

Hidrólisis enzimática de la cascarilla de arroz utilizando *Trichoderma reesei*

Humberto Ayala A. y Hugo Romero B.

Introducción

Los microorganismos producen una amplia gama de enzimas útiles a nivel industrial, muchas de las cuales son segregadas al exterior celular. Estos microorganismos son capaces de desarrollarse fácil y rápidamente en su medio de cultivo cuya tecnología se encuentra hoy bien establecida. La optimización de la producción de enzimas a partir de microorganismos depende de una serie de factores interrelacionados, lo que significa que una enzima solo puede sintetizarse durante parte del ciclo de crecimiento. Algunos hongos de importancia industrial empleados para la obtención de metabolitos son los correspondientes al género Deuteromicetos (Deuteromicotina), entre los cuales están *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum-chrysogenum* y *Trichoderma viride*. Otros están cobrando importancia debido a su utilización en la biotecnología ambiental ya que son capaces de metabolizar una variedad de compuestos químicos orgánicos, muchos de los cuales son contaminantes. Debido a estas características, se pretende contemplar el estado del arte de la producción industrial de celulasas a partir de *Trichoderma viride*, con el fin de aprovechar su metabolismo para degradar la celulosa presente en la cáscara de arroz residual del proceso pilado de arroz.

La celulosa es un polisacárido cuya fórmula química corresponde a: $C_6H_{10}O_5$, es el principal componente de la membrana celular de las plantas. La celulosa está constituida por moléculas de D-glucosa unidas por enlaces (1-4) glucosídicos y es el polímero más abundante en la biosfera, generalmente resistente a la fermentación, no significa que no se pueda hidrolizar, pues existen microorganismos celulíticos que poseen enzimas como: las celobiohidrolasas y las endoglucanasas que se encargan de su degradación.

Las especies de *Trichoderma* son hongos que aparecen en cualquier tipo de suelo, produciendo colonias blancas, amarillas o más típicamente verdes cuando se cultivan. Las especies verdes de *Trichoderma* fueron inicialmente clasificadas como una especie única, *T. Viride* hasta que fueron subdivididas por Rifai. Las especies de *Trichoderma* se utilizan para producir celulasas. Sin embargo, son particularmente efectivas como antagonistas del crecimiento de otros hongos, muchos de ellos patógenos de plantas, con el resultado de que las especies de *Trichoderma* son importantes agentes en biocontrol. El hongo *Trichoderma reesei* es un microorganismo celulítico que contiene cuatro grandes celulasas (1.4-beta-D-glucancelobiohidrolasas CBHI y CBH II, endo-1.4-beta-D-glucanasa EG I y EGII). Desde el punto de vista genético, se han estudiado genes que codifican para las celulasas (cbh1, cbh2, egl1 y egl2), mediante sustitución por el marcador genético Amds de *Aspergillus nidulans*.

Estas investigaciones han sugerido que la CBHII y la EGII son las más importantes en la actividad enzimática de la celulasa porque intervienen en la formación eficiente del inductor de estas en *T. Ressei* y que la eliminación de ambas cadenas celobiohidrolasas (CBHII y EGII) imposibilita a la enzima para desdoblar la celulosa cristalina. La mayor parte de los procedimientos estudiados a escala preindustrial utilizan enzimas producidas por *Trichoderma reesei*. Este microorganismo tiene la ventaja de excretar, en grandes cantidades, la mezcla adecuada de enzimas, que permite la hidrólisis de celulosas amorfas y cristalinas.

Materiales y métodos

Obtención de glucosa

La investigación se la realizó en el laboratorio del Centro de Transferencia y Desarrollo de Tecnologías de la Universidad Técnica de Machala. De acuerdo a la figura 1, se preparó una mezcla de cáscara de arroz molida y agua tecnificada, en concentraciones de (15%, 20% y 25%).

