

EVALUACIÓN DEL COMPLEJO ENZIMÁTICO PRODUCIDO MEDIANTE EL COCULTIVO DE *Aspergillus* sp. Y *Trichoderma* sp. EN FASE SÓLIDA SOBRE RESIDUOS DE PALMA

Katherine Manjarrés¹, Yineth Piñeros² y Eduardo Rodríguez-Sandoval¹

RESUMEN

El procesamiento de la palma de aceite en Colombia genera grandes cantidades de residuos ricos en lignina, celulosa y hemicelulosa. En este trabajo se estudió la actividad de enzimas celulolíticas mediante el cultivo individual y cocultivo de *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp. en fase sólida utilizando los residuos de palma como sustrato, pretratados biológicamente con *Pleurotus ostreatus* durante 20 días para deslignificarlos y favorecer así la producción de celulasas. Se evaluaron las actividades celulosa total (Fpasa), endoglucanasa (CMCasa) y β -glucosidasa (Celobiasa) durante 16 días de cultivo a una temperatura de 30°C. Los mayores valores se obtuvieron con *Aspergillus* sp. como cepa individual, reportando valores de 0,149 UI·mL⁻¹ de Fpasa, 0,329 UI·mL⁻¹ de CMCasa y 0,148 UI·mL⁻¹ de celobiasa. Sin embargo, bajo el sistema de cocultivo con *Aspergillus* sp. en los primeros 9 días y posteriormente de sembrar *Trichoderma* sp. resultó ser benéfico al evitar el decrecimiento de la actividad enzimática después de alcanzar su máximo nivel, obteniéndose valores de 0,112 UI/mL de Fpasa, 0,311 UI·mL⁻¹ de CMCasa y 0,140 UI/mL de celobiasa.

Palabras clave adicionales: Celulosa, celulasas, endoglucanasa, β -glucosidasa

ABSTRACT

Evaluation of enzymatic complex produced by the co-culture of *Aspergillus* sp. and *Trichoderma* sp. in solid phase on oil palm waste

Oil palm processing industry in Colombia generates a huge quantity of byproducts rich in lignin, cellulose and hemicelluloses. This work studied cellulolytic enzyme activity through the individual culture or coculture of *Aspergillus* sp. and *Trichoderma* sp. in a solid phase using byproducts of oil palm as a substrate. These agricultural wastes were biologically pretreated with *Pleurotus ostreatus* during 20 days in order to eliminate the lignin and thus improve the cellulase production. The total activity of cellulase (Fpase), endoglucanase (CMCases) and β -glucosidase (Celobiase) were evaluated during 16 days at 30 °C. The highest values were obtained using *Aspergillus* sp as individual culture, with 0.149 UI·mL⁻¹ of Fpase, 0.329 UI·mL⁻¹ of CMCCase and 0.148 UI/mL of celobiase. However, the coculture systems with *Aspergillus* sp. during the first 9 days and after adding *Trichoderma* sp. resulted in a suitable system because prevented the decrease of the enzymatic activity after reaching its maximum level of 0.112 UI/mL of Fpase, 0.311 UI/mL of CMCCase and 0.140 UI/ml of celobiase.

Additional key words: Cellulose, cellulase, endoglucanase, β -glucosidase

INTRODUCCIÓN

La celulosa es el biopolímero más abundante en la naturaleza y el constituyente principal de la pared celular de los tejidos vegetales; se degrada por algunos microorganismos tales como bacterias, protozoos y ciertos hongos filamentosos (Marquina, 2005). Muchos materiales lignocelulósicos (celulosa, hemicelulosa y lignina)

son una fuente para la producción de algunos productos de alto valor agregado. Su interés a nivel industrial se basa en su aplicación directa o indirecta para la producción de energía, la cual es considerada una energía limpia, abundante y descentralizada. Así mismo, se utiliza en la obtención de azúcares fermentables por la degradación de sus compuestos, y la producción de biocombustible (Monsalve et al., 2006).

Recibido: Febrero 12, 2010

Aceptado: Octubre 4, 2010

¹ Dpto. de Ingeniería Agrícola y Alimentos, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. Núcleo El Volador. Medellín, Colombia. e-mail: jkmanjarresp@unal.edu.co; edrodriguez@unal.edu.co

² Programa de Ingeniería de Alimentos, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Bogotá, Colombia. e-mail: yineth.pineros@utadeo.edu.co

Teniendo en cuenta su estructura, los materiales lignocelulósicos pueden usarse como sustratos para el cultivo de hongos filamentosos capaces de producir enzimas extracelulares con actividades celulasas (Rodríguez y Piñeros, 2007). Las celulasas son proteínas derivadas de los procesos naturales de fermentación, las cuales involucran un complejo enzimático que actúa de forma sinérgica en la degradación de la celulosa y son importantes para la industria de alimentos ya que evitan la compactación en la producción de purés de frutas, verduras y en polvos instantáneos, son usadas en la extracción de almidón, colorantes, aceites y antioxidantes (Chacón y Waliszewski, 2005); además, se utilizan en la industria de papel, textiles y jabones (Kenealy y Jeffries, 2003).

