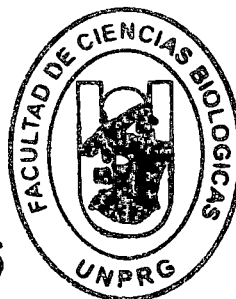




UNIVERSIDAD NACIONAL
"PEDRO RUIZ GALLO"

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA
Y PARASITOLOGÍA**

**"SELECCIÓN DE HONGOS LIGNOCELULOLÍTICOS
PARA OBTENER JARABES GLUCOSADOS EN LA
PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE BAGAZO
DE *Saccharum officinarum* L., "CAÑA DE AZÚCAR",
EN LAMBAYEQUE, 2013"**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA
MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA**

AUTOR:

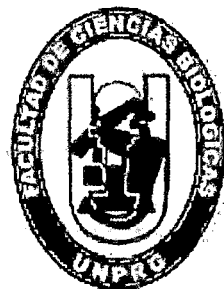
BACH. MIGUEL ANGELLO ORELLANA MERINO

LAMBAYEQUE - PERÚ

2014



**UNIVERSIDAD NACIONAL
PEDRO RUIZ GALLO**



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA**

**SELECCIÓN DE HONGOS LIGNOCELULOLÍTICOS PARA
OBTENER JARABES GLUCOSADOS EN LA
PRODUCCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE BAGAZO
DE *Saccharum officinarum* L., “CAÑA DE AZÚCAR”, EN
LAMBAYEQUE, 2013**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA –
PARASITOLOGÍA**

AUTOR:

BACH. MIGUEL ANGELLO ORELLANA MERINO

**LAMBAYEQUE - PERÚ
2014**

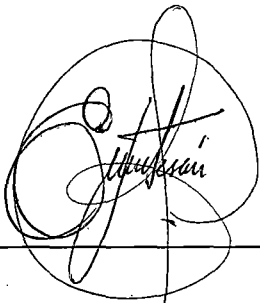
**Selección de hongos lignocelulolíticos para obtener
jarabes glucosados en la producción de bioetanol a partir
de bagazo de *Saccharum officinarum* L., “caña de azúcar”,
en Lambayeque, 2013**

TESIS

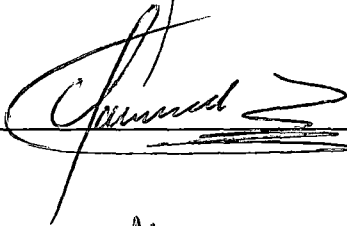
**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO
EN BIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA**

APROBADO POR:

**Dr. Eduardo Julio Tejada Sánchez
PRESIDENTE**



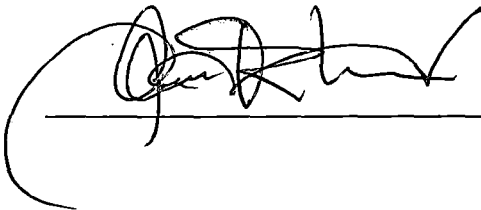
**Dr. César García Espinoza
SECRETARIO**



**Dra. Gianina Llontop Barandiarán
VOCAL**



**Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán
PATROCINADORA**



**LAMBAYEQUE, PERÚ
2014**

Agradecimiento

Agradezco a todas las personas que se vieron involucradas directa e indirectamente en la realización del presente trabajo.

A mis jefes y a la vez amigos **JAIME DÍAZ, FERNANDO FLORES y LESVIA PACHERRES** por su comprensión y apoyo en los momentos en que requería tiempo extra, así como de los medios facilitados para la realización de esta investigación.

El Autor

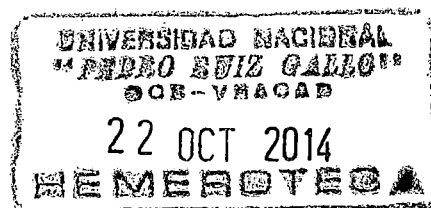
Dedicatoria

Esta dedicatoria va dirigida
fundamentalmente al dador de vida
espiritual y a mis seres amados.

El esfuerzo constante y dedicación que los seres humanos ponemos a las cosas que nos llevan a engrandecer los conocimientos, generan a futuro no solo la recompensa de sentir que hicimos algo para la posteridad sino también alegría en las personas que nos rodean por el resultado alcanzado.

El Autor

Índice



I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	4
	2.1 Antecedentes de la investigación.....	4
	2.2 Base teórica.....	7
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
	3.1 Materiales.....	13
	3.1.1 Material biológico.....	13
	3.1.2 Población y muestra de estudio.....	13
	3.2 Métodos.....	13
	3.2.1 Variables en estudio.....	13
	3.2.2 Tipo de estudio y diseño de la contrastación de hipótesis.....	14
	3.2.3 Lugar de muestreo.....	14
	3.2.4 Obtención y procesamiento de las muestras de suelos.....	14
	3.2.5 Aislamiento de hongos lignolíticos.....	19
	3.2.6 Aislamiento de hongos celulolíticos.....	19
	3.2.7 Valoración de la actividad lignolítica.....	19
	3.2.8 Valoración de la actividad celulolítica.....	27
	3.2.9 Identificación de hongos lignolíticos y celulolíticos.....	34
	3.2.10 Selección de hongos lignolítico y celulolítico.....	34
	3.2.11 Cuantificación de la glucosa obtenida por hidrólisis del bagazo de caña de azúcar.....	37
	3.2.12 Determinación del rendimiento alcohólico de bagazo de caña azúcar hidrolizado por hongos seleccionados.....	41
	3.2.13 Análisis de los datos.....	41
IV.	RESULTADOS.....	47
	4.1 Hongos lignolíticos y celulolíticos aislados.....	47
	4.2 Actividad lignolítica.....	47
	4.3 Actividad celulolítica.....	53
	4.4 Hongos lignolíticos y celulolíticos seleccionados.....	62
	4.5 Glucosa obtenida por hidrólisis del bagazo de caña de azúcar.....	62
	4.6 Rendimiento alcohólico en bagazo de caña de azúcar hidrolizado por hongos lignolítico y celulolítico nativos.....	62
V.	DISCUSIÓN.....	64
VI.	CONCLUSIONES.....	70
VII.	RECOMENDACIONES.....	71
VIII.	RESUMEN.....	72
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
X.	ANEXOS.....	80

Índice de tablas

Tabla 1.	Frecuencia de hongos lignolíticos identificados y seleccionados por el desarrollo micelial en bloque de madera.....	52
Tabla 2.	Actividad peroxidasa y lacasa de hongos lignolíticos nativos.....	55
Tabla 3.	Diámetros de halos de hidrólisis en agar sales minerales-carboximetilcelulosa por actividad endoglucanasa de hongos celulolíticos nativos.....	57
Tabla 4.	Frecuencia de hongos celulolíticos identificados y seleccionados por actividad endoglucanasa y exoglucanasa.....	60
Tabla 5.	Glucosa obtenida del extracto de corteza de <i>Salix</i> sp. por actividad β -glucosidasa de hongos celulolíticos nativos.....	61
Tabla 6.	Glucosa obtenida por la hidrólisis del bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L. con hongos lignolítico y celulolítico seleccionados.....	63
Tabla 7.	Cinética de la producción de etanol con bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L. hidrolizado por <i>Aspergillus niger</i> PU2.5 y <i>Chrysosporium</i> sp. MP5.2.....	63

Índice de figuras

Figura 1.	Ubicación geográfica de la provincia de Chiclayo en la región Lambayeque, noviembre, 2013 https://maps.google.com.pe/	15
Figura 2.	Campo cultivado con <i>Saccharum officinarum</i> L., “caña de azúcar”, en la provincia de Chiclayo, región Lambayeque, 2013.....	16
Figura 3.	Obtención de muestras de suelo cultivado con <i>Saccharum officinarum</i> L., “caña de azúcar” en Lambayeque.....	16
Figura 4.	Muestras de suelo cultivado con <i>Saccharum officinarum</i> L. para el aislamiento de hongos lignocelulolíticos.....	17
Figura 5.	Tamizado de muestra de suelo cultivado con <i>Saccharum officinarum</i> L.....	17
Figura 6.	Muestras de suelo tamizadas para aislamiento de hongos lignocelulolíticos.....	18
Figura 7.	Diluciones de muestras de suelo para aislamiento de hongos lignocelulolíticos.....	18
Figura 8.	Siembra de muestra de suelo en agar sales minerales-lignina.....	20
Figura 9.	Siembra de hongo filamentoso en agar sales minerales-lignina.....	20
Figura 10.	Siembra de hongo lignolítico en agar sales minerales-lignina.....	21
Figura 11.	Siembra de muestra de suelo en agar sales minerales-papel filtro.....	21
Figura 12.	Siembra de hongo filamentoso en agar sales minerales-papel filtro.....	22
Figura 13.	Siembra de hongo celulolítico en agar sales minerales-papel filtro.....	22
Figura 14.	Bloques de madera de <i>Pinus</i> sp. acondicionados.....	24

Figura 15.	Bloques madera en placas Petri.....	24
Figura 16.	Inoculación de suspensión de conidios en bloque de madera.....	25
Figura 17.	Bloques de madera inoculados con hongos filamentosos y depositados en agar agua.....	25
Figura 18.	Incubación de bloques de madera sembrados con hongos lignolíticos nativos.....	26
Figura 19.	Desarrollo micelial de hongos lignolíticos en medio de cultivo CGA.....	28
Figura 20.	Adición de α -naftol sobre halos rojizos de colonias de hongos lignolíticos.....	28
Figura 21.	Desarrollo micelial de hongos celulolíticos seleccionados en agar sales minareles-CMC.....	29
Figura 22.	Adición de rojo congo en colonias de hongos celulolíticos.....	29
Figura 23.	Adición de cloruro de sodio en colonias de hongos celulolíticos.....	30
Figura 24.	Caldo Sales Minerales con tiras de papel filtro Whatman.....	32
Figura 25.	Inoculación de suspensión de conidios en papel filtro Whatman.....	32
Figura 26.	Desarrollo de hongos celulolíticos sobre papel filtro Whatman.....	33
Figura 27.	Siembra de hongo celulolítico en caldo Sales minerales más extracto de la corteza de <i>Salix sp.</i>	35
Figura 28.	Cuantificación de glucosa por método de Glucosa oxidasa.....	35
Figura 29.	Colonias de hongos desarrolladas filamentosos desarrollados en agar papa dextrosa.....	36
Figura 30.	Impresión con cinta adhesiva en colonia de hongo filamentoso.....	36
Figura 31.	Bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L. lavado con agua destilada.....	38

Figura 32.	Secado del bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L.....	38
Figura 33.	Molienda de bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L.....	39
Figura 34.	Bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L. pretratado.....	39
Figura 35.	Proceso fermentativo para la hidrólisis del bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L.....	40
Figura 36.	Prueba de glucosa oxidasa en los hidrolizados de bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L.....	40
Figura 37.	Suspensión de conidios de hongo lignocelulolítico seleccionado.....	42
Figura 38.	Caldo sales minerales con bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L. inoculado con hongos lignolítico y celulolítico.....	43
Figura 39.	Prueba de glucosa oxidasa en hidrolizados de bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L.....	44
Figura 40.	Contaje de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en cámara de contaje de Levy con el rayado de Neubauer.....	44
Figura 41.	Fermentación alcohólica del hidrolizado de bagazo de <i>Saccharum officinarum</i> L.....	45
Figura 42.	Destilación del filtrado obtenido de la fermentación alcohólica.....	45
Figura 43.	Utilización del vinómetro en la medición del grado alcohólico del destilado obtenido.....	46
Figura 44.	Frecuencia de muestras de suelo cultivado con <i>Saccharum officinarum</i> L. positivas al aislamiento de hongos lignolíticos.....	48
Figura 45.	Hongos filamentosos lignolíticos desarrollados en agar sales minerales-lignina.....	48
Figura 46.	Frecuencia de muestras de suelo cultivado con <i>Saccharum officinarum</i> L. positivas al aislamiento de hongos celulolíticos.....	49
Figura 47.	Hongos filamentosos celulolíticos desarrollados en agar sales minerales-celulosa.....	49

Figura 48.	Hongos lignolíticos nativos según el desarrollo micelial en bloques de <i>Pinus</i> sp después de 15 días.....	50
Figura 49.	Hongos lignolíticos desarrollados en bloques de <i>Pinus</i> sp durante 30 días.....	50
Figura 50.	Desarrollo micelial bueno (a), regular (b) y escaso (c) en bloques de <i>Pinus</i> sp.....	51
Figura 51.	Hongos lignolíticos nativos según el desarrollo micelial en bloque de <i>Pinus</i> sp después de 30 días.....	52
Figura 52.	Halo rojizo que denota la actividad peroxidasa del hongo lignolítico.....	54
Figura 53.	Color púrpura que denota la actividad lacasa del hongo lignolítico.....	54
Figura 54.	Halos de hidrólisis que denotan actividad endoglucanasa de hongos celulolíticos.....	56
Figura 55.	Hongos celulolíticos nativos según el desarrollo micelial en papel filtro a los 15 días.....	58
Figura 56.	Hongos celulolíticos desarrollados en papel filtro durante 25 días.....	58
Figura 57.	Desarrollo micelial bueno (a), regular (b) y escaso (c) en papel filtro durante 25 días.....	59
Figura 58.	Hongos celulolíticos nativos según el desarrollo micelial en papel filtro a los 25 días.....	60

I. INTRODUCCIÓN

La disminución de las reservas de petróleo junto con el aumento de las emisiones de los gases de efecto invernadero (GEI) ha dado lugar a un creciente interés en la producción y utilización de combustibles alternativos. Los biocombustibles líquidos bioetanol y biodiesel, obtenidos a partir de biomasa, son los únicos productos renovables que pueden integrarse fácilmente en los actuales sistemas de distribución y son una de las pocas alternativas de diversificación del sector transporte a corto plazo, por lo que son una prioridad en la política energética dirigida a asegurar el suministro energético y reducir las emisiones de GEI (Tomás, 2010).

En el mundo, Estados Unidos y Brasil, producen millones de litros de biocombustibles de primera generación: bioetanol a partir de *Zea mays* L. "maíz" y *Saccharum officinarum* L. "caña de azúcar", cultivos destinados para la alimentación humana, generándose controversia social, económica y política, así como la disminución en la oferta de recursos alimenticios y consecuentemente el aumento en los precios (Castro *et al.*, 2009).

Como alternativa a los biocombustibles de primera generación obtenidos de alimentos, se proponen los biocombustibles de segunda generación a partir de fuentes no comestibles como los residuos agrícolas o cultivos que se puedan sembrar en tierras poco fértiles y que necesiten mínimos de energía para la conversión como *Jatropha curcas* L. “piñón blanco”. La viabilidad para un biocombustible está relacionada con la ganancia energética positiva, competitividad económica, producción en grandes cantidades y sobre todo no competencia con el suministro de alimentos (Hill *et al.*, 2006).

El uso de la biomasa lignocelulósica para la obtención de jarabes glucosados en la producción de biocombustibles es fundamental en la preservación del ambiente, generándose nuevas oportunidades de trabajo y desarrollo sostenible. Aproximadamente 70 % de la biomasa vegetal está compuesta por azúcares de cinco y seis átomos de carbono, encontrándose principalmente en la celulosa y en menor proporción en la hemicelulosa y lignina (Rubin, 2008); no obstante, los complejos lignina-celulosa son difíciles de degradar, requiriéndose pretratamientos físicos (pulverización y pirólisis), físico-químicos (explosión con vapor, amonio y dióxido de carbono), químicos (ozonólisis, hidrólisis ácida, hidrólisis alcalina, deslignificación oxidativa), biológicos y enzimáticos (Saucedo *et al.*, 2010).

El tratamiento biológico de la biomasa lignocelulósica usando hongos, no contamina, es barato y no requiere de infraestructura especializada; sin embargo, tiene la desventaja de ser muy lento, comparado con los métodos físico-químicos. Por ejemplo, la sacarificación del 35 % de los azúcares de paja de *Triticum aestivum* L. “trigo” se produce en 5 semanas, en comparación con las pocas horas que requieren los métodos físico-químicos (Taniguchi *et al.*, 2005). Los resultados son explicados por la inhibición de las celulasas por la glucosa y celobiosa liberadas en el proceso o por los productos formados en el pre-tratamiento de los residuos (Tejada *et al.*, 2011), así como también por la baja efectividad de las celulasas sintetizadas por los hongos. *Trichoderma reesei* se utiliza para la producción de celulasas y hemicelulasas; pero, no puede degradar lignina; en cambio, *Phanerochaete chrysosporium*, *Stropharia*, *Botrytis*, *Daedalea* y *Montierella* presentan sistemas enzimáticos que degradan

el polímero ramificado (Castro *et al.*, 2009). En este contexto, el aislamiento de hongos lignocelulolíticos es una prioridad para la utilización de residuos lignocelulósicos en la obtención de jarabes glucosados.

Por lo expuesto, se planteó el siguiente problema: ¿Cuáles son los hongos seleccionados para obtener jarabes glucosados en la producción de bioetanol a partir de bagazo de caña de azúcar en Lambayeque? Para resolver el problema se planteó como objetivo general seleccionar hongos lignocelulolíticos para obtener jarabes glucosados en la producción de bioetanol a partir de bagazo de caña de azúcar en Lambayeque. Los objetivos específicos fueron: aislar hongos filamentosos lignolíticos y celulolíticos, valorar la actividad lignolítica y celulolítica, identificar los hongos lignolíticos y celulolíticos, seleccionar los dos hongos con mayor actividad lignolítica y celulolítica, cuantificar la glucosa obtenida por hidrólisis de la lignocelulosa del bagazo de caña de azúcar y determinar el rendimiento alcohólico en bagazo de caña hidrolizado por dos hongos lignocelulolíticos nativos. La hipótesis planteada fue: Los hongos seleccionados para obtener jarabes glucosados en la producción de bioetanol a partir de bagazo de caña de azúcar en Lambayeque son filamentosos, con actividad lignolítica y celulolítica.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

2.1 Antecedentes de la investigación

En muestras de suelos agrícolas se obtuvieron 150 aislados de hongos filamentosos celulíticos, entre los que se identificaron 19 géneros. *Penicillium* presentó la mayor frecuencia, con 14,67 %; seguido de *Trichoderma* (13 %), *Aspergillus* (11,33 %), *Chaetomium* (10 %) y *Fusarium* con 6,67 % (Carreño & Flores, 2003). A su vez, en suelos agrícolas se aislaron 70 hongos filamentosos productores de exoglucanasas, entre los que destacaron *Cladosporium* sp. y *Chrysosporium* sp. con 25,71 % de frecuencia. A continuación, se investigó la actividad exoglucanasa sobre papel filtro, determinando 11,43 % con una degradación Muy buena y 75 % de pérdida de peso del papel filtro, mientras que 47,14 % de los hongos presentaron una degradación Buena y 50 % de pérdida de peso de papel filtro. A su vez, 1,43 % de los hongos presentó 60 % de pérdida de peso del papel filtro. Los mayores valores en la concentración de azúcares reductores por actividad sobre el papel filtro (APF) correspondieron a *Aspergillus* sp. FSen0847 y *Cladosporium* sp. FSen0936 con 0,107 UI/mL (Constantino & Manayay, 2005).

El bagazo de *Agave tequilana* Weber o residuo de la elaboración del tequila puede ser utilizado en la producción de químicos de alto valor agregado como el etanol. En el presente estudio se cuantificó 42 % de celulosa, 20 % de

hemicelulosa y 15 % de lignina, utilizándose para la sacarificación una hidrólisis química, seguida de una hidrólisis enzimática. Con el método de superficie de respuesta se optimizaron las condiciones de fermentación, siendo de 147 °C, 2 % de H₂SO₄ como catalizador y 15 minutos de hidrólisis química. A su vez, en la hidrólisis con una mezcla de celulasas de *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger* se determinó 40 °C, 8 % de bagazo y 72 horas. Con estas condiciones se alcanzó 25,74 g/50 g de bagazo tratado para un rendimiento total de 83 % de sacarificación. Los hidrolizados obtenidos se fermentaron con *Saccharomyces cerevisiae* obteniendo 9,27 g/50 g de bagazo y 70,61 % de rendimiento respecto al teórico (Saucedo *et al.*, 2010).

En el beneficio húmedo del café, la pulpa y el mucílago, representan en promedio 60 % del peso, que cuando no se utiliza adecuadamente genera contaminación del ambiente en las zonas cafetaleras. Se investigaron los microorganismos presentes en estos residuos, obteniendo 26 bacterias, 13 hongos filamentosos y dos levaduras. Mediante las pruebas de identificación comercial y el análisis de secuenciación de los productos de amplificación obtenidos por PCR con primers universales RN y RW para bacterias y primers ITS1 e ITS4 para hongos filamentosos y levaduras, se confirmaron *Achromobacter*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Cellulosimicrobium*, *Pseudomonas* y *Promicromonospora*. A su vez, entre los hongos se identificó *Cladosporium lignicola* y *Penicillium brevicompactum*. Este último hongo filamentoso presenta un gran potencial, debido a su producción de pectinasa que cataliza la degradación del compuesto presente en la pared celular de las plantas (Payán, 2011).

En la búsqueda de materias primas para la producción de biocombustibles se investigaron los residuos de poda. Para la obtención de jarabes glucosados que potencialmente podrían ser convertidos en bioetanol se aplicaron dos metodologías: la hidrólisis ácida, con ácido sulfúrico diluido y la hidrólisis enzimática con celulasas, obteniéndose conversiones de 10 – 30 y 8,83 gL⁻¹, respectivamente. Se demostró la posibilidad de obtener biocombustibles a partir de residuos lignocelulósicos, requiriéndose la

optimización del proceso para incrementar el rendimiento en la producción de glucosa (Tejada *et al.* 2011).

El material lignocelulósico es uno de las fuentes más abundantes, renovables y de bajo costo para la producción de bioetanol. La celulosa y la hemicelulosa son las fracciones de mayor interés, por lo que se investigaron *Trichoderma reesei* (MTCC-4876), *Phanerochaete chrysosporium* (MTCC-787) y *Aspergillus awamori* (MTCC-6652) para la sacarificación de paja de arroz, trigo y cáscara de arroz. La concentración de los sustratos fue de 5 g/150 ml y el cultivo se realizó a 30 °C, en agitación constante. Las mayores concentraciones de azúcares se alcanzaron con paja de arroz, siendo de 73,70 mg/g con *T. reesei*, 62,7 mg/g con *A. awamori* y 57,73 mg/g con *P. chrysosporium*. A su vez, con los tres hongos en conjunto se alcanzaron 112,50 mg/g de azúcares reductores y posteriormente en la fermentación alcohólica con *Zymomonas mobilis* se obtuvo 9,5 gL⁻¹ de etanol equivalentes a 25 % de etanol (Srivastava & Agrawal, 2012).

El gras es abundante en muchas regiones climáticas en el mundo y es considerado como maleza en algunas de ellas. En el presente estudio se investigó el uso de *Pennisetum purpureum* (gras Napier) en la producción de bioetanol. Para romper la lignina se consideró un tratamiento alcalino por inmersión en NaOH 7 % y un tratamiento biológico por crecimiento de *Phanerochaete chrysosporium* durante 3 semanas. Ambos productos fueron hidrolizados con *Trichoderma reesei* ATCC 26921, observándose que el contenido de glucosa en las muestras tratadas con álcali fue 1,6 veces mayor que el tratamiento con hongo. De igual manera, en el etanol obtenido por fermentación con *Escherichia coli* K011, el tratamiento químico superó en 1,5 veces al biológico; no obstante, la eficiencia de conversión etanólica fue de 18,5 g g⁻¹ con el tratamiento biológico, frente a 15,2 g g⁻¹ con el NaOH, concluyéndose que con la optimización del proceso se puede incrementar la glucosa y rendimiento etanólico mediante el uso de hongos lignocelulolíticos (Liong *et al.*, 2012).