Figura 1
Preparación de los medios de cultivos

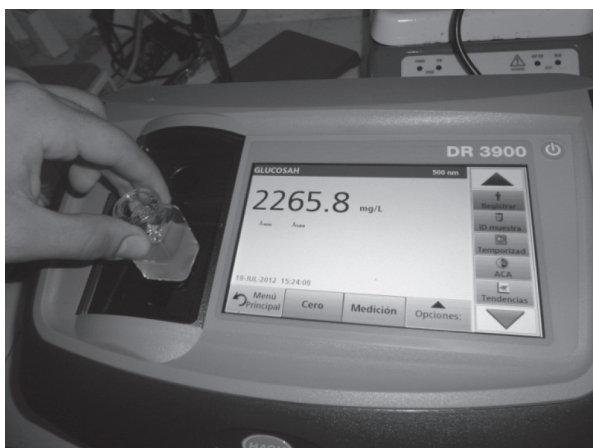


Procedimiento experimental

Se aplicó un experimento factorial 3x3, el cual implicó 2 factores: factor 1 concentración del sustrato (%) y factor 2 concentración del inóculo (g/l) y 3 niveles para cada factor (factor 1 (15%, 20% y 25%); factor 2 (0.2g/l, 0.4g/l, y 0.6 g/l), lo que nos dio como resultado 9 tratamientos con tres repeticiones. Se prepararon medios de cultivo (cáscara molida y agua tecnificada) a concentraciones de 15%, 20% y 25% en matraces Erlen Meyer de 500 ml, luego se esterizaron a 121° C por 15 min, se procedió a inocular con *Trichoderma reesei*, se incubaron por 6 días a temperatura ambiente (28° C). Una vez hidrolizados se filtraron y se ester-

lizaron. Durante los seis días de experimentación se tomó 1 ml de muestra para centrifugarla por 10 min a 3.600 rpm, posteriormente se tomó 0.3 ml del sobrenadante y se completaron a 1 ml con agua destilada en tubos de ensayo, para realizar la determinación de glucosa con ácido 3.5-dinitrosalicílico DNS, la absorbancia se midió a 540 nm en un espectrofotómetro UV visible HACH DR3900:

Figura 2
Medición de glucosa por espectrofotometría UV visible



Resultados

Caracterización química del sustrato (cascarilla de arroz)

Los resultados obtenidos en la caracterización química de la cascarilla de arroz utilizada como sustrato para la obtención de glucosa, presento la siguiente composición:

Tabla 1
Características químicas de la cáscara de arroz

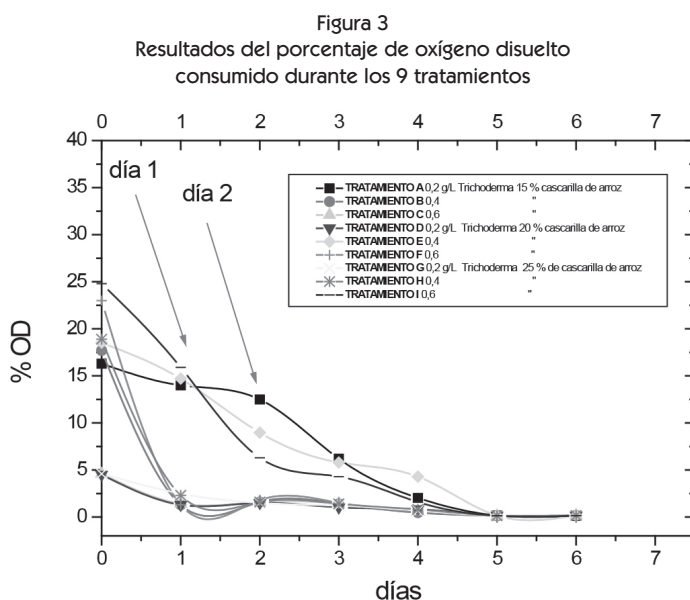
Compuesto químico	Cáscara de arroz
Celulosa	39%
Hemicelulosa	20%
Lignina	21%
Cenizas	20%
pH	6.6-6.8

Cuando analizamos los valores de celulosa y hemicelulosa presentes en la cáscara de arroz, podemos darnos cuenta que un 59% del total del sustrato está en capacidad de bioconvertirse en glucosa, existen otros compuestos como la lignina y las cenizas con valores que se encuentran alrededor de un 41% que no pueden ser hidrolizados.

