

Obtención de enzimas celulasas a partir de residuos agroindustriales por fermentación sumergida

Obtaining cellulases enzymes from agroindustrial waste by submersible fermentation

Edwin Daniel Mejía Florian *,
Nikol Daniela Delgado Monroy *, Ana María Arismendy Pabón **,
Yaneth Amparo Muñoz Peñaloza ***, Mónica Liliana Reyes Galvis ****

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v27n1.117573

RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivo obtener enzimas celulasas a partir de residuos generados por actividades agroindustriales, como la cascarilla de café y las cáscaras de naranja, mediante fermentación sumergida. Esta estrategia se planteó como una alternativa para disminuir el impacto ambiental negativo asociado con la acumulación de residuos orgánicos, y valorización de estos como sustratos más económicos para obtener enzimas. La metodología aplicada incluyó, en una primera etapa, la selección de hongos productores de celulasas utilizando placas con medio CMC, reveladas con el reactivo Rojo Congo, los microorganismos fueron facilitados por el Cepario sede Campos Elíseos, UFPS, los resultados obtenidos mostraron producción de celulasas para los hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*. Se llevaron a cabo análisis de sólidos en las muestras, seguidos de un pretratamiento oxidativo en autoclave utilizando ácido acético y peróxido de hidrógeno para eliminar la lignina presente en la biomasa. Posteriormente, se desarrolló el proceso de fermentación, empleando un sustrato pretratado al 3% p/v enriquecido con medio Mandels (90 mL) al que se inocularon 10 mL del hongo *Aspergillus niger* con una densidad celular de 10^8 esporas/mL. Los ensayos se realizaron en agitación orbital a 160 rpm durante 12 días. La actividad enzimática obtenida fue de 0,370 FPU/mL para cascarilla de café y de 0,400 FPU/mL para cáscaras de naranja a las 264 horas.

Palabras claves: celulasas, fermentación sumergida, microorganismos, residuos

ABSTRACT

The objective of this work was to obtain cellulase enzymes from residues generated by agroindustrial activities, such as coffee husks and orange peels, by submerged fermentation. This strategy was proposed as an alternative to reduce the negative environmental impact associated with the accumulation of organic wastes, and to valorize them as more economical substrates to obtain enzymes. The methodology applied included, in a first stage, the selection of cellulase-producing fungi using plates with CMC medium, developed with Congo Red reagent, the microorganisms were pro-

* Estudiante Programa de Ingeniería Biotecnológica Universidad Francisco de Paula Santander, edwindanielmf@ufps.edu.co, <https://orcid.org/0009-0004-6591-6877>, nikoldanieladm@ufps.edu.co, <https://orcid.org/0009-0001-8249-2138>.

** Docente catedrática del Programa Ingeniería Biotecnológica UFPS Email: anamariaap@ufps.edu.co, <https://orcid.org/0000-0002-9687-7047>.

*** Docente de planta Programa de Ingeniería Biotecnológica, Directora Semillero SINBI. yanethamparomp@ufps.edu.co, <https://orcid.org/0000-0001-6748-4781>.

**** Asistente de Laboratorio de Biotecnología General UFPS. monicalilianarg@ufps.edu.co, <https://orcid.org/0000-0002-9053-4991>, Cúcuta, Norte de Santander, Colombia.

vided by the Cepario Campos Elíseos, UFPS, the results obtained showed cellulase production for the fungi *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. Solids analysis was carried out on the samples, followed by an oxidative pretreatment in an autoclave using acetic acid and hydrogen peroxide to eliminate the lignin present in the biomass. Subsequently, the fermentation process was developed, using a 3% w/v pretreated substrate enriched with Mandels medium (90 mL) to which 10 mL of the fungus *Aspergillus niger* with a cell density of 10^8 spores/mL were inoculated. The assays were performed under orbital shaking at 160 rpm for 12 days. The enzyme activity obtained was 0,370 FPU/mL for coffee husks and 0,400 FPU/mL for orange peels at 264 hours.

Key words: Cellulases, submerged fermentation, microorganisms, waste.