Uno de los microorganismos celulolíticos más extensamente estudiados ha sido el hongo aerobio y mesófilo *Trichoderma reesei*, que pertenece al phylum *Ascomycota*, clase de los *Ascomycetes*, orden *Hipocreales* y familia de los *Hipocreaceae*. A nivel industrial es usado en la producción de celulasas y hemicelulasas para la elaboración de cerveza, vinos y alimentos procesados (Roldan et al., 2006). Lati et al. (2007) reportaron que este microorganismo cultivado sobre cascarrilla de arroz tuvo la mejor producción de celulasas a un rango de temperaturas entre 25 y 30 °C.

Así mismo, el género de hongos *Aspergillus*, con más de 200 especies, perteneciente al phylum *Ascomycota*, clase de los *Ascomycetes*, orden *Eurotiales* y familia de los *Thichocomaceae* es conocido por ser superior a muchos otros microorganismos en lo que se refiere a su capacidad de producción de β -glucosidasa extracelular, enzima que es particularmente atractiva por su elevada actividad frente a la celobiosa. Este microorganismo es utilizado para la producción de salsa de soya, antibióticos, algunas enzimas y en la degradación de ciertos plásticos (Rodríguez-Mayor et al., 2005).

Uno de los residuos lignocelulósicos con mayor producción durante el procesamiento de aceite de palma son los racimos vacíos o raquis, con una participación del 25 % de los subproductos. Para el 2006, en Colombia existían alrededor de 303.768 hectáreas cultivadas de palma de aceite, las cuales produjeron 3.543.178 toneladas de frutos y 885.794,5 toneladas de raquis (Fedepalma, 2006). Los racimos vacíos

son ricos en lignina (22 %) y celulosa 69 (%) (Siregar et al., 2002), los cuales han sido utilizados para compostaje, combustible para calderas utilizadas en las mismas plantas extractoras (Del Hierro, 1993), fabricación de papel (Templeton, 2002) y abono orgánico (Fedepalma, 2006). Estos residuos pueden ser aprovechados por los microorganismos *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp. que toman la celulosa como fuente de carbono y producen celulasas. Al utilizar los racimos vacíos para la producción de celulasas derivadas de *Trichoderma* sp. se han encontrado las mayores actividades celulolíticas con los sustratos sometidos a un pretratamiento biológico con *Pleurotus ostreatus* y NaNO_3 como fuente de nitrógeno (Rodríguez y Piñeros, 2007).

Alam et al. (2009) utilizaron *Trichoderma harzianum* y raquis como sustrato para la producción de celulasas en un bio-reactor con tambor rotatorio y obtuvieron la mayor actividad celulasa en el segundo día de fermentación, expresada como actividad sobre papel de filtro (FPA). Así mismo, Hidayah et al. (2008) utilizaron racimos vacíos de palma con *Bacillus pumilus* EB3 para determinar la actividad endoglucanasas. Incluso, estos residuos han sido pretratados con el fin de producir otros compuestos como xilosa (Rahman et al., 2006).

A pesar de las investigaciones que se han realizado, aún no se han reportado estudios basados en la evaluación del complejo enzimático derivado del cocultivo de las cepas utilizadas en raquis de palma. Por esta razón, este trabajo tuvo como objetivo estudiar las actividades celulasas totales, endoglucanasas, β -glucosidasas, mediante el cocultivo de *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp., como una alternativa para el aprovechamiento de algunos residuos de la industria procesadora de palma por medio de procesos biotecnológicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron cepas de *Trichoderma* sp. (R1, R2, T12, T29, T9-2, T4-3, T7-3) y *Aspergillus* sp. (A1, A2, A3) aisladas de una colección del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, en Bogotá, y las mismas fueron conservados a 4°C en agar papa dextrosa (PDA). Los inóculos se realizaron en medio de cultivo Mandels estéril (Mandels y Weber, 1969).

El medio se suplementó con $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucosa y $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de raquis molidos como fuentes de carbono. Se realizaron cultivos de 25 mL en frascos de 100 mL, los cuales se inocularon con 1 mL de suspensión de esporas de *Aspergillus* sp. ($2,85 \times 10^8$ esporas $\cdot\text{mL}^{-1}$) y *Trichoderma* sp. ($2,05 \times 10^8$ esporas $\cdot\text{mL}^{-1}$). Se incubaron a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ sobre un agitador orbital a 150 rpm, durante 7 días. Para seleccionar las cepas del experimento se evaluó la actividad celulasa en azúcares reductores utilizando racimos vacíos como sustrato.

