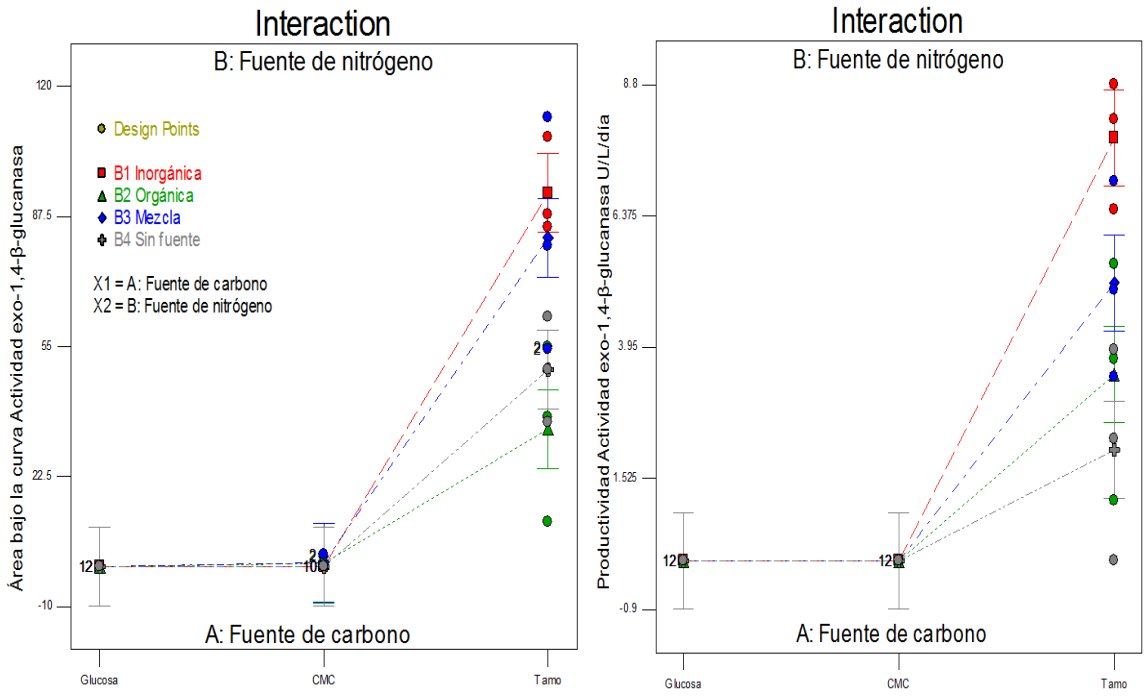
Tabla 4- 1: Análisis de varianza de la actividad endo-1,4-β-glucanasa 7.1

	Área bajo la curva		Productividad	
fuente	**valor F**	**valor-*p* Prob > F**	**valor F**	**valor-*p* Prob > F**
modelo	88.11	< 0.0001	52.04	< 0.0001
A-Fuente de carbono	407.12	< 0.0001	244.33	< 0.0001
B-Fuente de nitrógeno	20.18	< 0.0001	13.46	< 0.0001
AB	15.74	< 0.0001	7.23	0.0002

Área bajo la curva R^2 0,9758 Adj R^2 0,9648; **Productividad** R^2 0,9598 Adj R^2 0,9413

En cuanto a la actividad exoglucanasa, en la tabla 4-2 se observan los resultados del análisis de varianza, el cuál fue significativo, encontrando por lo menos una variable que afecta la actividad enzimática. Para el microorganismo 7.1 no se encontró actividad cuando la fuente de carbono utilizada fue glucosa o CMC. En la figura 4-2a, se muestran los resultados obtenidos para el área bajo la curva, donde la mayor actividad obtenida con tamo de arroz se detectó al utilizar como fuente de nitrógeno la fuente inorgánica y la mezcla (fuente orgánica y fuente inorgánica). Al evaluar la productividad (Figura 4-2b), se observa nuevamente que el tratamiento con tamo de arroz y fuente inorgánica de nitrógeno es el que presentó la mayor actividad exoglucanasa.

Figura 4- 2: Actividad exo-1,4-β-glucanasa 7.1



A. área bajo la curva y B. Productividad

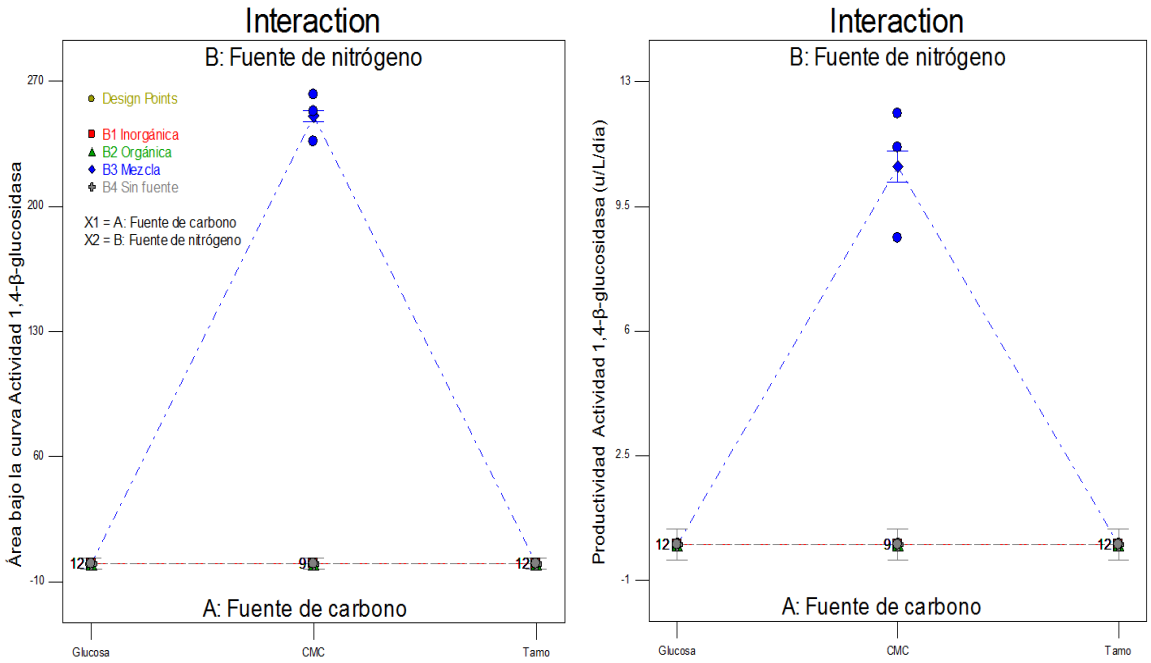
Tabla 4- 2: Análisis de varianza de la actividad exo-1,4-β-glucanasa 7.1

	Área bajo la curva		**Productividad**	
fuente	**valor F**	**valor-*p* Prob > F**	**valor F**	**valor-*p* Prob > F**
modelo	26.54	< 0.0001	18.38	< 0.0001
A-Fuente de carbono	121.09	< 0.0001	76.26	< 0.0001
B-Fuente de nitrógeno	5.5	0.0051	5.52	0.0050
AB	5.55	0.0010	5.52	0.0010

Área bajo la curva R^2 0,9240 Adj R^2 0,8892; **Productividad** R^2 0,8939 Adj R^2 0,8453

Finalmente, no se detectó actividad β-glucosidasa en los tratamientos utilizando glucosa y tamo de arroz como fuente de carbono. En la tabla 4-3, se muestran los resultados del análisis de varianza el cuál fue significativo para el modelo utilizado. En la figura 4-3, se observa el área bajo la curva y la productividad de la actividad β-glucosidasa, donde se muestra que solo se detectó actividad cuando la fuente de carbono fue CMC y la fuente de nitrógeno fue la mezcla (fuente orgánica y fuente inorgánica).

Figura 4- 3: Actividad β-glucosidasa 7.1



A. área bajo la curva y B. Productividad

Tabla 4- 3: Análisis de varianza de la actividad 1,4-β-glucosidasa 7.1

	Área bajo la curva		**Productividad**	
fuente	**valor F**	**valor-*p* Prob > F**	**valor F**	**valor-*p* Prob > F**
modelo	1068.84	< 0.0001	103.51	< 0.0001
A-Fuente de carbono	1068.84	< 0.0001	103.51	< 0.0001
B-Fuente de nitrógeno	1068.84	< 0.0001	103.51	< 0.0001
AB	1068.84	< 0.0001	103.51	< 0.0001

Área bajo la curva R^2 0,9980 Adj R^2 0,9970; **Productividad** R^2 0,9794 Adj R^2 0,9699

Como se puede observar, el aislamiento 7.1 no presenta actividad basal de la actividad enzimática endoglucanasa, exoglucanasa y β-glucosidasa, evaluada al utilizar como fuente de carbono glucosa, la cuál es una fuente de carbono conocida por ser represor de la actividad celulolítica debido a que es una fuente de carbono simple, es decir fácilmente asimilable.

En el medio con CMC se presentó actividad endoglucanasa, este sustrato está compuesto principalmente por celulosa amorfa, la cual es degradada por las enzimas endoglucanasas, por lo tanto, esta actividad es inducida por este tipo de sustrato. Por el contrario, la actividad exoglucanasa no se detectó, esta última, es principalmente inducida por fuentes de celulosa cristalina como Avicel. Thierie & Penninckx, 2007, evaluaron la actividad endoglucanasa y exoglucanasa en *Streptomyces* spp. utilizando como fuente de carbono CMC, y encontraron una alta actividad endoglucanasa y baja actividad exoglucanasa la cual clasificaron como una actividad basal en este medio. En este caso, la actividad basal de estas enzimas no se detectó.

En cuanto a la actividad β-glucosidasa, no se detectó en ninguna de las fuentes de carbono evaluadas, con excepción del tratamiento con la mezcla de las fuentes de nitrógeno en CMC. En un estudio realizado por Semedo, *et al*., 2000, donde se evalúo la actividad celulasa en CMC como fuente de carbono, tampoco se encontró actividad β-glucosidasa en dos especies de *Streptomyces* spp. aisladas de suelos de bosque. Sin embargo, Thierie & Penninckx, 2007, encontraron una alta actividad β-glucosidasa al evaluarla en medio CMC, lo que indica que la expresión de estas enzimas puede estar determinada por la especie de *Streptomyces*.

Al comparar las fuentes de carbono con las fuentes de nitrógeno se puede determinar que para el aislamiento 7.1 el medio con CMC y fuente de nitrógeno orgánica tiene una mejor inducción sobre la actividad endoglucanasa, mientras que en el medio con tamo de arroz la mayor actividad endoglucanasa y exoglucanasa se detecta con la fuente inorgánica de nitrógeno. En la literatura, se encuentra poca información sobre el efecto de las fuentes de nitrógeno en la actividad celulolítica del género *Streptomyces*, siendo la más recomendada el extracto de levadura, Chellapandi & Himanshu, 2008, evaluaron diferentes fuentes orgánicas e inorgánicas en medio CMC, encontrando una mayor inducción de la actividad endoglucanasa en las fuentes orgánicas para *Streptomyces* sp. BRC1, concordando con los resultados obtenidos en este trabajo.

Por otro lado, la actividad enzimática presentada por el aislamiento 7.1 fue una actividad baja en comparación con otros estudios realizados para *Streptomyces* spp. Grigorevski de Lima, *et al*., 2005, evaluaron la actividad celulasa en *Streptomyces drozdowiczii*, encontrando actividad endoglucanasa de hasta 595 U/L utilizando extracto de levadura y CMC como fuente de nitrógeno y carbono respectivamente, así mismo utilizando una fuente de carbono compleja como salvado de trigo y extracto de levadura como fuente de nitrógeno, la actividad endoglucanasa fue hasta 395 U/L. El-Sersy, *et al*., 2010, evaluaron con *Streptomyces ruber* la actividad celulasa sobre tamo de arroz en diferentes concentraciones, la mayor actividad fue 30 U/ml con una concentración de 30 g/L de tamo de arroz. En este trabajo la mayor actividad presentada fue en el medio con tamo de arroz y sulfato de amonio 82,18 U/L para la actividad endoglucanasa y 84,76 U/L para la actividad exoglucanasa en el mismo medio.

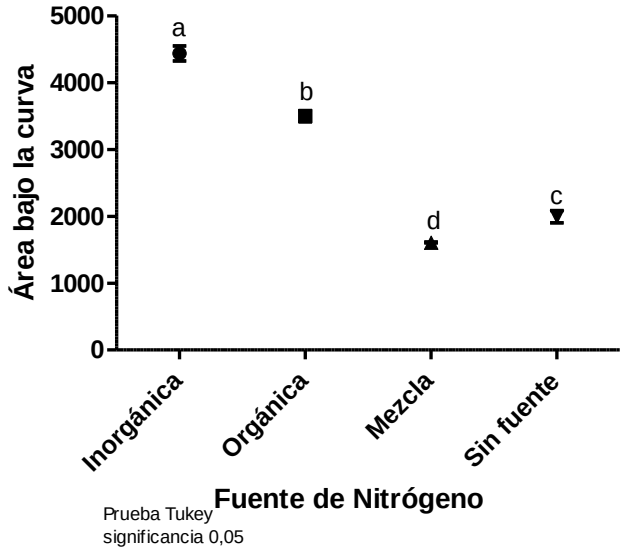
Adicionalmente, el aislamiento H1, evaluado por Sánchez, 2013, presentó actividades endoglucansa, exoglucanasa, y β-glucosidasa mayores que el aislamiento 7.1, cabe resaltar que las condiciones de evaluación para este aislamiento fueron las mismas descritas en este trabajo para la determinación de la actividad lignocelulolítica (punto 2.3). En el anexo G, se muestran los resultados obtenidos para este aislamiento en términos de productividad, usando como fuentes de carbono CMC y tamo de arroz. La mayor productividad de la actividad exoglucanasa fue de 1034,014 U/L/día usando como fuente de carbono tamo de arroz y fuente inorgánica de nitrógeno; en la actividad endoglucanasa fue de 89,69U/L/día y se presentó en el medio de tamo de arroz con fuente inorgánica de nitrógeno; por último, la mejor productividad para la actividad β-glucosidasa fue de 18153,57 U/L/día en el medio CMC con sulfato de amonio.

4.1.2 Determinación de la actividad de xilanasa

Para la determinación de la actividad xilanasa, se determinó el área bajo la curva de la cinética obtenida (Anexo E), con fuente de carbono tamo de arroz y las cuatro fuentes de nitrógeno (orgánica, inorgánica, mezcla, sin fuente).

Cómo se observa en la figura 4-4, para el aislamiento 7.1, la mayor actividad durante el tiempo de evaluación se presentó en el tratamiento con la fuente inorgánica de nitrógeno (sulfato de amonio). En el anexo E, se muestra la cinética de la actividad enzimática donde se observa que para las cuatro fuentes de nitrógeno la actividad máxima se detectó al día 10, siendo 1081,59 U/L para la fuente inorgánica, 875,46 U/L para la fuente orgánica, 488,27 U/L para el tratamiento sin nitrógeno, y 409,21 U/L para la mezcla.

Figura 4- 4: Área bajo la curva actividad xilanasa 7.1



Los resultados observados para el aislamiento 7.1 sugieren que con la fuente de nitrógeno inorgánica hay una mayor inducción de las enzimas xilanasas utilizando como fuente de carbono tamo de arroz. Por el contrario, diversos estudios de la actividad xilanolítica en el género *Streptomyces* sugieren que las fuentes orgánicas de nitrógeno tienen un mejor efecto sobre la producción de estas enzimas. En un estudio realizado por Deng *et al*., 2005, encontraron que la fuente orgánica de nitrógeno incrementa la actividad xilanolítica al usar xilano de mazorca como fuente de carbono en *Streptomyces olivaceoviridis*. Techapun *et al*., 2002, reporta que al utilizar bagazo de caña como fuente de carbono, la actividad xilanolítica aumenta cuando se suplementa con extracto de levadura en bajas concentraciones, mientras que al usar sulfato de amonio no se presenta alteración en la actividad.

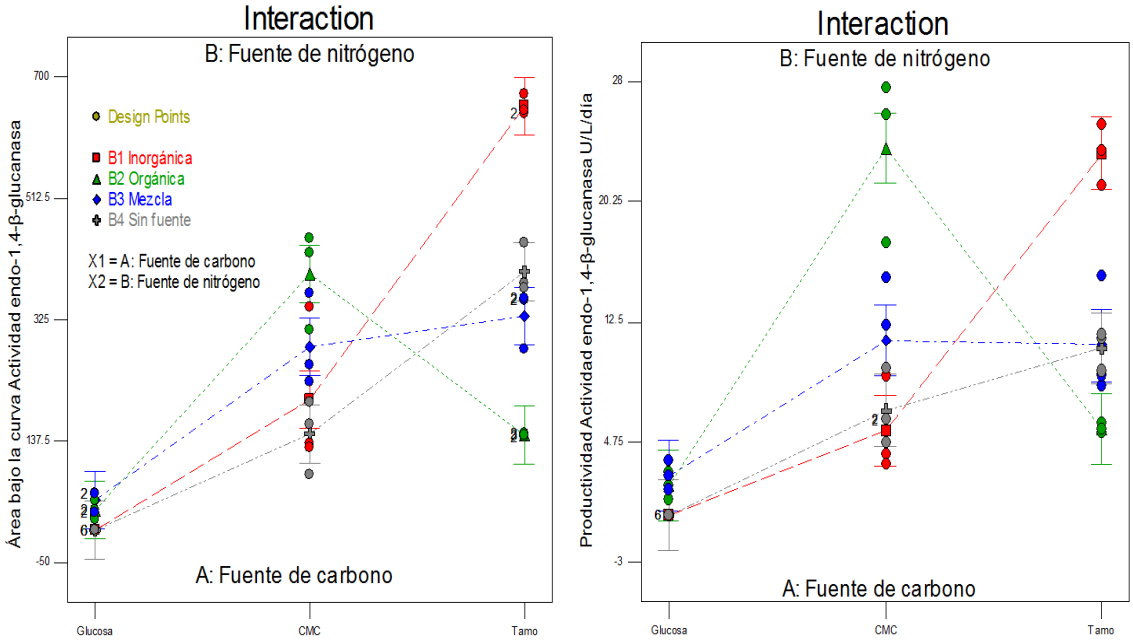
4.2 Actividad enzimática del aislamiento T1.1

Para el aislamiento T1.1 se realizó la evaluación de la actividad celulolítica (endoglucanasas, exoglucanasas, β-glucosidasas), xilanolítica, y ligninolítica (Lacasa y manganeso peroxidasa).