Recibido: noviembre 14 de 2024

Aprobado: febrero 25 de 2025

INTRODUCCIÓN

Las enzimas son catalizadores biológicos, que sirven para acelerar reacciones con la finalidad de obtener un producto, en el caso de las celulasas hidrolizan la celulosa para producir glucosa por medio de la acción sinérgica de tres enzimas que son las endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas, (Alvarado y Hernández, 2018).

La biomasa lignocelulósica que se utiliza como sustrato para obtener las enzimas, se encuentra conformada por celulosa, hemicelulosas y lignina. La celulosa es un polisacárido formado por largas cadenas de azúcares de seis átomos de carbono, por lo que se denominan hexosas, unidas por enlaces glicosídicos β -1,4, (Liu, 2013), (Puente-Urbina, 2022). La hemicelulosa es un polímero conformado por azúcares de cinco y seis átomos de carbono como D-xilosa, L-arabinosa, D-glucosa, D-manosa y D-galactosa. La lignina es un polímero que se compone de fenilpropanoides que son hidroxifenil (H), guaiacil (G) y siringil (S), (Ralph *et al.*, 2019). En relación a la biomasa que se utilizó para la elaboración de este trabajo y analizando la problemática ambiental por acumulación de residuos orgánicos en el medio ambiente, se propuso realizar ensayos con estos residuos entre estos las cáscaras de naranja y café. Respecto a lo anterior se encontró que la acumulación de residuos de cítricos a nivel mundial genera alrededor de 20 millones de toneladas anuales de estos, en solo la ciudad de Bogotá, (Peñaranda *et al.*, 2017) en la capital del país se producen 6.300.000 de residuos sólidos, de esta cantidad de residuos el 53,22% corresponde a orgánicos y tan solo el 17% del total de toneladas que se producen se reciclan, (Muñoz *et al.*, 2022).

La naranja es uno de los cítricos que más se producen en ciudades como Bogotá y Medellín, las anteriores cifras nos indican el gran impacto que genera la acumulación de estos residuos orgánicos, y el poco aprovechamiento que se les da, tan solo analizando las ciudades principales del país como Bogotá y Medellín, (Muñoz *et al.*, 2022), por otra parte en la industria de producción

del café aproximadamente el 95% de lo que se obtiene, confieren a residuos, teniendo en cuenta que Colombia es un país cafetero, se afirma que los principales subproductos generados en esta industria son: la pulpa, el mucílago, el cisco (cáscara), las pasillas, y la borra, que son considerados residuos del proceso.

Por lo anterior, es importante mencionar que en la producción de café se generan impactos negativos ambientales significativos, principalmente en fuentes hídricas, suelos y aire, afectando los recursos naturales según (Rodríguez, 2007); (Alvarado y Hernández, 2018), por lo que proponer un aprovechamiento de residuos de esta industria es interesante.

Teniendo en cuenta que la biomasa utilizada es lignocelulósica, se recalca que la conversión de la celulosa a monómeros, conlleva a la realización de un proceso denominado pretratamiento de la materia prima, el cual permite la eliminación de componentes como lignina y hemicelulosas (Torres y Molina, 2012).

Para remover componentes de la biomasa utilizada en este proyecto, se optó por aplicar el pretratamiento con ácido acético y peróxido de hidrógeno (la mezcla se denomina ácido peracético), debido a que son reactivos biodegradables.

Finalmente la fermentación en estado sumergido, la cual es una técnica ampliamente usada para producir enzimas, permitió obtener las celulasas, cabe destacarse que las celulasas son enzimas que se comercializan en gran medida a nivel mundial, dada su importancia en industrias como textiles, alimentos, detergentes, y producción de biocombustibles, (Khatiwada *et al.*, 2016; Sinjaroonsak *et al.*, 2020; Pangsi *et al.*, 2021) sin embargo, los altos costos involucrados en su producción generan limitantes, esto se debe a sustratos utilizados como el carboximetilcelulosa y técnicas empleadas en la obtención de estos catalizadores biológicos (Bhardwaj *et al.*, 2021; Coelho *et al.*, 2021). Por consiguiente, se determinó realizar este proyecto para obtener enzimas celulasas a partir de residuos

agroindustriales, ya que actualmente se busca la valorización de estos, debido a que son de bajo costo, logrando también generar un impacto positivo en el medio ambiente al disminuir la cantidad de residuos orgánicos que son arrojados diariamente.