Pretratamiento biológico de los racimos vacíos

Los racimos vacíos o raquis se obtuvieron de cultivos de palma localizados en Cumaral, departamento del Meta, en el mes de abril de 2007, los cuales fueron lavados, desinfectados, secados y cortados hasta un tamaño de partícula de 3-4 cm. El pretratamiento biológico se realizó sembrando sobre los racimos vacíos cortados el hongo *Pleurotus ostreatus* (semillas comerciales al 4 % en peso) durante 20 días a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ con la finalidad de modificar la estructura lignocelulósica del residuo. El procedimiento se realizó en bolsas esterilizables en polipropileno biorientado, con tapón de algodón para realizar la fermentación a condiciones aerobias, y humedad del sustrato de 66 %, para lograr el crecimiento micelar sobre los residuos. Después del tratamiento, los residuos fueron lavados con el fin de retirar los restos miceliales y secados a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 días (Rodríguez y Piñeros, 2007).

Cultivo en fase sólida de *Trichoderma* sp. y *Aspergillus* sp.

El cultivo en fase sólida se realizó en bolsas esterilizables de polipropileno biorientado, con tapón de algodón, 80 g de sustrato (pretratado biológicamente) y humedad del 66 %. A cada bolsa se le adicionaron 15 mL de medio básico de Mandels; se esterilizaron durante 30 min a $121 \text{ }^\circ\text{C}$, se enfriaron y se les adicionó 25 mL de inóculo. La fermentación se llevó a cabo a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ en oscuridad, durante 16 días para cada uno de los tratamientos estipulados (Cuadro 1). El primer subíndice indica el número de días que el microorganismo se mantuvo en las unidades de fermentación como cepa individual y el segundo subíndice indica el tiempo que estuvo en un sistema de cocultivo. La letra inicial coincide con el orden de adición de cada cepa. Se tomaron

muestras en el tiempo de acuerdo al diseño experimental.

Cuadro 1. Tratamientos utilizados para la fermentación en fase sólida

Tratamiento	Cepa
A ₁₆ T ₀	<i>Aspergillus</i> sp. (A)
A ₀ T ₁₆	<i>Trichoderma</i> sp. (T)
A ₁₆ T ₁₆	<i>Aspergillus</i> sp. y <i>Trichoderma</i> sp.
A ₉ T ₇	<i>Aspergillus</i> sp. y <i>Trichoderma</i> sp.
T ₉ A ₇	<i>Trichoderma</i> sp. y <i>Aspergillus</i> sp.

Análisis enzimáticos

La extracción del complejo enzimático se llevó a cabo con 20 mL de buffer de citratos (0,05 M - pH 4,8) para 5 g de sustrato. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 1 h y el sobrenadante fue utilizado para medir las actividades enzimáticas. La actividad celulasa total se determinó como actividad sobre papel de filtro (FPA), utilizando 500 μL del extracto suspendido en 1 mL del buffer de citratos, se adicionó 50 mg de papel filtro y se incubó durante una 1 h a 50°C . Posteriormente se determinaron los azúcares reductores liberados. La actividad endoglucanasa o CM Casa se midió valorando la formación de azúcares reductores liberados de una solución de CMC al 1 %, con el buffer de citratos e incubados a 50°C por 30 min (Rodríguez y Piñeros, 2007).

La actividad β -glucosidasa o celobiasa se determinó utilizando 1 mL del filtrado y 1 mL de salicina 10 mM en buffer acetato de sodio 1M (pH 6,0); se incubó a 50°C durante 30 min y se determinó la liberación de azúcares reductores (Ceroni y Gutiérrez, 1988; Bernier y Stutzenberger, 1989; Ramírez y Cocha, 2003). El contenido de azúcares reductores fue determinado usando el método de ácido 5-dinitrosalicílico (DNS), con glucosa como patrón (Miller, 1959) y midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro (Unicam Helios B NC 9432 UVB 1000E, Termo Spectronic) a una longitud de onda de 575 nm.

El estudio se condujo bajo un diseño experimental aleatorio de medidas repetidas con los factores de tiempo y tratamiento. Las determinaciones se realizaron en los días 2, 4, 7, 9, 11, 14 y 16, y los niveles de los tratamientos se muestran en el Cuadro 1. Los tratamientos se realizaron por triplicado, y los resultados de las

actividades de celulasas totales (FPasa), endoglucanasa (CMCasa) y β -glucosidasa (Celobiasa) se analizaron mediante ANOVA y prueba de Duncan utilizando el programa Statgraphics Plus V.5.1.

