

**BIOTECNOLOGÍA EN EL
SECTOR AGROPECUARIO
Y AGROINDUSTRIAL**

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial

ISSN: 1692-3561

ISSN: 1909-9959

biotecnofaca@unicauca.edu.co

Universidad del Cauca

Colombia

HEREDIA-MARTÍN, JUAN-PABLO; SÁNCHEZ-CASTELBLANCO, ETNA-MILENA

Evaluación de microorganismos y sustratos obtenidos a
partir de residuos orgánicos para la producción de celulasas

Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial,
vol. 21, núm. 2, 2023, Julio-Diciembre, pp. 50-61

Universidad del Cauca

Colombia

DOI: <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v21.n2.2023.2165>

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=380877291003>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica Redalyc

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso
abierto

Evaluación de microorganismos y sustratos obtenidos a partir de residuos orgánicos para la producción de celulasas*

Microorganism and substrate evaluation from organic wastes for cellulases production

HEREDIA-MARTÍN, JUAN-PABLO¹; SÁNCHEZ-CASTELBLANCO, ETNA-MILENA²

* Título del proyecto de origen: Proyecto obtención de productos aprovechables a partir de la valorización de residuos orgánicos generados en plazas de mercado de Bogotá, en el marco de la economía circular. Financiación: SENNOVA. Culminación: 20 de diciembre 2021.

- 1 Servicio Nacional de Aprendizaje – SENA, Regional Distrito Capital, Centro de Gestión Industrial, Grupo de Investigación en Procesos industriales. Maestría en biotecnología. Bogotá, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-5273-4108>
- 2 Servicio Nacional de Aprendizaje – SENA, Regional Distrito Capital, Centro de Gestión Industrial, Grupo de Investigación en Procesos industriales. Maestría en biología. Bogotá, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-3549-0164>

Correspondencia: esanchezc@sena.edu.co

Cómo citar este artículo

HEREDIA-MARTÍN, JUAN-PABLO ; SÁNCHEZ-CASTELBLANCO, ETNA-MILENA . Evaluación de microorganismos y sustratos obtenidos a partir de residuos orgánicos para la producción de celulasas. Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, v. 21, n. 2, 2023, p. 50-61. Doi: <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v21.n2.2023.2165>

RESUMEN

La necesidad de reducir los costos de producción de las enzimas y su amplia utilización en diferentes sectores industriales, ha incrementado el interés en la valorización de residuos agroindustriales como sustratos para la obtención de estos bioproductos. Los residuos agrícolas son una fuente tanto de celulosa como de microorganismos productores de celulasas, por lo que este estudio tuvo como propósito la selección de bacterias celulolíticas aisladas previamente de residuos generados en plazas de mercado y la evaluación de medios formulados a partir de estos. 11 cepas bacterianas fueron cultivadas en caldo Mandels durante 72 horas, evaluando su actividad celulolítica a 30 y 50 °C. Para la formulación de medios de cultivo se determinó el contenido de celulosa, nitrógeno y carbono orgánico total de los ameros de mazorca y vainas de leguminosas recolectados en una plaza de mercado. Se elaboraron tres medios de cultivo utilizando los residuos como fuente de celulosa y suplementándolos con peptona, sulfato de amonio y urea como fuente de nitrógeno. El medio A se formuló con residuos troceados y deshidratados, en el medio B estos tuvieron el mismo tratamiento adicionando un paso de licuado y para el medio C se utilizaron residuos licuados sin deshidratar. De las 5 cepas celulolíticas seleccionadas, C6M2 fue cultivada a 37 °C en los tres medios y la actividad enzimática fue monitoreada durante las 96 horas de fermentación. En los medios A y B se evidenció la producción de celulasas, siendo A el que presentó una mayor actividad ($19,82 \pm 3,0$ U/mL), mientras que en el medio C no se evidenció actividad celulolítica. En conclusión, la cepa bacteriana seleccionada C6M2 es capaz de producir celulasas en medios de cultivo formulados con ameros de mazorca y vainas de leguminosas troceados y deshidratados.

PALABRAS CLAVE:

Celulosa; Celulasas; Residuos agrícolas; Ameros de mazorca; Vainas de leguminosas; Plazas de mercado; Bacterias celulolíticas; Nitrógeno; Carbono; Sustrato; Medios de cultivo.

ABSTRACT

The necessity of reducing enzyme production costs and their wide use in several industrial sectors, have increased the interest on agro-industrial wastes valorization as substrates for the obtention of these bioproducts. Given that agricultural wastes are both a source of cellulose and cellulolytic microorganisms, the purpose of this study was the selection of previously isolated cellulolytic bacteria from wastes generated in marketplaces and, the evaluation of media formulated from this waste. 11 bacterial strains were grown in Mandel's broth for 72 hours evaluating their cellulolytic activity at 30 and 50 °C. To formulate the culture media, the cellulose, nitrogen and total organic carbon content in corn cob leaves and legume seed pods collected in a marketplace was determined. Three types of media were made using cellulose, sourced from waste, supplemented with peptone, ammonium sulfate and urea: the last three added as Nitrogen source. Medium A was formulated with chopped and dehydrated wastes. Medium B had the same treatment than medium A plus a liquefy step. Medium C was made with un-dehydrated and liquefied waste. From the 5 selected cellulolytic strains, C6M2 was cultured at 37 °C on each of the three media and the enzyme activity was monitored

KEYWORDS:

Cellulose; Cellulases; Agriculture wastes; Corn cob leaves; legume seed pods; Marketplaces; Cellulolytic bacteria; Nitrogen; Carbon; Substrate; Culture media.

for 96 hours of fermentation. Cellulase production was achieved in media A and B. Medium A presented higher production ($19,82 \pm 3,0$ U/mL). On the other hand, no cellulolytic activity was evidenced in medium C. The corn cob leaves and legume seed pods, chopped and dehydrated, allow the cellulase production using the bacterium strain C6M2.

INTRODUCCIÓN

Las celulasas hacen parte de un complejo enzimático conformado por endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas que hidrolizan los enlaces β 1-4 de la celulosa (Jayasekara and Ratnayake, 2019), componente principal de la pared celular de las plantas y el polímero más abundante de la naturaleza (Li *et al.*, 2021). Este polímero puede ser biodegradado hasta monómeros de glucosa por microorganismos productores de celulasas, lo que permite que la celulosa sea una fuente importante de energía renovable (Patela *et al.*, 2019).