2.2 Base teórica

a. Material lignocelulósico: bagazo de caña de azúcar

La lignocelulosa constituida por celulosa, hemicelulosa y lignina, es el principal componente de la biomasa vegetal. La celulosa es un polímero de D-glucosa unida por enlaces glucosídicos β -1,4, que se estructuran en largas cadenas lineales o microfibrillas unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals intramoleculares, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática. La hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa), que forman cadenas ramificadas y los ácidos 4-O-metilglucorónico, D-galacturónico y D-glucorónico. Por su parte, la lignina es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado, formado por alcoholes aromáticos que dan soporte estructural, rigidez, impermeabilidad y protección a los polisacáridos estructurales (Mejía *et al.*, 2002; Cuervo *et al.*, 2009; Ferrer *et al.*, 2011).

La conversión de la lignocelulosa a etanol involucra el pre-tratamiento (procesamiento e hidrólisis), detoxificación de la hemicelulosa, sacarificación enzimática de la celulosa, fermentación y recuperación del etanol (destilación y deshidratación). Cualquier biomasa lignocelulósica en su forma nativa, es resistente a la sacarificación enzimática, por lo que estos residuos necesitan ser pre-tratados para facilitar la depolimerización de la celulosa e hidrolizar la hemicelulosa. Así pues, el objetivo del procesamiento consiste, por un lado, en incrementar el área expuesta de la materia prima, permitiendo con ello una mayor accesibilidad de las enzimas que hidrolizan la celulosa y por otro, generar jarabes de azúcares ricos en pentosas y hexosas (Saha, 2004; Carreón *et al.*, 2009).

El bagazo es el subproducto o residuo de la molienda o difusión de la caña, la fibra leñosa de la caña, en el que permanecen el jugo residual y la humedad provenientes del proceso de extracción. En la práctica aproximadamente la mitad es fibra y la otra mitad es jugo residual con variaciones que resultan de los procesos de la molienda y de la variedad y

calidad de la caña (Chen, 1997). Es considerado un residuo agroindustrial que contiene 45,51 – 45,66 % de fibra bruta; 90,95 – 90,98 % de fibra neutra detergente (FND); 59,88 – 59,92 % de fibra ácido detergente (FAD), 47,49 – 47,88 % de celulosa y 31,07 – 31,98 % de hemicelulosa. También contiene 27,22 % \pm 0,8 % de lignina klason (Mesa *et al.*, 2009). En que su composición química se ha determinado 24,8 % de carbono, 2,53 % de hidrógeno, 21,43 % de oxígeno, 0,25 % de azufre, 2,03 % de cenizas, 44,42 % de humedad, 4, 17 % de carbono fijo, 97,27 % de volátiles y 2,15 % de ceniza (Díaz, 2008).

b. Biodegradación del material lignocelulósico

Existen dos tipos de sistemas enzimáticos extracelulares: los que producen hidrolasas que degradan la celulosa (celulasas) y la hemicelulosa (hemicelulasas) y los que despolimerizan la lignina por reacciones de oxidación (peroxidasas y lacasas). Los hongos basidiomicetes y las bacterias aerobias degradan el material celulósico a través de la producción de celulasas extracelulares. En este grupo se encuentran las bacterias *Cellulomonas* y *Streptomyces*, los basidiomicetes responsables de la pudrición de la madera como *Sclerotium rolfsii*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Vorvariella volvacea*, *Schizophyllum commune*, *Pycnoporus sanguineus*, *Bjerkandera adusta* y ascomicetos como *Trichoderma reesei* y especies de *Aspergillus* y *Penicillium*. Por su parte, los hongos y bacterias anaerobias degradan la celulosa a través de celulosomas, destacando los hongos *Anaeromyces mucronatus*, *Coecomycetes communis* y *Cyllumycetes aberencis*, *Neocallimastix frontalis*, *Orpinomyces* sp. y *Piromyces* sp. (Lynd *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2002; Cuervo *et al.*, 2009).

Las celulasas son sintetizadas por una gran variedad de bacterias y hongos, pero relativamente pocos microorganismos pueden producir las enzimas necesarias para degradar la celulosa cristalina. Los hongos filamentosos son responsables de la mayor celulosis en la naturaleza, por la eficiencia y diversidad de sus sistemas celulolíticos y sus ventajas adaptativas. Las especies más estudiadas pertenecen al género *Trichoderma*, considerando uno de los mayores productores de enzimas, aunque especies de *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Neurospora*, también son buenos

productores de celulasas. Por su parte, la mayoría de los estudios concernientes a la naturaleza, modo de acción y aspectos generales de las celulasas han sido realizados usando *Trichoderma reesei*; sin embargo, la búsqueda de una eficiente y posiblemente mejor fuente de celulasas continúa, debido a la baja actividad β -glucosidasa, limitante de la velocidad y extensión de la hidrólisis (Ferrer *et al.*, 2011).

La molécula de lignina, de estructura química aromática, sintetizada por la polimerización oxidativa de tres tipos principales de alcoholes cinamílicos hidroxilados: p-cumaril, coniferil, sinapil, cuya estructura se caracteriza por tener un grupo hidroxilo libre en la posición 4 del anillo aromático. La complejidad química de la lignina hace que las enzimas hidrolíticas presenten mecanismos de acción no específicos que oxidan los anillos aromáticos constituyentes del polímero. Las enzimas son: lignina peroxidasa, peroxidasa dependiente de manganeso y lacasa. Otras enzimas asociadas son la glioxal oxidasa y superóxido dismutasa (Castro *et al.*, 2009). Los principales hongos lignolíticos son los basidiomicetos de la podredumbre blanca. Especies como *Phanerochaete chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathus stercoreus*, *Ceriporiosis stercoreus*, *Ceriporiosis subvermispora*, *Pycnoporus cinnabarinus* y *Pleurotus ostreatus* han sido examinados sobre diferente biomasa lignocelulósica mostrando elevada eficiencia de degradación del polímero (Liong *et al.*, 2012).

c. Biocombustibles y su normatividad

Los biocombustibles líquidos son compuestos de la química orgánica (alcoholes, éteres, ésteres, ácidos grasos) producidos a partir de materia vegetal como las plantas herbáceas, oleaginosas y leñosas, residuos de la agricultura y actividad forestal, residuos residenciales, comerciales e industriales como los aceites comestibles que ya cumplieron su ciclo de uso y los subproductos o residuos grasos y aceitosos de la industria alimentaria y ganadera. La principal forma de utilización de los biocombustibles líquidos es como combustibles únicos o en mezcla en motores a gasolina y diésel. En el Perú se vienen utilizando los biocombustibles líquidos Alcohol Carburante y

Biodiesel. Ambos contribuyen a la diversificación de la matriz energética y a la disminución de las emisiones de gases de efecto invernadero (MINEM, 2010).

Alcohol carburante se define como el etanol anhidro desnaturalizado, obtenido de la mezcla del etanol anhidro con una sustancia desnaturalizante en capacidad volumétrica no inferior a 2 % ni superior a 3 % en el caso de ser gasolina sin contenido de plomo. A su vez, Gasohol es la mezcla que contiene gasolina (de 97, 98, 90, 84 octanos y otros según sea el caso) y alcohol carburante. Por su parte, el Biodiesel es el combustible compuesto de ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadenas largas, derivadas de recursos renovables como aceites vegetales o grasas animales para ser usados en motores del ciclo diésel. Cuando el biodiesel es puro, sin mezcla alguna y cumple con las especificaciones detalladas en las Normas Técnicas Peruanas se denomina Biodiesel B100. A su vez, Diésel BX es la mezcla que contiene Diésel N°2 y Biodiesel puro, donde X representa el porcentaje en base volumétrica de Biodiesel puro contenido en la mezcla, siendo el diferencial volumétrico el porcentaje de Diésel N°2 o Diésel con menos de 50 ppm de azufre (MINEM, 2010; SPDA, 2011; MINEM, 2011).

El comité multisectorial de bioenergía conformado por el Ministerio de Agricultura, Ambiente, Energía y Minas, Producción así como por Industrias del Espino, MAPLE, PetroPerú, PROINVERSION REPSOL, Sociedad Nacional de Industrias y Sociedad Peruana de Derecho Ambiental, teniendo como coordinador al Ministerio de Energía y Minas en su primer informe de 2010 y segundo informe de 2011 mencionan la normatividad sobre los biocombustibles. La ley 28054, Ley de Promoción de Mercado de Biocombustibles promulgada en 2003 estableció el marco general para promover dicha actividad con base a la libre competencia y acceso al mercado, con el objetivo de diversificar el mercado de biocombustibles, fomentar el desarrollo agropecuario y agroindustrial, así como generar empleo, disminuir los niveles de contaminación ambiental, además de constituir una alternativa ante el cultivo ilícito de la hoja de coca.

El Reglamento de la Ley 28054, aprobado mediante Decreto Supremo N° 013-2005-EM promueve la inversión para la producción y comercialización de biocombustibles difundiendo las ventajas económicas, sociales y ambientales de su uso. Así mismo, establece los requisitos técnicos de seguridad para su producción y distribución, de modo que salvaguarde la salud pública y el medio ambiente y coadyuve a la Estrategia Nacional de Lucha Contra las Drogas, promoviendo la inversión en cultivos alternativos en las zonas cocaleras del Perú.

El Decreto Supremo N° 021-2007-EM aprobó el Reglamento para la Comercialización de Biocombustibles, el cual tiene como objetivo establecer los requisitos para la comercialización y distribución de los Biocombustibles, así como lo referente a las Nomas Técnicas de Calidad del Alcohol Carburante, Biodiesel B100, Gasohol y Diésel BX. También se establece la obligación de comercialización de Biodiesel B100 mezclado con Diésel 2 en una proporción de 2 % (Diésel B2) a partir del 01 de enero de 2009 y de alcohol carburante en la gasolina en una proporción de 7,8 % (Gasohol) a partir de 01 de enero de 2010. A su vez, mediante DS N° 091-2009-EM, se modificaron artículos del Reglamento para la Comercialización de Biocombustibles y entre otras disposiciones se establece un cronograma para la implementación de uso de Gasohol de manera progresiva en el territorio nacional, iniciando el 01 de enero de 2010 en Piura y Chiclayo

La Ley 27446 del Sistema Nacional de Evaluación del Impacto Ambiental (SEIA) establece un proceso uniforme que comprende los requerimientos, etapas y alcances de las evaluaciones del impacto ambiental de los proyectos de inversión. Su reglamento aprobado mediante DS N°019-2009.MINAM establece un listado de inclusión de los proyectos de inversión sujetos al sistema, como son los proyectos de inversión de plantas de biocombustibles (biodiesel B100, alcohol carburante), correspondientes al Subsector Industrial del Ministerio de la Producción, en su condición de entidad competente, conforme al artículo N°18 de la Ley del SEIA. La producción y uso de biocombustibles es de carácter multisectorial y entre los organismos competentes están el Ministerio de Agricultura-MINAG que provee las áreas

disponibles con actitud agrícola para la producción de biocombustibles, el Ministerio de Energía y Minas-MINEM que autoriza la comercialización de biocombustibles y sus mezclas con gasolina y el diésel 2, PRODUCE que autoriza la instalación y funcionamiento de las plantas productoras, Pro Inversiones que promueve los proyectos PROBIOCH y PROAMAZONIA y el Organismo Supervisor de la Inversión en Energía y Minería-OSINERMIN que controla y fiscaliza.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Material biológico

El material biológico estuvo constituido por muestras de suelo agrícola, hongos filamentosos nativos y un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*.

3.1.2 Población y muestra de estudio

Se consideró como población a los hongos lignocelulolíticos de los suelos agrícolas de la provincia de Chiclayo y se trabajó con una muestra de hongos aislados de 54 unidades de muestreo, colectadas durante noviembre, 2013 – enero, 2014. El número de muestras fue calculado según fórmula mencionada por Alvitres (2000), tomando en cuenta 90 % de prevalencia, determinada por el autor en un muestreo piloto (Anexo 1).

3.2 Métodos

3.2.1 Variables en estudio

Las variables fueron los hongos filamentosos lignocelulolíticos nativos.

3.2.2 Tipo de estudio y diseño de la contrastación de hipótesis

El trabajo de investigación fue descriptivo y transeccional (Hernández *et al.*, 2003) y para contrastar la hipótesis se utilizó el diseño de una sola casilla (Alvitres, 2000), según la cual se aislaron hongos lignocelulolíticos, se investigó la degradación de lignina y celulosa, se cuantificó la glucosa obtenida por hidrólisis de la lignocelulosa y se determinó el rendimiento alcohólico.

3.2.3 Lugar de muestreo

Para aislar hongos filamentosos se colectaron 54 muestras de suelos agrícolas destinados a la siembra de caña de azúcar en la provincia de Chiclayo (Figura 1). La provincia de Chiclayo está ubicada en la región Lambayeque, entre las coordenadas 6° 28' 45" y 7° 10' 27" latitud Sur, 79° 07' 09" y 79° 56' 38" longitud Oeste (MPCH, 2010).

3.2.4 Obtención y procesamiento de las muestras de suelo

Para la obtención de las muestras, según Carreño & Flores (2002), en cada campo cultivado con caña de azúcar, previamente seleccionado y a una profundidad de 10 cm, se colectaron cuatro submuestras de suelo hasta completar 1 kg (Figuras 2, 3). A continuación, las muestras fueron depositadas en bolsas de polietileno (Figura 4), debidamente etiquetadas e inmediatamente se transportaron para su procesamiento en la sección de Biotecnología Microbiana del Laboratorio Microbiología y Parasitología, en la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, en Lambayeque.

Cada muestra de suelo fue tamizada (malla de 2 mm), del material obtenido se tomaron 10 g, se depositaron en frascos con 90 mL de solución salina esterilizada (NaCl 0,85 %, p/v) más Tween 80 al 0,1 % (Figuras 5, 6) y la suspensión fue homogenizada por 20 minutos, constituyendo la dilución 10^{-1} (Figura 7).

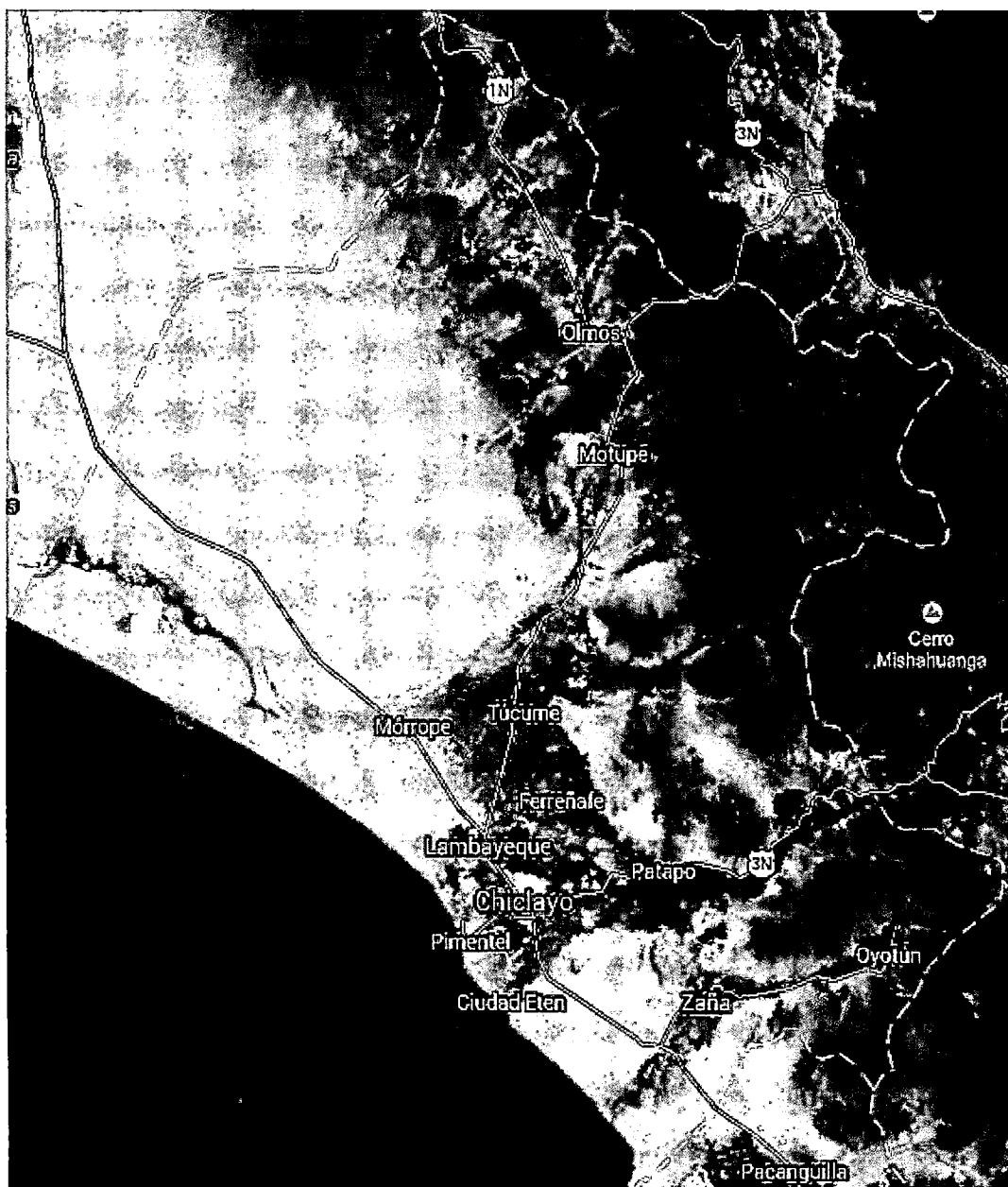


Figura 1. Ubicación geográfica de la provincia de Chiclayo en la región Lambayeque, noviembre, 2013 (<https://maps.google.com.pe/>).



Figura 2. Campo cultivado con *Saccharum officinarum* L., “caña de azúcar”, en la provincia de Chiclayo, región Lambayeque, 2013.



Figura 3. Obtención de muestras de suelo cultivado con *Saccharum officinarum* L., “caña de azúcar” en Lambayeque.



Figura 4. Muestras de suelo cultivado con *Saccharum officinarum* L. para el aislamiento de hongos lignocelulolíticos.

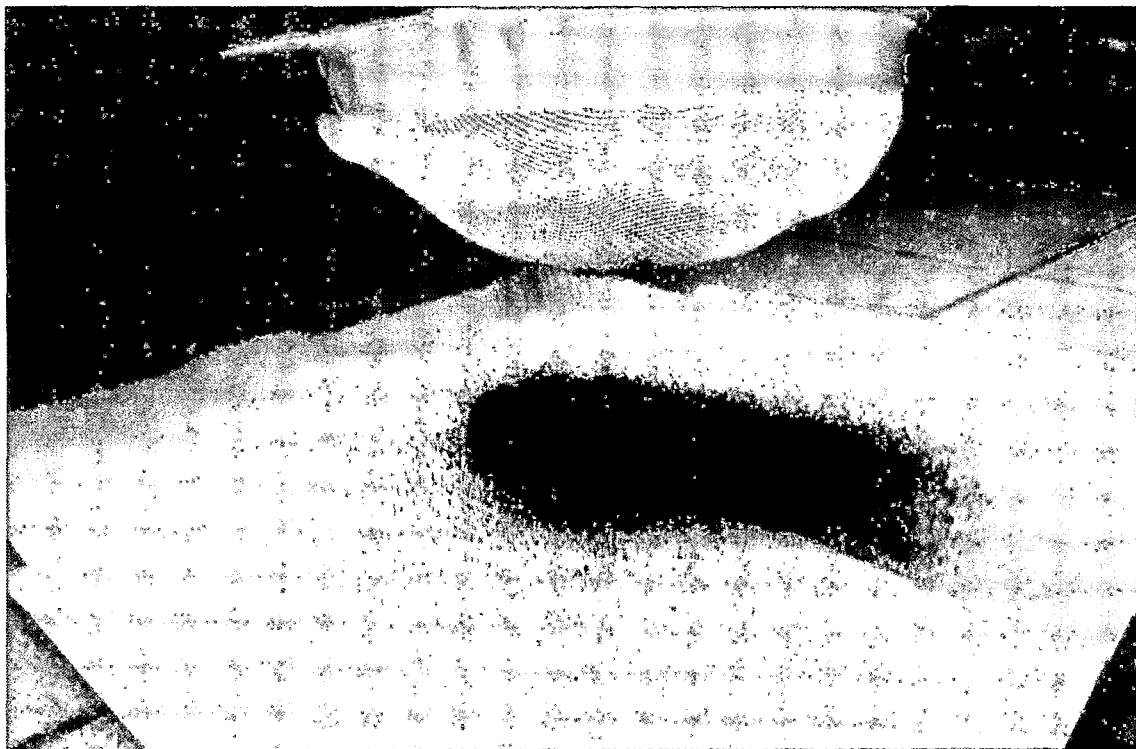


Figura 5. Tamizado de muestra de suelo cultivado con *Saccharum officinarum* L.

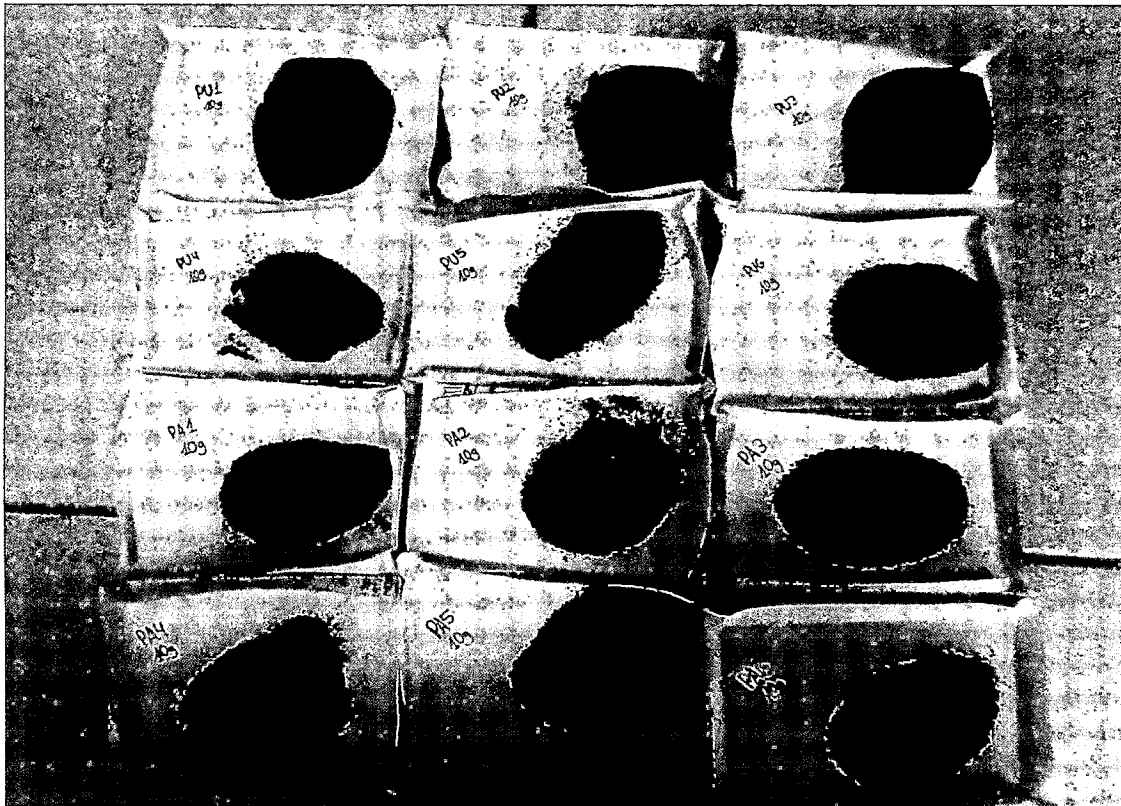


Figura 6. Muestras de suelo tamizadas para el aislamiento de hongos lignocelulolíticos.



Figura 7. Diluciones de muestras de suelo para el aislamiento de hongos lignocelulolíticos.

3.2.5 Aislamiento de hongos lignolíticos

Para el aislamiento de hongos filamentosos lignolíticos, según Rajan *et al.* (2005), modificado por el autor, de cada suspensión acuosa de suelo, se tomó una alícuota, se sembró mediante la técnica de agotamiento y estría en agar sales minerales-lignina al 0,2 % más cloranfenicol (Figura 8, anexo 2) y se incubó en aerobiosis, a 30 °C, durante 5 días. Las colonias de hongos filamentosos desarrolladas, fueron cultivadas nuevamente en placas de Petri con agar sales minerales-lignina al 0,2 %, en aerobiosis, a 30 °C, durante 5 días y posteriormente en viales con el mismo medio, durante 72 horas (Figuras 9, 10), constituyendo los cultivos puros de hongos lignolíticos que fueron guardados en refrigeración a 8 °C.