RESULTADOS

La cepa T12 correspondiente a *Trichoderma* sp. y la A3 perteneciente a *Aspergillus* sp. fueron las que tuvieron mayor producción de azúcares reductores (Cuadro 2), y por lo tanto las seleccionadas para la experimentación.

Cuadro 2. Actividad celulasa (en azúcares reductores de diferentes cepas de *Trichoderma* sp. y *Aspergillus* sp.

Cepa	Azúcares reductores (mg·mL ⁻¹)
R1	0,238
R2	0,260
T12	0,479
<i>Trichoderma</i> sp. T29	0,162
T9-2	0,199
T4-3	0,354
T7-3	0,318
A1	0,118
<i>Aspergillus</i> sp. A2	0,309
A3	0,338

Actividad de celulasa total (FPasa)

Los cultivos realizados de forma individual presentaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$), siendo superior el *Aspergillus* sp. ($A_{16}T_0$) al *Trichoderma* sp (A_0T_{16}) (Figuras 1 y 2). Los tratamientos donde estuvo presente el *Aspergillus* sp. no mostraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre sí, a diferencia de los tratamientos con *Trichoderma* sp. donde estas diferencias sí estuvieron presentes. Los datos indican que la cepa de *Trichoderma* sp. es inferior en su capacidad celulolítica a la cepa de *Aspergillus* sp., bajo las condiciones de experimentación utilizadas, donde se obtuvo un valor máximo de actividad FPasa de $0,149 \pm 0,07$ UI·mL⁻¹ en el noveno día de cultivo para el tratamiento $A_{16}T_0$ (Figura 1), lo que demuestra que esta cepa produce complejos con mayor actividad celulasa y en un menor tiempo de cultivo si se compara con el tratamiento A_0T_{16} en el cual la máxima actividad FPasa se alcanzó en el día 16 y sólo

superó ligeramente los $0,100$ UI·mL⁻¹ (Figura 2). Esta diferencia se atribuye a que la cepa de *Trichoderma* sp es productora de altas cantidades de β -glucosidasa, lo que sugiere presencia de celobiosa, disacárido que inhibe la actividad de las celulasas, específicamente endoglucanasas y β -glucosidasas (Alam et al., 2009). En este contexto, el *Aspergillus* sp. hidrolizaría al disacárido de una forma más eficiente que la cepa de *Trichoderma* sp.

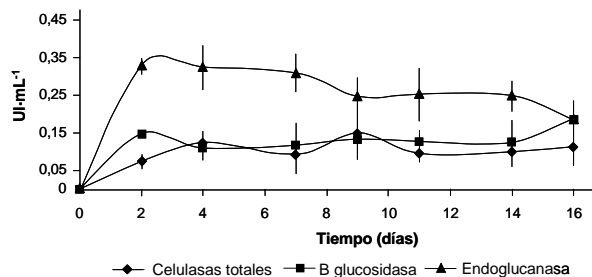


Figura 1. Actividades enzimáticas producidas por el tratamiento $A_{16}T_0$

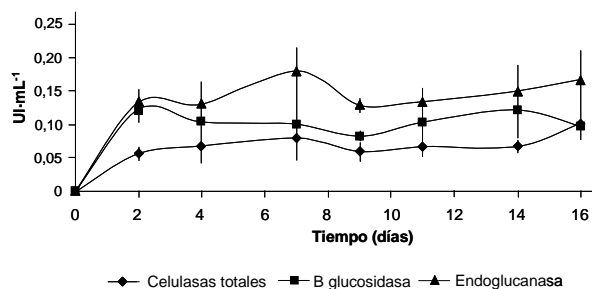


Figura 2. Actividades enzimáticas producidas por el tratamiento A_0T_{16}

Kang et al. (2004) encontraron cepas de *Aspergillus* sp. superiores a las de *Trichoderma* sp. para la producción de celulasas sobre cascarilla de arroz obteniendo valores de 19 UI·g⁻¹ con *Aspergillus niger* KK2 y $7,7$ UI·g⁻¹ con *Trichoderma reesei* MGC77. Por su parte, Couri et al. (2000) obtuvieron celulasas mediante cultivo de *Aspergillus niger* sobre salvado de trigo, con valores de actividad de $0,65$ UI·mL⁻¹ durante dos días de fermentación, mientras que el valor obtenido en el presente trabajo fue 4,3 veces menor, lo cual puede deberse a las diferentes condiciones de experimentación tanto en la fermentación como en las características del sustrato y la competencia por los nutrientes disponibles en éste. En cuanto al cocultivo $A_{16}T_{16}$

(Figura 3) la mayor actividad enzimática encontrada fue de $0,105 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$ al séptimo día de cultivo. Los valores son intermedios entre los producidos de forma individual por cada cepa. Este comportamiento se atribuye a la interacción de los dos microorganismos y la competencia en el consumo de ciertos nutrientes contenidos en los racimos vacíos que se necesitan para su metabolismo, por lo que los valores de la actividad enzimática no fueron superiores a los mostrados por *Aspergillus* sp.