La hidrólisis enzimática de la celulosa presente en material de origen vegetal es ampliamente utilizada a nivel industrial para obtener productos como jarabes de glucosa y sustratos ricos en azúcares para producir bioetanol por fermentación alcohólica (Singh *et al.*, 2019; Portero *et al.*, 2020; de Souza and Yukio, 2021). Aunque las celulasas se han utilizado tradicionalmente como materia prima para el tratamiento de fibras en la industria textil, de los detergentes y de la pulpa y del papel (Ejaz *et al.*, 2021), actualmente se han encontrado nuevas aplicaciones que incluyen su uso en la extracción de biocompuestos como polisacáridos, aceites y carotenoides a partir de material vegetal (Marathe *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2021).

Las celulasas son unas de las enzimas más comercializadas a nivel mundial por su importancia industrial, sin embargo, su alto costo de producción limita su uso en la hidrólisis de materia prima de origen lignocelulósico, ya que solamente la producción de la enzima implica el 50 % del costo total del proceso de hidrólisis enzimática, costos están asociados al alto valor comercial de la celulosa y carboximetilcelulosa utilizadas generalmente como sustratos en la producción de celulasas (Bhardwaj *et al.*, 2021). Teniendo en cuenta la importancia de las celulasas microbianas a nivel industrial, su creciente demanda y sus nuevas aplicaciones hacia métodos más sustentables, es necesario buscar nuevas enzimas que faciliten la hidrólisis de la celulosa presente en residuos agroindustriales, así como la búsqueda de métodos de producción de enzimas a bajo costo (Sarup *et al.*, 2019).

Debido al contenido de celulosa presente en los residuos agroindustriales, éstos se han utilizado como sustratos en la producción de celulasas con el objetivo de disminuir los costos de producción y utilizar la celulosa disponible en esta biomasa residual, que presenta altos índices de producción y bajas tasas de aprovechamiento. A nivel mundial se producen 2.010 millones de toneladas de residuos sólidos al año y solamente el 19 % del total de residuos orgánicos generados se recupera mediante el reciclaje y el compostaje (Kaza *et al.*, 2018). En Colombia, el 18 % de los residuos vegetales son generados en las centrales de abastecimiento de mercado, teniendo como destino final los rellenos sanitarios (Vargas-Pineda *et al.*, 2019). Así mismo, el 51,32 % de residuos biodegradables generados en Bogotá tienen esta misma disposición a pesar de su alto potencial de aprovechamiento (UAESP, 2020). Como estrategia de valorización de residuos agroindustriales como arroz, maíz, soya, trigo, café, caña de azúcar, remolacha, naranja, uva y aceitunas, han sido utilizados como materia prima en la formulación de sustratos de bajo costo para la obtención de enzimas celulolíticas (Marzo *et al.*, 2019; Bajar *et al.*, 2020; Leite *et al.*, 2021).

Además de obtener sustratos económicos para la producción de celulasas, es necesario contar con cepas microbianas capaces de fermentar dichos sustratos y obtener actividades enzimáticas que permitan ser aplicadas en diferentes procesos industriales. Aunque la mayor producción de celulasas se ha obtenido a partir de hongos filamentosos como *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. (Bajar *et al.*, 2020; Coêlho *et al.*, 2021), especies bacterianas como *Streptomyces* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. y *Serratia* sp. también se han utilizado en la fermentación sumergida de residuos agroindustriales para la producción de enzimas celulolíticas (Khatiwada *et al.*, 2016; Sinjaroonsak *et al.*, 2020; Pangri *et al.*, 2021).

En este estudio se evaluaron y seleccionaron diferentes cepas bacterianas celulolíticas aisladas previamente de residuos generados en la plaza de mercado distrital de El Restrepo, Bogotá. Adicionalmente, se evaluó el potencial de residuos de ameros de mazorca y vainas de leguminosas como sustratos para la obtención de celulasas, a partir de las bacterias celulolíticas seleccionadas.

MÉTODO

Recolección y pretratamiento de los residuos

Los residuos orgánicos compuestos por ameros de mazorca y vainas de leguminosas se recolectaron en la plaza Distrital de mercado El Restrepo en Bogotá y transportaron en nevera portátil al laboratorio de biotecnología del Centro de Gestión Industrial del SENA. Seguidamente, estos fueron lavados, troceados, deshidratados en horno Binder FED 115 a 90 °C por 12 horas y preservados en ultracongelador a -80 °C para su posterior caracterización fisicoquímica y elaboración de medios de cultivo.

Selección de microorganismos celulolíticos

11 cepas bacterianas previamente aisladas de residuos orgánicos generados en plazas de mercado (Sánchez and Heredia, 2022) fueron cultivadas en 50 mL de caldo Mandels (Carboximetilcelulosa - CMC 1 %; (NH₄)₂SO₄ 0,14 %; KH₂PO₄ 0,15 %; Urea 0,03 %; CaCl₂·2H₂O 0,04 %; MgSO₄ 0,03 %; Peptona 0,075 %) asegurando una concentración bacteriana inicial correspondiente al tubo número 2 de la escala de McFarland. Los cultivos se llevaron a 37 °C y 120 rpm por 72 horas tomando muestras para determinar la actividad enzimática cada 24 horas.

Caracterización fisicoquímica

Cuantificación de celulosa en los residuos. Los residuos deshidratados se llevaron a digestión en reflujo abierto con solución de NaOH 17,5 % m/v por 2 horas y se neutralizó en agitación con HCl concentrado. La recuperación de la biomasa se realizó mediante centrifugación a 4500 rpm, 7 °C y 20 minutos en una centrifuga Hettich – Rotanta 460R, seguida de una filtraron al vacío. Para la determinación gravimétrica de la celulosa, los residuos digeridos se llevaron a 105 °C hasta peso constante de acuerdo con el método descrito por Kulic and Radojičić (2011).