4.2.1 Determinación de la actividad de celulasas

Al igual que para el aislamiento 7.1, la evaluación de la actividad celulolítica, se determinó por el área bajo la curva de cada una de las gráficas de la actividad enzimática obtenida (Anexo D), y la productividad.

Figura 4- 5: Actividad endoglucanasa T1.1



A. área bajo la curva y B. Productividad

Tabla 4- 4: Análisis de varianza de la actividad endo1,4-β-glucanasa T1.1

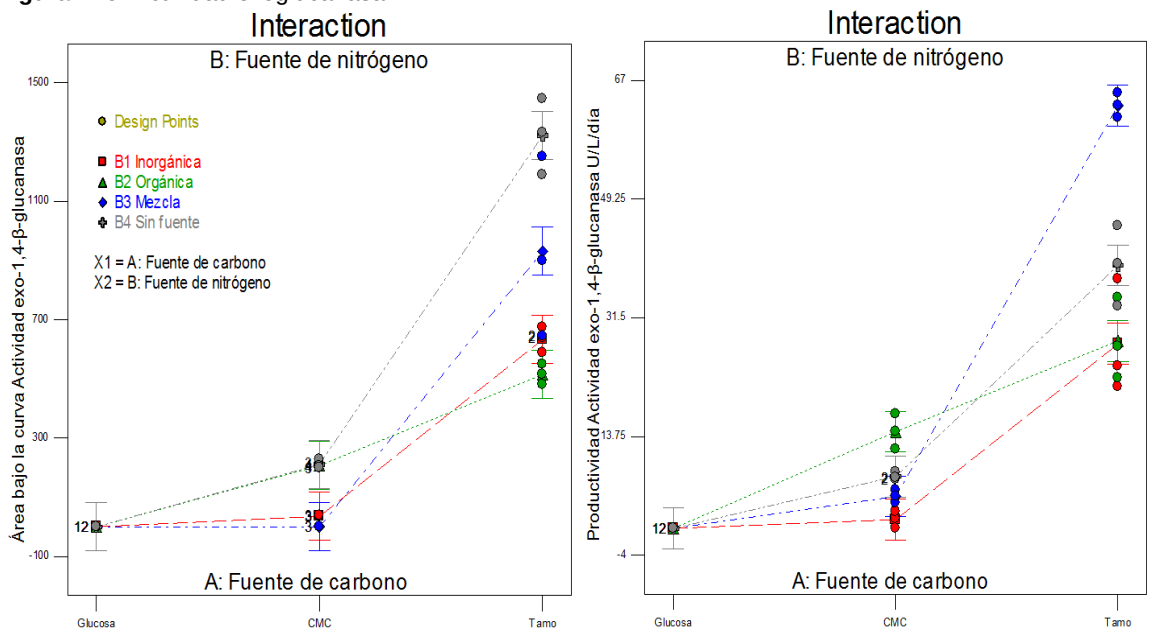
	Área bajo la curva		productividad	
fuente	**valor F**	**valor-*p* Prob > F**	**valor F**	**valor-*p* Prob > F**
modelo	42.76	< 0.0001	26.52	< 0.0001
A-Fuente de carbono	145.14	< 0.0001	67.72	< 0.0001
B-Fuente de nitrógeno	6.93	0.0016	4.86	0.0089
AB	26.55	< 0.0001	23.63	< 0.0001

Área bajo la curva R^2 0,9515 Adj R^2 0,9292; **Productividad** R^2 0,9240 Adj R^2 0,8892

En la tabla 4-4, se observan los resultados obtenidos en el análisis de varianza para la actividad endoglucanasa, el cual muestra que el modelo y las variables tienen un efecto significativo. En la figura 4-5a, se observa el área bajo la curva para cada una de las

variables, donde la mayor área se presentó usando tamo de arroz como fuente de carbono y la fuente inorgánica de nitrógeno. En términos de productividad (Figura 4-5b), se observa que la actividad entre el tamo de arroz con la fuente inorgánica y la actividad en medio CMC con la fuente orgánica son iguales. En el anexo D, se observa que la actividad endoglucanasa en el medio CMC presenta actividad máxima en el día 4 con la fuente orgánica de nitrógeno, y a partir de este día la actividad decrece.

Figura 4- 6: Actividad exoglucanasa T1.1



A. área bajo la curva y B. Productividad

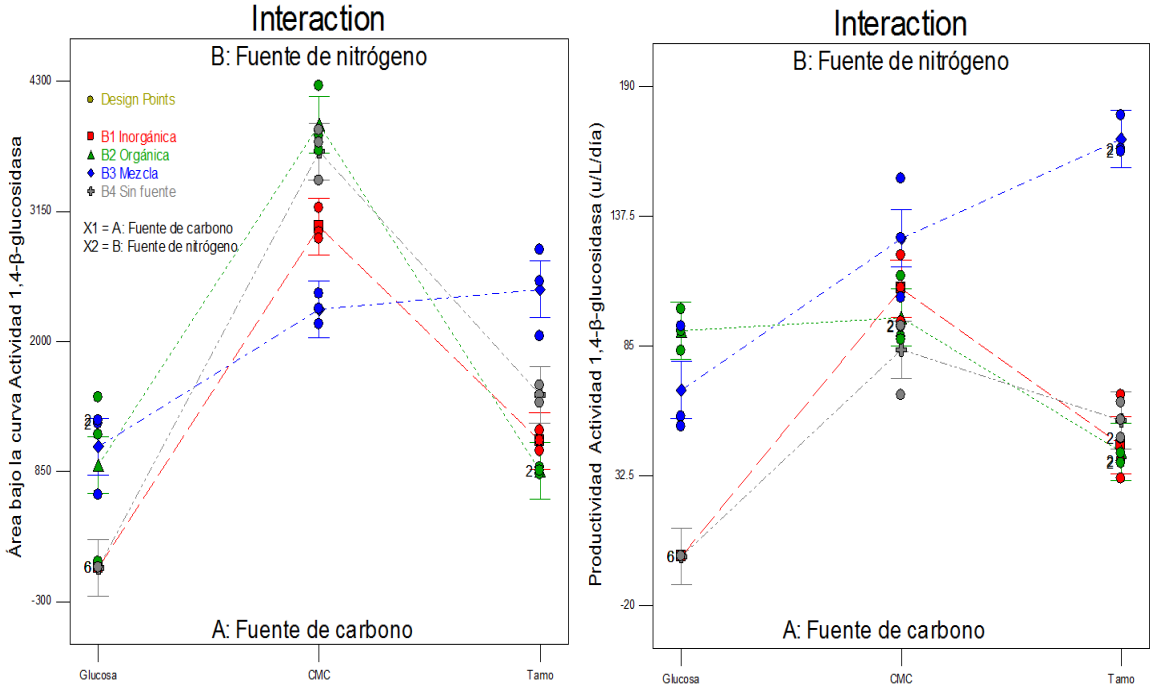
Tabla 4- 5: Análisis de varianza de la actividad exo1,4-β-glucanasa T1.1

	Área bajo la curva		**productividad**	
fuente	**valor F**	**valor-*p* Prob > F**	**valor F**	**valor-*p* Prob > F**
modelo	62.05	< 0.0001	92.54	< 0.0001
A-Fuente de carbono	273.02	< 0.0001	403.42	< 0.0001
B-Fuente de nitrógeno	16.76	< 0.0001	19.89	< 0.0001
AB	14.37	< 0.0001	25.23	< 0.0001

Área bajo la curva R^2 0,9660 Adj R^2 0,9505; **Productividad** R^2 0,9770 Adj R^2 0,9664

En cuanto a la actividad exoglucanasa, en la tabla 4-5 se muestra que el modelo aplicado, fue significativo, y así mismo las variables y la interacción entre estas fueron significativas. En la figura 4-6a se observa que la mayor área bajo la curva se presentó al usar el tamo de arroz como fuente de carbono, el tratamiento sin fuente de nitrógeno fue con el que se detectó la mejor inducción de la actividad exoglucanasa, seguido por el tratamiento con la mezcla (fuente orgánica y fuente inorgánica). Al evaluar la productividad (figura 4-6b), el tratamiento con tamo de arroz como fuente de carbono y la mezcla como fuente de nitrógeno, fue el que presentó una mayor productividad, sin embargo en el anexo D, se observa que este tratamiento presenta una disminución de la actividad a partir del día 6, siendo el día 4, en el que se detecta la máxima actividad.

Figura 4- 7: Actividad β-glucosidasa T1.1



A. área bajo la curva y B. Productividad

Tabla 4- 6: Análisis de varianza de la actividad 1,4-β-glucosidasa T1.1

	Área bajo la curva		**Productividad**	
fuente	**valor F**	**valor-*p* Prob > F**	**valor F**	**valor-*p* Prob > F**
modelo	59.35	< 0.0001	39.57	< 0.0001
A-Fuente de carbono	257.46	< 0.0001	67.43	< 0.0001
B-Fuente de nitrógeno	6.53	0.0022	56.93	< 0.0001
AB	19.72	< 0.0001	21.60	< 0.0001

Área bajo la curva R^2 0,9645 Adj R^2 0,9483; **Productividad** R^2 0,9477 Adj R^2 0,9238

Finalmente la actividad β-glucosidasa, se detectó en los tratamientos con las tres fuentes de carbono. En la tabla 4-6 se muestran los resultados del análisis de varianza, determinando que el modelo, las variables y la interacción entre estas son significativos para área bajo la curva y la productividad.

En la evaluación del área bajo la curva (Figura 4-7a), se observa que el tratamiento que presentó mayor actividad β-glucosidasa durante los 10 días de evaluación fue utilizando CMC como fuente de carbono, y fuente orgánica y sin nitrógeno. Por otro lado, en el medio con tamo de arroz, la mayor área bajo la curva se presentó con la mezcla de las fuentes de nitrógeno. En la figura 4-7b, se observa que la mayor productividad se presentó en los tratamientos utilizando como fuente de carbono tamo de arroz y CMC, con la mezcla como fuente de nitrógeno. Sin embargo, en el anexo D se observa que para CMC, la mezcla como fuente de nitrógeno presentó su pico más alto de actividad al día 4, y a partir de este día, la actividad disminuyó, por lo tanto, durante el tiempo evaluado este tratamiento fue el que presentó una menor actividad. Por otro lado, en el

tratamiento con glucosa se presentó actividad únicamente con la fuente de carbono orgánica y la mezcla.

Como se observó en los resultados, para el aislamiento T1.1 la fuente de carbono que presentó una mayor inducción en la actividad endoglucanasa y exoglucanasa fue el tamo de arroz. En el medio con CMC como fuente de carbono se presentó inducción en la producción de endoglucanasas, sin embargo, la actividad en este medio fue menor que en tamo de arroz, en cuanto a la actividad exoglucanasa, en este medio fue baja comparada con la actividad endoglucanasa, como se mencionó anteriormente, este medio está compuesto por celulosa amorfa principalmente por lo que la CMC no induce la producción de estas enzimas.

Por otro lado, los mejores resultados de la actividad β-glucosidasa, se presentaron en el medio CMC, esta actividad también fue inducida en las otras dos fuentes de carbono (glucosa y tamo de arroz). La inducción de estas enzimas, se da principalmente por la presencia de celobiosa u otros oligosacáridos en el medio, en este caso en el medio con glucosa se detecto la producción de β-glucosidadasa con algunas fuentes de nitrógeno, Jorgensen, *et al*., 2004, evaluaron la actividad celulolítica y xilanolítica en *Penicillium* spp., con monosacáridos, encontrando que la actividad β-glucosidasa puede detectarse cuando la concentración de glucosa comienza a disminuir en el medio, presentando una expresión basal de la enzima, estos resultados también fueron encontrados por Zampiere, *et al.* 2013, en medio con glucosa como fuente de carbono en *Penicillium echinulatum*.

Por otro lado, la mayor actividad endoglucanasa se presentó con fuente inorgánica de nitrógeno en tamo de arroz, mientras que en el tratamiento con CMC, la fuente orgánica fue la que presentó mejores resultados. Membrillo, *et al*., 2008 encontraron que el tratamiento con *Pleurotus ostreatus* en fermentación sólida agregando sulfato de amonio mejoraba la actividad endoglucanasa en bagazo de caña, estos resultados coinciden con lo encontrado en este trabajo para tamo de arroz. En cuanto a la actividad exoglucanasa, se observó que el tratamiento sin fuente de nitrógeno presentó una mejor inducción de la actividad en tamo de arroz y CMC, mientras que la actividad β-glucosidasa fue mayor en los tratamientos con fuente orgánica y sin fuente en el medio CMC, y la mezcla para el medio con tamo de arroz.

Estos resultados concuerdan con estudios realizados donde se ha demostrado que la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno son un factor regulador de la producción de enzimas celulolíticas, Lockington *et al*., 2002, demostraron que en *Aspergillus nidulans*, la producción de celulasas está regulada por la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno con reguladores de carbono CreA, CreB, CreC, y nitrógeno AreA. Con hongos de podredumbre blanca, Elisashvili *et al*., 2006, 2008, 2009, han realizado varios estudios con diferentes residuos de cosecha principalmente cáscaras de mandarina, hojas de árboles y paja de trigo, encontrando influencia de la actividad celulasa con la adición de fuentes de nitrógeno, y variación del rendimiento de la actividad tanto en la fuente de carbono como en la fuente de nitrógeno. En *P. ostreatus*, por ejemplo, encontraron que con el medio base de extracto de levadura, y adicionando sulfato de amonio, la actividad endoglucanasa y xilanasa aumenta cuando el sustrato es paja de trigo, pero disminuye cuando el sustrato son hojas de árbol (Elisashvili *et al*., 2008), así mismo, en *Pleurotus drynus* encontraron que la actividad endoglucanasa aumenta cuando el sustrato utilizado es cáscaras de mandarina y la fuente de nitrógeno es extracto de levadura adicionando sulfato de amonio (Elisashvili *et al*., 2006).

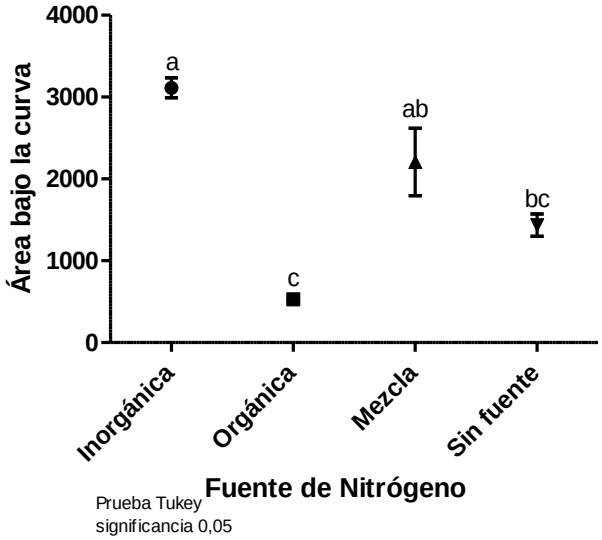
Así mismo, con sustratos sintéticos, *Goldbeck et al*., 2013, encontraron que *Acremonium strictum* tiene mejor actividad endoglucanasa y β-glucosidasa en medio con CMC durante las primeras 48 horas de incubación en medio líquido que usando avicel como fuente de carbono.

4.2.2 Determinación de la actividad de xilanasa

Para la determinación de la actividad xilanasa en el aislamiento T1.1, se determinó el área bajo la curva de la cinética obtenida (Anexo E), con fuente de carbono Tamo de arroz y las cuatro fuentes de nitrógeno.

Como se observa en la figura 4-8, para el aislamiento T1.1, los tratamientos con la fuente inorgánica de nitrógeno y con la mezcla de las fuentes presentaron la mayor área bajo la curva, siendo el tratamiento con fuente orgánica el que presentó la menor área. En el anexo E, se observa la cinética de la actividad para las cuatro fuentes de nitrógeno, la actividad máxima para el tratamiento con fuente inorgánica fue 933,92 U/L en el día 10, para la mezcla fue 523,06 U/L en el día 8, para el tratamiento sin fuente fue 508,22 U/L en el día 10, y finalmente la fuente orgánica presentó la máxima actividad en el día 10 con 114,75 U/L, siendo la actividad más baja.

