


DESLIGNIFICACIÓN DE LA FIBRA INSOLUBLE DEL BAGAZO DE CAÑA EN MEDIO SÓLIDO

Ing. Perla X. Sotelo-Navarro, Dra. María T. Castañeda-Briones, MsC. María del R. Cruz-Colín, 
MsC. Miguel Ávila-Jiménez

al2121800068@alumnos.azc.uam.mx; tcb@correo.azc.uam.mx

Laboratorio de Microbiología Ambiental, Departamento de Ciencias Básicas, UAM-Azcapotzalco

● Resumen

Utilizando como sustrato la fibra insoluble del bagazo de caña de azúcar en medio sólido, se evaluó la capacidad ligninolítica de dos hongos: *Cladosporium sp.* y *Fusarium sp.*, aislados del bagazo, y se compararon con el hongo *Phanerochaete chrysosporium*. La fermentación se realizó en biorreactores con 3 g de fibra insoluble y 30 mL de medio basal; fueron inoculados con suspensión de esporas, mantenidos a una temperatura de 35 °C y aireados diariamente durante 10 min. La evaluación de la capacidad de degradación de la lignina se llevó a cabo midiendo periódicamente las cantidades de lignina, celulosa y azúcares reductores remanentes; así como la actividad enzimática durante 30 días de incubación. Los dos hongos mostraron actividad de lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa. Los porcentajes de degradación de lignina fueron: 16 % para *Cladosporium sp.*, 5 % con *Fusarium sp.* y 6 % con el hongo modelo.

Palabras clave: fibra insoluble, fermentación en estado sólido, lignina, actividad enzimática.

● Abstract

Insoluble fiber of sugar cane was used as substrate on solid media to evaluate the ability of two ligninolytic fungi (*Cladosporium sp.* and *Fusarium sp.*) isolated from bagasse and were compared with the fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Bioreactors were prepared with the substrate supplemented, inoculated with a spore suspension, maintained at a temperature of 35 °C, and aerated daily for 10 minutes. The evaluation of the ligninolytic activity was carried out periodically by measuring the amounts of lignin, cellulose and reducing sugars remaining, as well as the enzyme activity during 30 days of incubation. The two fungi showed activity of lignin peroxidase and manganese peroxidase. The percentages degradation of lignin were: 16 % with the fungus *Cladosporium sp.*, 5 % with *Fusarium sp.*, and 6 % with the model fungus.

Key words: insoluble fiber, solid state fermentation, lignin, enzyme activity.

● Introducción

Grandes cantidades de residuos vegetales y agroindustriales son generados y acumulados anualmente en la naturaleza en forma sólida, ocasionando serios problemas de contaminación ambiental y pérdidas de fuentes potenciales de alto valor agregado /1/. Estos problemas traen consigo el aumento del interés de la comunidad científica en encontrar nuevas tecnologías para el aprovechamiento de los mismos en la obtención de productos de alto

valor agregado. Es por ello que el uso integral y racional de los desechos agroindustriales como sustratos en la producción biotecnológica de nuevos productos se convierte en una alternativa extremadamente atractiva debido a la presencia en estos compuestos de grandes cantidades de celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina /2/.

Los desechos agroindustriales poseen poca biodegradabilidad debido a su alto contenido de materiales lignocelulósicos pero bajo las condiciones

adecuadas pueden ser un excelente soporte y/o sustrato para la fermentación en estado sólido /3/.

El bagazo de la caña de azúcar es un residuo que se genera en altas proporciones en la agroindustria, el cual contiene una cantidad apreciable de celulosa que puede ser separada de otras sustancias entre las cuales se encuentran principalmente la lignina y la hemicelulosa. De esta manera, se estaría creando un producto de valor añadido a partir de una fuente de biomasa, lo que a la vez representa una valiosa alternativa comercial para las agroindustrias.