Cuantificación de nitrógeno en los residuos. 1,5 g de muestras maceradas de residuos se mezclaron en tubos de digestión con 12,5 mL de H₂SO₄ al 98 % y un catalizador (K₂SO₄/CuSO₄). Como blanco se realizaron dos digestiones con glucosa. La reacción se realizó en un digestor Foss tecator digestor DT 508 a 400 °C durante 2 horas, luego se enfrió a temperatura ambiente y se destiló en un equipo Kjeltec 8200. Mediante alcalinización, el amoniaco se recuperó sobre una solución concentrada de ácido bórico con indicador Tashiro. El nitrógeno amoniacal se cuantificó por volumetría ácido-base usando HCl 0,15 M estandarizado (Gavidia et al., 2020).

Determinación de Carbono Orgánico Total (COT). La determinación de COT se realizó por el método de adición estándar modificando la técnica de Walkley and Black (1934), en donde 0,1 g de ameros de mazorca y vainas de leguminosas pretratados y macerados se adicionaron en seis tubos que contenían una cantidad creciente de estándar de glucosa (0,0137 a 0,1370 g). Se adicionaron 5,0 mL de una solución de K₂Cr₂O₇ (Merck®) al 10 %, 5,0 mL de H₂SO₄ concentrado y se dejó en reacción por 30 minutos. Finalmente, se adicionaron 15 mL de agua destilada y se dejó en reacción por 18 horas. Una mezcla similar a la anterior sin residuos fue utilizada como blanco. En un espectrofotómetro Shimadzu UV – 1800 se leyó la absorbancia de las muestras a 600 nm.

Elaboración de los medios de cultivo. De acuerdo con los resultados del porcentaje de celulosa presente en los ameros y vainas, se formularon 3 medios de cultivo a una concentración final del 1 % (A, B y C). Los residuos se mezclaron con 50 mL de una solución base caldo Mandels sin CMC y se llevaron a volumen final de 100 mL. La

concentración de las sustancias que aportan nitrógeno en la solución de nutrientes fue recalculada teniendo en cuenta el contenido de este en los residuos ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,031 %; Urea 0,0065 %; Peptona 0,0168 %). Para el medio de cultivo A se pesaron 2,9 g de residuos de ameros y vainas troceados y deshidratados, para el medio B se pesaron 2,9 g de residuos troceados, deshidratados y licuados y para el medio C se pesaron 12,5 g de residuos sin deshidratar, troceados y licuados. Como control positivo para la producción de celulasas se prepararon 100 mL de caldo Mandels (Medio D). Finalmente, el pH de los medios se ajustó a 7 con NaOH 1M y se llevaron a autoclave SANYO MLS a 113 °C por 7 minutos y 15 psi.

Producción de celulasas. De acuerdo con los resultados de la selección de microorganismos, se utilizó la cepa C6M2 para evaluar la producción de celulasas en los medios A, B, C y D. 1 mL de la cepa previamente ultracongelada a -80 °C, con una concentración de $1,5 \times 10^8$ células/mL, fue adicionado en cada uno de los medios, incubándolos a 37 °C y 150 rpm por 96 horas, tomando muestras cada 24 horas para determinar la actividad celulolítica.

Determinación de la actividad enzimática (AE)

4 mL de cada una de las muestras fueron centrifugados a 4500 rpm y 7 °C por 30 minutos en una centrifuga Hettich – Rotanta 460R y el sobrenadante se recuperó para evaluar la AE por triplicado. En un tubo Eppendorf se tomaron 750 μL de sobrenadante y se mezclaron con 750 μL de una solución CMC al 1 % p/v buffer fosfato pH 7,0. Para la selección de microorganismos celulolíticos la AE se evaluó a 37 y 50 °C, mientras que para la evaluación de los medios se realizó únicamente a 50 °C. La reacción enzimática se llevó a cabo en un baño termostático marca Memmert, después de 30 minutos esta se detuvo en un baño de hielo por 5 minutos. Los tubos se llevaron a centrifugar a 5000 rpm, 20 minutos y 7 °C en una centrifuga Benchmark Z326K y en 500 μL del sobrenadante se cuantificaron los azúcares reductores (AR) por la técnica del ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) según Olanbiwoninu and Fasiku (2015). La absorbancia de las muestras se determinó a 540 nm en un lector de multimicroplacas marca BIOTEK – SYNERGY H1MG. El cálculo de la AE se hizo de acuerdo con Sánchez et al., (2020) teniendo en cuenta que unidad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima capaz de producir un micro mol de glucosa por mL por minuto bajo las condiciones del ensayo.

Análisis estadístico

Los ensayos de AE a 37 y a 50 °C se realizaron por triplicado y las diferencias significativas de los resultados obtenidos se evaluaron a través de la prueba de análisis de varianza de un factor (ANOVA) definiendo un $\alpha = 0,05$ con un $p < 0,001$ y posteriormente se realizó el test de Tukey como prueba de comparación. Las diferencias significativas entre las AE evaluadas a 37 y 50 °C para las cepas de mayor AE fueron determinadas a través de una prueba ANOVA de dos factores con un α de 0,01 y $p < 0,001$. La producción de celulasas entre los medios A y B se evaluó utilizando un ANOVA de un factor con un α de 0,01 y $p = 0,012$ seguido del test de Tukey.

RESULTADOS

Las 11 cepas bacterianas previamente aisladas de residuos orgánicos de plazas de mercado presentaron actividad celulolítica, siendo las cepas 7 a 11 las que lograron mayor producción de celulasas a las 48 horas de fermentación en caldo Mandels (Cuadros 1 y 2). De acuerdo con los resultados de la prueba ANOVA hay diferencias significativas en la AE a 37 y 50 °C de las cepas 1 a 11 ($p < 0,001$), esto se confirmó aplicando el test de comparación Tukey. Adicionalmente, este test demostró que hay diferencias significativas entre las AE de las cepas 1 a 6 respecto a la de las cepas 7 a 11 de mayor actividad celulolítica ($p < 0,001$). De esta forma, las cepas C3M1A, C3M3R5A, C3M3R5B, C5M2 y C6M2, con actividades a 37 °C entre $21,51 \pm 0,2$ U/mL y $22,24 \pm 0,2$ U/mL y a 50 °C entre $30,83 \pm 0,44$ U/mL y $30,37 \pm 0,29$ U/mL, pueden ser utilizadas para la producción de celulasas teniendo en cuenta que son las de mayor actividad celulolítica.