Figura 4- 8: Área bajo la curva actividad xilanasa



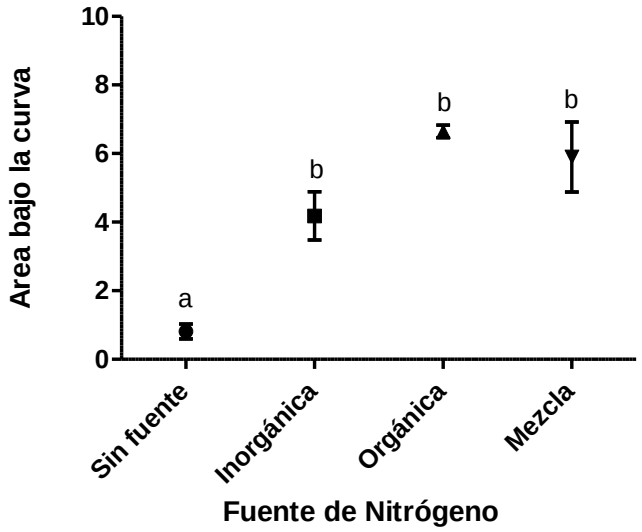
Los resultados obtenidos para el aislamiento T1.1 muestran que las fuentes de nitrógeno inorgánica y la mezcla (orgánica-inorgánica), incrementan la producción de enzimas xilanasas en el microorganismo, utilizando como fuente de carbono tamo de arroz. En un estudio realizado por Qinnghe *et al*., 2004, encontraron que para *Pleurotus ostreatus* utilizando salvado de trigo como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno se favorecía la actividad xilanasa, por el contrario la actividad con sulfato de amonio era baja, estos resultados son contrarios a los obtenidos en este trabajo. Sin embargo, en otro estudio, Elisashvili *et al*., 2006, encontraron que con *Pleurotus drynus,* utilizando cascaras de mandarina como fuente de carbono y extracto de levadura suplementado con sulfato de amonio como fuente de nitrógeno incrementaba la producción de xilanasas en comparación del medio con extracto de levadura únicamente.

4.2.3 Determinación de la actividad de ligninasa

Para la determinación de la actividad ligninasa evaluada en el aislamiento T1.1, se determinó el área bajo la curva de la gráfica obtenida (Anexo F) para la actividad lacasa y la actividad manganeso peroxidasa, con fuente de carbono Tamo de arroz y las cuatro fuentes de nitrógeno evaluadas para las actividades anteriores.

Como se observa en la Figura 4-9, los tratamientos que presentaron una mayor área bajo la curva para la actividad lacasa fueron los que tenían como fuente de nitrógeno extracto de levadura (fuente orgánica) y la mezcla de las fuentes. Con el tratamiento con la fuente orgánica, se detectó la mayor actividad en el día 8 de tratamiento, momento en el cual disminuyo la actividad. El tratamiento con la mezcla de las fuentes de nitrógeno presentó un aumento constante de la actividad lacasa durante los 10 días de tratamiento.

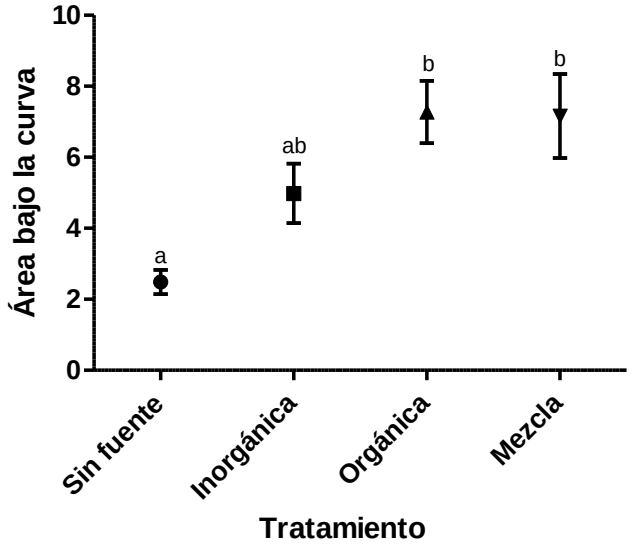
Figura 4- 9: Actividad Lacasa



La actividad manganeso peroxidasa, presentada en la figura 4-10, no presentó diferencias entre los tratamientos con fuente de nitrógeno orgánica, inorgánica, y la mezcla, por otro lado, el área bajo la curva presentada por el tratamiento sin fuente de nitrógeno fue el que presentó la menor actividad durante los 10 días de tratamiento.

Como se muestra en los resultados, la actividad manganeso peroxidasa y lacasa se ven inducidas por las fuentes de nitrógeno orgánica, inorgánica y la mezlca, siendo la fuente sin nitrógeno la que presentó la menor actividad para las dos enzimas ligninolíticas evaluadas.

Figura 4- 10: Actividad Manganeso peroxidasa



Algunos estudios, han reportado como estándar el extracto de levadura como fuente de nitrógeno para la producción de lacasas en *Pleurotus ostreatus* (Prasad, *et al*., 2005), Bettin *et al*., 2009, encontraron una alta actividad lacasa con las fuentes orgánicas de nitrógeno comparada con las fuentes inorgánicas en *Pleurotus sp*. por otro lado, Elisashvili, *et al.,* 2006, encontraron que el extracto de levadura suplementado con sulfato de amonio presentaba una inducción de la actividad con respecto al medio con únicamente la fuente orgánica. Estos estudios, concuerdan con los resultados de este trabajo donde la producción de lacasa fue mejor en los medios con extracto de levadura y la mezcla de la fuente de nitrógeno.

Para la actividad manganeso peroxidasa, Stajic *et al*., 2006 encontraron que la fuente de nitrógeno orgánica utilizada para ese estudio tenía una inducción más alta de esta enzima comparada con las fuente inorgánica, por otro lado, Elisashvili, *et al.,* 2006, evaluaron la producción de manganeso peroxidasa encontrando que la actividad disminuye al combinar el sulfato de amonio y el extracto de levadura como fuente de nitrógeno. En este trabajo, por el contrario se encontró que la fuente de carbono orgánica, la fuente de carbono inorgánica, o la mezcla de las dos no tenían efecto inhibitorio en la actividad manganeso peroxidasa para el aislamiento T1.1.

4.3 Conclusión del segundo objetivo

En este trabajo se encontró que para el aislamiento 7.1 la fuente de nitrógeno inorgánica tiene una mejor inducción de la actividad enzimática, al contrario de lo reportado en la mayoría de artículos donde la fuente orgánica es la recomendada para la inducción de las enzimas ligninocelulolíticas. Por otro lado, la actividad de celulasa en el aislamiento T1.1 se ve favorecida por la mezcla de las fuentes de nitrógeno principalmente.

La actividad celulolítica y xilanolítica encontrada para el aislamiento 7.1 mostró que el tamo de arroz y el sulfato de amonio son buenos inductores de la actividad enzimática en

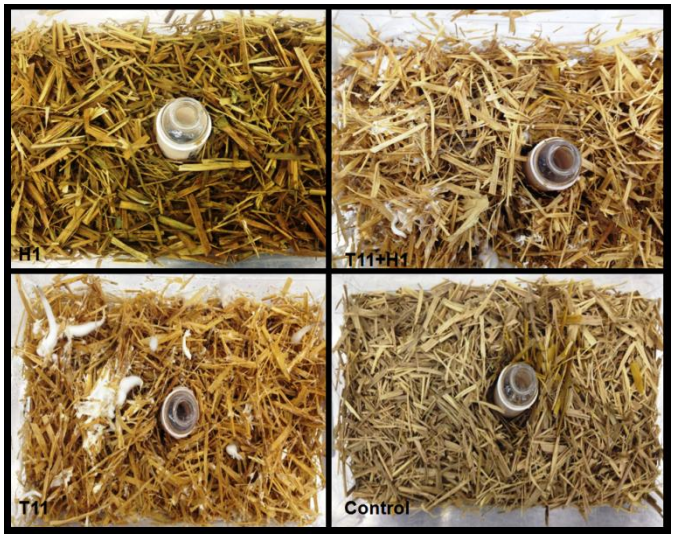
este aislamiento, sin embargo teniendo en cuenta los máximos valores de actividad obtenidos para este microorganismo y los resultados obtenidos por Sánchez, 2013 en la actividad enzimática del aislamiento H1, en este trabajo se decidió continuar con el aislamiento H1. Por otro lado, el aislamiento T1.1 presentó actividad celulolítica, xilanolítica y ligninolítica al utilizar tamo de arroz como fuente de carbono. A partir de los resultados obtenidos en este objetivo, se decidió realizar las pruebas de invernadero con el aislamiento T1.1 como ligninolítico y H1 cómo celulolítico.

5. Resultados y discusión: capacidad de degradación de los aislamientos seleccionados en invernadero

Para la evaluación de la capacidad de degradación de los aislamientos en invernadero se plantearon cuatro tratamientos: el control abiótico, el aislamiento ligninolítico seleccionado (T1.1), el aislamiento celulolítico seleccionado (H1), y un tratamiento con los dos microorganismos. Para este último tratamiento se tuvieron en cuenta las pruebas de antagonismo realizadas por Rincón, 2013, en donde no se encontró antagonismo entre los aislamientos T1.1 y H1.

Para cada uno de los tratamientos, se realizó el seguimiento del crecimiento de los microorganismos por microscopía electrónica, por otro lado, en el análisis del residuo se evalúo el contenido de celulosa, hemicelulosa, y lignina en el tamo de arroz, y sobre el suelo se evalúo el contenido de carbono orgánico y nitrógeno total entre los tratamientos.

Figura 5- 1: Crecimiento sobre el residuo.

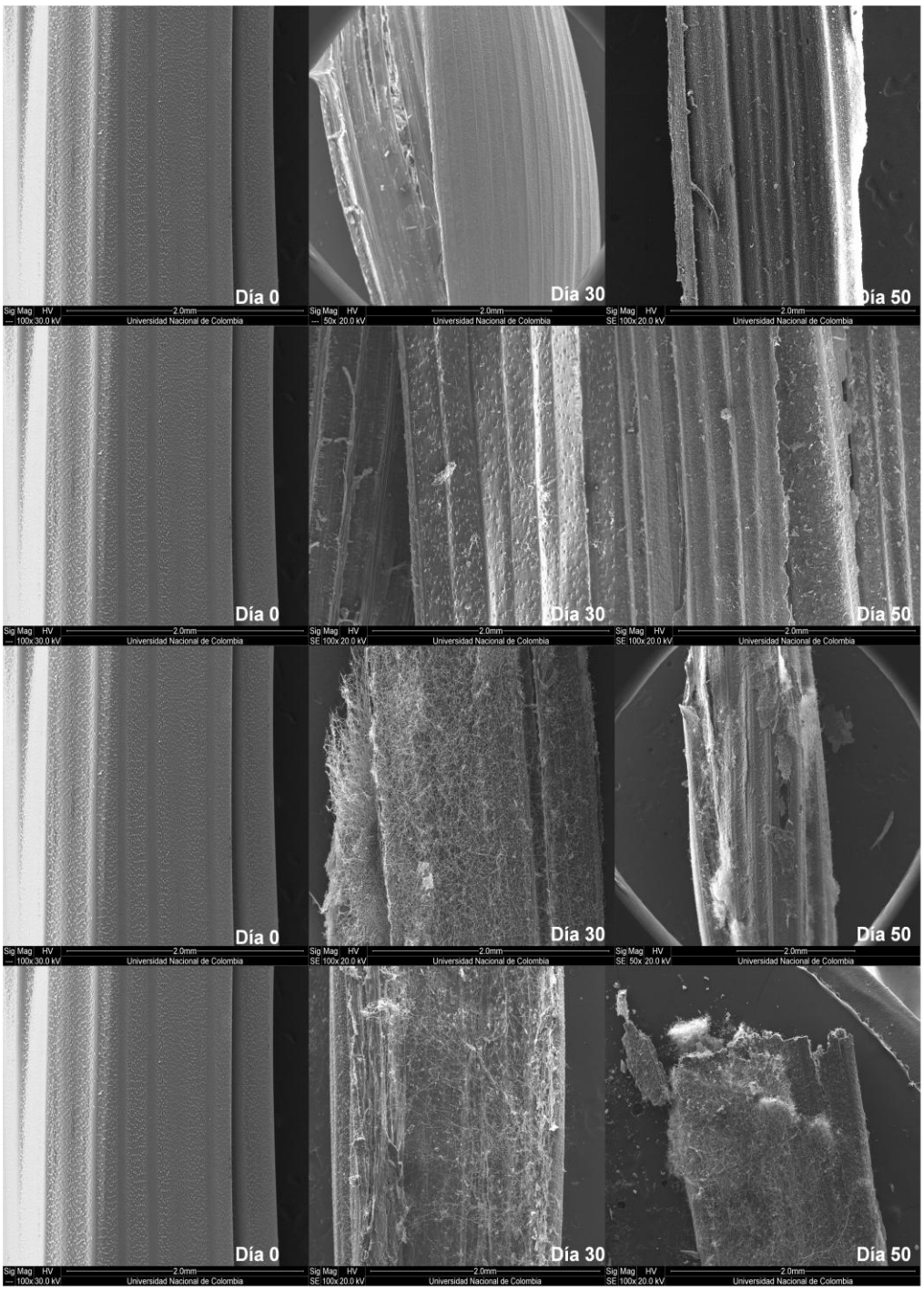


Día 30 de tratamiento

En la figura 5-1 se observan los tratamientos al día 30 de evaluación, en todos los tratamientos se evidenció crecimiento de los microorganismos, menos en el control abiótico. En el tratamiento con H1, se observó un pigmento verde sobre el residuo correspondiente al crecimiento micelial y esporulación del microorganismo. En el tratamiento con T1.1 se observó un rápido crecimiento del micelio del hongo sobre el

sustrato, y aglomeración del micelio con posterior formación del cuerpo fructífero después del día 20. En el tratamiento inoculado con los dos microorganismos (T1.1+H1), se observó muy poco crecimiento del aislamiento H1, por el contrario, el T1.1 presentó un buen crecimiento y el comienzo de la formación del cuerpo fructífero se evidenció después del día 40.

Figura 5- 2: Microscopía electrónica

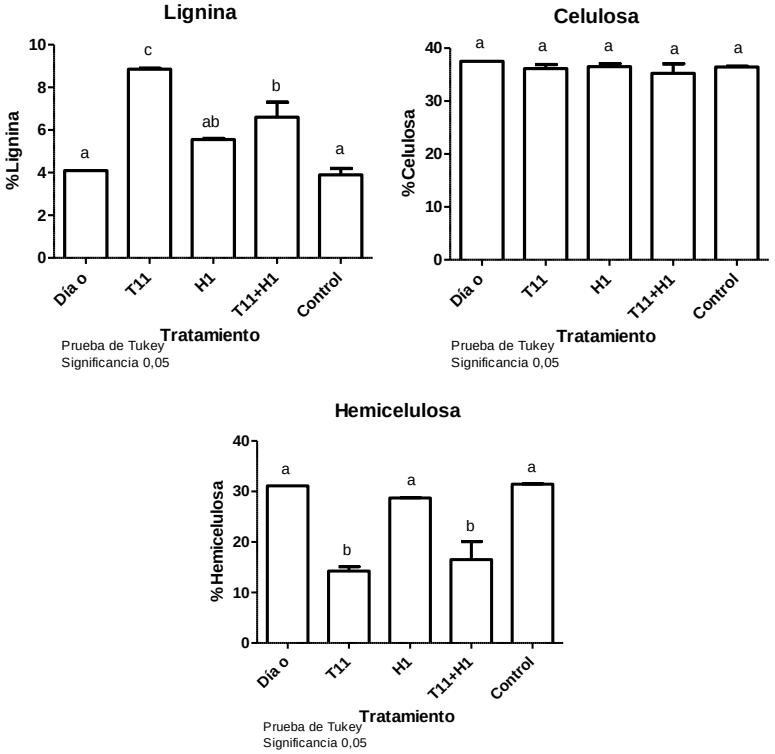


Fila 1. Control, Fila 2. Tratamiento con H1, Fila 3. Tratamiento con T1.1, Fila 4. Tratamiento con T1.1+H1

En la figura 5-2 se observa la microscopía electrónica realizada sobre el residuo para los tratamientos y el control abiótico. En el tratamiento inoculado con H1, se observa crecimiento micelial y presencia de conidios en el día 30 y en el día 50. No se observan cambios en el residuo durante los 50 días. En el tratamiento inoculado con T1.1, al día 30 se observa presencia abundante de micelio y adicionalmente en el día 50 se pueden observar cambios en el residuo. Finalmente con la inoculación de los dos microorganismos se observa una amplia colonización del aislamiento T1.1, y poco crecimiento del aislamiento H1 en el día 30, adicionalmente hay presencia de conidios en el día 30 y el día 50. Posiblemente este comportamiento puede darse por el método de inoculación de los microorganismos (siendo para el H1 10^6 conidios/ml y para el T1.1 10^6 UFC/ml), el cual permite un desarrollo micelial y colonización más rápida del T1.1.

Al finalizar los 50 días de tratamiento, el tamo de arroz se recolectó para el análisis del contenido de lignina, celulosa, y hemicelulosa de cada uno de los tratamientos, estos contenidos fueron determinados por la obtención de la FDN y la FDA.