Los resultados del % de OD consumido por cada tratamiento durante la experimentación se pueden observar en la figura 3. Al cabo del tercer día de hidrólisis enzimática, los tratamientos B, F y H presentaron mayor velocidad en el consumo de OD, comparados con los tratamientos A, E, I. De estos tres últimos, el tratamiento A (0.2 g/l *Trichoderma* + 15% cascarilla) tiene un menor porcentaje de consumo de OD, porque tiene la menor concentración de hongo y menor sustrato (cascarilla de arroz). El tratamiento E (0.4 g/l *Trichoderma* + 20% cascarilla), le sigue en el porcentaje de consumo de OD, mientras que el tratamiento I (0.6 g/l *Trichoderma* + 25% cascarilla) de estos 3 tratamientos, es el que mayor porcentaje de consumo de OD presentó.

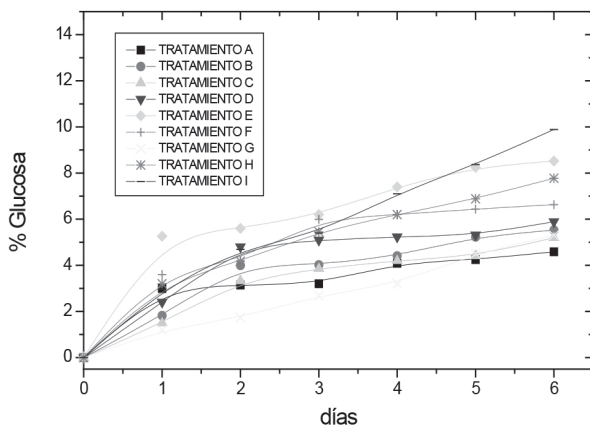
Adicionalmente, durante el primer día, el porcentaje de consumo de OD en el tratamiento B (0.4 g/l + 15%), es mayor que en el tratamiento I (0.6 g/l *Trichoderma* + 25% cascarilla), el cuál a pesar de tener mayor concentración de *Trichoderma*, también tiene una mayor porcentaje de sustrato, por lo que en el tratamiento B, el consumo de OD sucede a mayor velocidad siendo 12.2 veces más rápido (I 15.9% OD/B 1.3% OD).

Asimismo, si comparamos el tratamiento F con el I, durante el primer día, el tratamiento F (0.6 g/l + 20% cascarilla), el porcentaje de consumo de OD sucede a mayor velocidad que el tratamiento I, siendo al igual que en el caso anterior 12.2, veces más rápido (I 15.9 5 OD/F 1.3% OD). Esto se podría explicar debido a que el tratamiento F tiene menor concentración de cascarilla de arroz que el tratamiento I, a pesar de tener la misma cantidad de hongo.



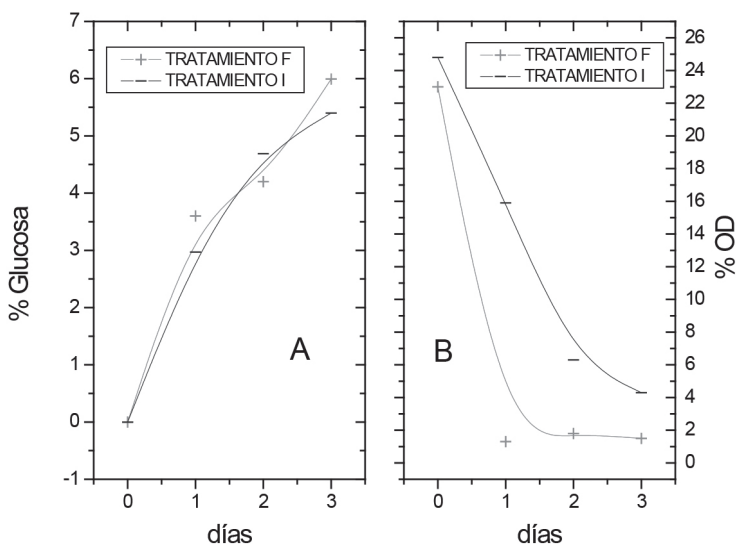
Los resultados del porcentaje de glucosa para los 9 tratamientos durante 6 días, se muestran en la figura 4, obteniéndose el siguiente orden de rendimiento de glucosa en función del tratamiento realizado: I > E > H > F > D > B > G > C > A.