Cuadro 1. Evaluación de la actividad celulolítica a 37 °C de las cepas 11 aisladas a partir de residuos de plazas de mercado

Número	CEPA	Actividad enzimática (U/mL)			
		0 h	24 h	48 h	72 h
0 (Control negativo)	Sin inóculo	4,17 ± 0,13	4,35 ± 0,03	4,7 ± 0,22	4,9 ± 0,96
1	C1M1	4,3 ± 0,14	4,81 ± 0,03	4,7 ± 0,17	21,8 ± 0,95
2	PC1M1	4,03 ± 0,15	4,28 ± 0,13	5,06 ± 0,20	8,49 ± 0,13
3	C1M3R5	4,37 ± 0,17	11,49 ± 2,06	11,16 ± 0,86	8,4 ± 0,11
4	C2M1A	4,46 ± 0,3	12,99 ± 0,9	12,69 ± 1,06	8,67 ± 0,15
5	C2M1B	4,39 ± 0,24	16,64 ± 2,62	11,73 ± 0,17	8,6 ± 0,18
6	C2M3R5A	4,44 ± 0,17	4,19 ± 0,16	11,73 ± 1,76	8,46 ± 0,23
7	C3M1A	4,35 ± 0,03	7,05 ± 0,07	21,78 ± 0,33	8,61 ± 0,07
8	C3M3R5A	4,13 ± 0,00	10,73 ± 0,5	21,51 ± 0,2	8,43 ± 0,13
9	C3M3R5B	4,36 ± 0,03	15,51 ± 1,03	21,81 ± 0,23	9,09 ± 0,26
10	C5M2	4,33 ± 0,14	4,33 ± 0,05	22,24 ± 0,2	8,95 ± 0,13
11	C6M2	4,26 ± 0,00	4,24 ± 0,14	22,07 ± 0,23	8,47 ± 0,15

* Los resultados de AE corresponden al promedio de las tres réplicas realizadas y su desviación estándar

Para el caso de la actividad enzimática a 50 °C, las cepas C1M1, C1M3R5, C2M1A, C2M1B y C2M3R5A presentaron un comportamiento parecido al del control negativo durante las 72 horas de fermentación (Cuadro 1). Un caso similar se presentó a 37 °C con las cepas C1M1 y PC1M1 hasta las 48 horas (Cuadro 2), por esta razón, estas seis cepas se excluyeron de las seleccionadas para la producción de celulasas. Mientras que las cepas C3M1A, C3M3R5A, C3M3R5B, C5M2 y C6M2 se seleccionaron como bacterias celulolíticas con potencial en la producción de celulasas a partir de residuos agrícolas debido a sus resultados de AE tanto a 37 como a 50 °C. La cepa C6M2 fue la seleccionada en este estudio para llevar a cabo la fermentación de los medios de cultivo formulados a partir de ameros de mazorca y vainas de leguminosas, debido a que tanto a 37 como a 50 °C tuvo la segunda mejor actividad celulolítica (Cuadros 1 y 2).

Cuadro 2. Evaluación de la actividad celulolítica a 50 °C de las cepas 11 aisladas a partir de residuos de plazas de mercado

Número	CEPA	Actividad enzimática (U/mL)			
		0 h	24 h	48 h	72 h
0 (Control negativo)	Sin inóculo	6,22 ± 0,14	6,76 ± 0,1	6,86 ± 0,15	9,72 ± 0,14
1	C1M1	6,63 ± 0,12	7,33 ± 0,21	7,33 ± 0,21	9,56 ± 0,2
2	PC1M1	6,28 ± 0,07	7,23 ± 0,1	21,79 ± 1,36	9,59 ± 0,16
3	C1M3R5	6,53 ± 0,18	6,32 ± 0,16	6,76 ± 0,14	9,41 ± 0,16
4	C2M1A	6,34 ± 0,08	6,51 ± 0,27	6,96 ± 0,17	9,57 ± 0,19
5	C2M1B	6,37 ± 0,25	6,46 ± 0,13	6,91 ± 0,19	9,7 ± 0,12
6	C2M3R5A	6,77 ± 0,14	6,76 ± 0,12	7,15 ± 0,1	9,48 ± 0,17
7	C3M1A	6,42 ± 0,1	6,69 ± 0,11	28,67 ± 0,57	9,43 ± 0,05
8	C3M3R5A	7,35 ± 0,16	7,38 ± 0,15	30,83 ± 0,44	9,13 ± 0,18
9	C3M3R5B	6,91 ± 0,3	7,82 ± 0,1	30,48 ± 0,31	9,25 ± 0,26
10	C5M2	7,16 ± 0,13	7,24 ± 0,16	30,37 ± 0,29	9,06 ± 0,37
11	C6M2	7,65 ± 0,23	6,59 ± 0,16	30,79 ± 0,46	9,09 ± 0,17

* Los resultados de AE corresponden al promedio de las tres réplicas realizadas y su desviación estándar

Según la prueba de ANOVA de dos factores, la AE a 37 °C de las cepas 8 a 11 (Cuadro 1) presentaron diferencias significativas respecto a su AE a 50 °C ($p < 0,001$), mostrando mayor actividad a esta temperatura. Estudios de caracterización de celulasas bacterianas han demostrado que la mayor actividad de estas enzimas se evidencia a los 50 °C (Khatiwada *et al.*, 2016; Islam *et al.*, 2019; Camacho *et al.*, 2021, Ibrahim *et al.*, 2021).

La producción de celulasas de las 5 cepas seleccionadas, en general, fue mayor a la reportada para otros microorganismos evaluados en medios formulados a partir de CMC. Hossain *et al.* (2021) obtuvieron la máxima actividad de celulasas por *Pseudomonas* sp. de 0,156 U/mL luego de 48 horas de fermentación, Da Silva *et al.* (2021) lograron una producción de 0,493 U/mL para las enzimas producidas por *Bacillus licheniformis* a las 96 horas de cultivo y Kazeem *et al.* (2017) obtuvieron una actividad CMCasa de 0,33 U/mL a partir de *B. licheniformis* 2D55 a las 18 horas de fermentación.