Como todos los materiales lignocelulósicos es rico en fibra; sin embargo, debido a su estructura, son de difícil degradación, es necesario someterlos a tratamientos que conduzcan a la disminución o eliminación de las barreras físicas y químicas, tales como la cristalinidad de la celulosa, los grupos acetilo de la hemicelulosa y los enlaces entre la hemicelulosa y la lignina /4/.

La fermentación en estado sólido simula mejor las condiciones ambientales y nutricionales que los hongos pueden tener en un terreno donde se depositen los desechos agroindustriales. Por lo general, la fermentación se realiza utilizando como soporte los residuos agrícolas, y se les agrega una solución de sales u otros compuestos como sustratos, de modo que los nutrientes estarían disueltos en la solución acuosa absorbida sobre el soporte sólido /3/.

Métodos experimentales

Preparación del inóculo

Las tres cepas utilizadas como inóculo, fueron obtenidas del Laboratorio de Microbiología Ambiental del Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco (UAM-A), de las cuales, dos de ellas (*Cladosporium sp.* y *Fusarium sp.*), fueron aisladas previamente del bagazo de caña, y *Phanerochaete chrysosporium* (*P. chrysosporium*), la cual fue usada como comparativo respecto a las otras dos cepas.

Las cepas fueron mantenidas en tubos inclinados con agar extracto de malta y posteriormente fueron desarrolladas en botellas Roux con el mismo agar

durante dos semanas, a fin de obtener una suspensión de esporas para la inoculación del sustrato sólido.

Pruebas de degradación sobre sustrato sólido

Se obtuvo la fibra insoluble de bagazo de caña conforme a la Norma Mexicana NMX-F-300-1991 /5/ y se utilizó como fuente de sustrato en medio sólido, para lo cual se homogeneizó una porción de la muestra, se transfirió aproximadamente 100 g de la misma a una bolsa de lona y se lavó con agua caliente a 333 K (60 °C), hasta que el agua de lavado no presentó prueba positiva a la prueba de alfa-naftol.

El bagazo de caña de azúcar de donde se obtuvo la fibra insoluble utilizada en este proyecto fue proporcionado por el ingenio azucarero San José de Abajo, del Estado de Veracruz. Se pesó una cantidad de 3 g de fibra insoluble seca por biorreactor, y se añadieron 30 mL de medio basal con composición por litro: 2,0 g de KH_2PO_4 ; 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g de NH_4NO_3 ; 0,1 g de CaCl_2 ; 0,04 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 10,0 g de glucosa. Se sometió a un proceso de esterilización en autoclave (15 kg/cm² durante 20 min). Para cada periodo de incubación se realizó un sembrado por triplicado para cada hongo en estudio. Los biorreactores (figura 1) fueron aireados diariamente por un periodo aproximado de 10 min.

Actividad enzimática

Se prepararon extractos enzimáticos para determinar la actividad enzimática que presentan los tres hongos en estudio en cuanto a lacasa, lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP). Una vez tomadas las muestras de los biorreactores a los diferentes tiempos de crecimiento, se tomó el total de la fibra insoluble contenido en ellos con el micelio de los hongos; se mezcló con 50 mL de solución buffer de tartrato de sodio 0,25 M y pH 3,5; se llevó a agitación por 1 h y posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 min y se filtró. Los extractos fueron almacenados en refrigeración.

La actividad enzimática se monitoreó cada cinco días durante treinta días. Las mediciones se registraron usando un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV 1800. La actividad de la enzima lacasa se determinó

por la oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis [3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfónico] /6, 7/. La actividad de la enzima LiP se determinó por la oxidación del alcohol veratrílico a veratrilaldehído /8, 9/. La actividad de la enzima MnP se determinó por el método de la oxidación de rojo de fenol /10/.

Determinación de lignina, celulosa y azúcares reductores

El contenido de lignina se determinó por el Standard Test Method for Acid-Insoluble Lignin in Wood D1106/11/. La celulosa se precisó de acuerdo con Van Soest y Wine /12, 13/ y los azúcares reductores se determinaron por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS)/14/.