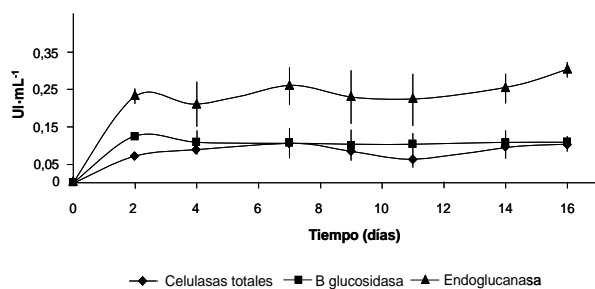


Figura 3. Actividades enzimáticas producidas por el tratamiento A₁₆T₁₆

Comportamientos similares se observaron para los tratamientos A₉T₇ y T₉A₇ (Figuras 4 y 5) cuyos valores máximos de celulasas encontrados fueron $0,112$ y $0,113 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente, en las determinaciones realizadas después del día 9, tiempo en el cual se colocaron las cepas complementarias como cocultivo. La actividad sobre papel filtro aumentó en el caso de T₉A₇, donde la presencia de *Aspergillus* sp. después del noveno día logró aumentar la actividad en 30 %. La actividad celulasa total disminuyó luego de realizar el cocultivo en el tratamiento A₉T₇ y se mantuvo constante en las determinaciones posteriores.

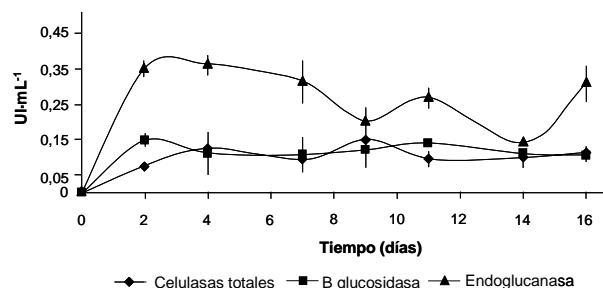


Figura 4. Actividades enzimáticas producidas por el tratamiento A₉T₇

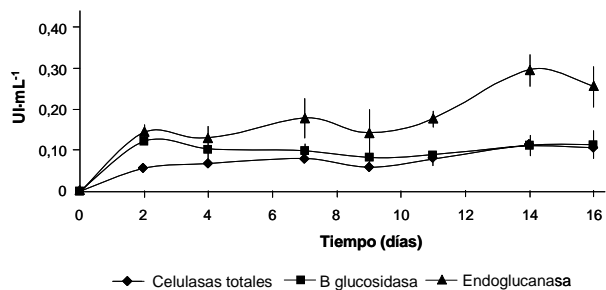


Figura 5. Actividades enzimáticas producidas por el tratamiento T₉A₇

Actividad de endoglucanasa (CMCasa)

El tratamiento que presentó los valores más altos de CMCasa fue el A₁₆T₀ con una actividad de $0,329 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$ en un tiempo de 2 días (Figura 1), mientras que el tratamiento con los valores más bajos fue el A₀T₁₆ el cual mostró en el día 7 una actividad de $0,178 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 2). Esta actividad logró un máximo con *Aspergillus* sp. y luego disminuyó durante el tiempo del ensayo, probablemente debido a que este microorganismo en su primera fase de crecimiento necesita producir endoglucanasas para hidrolizar el sustrato y realizar su metabolismo. Botella et al. (2005) reportaron resultados de esta actividad utilizando *Aspergillus awamori* con residuos de uvas como sustrato, y obtuvieron un valor máximo de $0,113 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$, que disminuyó posteriormente. Esto permite comparar el comportamiento del cultivo, aunque no los datos numéricos, ya que los sustratos y las condiciones del ensayo fueron diferentes.