3.2.6 Aislamiento de hongos celulolíticos

Para el aislamiento de hongos filamentosos celulolíticos, según Collazos & Ortiz (2014), modificado por el autor, de cada suspensión acuosa de suelo, se tomó una alícuota, se sembró mediante la técnica de agotamiento y estría en agar sales minerales-papel filtro 1 % más cloranfenicol (Figura 11, anexo 3), se incubó en aerobiosis, a 30 °C, durante 5 días. Las colonias de hongos filamentosos desarrollados fueron cultivadas nuevamente en placas de Petri con agar sales minerales-papel filtro 1 %, en aerobiosis, a 30 °C, durante 5 días y posteriormente en viales con el mismo medio, durante 72 horas (Figuras 12, 13), constituyendo los cultivos puros de hongos celulolíticos que fueron guardados en refrigeración a 8 °C.

3.2.7 Valoración de la actividad lignolítica

Para la valoración de la actividad lignolítica de los hongos filamentosos nativos, según Saldarriaga & Pineda (2001), modificada por el autor, se calificó el desarrollo micelial en bloques de madera, se seleccionaron e identificaron los hongos con mayor desarrollo y se detectó la actividad de las enzimas peroxidasa y lacasa *in vitro* de los hongos seleccionados.



Figura 8. Siembra de muestra de suelo en agar sales minerales-lignina.



Figura 9. Siembra de hongo filamentoso en agar sales minerales-lignina.



Figura 10. Siembra de hongo lignolítico en agar sales minerales-lignina.



Figura 11. Siembra de muestra de suelo en agar sales minerales-papel filtro.



Figura 12. Siembra de hongo filamentososo en agar sales minerales-papel filtro.



Figura 13. Siembra de hongo celulolítico en agar sales minerales-papel filtro.

a. Desarrollo de hongos filamentosos en bloques de madera

Para calificar el desarrollo micelial, bloques de madera de *Pinus* sp. “pino” de 4 x 1 x 0,5 cm, se esterizaron en autoclave a 121 °C, 15 libras de presión por 20 minutos. Para la obtención del inóculo, cada hongo lignolítico se sembró en agar papa dextrosa (PDA) a 30 °C, por 72 horas y luego se obtuvo una suspensión de conidios en solución salina esterilizada (NaCl 0,85 %, p/v), que se estandarizó a 2×10^7 células mL⁻¹, con ayuda de la cámara de conteo de Levy con el rayado de Neubauer (Figura 14, anexo 4).

A continuación, los bloques de madera se depositaron independientemente en placas de Petri esterilizadas, sobre ellos se vertieron 2,5 mL del inóculo y luego se llevaron a frascos de vidrio conteniendo 20 mL de agar agua inclinado, ubicándolos de tal manera que el agar fue el soporte de un extremo del bloque y la pared del frasco el soporte del otro extremo (Figuras 15 a 17, anexo 5). Después de incubar a 30 °C, se realizó la valoración del desarrollo micelial sobre el bloque de madera, a los 15 y 30 días (Figura 18), calificándolo según una escala convencional elaborada por el autor donde 0 – 25 % del área colonizada correspondió a desarrollo escaso, 26 – 50 % a desarrollo regular y 51 – 100 % a desarrollo bueno.

Escala convencional para calificar el desarrollo micelial sobre bloques de madera

Área colonizada (%)	Calificativo
0 – 25	Escaso
26 – 50	Regular
51 – 100	Bueno



Figura 14. Bloques de madera de *Pinus* sp. acondicionados.



Figura 15. Bloques de madera en placas de Petri.

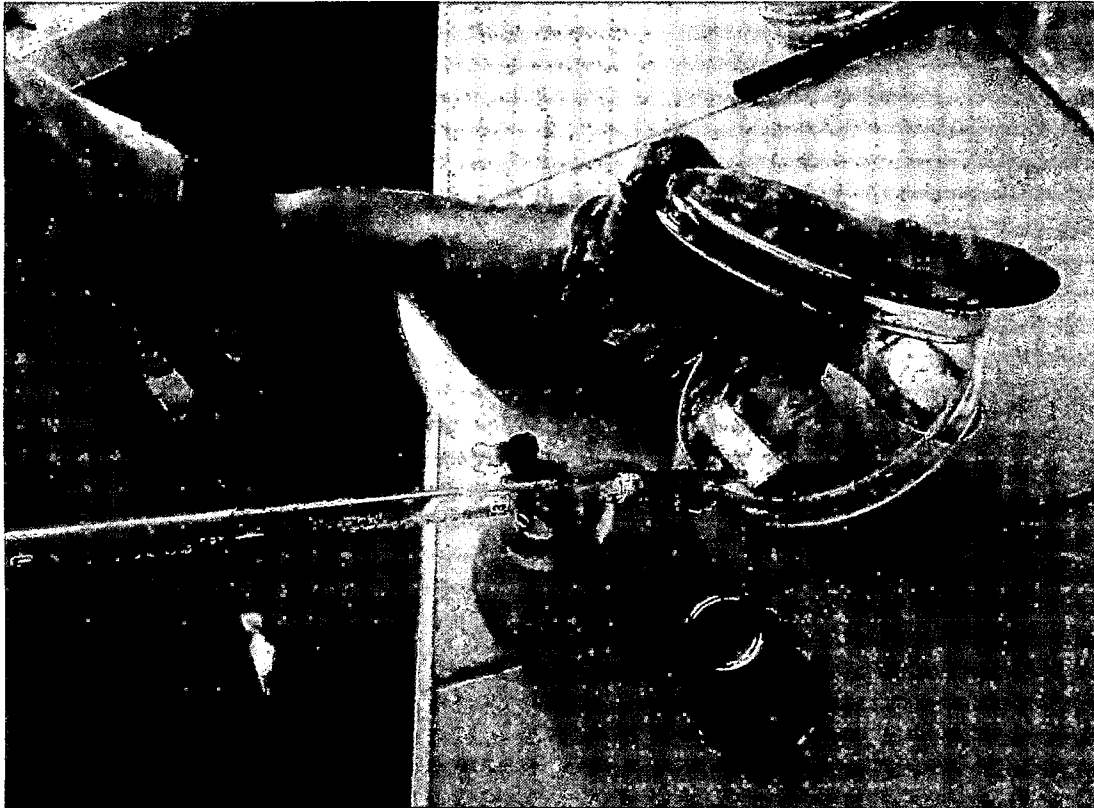


Figura 16. Inoculación de suspensión de conidios en bloque de madera.

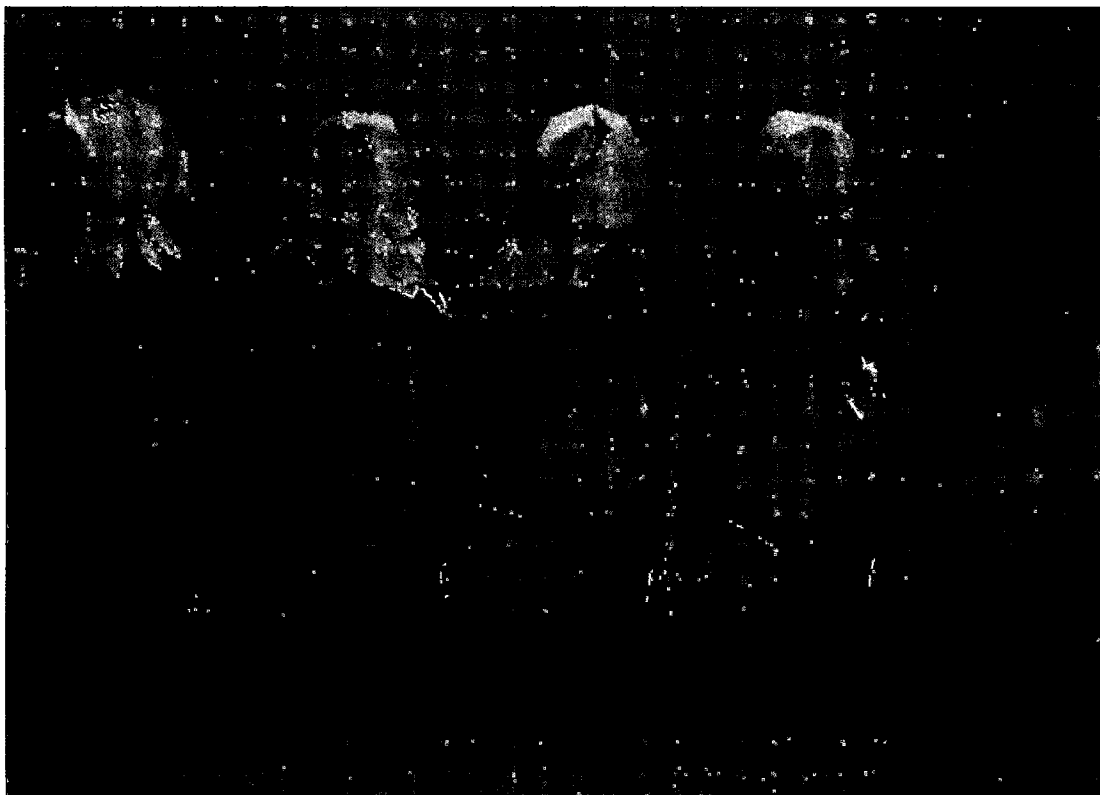


Figura 17. Bloques de madera inoculados con hongos filamentosos y depositados en agar agua.



Figura 18. Incubación de bloques de madera sembrados con hongos lignolíticos nativos.

b. Selección preliminar de hongos lignolíticos

Los hongos lignolíticos que presentaron un buen desarrollo micelial, correspondiente a una colonización del 51 – 100 % del área del bloque de madera a los 30 días, fueron identificados y seleccionados para la detección de la actividad peroxidasa y lacasa.

c. Detección de actividad enzimática lignolítica

Para detectar la actividad enzimática lignolítica según Okino *et al.* (2001), modificado por el autor, cada hongo lignolítico seleccionado fue sembrado por duplicado en el centro de placas de Petri con medio de cultivo CGA modificado (Anexo 6). Después de 7 días de incubación a 30 °C, en una de las placas se investigó la presencia de halos rojizos, alrededor de las colonias, producto de la actividad peroxidasa de los hongos sobre el guayacol (Figura 19). En la otra placa se agregó 1 mL de α -naftol 0,1 M, en el halo rojizo de cada colonia y después de 24 horas, en oscuridad, se observó un viraje al color púrpura, producto de la actividad lacasa (Figura 20).

3.2.8 Valoración de la actividad celulolítica

En la valoración de la actividad celulolítica de los hongos filamentosos, según Constantino & Manayay (2005), modificado por el autor, se investigó la actividad endoglucanasa en agar carboximetilcelulosa, exoglucanasa o actividad en papel filtro y β -glucosidasa en caldo sales minerales con extracto de la corteza de *Salix* sp.

a. Actividad endoglucanasa

Para cuantificar la actividad endoglucanasa según el método descrito por Gaitán & Pérez (2007), modificado por el autor, cada hongo celulolítico fue sembrado en placas de Petri con agar sales minerales-carboximetilcelulosa 1 % (CMC 1 %). Transcurridos 5 días de incubación, a 30 °C, se agregaron 5 mL de rojo congo al 1 % (p/v) como revelador de las colonias desarrolladas en el medio y luego de 15 minutos se retiró el exceso con tres lavados de agua destilada. A continuación, se agregaron 5 mL de NaCl 0,1 M, se dejó reposar 15 minutos y se midió el diámetro de los halos de hidrólisis (Figuras 21 a 23, anexo 7).

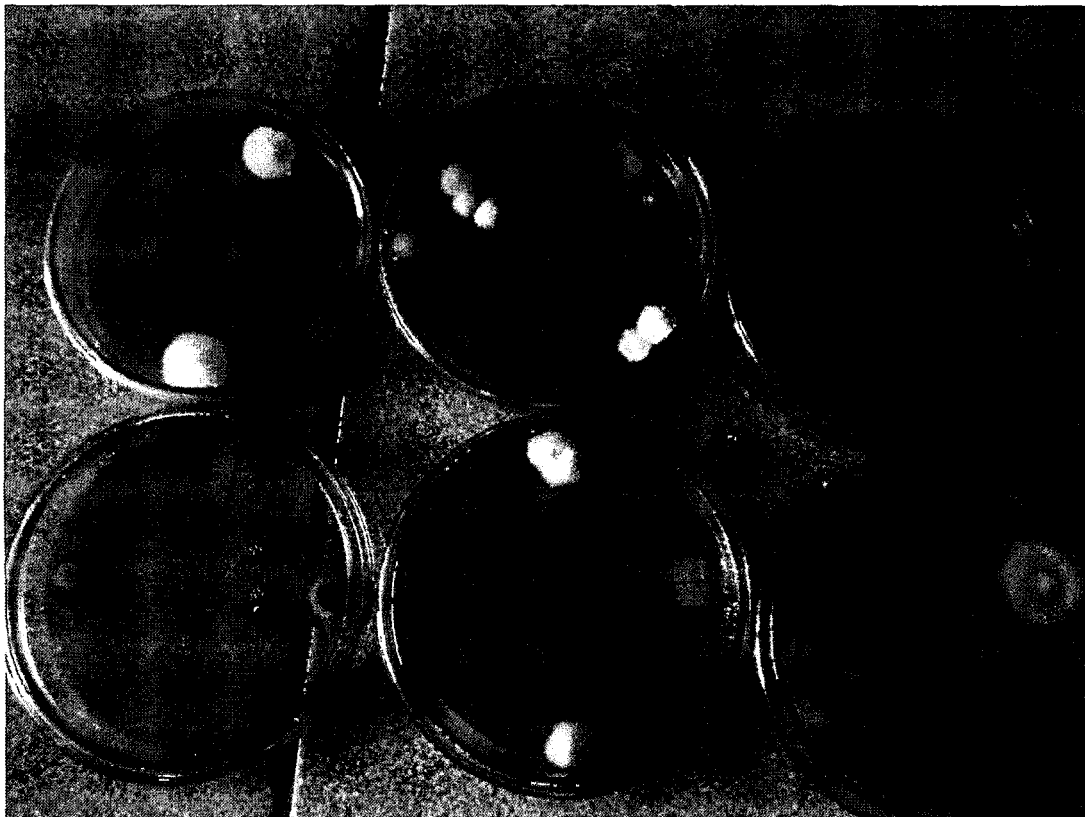


Figura 19. Desarrollo micelial de hongos lignolíticos en medio de cultivo CGA.



Figura 20. Adición de α -naftol sobre halos rojizos de colonias de hongos lignolíticos.

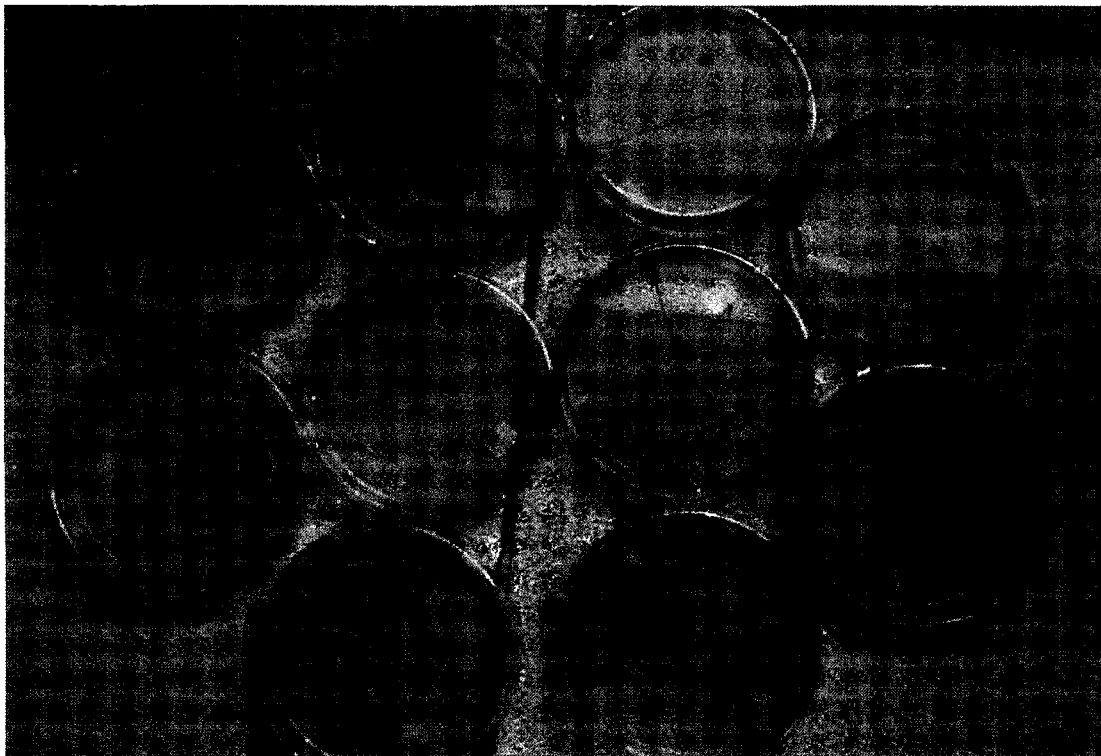


Figura 21. Desarrollo micelial de hongos celulolíticos seleccionados en agar sales minerales-CMC.

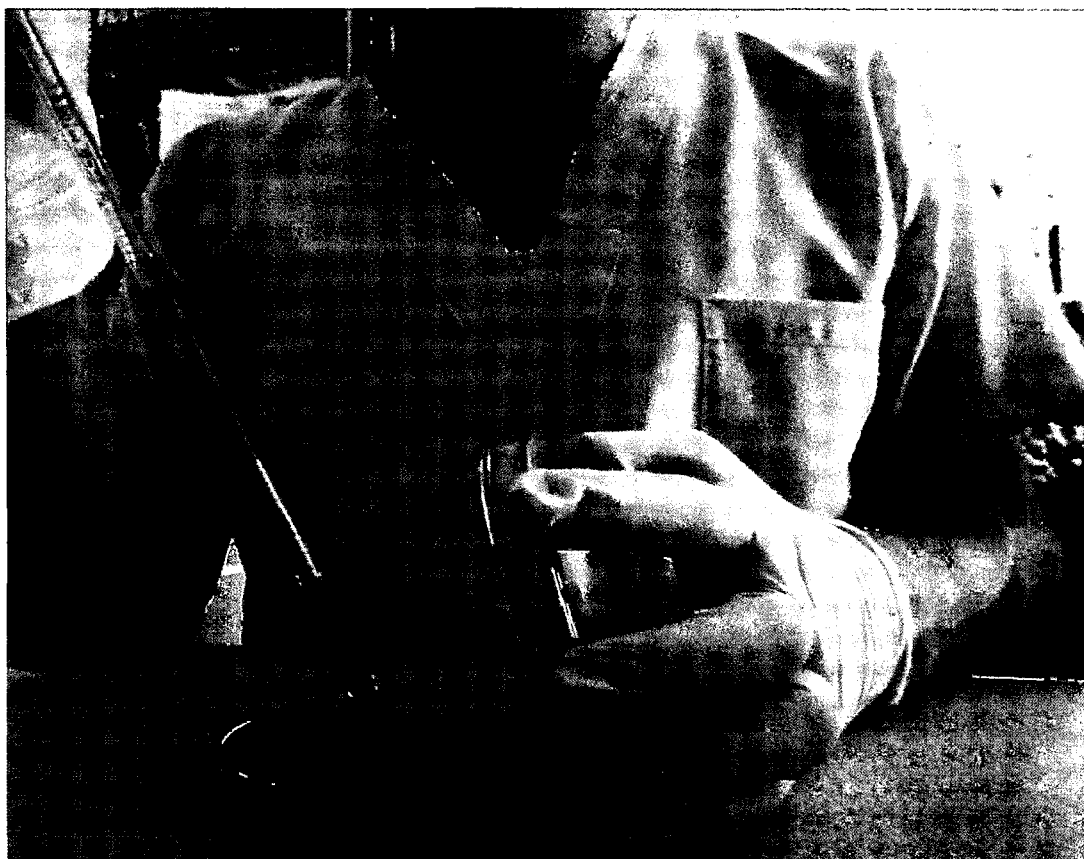


Figura 22. Adición de rojo congo en colonias de hongos celulolíticos.

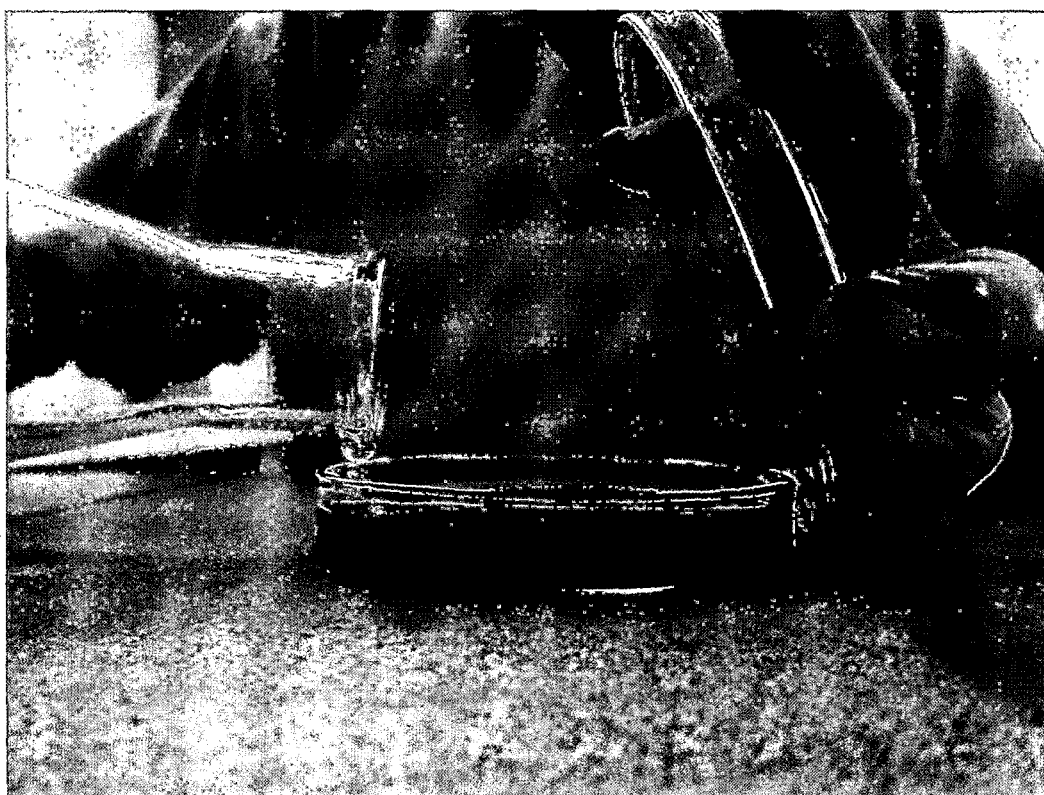


Figura 23. Adición de cloruro de sodio en colonias de hongos celulolíticos

b. Actividad exoglucanasa

En tubos de ensayo de 20 mL de capacidad, conteniendo 2 mL de caldo Sales Minerales, se depositaron verticalmente tiras de papel filtro Whatman N° 1, de 6 x 1 cm, previamente esterilizados (Figura 24, anexo 8). Cada hongo celulolítico se sembró en PDA a 30 °C, por 72 horas y luego se obtuvo una suspensión de conidios en solución salina esterilizada (NaCl 0,85 %, p/v), que se estandarizó a 2×10^7 células mL⁻¹, con ayuda de la cámara de conteo de Levy con el rayado de Neubauer. Después, cuidadosamente, se inocularon 0,2 mL de la suspensión de conidios, tratando que se distribuya uniformemente en el papel filtro y los tubos fueron incubados a 30 °C, agitándolos cada semana, por 25 días (Figura 25).

Después de 15 y 25 días de incubación se observó el desarrollo del micelio sobre el papel filtro (Figura 26) y se calificó con una escala convencional elaborada por el autor, donde 0 – 50 % del área colonizada correspondió a desarrollo escaso, 51 – 80 % a desarrollo regular y 81 – 100 % a desarrollo bueno.