Figura 5- 3: Determinación de lignina, celulosa y hemicelulosa



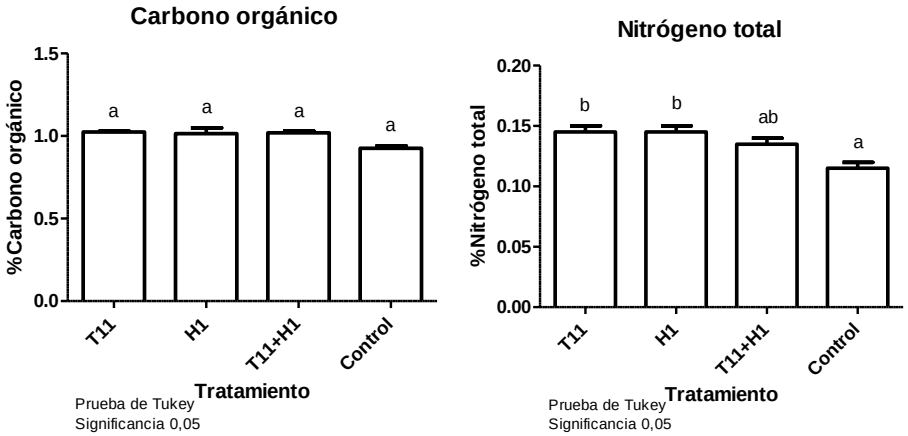
En la figura se observan los resultados obtenidos para el tamo sin tratar que corresponde al día 0 de inoculación, y los cuatro tratamientos en el día de finalización del ensayo (día 50).

En la figura 5-3, se muestran los resultados de los porcentajes obtenidos en el día inicial y el día 50 de los tratamientos. Como se puede observar, no se encontraron diferencias en el contenido de celulosa entre los tratamientos. Por otro lado, en cuanto al contenido de hemicelulosa, el control abiótico y el tratamiento con H1 no presentaron diferencias entre ellos. El tratamiento con el aislamiento T1.1 presentó la mayor disminución en el contenido de hemicelulosa, seguido por el aislamiento con T1.1+H1, estos dos

tratamientos, presentaron diferencias con respecto a los demás tratamientos. Referente al contenido de lignina, se observa un aumento en el contenido de los tratamientos inoculados con T1.1, H1, y T11+H1, este aumento porcentual en la lignina puede explicarse por la disminución en el contenido de hemicelulosa, ya que al disminuir este porcentaje el producto sólido se enriquece con los componentes menos metabolizados (lignina) (Rangel, 2012), adicionalmente este método presenta limitaciones que pueden llevar a sobreestimaciones o subestimaciones de los componentes del residuo (lignina, celulosa y hemicelulosa), principalmente cuando se han realizado tratamientos con microorganismos (Segura *et al*., 2007).

La evaluación realizada sobre el suelo no mostró cambios en el contenido de carbono orgánico presente en las muestras analizadas (figura 5-4), en cuanto al nitrógeno total, los tratamientos inoculados con H1, T11, y T11+H1, presentaron diferencia con el control abiótico, encontrando un mayor porcentaje de nitrógeno en el suelo con los tres tratamientos. El contenido de carbono orgánico y nitrógeno total en el suelo es un factor importante, ya que es un indicador del retorno de nutrientes en el suelo al degradarse el tamo de arroz (Garcés & Ospina, 2009). En campo, este retorno de nutrientes conlleva a una disminución en la fertilización aplicada para el crecimiento del cultivo, en este trabajo, se encontró aumento en el contenido de nitrógeno, lo que lo hace un resultado favorable como un indicio para el estudio en campo, y la posible degradación *in situ* de este residuo.

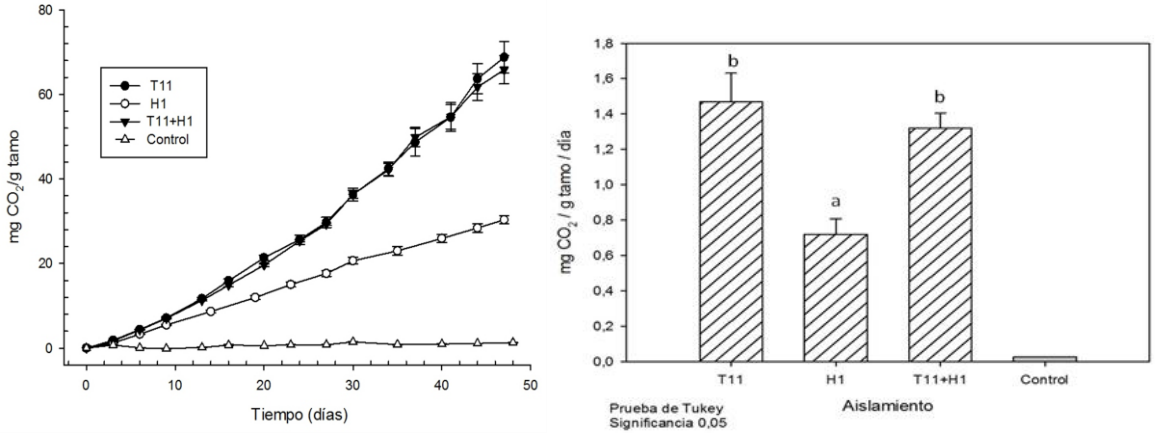
Figura 5- 4: Determinación de carbono orgánico y nitrógeno total en el suelo.



5.1 Prueba de respirometría

La prueba de respirometría en los ensayos de invernadero se implementó como método indirecto del crecimiento de la biomasa y el consumo del sustrato durante los 50 días del tratamiento, siendo el CO_2 una forma indirecta de medición de la capacidad de los aislamientos para usar el tamo como único sustrato presente en el medio.

Figura 5- 5: Resultados respirometría en invernadero



a. mg CO_2 producidos durante los 50 días de tratamiento, b. Velocidad de producción (mg CO_2 /g /día) obtenida a partir de las pendientes de la gráfica anterior.

La producción de CO_2 para el tratamiento con H1 fue de 30,34 mg CO_2/g tamo, para el T1.1 fue de 68,76 mg CO_2/g tamo y para el consorcio 61,87 mg CO_2/g tamo. En cuanto a la velocidad de producción de CO2 (Figura 5-5b) se observa que el tratamiento con menor velocidad fue el H1, mientras que los tratamientos T1.1 y el consorcio entre el T1.1 y H1 no presentaron diferencias entre ellos.

La prueba de respirometría en invernadero, presentó una disminución aproximada del 70% en la producción de CO_2 al comparar con la prueba realizada en el objetivo 1, esto puede deberse probablemente a que el residuo utilizado para este objetivo es de mayor tamaño y así mismo la cantidad del residuo y el tamaño del recipiente utilizado fue diferente, por lo tanto las enzimas producidas por el microorganismo para la degradación del residuo pueden variar. Membrillo *et al*., 2008, evaluaron diferentes tamaños de partículas en bagazo de caña encontrando que la actividad enzimática se ve afectada por el tamaño de la partícula. Sin embargo, la tendencia observada entre el H1 y el T1.1 en las dos pruebas fue similar, teniendo una mayor producción el aislamiento T1.1 comparado con el H1. En el tratamiento donde se evaluaron los dos microorganismos, no se encontraron diferencias con el tratamiento T1.1, lo que indica que no se incrementó el consumo del sustrato al utilizar estos dos microorganismos como consorcio, lo que concuerda con las observaciones macroscópicas y microscópicas en este tratamiento.

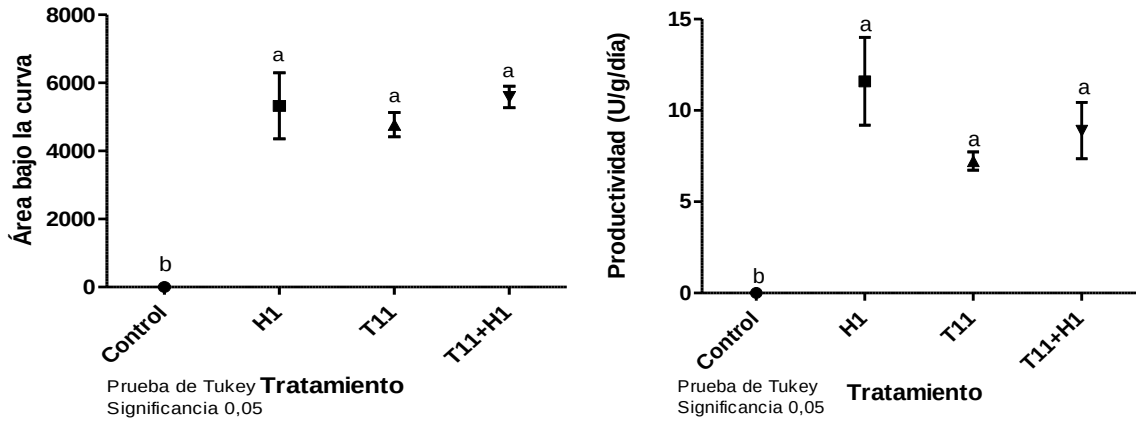
5.2 Actividad enzimática

Para la actividad enzimática en los ensayos de invernadero, cada 8 días se obtuvo un extracto enzimático de cada uno de los tratamientos y se realizaron las lecturas para exoglucanasa, endoglucanasa, β-glucosidasa, xilanasas, lacasa, y manganeso peroxidasa en cada uno de los tratamientos. Se halló el área bajo la curva para cada una de las actividades enzimáticas a partir de las cinéticas obtenidas (Anexo H).

La actividad exoglucanasa no presentó diferencias entre los tratamientos H1, T1.1, y consorcio, al evaluar la actividad enzimática durante todo el tiempo de tratamiento (Figura 5-6), siendo el consorcio el que presentó la mayor actividad con 356,52 U/g en el día 49, seguido por el T1.1 con 263,64,27 U/g en el día 49, y finalmente el H1 con 259,43

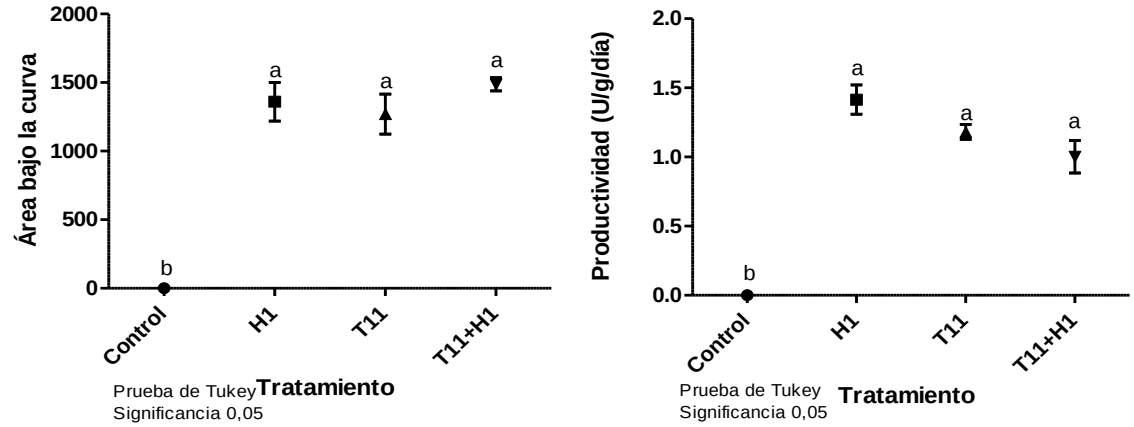
U/g en el día 21 (Anexo H), sin embargo al evaluar la productividad, los aislamientos tampoco presentaron diferencias entre ellos (Figura 5-6), al observar la gráfica de la cinética, se observa una actividad enzimática con varios picos durante los 50 días en todos los tratamientos, por esta razón no hay diferencias al evaluar el área bajo la curva.

Figura 5- 6: Actividad Exo-1,4-β-glucanasa en invernadero



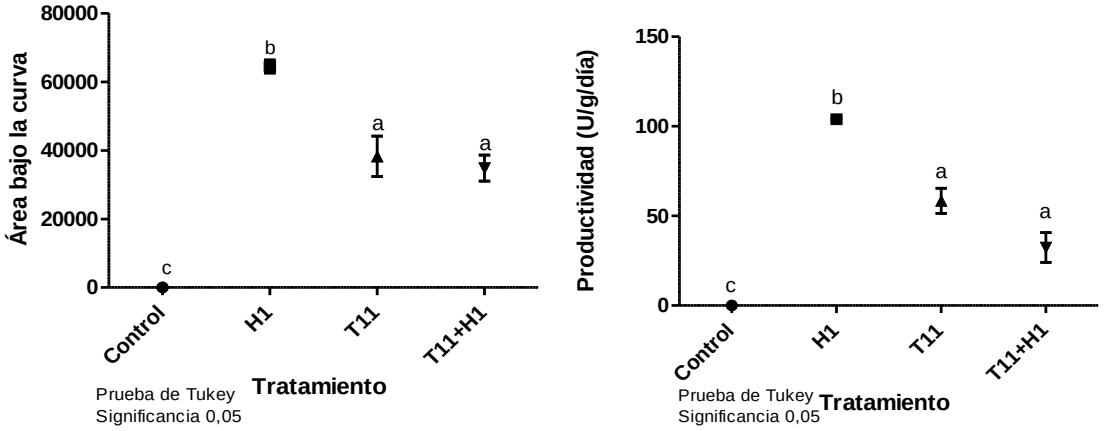
La actividad endoglucanasa no presentó diferencias entre los tratamientos H1, T1.1 y el consorcio como se observa en la figura 5-7, la actividad endoglucanasa más alta se presentó en el consorcio con 55,09 U/g de extracto enzimático en el día 49, seguido por el T1.1 con 50,07 U/g en el día 49, y por último el H1 con 49,51 U/g en el día 35 (Anexo H). al evaluar la productividad, no se presentaron diferencias entre los tratamientos.

Figura 5- 7: Actividad Endo-1,4-β-glucanasa en invernadero



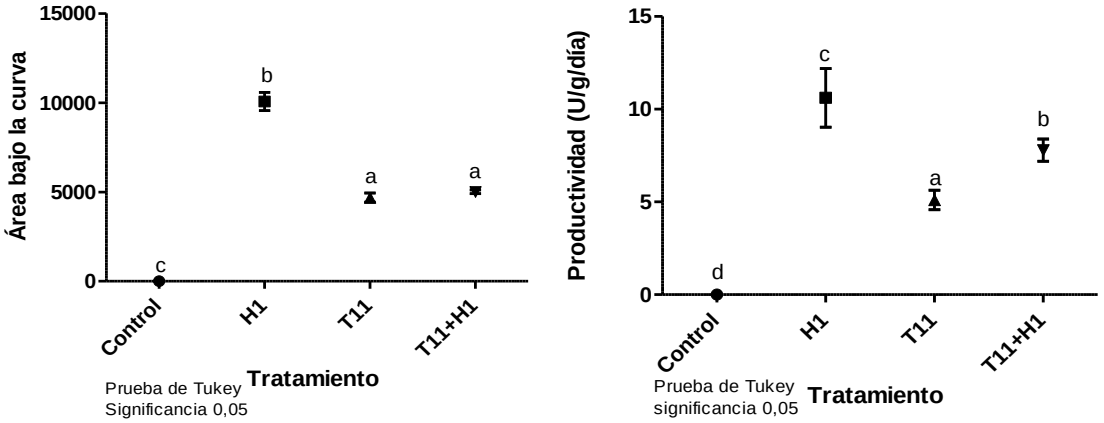
La actividad β-glucosidasa presentó diferencias entre los tratamientos durante los 50 días de evaluación, como se observa en la figura 5-8, el área bajo la curva presentada por el tratamiento con H1 fue más grande que con los demás tratamientos, los tratamientos T1.1 y consorcio no presentaron diferencias. La actividad más alta fue 3834,95 U/g para el aislamiento H1 en el día 35, seguido por el aislamiento T11 con 3110,22 U/g en el día 49, y finalmente en consorcio con 1833,33 U/g en el día 49 (Anexo H). Al evaluar la productividad, se observa la misma tendencia anterior, lo cual concuerda con la cinética donde el tratamiento con H1 sobresale en comparación con los otros tratamientos.

Figura 5- 8: Actividad 1,4-β-glucosidasa en invernadero



La actividad xilanasa presentó diferencias entre los tratamientos, como se muestra en la figura 5-9, el tratamiento con el aislamiento H1 presentó la mayor actividad xilanasa, y los tratamientos T1.1 y el consorcio no presentaron diferencias entre ellos en cuanto el área bajo la curva obtenida. La actividad xilanasa más alta fue 371,41 U/g de extracto enzimático en el día 35 con el aislamiento H1, seguido por 267,03 U/g en el día 49 con el consorcio y finalmente 177,72 U/g en el día 21 para el T11. Al analizar la productividad, se observan diferencias entre todos los tratamientos, teniendo la productividad más alta el tratamiento con H1 y la más baja en tratamiento con T1.1. Al observar la cinética, se observa aumento de la actividad enzimática en el tratamiento con H1 y a partir del día 35 comienza a disminuir, por otro lado, el tratamiento T1.1 presenta un crecimiento de la actividad más lento durante todo el tratamiento. El consorcio presenta el mismo comportamiento del aislamiento H1 hasta el día 27, a partir de este la actividad decrece y vuelve a aumentar para el día 50 (Anexo H).