Los resultados del contenido de celulosa, nitrógeno y COT para los residuos de ameros de mazorca y vainas de leguminosa generados en plazas de mercado se presentan en el cuadro 3. El porcentaje de celulosa determinado es comparable al reportado para otros residuos agroindustriales utilizados en la producción de enzimas como paja de trigo, paja de arroz, caña de maíz y pastos (Sooch *et al.*, 2019).

Teniendo en cuenta que la relación C/N es fundamental para el crecimiento y metabolismo microbiano (Brust, 2019; Lin *et al.*, 2019) y que el objetivo del estudio era evaluar los residuos agrícolas como sustratos para la producción de celulasas, mediante la evaluación de COT y del porcentaje de nitrógeno se determinó un índice C/N de 39 para los ameros de mazorca y vainas de leguminosas. A partir de este resultado, los residuos agrícolas se utilizaron en la formulación de medios con una relación C/N de 9 similar a la del caldo Mandels.

Cuadro 3. Contenido de celulosa y nitrógeno de los residuos

Tipo de residuos	% Celulosa	% Nitrógeno	COT
Ameros de mazorca y vaina de leguminosas	35,71 ± 0,77	1,20 ± 0,14	45,77 ± 0,24

En la figura 1 se encuentran los resultados de la producción de celulasas utilizando la cepa C6M2 en los medios formulados con ameros de mazorca y vainas de leguminosas. En el medio A, preparado a partir de residuos orgánicos troceados y deshidratados, se obtuvo la mayor AE a las 72 horas de fermentación ($19,82 \pm 3,0$ U/mL), seguido por el medio B con una AE de $9,76 \pm 1,6$ U/mL, actividades que según la prueba de ANOVA y el test de Tukey presentan diferencias significativas ($p = 0,012$).

Por el contrario, en el medio elaborado a partir de residuos licuados y sin deshidratar (medio C) no se registró AE durante las 96 horas de fermentación (Figura 1), evidenciándose que el pretratamiento de los residuos mediante troceado y deshidratación, probablemente favorece la disponibilidad de celulosa en el medio permitiendo una mayor producción de celulasas por C6M2. Otros estudios también han evidenciado que el pretratamiento físico de los residuos agroindustriales promueve la obtención de celulasas (Waghmare *et al.*, 2018), incluso en algunos casos se han realizado hidrólisis alcalinas buscando una mayor disponibilidad de la celulosa. A pesar de que en el presente estudio no se hidrolizaron previamente los residuos, se lograron mayores AE que en otros donde estos si fueron sometidos a pretratamientos químicos (Kazeem *et al.*, 2017; Gunam *et al.*, 2019).

El pretratamiento fisicoquímico de los residuos es fundamental en su aprovechamiento como sustratos en fermentaciones para la obtención de celulasas que contribuye a la ruptura de la matriz lignocelulósica reduciendo tanto el tamaño de partícula como el grado de cristalinidad de la celulosa e incrementando su fracción amorfa, que es la forma más susceptible a la hidrólisis enzimática durante la fermentación (Sarkar *et al.*, 2012), sin embargo, cuando el tamaño de partícula es pequeño estas se pueden aglutinar limitando el crecimiento microbiano debido a la reducción de la difusión del oxígeno y la transferencia de calor y materia (De Castro and Sato, 2015). Esta situación podría explicar los resultados obtenidos tanto en los medios B y C, en donde los residuos fueron licuados, obteniendo un tamaño de partícula menor que en el medio A.

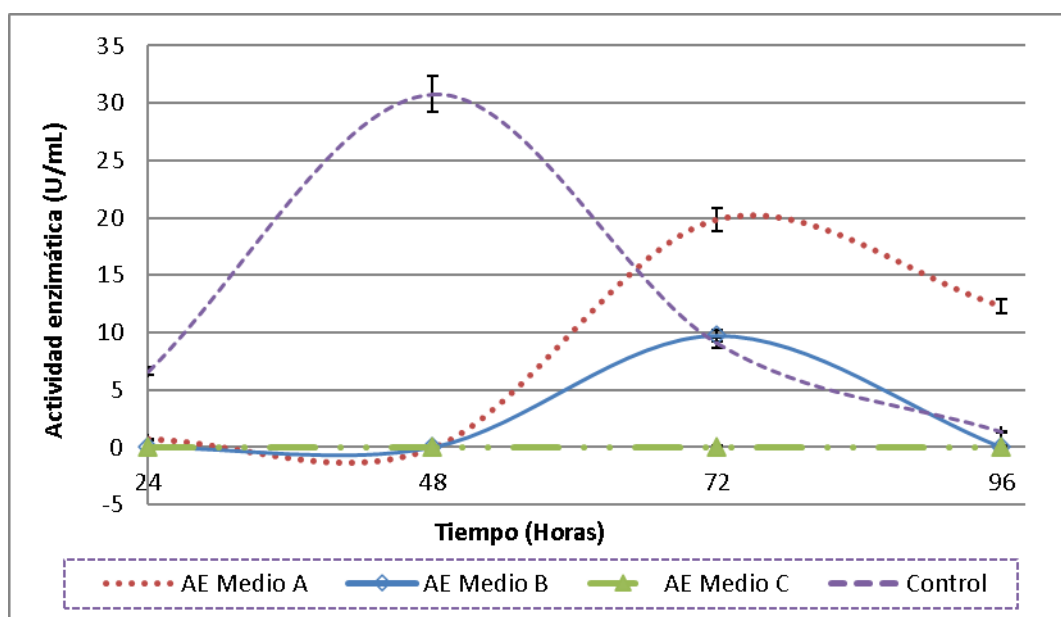


Figura 1. Producción de celulasas en los medios formulados a partir de residuos de plazas de mercado. Los datos de AE corresponden al promedio de las tres réplicas realizadas y las barras de error representan su desviación estándar. Medio A - residuos troceados y deshidratados. Medio B - residuos licuados. Medio C - residuos licuados sin deshidratar. Control/Medio D - Caldo Mandels 1% CMC, medio convencional para la producción de celulasas.