Escala convencional para calificar el desarrollo micelial sobre papel filtro

Área colonizada (%)	Calificativo
0 – 50	Escaso
51 – 80	Regular
81 – 100	Bueno

c. Selección preliminar de hongos celulolíticos

Los hongos celulolíticos que presentaron actividad endoglucanasa y desarrollo micelial bueno, correspondiente a una colonización de 81 – 100 % del área del papel filtro, a los 25 días fueron seleccionados e identificados para determinar la actividad β -glucosidasa.

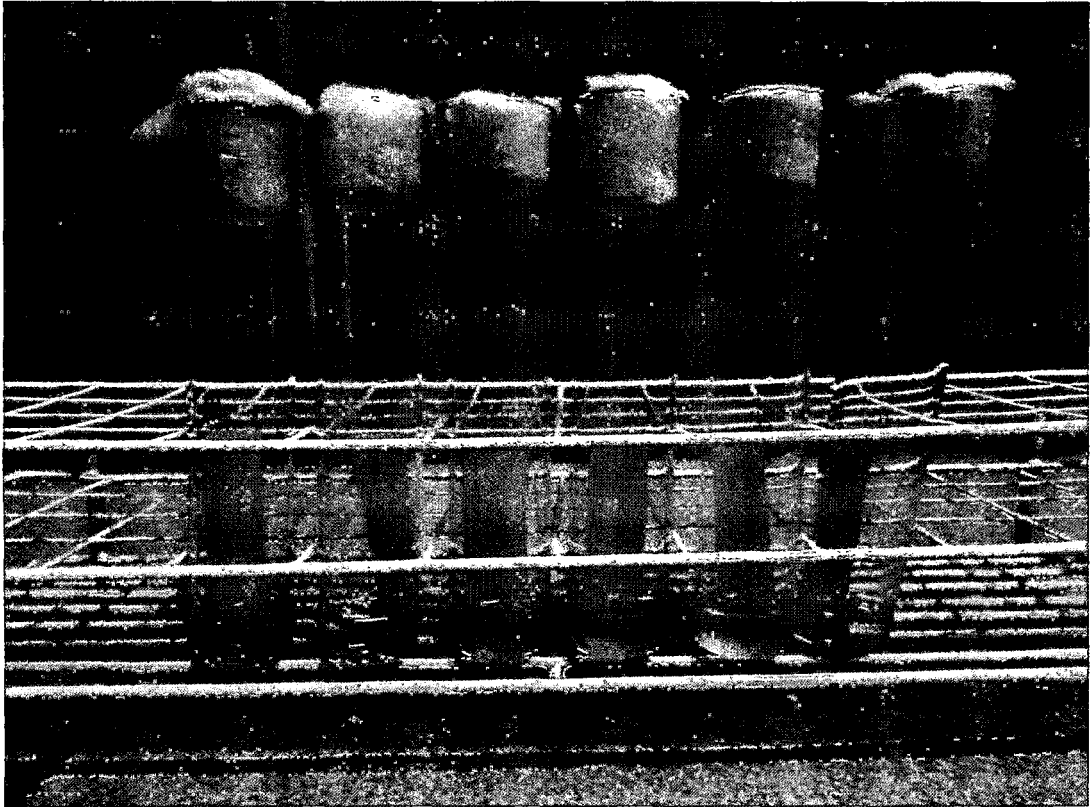


Figura 24. Caldo Sales Minerales con tiras de papel filtro Whatman.

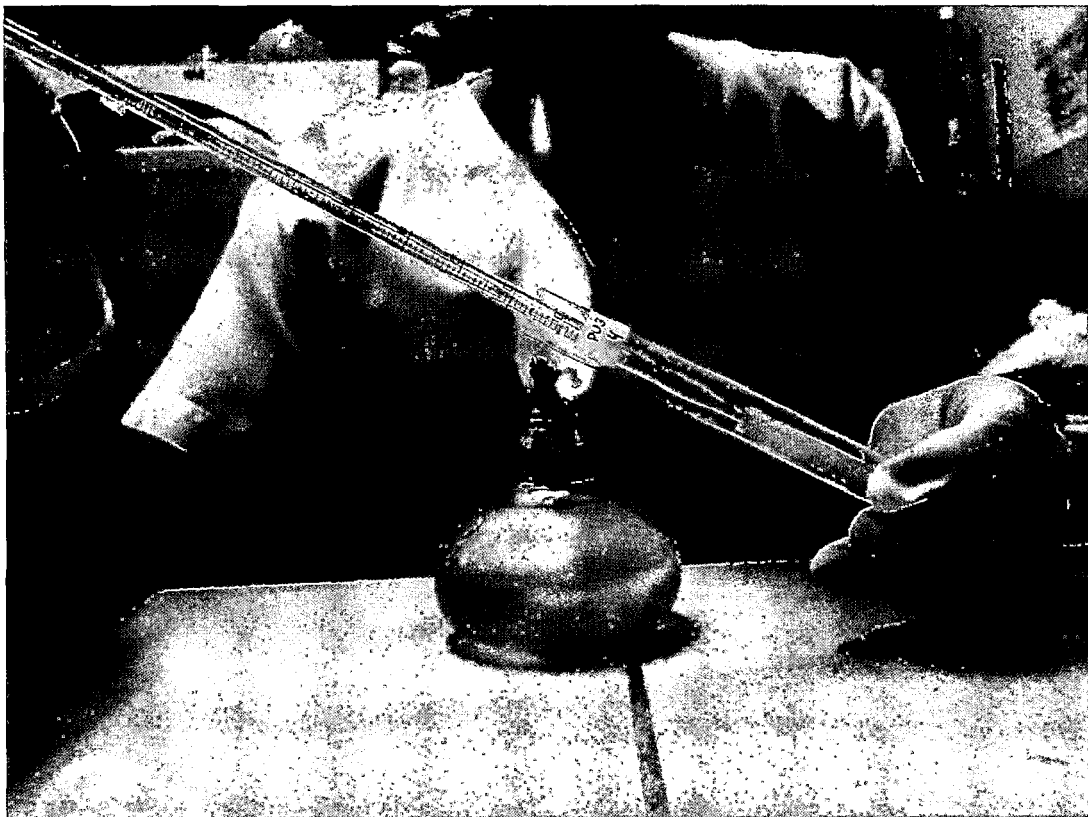


Figura 25. Inoculación de suspensión de conidios en papel filtro Whatman.

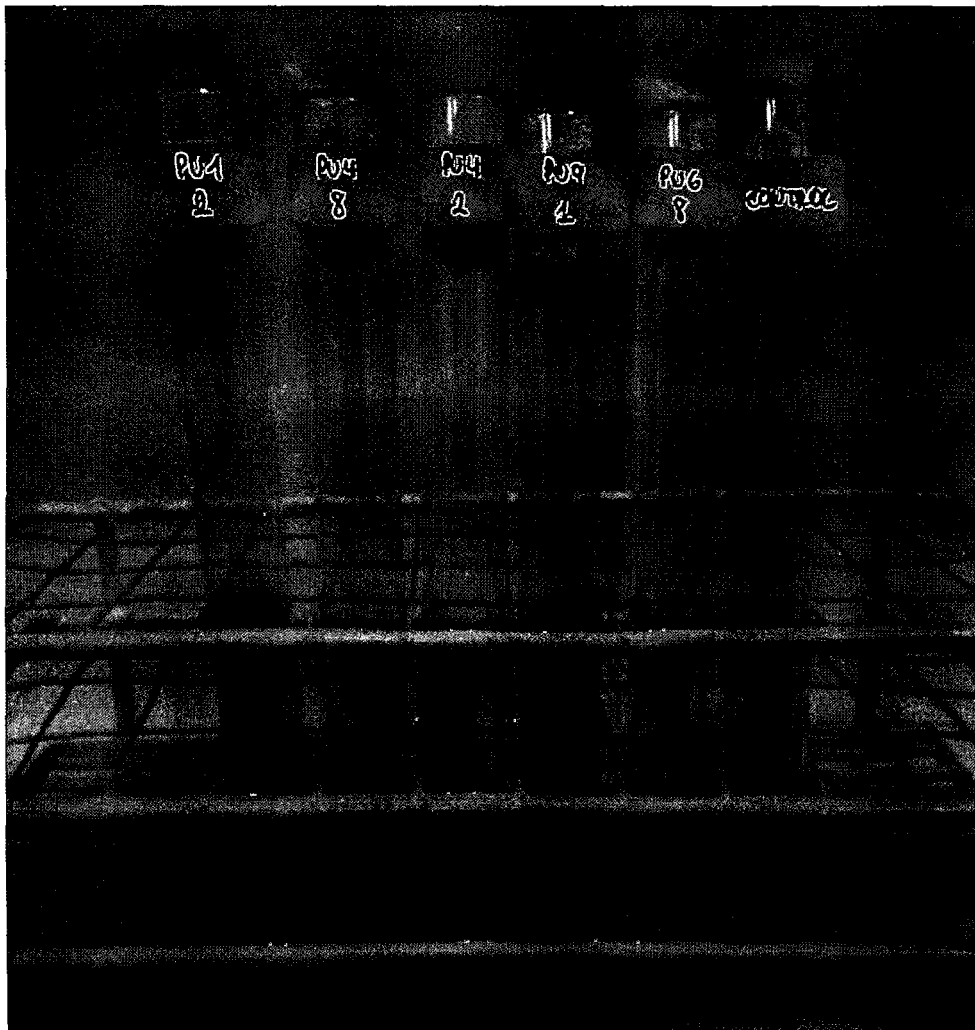


Figura 26. Desarrollo micelial de hongos celulolíticos sobre papel filtro Whatman.

a. Actividad β -glucosidasa

Para cuantificar la actividad β -glucosidasa, según el método descrito por Ramírez & Cocha (2003), modificada por el autor, 0,2 mL de una suspensión de conidios de cada hongo celulolítico, previamente estandarizada a 2×10^7 células mL⁻¹, fue inoculada en tubos con 10 mL de caldo Sales minerales suplementado con extracto de la corteza de *Salix* sp., "sauce", al 1 % (p/v) como fuente de salicina (Figura 27, anexo 9). Después de la incubación a 30 °C, con agitación diaria durante 15 minutos, por 5 días, se cuantificó la glucosa (mg dL⁻¹) utilizando el método enzimático de Glucosa Oxidasa (Figura 28, anexo 10).

3.2.9 Identificación de hongos lignolíticos y celulolíticos

Para la identificación de los hongos filamentosos nativos se determinaron las características macroscópicas de las colonias desarrolladas en PDA, a 30 °C, por 7 días (Figura 29). A continuación, según Labarca *et al.* (2006) con la técnica de "impresión con cinta adhesiva transparente", sobre cada colonia de hongo se depositó cuidadosamente un fragmento de cinta adhesiva de 6 cm de longitud y luego ésta se llevó a una lámina portaobjetos conteniendo una gota de azul de lactofenol, se presionó suavemente y se observó con objetivo de 40x (Figura 30), identificándose las características microscópicas del micelio vegetativo y las estructuras reproductivas según la clave de Barnett & Hunter (1999).

3.2.10 Selección de hongos lignolítico y celulolítico

El hongo con mayor desarrollo micelial en el bloque de madera, actividad peroxidasa y lacasa, así como el hongo con actividad endoglucanasa, mayor desarrollo en el papel filtro y actividad β -glucosidasa se seleccionaron para la siguiente fase de la investigación.



Figura 27. Siembra de hongo celulolítico en caldo Sales minerales más extracto de la corteza de *Salix* sp.

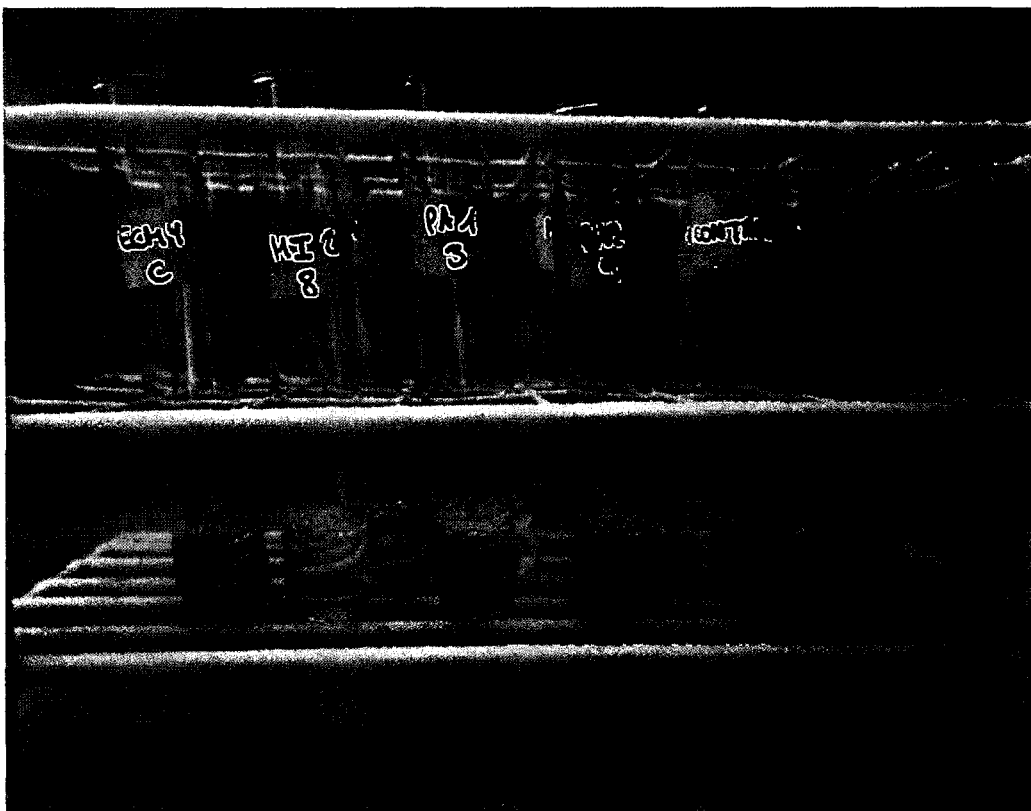


Figura 28. Cuantificación de glucosa por el método de Glucosa oxidasa.

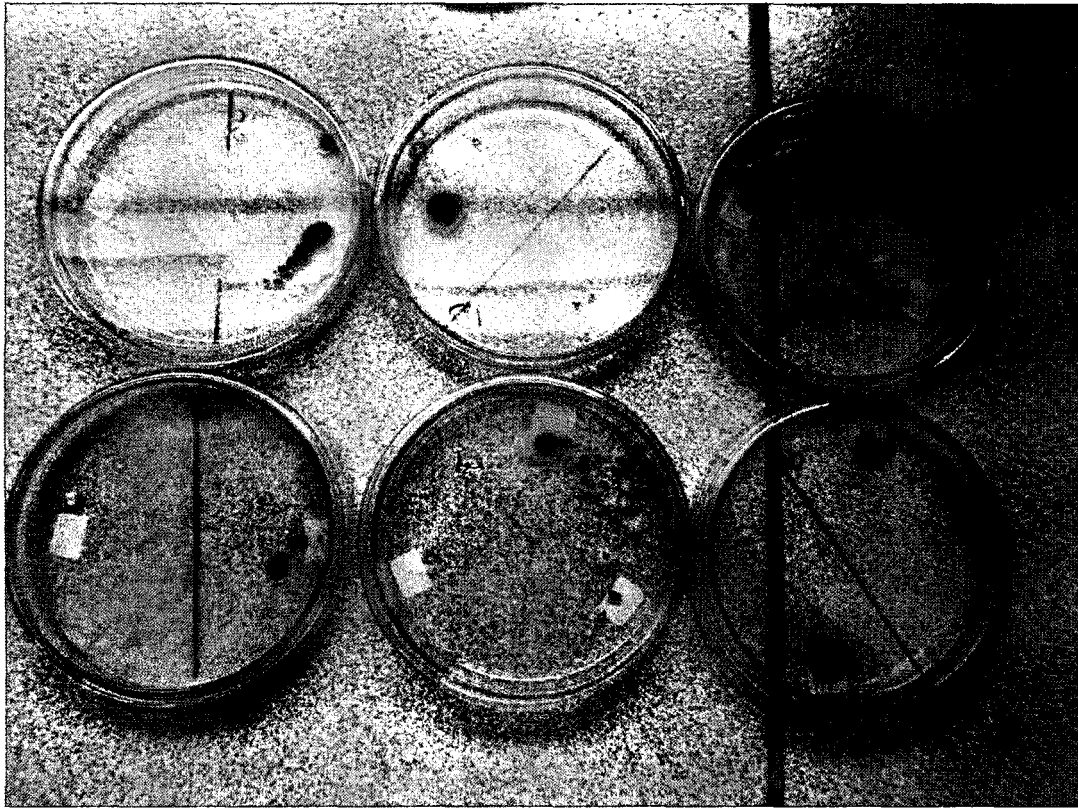


Figura 29. Colonias de hongos filamentosos desarrolladas en agar papa dextrosa.



Figura 30. Impresión con cinta adhesiva en colonia de hongo filamentosos.

3.2.11 Cuantificación de la glucosa obtenida por hidrólisis del bagazo de caña de azúcar

El bagazo de caña de azúcar fue pretratado y luego hidrolizado por los hongos lignolíticos y celulolíticos previamente seleccionados, obteniéndose un jarabe cuya concentración de glucosa fue determinada por método de glucosa oxidasa según Collazos & Ortiz (2014).

a. Pretratamiento del bagazo de caña de azúcar

Se realizó el pretratamiento del bagazo de caña de azúcar, para lo cual se pesaron 250 g, se lavaron tres veces con agua potable, se enjuagaron cinco veces con agua destilada, se secaron a temperatura ambiente por una semana y luego fueron molidos en fragmentos de 0,1 cm² (Figuras 31 a 34). Posteriormente, fue utilizado como fuente de carbono en la preparación del caldo de fermentación con sales minerales.

b. Proceso fermentativo

Los hongos lignolítico y celulolítico fueron cultivados en PDA, a 30 °C durante 5 días y luego con cada uno, se obtuvo una suspensión de conidios, que se estandarizó a 2×10^7 células mL⁻¹ mediante la cámara de Levy con el rayado de Neubauer. A continuación, en matraces de 50 mL de capacidad con 25 mL de caldo sales minerales más 0,25 g de bagazo de caña de azúcar pretratado se inoculó 1 mL de suspensión de conidios (Figura 35), se homogenizó y se incubó a 30 °C, con agitación manual por 15 minutos diarios. Posteriormente, la glucosa (mg dL⁻¹) liberada por la hidrólisis de la lignocelulosa a las 72, 96 y 120 horas fue cuantificada utilizando el método enzimático de Glucosa Oxidasa (Figura 36).

Con base a la concentración de glucosa liberada por la hidrólisis de la lignocelulosa del bagazo de caña de azúcar, se determinó el tiempo óptimo de incubación los hongos lignolítico y celulolítico seleccionados.



Figura 31. Bagazo de *Saccharum officinarum* L. lavado con agua destilada.



Figura 32. Secado del bagazo de *Saccharum officinarum* L.

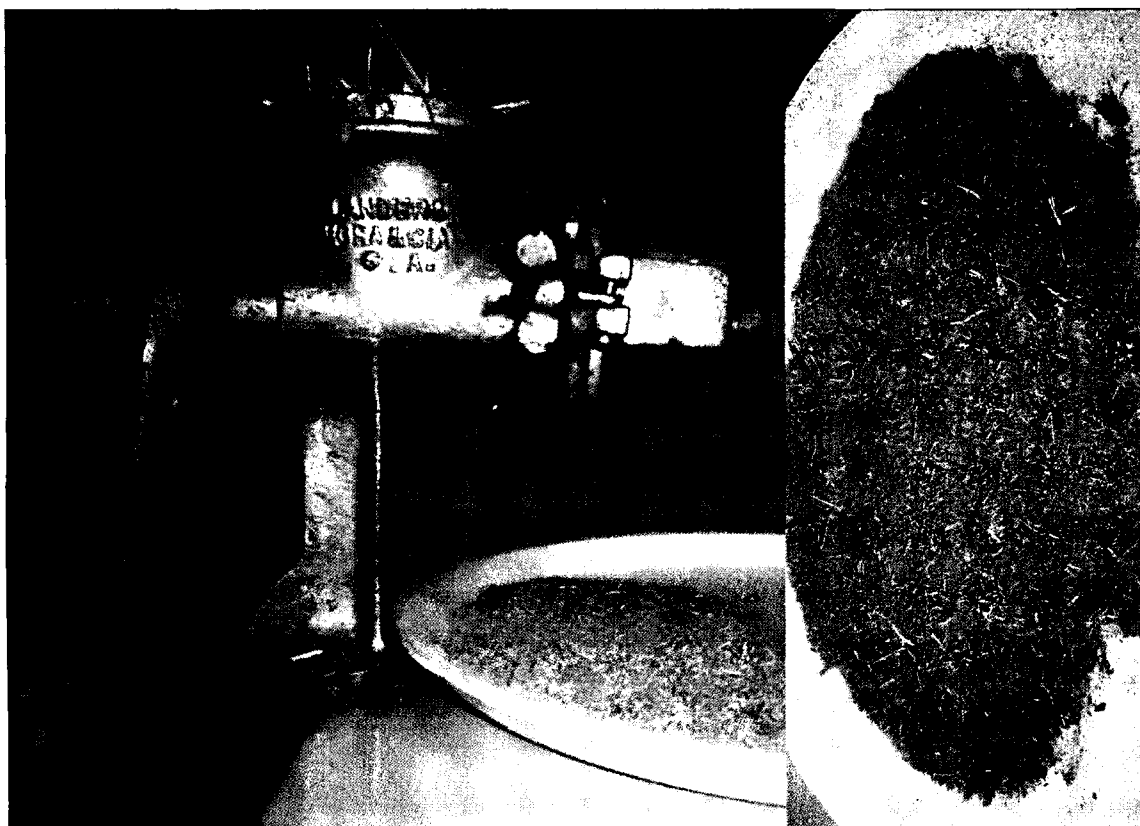


Figura 33. Molienda de bagazo de *Saccharum officinarum* L.

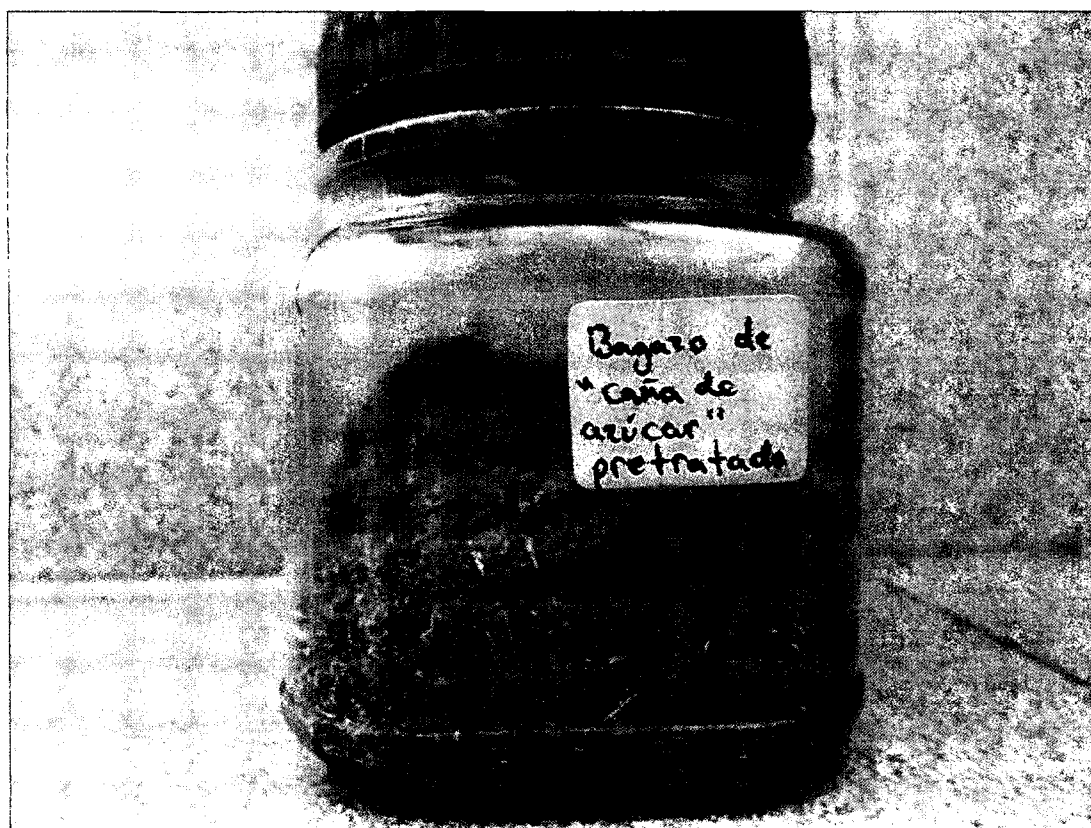


Figura 34. Bagazo de *Saccharum officinarum* L. pretratado.