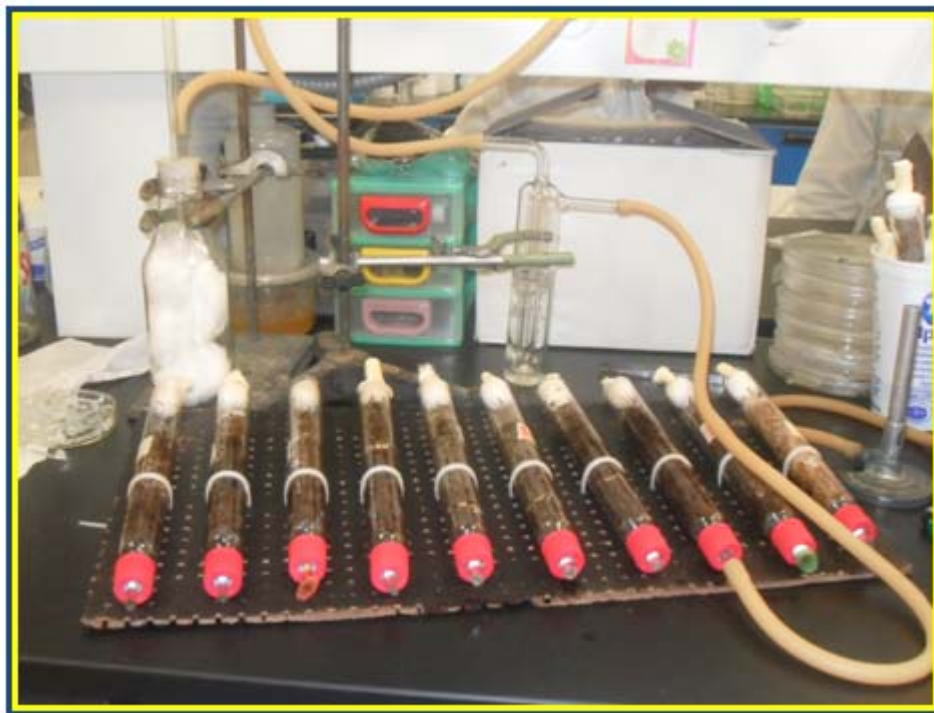


Fig. 1 Biorreactores utilizados en el estudio.

● Resultados y discusión

Actividad enzimática

Sólo se apreció actividad de LiP y MnP para los tres hongos. En la figura 2 se muestran los resultados de la actividad de LiP por litro de extracto. Los tres hongos mostraron baja actividad de LiP durante los primeros diez días.

Después de este periodo, la actividad aumentó presentando los hongos *Cladosporium sp.* y *Fusarium sp.* su máxima actividad el día 15 y *P. chrysosporium* el día 20. Al final se observó una tendencia a disminuir la actividad de *Cladosporium sp.* y *P. chrysosporium*. La

mayor actividad de LiP la presentó *P. chrysosporium* el día 20.

La figura 3 muestra los resultados de la actividad de MnP por litro de extracto. *Cladosporium sp.* y *Fusarium sp.* tuvieron un comportamiento similar, mostraron baja actividad de MnP durante los primeros 20 días de prueba y al final presentaron un aumento importante.

La actividad de *P. chrysosporium* se mantuvo baja y casi constante durante todo el periodo de prueba. La máxima actividad de MnP la presentaron *Cladosporium sp.* y *Fusarium sp.* el día 30, siendo ligeramente mayor la de *Cladosporium sp.*