El tratamiento A₁₆T₁₆ (Figura 3) presentó valores intermedios entre los dos tratamientos de las cepas individuales, incrementando en 31 % la actividad de endoglucanasa con respecto a la que se obtuvo con A₀T₁₆, lo cual resulta ser una alternativa para alcanzar mejores niveles de endoglucanasa utilizando los racimos vacíos de palma. Lo anterior demuestra que *Aspergillus* sp. es superior en su capacidad de degradación de los materiales lignocelulósicos presentes en el raquis comparando con la cepa de *Trichoderma* sp. bajo las condiciones de experimentación propuestas en este estudio. En otra investigación (Gutiérrez et al., 1999), las cepas de *Aspergillus* sp. fueron superiores a las de *Trichoderma* sp. en la producción de endoglucanasas utilizando bagazo de caña como sustrato, obteniéndose valores de $65,8 \text{ UI}\cdot\text{g}^{-1}$ seco con *A. niger* y $57,2 \text{ UI}\cdot\text{g}^{-1}$ seco con *T. reesei* LM-UC4; además de lograr buenos

resultados con el sistema de cocultivo.

Actividad de β -glucosidasa (Celobiosa)

Los cultivos realizados de forma individual presentaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre ellos, siendo superior el tratamiento $A_{16}T_0$ que el A_0T_{16} con actividades de 0,187 y 0,122 $UI \cdot mL^{-1}$ a los 16 y 2 días de fermentación, respectivamente (Figuras 1 y 2). El tratamiento A_0T_{16} presentó los menores valores de actividad β -glucosidasa, y las cepas utilizadas para este trabajo confirman lo encontrado en otros estudios donde cepas de *Aspergillus* sp. fueron superiores a las de *Trichoderma* sp. para la producción de β -glucosidasa con valores de 27,3 $UI \cdot g^{-1}$ seco con *A. niger* y 8,8 $UI \cdot g^{-1}$ seco con *T. reesei* LM-UC4 sobre bagazo de caña y suplementado con fuentes de nitrógeno (Gutiérrez et al., 1999). Kang et al. (2004) investigaron el potencial de *Aspergillus* sp. para la producción de esta enzima en fermentación sólida durante 16 días sobre cascarilla de arroz y salvado de trigo, encontrando que la actividad β -glucosidasa fue de 100 $UI \cdot g^{-1}$ seco.

El tratamiento $A_{16}T_{16}$ mostró la máxima actividad a los dos días de fermentación con 0,125 $UI \cdot mL^{-1}$. Los tratamientos A_9T_7 y T_9A_7 , presentaron máxima actividad β -glucosidasa de 0,141 y 0,114 $UI \cdot mL^{-1}$, en un tiempo de 9 y 16 días, respectivamente. En general, el comportamiento de los cocultivos fue similar a los resultados obtenidos con A_0T_{16} . La presencia de *Aspergillus* sp. en los cocultivos pudo sostener la actividad en el tiempo, mientras que con sólo *Trichoderma* ésta disminuyó luego del máximo. Otros reportes también demuestran el potencial de *A. phoenicis* para la producción de esta enzima en comparación con *T. reesei* utilizando residuos de origen animal donde obtuvo valores de 0,7 y 0,09 $UI \cdot mL^{-1}$, respectivamente. En presencia de *T. reesei* esta actividad se incrementó utilizando *A. phoenicis* en cocultivo (Zhiyou et al., 2005). Los tratamientos A_9T_7 y T_9A_7 (Figuras 4 y 5) no mostraron diferencias significativas; sin embargo, estos grupos fueron superiores ($P \leq 0,05$) con el tratamiento de cocultivo durante los 16 días.

DISCUSIÓN

El potencial que tiene el *Aspergillus* sp. para la producción de celulasas ya ha sido previamente reportado (Szendefy et al., 2006); y la producción

de celulasas con cepas de *Trichoderma* sp. se ha estudiado de forma amplia utilizando sustratos como madera (Reczey et al., 1996), residuos de maíz (Xia y Shen, 2004) y residuos de trigo (Smits et al., 1996), los cuales resultaron apropiados para este proceso.

De acuerdo a nuestra investigación, cuando se utilizan residuos de palma como sustrato, la cepa de *Trichoderma* sp. presenta una menor actividad celulolítica que la cepa de *Aspergillus* sp. Este último hongo produce principalmente enzimas degradadoras de xilano, el polisacárido que da origen a la xilosa. Algunos autores reportan una producción de xilosa de 29,4 $g \cdot L^{-1}$ de racimos de palma de aceite hidrolizada (Rahman et al., 2006). Esta característica del sustrato pudo haber influido en el mejor desempeño del *Aspergillus* sp. Así mismo, la literatura reporta que el *Trichoderma* sp. generalmente produce niveles muy bajos de β -glucosidasa (Zhiyou et al., 2005), contrario al *Aspergillus* sp., el cual es buen productor de esta enzima (Flachner et al., 1999).