Figura 35. Proceso fermentativo para la hidrólisis del bagazo de *Saccharum officinarum* L.



Figura 36. Prueba de glucosa oxidasa en los hidrolizados de bagazo de *Saccharum officinarum* L.

3.2.12 Determinación del rendimiento alcohólico de bagazo de caña azúcar hidrolizado por hongos seleccionados

Los hongos lignolítico y celulolítico seleccionados se cultivaron en PDA durante 5 días, luego se obtuvo y se estandarizó una suspensión de conidios con 2×10^7 células mL^{-1} (Figura 37) mediante la cámara de Levy con el rayado de Neubauer. Posteriormente, según Ortiz y Collazos (2014), modificado por el autor, en seis frascos de 500 mL de capacidad con 350 mL de caldo sales minerales más 3,5 g de bagazo de caña de azúcar pretratado, se inoculó 1 mL de suspensión de conidios del hongo lignolítico y después de 24 horas 1 mL de la suspensión de conidios del hongo celulolítico, incubándose tres frascos por 72 horas y tres durante 96 horas a 30 °C (Figura 38). Después, se tomaron muestras de 5 mL del caldo fermentado para cuantificar la glucosa por el método de glucosa oxidasa (Figura 39) y en simultáneo los caldos fueron inoculados con una suspensión estandarizada de 2×10^7 UFC mL^{-1} de *Sacharomyces cerevisiae*, incubándose en anaerobiosis, a 30 °C, por 72 horas (Figuras 40, 41).

Finalizada la incubación, los caldos fermentados fueron filtrados y destilados durante 90 minutos (Figura 42). El producto de la destilación se le determinó el grado alcohólico utilizando el vinómetro (Figura 43) y finalmente se calculó el rendimiento alcohólico del bagazo de caña de azúcar hidrolizado por hongos lignolítico y celulolítico.

3.2.13 Análisis de los datos

Los datos obtenidos fueron ordenados en tablas y figuras que permitieron seleccionar hongos lignocelulolíticos para la obtención de jarabes glucosados por hidrólisis del bagazo de caña de azúcar. En el presente trabajo se utilizó el software estadístico SPSS versión 15.0, así como programas Microsoft Office Word y Excel versión 2013.

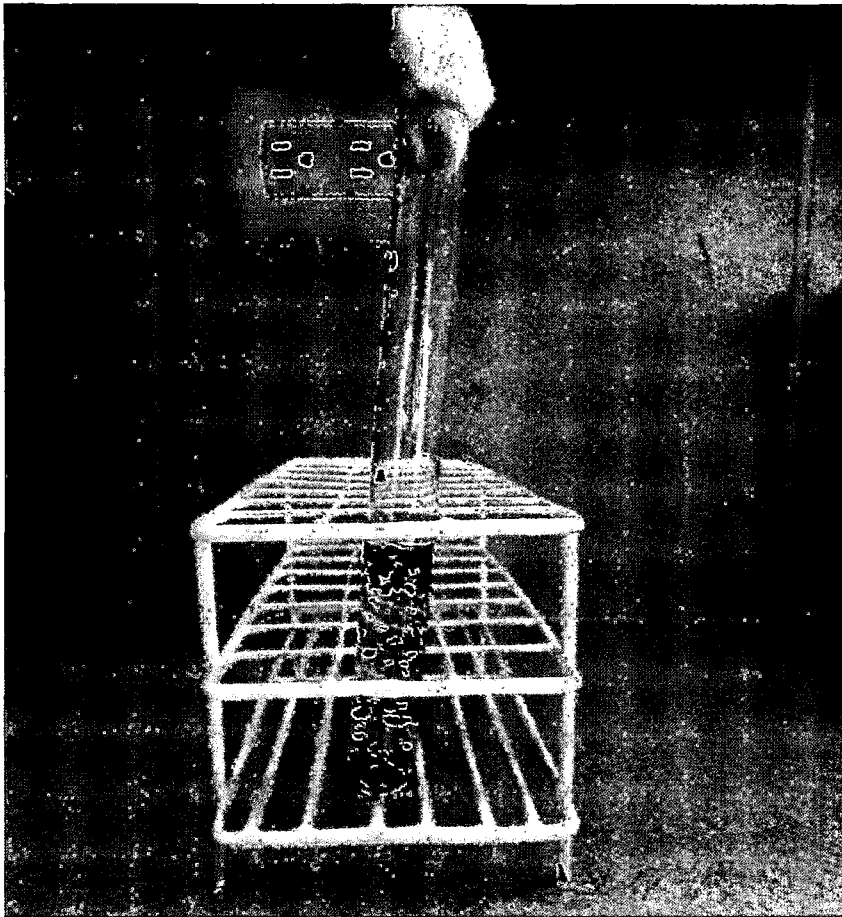


Figura 37. Suspensión de conidios de hongo lignocelulolítico seleccionado.



Figura 38. Caldo sales minerales con bagazo de *Saccharum officinarum* L. inoculado con hongos lignolítico y celulolítico.



Figura 39. Prueba de glucosa oxidasa en hidrolizados de bagazo de *Saccharum officinarum* L.

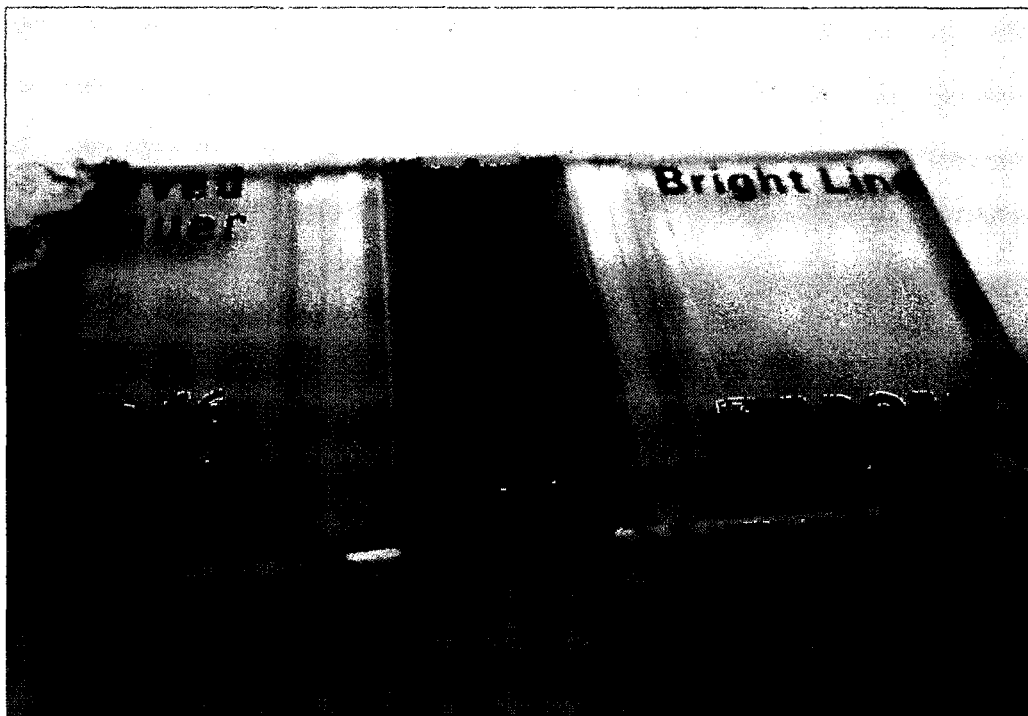


Figura 40. Contaje de *Saccharomyces cerevisiae* en cámara de contaje de Levy con el rayado de Neubauer.



Figura 41. Fermentación alcohólica del hidrolizado de bagazo de *Saccharum officinarum* L.

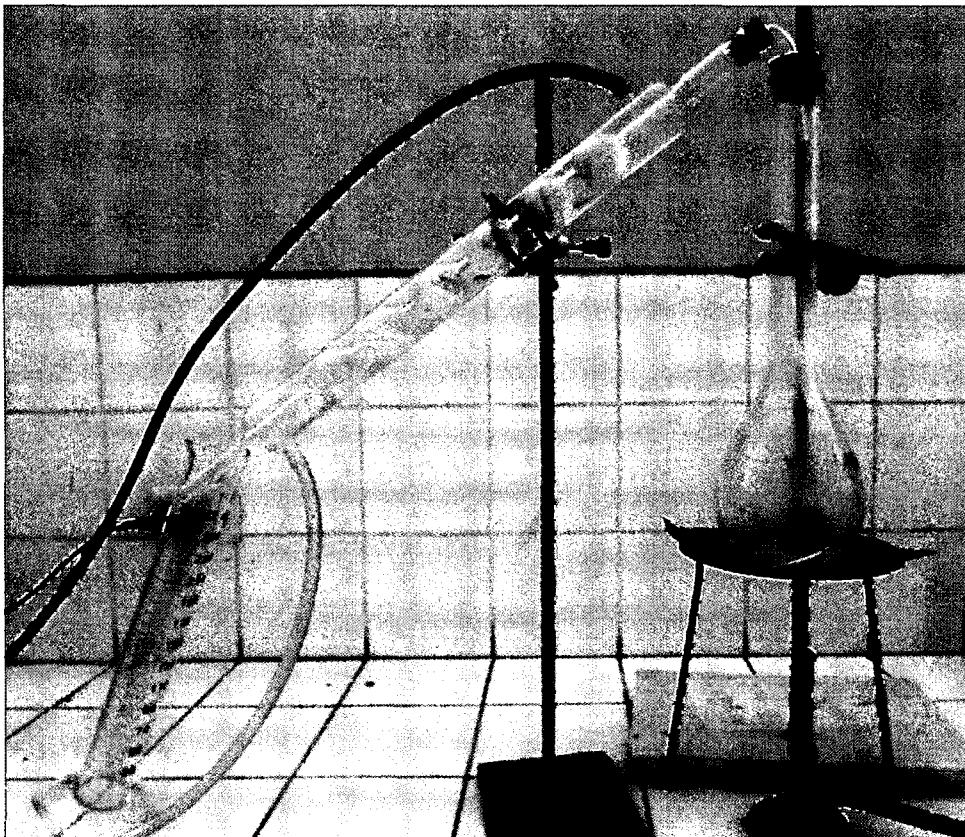


Figura 42. Destilación del filtrado obtenido de la fermentación alcohólica.



Figura 43. Utilización del vinómetro en la medición del grado alcohólico del destilado obtenido.

IV. RESULTADOS

4.1 Hongos lignolíticos y celulolíticos aislados

En el 96,3% de las muestras de suelo cultivado con caña de azúcar se aislaron 300 hongos filamentosos lignolíticos, con desarrollo micelial en agar sales minerales-lignina (Figuras 44, 45). Por su parte, en el 98,1 % de las muestras de suelo se aislaron 294 hongos filamentosos celulolíticos, con desarrollo micelial en agar sales minerales-papel filtro (Figuras 46, 47).

4.2 Actividad lignolítica

El desarrollo micelial en bloques de madera fue calificado como bueno en el 12,7 % de los hongos lignolíticos; regular en el 37,3 % y escaso en el 50,0 % después de 15 días de incubación (Figura 48). A su vez, el desarrollo fue bueno en el 13,3 %; regular en el 48,7 % y escaso en el 38,0 % de los hongos lignolíticos después de 30 días (Figuras 49 a 51).

Los hongos con buen desarrollo micelial en bloques de madera, fueron 20, predominando *Aspergillus niger* (35 %), seguido de *Cladosporium* sp. (20 %), *Verticillium* sp. (15 %), así como *Aspergillus terreus*, *Paecilomyces* y *Penicillium* spp. con 10 %, respectivamente (Tabla 1).

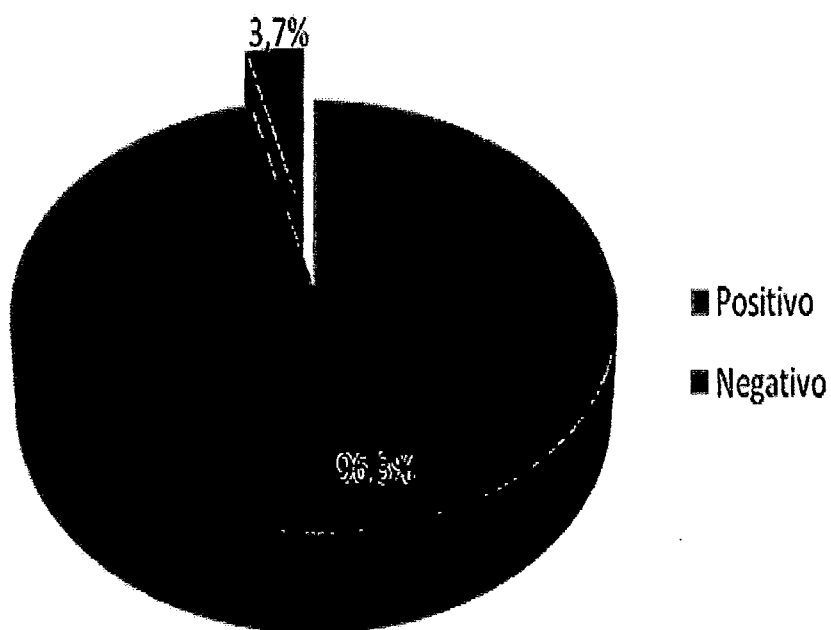


Figura 44. Frecuencia de muestras de suelo cultivado con *Saccharum officinarum* L. positivas al aislamiento de hongos lignolíticos.

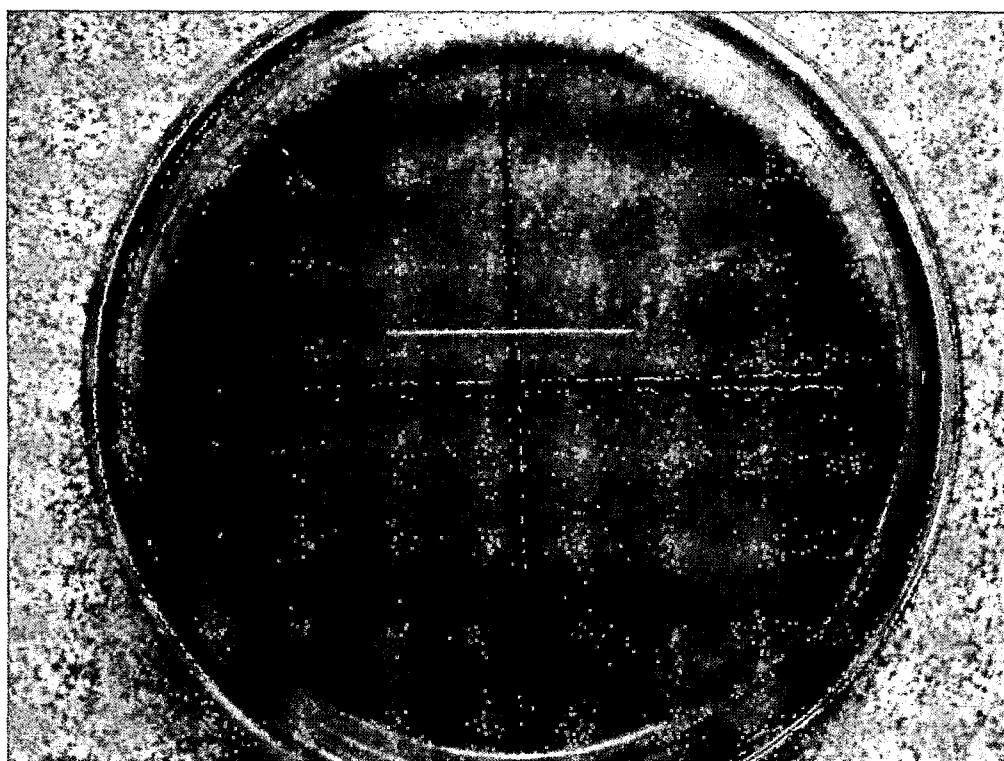


Figura 45. Hongos filamentosos lignolíticos desarrollados en agar sales minerales-lignina.

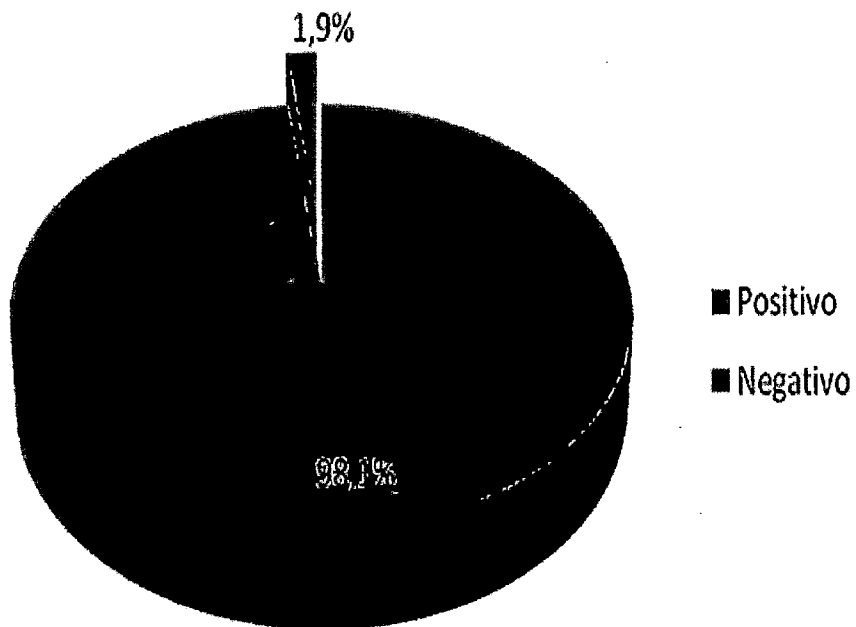


Figura 46. Frecuencia de muestras de suelo cultivado con *Saccharum officinarum* L. positivas al aislamiento de hongos celulolíticos.

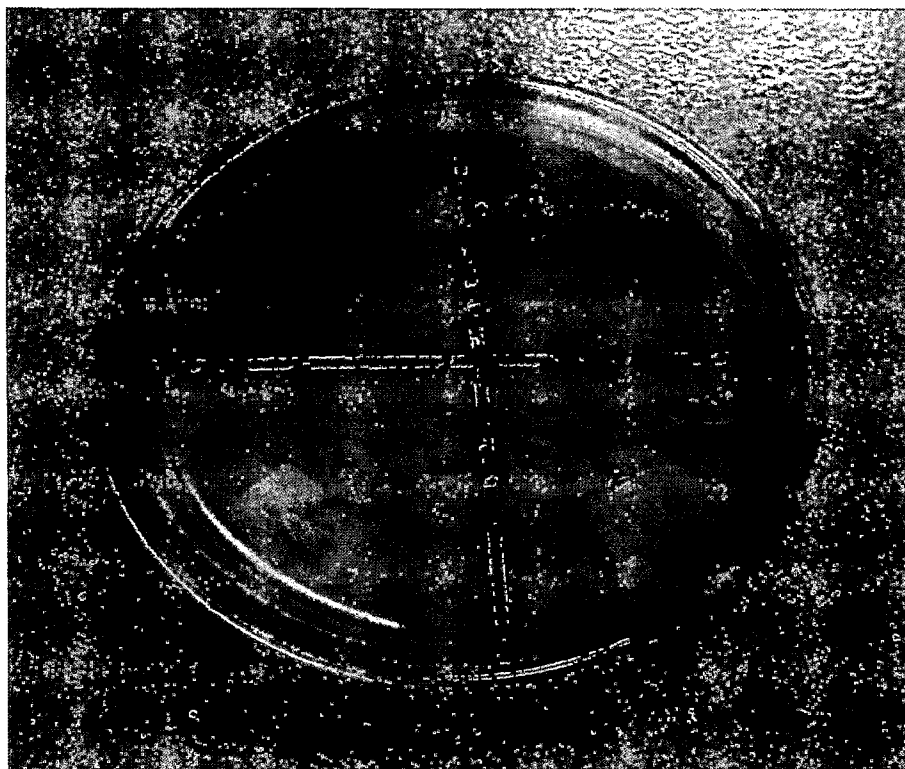


Figura 47. Hongos filamentosos celulolíticos desarrollados en agar sales minerales-celulosa.

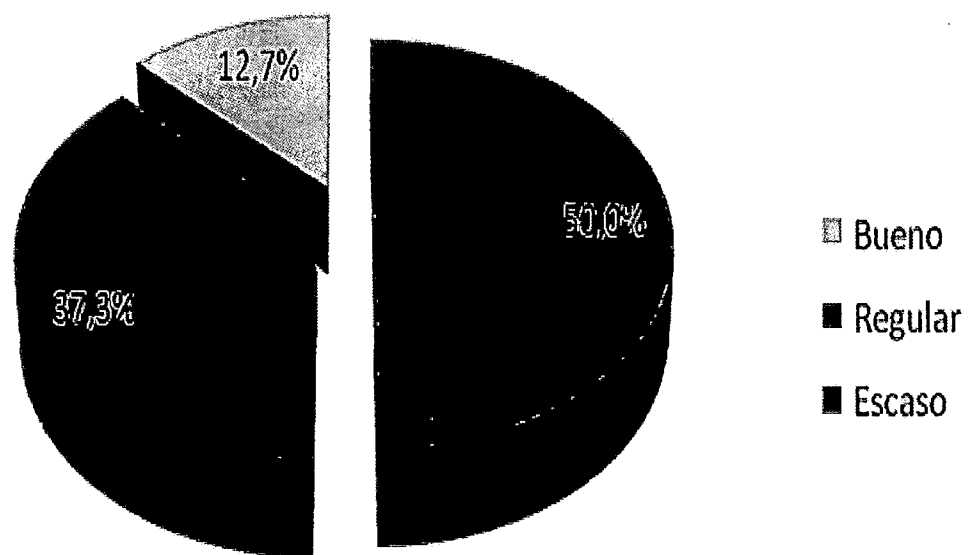


Figura 48. Hongos lignolíticos nativos según el desarrollo micelial en bloques de *Pinus* sp. después de 15 días.

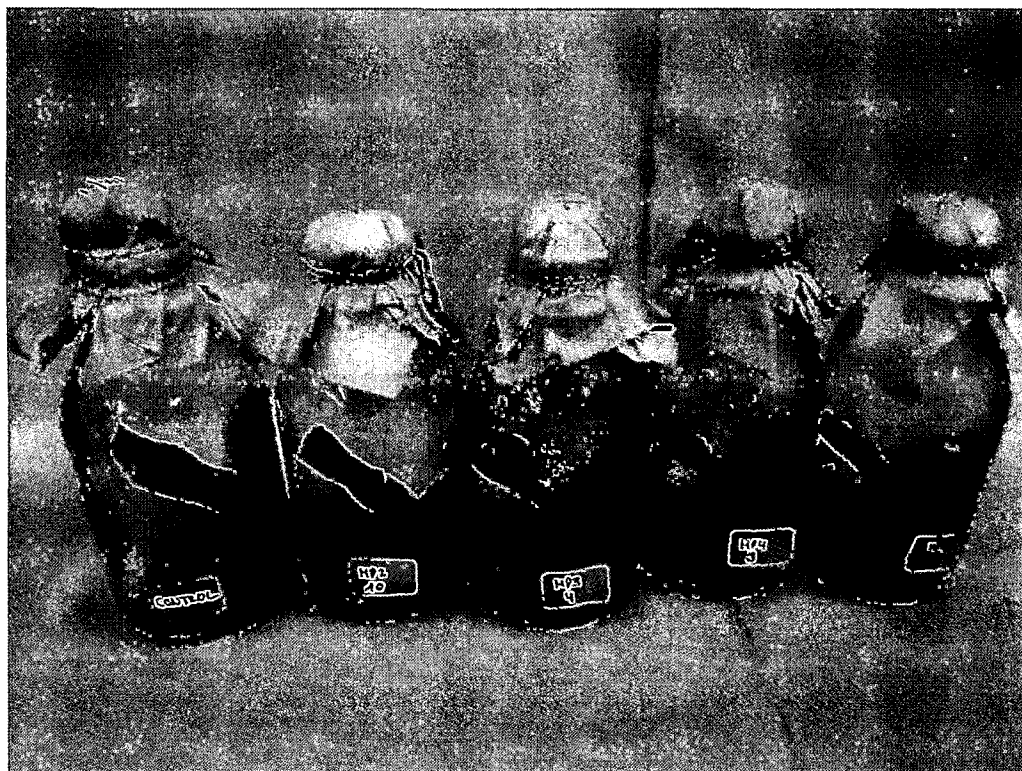


Figura 49. Hongos lignolíticos desarrollados en bloques de *Pinus* sp. durante 30 días.