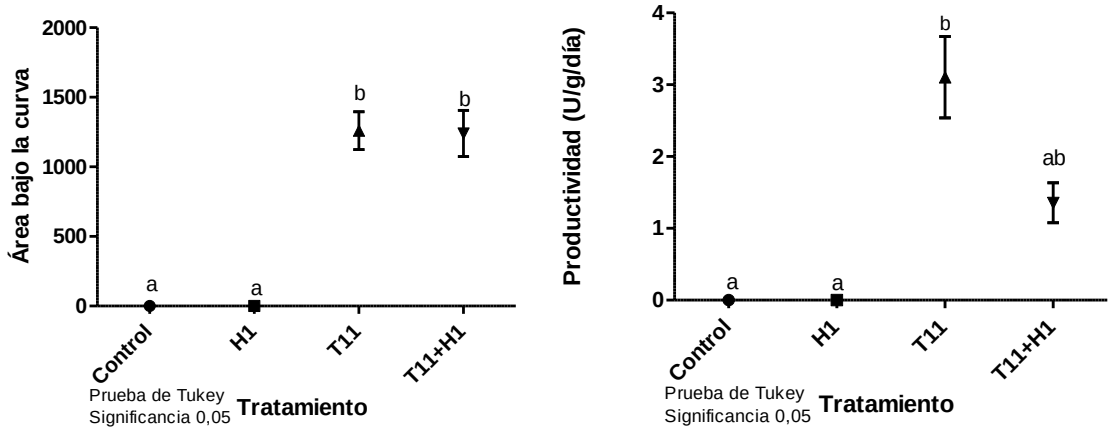
Figura 5- 9: Actividad Xilanasa en invernadero



La actividad Lacasa, se presentó únicamente en los tratamientos inoculados con T1.1 y T1.1+H1. Durante el tiempo de evaluación no se presentaron diferencias entre estos dos tratamientos en cuanto al área bajo la curva, al determinar la productividad, tampoco se presentaron diferencias (Figura 5-10). La actividad máxima presentada por el tratamiento con T1.1 fue en el día 14 (Anexo H), al observar el día 21, se presenta un decrecimiento

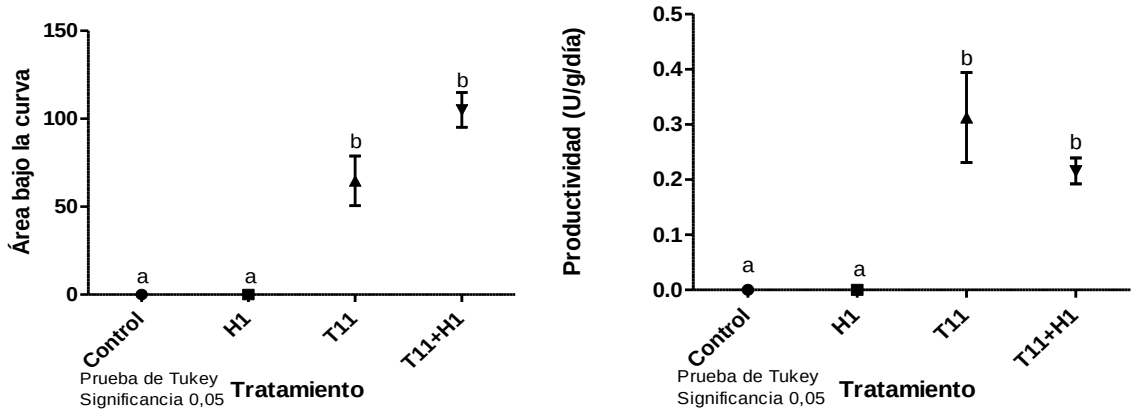
de la actividad, a partir de este día y hasta el día 35, la actividad se mantiene constante. En cuanto al tratamiento con el T1.1+H1, se observa un aumento constante de la actividad desde el día 7 hasta el día 42, donde presenta su máximo pico de actividad (Anexo H).

Figura 5- 10: Actividad Lacasa en invernadero



La actividad manganeso peroxidasa se observó únicamente en los tratamientos inoculados con T1.1 y T1.1+H1. En la figura 5-11 se observa que estos dos tratamientos no presentaron diferencias en la actividad enzimática durante el tratamiento, adicionalmente al determinar la productividad, tampoco se evidenciaron diferencias. Como se observa en el anexo H, ninguno de los tratamientos presentó actividad durante todo el tiempo de evaluación, en el aislamiento T1.1 se detectó actividad entre los días 7 a 28 siendo este último día el que presentó la máxima actividad. Por otro lado el tratamiento con los dos microorganismos, presento actividad entre los días 28 a 42, siendo este último el que presentó la máxima actividad.

Figura 5- 11: actividad Manganeso peroxidasa en invernadero



Como se puede observar en los resultados anteriores, no se encontraron diferencias con las actividades endoglucanasa y exoglucanasa entre los tratamientos. En cuanto a las actividades β-glucosidasa y xilanasa los tratamientos con T11 y T11+H1 no presentaron diferencias entre ellos, el aislamiento H1 presentó diferencias respecto a los otros dos tratamientos. En cuanto a la actividad ligninolítica, la producción de Lacasa y Manganeso peroxidasa no se detectó en el tratamiento con el aislamiento H1, lo cual está de acuerdo

con la literatura ya que el género *Penicillium* está reportado como celulolítico y xilanolítico y no es capaz de generar este tipo de enzimas (Chávez, *et al.*, 2006; Marjamaa *et al*., 2013), la poca actividad manganeso peroxidasa encontrada puede deberse a la presencia de manganeso en el medio, ya que este no fue adicionado, y tampoco se realizó una determinación del contenido de manganeso en el montaje.

Los resultados obtenidos de las actividades enzimáticas, son congruentes con los resultados en la prueba de respirometría mostrada en el númeral 5.1, los resultados obtenidos en la evaluación de la degradación de los residuos, y las observaciones microscópicas y macroscópicas mostradas en el inicio del capítulo, donde se presentaron pocas diferencias entre el tratamiento con T1.1 y el tratamiento con T1.1+H1, observando poco crecimiento del H1 en el tratamiento del consorcio. En la literatura, por el contrario, los estudios realizados utilizando co-cultivos o consorcios microbianos para mejorar la actividad ligninocelulolítica han tenido resultados favorables, en un estudio realizado por Dwivedi, *et al*., 2011, la fermentación sólida con *Penicillium oxalicum* y *Pleurotus ostreatus* aumentaba el rendimiento de la actividad enzimática en comparación con los microorganismos individualmente. Los resultados de este trabajo indican que posiblemente el crecimiento del aislamiento T1.1 está inhibiendo el crecimiento del H1, esto puede deberse a que la velocidad de crecimiento del T1.1 es mayor que la del H1 (numeral 5.1), lo que puede generar un efecto negativo, cabe recordar que el tiempo de inoculación entre los dos microorganismos fue el mismo y el tipo de inóculo fue diferente, por lo tanto, el ensayo podría establecerse estandarizando la inoculación del H1 antes que el T1.1, de esta forma se le da ventaja para que se genere la germinación de los conidios, otra opción puede ser aumentar la concentración o el tamaño del inóculo en el aislamiento H1, de esta forma va a tener una ventaja sobre el T1.1 y no se va a presentar la inhibición.

5.3 Conclusión tercer objetivo

Los resultados obtenidos en los ensayos de invernadero indican que los aislamientos H1 y T1.1 tienen la capacidad de crecer sobre tamo de arroz como única fuente de nutrientes, adicionalmente en todos los tratamientos evaluados se observó disminución en el contenido de hemicelulosa en el residuo, así como actividad enzimática celulolítica y lignolítica, siendo estos, indicadores importantes en la degradación de tamo de arroz. No se encontraron diferencias entre el tratamiento con T1.1 y el tratamiento con la inoculación de los dos microorganismos T1.1 + H1 durante el tiempo de evaluación, por lo que es necesario estudiar el tiempo y tamaño del inoculo y el tipo de inoculación para este aislamiento y poder determinar si pueden encontrarse diferencias entre estos dos tratamientos, cambiando estas condiciones.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

Con el fin de obtener un producto para la degradación de tamo de arroz en campo, el grupo de investigación de bioprocesos y bioprospección, seleccionó 8 aislamientos con actividad celulolítica y/o ligninolítica, los cuales fueron evaluados en este trabajo. De estos aislamientos iniciales (correspondientes a *Paecilomyces lilacinus*, *Trichoderma ghanense., Streptomyces* sp., *Pleurotus ostreatus*, y cuatro especies del género *Penicillium*), se escogieron tres aislamientos H1, T1.1, 7.1, los cuales presentaron los mejores resultados en medio CMC y la prueba de respirometría. En la evaluación de la actividad enzimática utilizando diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, se encontró que el aislamiento 7.1 tiene una mayor actividad celulolítica y xilanolítica cuando la fuente de carbono utilizada es tamo de arroz y la fuente de nitrógeno es inorgánica, por otro lado no se encontró relación entre las fuentes de carbono y las fuentes de nitrógeno en la inducción de la actividad celulolítica para el aislamiento T1.1, ya que se encontró que diferentes fuentes de carbono y diferentes fuentes de nitrógeno inducían diferentes enzimas. Como resultado de la evaluación de este objetivo, y teniendo en cuenta que la actividad enzimática del H1 evaluada por Sánchez, 2013, se seleccionaron el aislamiento H1 como celulolítico y el aislamiento T1.1 como ligninolítico para la evaluación de la capacidad de degradación de tamo de arroz en invernadero. Los dos aislamientos seleccionados tienen la capacidad de degradar tamo de arroz en condiciones de invernadero evidenciada indirectamente por la prueba de respirometría, observaciones microscópicas y la actividad enzimática obtenidos durante el tiempo de evaluación, lo que hace estos dos microorganismos potenciales para su aplicación en campo. En este trabajo no se encontraron diferencias entre la inoculación del T1.1 o la inoculación del T1.1 y el H1 en cuanto a crecimiento sobre el residuo, respitometría y actividad enzimática, sin embargo al ser el T1.1 (*Pleurotus ostreatus*) un microorganismo ligninolítico y el H1 (*Penicillium* sp.) un microorganismo celulolítico, es necesario revisar el tiempo y forma de inoculación para el establecimiento del tratamiento con los dos microorganismos y así poder establecer si el cambio de estas condiciones puede generar una mayor degradación.

6.2 Recomendaciones

A pesar de que se observó un resultado positivo con los microorganismos seleccionados para la degradación de tamo de arroz, es necesario aumentar el tiempo de la evaluación en invernadero para ver el comportamiento de la actividad enzimática y la degradación del residuo, así como estandarizar el tiempo y concentración de inoculación entre los

microorganismos para establecer o no diferencias entre la inoculación de estos microorganismos solos o como consorcio.

Teniendo en cuenta que todos los ensayos realizados se evaluaron en condiciones estériles, es necesario realizar pruebas en condiciones no estériles ya que la influencia de otros microorganismos puede afectar la actividad enzimática y por ende la degradación del residuo.

Es necesario el uso de técnicas diferentes a las utilizadas en este trabajo para la determinación de celulosa, hemicelulosa y lignina en el residuo.

A. Anexo: Medios de cultivo

Medio Carboximetil celulosa	
Componentes	**Cantidades %**
$NaNO_3$	0,2
K_2HPO_4	0,1
$MgSO_4$	0,05
KCL	0,05
CMC	0,2
Peptona	0,02
Agar	1,7

Medio de Mandels y weber	
Componentes	**Cantidades L^{-1}**
KH_2PO_4	2,0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,83 g
$CaCl_2$	0,3 g
Elementos traza:	
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,005 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	1,56 mg
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1,4 mg
$CoCl_2$	0,02 g
Surfactante	
Tween 80	0,2 ml

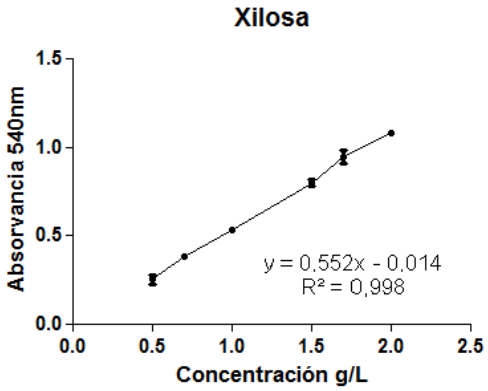
Medio Lignina	
Componentes	**Cantidades $g.L^{-1}$**
KH_2PO_4	0,5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2
NH_4NO_3	0,1
KCl	0,1
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,02

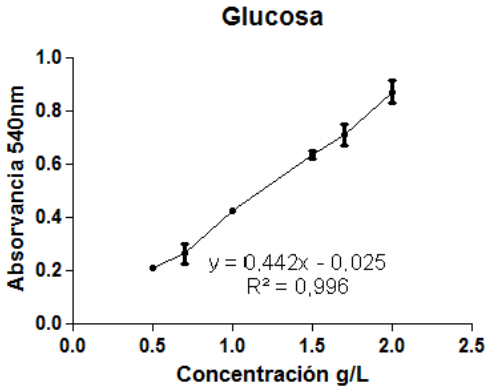
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	0,05
Extracto de malta	2
Lignina alcalina	1
Guayacol*	0,4 ml
Dioxano	10 ml
Agar	13
*se agrega después de esterilizar el medio	

B. Anexo: Curvas de calibración actividad enzimática

Curva DNS

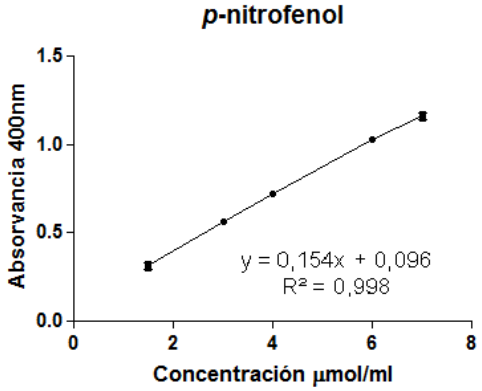
La curva de DNS se realizó preparando una concentración de 2g/L de glucosa o xilosa.