Figura 4
Resultados del porcentaje de glucosa obtenidos
para los 9 tratamientos durante seis días



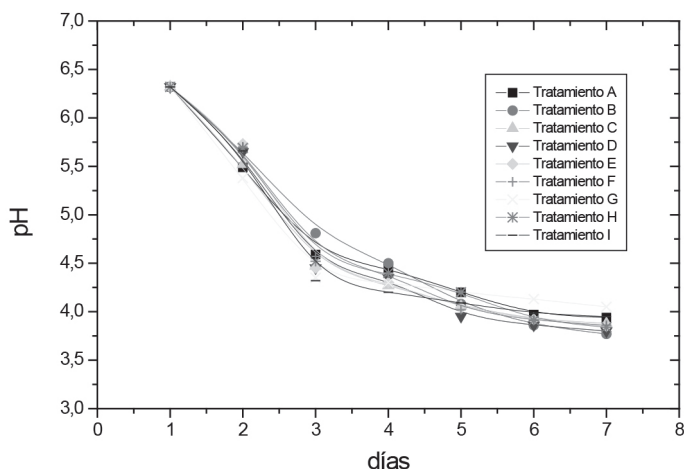
Los comportamientos en el consumo de OD, se ve corroborado cuando se lo compara con los porcentajes de glucosa obtenidos durante los 3 primeros días (figura 5b). Si comparamos el % de glucosa obtenido durante el tratamiento F, este produjo mayor porcentaje de glucosa que el tratamiento I, consumiendo mayor cantidad de OD durante ese mismo tiempo de experimentación (figura 5a).

Figura 5
Comparación entre los porcentajes de glucosa obtenidos (a)
y los porcentajes de OD consumido (b), de los tratamientos F e I



Los valores de pH durante los seis días para los 9 tratamientos presentaron similar comportamiento:

Figura 6
Comportamiento del pH durante el tiempo de hidrólisis enzimática de la cascarilla de arroz en los 9 tratamientos



Conclusión

Al realizar una comparación de los tratamientos F (20% S y 0.6 g/l I) e I (25% S y 0.6 g/l I), podemos concluir que la concentración del hongo tiene un efecto significativo en la producción de glucosa, ya que a mayor concentración de hongo y menor porcentaje de sustrato, es mayor la producción de glucosa al tercer día. Es posible concluir que los residuos agroindustriales evaluados en este trabajo son utilizados como sustrato por el hongo el modifica el pH del medio de cultivo para su crecimiento. Los resultados alcanzados hacen posible considerar que la optimización de este proceso podría mejorar los rendimientos, con un aumento en los azúcares fermentables obtenidos.

Referencias

Cabello Agüero, J. E.

- 2007 "La biomasa Lignocelulósica como materia prima para la producción de etanol". Universidad Nacional de Colombia. http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/sedes/arauca/87061/docs_curso/C8_L2.htm

Dekker, M.

- 1989 "Fermentation Process Development of Industrial Organisms". Neway.

Fonseca Santanilla, E. B., Angélica, M. O. y Vargas, J.

- 2006 "Hidrolisis ácido de sustratos residuales agroindustriales colombianos Colombia", pp.5-11.

García Espino, L. O., Pless Ellin, R. y González, J. E.

- 1972 "Diseño de un proceso para la hidrólisis de residuos lignocelulosicos". *Universidad Tecnológica de San Juan del Río, CICATA-IPN, Querétaro*, www.cicataqro.ipn.mx

Guzmán-Moreno, J., López-Olmos, K., Medrano-Santillana, M., Romo-Rodríguez, P. y Ponce-Noyola
2008 "Biocombustibles: panorama general y mejoras en la producción mediante microorganismos genéticamente modificados". Universidad de Guanajuato, México.