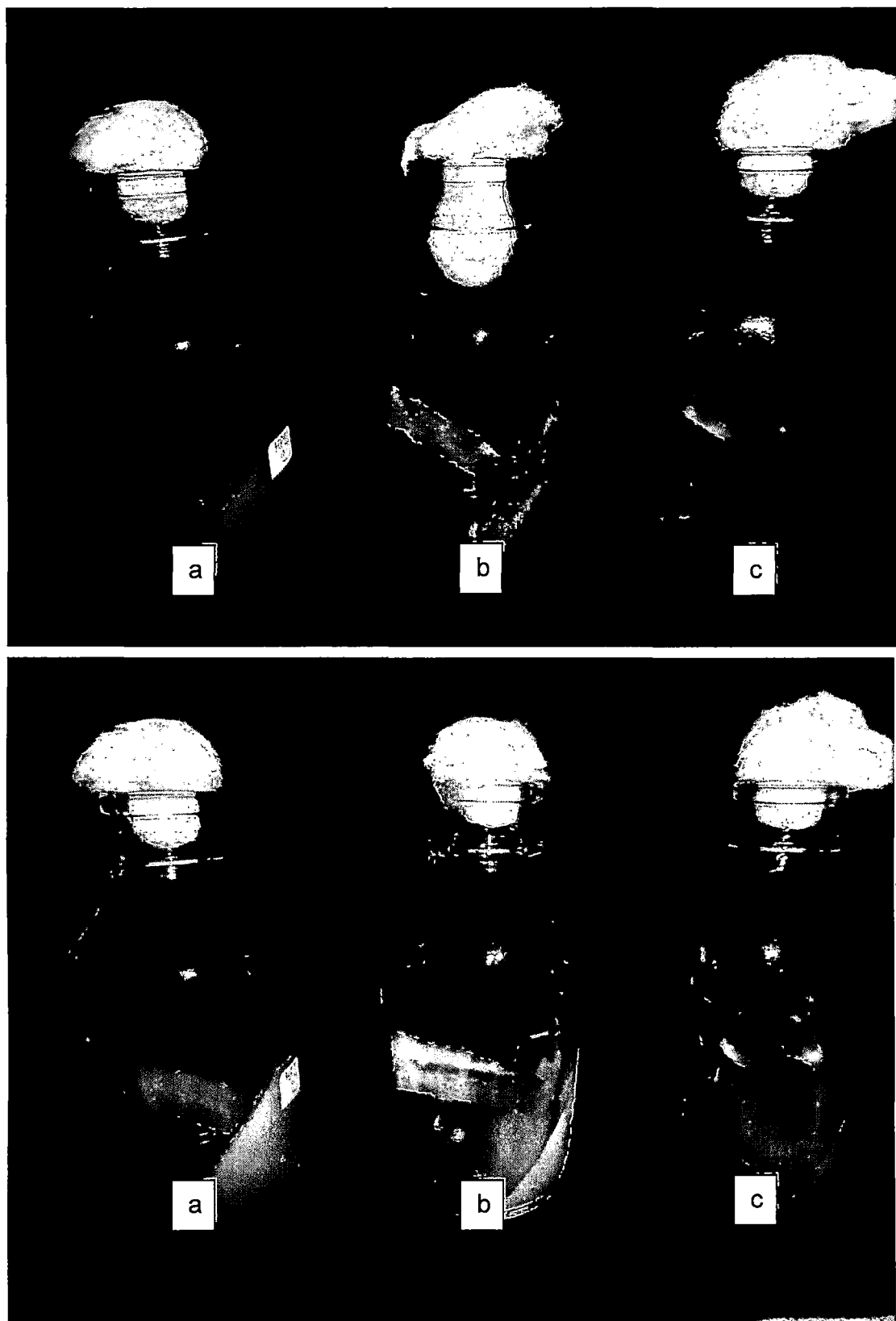


Figura 50. Desarrollo micelial bueno (a), regular (b) y escaso (c) en bloques de *Pinus* sp.

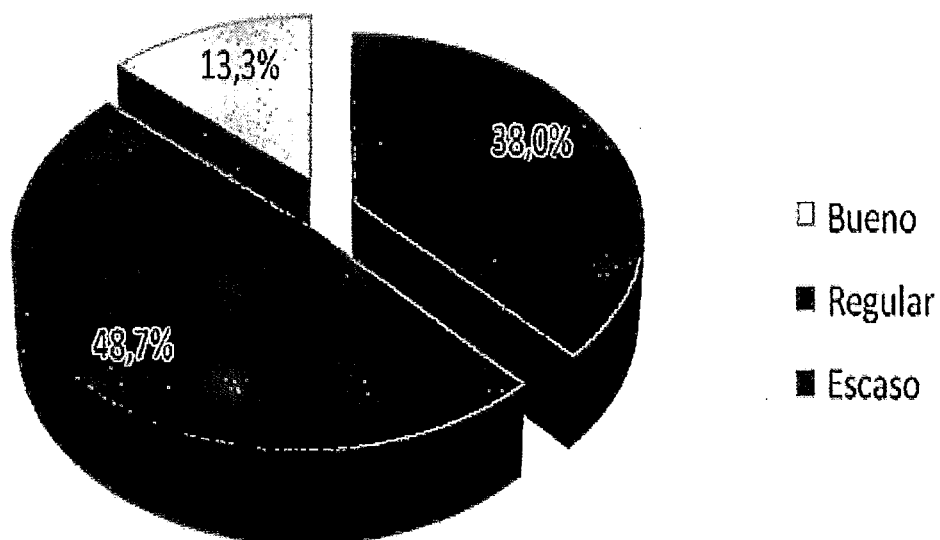


Figura 51. Hongos lignolíticos nativos según el desarrollo micelial en bloques de *Pinus* sp. después 30 días.

Tabla 1. Frecuencia de hongos lignolíticos identificados y seleccionados por el desarrollo micelial en bloques de madera

Hongo lignolítico	Cultivos	
	Número	Porcentaje (%)
<i>Aspergillus niger</i>	7	35,0
<i>Cladosporium</i> sp.	4	20,0
<i>Verticillium</i> sp.	3	15,0
<i>Aspergillus terreus</i>	2	10,0
<i>Paecilomyces</i> sp.	2	10,0
<i>Penicillium</i> sp.	2	10,0

La actividad lignolítica se detectó *in vitro*, observándose halos rojizos alrededor de las colonias, que indicaron actividad de la enzima peroxidasa (Figura 52) y un viraje al púrpura como producto de la actividad de la enzima lacasa (Figura 53). De esta manera, se detectó actividad peroxidasa en el 30 % de los hongos y actividad lacasa en 25 % de los hongos lignolíticos seleccionados, valores correspondientes a 2 y 1,67 % de los hongos aislados. A su vez, *Aspergillus niger* PU2.5 presentó actividad peroxidasa y lacasa (Tabla 2).

4.3 Actividad celulolítica

El 44,83 % de los hongos filamentosos presentó actividad endoglucanasa en agar sales minerales con carboximetilcelulosa como fuente de carbono, observándose halos de hidrólisis alrededor de las colonias (Figura 54), cuyo diámetro fue < 1 a 10 mm. Los géneros de hongos con halos mayores a 1 mm o mejor actividad endoglucasa fueron *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Chrysosporium*, *Cladosporium*, *Cunninghamella* y *Rhizoctonia* (Tabla 3). El 40,3 % de los hongos filamentosos presentó actividad exoglucanasa, observándose desarrollo micelial en papel filtro, el cual fue calificado como bueno en el 17,0 % de los hongos celulolíticos; regular en el 22,4 % y escaso en el 60,5 %, después de 15 días de incubación (Figura 55). A su vez, el desarrollo micelial fue bueno en el 19,7 %; regular en el 42,9 % y escaso en el 37,4 % de los hongos, después de 25 días (Figuras 56 a 58).

Los hongos con actividad endoglucanasa y buen desarrollo micelial en papel filtro fueron 29, predominando *Trichoderma* sp. (37,93 %), *Aspergillus niger* (20,69 %), *Cladosporium* sp. (17,24 %), seguidos de *Aspergillus terreus* (6,90 %), así como *Aspergillus flavus*, *Alternaria*, *Chrysosporium*, *Cunninghamella* y *Rhizoctonia* spp., con 3,45 %, respectivamente (Tabla 4). El 15,34 % de los hongos con actividad endoglucanasa y exoglucanasa seleccionados (4,38 % de los hongos aislados) presentó actividad β -glucosidasa, cuantificándose 11,96 – 26,63 mg dL⁻¹ de glucosa (Tabla 5). La mayor concentración de glucosa (26,63 mg dL⁻¹) por actividad β -glucosidasa, correspondió a *Chrysosporium* sp. MP5.2.

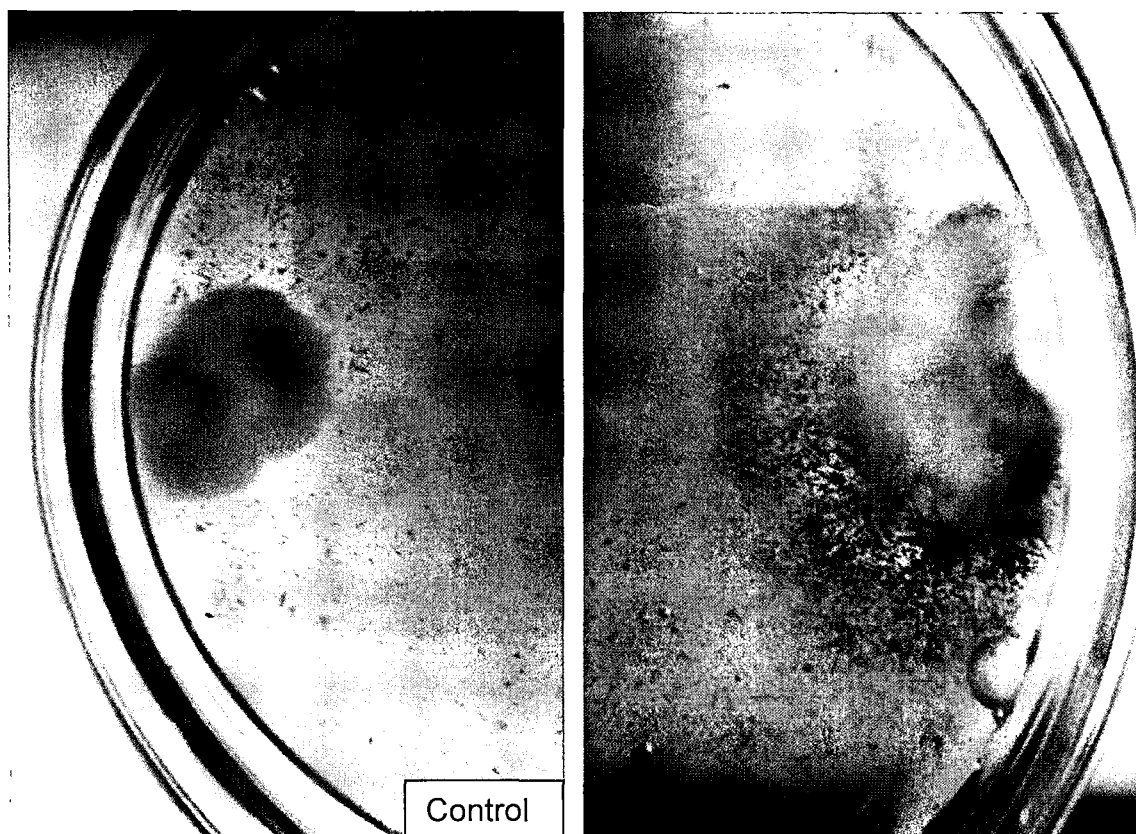


Figura 52. Halo rojizo que denota actividad peroxidasa de hongo lignolítico.

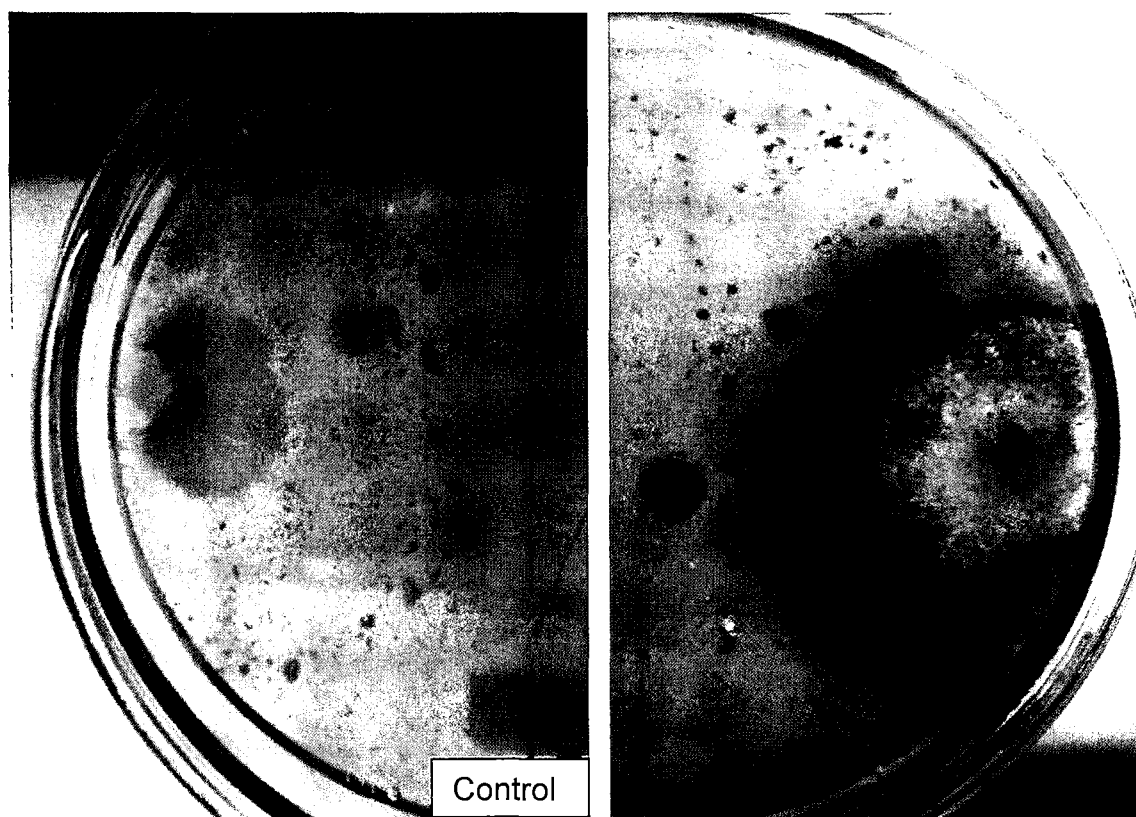


Figura 53. Color púrpura que denota actividad lacasa de hongo lignolítico.

Tabla 2. Actividad peroxidasa y lacasa de hongos lignolíticos nativos

Hongo lignolítico	Peroxidasa	Lacasa
<i>Aspergillus niger</i> MP2.2	Negativo	Positivo
<i>Aspergillus niger</i> PU5.8	Positivo	Negativo
<i>Aspergillus niger</i> PU6.3	Positivo	Negativo
<i>Aspergillus niger</i> PA5.7	Positivo	Negativo
<i>Aspergillus niger</i> PU2.5	Positivo	Positivo
<i>Aspergillus niger</i> PU3.4	Negativo	Positivo
<i>Aspergillus niger</i> PU5.3	Positivo	Negativo
<i>Aspergillus terreus</i> ECM4.3	Negativo	Negativo
<i>Aspergillus terreus</i> MP2.10	Negativo	Negativo
<i>Cladosporium</i> sp. PA1.2	Negativo	Negativo
<i>Cladosporium</i> sp. PA2.6	Negativo	Negativo
<i>Cladosporium</i> sp. PU6.8	Positivo	Negativo
<i>Cladosporium</i> sp. ECM4.1	Negativo	Negativo
<i>Paecilomyces</i> sp. MP1.5	Negativo	Negativo
<i>Paecilomyces</i> sp. MP5.10	Negativo	Negativo
<i>Penicillium</i> sp. ECM5.1	Negativo	Positivo
<i>Penicillium</i> sp. ECM5.2	Negativo	Positivo
<i>Verticillium</i> sp. MP2.6	Negativo	Negativo
<i>Verticillium</i> sp. MP4.4	Negativo	Negativo
<i>Verticillium</i> sp. PA5.2	Negativo	Negativo

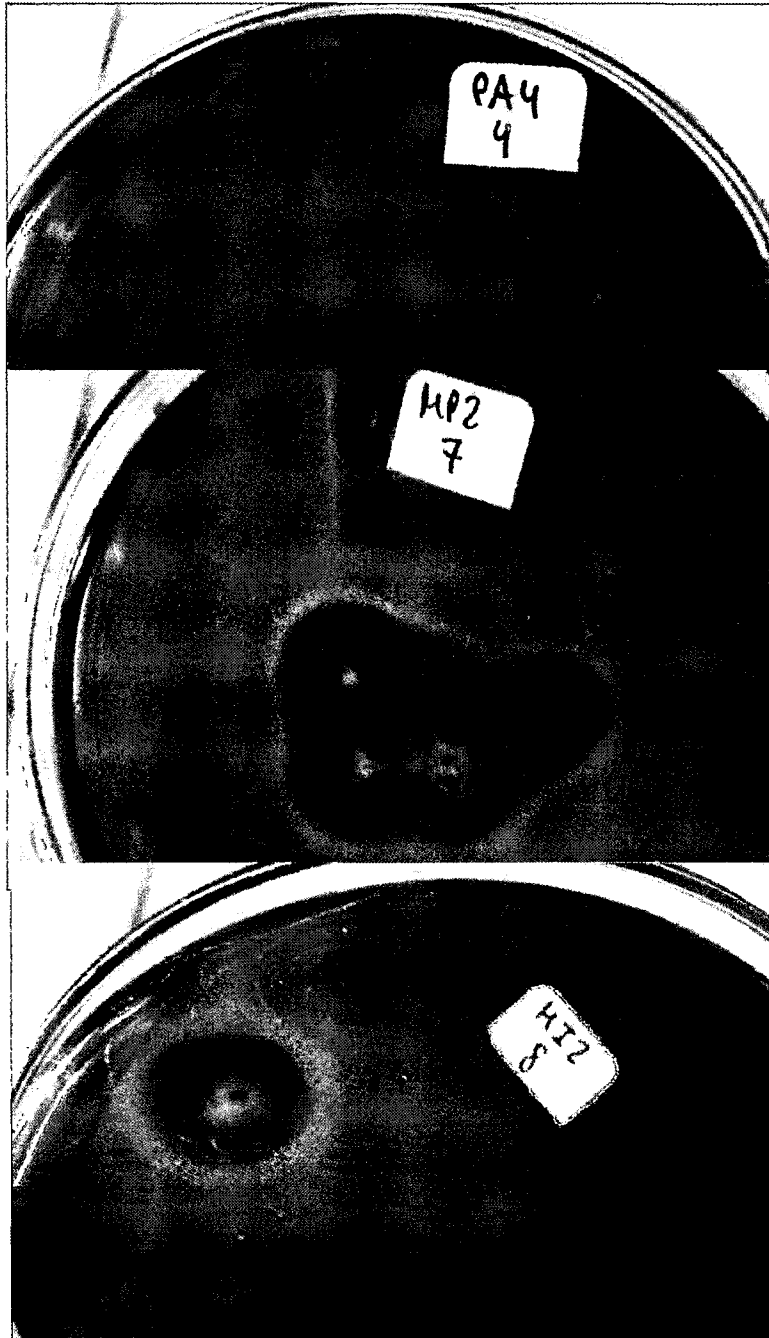


Figura 54. Halos de hidrólisis que denotan actividad endoglucanasa de hongos celulolíticos.

Tabla 3. Diámetro de halos de hidrólisis en agar sales minerales-carboximetilcelulosa por actividad endoglucanasa de hongos celulolíticos nativos

Hongo celulolítico	Diámetro de halo (mm)
<i>Aspergillus niger</i> PU2.5	10
<i>Chrysosporium</i> sp. MP5.2	10
<i>Trichoderma</i> sp. MI2.8	10
<i>Aspergillus niger</i> PU2.2	9
<i>Trichoderma</i> sp. PA1.3	9
<i>Trichoderma</i> sp. MP2.2	9
<i>Trichoderma</i> sp. PA2.4	9
<i>Trichoderma</i> sp. ECM3.3P	9
<i>Aspergillus niger</i> PU9.A	8
<i>Trichoderma</i> sp. MP3.1	8
<i>Trichoderma</i> sp. MP5.1	8
<i>Aspergillus terreus</i> ECM4.C	7
<i>Trichoderma</i> sp. MP4.3	7
<i>Trichoderma</i> sp. ECM3.3	6
<i>Trichoderma</i> sp. PU3.1	6
<i>Aspergillus niger</i> MP2.7	5
<i>Aspergillus terreus</i> PA3.3	5
<i>Cunninghamella</i> sp. PU5.10	5
<i>Aspergillus niger</i> PU1.1	4
<i>Aspergillus flavus</i> PU4.2	4
<i>Rhizoctonia</i> sp. ECM4.3	4
<i>Trichoderma</i> sp. MP3.4	3
<i>Aspergillus niger</i> PU5.3	2
<i>Alternaria</i> sp. PU6.6	2
<i>Cladosporium</i> sp. PA4.4	2
<i>Cladosporium</i> sp. IM3.5	2
<i>Cladosporium</i> sp. PU6.4	2
<i>Cladosporium</i> sp. ECM4.5	1
<i>Cladosporium</i> sp. PU2.6	1

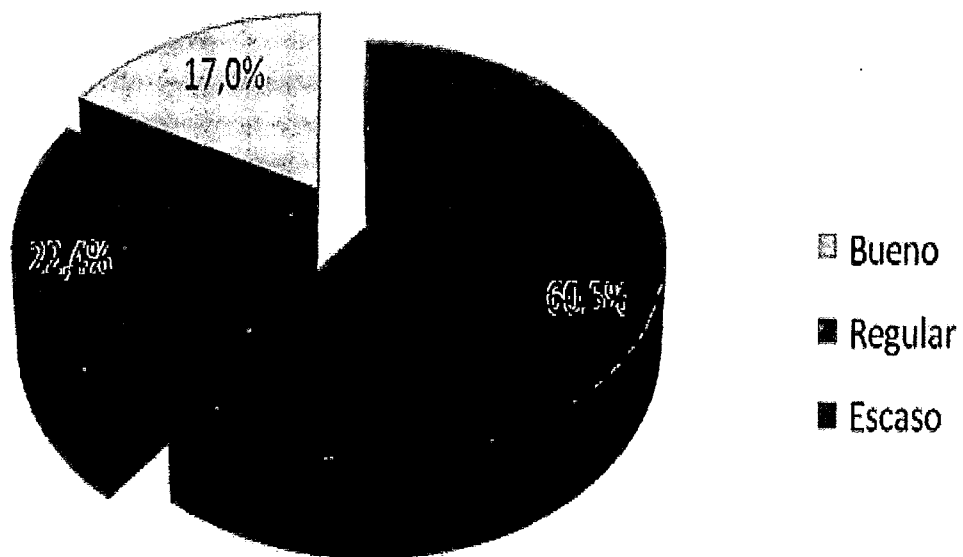


Figura 55. Hongos celulolíticos nativos según el desarrollo micelial en papel filtro a los 15 días.