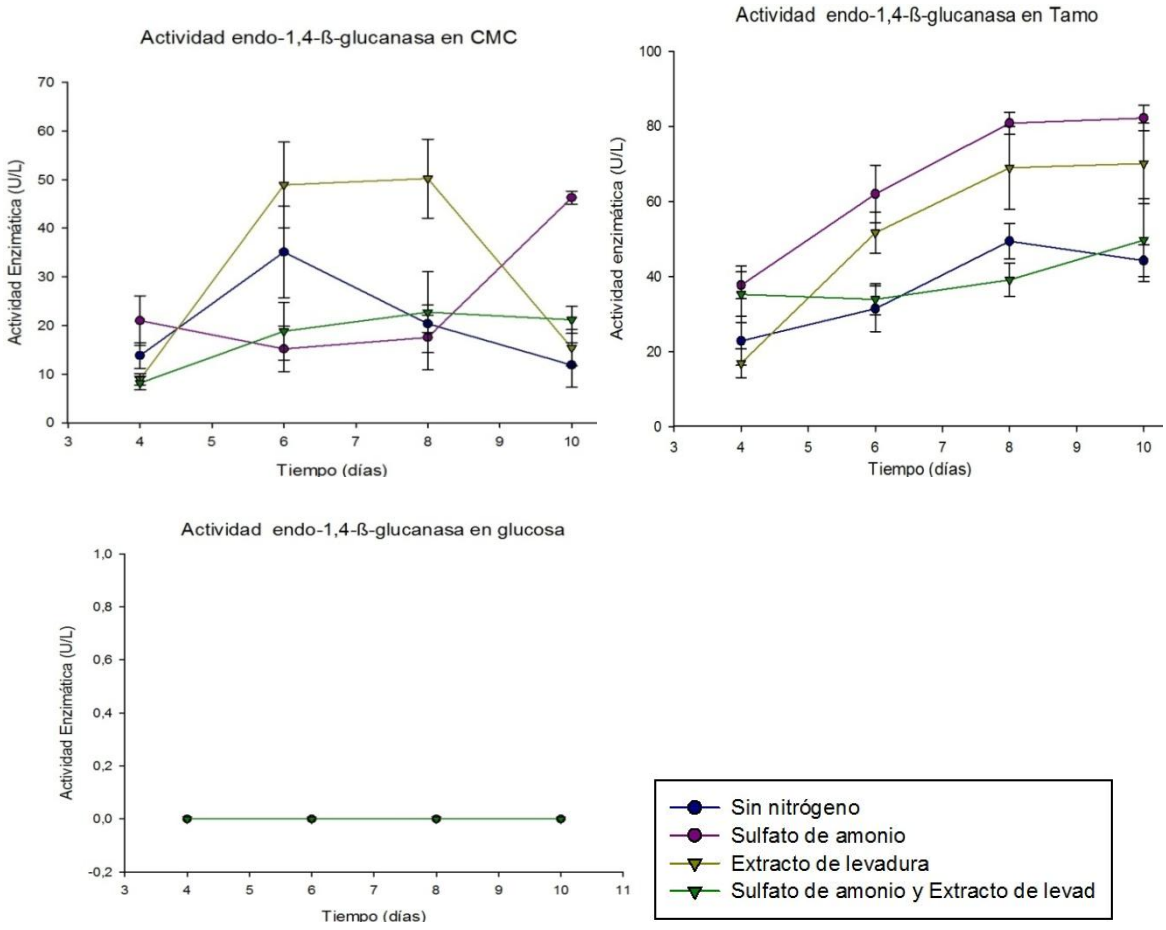
Curva de *p*-nitrofenol

La curva de p-nitrofenol se realizó preparando una concentración de 20µmol/ml

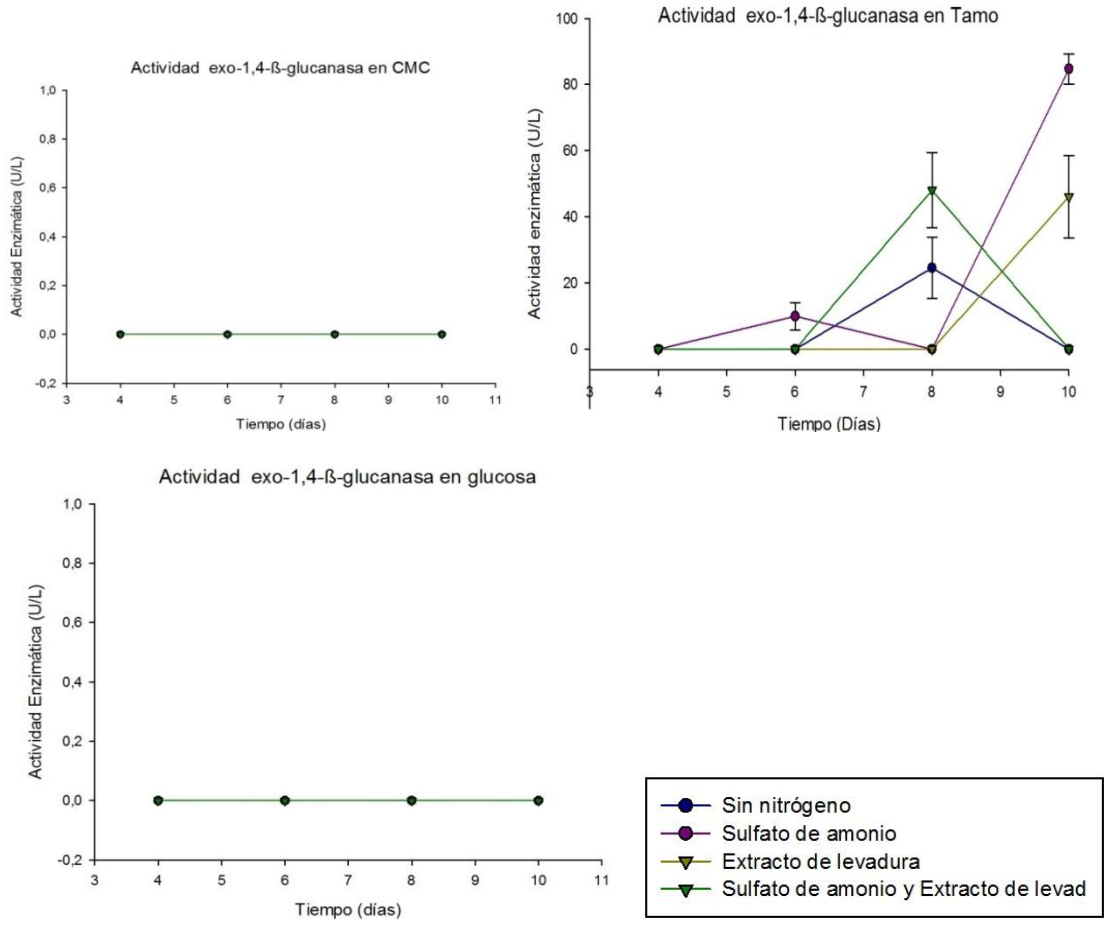


C. Anexo: Gráficas actividad celulasa 7.1

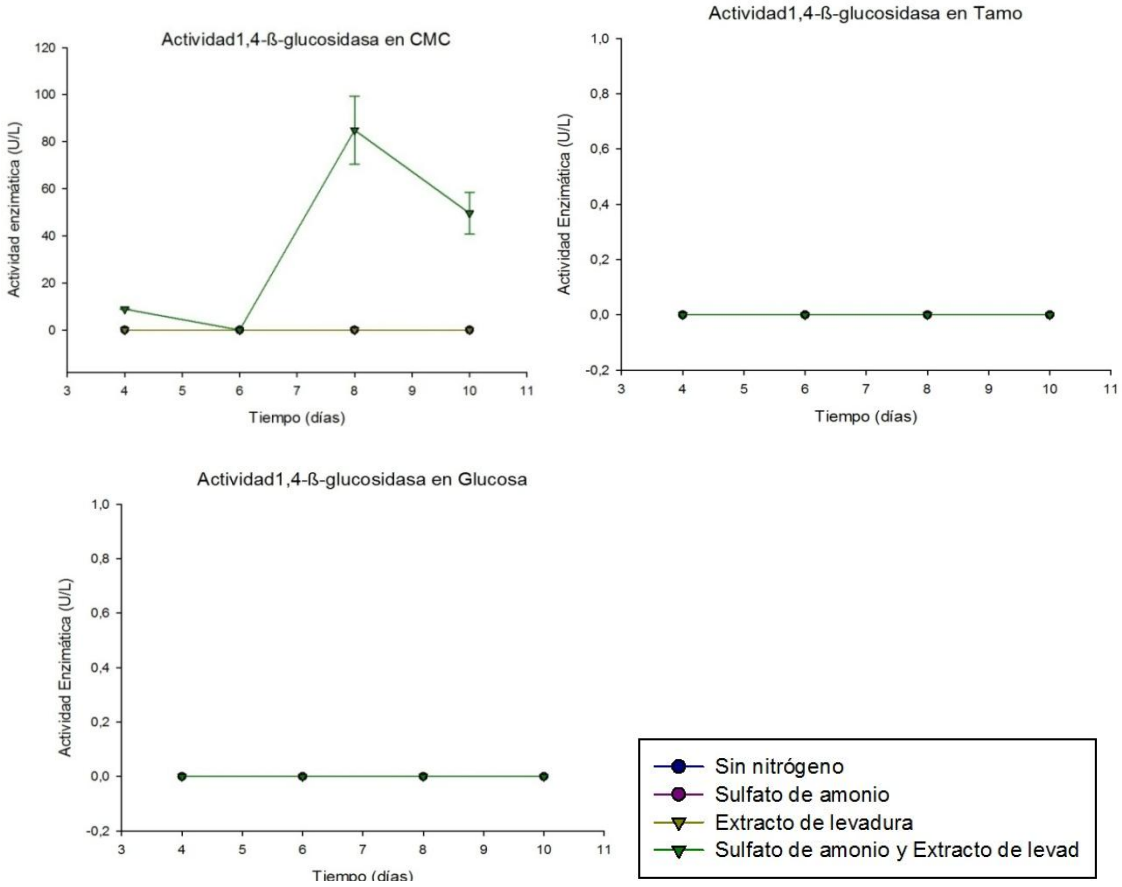
Actividad endo-1,4-β-glucanasa



Actividad exo-1,4-β-glucanasa

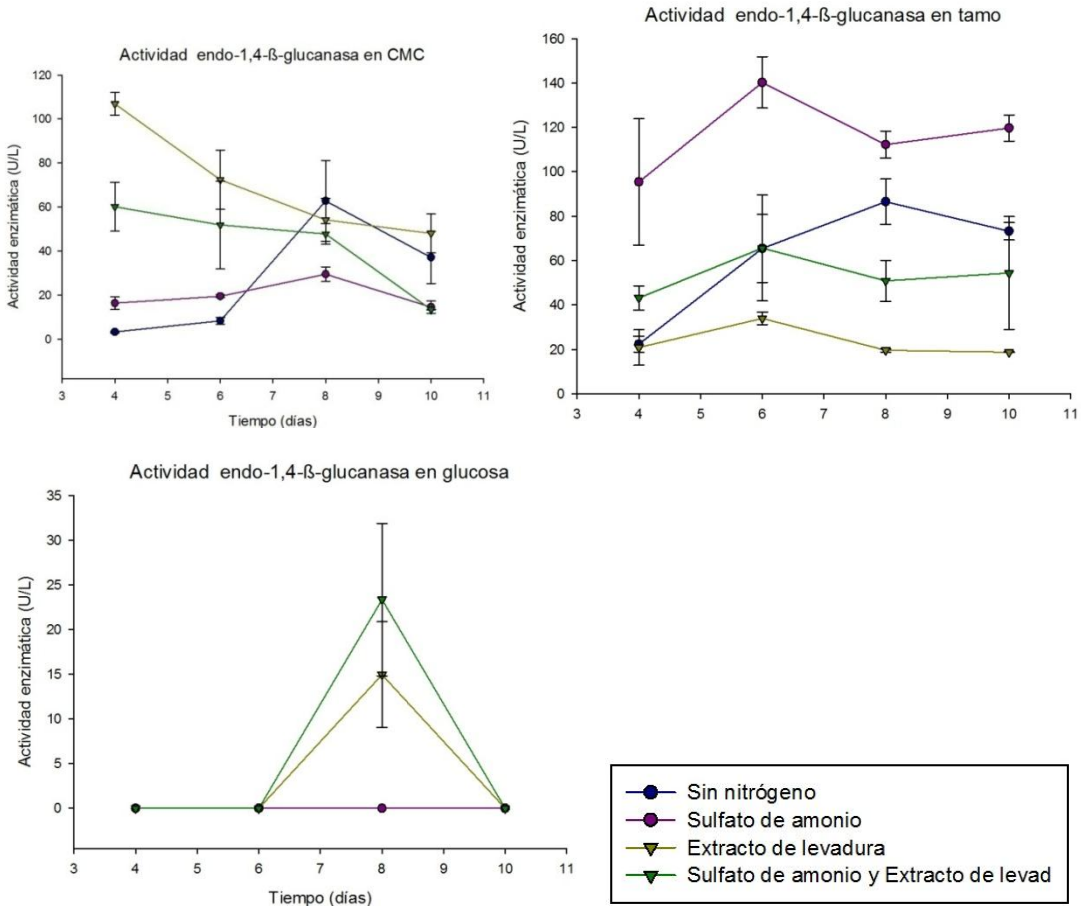


Actividad 1,4-β-glucosidasa

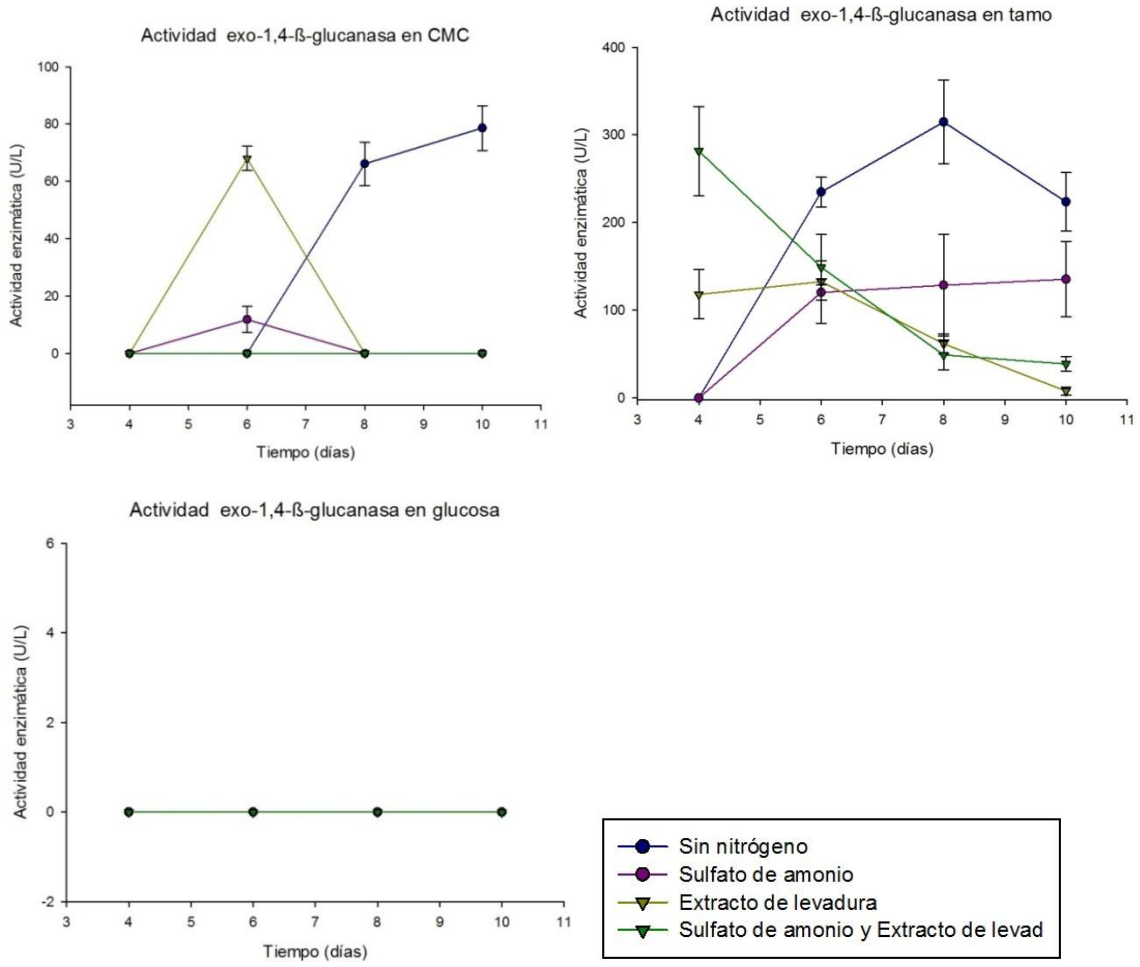


D. Anexo: Gráficas actividad celulasa T1.1

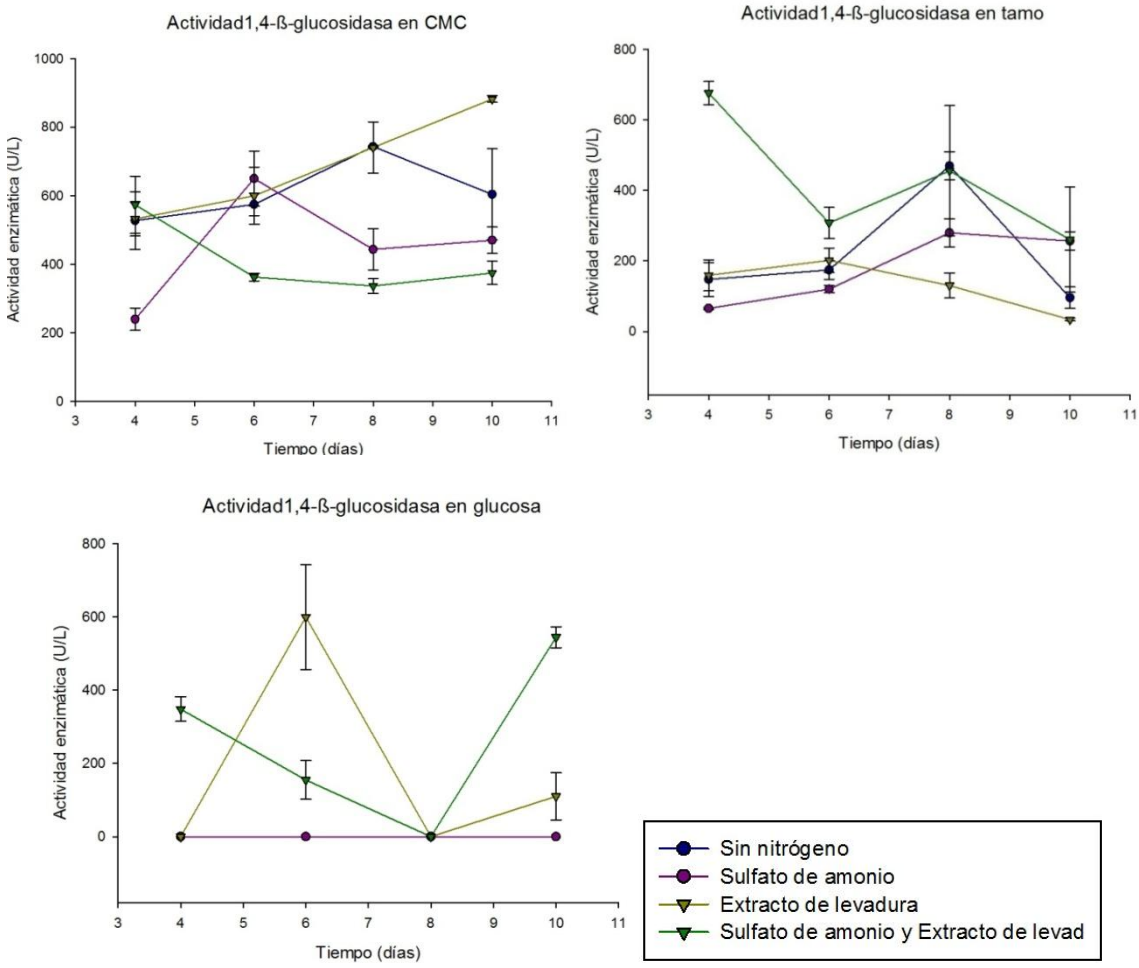
Actividad endo-1,4-β-glucanasa



Actividad exo-1,4-β-glucanasa

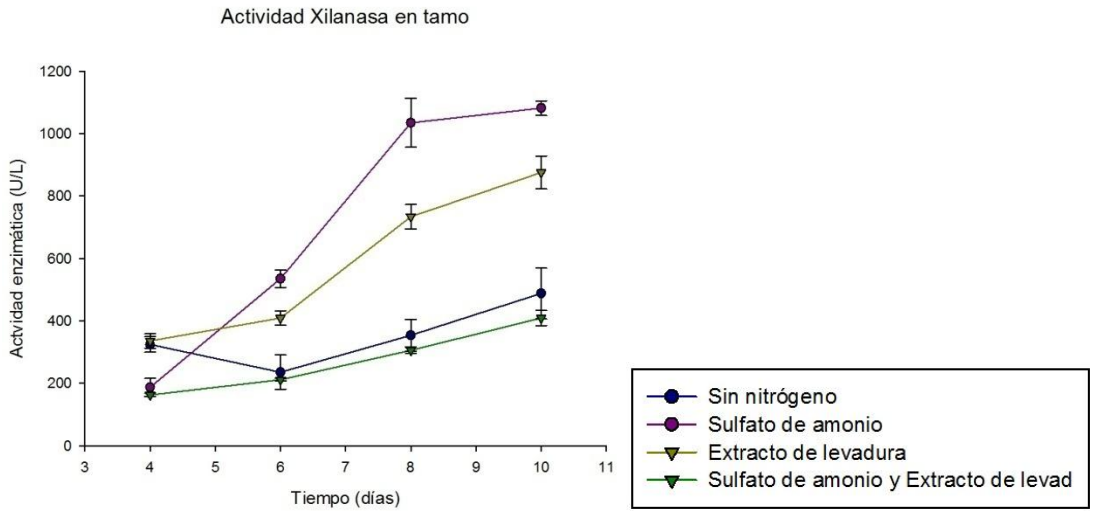


Actividad 1,4-β-glucosidasa

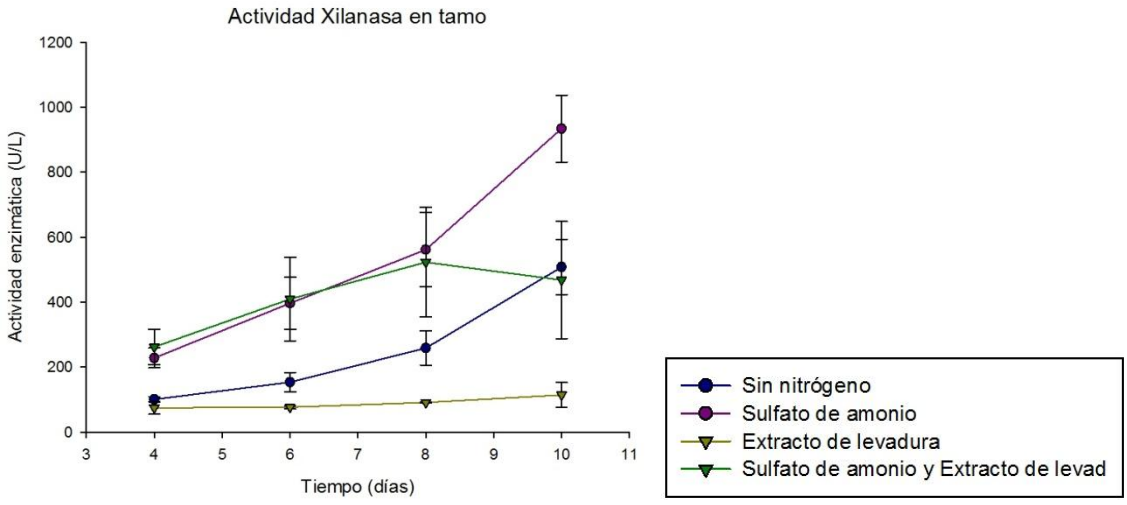


E. Anexo: Gráficas actividad xilanasa

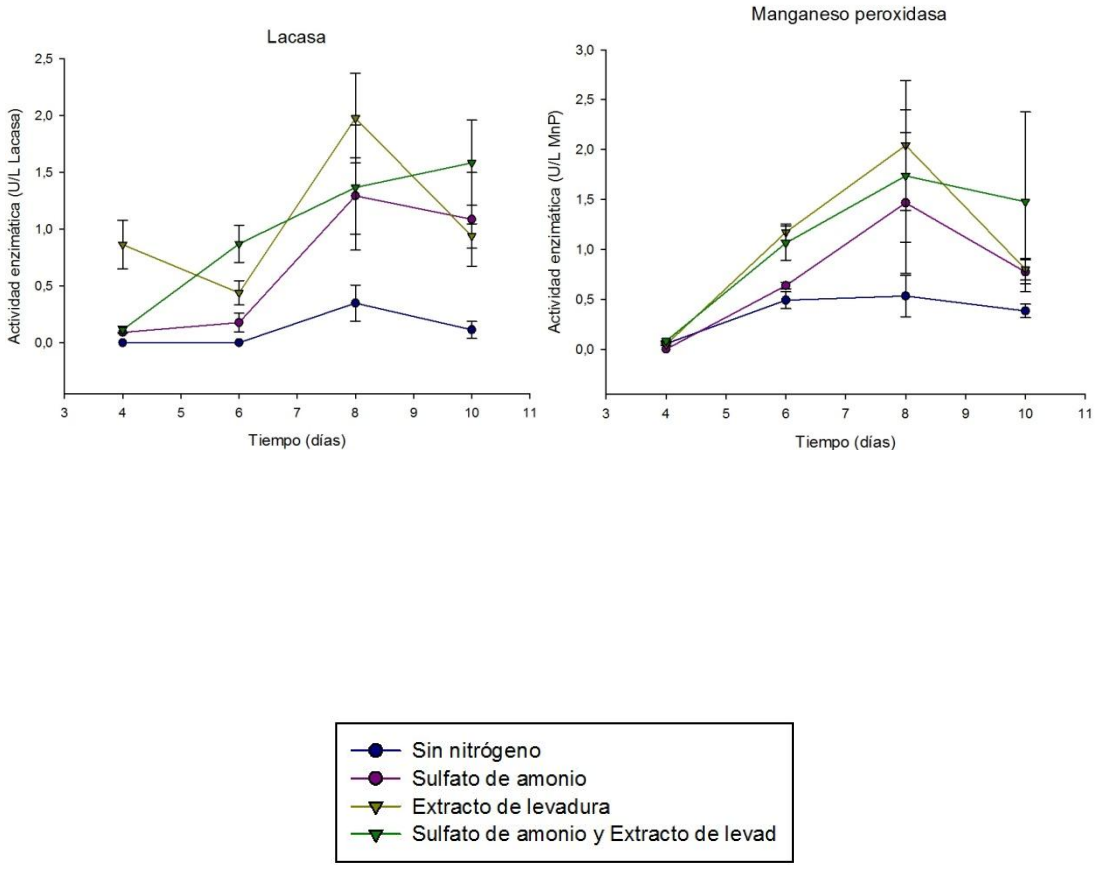
Actividad xilanasa 7.1



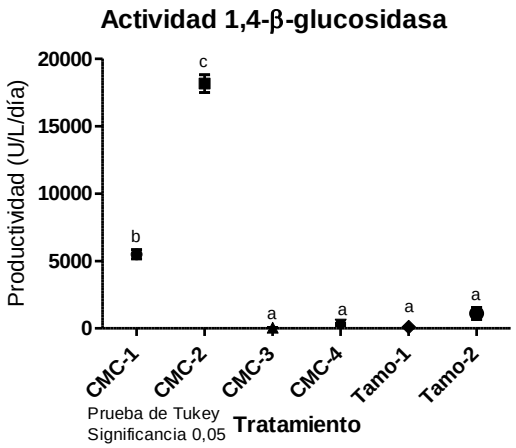
Actividad xilanasa T1.1

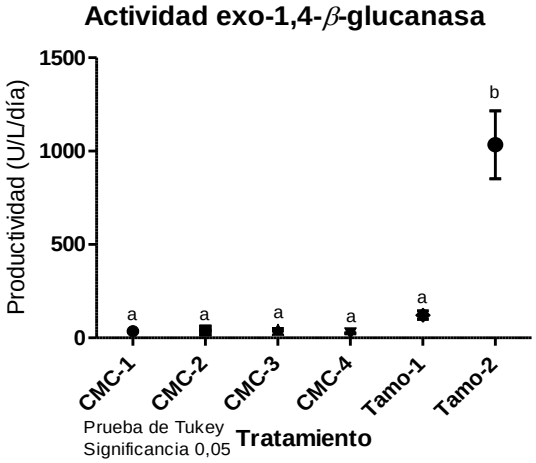


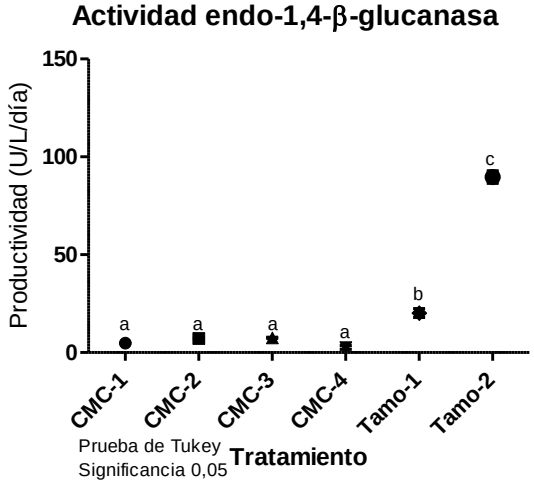
F. Anexo: Gráficas actividad de ligninasa



G. Anexo: Productividad de la actividad celulolítica en *Penicillium* sp. H1



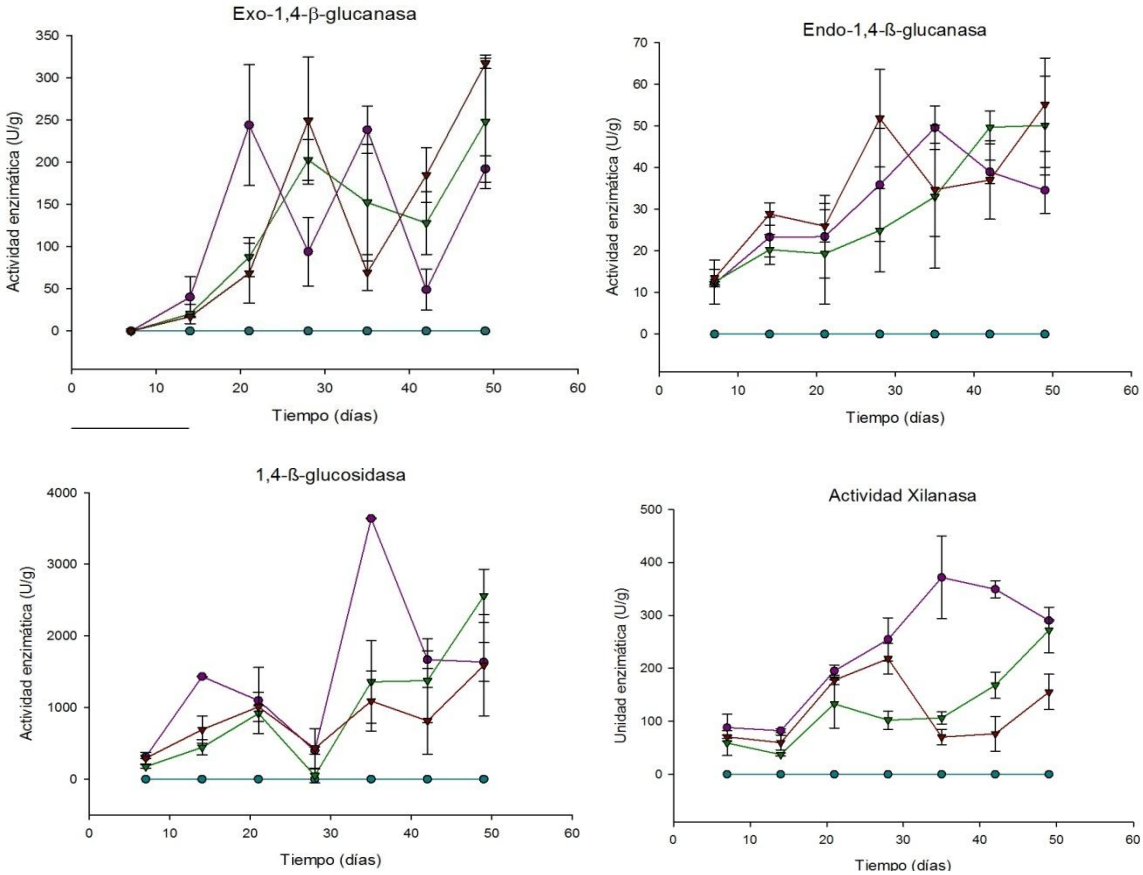


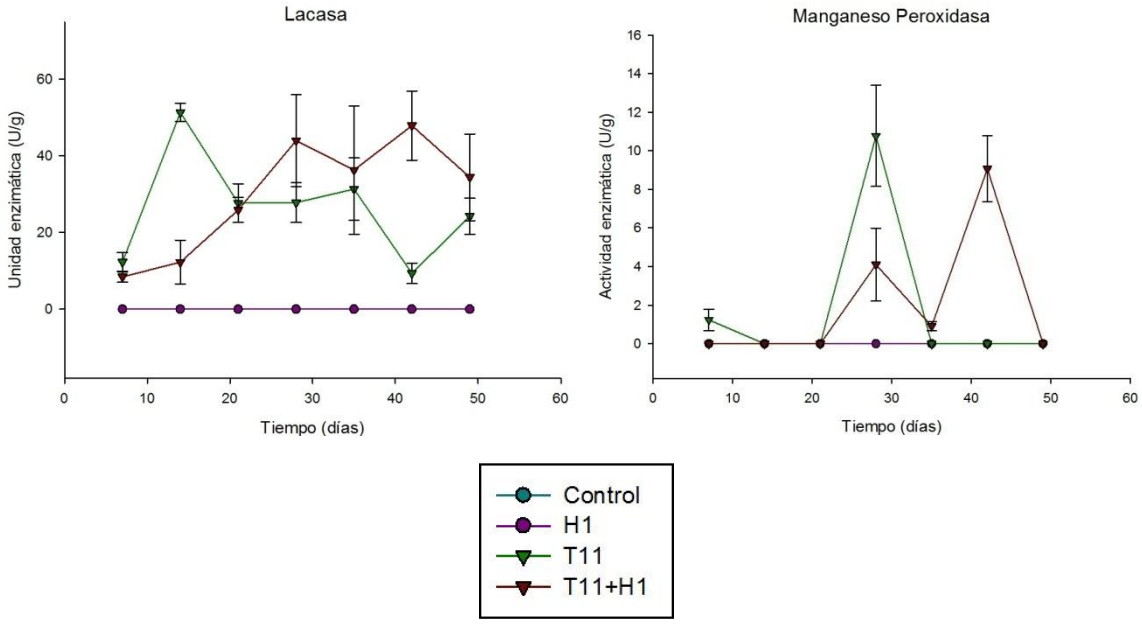


Tratamiento	Fuente de nitrógeno
1	Sin fuente
2	Inorgánica
3	Orgánica
4	Mezcla

Resultados obtenidos por Sánchez, 2013.

H. Anexo: Actividad enzimática invernadero




Lacasa
Unidad enzimática (U/g)
Tiempo (días)
Manganeso Peroxidasa
Actividad enzimática (U/g)
Tiempo (días)
Control
H1
T11
T11+H1

Bibliografía

Abdulla, H. M. & El-Shatoury, S. A. (2007). Actinomycetes in rice Straw decomposition. *Waste management*. 27, 850-853.