Diferentes investigaciones han utilizado cultivos de *Trichoderma* sp. y *Aspergillus* sp. sobre residuos lignocelulósicos tales como bagazo de caña, salvado de trigo, cascarillas de arroz y residuos de la industria láctea en cultivos independientes y bajo cocultivo (Gutiérrez et al., 1999; Kang et al., 2004; Zhiyou et al., 2005). En todas ellas el comportamiento de los cultivos ha sido comparable al de la presente investigación a pesar de las diferencias en cuanto a las cepas, el sustrato y las condiciones generales de cultivo.

Gutiérrez et al. (1999) indicaron que los cultivos mixtos de *Aspergillus* sp y *Trichoderma* sp. tienen los mejores resultados en la producción de enzimas celulolíticas. Los resultados del presente trabajo indican que el sistema de cocultivo presenta ciertas deficiencias al utilizar raquis como sustrato, por lo que se podría deducir que las características del sustrato, como la baja cantidad de nitrógeno (0,52 %, según Suhani y Ong, 2001), genera competencia por los nutrientes entre las dos cepas, afectando la producción de las enzimas. Además la alta concentración de xilano podría favorecer más la actividad celulolítica del *Aspergillus* sp. teniendo en cuenta su metabolismo. Esto podría sugerir el uso del raquis de palma y la utilización de xilanos para la producción de xilosa, que a su vez se podría emplear en la obtención de xilitol y transformarlo

en etanol mediante rutas biotecnológicas.

La presencia de *Aspergillus* sp. en los cocultivos mantuvo la actividad β -glucosidasa en el tiempo, mientras que con sólo *Trichoderma* ésta disminuyó luego de alcanzar un máximo. Es decir, *Aspergillus* sp. potenció la actividad β -glucosidasa. Zhiyou et al. (2005) reportaron que *T. reesei* en cocultivo con *A. phoenicis* aumentó los valores de esta actividad de 0,56 a 0,64 UI·mL⁻¹; sin embargo, también confirmaron que la cepa *Aspergillus* individual resulta ser mejor productora de β -glucosidasa (0,72 UI·mL⁻¹), lo cual concuerda con varios estudios donde muestran que esta cepa tiene un potencial para la producción de la enzima.

CONCLUSIONES

La cepa A3 de *Aspergillus* sp. produjo celulasas con una mayor capacidad que la cepa T12 de *Trichoderma* sp. El sistema de cocultivo resultó tener valores más elevados que la cepa de *Trichoderma* sp.; sin embargo, en ninguna de las actividades superó el potencial del *Aspergillus* sp. en cultivo individual para la producción de celulasas. Este tratamiento mostró la mayor actividad FPasa, CMCasa y β -glucosidasa bajo las condiciones experimentales de este trabajo con valores de 0,149; 0,329 y 0,187 UI·mL⁻¹ en los días 2, 9 y 16 de cultivo, respectivamente.

El tipo de tratamiento y el tiempo influyeron de forma significativa sobre todas las actividades enzimáticas evaluadas. Las características del sustrato son un factor determinante en el comportamiento de las cepas cultivadas bajo el sistema de cocultivo, debido probablemente a su composición en cuanto a nitrógeno y alta concentración de xilano.

Este trabajo permite dar algunos lineamientos del manejo y aprovechamiento de residuos lignocelulósicos de palma de aceite utilizando cocultivo para la producción de enzimas.

AGRADECIMIENTO

Trabajo financiado por el proyecto 002IA de la Universidad Jorge Tadeo Lozano de Bogotá

LITERATURA CITADA

1. Alam, M., A. Mamun, I. Qudsieh, S. Muyibi,

H.M. Salleh y N.M. Omar. 2009. Solid state bioconversion of oil palm empty fruit bunches for cellulase enzyme production using a rotary drum bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 46: 61–64.

2. Bernier, R. y F. Stutzenberger. 1989. Stabilization of *Thermomonospora curvata* β -glucosidase by a low molecular weight intracellular factor. *Lett. Appl. Microbiol.* 8: 9-13.

3. Botella, C., I. Ory, C. Webb, D. Cantero y A. Blandino. 2005. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochem. Eng. J.* 26: 100-106.

4. Ceroni, A. y M. Gutiérrez. 1988. Producción de celulasas por hongos: estudios cinéticos en hongos silvestres. *Boletín de Lima* 55: 13-20.

5. Chacón, O. y K.N. Waliszewski. 2005. Commercial cellulases preparations and their applications in extractives processes. *Universidad y Ciencia* 21(42): 111-120.

6. Couri, S., S. Terzi, G. Saavedra, S. Pereira y A. Costa. 2000. Hydrolytic enzyme production in solid-state fermentation by *Aspergillus niger* 3T5B8. *Process Biochem.* 36: 255–261.