Figura 56. Hongos celulolíticos desarrollados en papel filtro durante 25 días.

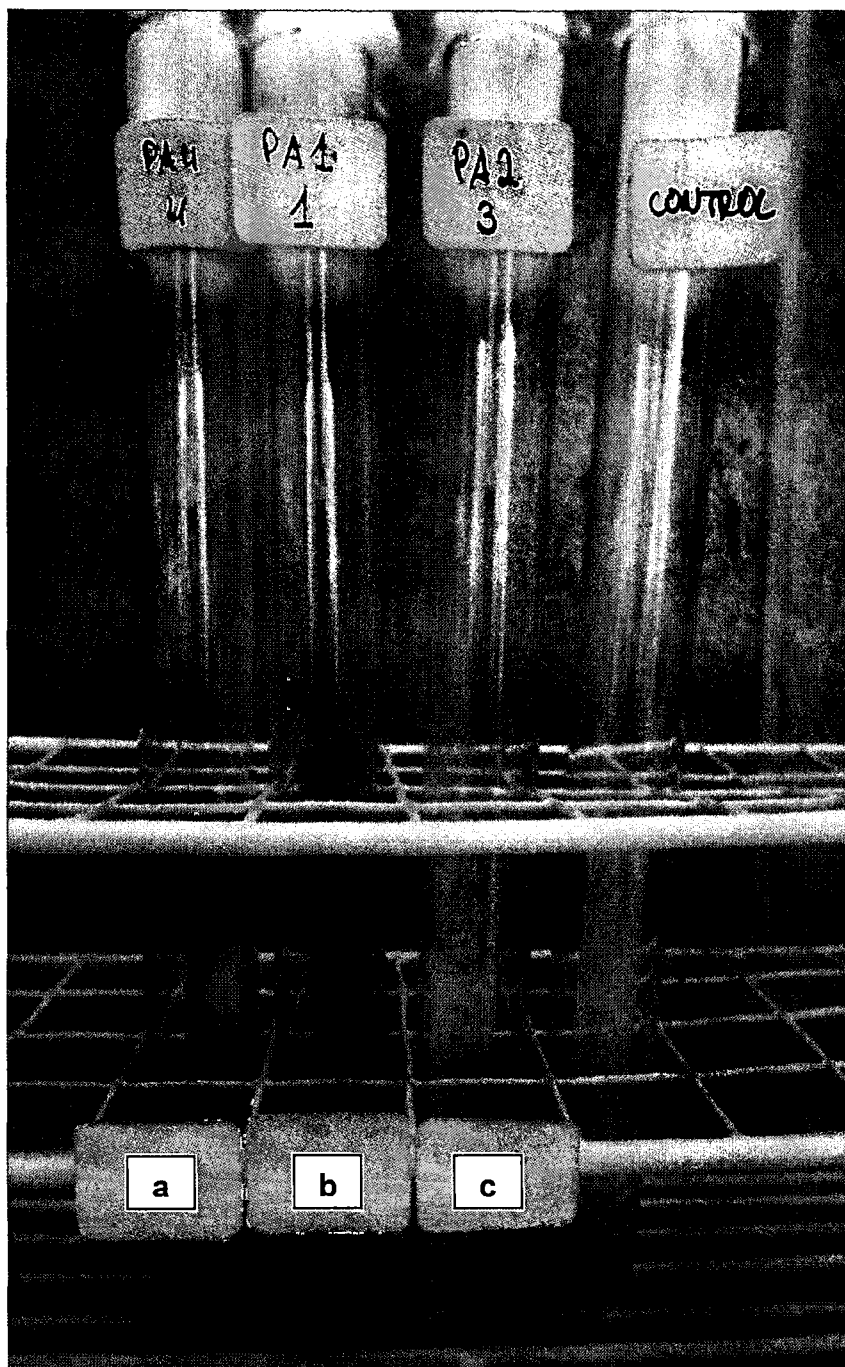


Figura 57. Desarrollo micelial bueno (a), regular (b) y escaso (c) en papel filtro durante 25 días.

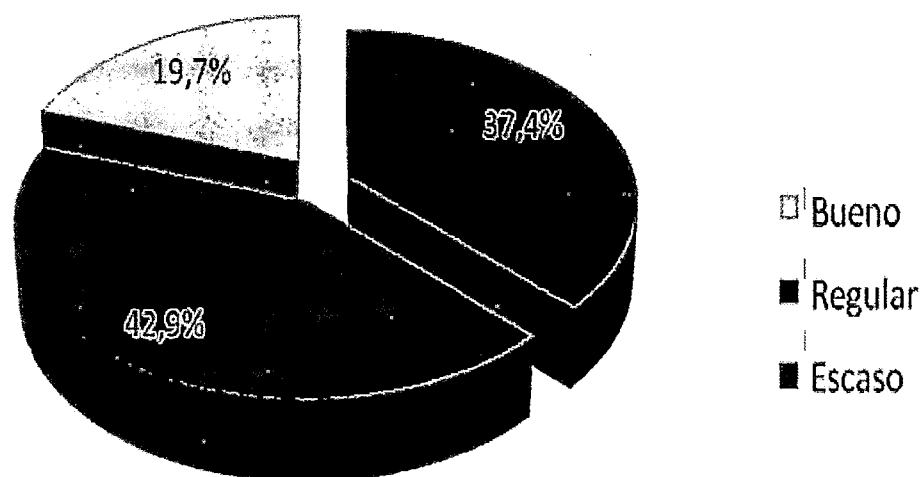


Figura 58. Hongos celulolíticos nativos según el desarrollo micelial en papel filtro a los 25 días.

Tabla 4. Frecuencia de hongos celulolíticos identificados y seleccionados por la actividad endoglucanasa y exoglucanasa

Hongo celulolítico	Cultivos	
	Número	Porcentaje (%)
<i>Trichoderma</i> sp.	11	37,93
<i>Aspergillus niger</i>	6	20,69
<i>Cladosporium</i> sp.	5	17,24
<i>Aspergillus terreus</i>	2	6,90
<i>Aspergillus flavus</i>	1	3,45
<i>Alternaria</i> sp.	1	3,45
<i>Chrysosporium</i> sp.	1	3,45
<i>Cunninghamella</i> sp.	1	3,45
<i>Rhizoctonia</i> sp.	1	3,45

Tabla 5. Glucosa obtenida del extracto de corteza de *Salix* sp. por actividad β -glucosidasa de hongos celulolíticos nativos

Hongo celulolítico	Glucosa (mgdL ⁻¹)
<i>Chrysosporium</i> sp. MP5.2	26,63
<i>Trichoderma</i> sp. MP3.1	23,91
<i>Trichoderma</i> sp. ECM3.3P	19,56
<i>Aspergillus terreus</i> ECM4.C	19,02
<i>Trichoderma</i> sp. PA1.3	16,85
<i>Aspergillus niger</i> PU9.A	16,30
<i>Trichoderma</i> sp. PA2.4	16,30
<i>Trichoderma</i> sp. MP4.3	15,70
<i>Aspergillus niger</i> PU2.5	14,13
<i>Trichoderma</i> sp. MI2.8	14,13
<i>Trichoderma</i> sp. MP2.2	13,04
<i>Trichoderma</i> sp. MP5.1	12,50
<i>Aspergillus niger</i> PU2.2	11,96

* Control = 22,28

4.4 Hongos lignolíticos y celulolíticos seleccionados

Aspergillus niger PU2.5 y *Chrysosporium* sp. MP5.2 se seleccionaron como lignolítico y celulolítico, respectivamente, para la siguiente fase experimental. *Aspergillus niger* PU2.5 con buen desarrollo micelial en el bloque de madera, presentó actividad peroxidasa y lacasa (Tabla 2). A su vez, *Chrysosporium* sp. MP5.2 presentó actividad endoglucasa, exoglucanasa y β -glucosidasa (Tablas 3, 4, 5).

4.5 Glucosa obtenida por hidrólisis del bagazo de caña de azúcar

Los hongos lignolítico *Aspergillus niger* PU2.5 y celulolítico *Chrysosporium* sp. MP5.2 hidrolizaron el bagazo de caña de azúcar, cuantificándose glucosa, como producto de la actividad. A las 72 horas se alcanzaron los mayores valores en la glucosa, correspondientes a 28,76 mg dL⁻¹ con *Aspergillus niger* PU2.5 y 29,07 mg dL⁻¹ con *Chrysosporium* sp. MP5.2 (Tabla 6).

4.6 Rendimiento alcohólico en bagazo de caña de azúcar hidrolizado por hongos lignolítico y celulolítico nativos

El coeficiente de rendimiento alcohólico ($Y_{p/s}$) del bagazo de caña de azúcar hidrolizado por *Aspergillus niger* PU2.5 y *Chrysosporium* sp. MP5.2 fue de 0,29 gg⁻¹ después de 72 horas de fermentación, con un porcentaje de conversión 29 % (Tabla 7, anexo 11).

Tabla 6. Glucosa obtenida por hidrólisis del bagazo de *Saccharum officinarum* L. con hogos lignolítico y celulolítico seleccionados

Hongo filamentoso	Glucosa (mg dL ⁻¹)		
	72 horas	96 horas	120 horas
Hongo lignolítico: <i>Aspergillus niger</i> PU2.5	28,76	26,05	23,86
Hongo celulolítico: <i>Chrysosporium</i> sp. MP5.2	29,07	26,90	22,94

* Control = 23,09

Tabla 7. Cinética de la producción de etanol con bagazo de *Saccharum officinarum* L. hidrolizado por *Aspergillus niger* PU2.5 y *Chrysosporium* sp. MP5.2

Parámetros	Valores
Glucosa inicial (mg dL ⁻¹)	37,17
Glucosa inicial (gL ⁻¹)	0,3717
Glucosa consumida (gL ⁻¹)	0,3717
Concentración del producto (gL ⁻¹)	0,1095
Coeficiente de rendimiento, Y _{p/s} (gg ⁻¹)	0,29
Porcentaje de conversión (%)	29

V. DISCUSIÓN

En muestras de suelo cultivado con caña de azúcar se aislaron hongos lignolíticos y celulolíticos. El suelo se divide en tres partes la masa del suelo, no afectada por las plantas a mas de 5 mm de la raíz, el suelo de la rizósfera, alrededor de 1 – 5 mm de la raíz, afectado por la respiración y exudado de las plantas y el rizoplasma o área en la que interacciona la planta y el suelo. Los microorganismos que habitan la masa del suelo o autóctonos aprovechan mejor los recursos disponibles como los carbohidratos especialmente polisacáridos, que subsisten como tal en el suelo y constituyen el 5 – 20 % de la materia orgánica del suelo. Entre los polímeros de carbono orgánico se incluye la celulosa, probablemente el componente más abundante del planeta, la hemicelulosa y lignina (Coyne, 2000).

En cuanto a los hongos lignolíticos, se coincide con Ortiz & Uribe (2011) y Collazos & Ortiz (2014) quienes aislaron estos hongos de muestras de suelo de bosque secundario - sabana de pastoreo con *Brachiaria* spp y bagazo de caña de azúcar, respectivamente. Respecto a los hongos celulolíticos, Ferrer *et*

al. (2011) concluyeron que los hongos filamentosos son responsables de la mayor celulosis en la naturaleza, por la eficiencia y diversidad de sus sistemas celulolíticos y sus ventajas adaptativas. Investigadores como Carreño & Flores (2003), Constantino & Manayay (2005) y Ortiz & Uribe (2011) también aislaron hongos celulolíticos de suelos agrícolas, aunque también se han reportado en suelos con hojarascas (Vílchez, 2002), compost (Mikán & Castellanos, 2004), residuos de beneficio del café (Payán, 2011) y bagazo de caña de azúcar (Collazos & Ortiz, 2014).

Los hongos lignolíticos y celulolíticos se reconocieron por su desarrollo micelial en agar sales minerales con lignina y papel filtro como fuentes de carbono. Estos medios son selectivos y limitan el crecimiento de los microorganismos que no sintetizan las enzimas necesarias para degradar los polímeros (Ferrer *et al.*, 2011). Para el aislamiento de hongos celulolíticos, coincidiendo con Vílchez (2002), se utilizó papel filtro, constituido por 98 % de celulosa (Ramírez & Coha, 2003); no obstante, también se puede utilizar celulosa cristalina al 1 % (Ferrer *et al.*, 2011) y carboximetilcelulosa (Ortiz & Uribe, 2010). A su vez, para el aislamiento de hongos lignolíticos, coincidiendo con Ortiz & Uribe (2010), se utilizó agar lignina.

La celulosa es un polímero de D-glucosas unidas por enlaces β 1-4, que se estructuran en largas cadenas lineales o microfibrillas, formando una estructura cristalina, resistente a la hidrólisis y regiones amorfas, susceptibles a la biodegradación. Por su parte, la lignina es un heteropolímero, amorfo, tridimensional y ramificado, formado por alcoholes aromáticos, altamente resistentes a la degradación química y biológica (Cuervo *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2009; Ferrer *et al.*, 2011).

El material lignocelulósico como el bagazo de caña de azúcar contiene celulosa, hemicelulosa y lignina (Díaz, 2008). Como cualquier biomasa lignocelulósica en su forma nativa, es resistente a la sacarificación y para obtener jarabes glucosados se requiere un tratamiento para remover la lignina y hemicelulosa, reducir la cristalinidad de la celulosa e incrementar la porosidad del material, mejorando la liberación de azúcares, evitando la degradación de

los carbohidratos, así como también, la formación de compuestos inhibitorios en la fermentación alcohólica. Los procesos para el tratamiento de materiales lignocelulósicos pueden ser físicos, físicos-químicos y biológicos (Cuervo *et al.*, 2009). En el contexto biológico, en el presente estudio se investigó la actividad lignolítica y celulolítica de los hongos filamentosos nativos.

En la valoración de la actividad lignolítica, los hongos presentaron bueno, regular y escaso desarrollo micelial en bloques de madera de pino. Esta madera blanda está constituida básicamente por 25 – 35 % de lignina 25 – 30 % de hemicelulosa y 40 – 50 % de celulosa (Joshi *et al.*, 2011) y para metabolizarla los microorganismos necesitan sistemas enzimáticos que despolimericen la lignina y que hidrolicen la celulosa y hemicelulosa (Carreón *et al.*, 2009).

Los hongos lignolíticos, identificados fueron *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* y *Verticillium* spp. Se coincide con Collazos y Ortiz (2014), quienes observaron mayor biomasa en bloques que madera con *Aspergillus*, *Paecilomyces* y *Penicillium*. Ahammed & Prema (2010) estudiaron como degradadores de lignina a *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. japonicus* y *A. fumigatus*. A su vez, Ortiz & Uribe (2010) demostraron actividad lignolítica en *Verticillium* sp. Por su parte, Collazos & Ortiz (2014) informaron que *Cladosporium* y *Verticillium* formaron micelio visible sobre bloques de madera después de 15 días; sin embargo, el desarrollo fue calificado como regular, siendo superados por *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium* y *Trichoderma*. Por el contrario, Ortiz & Uribe (2010), mencionaron que *Verticillium* es de interés biotecnológico porque oxida parcialmente la lignina hasta ácido húmico y fúlvicos, favoreciendo la formación de agregados en el suelo, contrario a lo que ocurre con los basidiomicetes lignolíticos que mineralizan hasta dióxido de carbono y pueden ser microorganismos interesantes para la biorremediación.

Los hongos lignolíticos producen tres tipos de enzimas extracelulares, la lignina y manganeso peroxidasas, que oxidan los anillos aromáticos, utilizando el peróxido de hidrógeno como co-substrato y la lacasa que oxida los residuos metoxilo laterales con oxígeno molecular como co-substrato (Ortiz & Uribe,

2010). En la presente investigación se detectó actividad peroxidasa y lacasa en los hongos nativos, coincidiendo con Ortiz & Uribe (2010).

En agar lignina y bloques de madera desarrollaron *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* y *Verticillium* spp.; no obstante, solo se evidenció actividad enzimática en *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Penicillium*. Se coincide con Ortiz & Uribe (2010) quienes aislaron *Penicillium*, *Verticillium*, *Fusarium* y *Zygorhynchus* en agar lignina; sin embargo, solo dos cultivos de *Verticillium* spp. mostraron actividad peroxidasa por oxidación positiva de guayacol. Éste es un fenol que actúa como dador de hidrógenos, por medio de peróxidos (H_2O_2), los cuales al ser oxidados por las peroxidasas cambian su estructura a tretraguayacol o complejo color rojo ladrillo, responsable de la reacción positiva observada en el medio de cultivo (Ramírez, 2009). A su vez, las lacasas son enzimas que oxidan gran variedad de compuestos metoxi- o amino-monofenoles como el guayacol, pero también oxidan los componentes no fenólicos diaminas aromáticas como el α -naftol, cambiando su estructura a su forma oxidada, de color púrpura (More *et al.*, 2011; Galai *et al.*, 2012).

Los microorganismos degradadores de sustratos celulósicos producen múltiples enzimas, que actúan en sinergismo directamente sobre la celulosa. Las celulasas son glicosil hidrolasas y rompen el enlace glucosídico, siendo clasificadas con base al sitio que cortan la fibra de celulosa en endocelulasas, endoglucanasas ó 1,4- β -D-glucanohidrolasas; exocelulasas o exoglucanasas y β -glucosidasas, β -D-glucósido glucohidrolasas o celobiasas (Martínez *et al.*, 2008). En este contexto, se investigó la actividad endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa de los hongos celulolíticos nativos.

La actividad endoglucanasa se investigó por los halos de hidrólisis alrededor de las colonias de los hongos cultivados en agar sales minerales con carboximetilcelulosa, coincidiendo con Carreño & Flores (2004) y Mikán & Castellanos (2004). Las endoglucanasas actúan aleatoriamente sobre las regiones de celulosa amorfa en el interior del polisacárido, generando oligosacáridos de diferente tamaño y por lo tanto, nuevas cadenas terminales (Martínez *et al.*, 2008). La actividad *in vitro* de la endoglucanasa se investiga

utilizando carboximetilcelulosa, por lo que también se denomina carboximetilcelulasa, CMCasa o enzima con actividad hidrolítica de la carboximetilcelulosa, un derivado soluble de la celulosa (Valdiño *et al.*, 2004).

En la presente investigación se detectó actividad endoglucanasa con *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Chrysosporium*, *Cunninghamella*, *Rhizoctonia* y *Trichoderma*, coincidiendo con Carreño & Flores (2004); Mikán & Castellanos (2004); Rodríguez & Piñeros (2007) y Manjarrés *et al.* (2011). Con estos hongos se observó un halo de hidrólisis visible, demostrando la producción de cantidades apreciables de celulasas, detectables en el medio extracelular, característica que los hace deseables para su aplicación biotecnológica (Gutiérrez *et al.*, 1998). De esta manera, el mayor diámetro de los halos de hidrólisis fue de 10 mm con *Aspergillus niger*, *Chrysosporium* y *Trichoderma* sp. Se coincide con Carreño & Flores (2004), quienes informaron de halos de hidrólisis de 8 – 13 mm con *Aspergillus* y *Trichoderma* sp.

Los halos de hidrólisis celulolítica se evidenciaron adicionando rojo congo al 1 % como revelante disuelto en agua, coincidiendo con Mikán y Castellanos (2004) quienes reportaron halos de degradación de 1,0 – 1,1 cm para *Fusarium merismoides*, *F. oxysporum*, *Paecilomyces*, *Penicillium* sp. y *Clonostachys rosea* aislados de muestras de compost y suelos bajo agricultura orgánica. La mayoría de estudios, concernientes a la naturaleza, modo de acción y aspectos generales de las celulasas han sido realizados usando *Trichoderma reesei*, como modelo de mejor productor de endoglucanasas mayoritariamente; sin embargo, presenta baja actividad β -glucosidasa, limitante de la velocidad y extensión de la hidrólisis (Ferrer *et al.*, 2011).

La actividad exoglucanasa se evidenció por el desarrollo micelial en papel filtro, coincidiendo con Vilchez (2002); Constantino & Manayay (2005) y Collazos & Ortiz (2014). Las exoglucanasas actúan en los extremos terminales del polímero, liberando ya sea moléculas de glucosa (glucohidrolasas o 1-2- β -D-glucan glucohidrolasa) o moléculas de celobiosa (celobiohidrolasas o 1,4- β -D-celobiohidrolasas). La actividad *in vitro* de la exoglucanasa se investiga utilizando papel de filtro, por lo que también se denomina papel de filtro

celulosa, Fpasa o enzima con actividad hidrolítica del papel filtro o de la celulosa cristalina (Valiño *et al.*, 2004; Martínez *et al.*, 2009).

En la presente investigación se detectó actividad exoglucanasa con *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Chrysosporium*, *Cunninghamella*, *Rhizoctonia* y *Trichoderma*, coincidiendo con Aguilar (2001), Vílchez (2002), Constantino & Manayay (2005), Rodríguez & Piñeros (2007) e Izarra *et al.* (2010). En la actividad exoglucanasa destacaron *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Trichoderma* coincidiendo con Constantino & Manayay (2005), Rodríguez & Piñeros (2007), Izarra *et al.* (2010), Manjarrés *et al.* (2011), Llacza (2012) y Srivastava & Agrawal (2012). Los hongos con actividad exoglucanasa como *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp. no solo colonizan el papel de filtro sino también lo degradan, disminuyendo el peso inicial (Vílchez, 2002; Collazos & Ortiz, 2014).

La actividad β -glucosidasa se evidenció por la glucosa liberada, cuantificándose 11,96 – 26,63 mg dL⁻¹ de glucosa. Se coincide con Ramírez & Cocha (2003). Las β -glucosidasas son β -D-glucósido hidrolasas y degradan la celobiosa o monómeros de glucosa (Martínez *et al.*, 2009).

En el proceso convencional para la obtención de etanol a partir de la biomasa lignocelulósica se consideran cuatro etapas: el pretratamiento para romper la matriz lignocelulósica, la hidrólisis enzimática para despolimerizar la celulosa a glucosa, la fermentación alcohólica y la destilación – rectificación – deshidratación, para obtener etanol con las especificaciones de combustible (Castro *et al.*, 2009; Tomás, 2010). En este contexto, se investigó la concentración de glucosa obtenida por hidrólisis del bagazo de caña de azúcar, con los hongos lignolíticos y celulolíticos seleccionados.

VI. CONCLUSIONES

- Se aislaron 300 hongos filamentosos lignolíticos y 294 hongos filamentosos celulolíticos de muestras de suelo cultivado con *Saccharum officinarum* L., “caña de azúcar”.
- En la actividad lignolítica el 13,3 % de los hongos presentó un buen desarrollo micelial en bloques de madera, el 2 % presentó actividad peroxidasa y el 1,67 % actividad lacasa.
- En la actividad celulolítica el 44,83 % de los hongos presentó actividad endoglucanasa, el 40,3 % actividad exoglucanasa y el 4,38 % actividad β -glucosidasa.
- Los hongos con actividad lignolítica correspondieron a *Aspergillus niger*, *Cladosporium* sp., *Verticillium* sp., *Aspergillus terreus*, *Paecilomyces* sp. y *Penicillium* sp.
- Los hongos con actividad celulolítica correspondieron a *Aspergillus niger*, *Cladosporium* sp., *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus*, *Alternaria* sp., *Chrysosporium* sp., *Cunninghamella* sp., *Rhizoctonia* sp. y *Trichoderma* sp.
- Los hongos seleccionados fueron *Aspergillus niger* PU2.5 con mayor actividad lignolítica y *Chrysosporium* sp. MP5.2 con mayor actividad celulolítica.
- Se obtuvo glucosa por hidrólisis de la lignocelulosa del bagazo de caña de azúcar alcanzando 28,76 mg dL⁻¹ con *Aspergillus niger* PU2.5 y 29,07 mg dL⁻¹ con *Chrysosporium* sp. MP5.2.
- El rendimiento alcohólico del bagazo de caña de azúcar hidrolizado por *Aspergillus niger* PU2.5 y *Chrysosporium* sp. MP5.2 fue 0,29 gg⁻¹, después de 72 horas de fermentación.