Abril, D., Navarro, E. & Abril, A. (2009). La paja de arroz. Consecuencias de su manejo y alternativas de aprovechamiento. *Agronomía*. 17 (2), 69-79.

Aro, N., Pakula, T. & Penttila, M. (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology reviews*. 29, 719-739.

Bettin, F., Montanari, Q., Calloni, R., Gaio, T., Silveira, M. & Dillon, A. (2009). Production of laccases in submerged process by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 in relation to carbon and organic nitrogen sources, antifoams and tween 80. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 36, 1-9.

Brijwani, K., Oberoi, H., Vadlani, P. (2010). Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochemistry.*45, 120–128.

Buranov, A. & Mazza, G. (2008). Lignin in straw of herbaceous crops*. Industrial crops* and products.28, 237-259.

Castilla, L. A. (2013). Manejo productivo de residuos de la cosecha de arroz. *Arroz*. 60,10-17

Chang, K., Thitikorn, J., Hsieh, J., Ou, B., Chen, S., Ratanakhanokchai, K., Huang, P. & Chen, S. (2011). Enhanced enzymatic conversion with freeze pretreatment of rice straw. *Biomass and Bioenergy*.35, 90-95.

Chater, K. F., Biró, S., Lee, K. J., Palmer, T. & Schrempf, H. (2010). The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Reviews*. 34, 171-198.

Chaudhary, R.C., Nanda, J.S. & Tran, D. V. (2003). Problemas y limitaciones en la producción de arroz. En Guía para identificar las limitaciones de campo en la producción de arroz, pp. 19-31. Roma: Organización para las naciones unidas para la alimentación y la agricultura FAO.