En el medio A, la producción de celulasas a partir de la cepa C6M2 fue mayor a la reportada por *Bacillus subtilis* P2-5 (0,58 U/mL) a partir de residuos de té (Pangsri *et al.*, 2021), por *B. subtilis* PJK6 (1,37 U/mL) en salvado de trigo (Kaur *et al.*, 2018), por *Bacillus subtilis* DSM 17766 (0,175-0,184 IU/mL) usando orujo de uva (Kurt and Cekmecelioglu, 2021) y por *Enterobacter* sp. (12,24 U/mL) en cascarilla de sorgo (Waghmare, *et al.*, 2018). Así mismo las AE obtenidas luego de la fermentación sumergida en medio A por C6M2 son mayores a las reportadas en fermentaciones sólidas de residuos agroindustriales a partir de especies fúngicas (Kalsoom *et al.*, 2019; Ramamoorthy *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020; Abdullah *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2021).

CONCLUSIONES

Los ameros de mazorca y las vainas de leguminosas generados en plazas de mercado presentan un contenido de celulosa y nitrógeno que permite su aprovechamiento en la formulación de medios de cultivo que, al trocearlos, deshidratarlos y suplementarlos con peptona, sulfato de amonio y urea, favorecen la producción de celulasas a partir de microorganismos aislados de residuos agrícolas como la cepa bacteriana celulolítica C6M2.

AGRADECIMIENTOS

A SENNOVA y al Centro de Gestión Industrial CGI – SENA donde se llevó a cabo este estudio: directivos, aprendices – semilleristas del grupo BioTec y técnicos de laboratorio.

REFERENCIAS

- ABDULLAH, ROHEENA; AKHTAR, AMMARA; NISAR, KINZA; KALEEM, AFSHAN; IQTEDAR, MEHWISH; IFTIKHAR, TEHREEMA; SALEEM, FAIZA; ASLAM, FARHEEN. Process optimization for enhanced production of cellulases from locally isolated fungal strain by submerged fermentation. *Bioscience Journal*, v. 37, 2021, p. 1-7.
<https://doi.org/10.14393/BJ-v37n0a2021-53815>
- BAJAR, SOMVIR; SINGH, ANITA; BISHNOI, NARSI. Exploration of low-cost agro-industrial waste substrate for cellulase and xylanase production using *Aspergillus heteromorphus*. *Applied Water Science*, v. 10, n. 153, 2020, p. 1-9.
<https://doi.org/10.1007/s13201-020-01236-w>
- BHARDWA, NISHA; KUMAR, BIKASH; AGRAWAL, KOMAL; VERMA, PRADEEP. Current perspective on production and applications of microbial cellulases: a review. *Bioresources Bioprocess*, v. 8, n. 95, 2021, p. 1-34.
<https://doi.org/10.1186/s40643-021-00447-6>
- BRUST, GERALD. Management Strategies for Organic Vegetable Fertility. En: BISWAS, SHIRLEY-MICALLEF; Safety and Practice for Organic Food. Academic Press, 2019, 408 p. <https://doi.org/10.1016/C2016-0-02314-8>
- CAMACHO, VERUSHKA; SOTO, ROBERTO; GUZMÁN, HÉCTOR. Cellulase production by microorganisms isolated from laguna Blanca, Potosí-Bolivia. *Revista Boliviana de Química*, v. 38, 2021, p. 148-154.
- COELHO, MARINA-DE CASTRO; DA CÂMARA-ROCHA, JULIENE; SANTOS, FELIPE-AUGUSTO; RAMOS-GONÇALVES, JUAN-CARLOS; DE VASCONCELOS, SOLANGE-MARIA; SOARES-DE LIMA-GRISI, TERESA-CRISTINA; FLORENTINO-DE MELO -SANTOS, SHARLINE; MACHADO-DE ARAÚJO, DEMETRIUS-ANTÔNIO; TEIXEIRA-DE CARVALHO-GONÇALVES, LAÍS-CAMPOS. Use of agroindustrial wastes for the production of cellulases by *Penicillium* sp. FSDE15. *Journal of King Saud University - Science*, v. 33, n. 6, 2021, p. 1-7.
<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101553>
- DA SILVA, RAQUEL-NASCIMENTO; DE ANDRADE-MELO, LIANY-FIGUERÊDO; LUNA-FINKLER, CHRISTINE-LAMENHA. Optimization of the cultivation conditions of *Bacillus licheniformis* BCLLN-01 for cellulase production. *Biotechnology Reports*, v. 29, 2021, p. 1-8.
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00599>
- DE CASTRO, RUANN-JANSER; SATO, HÉLIA-HARUMI. Enzyme Production by Solid State Fermentation: General Aspects and an Analysis of the Physicochemical Characteristics of Substrates for Agro-industrial Wastes Valorization. *Waste and Biomass Valorization*, v. 6, 2015, p. 1085–1093.
<https://doi.org/10.1007/s12649-015-9396-x>
- DE SOUZA, THAIZA; YUKIO-KAWAGUTI, HAROLDO. Cellulases, Hemicellulases, and Pectinases: Applications in the Food and Beverage Industry. *Food and Bioprocess Technology*, v. 14, 2021, p. 1446–1477.
<https://doi.org/10.1007/s11947-021-02678-z>
- EJAZ, UROOSA; SOHAIL, MUHAMMAD; GHANEMI, ABDELAZIZ. Cellulases: From Bioactivity to a Variety of Industrial Applications. *Biomimetics*, v. 6, 2021, p. 44.
<https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044>
- GAVIDIA, JOSÉ; VENEGAS, EDMUNDO; RÍOS, MIGUEL; URIBE, JOSÉ; GUTIÉRREZ, DANNY; RENGIFO, ROGER; JARA, DEMETRIO; MARTÍNEZ, JOSÉ. Determinación del factor de conversión de nitrógeno a proteína en huevos *Coturnix coturnix* L. (Codorniz japonesa). *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, v. 39, 2020, p. 706-708.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.440472>
- GUNAM-I. B. W; ANTARA-N. S; ANGGRENI-A. A. M. D; SETIYO-Y; WIGUNA-I. P. E; WIJAYA-I. M. M; PUTRA-I. W. W. P. Chemical pretreatment of lignocellulosic wastes for cellulase production by *Aspergillus niger* FNU 6018. *AIP Conference Proceedings*, v. 2155, 2019, p. 20-40. <https://doi.org/10.1063/1.5125544>