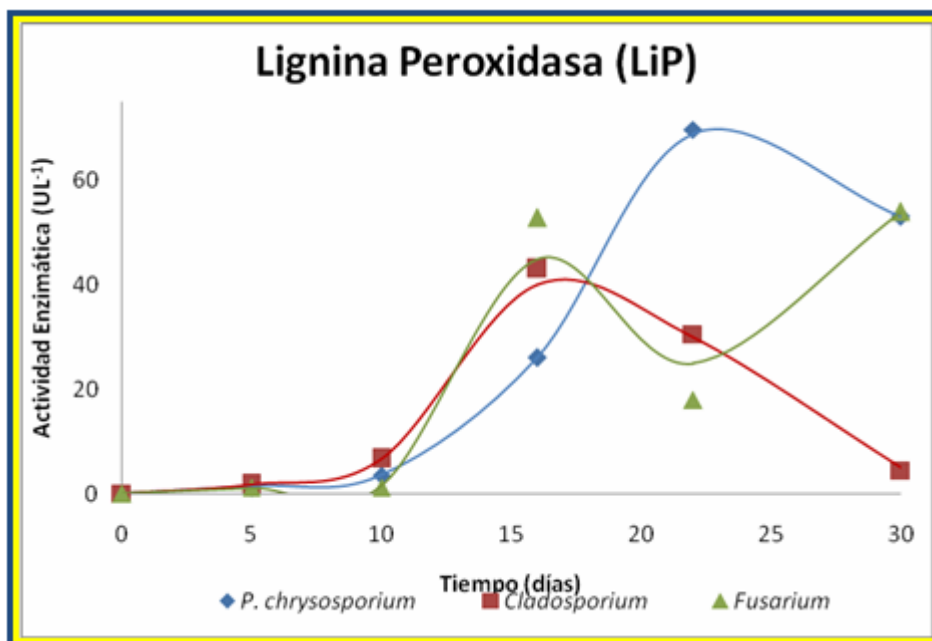


Fig.2 Actividad enzimática de LiP.

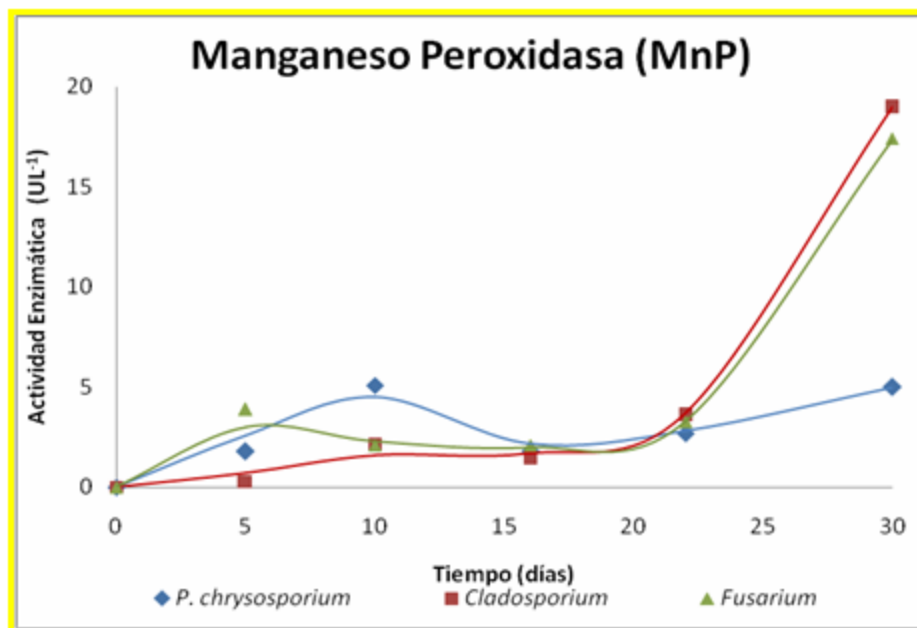


Fig.3 Actividad enzimática de MnP.

Determinación de lignina, celulosa y azúcares reductores

En la tabla 1 se muestran los porcentajes de degradación de lignina. *Cladosporium sp.* fue el hongo que produjo el mayor porcentaje de degradación de lignina (15,9 %).