VII. RECOMENDACIONES

- Investigar la actividad hemicelulasa en los hongos filamentosos lignolíticos y celulolíticos.
- Realizar la caracterización molecular de *Aspergillus niger* PU2.5 y *Chrysosporium* sp. MP5.2.
- Optimizar las condiciones de hidrólisis del bagazo de *Saccharum officinarum* L. “caña de azúcar” con *Aspergillus niger* PU2.5 y *Chrysosporium* sp. MP5.2.
- Optimizar las condiciones de fermentación del hidrolizado de bagazo de caña de azúcar con *Aspergillus niger* PU2.5 y *Chrysosporium* sp. MP5.2.

VIII. RESUMEN

La producción de alcohol a partir de biomasa lignocelulósica es una alternativa sostenible; sin embargo, se requiere de un pretratamiento físico, químico o biológico. En este contexto, se investigaron hongos filamentosos nativos en la hidrólisis del bagazo de *Saccharum officinarum* L. "caña de azúcar" para la obtención de jarabes glucosados en la producción de bioetanol. Se colectaron 54 muestras de suelo cultivado con caña de azúcar, se diluyeron y se sembraron en agar sales minerales con 0,2 % de lignina y 1 % de papel filtro, obteniéndose 300 cultivos puros lignolíticos y 297 cultivos puros celulolíticos de muestras de suelo cultivado con *Saccharum officinarum* L., "caña de azúcar". En la actividad lignolítica el 13,3 % de los hongos presentó un buen desarrollo micelial en bloques de madera, el 2 % actividad peroxidasa y el 1,67 % actividad lacasa. En la actividad celulolítica el 44,83 % de los hongos presentó actividad endoglucanasa, el 40,3 % actividad exoglucanasa y el 4,38 % actividad β -glucosidasa. Los hongos con actividad lignolítica correspondieron a *Aspergillus niger*, *Cladosporium* sp., *Verticillium* sp., *Aspergillus terreus*, *Paecilomyces* sp. y *Penicillium* sp. Los hongos con actividad celulolítica correspondieron a *Aspergillus niger*, *Cladosporium* sp., *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus*, *Alternaria* sp., *Chrysosporium* sp., *Cunninghamella* sp., *Rhizoctonia* sp. y *Trichoderma* sp. Los hongos seleccionados fueron *Aspergillus niger* PU2.5 con mayor actividad lignolítica y *Chrysosporium* sp. MP5.2 con mayor actividad celulolítica. Se obtuvo glucosa por hidrólisis de la lignocelulosa del bagazo de caña de azúcar alcanzando 28,76 mg dL⁻¹ con *Aspergillus niger* PU2.5 y 29,07 mg dL⁻¹ con *Chrysosporium* sp. MP5.2. El rendimiento alcohólico del bagazo de caña de azúcar hidrolizado por *Aspergillus niger* PU2.5 y *Chrysosporium* sp. MP5.2 fue 0,29 gg⁻¹, después de 72 horas de fermentación.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcántara, R. & Zúñiga, J. (2012). *Remoción de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) de agua residual sintética para la generación de energía, por acción de consorcios microbianos nativos en celdas de combustible, Lambayeque, 2012.* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Aguilar, C. (2001). Biodegradación de celulosa de bagazo de caña de azúcar por hongos celulolíticos. *Revista Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 3(2), 117-121.
- Ahammed, S. & Prema, P. (2002). Influence of media nutrients on synthesis of lignin peroxidase from *Aspergillus* sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1(6), 102 -103.
- Alvitres, V. (2000). *Método Científico. Planificación de la Investigación.* 2da ed. Lambayeque: Editorial Ciencia.
- Burnett, H. & Hunter, B. (1999). *Illustrated General of Imperfect Fungy.* EEUU: Burgess Publishing.
- Carreño, C. & Flores, C. (2003). *Capacidad celulolítica de mohos aislados de suelos agrícolas de la comunidad de San José, Lambayeque, 2002* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Carreón, O., Ramos, A., Centeno, S., Leal, L., Martínez, A. & Fernández, M. (2009). Etanol carburante. *BioTecnología*, 13(3), 295-331.
- Castro, C., Elena, M. & Octavio, P. (2009) Biocombustibles: biomasa lignocelulósica y procesos de producción. *Ideas CONCYTEG*, 4(54), 1246-70.
- Chen, J. (1997). *Manual del Azúcar de Caña.* Balderas, México: Limusa.
- Collazos, L. & Ortiz, R. (2014). *Hongos filamentosos en la hidrólisis del bagazo de *Saccharum officinarum* L., caña de azúcar, para la producción de etanol celulósico en Lambayeque, 2012.* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.

- Constantino, A. & Manayay, J. (2005). *Exoglucanasas de mohos celulolíticos aislados de suelos agrícolas de la provincia de Ferreñafe, Febrero a Noviembre, 2004*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Coyne, M. (2000). *Microbiología del Suelo un Enfoque Exploratorio*. España: Editorial Paraninfo.
- Cuervo, L., Folch, J. & Quiroz, R. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Biotecnología*, 13(3), 11-25.
- Díaz, R. (2008). Caracterización energética del bagazo de caña de azúcar del ingenio Valdez. Ecuador. Curso internacional: producción y aprovechamiento energético de biomasa. Riobamba, Ecuador.
- Delgado, D. & Ramos, L. (2009). *Temperatura y pH en la producción de pectinasas por Aspergillus niger nativo en bagazo de caña de azúcar (Saccharum officinarum) con cáscara de naranja (Citrus sinensis)*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Ferrer, Y., León, M., Michelena, G., Dustet, J., Duque, A., Ibañez, M. & Tortoló, K. (2011). Evaluación y selección de hongos aislados de bagazo de caña con actividad celulasa sobre celulosa cristalina para posibles aplicaciones industriales. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 45(1), 3-12.
- Galai, S., Touhami, Y., Marzouki, M. (2012). Response surface methodology applied to laccases activities exhibited by *Stenotrophomonas maltophilia* AAP56 in different growth conditions. *BioResources*, 7(1), 706-726.
- Gaitán, D. & Pérez, L. (2007). *Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (Dendranthema grandiflora)*. (Tesis Doctoral). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.
- Grupo de Trabajo de Agroenergía en el Sector Agrario. (2009). Resolución Ministerial N° 0315-2009-AG. Lima, Perú: Diario Oficial El Peruano.
- Hernández, R., Fernández, C. & Baptista, P. (2003). *Metodología de la Investigación*. México: MC Graw Hill Interamericana Editores S.A.

- Hill, J., Nelson, E., Tilman, D., Polasky, S. & Tiffany, D. (2006). Environmental, economic and energetic; costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(30), 11206-10.
- Izarra, M., Santayana, M., Villena, G. & Gutiérrez, M. (2010). Influencia de la concentración de inóculo en la producción de celulasa y xilanasa por *Aspergillus niger*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7(2), 139-150.
- Joshi, B., Bhatt, M., Sharma, D., Joshi, J., Malla, R. & Sreerama, L. (2011). Lignocellulosic ethanol production: Current practices and recent developments. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 6(8), 172-182.
- Labarca, M., Sanabria, N. & Arcia, A. (2006). Patogenicidad de *Pestalotiopsis palmarum* Cooke, sobre plantas de vivero de palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*, 23, 417-424.
- Llaczka, H. (2012). *Evaluación de la actividad celulolítica del complejo enzimático celulasa en cepas fúngicas de los departamentos de Cajamarca, Lima, Junín, Huánuco*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Ley N° 28054 de promoción del mercado de biocombustibles. (2003). En Diario Oficial El Peruano N° 8447. Perú.
- Ley N° 27446 del Sistema Nacional de Evaluación de Impacto Ambiental. (2001). En Diario Oficial El Peruano N° 7609. Perú.
- Long, Y., Halis, R., Lai, O. & Mohamed, R. (2012). Conversion of lignocellulosic biomass from grass to bioethanol using materials pretreated with alkali and the White rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. *BioResources*, 7(4), 5500-13.
- Lynd, L., Weimer, P., van Zyl, W. & Pretorius, I. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 3, 506-77.
- Manjarrés, K., Piñeros, Y. & Rodríguez, E. (2011). Evaluación del complejo enzimático producido mediante el cocultivo de *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp. en fase sólida sobre residuos de palma. *Bioagro*, 23(1), 19-26.

- Martínez, C., Balcázar, E., Dantán, E. & Floch, J. (2008). Celulasas fúngicas: aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50(3-4), 119-131.
- Mejía, T., Mújica, F., Gonzales, A. & Ortega, J. (2002). Proteínas con afinidad a celulosa: una herramienta en biotecnología. *Revista Avance y Perspectiva*, 1(21), 267-271.
- Mikán, J. & Castellanos, E. (2004). Screening para el aislamiento y caracterización de microorganismos y enzimas potencialmente útiles para la degradación de celulosas y hemicelulosas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 6 (1), 58-71.
- Ministerio de Energía y Minas, MINEM. (2010). *Análisis de la cadena del valor del alcohol carburante y del biodiesel*. Lima, Perú: MINEM.
- Ministerio de Energía y Minas, MINEM. (2011). *Conclusiones y recomendaciones de normatividad: cadena de valor del alcohol carburante y del biodiesel*. Lima, Perú: MINEM.
- More, S., Renuka, P., Pruthvi, K., Swetha, M., Malini, S., Veena, S. (2011). Isolation, purification and characterization of fungal laccase from *Pleurotus* sp. *Jain University* 248735 (2011), 7.
- Modificación del Reglamento para la Comercialización de Biocombustibles. (2009). *Decreto Supremo N° 091-2009-EM*. Lima, Perú: Diario Oficial El Peruano N° 10840.
- Municipalidad Provincial de Lambayeque, MPL. (2013). Lambayeque: Municipalidad Provincial de Lambayeque. Recuperado de: http://www.munilambayeque.gob.pe/ubicacion_geografica.php
- Okino, L., Gomes, K., Fabris, C. & Ramos, V. (2000). Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 889-93.
- Ortiz, M. & Uribe, D. (2010). Determinación de la actividad lignocelulolítica en sustrato natural de aislamientos fúngicos obtenidos de sabanas de pastoreo y de bosque secundario de sabana inundable tropical. *Ciencias del Suelo*, 28 (2), 169-180.

- Payán, C. (2011). *Aislamiento, identificación y conservación de microorganismos presentes en residuos lignocelulósicos (pulpa) provenientes del beneficio del café*. (Tesis Doctoral). Universidad Católica de Manizales, Caldas, Colombia.
- Pérez, J., Muñoz, A., De la Rubia, T. & Martínez, E. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5, 53-63.
- Ramírez, C. (2009). *Estudio experimental de la desactivación de la enzima peroxidasa durante el proceso de escaldado de papas (Solanum tuberosum) y el almacenamiento a -18°C*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Ramírez, P. & Coha, J.M. (2003). Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celulolítica. *Revista Peruana de Biología*, 10 (1), 67-77.
- Reglamento para la Comercialización de Biocombustibles. (2007). *Decreto Supremo N° 021-2007-EM*. Lima, Perú: Diario Oficial El Peruano N° 9810.
- Reglamento de la ley de promoción del mercado de biocombustibles. (2005). *Decreto Supremo N° 013-2005-EM*. Lima, Perú: Diario Oficial El Peruano N° 9054.
- Reglamento de la Ley del Sistema Nacional de Evaluación de Impacto Ambiental. (2009). *Decreto Supremo N° 019-2009-MINAM*. Lima; Perú: Diario Oficial El Peruano N° 10742.
- Rajan, A., Sena, R., Pavithran, C. & Abraham, T. (2005). Biosoftening of coir fiber using selected microorganisms. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 28, 165-173.
- Rodríguez, I. & Piñeros, Y. (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. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 14(2), 35-42.

- Rojith, G. & Bright Singh, I. (2013). Hydrogen peroxide pretreatment efficiency comparison and characterization of lignin recovered from coir pith black liquor. *Journal of Environmental Research and Development*, 7 (4), 1333-39.
- Rubin, E. (2008). Genomics of cellulosic biofuel. *Nature*, 454, 841-45.
- Saha, B. (2004). Lignocellulose biodegradation and applications in biotechnology. En B. Saha *et al.* (Compos). Lignocellulose Biodegradation (p. 2-34). Washington, DC: American Chemical Society.
- Saldarriaga, Y. & Pineda, F. (2001). *Manual de Micología Aplicada*. Colombia: Editorial Universidad de Antioquía.
- Saucedo, J., Castro, A., Martínez, M. & Campos, J. (2010). Diseño de un bioproceso para la obtención de etanol anhidro a partir de bagazo del *Agave tequilana* Weber. *Ciencia Nicolaita*, 1, 1-9.
- Sociedad Peruana de Derecho Ambiental, SPDA. (2011). Criterios de sostenibilidad para la producción de biocombustibles: propuesta de herramientas y entidades responsables de su evaluación por nivel de gobierno. Lima, Perú.
- Srivastava, A. & Agrawal, P. (2012) Saccharification by fungi and ethanol production by bacteria using lignocellulosic materials. *International Research Journal of Pharmacy*, 3(5), 411-14.
- 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. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100, 637-43.
- Tejada, L., Quintana, J., Pérez, J. & Young, H. (2011). Obtención de etanol a partir de residuos de poda, mediante hidrólisis ácida e hidrólisis enzimática. *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*, 14(1), 111-16.
- Tomás, M. (2010). *Bioetanol de paja de trigo: estrategias de integración de las etapas del proceso*. (Tesis de Especialización). Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

- Valiño, E., Elías, A., Torres, V., Carrasco, T. & Albelo, N. (2004). Mejoramiento de la composición del bagazo de caña de azúcar por la cepa *Trichoderma viride* M5-2 en un biorreactor de fermentación en estado sólido. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 38 (2), 145-153.
- Vílchez, L. (2002). *Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

X. ANEXOS

ANEXO 1

Fórmula para la determinación del número de muestras (en Alvitres, 2000)

$$n = \frac{Z^2 \cdot p \cdot q}{t^2}$$

$$n = \frac{(1,96)^2 (0,90)(0,10)}{(0,08)^2}$$

$$n = 54$$

n = 54 muestras de suelo cultivado con *Saccharum officinarum* L, “caña de azúcar” para el aislamiento de hongos lignocelulolíticos.

Dónde:

n = tamaño de muestra

Z = 1,96 ($\alpha=0,05$) valor estándar

p = Presencia (0,90) de hongos lignolíticos y celulolíticos en suelos agrícolas

q = tasa de ausencia (1-p = 0,10)

t = error permitido (0,08)

ANEXO 2

Medio de cultivo para aislamiento, cultivo y mantenimiento de hongos lignolíticos (en Rajan *et al.*, 2005)

Agar sales minerales-Lignina 0,2 % (precipitación ácida de lignina a partir de fibra de bonote) suplementado con cloranfenicol para aislamiento de hongos.

Componentes	g/L
Lignina	2,00
K ₂ HPO ₄	0,80
KH ₂ PO ₄	0,20
CaSO ₄ .H ₂ O	0,05
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,00
Agar agar	20,00
H ₂ O csp	1 000 mL
pH	7,0

Para obtener lignina según Rojith y Singh (2013), eliminar manualmente las fibras externas del exocarpo del fruto de *Cocos nucifera*, “cocotero”, y coleccionar el material que se desprende o fibra de bonote. Pesar 3 g de fibra de bonote, depositar en un balón con 100 ml con solución de H₂O₂ 10 vol (comercial) y agitar ligeramente cada hora durante 10 horas. Filtrar y coleccionar el “licor negro de fibra de bonote” en frascos color ámbar. Para recuperar la lignina, en un tubo de ensayo agregar 0,40 mL de H₂SO₄ 98 % por cada 20 mL de licor negro de fibra de bonote, centrifugar a 4000 rpm por 15 minutos. Recuperar el sedimento o lignina y llevar a estufa a 40 °C por 3 días para eliminar el exceso de humedad. Triturar la lignina deshidratada en agua destilada con la ayuda de un mortero y pilón para pulverizar. Agregar los otros

componentes, ajustar el pH y esterilizar a 15 libras de presión, 121 °C durante 20 minutos.

Disolver una cápsula de cloranfenicol de 250 mg en 10 mL de alcohol al 95 %. Para 1 L de agar sales minerales-lignina agregar 2 mL de la disolución del antibiótico.

ANEXO 3

Medio de cultivo para aislamiento, cultivo y mantenimiento de hongos celulolíticos (en Ortiz & Collazos, 2014)

Agar sales minerales-Celulosa 1 % (papel filtro Whatman N°1) suplementado con cloranfenicol para aislamiento de hongos celulolíticos.

Componentes	g/L
Celulosa	10,00
K ₂ HPO ₄	0,80
KH ₂ PO ₄	0,20
CaSO ₄ .H ₂ O	0,05
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,00
Agar agar	20,00
H ₂ O csp	1 000 mL
pH	7,0

Fragmentar (0,5 cm²) papel filtro Whatman N°1. Pesar 1 g, triturar en un mortero con 100 mL de agua destilada. Agregar los otros componentes, ajustar el pH y esterilizar a 15 libras de presión, 121 °C durante 20 minutos. Disolver una cápsula de cloranfenicol de 250 mg en 10 mL de alcohol al 95 %. Agregar 2 mL del antibiótico disuelto en un litro de agar sales minares-Celulosa 1 %.

ANEXO 4

Agar papa dextrosa para identificación y cultivo de hongos lignolíticos y celulolíticos (en Delgado y Ramos, 2009)

Componentes	g/L
Papa	2,00
Dextrosa	2,00
Agar agar	15,0
Agua destilada en cantidad suficiente	1 000 mL

Hervir 250 g de papas (peladas y picadas) en 500 mL de agua destilada, durante 20 minutos. Completar a 500 en agua destilada. Filtrar y recepcionar el filtrado en un vaso de precipitación. Añadir 20 g de agar disuelto en 500 mL de agua destilada (baño maría). Completar a 1 litro con agua destilada y distribuir en matraces. Esterilizar a 15 libras de presión, 121 °C durante 20 minutos.

ANEXO 5

Agar agua al 2% (en Saldarriaga y Pineda, 2001)

Componentes	g/L
Agar agar	20,00
H ₂ O csp	1 000 mL
pH	7,0

Esterilizar a 15 libras de presión, 121 °C durante 20 minutos.

ANEXO 6

Medio de cultivo CGA modificado para la detección de actividad peroxidasa y lacasa (en Okino *et al.*, 2001)

Componentes	g/L
Bagazo de caña de azúcar pulverizado	2,00
Guiaicol	0,10
K ₂ HPO ₄	0,80
KH ₂ PO ₄	0,20
CaSO ₄ .H ₂ O	0,05
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,00
Agar agar	20,00
H ₂ O csp	1 000 mL
pH	7,0

Esterilizar a 15 libras de presión, 121 °C durante 20 minutos. Agregar 10 mL de solución de guaicol al 1 % en un litro de medio de cultivo CGA modificado.

ANEXO 7

Agar sales minerales-Carboximetilcelulosa 1 % para la detección de actividad endocelulasas (en Gaitán & Pérez, 2007)

Componentes	g/L
Carboximetilcelulosa	10,00
K ₂ HPO ₄	0,80
KH ₂ PO ₄	0,20
CaSO ₄ .H ₂ O	0,05
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,00
Agar agar	20,00
H ₂ O csp	1 000 mL
pH	7,0

Esterilizar a 15 libras de presión, 121 °C durante 20 minutos.

ANEXO 8

Caldo sales minerales para la detección de hongos degradadores de celulosa (en Constantino & Manayay, 2005)

Componentes	g/L
K_2HPO_4	0,80
KH_2PO_4	0,20
$CaSO_4 \cdot H_2O$	0,05
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,50
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01
$(NH_4)_2SO_4$	1,00
H_2O csp	1 000 mL
pH	7,0

Esterilizar a 15 libras de presión, 121 °C durante 20 minutos.

ANEXO 9

Obtención de extracto de *Salix* sp., “sauce” como fuente de salicina (en Ramírez & Cocha 2003)

Extraer manualmente la corteza de ramas de *Salix* sp., “sauce”. En un frasco de vidrio de 500 g capacidad pesar 10 g de fragmentos de corteza previamente extraídos. Agregar 300 mL de etanol 96 % (comercial), tapar el frasco y reposar a temperatura ambiente, en oscuridad, por 2 días. Recuperar el extracto de sauce, filtrar con malla de 2 mm y eliminar los restos de corteza. Verter el extracto en cristalizadores para favorecer la evaporación del alcohol y reposar hasta ver la formación de una sustancia pastosa.

ANEXO 10

Método de Glucosa Oxidasa para cuantificar glucosa (en Alcántara y Zúñiga, 2012)

FUNDAMENTOS DEL MÉTODO

La glucosa reacciona con el reactivo enzimático que contiene una mezcla de las enzimas Glucosa Oxidasa (GOD) y Peroxidasa (POD). En la primera etapa la glucosa es oxidada a ácido glucorónico por la acción de la enzima GOD, liberándose como producto H_2O_2 , el cual en una reacción mediada por la enzima POD, reacciona con el ácido p-hidroxibenzoico y 4-aminoantipirina produciéndose un compuesto coloreado con un máximo de absorción a 505 nm., en cantidad proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra.



REACTIVOS

Los reactivos serán conservados entre 2 y 8 °C y protegidos de la luz para que se mantengan estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

Composición del reactivo enzimático	
Buffer fosfato pH 7.0	75 mM
Glucosa Oxidasa (<i>Aspergillus niger</i>)	≥15000 U/l
Peroxidasa	≥2000 U/l
4-Aminoantipirina	0.5 mM
Ácido p-hidroxibenzoico	10 mM
Azida sódica	0,1 g/dl
Estabilizantes y preservantes no reactivos	c.s.p

Preparación del reactivo de trabajo: El reactivo de trabajo se provee listo para su uso. El reactivo con el tiempo puede tomar un leve color rosado, que no

afecta los resultados. Descartar el reactivo si su absorbancia contra blanco de agua es superior a 0,4 DO a 505 nm.

TÉCNICA

Llevar el reactivo a la temperatura que se realizará el ensayo. Las pipetas a utilizar deber estar limpias y libres de residuos par ano contaminar el reactivo.

		Blanco	Calibrador	Muestra
Muestra	(ml)	--	--	0.01
Calibrador	(ml)	--	0.01	--
Reactivo	(ml)	1.00	1.00	1.00
Mezclar e incubar 5 minutos a 37 °C o temperatura ambiente (20 ° a 25 °C). Leer las absorbancias ajustando a cero el espectrofotómetro con el blanco de reactivo. El color resultante es estable por a lo menos treinta minutos.				

CÁLCULO

Factor = $\frac{\text{Concentración Calibrador}}{\text{Abs. Calibrador}}$
Glucosa (mg/dL) = Factor x Abs. Calibrador

ANEXO 11

Cálculo de coeficiente de rendimiento

El grado alcohólico del producto obtenido fue 0,0138°, que equivalen a 0,0138 % de etanol, que a su vez equivalen a 0,138 mL de etanol por litro de producto obtenido:

$$0,0138 \text{ GL} \rightarrow 0,0138\%$$

$$\begin{array}{rcl} 0,0138 & \rightarrow & 100 \text{ mL} \\ x & \rightarrow & 1000 \text{ mL} \end{array}$$

$$x = 0,138 \text{ mL L}^{-1}$$

La concentración de etanol del producto se encuentra expresado en volumen sobre volumen (v/v), se hace la conversión a peso sobre volumen (p/v):

$$\begin{array}{l} 0,138 (0,79357) \\ 0,1095 \text{ g L}^{-1} \end{array}$$

Para el cálculo del rendimiento alcohólico ($Y_{p/s}$) del bagazo de caña de azúcar hidrolizado por los hongos lignolítico y celulolítico seleccionados, se hace una división de la concentración del etanol (p/v) obtenido en el producto entre la concentración de glucosa (p/v) consumida para su producción:

$$\begin{array}{lcl} Y_{p/s} & = & \frac{0,1095}{0,3717} \\ Y_{p/s} & = & 0,29 \text{ gg}^{-1} \end{array}$$

Siendo el porcentaje de conversión 29 %