- HOSSAIN-ARJU; AHAMMED-AKASH; SOBUJ-SAIFUL ISLAM; SHIFAT-SIRATUL KUBRA; SOMADDER-PRATUL DIPTA. Cellulase Producing Bacteria Isolation, Screening and Media Optimization from Local Soil Sample. American Journal of Microbiological Research, v. 9, 2021, p. 62-74.
<https://doi.org/10.12691/ajmr-9-3-1>
- HU-YAWEI; KANG-GUANGBO; WANG-LINA; GAO-MENGXUE; WANG-PING; YANG-DONG; HUANG-HE. Current Status of Mining, Modification, and Application of Cellulases in Bioactive Substance Extraction. Current Issues in Molecular Biology, v. 43, n. 2, 2021, p. 687-703.
<https://doi.org/10.3390/cimb43020050>
- IBRAHIM-ATEF; HAMOUDA-RAGAA; ELNAGGAR-NOURA; ALSHAKANKERY-FATMA. Bioprocess development for enhanced endoglucanase production by newly isolated bacteria, purification, characterization and in-vitro efficacy as anti-biofilm of *Pseudomonas aeruginosa*. Scientific Reports, v. 11, 2021, p. 1-24
- ISLAM-MAIDUL; PALASH-SARKAR; MOHIUDDIN-A. Optimization of fermentation condition for cellulase enzyme production from *Bacillus* sp. Malaysian Journal of Halal Research, v. 2, 2019, p. 19-24.
<https://doi.org/10.2478/mjhr-2019-0009>
- JAYASEKARA-SANDHYA; RATNAYAKE-RENUKA. (). Microbial Cellulases: An Overview and Applications. En: ALEJANDRO-PASCUAL, MARÍA-MARTÍN; Cellulose. London, (United Kingdom): IntechOpen, 2019, 130 p.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.84531>
- KALSOOM-R; AHMED-S; NADEEM-M; ABID-M. Biosynthesis and extraction of cellulase produced by *Trichoderma* on agro-wastes. International Journal of Environmental Science and Technology, v. 16, 2019, p. 921-928.
<https://doi.org/10.1007/s13762-018-1717-8>
- KAUR-PRABHJOT; BHARDWAJ-SHUBHANG; BHARDWAJ-NISHI; SHARMA-JITENDER. Lignocellulosic Waste as a Sole Substrate for Production of Crude Cellulase from *Bacillus subtilis* PJK6 Under Solid State Fermentation Using Statistical Approach. Journal of Carbohydrates, v. 1, n. 1, 2018, p. 1-14.
- KAZA-SILPA; YAO-LISA.; BHADA-TATA-PERINAZ; VAN WOERDEN-FRANK. What a waste 2.0: a global snapshot of solid waste management to 2050. Banco Mundial. 2018
<https://openknowledge.worldbank.org/handle/10986/30317>
- KAZEEM-MUINAT OLANIKE; SHAH-UMI KALSOM MD; BAHARUDDIN-AZHARI SAMSU. Prospecting Agro-waste Cocktail: Supplementation for Cellulase Production by a Newly Isolated Thermophilic *B. licheniformis* 2D55. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 182, 2017, p. 1318-1340.
<https://doi.org/10.1007/s12010-017-2401-z>
- KHATIWADA-PRABESH; AHMED-JAHED; SOHAG-MD. MEHADI; ISLAM-KAMRUL; AZAD-ABUL. Isolation, Screening and Characterization of Cellulase Producing Bacterial Isolates from Municipal Solid Wastes and Rice Straw Wastes. Journal of Bioprocessing & Biotechniques, v. 6, n. 4, 2016, p. 1-5.
<https://doi.org/0.4172/2155-9821.1000280>
- KULIC-GORDANA; RADOJIČIĆ-VESNA. Analysis of cellulose content in stalks and leaves of large leaf tobacco. Journal of Agricultural Sciences, v. 56, n. 3, 2011, p. 207-215.
<https://doi.org/10.2298/JAS1103207K>
- KURT-AYSE; CEKMECELIOGLU-DENIS. Bacterial cellulase production using grape pomace hydrolysate by shake-flask submerged fermentation. Biomass Conversion and Biorefinery, 2021, p 1-8.
<https://doi.org/10.1007/s13399-021-01595-7>
- LEITE-PAULINA; SOUSA-DANIEL; FERNANDES-HELENA; FERREIRA-MARTA; COSTA-ANA RITA; FILIPE-DIOGO; GONÇALVES-MARGARIDA; PERES-HELENA; BELO-ISABEL; SALGADO-JOSÉ MANUEL. Recent advances in production of lignocellulolytic enzymes by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry, v. 27, 2021, p. 1-27.
<https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.100407>
- LI-JIA; ZHANG-FEI; JIANG-DAN; LI-JUN; WANG-FENG; ZHANG-ZHANG; WANG-WEI; ZHAO-XIN. Diversity of Cellulase-Producing Filamentous Fungi From Tibet and Transcriptomic Analysis of a Superior Cellulase Producer *Trichoderma harzianum* LZ117. Frontiers in Microbiology, v. 11, 2020, p. 1-15.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01617>