Los resultados de la determinación de celulosa se presentan en la tabla 2. Los tres hongos mostraron una tendencia a incrementar el contenido de celulosa durante el periodo de la prueba. *Cladosporium sp.* es el hongo que dio el mayor incremento en el contenido de celulosa seguido por *Fusarium sp.*

TABLA1. PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN DE LIGNINA

Hongo	% Degradación
<i>P. chrysosporium</i>	5,8
<i>Cladosporium sp.</i>	15,9
<i>Fusarium sp.</i>	5,2

El contenido de celulosa en la fibra insoluble con el hongo *P. chrysosporium* aumentó ligeramente después del tratamiento.

TABLA2. CONTENIDO DE CELULOSA

Hongo	Celulosa inicial (%)	Celulosa Final (%)
<i>P. chrysosporium</i>	51,5	51,7
<i>Cladosporium sp,</i>	51,5	53,5
<i>Fusarium sp,</i>	51,5	52,9

La figura 4 muestra los resultados obtenidos para los azúcares reductores totales. En la gráfica se puede observar la velocidad de consumo de la glucosa.

Fusarium sp. es el hongo que presentó el consumo más rápido, mientras que *Cladosporium sp.* presentó el consumo más lento.

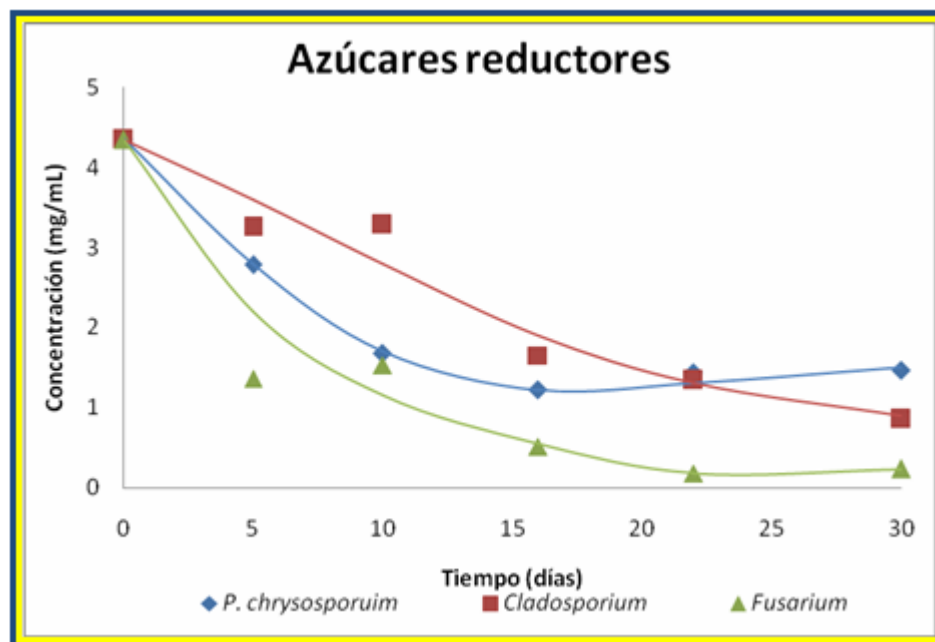


Fig. 4 Azúcares reductores totales en la fibra.



Conclusiones

Los tres hongos sólo mostraron actividad enzimática de LiP y MnP. Aunque la producción de estas enzimas ligninolíticas se presentó desde el día 5, la actividad resultó importante solo en los últimos diez días de tratamiento.

Bajo las condiciones de trabajo, la deslignificación de la fibra insoluble resultó, después del tratamiento, en una máxima degradación del 15,9 % con el hongo *Cladosporium* sp.; un 5,2 % con *Fusarium* sp. y un 5,8 % con *P. chrysosporium*. Aunque estos porcentajes de degradación son bajos se cree pueden mejorar modificando las condiciones de tratamiento para lograr una oportuna y mayor producción de enzimas.

La comparación de los hongos *Cladosporium* sp. y *Fusarium* sp. con la referencia del *P. chrysosporium* indica, después de las pruebas realizadas, que son potencialmente utilizables para el proceso de fermentación sólida aplicada a la obtención de celulosa, optimizando algunas condiciones del proceso como una posible alternativa biotecnológica para llevar a cabo la deslignificación de la fibra insoluble de manera sustentable y que permita reducir los impactos ambientales provocados por la obtención de la celulosa en la industria papelera. A lo anterior se añade la importancia de que utilizando como materia prima un residuo, se obtiene un producto de valor agregado.