7. Del Hierro, E. 1993. Aprovechamiento de los subproductos de palma de aceite. *Rev. Palmas* 14: 149-153.

8. Fedepalma. 2006. Anuario Estadístico de Fedepalma. <http://www.fedepalma.org> (consulta de 16/01/2007).

9. Flachner, B., A. Brumbauer y K. Reczey. 1999. Stabilization of beta-glucosidase in *Aspergillus phoenicis* QM 329 pellets. *Enzyme Micro Technol.* 24: 362.

10. Gutiérrez, M., L. Portal, P. Moreno y R. Tengerdy. 1999. Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. *Bioresource Technol.* 68: 173-178.

11. Hidayah, A., A.H. Mohd, K.M. Umi, A. Norhafizah, M. Farinazleen y S. Yoshihito. 2008. Production of bacterial endoglucanase from pretreated oil palm empty fruit bunch by *Bacillus pumilus*. *J. Biosci. Bioeng.* 106: 231-236.

12. Kang, S., Y. Park y J. Lee. 2004. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* K2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technol.* 91: 153-156.
13. Kenealy, W.R. y T.W. Jeffries. 2003. Enzyme processes for pulp and paper: a review of recent developments. In: Goodell, Nicholas y Schultz (eds). *Wood Deterioration and Preservation: Advances in our Changing World*. AMS. San Diego, CA. pp. 210-239.
14. Lati, M., Z. Hamidi y M. Barzegar. 2007. Evaluation of culture conditions for cellulase production by two *Trichoderma reesei* mutants under solid-state fermentation conditions. *Bioresource Technol.* 68: 165-172.
15. Mandels, M. y J. Weber. 1969. The production of cellulases. *Advances Chem.* 95: 391-414.
16. Marquina, D. 2005. Producción de biomasa de hongos celulolíticos para la degradación de residuos celulósicos. Universidad Complutense de Madrid. 47 p.
17. Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chem.* 31: 426-428.
18. Monsalve, J., V. Medina y A. Ruiz. 2006. Producción de etanol a partir de la cáscara de banano y de almidón de yuca. *Rev. Dyna.* 73: 21-27.
19. Rahman, S.H.A., J.P. Choudhury y A.L. Ahmad. 2006. Production of xylose from oil palm empty fruit bunch fiber using sulfuric acid. *Biochem. Eng. J.* 30: 97-103.
20. Ramírez, P. y J. Cocha. 2003. Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Rev. Peruana Biol.* 10(1): 67-77.
21. Reczey, K., Z. Szengyel, R. Eklund y G. Zacchi. 1996. Cellulase production by *T. reesei*. *Bioresource Technol.* 57: 25-30.
22. Rodríguez, I. y Y. Piñeros. 2007. Producción de complejos enzimáticos celulolíticos mediante el cultivo en fase sólida de *Trichoderma* sp. sobre los racimos vacíos de palma de aceite como sustrato. *Rev. Vitae* 14: 35-42.
23. Rodríguez-Mayor, L., J. Aguado y M. Romero. 2005. Hidrólisis de celobiosa con Beta-glucosidasa inmovilizada. Universidad Complutense de Madrid. 276 p.
24. Roldan, A., V. Palacios, X. Peñate, T. Benitez y L. Pérez. 2006. Use of *Trichoderma* enzymatic extracts on vinification of Palomino grapes in the Sherry Region. *J. Food Eng.* 75: 375-382.
25. Siregar, F.A., S. Saletes, J.P. Caliman y T. Liwang. 2002. Empty fruit bunch compost: processing and utilities. International Oil Palm Conference: IOPRI. Bali, Indonesia: pp. 27-57.
26. Smits, J.P., A. Rinzema, J. Tramper, H.M. van Sonsbeek y W. Knol. 1996. Solidstate fermentation of wheat bran by *Trichoderma reesei* QM9414: substrate composition changes, C balance, enzyme production, growth and kinetics. *Appl Microbiol Biotechnol.* 46: 489-496.
27. Suhami, M. y H.K. Ong. 2001. Composting empty fruit bunches of oil palm. Food & Fertilizer Technology Center. <http://www.agnet.org/library/eb/505a> (consulta del 25/05/2009).
28. Szendefy, J., G. Szakacs y L. Christopher. 2006. Potential of solid-state fermentation enzymes of *Aspergillus oryzae* in biobleaching of paper pulp. *Enzyme Microbiol Technol.* 39: 1354-1360.
29. Templeton, D. 2002. *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology, and Applications*. Marcel Dekker. New York.
30. Xia, L. y X. Shen. 2004. High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. *Bioresource Technol.* 91: 259-262.
31. Zhiyou, W., L. Wei, y C. Shulin. 2005. Production of cellulase/ β -glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*. *Process Biochem.* 40: 3087-3094.