- LI-TIAN; CHEN-CHAOJI; BROZENA-ALEXANDRA; ZHU-Y; XU-LIXIAN, DRIEMEIER-CARLOS, DAI-JIAQI; ROJAS-ORLANDO; ISOGAI-AKIRA; WÄGBERG-LAR; HU-LIANGBING. Developing fibrillated cellulose as a sustainable technological material. *Nature*, v. 590, 2021, p. 47-56.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-03167-7>
- LIN-LONG; XU-FUQING; GE-XUMENG; LI-YEBO. Biological treatment of organic materials for energy and nutrients production - Anaerobic digestion and composting. En: GE-XUMENG, LI-YEBO; *Advances in Bioenergy*. Elsevier, 2019, 208 p.
- MARATHE-SANDESH; JADHAV-SWATI; BANKAR-SANDIP; SINGHAL-REKHA. Enzyme-Assisted Extraction of Bioactives. En: PURI-MUNISH; *Food Bioactives: Extraction and Biotechnology Applications*. Springer, 2017, 326 p.
- MARZO-C; DÍAZ-A; CARO-I; BLANDINO-A. Valorization of agro-industrial wastes to produce hydrolytic enzymes by fungal solid-state fermentation. *Waste Management & Research*, v. 37, n. 2, 2019, p. 149-156.
<https://doi.org/10.1177/0734242x18798699>
- OLANBIWONINU-AFOLAKE; FASIKU-SAMUEL. Production of bacterial amylases and cellulases using sweet potato (*Ipomoea batatas*. (L.) Lam.) peels. *African Journal of Biochemistry*, v. 9, n. 9, 2015, p. 104- 109.
<https://doi.org/10.5897/AJBR2015.0841>
- PANGSRI-PRAPAWAN; WUTTIPORN-PUN-TEERADEJ; SONGSERM-WATCHARA. Mannanase and Cellulase Enzyme Production from the Agricultural Wastes by the *Bacillus subtilis* P2-5 Strain. *Applied science and engineering progress*, v. 14, n. 3, 2021, p. 425-434.
<https://doi.org/10.14416/j.asep.2020.05.002>
- PATELA-ANIL; SINGHANIA-REETA; SIM-SANG; PANDEY-ASHOK. Thermostable cellulases: Current status and perspectives. *Bioresource Technology*, v. 279, 2019, p. 385-392.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.049>
- PORTERO-PATRICIA; BASTIDAS-BERNARDO; MARTÍN GIL-JESÚS; MARTÍN RAMOS-PABLO; CARVAJAL-ENRIQUE. Cellulosic Ethanol: Improving Cost Efficiency by Coupling Semi-Continuous Fermentation and Simultaneous Saccharification Strategies. *Processes*, v. 8, n. 11, 2020, p. 1-13.
<https://doi.org/10.3390/pr8111459>
- RAMAMOORTHY-NAVNIT KUMAR; SAMBAVI-T. R; SAHADEVAN-RENGANATHAN. Assessment of fed-batch strategies for enhanced cellulase production from a waste lignocellulosic mixture. *Biochemical Engineering Journal*, v. 152, 2019, p. 107387.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107387>
- SÁNCHEZ-ETNA; HEREDIA-JUAN. Evaluación de residuos orgánicos generados en plazas de mercado para la producción de enzimas bacterianas. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, v. 46, n. 180, 2022, p. 1-10.
<https://doi.org/10.18257/raccefyn.1652>
- SÁNCHEZ-ETNA; HEREDIA-JUAN; BUITRAGO-SONIA; MEDINA-JUAN PABLO. Aislamiento e identificación de microorganismos potencialmente amilolíticos y celololíticos de suelos de humedales de Bogotá. *Revista Colombiana de Biotecnología*, v. 22, n. 1, 2020, p. 36-44.
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v22n1.71278>
- SARKAR-NIBEDITA; GHOSH-SUMANTA; BANNERJEE-SATARUPA; AIKAT-KAUSTAV. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, v. 37, n.1, 2012, p. 19-27.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.06.045>
- SILVA-A. F. V; SANTOS-L. A; VALENÇA-R. B; PORTO-T. S; SOBRINHO-M. D. M; GOMES-G. J. C; JUCA-J.F.T; SANTOS-A. F. M. S. Cellulase production to obtain biogas from passion fruit (*Passiflora edulis*) peel waste hydrolysate. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, v.7, 2019, p. 103.
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103510>
- SINGH-ANITA; BAJAR-SOMVIR; DEVI-ARTI; PANT-DEEPAK. An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. *Bioresource Technology Reports*, v. 14, 2021, p. 1-13.
<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100652>

- SINGH-JAGRITI; KUNDU-DEBAJYOTI; DAS-MOHAN; BANERJE-RINTU. Enzymatic Processing of Juice from Fruits/Vegetables: An Emerging Trend and Cutting Edge Research in Food Biotechnology. En: KUDDUS-MOHAMMED; Enzymes in Food Biotechnology. Academic Press, 2019, 883 p.
- SINGH- RAM SARUP; SINGH- TARANJEET; PANDEY- ASHOK. Microbial Enzymes—An Overview. En: RAM SARUP-SINGH, REETA RANI-SINGHANIA, ASHOK-PANDEY, CHRISTIAN-LARROCHE; Biomass, Biofuels, Biochemicals, Advances in Enzyme Technology. Elsevier, 2019, 510 p.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00001-7>
- SINJAROONSAK-SANTAT; CHAIYASO-THANONGSAK; KITTIKUN-ARAN. Optimization of Cellulase and Xylanase Productions by *Streptomyces thermocoprophilus* TC13W Using Low Cost Pretreated Oil Palm Empty Fruit Bunch. Waste and Biomass Valorization, v. 11, 2020, p. 3925-3936.
<https://doi.org/10.1007/s12649-019-00720-y>
- SOOCH-BALWINDER; LUGANI-YOGITA; SINGH-RAM. Agro-industrial lignocellulosic residues for the production of industrial enzymes. En: MUKESH-YADAV, VIKAS-KUMAR, NIRMALA-SEHRAWAT; Industrial Biotechnology: Plant Systems, Resources and Products. Gruyter STEM, 2019, 222 p.
<https://doi.org/10.1515/9783110563337-002>
- Unidad Administrativa Especial de Servicios Públicos. Plan de Gestión Integral de residuos sólidos- Documento Técnico de soporte. 2020.
https://www.uaesp.gov.co/images/pgirs_mesas/DOCUMENTO%20TECNICO%20SOPORTE%20-%20DTS.pdf
- VARGAS-PINEDA-OSCAR; TRUJILLO-GONZALEZ-JUAN; TORRES-MORA-MARCO. El compostaje, una alternativa para el aprovechamiento de residuos orgánicos en las centrales de abastecimiento. Orinoquia, v. 23. n.2, 2019, p 123-129.
<https://doi.org/10.22579/20112629.575>
- WAGHMARE-PANKAJKUMAR; PATIL-SWAPNIL; JADHAV-SANJIVANI; JEON-BYONG HUN; GOVINDWAR-SANJAY. Utilization of agricultural waste biomass by cellulolytic isolate *Enterobacter* sp. SUK-Bio. Agriculture and Natural Resources, v. 52, n. 5, 2018, p. 399-406.
<https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.10.019>
- WALKLEY-A; BLACK-I. An examination of the DEGTJAREFF method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Science, v. 37, n. 1, 1934, p. 29-38.