Bibliografía

- MOLWITZ, M.; S. S. SILVA; J. D. RIBEIRO; I. C. ROBERTO; A. M. R. PRATA; MANCILLA, I. M. "Aspects of the Cell Growth of *Candida guilliermondii* in Sugar Cane Bagasse Hydrolysis". *Journal of Biosciences*. 1996, 51, (5-6), 404-408.
- GARCÍA, A. "Producción de enzimas ligninolíticas por *Basidiomycetes* mediante la técnica de fermentación en sustrato sólido". *Revista Colombiana*, 2003, 5, 1, 56-64.
- ROBINSON, T.; D. SINGH; P. NIGAM. "Solid State Fermentation: a Promising Microbial Technology for Secondary Metabolite Production". *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001, 55, 3, 284-289.
- PERNALETE, Z.; F. PIÑA; M. SUÁREZ; A. FERRER; C. AIELLO. "Fraccionamiento del bagazo de caña de azúcar mediante tratamiento amoniacal: efecto de la humedad del bagazo y de la carga de amoniacal". *Biagro*, 2008, 20, 1, 3-10.
- NMX-F-300-1991, "Industria Azucarera. Fibra en muestras de bagazo de caña de azúcar". Método de prueba. *Normas Mexicanas*. Dirección General de Normas.
- GÓMEZ-DORADO, C.; M. MARTÍNEZ-SALGADO; D. NIETO-MOSQUERA; A. PEDROZA-RODRÍGUEZ; R. RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ; J. ROSAS-ACOSTA. "Estudio del efecto de dos inductores y un protector enzimático sobre la actividad de las enzimas Mn-peroxidasa y lacasa producidas por *Trametes versicolor* y su efecto en la decoloración de efluentes de la industria papelera". *Universitas Scientiarum*, 2005, 10, 2, 37-45.
- GAYOSSO-CANALES, M.; F. ESPARZA-GARCÍA; E. RÍOS-LEAL; R. RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ. "Evaluación de la actividad enzimática de *Pleurotus ostreatus* en presencia de bifenilos policlorados". *El cultivo de setas *Pleurotus* spp en México*. Editores Sánchez-Vázquez, J.E., Martínez Carrera, D., Mata, G. y Leal Lara, H. ECOSUR. Preprinted, 2007, 191-197.
- TIEN, M.; T. K. KIRK. "Lignin-Degrading Enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, Characterization, and Catalytic Properties of a Unique H₂O₂-Requiring Oxigenase". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 2280-2284.
- KIRK, T. K.; R. L. FARREL. "Enzymatic Combustion: The Microbial Degradation of Lignin". *Ann. Rev. Microbiol*, 1987, 41, 465-505.
- KUWAHARA, M.; J. K. GLENN; M. A. MORGAN; M. H. GOLD. "Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*". *FEBS Letters*. 1984, 169, 2, 247-250.
- STANDARD TEST METHOD FOR ACID-INSOLUBLE LIGNIN IN WOOD. Technical Association of Pulp and Paper Industry, en *Standard Method*. D1106, 2001.
- ABDULLAH, N.; N. EJAZ; M. ABDULLAH; A. UNNISA; S. FIRDOUS. "Lignocellulosic Degradation in Solid-State Fermentation of Sugar Cane Bagasse by *Termitomyces* sp.". *Micología Aplicada Internacional*. 2006, 18, 2, 15-19.
- VAN SOEST, P. J.; R. H. WINE. "Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feed. IV. Determination on Plant Cell-Wall Constituents". *J. Assoc. Anal. Chem*, 1967, 50, 50-55.
- GHOSE, T. K. "Measurement of Cellulase Activities". *Pure and Applied Chemistry*. 1987, 59, 257-258.