Chávez, R., Bull, P. & Eyzaguirre, J. (2006). The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium. Journal of Biotechnology.*123, 413–433.

Chellapandi, P. & Jani, H. (2008). Production of endoglucanase by the native strains of *Streptomyces* isolates in submerged fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 39, 122-127.

Chen, X., Yu, J., Zhang, Z. & Lu, C. (2011). Study on structure and thermal stability properties of cellulose fibers from rice straw. *Carbohidrate Polymers*. 85, 245-250.

Critter, S., Freitas, S., Airoldi, C. (2004). Comparison of microbial activity in some Brazilian soils by microcalorimetric and respirometric methods. *Thermochimica* acta. 410, 35–46.

Cuevas, A. (2010). Transformadores del tamo del arroz y el aporte de materia orgánica para el suelo. *Arroz*. 486(58), 26-34.

Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T. & Qin, W. (2010).Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* .1(1), 36-50.

Deng, W., Jiang, Z. Q., Li, L. T., Wei, Y.,Shi, B. & Kusakabe, I. (2005). Variaton of xylanosomal subunit composition of *Strptomyces olivaceoviridis* by nitrogen sources. *Biotechnology letters*. 27, 429-433.

Departamento administrativo nacional de estadística DANE. Boletín de prensa, encuesta Nacional de arroz mecanizado; 2013 [20/11/2013]; Disponible en: http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/boletines/arroz/bol_arroz_Isem13.pdf

Dwivedi, P., Vivekanand, V., Pareek, N., Sharma, A. & Singh, R. (2011). Co-cultivation of mutant *Penicillium oxalicum* SAU_E-3.510 and *Pleurotus ostreatus* for simultaneous biosynthesis of xylanase and laccase under solid-state fermentation. *New Biotechnology*. 28 (6), 616-126.

Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., Khardziani, T. & Agathos, S. (2009). Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forest of Georgia. *World journal of microbiology and biotechnology*. 25, 331-339.

Elisashvili, V., Penninckx, M., Kachlishvili, E., Asatiani, M., K vesitadze, G. (2006). Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. *Enzyme and Microbial Technology.* 38, 998–1004.

Elisashvili, V., Penninckx, M., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., Kharziani, T. & Kvesitadze, G. (2008). *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresource Technology*. 99, 457-462.

El-Sersy, N. A., Abd-Elnaby, H., Abou-Elela, G. M., Ibrahim, H., El-Toukhy, N. M. K. (2010). Optimization, economization and characterization of cellulase produced by marine *Streptomyces ruber. African Journal of Biotechnology*. 9(38), 6355-6364.

Federación nacional de arroceros Fedearroz (2010). Propuesta de política arrocera 2010-2014. Congreso extraordinario nacional arrocero. *Arroz*. 488(58), 25-32.

Federación nacional de arroceros Fedearroz. Historia del arroz; 2012 [20/09/2012]; Disponible en: http://www.fedearroz.com.co/new/historiaarroz.php

Franquet, J. (2004). Algunas ideas previas. En variedades y mejora del arroz (*Oryza sativa*), pp. 7-58. España: Universidad Internacional de Cataluña y Asociación de ingenieros agrónomos de Cataluña.

Garcés, G. & Ospina, J. (2009). Estrategias para el aprovechamiento de los residuos de cosecha del arroz. *Boletín informativo de la federación nacional de arroceros*. 217, 4-5.

Goldbeck, R., Ramos, M. M., Pereira, G. A. & Maugeri-Filho, F. (2013). Cellulase production from a new strain *Acremonium strictum* isolated from the Brazilian Biome using different substrates. *Bioresource technology*. 128, 797-803.

Goyal, S., Singh, D., Suneja, S. & Kapoor, K. (2009). Effect of rice straw compost on soil microbiological properties and yield of rice. *Indian Journal Agricultural Research*, 43(4), 263-268.

Granda, D. M., Mejía, A. I. & Jiménez, G. A. (2005). Utilización de residuos de plátano para la producción de metabolitos secundarios por fermentación en estado sólido con el hongo *Lentinus crinitus*. *Vitae*. 12(2), 13-20.

Grigorevski de Lima, A. L., Pires do Nascimento, R., Pinto da Silva, E. & Rodrigues, R. (2005). *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. *Enzyme and microbial technology*. 37, 272-277.

Hammel, K. E. (1997). Fungal degradation of lignin. In Nature: Plant litter quality and decomposition, edited by Cadisch, G & Gille, K. E. pp. 33-45. UK: CAB International.

Hideno, A., Inoue, H., Tsukahara, K., Yano, S., Fang, X., Endo, T., Sawayama, S. (2011). Production and characterization of cellulases and hemicellulasesby *Acremonium cellulolyticus* using rice straw subjected to various pretreatments as the carbon source. *Enzyme and Microbial Technology*.48, 162–168.

Jiang, X., Geng, A., He, N. & Li, Q. (2011). New isolate of *Trichoderma viride* strain for enhanced cellulolytic enzyme complex production. *Journal of Bioscience and Bioengineering.*111(2), 121–127.

Jorgensen, H. & Olsson, L. (2006). Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888- effect of substrate on hydrolytic performance. *Enzyme and Microbial Technology.* 38, 381–390

Jorgersen, H., Morkeberg, A., Krogh, K. & Olsson, L. (2004). Growth and enzyme production by three *Penicillium* species on monosaccharides. *Journal of biotechnology*. 109, 295-299.

Kadam, K.L., Forrest, L.H. & Jaconson, W.A. (2000). Rice straw as a lignocellulosic resource: collection, processing, transportation, and environmental aspects. *Biomass and Bioenergy*, 18, 369-389

Kasana, R., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S., Gulati, A. (2008). A rapid and Easy method for the detection of microbial cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Current Microbiology*. 57, 503-507.

Kausar, H., Sariah, M., Mohd, H., Zahangir, M. & Razi, M. (2010).Development of compatible lignocellulolytic fungal consortium for rapid composting of rice straw. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 64, 594-600.

Khalil, I., Hoque, M. M., Basunia, M. A., Alam, N. & Khan, A. (2011). Production of cellulase by *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* in solid state fermentation of lignocellulosic biomass. *Turkish journal of agriculture & forestry*. 35, 333-341.

Kluczek-Turpeinen, B., Maijala, P., Hofrichter, M. & Hatakka, A. (2007). Degradation and enzymatic activities of three *Paecilomyces inflatus* strains grown on diverse lignocellulosic substrates. *International biodeterioration & biodegradation.* 59, 283-291.

Kulkarni, N., Shendye, A. & Rao, M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology reviews.* 23, 411-456.

Kumar, R., Singh, S. & Singh, O.V. (2008). Bioconversion of lignocellulosic biomass: bioquemical and molecular perspectives. *Indian Journal of Microbiology*. 35, 377-391

Levy, I. & Shoseyov, O. (2002). Cellulose-binding domains Biotechnological applications. *Biotechnology advances*. 20, 191-213.

Liao, H., Xu, C., Tan, S., Wei, Z., Ling, N., Yu, G., Raza, W., Zhang, R., Shen, Q. & Xu, Y. (2012).Production and characterization of acidophilic xylanolytic enzymes from *Penicillium oxalicum* GZ-2. *Bioresource Technology.*123, 117–124.

Linder, M. & Teeri, T. T. (1997). The roles and function of cellulose-binding domains. *Journal of Biotechnology*. 57, 15-28.

Lockington, R. A., Rodbourn, L., Barnett, S., Carter, C. J. & Kelly, J. M. (2002). Regulation by carbon and nitrogen sources of family of cellulases in *Aspergillus nidulans*. *Fungal genetics and biology*. 37, 190-196.

Lu, L., Zeng, G., Fan, C., Ren, X., Wang, C., Zhao, Q., Zhang, J., Ming, C., Chen, A. & Jiang, M. (2013). Characterization of laccase-like multicopper oxidase from newly isolated *Streptomyces* sp. C1 in agricultural waste compost and enzymatic decolorization of azo dyes. *Biochemical engineering journal*. 72, 70-76.

Lynd, L., Willem, W., Zyl, V. & Pretorius, I. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 66(3), 506-577.

Machado, A., Lins de Albuquerque, M., Ferreira, S. G. & Pereira, N. (2010). Cellulases from *Penicillium funiculosum*: Production, properties and application to cellulose hydrolysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 37, 151-158.

Malherbe, S. & Cloete, T. E. (2002). Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Enviromental Science & Bio/Technology*. 1,105-114

Mandels, M. & Weber, J. (1969). The poduction of cellulases. *Advances in Chemistry.* 95, 394-414.

Marjamaa, K., Toth, K., Bromann, P., Szakacs, G. & Kruus, K. (2013). Novel *Penicillium* cellulases for total hydrolysis of lignocellulosics. *Enzyme and microbial Technology*. 52, 358-369.

Martinez, C., Balcázar, E., Dantán, E. & Folch-Mallol, J. (2008). Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* 50(3), 119-131.

Membrillo, I., Sánchez, C., Meneses, M., Favela, E. & Loera, O. (2008). Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. *Bioresource technology*. 99, 7842-7847.

Menon, V. & Rao, M. (2012). Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in energy and combustion science*. 38, 522-550.

Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical chemistry*. 31(3), 426-428.

Ministerio de agricultura y desarrollo rural MADR. El agro Colombiano frente al TLC con los Estados Unidos; 2004 [11/11/2012]; Disponible en: http://www.minagricultura.gov.co/archivos/El%20Agro%20Colombiano%20Frente%20al%20TLC.pdf

Mohan, P. R., Ramesh, B. & Reddy, O. V. (2012). Biological pretreatment of rice straw by *Phenarocheate chrysosporium* for the production of cellulases and xylanases using *Aspergillus niger* isolate. *Research Journal of Mycrobiology*. 7(1), 1-12.

Montoya, S. (2008). Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos orgánicos y generación de biomasa útil del macromiceto *Grifola frondosa*. Facultad de Ingeniería. Manizales, Universidad Nacional de Colombia.

Munir, M., Ali, S., Razi, A. & Alam, M. (2007). Use of fungi for the bioconversion of rice straw into cellulose Enzyme. *Journal of Environmental Science and Health part B*. 42, 381-386.

Niladevi, K. N., Sukumaran, R. K., Jacob, N., Anisha, G. S. & Prema, P. (2009). Optimization of laccase production from a novel strain – *Streptomyces psammoticus* using response surface methodology. *Microbiological research*. 164, 105-113.

Niladevi, K., Sukumaran, R. & Parukuttyamma, P. (2007). Utilization of rice straw for laccase production by *Streptomyces psammoticus* in solid-state fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 34, 665–674

Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura FAO. Año internacional del arroz 2004, el arroz es vida; 2004 [11/11/2012]; Disponible en: http://www.fao.org/rice2004/es/p3.htm

Plants database, United States department of agriculture. Plants profile, *Oryza sativa* L.; 2012 [10/09/2012]; Disponible en: http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=ORSA#

Prasad, K. K., Mohan, S. V., Rao, R. S., Pati, B. R. & Sarma, P. N. (2005). Laccase production by *Pleurotus ostreatus* 1804: Optimization of submerged cultura conditions by Taguchi DOE methodology. *Biochemical engineering journal*. 24, 17-26.

Quevedo, B.E., (2011). Evaluación de la degradación de residuos de floricultura para la obtención de azúcares con el uso de tres hongos lignocelulolíticos. Facultad de ingeniería. Bogotá, Universidad Nacional de Colombia.

Quinnghe, C., Xiaoyu, Y., Tiangui, N., Cheng, J. & Qiugang, M. (2004). The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Process biochemistry*. 39, 1561-1566.

Rangel, S. X. (2012). Estudio del efecto de enzimas ligninolíticas y celulolíticas obtenidas del hongo *Pleurotus ostreatus* sobre una gramínea forrajera tropical. Facultad de ingeniería. Bogotá, Universidad Nacional de Colombia.

Rathnan, R. K. & Ambili, M. (2008). Cellulase enzyme production by *Streptomyces* sp. using fruit waste as substrate. *Australian journal of basic and applied sciences*. 5(12), 1114-1118.

Reddy, G. V., Ravindra, P., Komaraiah, P., Roy, K. R. R. M. & Kothari, I. L. (2003). Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process biochemistry*. 38, 1457-1462

Rincón, M. A. (2013). Degradación de residuos de cultivo de clavel con hongos ligninolíticos y celulolíticos en fermentación sólida. Facultad de ciencias. Bogotá, Pontificia Universidad Javeriana.

Ruíz, F. J. & Martínez, A. T. (2009). Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbial Biotechnology*. 2(2), 164-177.

Saber, W., El-ahmady, N. & Abdallah, S. (2010). Bioconversion of lignocellulosic wastes into organic acids by cellulolytic rock phosphate-solubilizing fungal isolates grown under solid-state fermentation conditions. *Research Journal of Microbiology*. 5(1), 1-20.

Saha, B. C. (2004). Lignocellulose Biodegradation and Applications in Biotechnology. In Lignocellulose Biodegradation*,* pp. 2-34. Washington: ACS Symposium Series: American Chemical Society.

Sánchez, A. M. (2013). Evaluación de la degradación del tamo de arroz por hongos celulolíticos aislados de suelos de cultivo de arroz. Facultad de Ciencias. Bogotá, Universidad Nacional de Colombia.

Sanchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*. 27(2), 185-194.

Sánchez, L. (2011). Evaluación cuantitativa de la producción de CO_2 en la degradación del tamo de arroz empleando microorganismos lignocelulolíticos. Facultad de Ciencias de la salud. Bogotá, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Saratale, G. D., Saratale, R. G. & Eun Oh, S. (2012). Production and characterization of multiple cellulolytic enzymes by isolated *Streptomyces* sp. MDS. *Biomass and Bioenergy*. 47, 302-315.

Segura, F., Echeverri, R., Patiño, A. & Mejía, A. (2007). Descripción y discusión acerca de los métodos de análisis de fibra y del valor nutricional de forrajes y alimentos para animales. *VITAE.* 14(1), 72-81.

Semêdo, L., Gomes, R., Bon, E., Soares, R., Linhares, L. & Coelho, R. (2000). Endocellulase and Exocellulase Activities of Two *Streptomyces* Strains Isolated from a Forest Soil**.** *Applied biochemistry and biotechnology*. 84, 267-276

Singhvi, M. S., Adsul, M. G. & Gokhale, D. V. (2011). Comparative production of cellulases by mutants of *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 and its application in hydrolysis of avicel and cellulose. *Bioresource technology*. 102, 6569-6572.

Stajic, M., Persky, L., Friesem, D., Hadar, Y., Wasser, S., Nevo, E. & Vukojevic, J. (2006). Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology*. 38, 65-73.

Sun, W., Cheng, C. & Lee, W. (2008).Protein expression and enzymatic activity of cellulases producted by *Trichoderma reesei* Rut C-30 on rice straw. *Process Biochemistry*. 43, 1083-1087.

Taniguchi, M., Suzuki, H., Watanabe, D., Sakai, K., Hoshino, K. & Tanaka, T. (2005). Evaluation of Pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for Enzymatic Hydrolysis of Rice Straw. *Bioscience and Bioengineering*. 100(6), 637-643.

Techapun, C., Charoenrat, T., Poosaran, N., Watanabe, M. & Sasaki, K. (2002). Thermostable and alkaline- tolerant cellulose – free xylanase produced by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab106. *Bioscience and Bioengineering*. 93(4), 431-433

Thierie, J. & Penninckx, M. J. (2007). Modeling of competitive relationships. Application to cellulose degradation by *Streptomyces* sp. Strains. *Current microbiology*. 55, 507-511

Umasaravanan, D., Jayapriya, J. & Rajendran, B. (2011). Comparison of lignocellulose biodegradation in solid state fermentation of sugarcane bagasse and rice straw by *Aspergillus Tamarii*. *Ceylon Journal* of Science. 40 (1), 65-68.

Valášková, V. & Baldrian, P. (2006). Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* and *Piptoporus betulinus*. *Research in Microbiology*. 157, 119-124.

Van Dyk, J. & Pletschke, B. (2012). A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—Factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*. 30, 1458-1480.

Xi, J., Du, W. & Zhong, L. (2013). Probing the interaction between cellulose and cellulose with a nanomechanical sensor. In Cellulose – Medical, pharmaceutical and electronic applications, pp. 125-140. Edited by Ven, T. & Godbout, L. USA: InTech

Xu, J. & Yang, Q. (2010). Isolation and characterization of rice Straw degrading *Streptomyces griseorubens* C-5. *Biodegradation*. 21, 107-116

Yang, S., Wang, L., Yan, Q., Jiang, Z. & Li, L. (2009). Hydrolysis of soybean isoflavone glycosides by a thermostable *β*-glucosidase from *Paecilomyces thermophila*. *Food Chemistry*. 115, 1247-1252.

Zampieri, D., Guerra, L., camassola, M. & Dillon, A. (2013). Secretion of endoglucanases and β-glucosidases by *Penicillium echinulatum* 9A02S1 in presence of different carbon sources. *Industrial crops and products*. 50, 882-886

Zhang, B., Pang, C., Qin, J., Liou, K., Xu, H. & Li, H. (2013). Rice straw incorporation in winter with fertilizer-N application improves soil fertility and reduces global warming potencial from a double rice paddy field. *Biology and fertility of soils*. 49, 1039-1052.