METODOLOGÍA

En esta sección se presenta la metodología aplicada para el desarrollo de este trabajo que cuenta con la caracterización de microorganismos, biomasa, pretratamiento de la biomasa, fermentación y determinación de la actividad enzimática.

Caracterización de los microorganismos, producción de enzima en placa, preparación y caracterización de la biomasa

Se realizó la siembra en medio carboximetilcelulosa (CMC) de los microorganismos utilizados, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger* cedidos por el cepario de los laboratorios de la sede Campos Elíseos de la Universidad Francisco de Paula Santander, los cuales fueron puestos en incubación durante 5 días, transcurrido este tiempo se hizo lavado de las cepas con el reactivo Rojo Congo y se llevaron a nevera 3 días, después se observó y cuantificó el halo de producción de enzima celulasa en placa, la observación microscópica se realizó con la técnica impropia utilizando azul de lactofenol, (Escudero, 2022). En el caso de la biomasa, se recolectó una cantidad significativa de cáscaras de naranja y cáscaras de café, que fueron donadas por propietarios de la Finca El Paraíso de la vereda Barrientos, en el corregimiento de Arboledas, Norte de Santander. Seguidamente se realizó la reducción de tamaño de las cáscaras de naranja obteniendo trozos de 0,5 cm x 0,5 cm, para las cáscaras de café no se aplicó la reducción de tamaño, ya que estas naturalmente presentan un tamaño pequeño.

Se procedió a secar las cáscaras a temperatura ambiente, 30°C +/- 0,015, teniendo en cuenta que la ciudad de Cúcuta presenta clima cálido, luego se determinó la humedad que quedaba en la biomasa, por lo que se agregó 1 o 2 gramos de cáscara de café y naranja en una cápsula de porcelana, posteriormente se colocaron en el horno a 110°C durante 1 hora, después se llevaron al desecador las muestras y se realizaron pesadas hasta obtener cantidades constantes. El ensayo se realizó por duplicado, según la norma NREL/TP-510-42621 (Sluiter *et al.*, 2008). Para la determinación de celulosa, hemicelulosa y lignina de muestras analizadas durante el año 2024, se utilizó el método de Van Soest, el cual es aplicado en el Laboratorio de Bromatología (Janke *et al.*, 2016), de la sede de Campos Elíseos, Universidad Francisco de Paula Santander.

También se caracterizó la biomasa antes y después del pretratamiento con microscopía electrónica de barrido SEM para observar la disposición de la estructura interna de la biomasa antes y después de ser procesadas. Para hallar el % de humedad se utiliza la siguiente ecuación (1).

$$\% \text{Humedad} = \frac{\text{peso de la muestra seca} - \text{peso de la cápsula}}{\text{peso de la muestra húmeda}} * 100$$

Para hallar la cantidad de lignina y celulosa en la biomasa sin pretratar y pretratada se utilizan las siguientes ecuaciones, (2) y (3):

%Hemicelulosa

$$\% \text{Hemicelulosas} = \% \text{FDN} - \% \text{FDA}$$

%Lignina

$$\% \text{Lignina} = \% \text{FDA} - \% \text{celulosa}$$

En donde:

%FDN: porcentaje fibra detergente neutra

%FDA: porcentaje fibra detergente ácida

Pretratamiento de la biomasa

Las cáscaras de naranja y café se sometieron a un pretratamiento tipo oxidativo para remover lignina con ácido acético (vinagre comercial) y peróxido de hidrógeno (agua oxigenada), se trabajó la dosificación de reactivos en relación de 1:7, por cada gramo de residuo seco se agregan 7 mL de agua (se tiene en cuenta la humedad del residuo y los reactivos como el ácido acético y peróxido de hidrógeno), la relación establecida para ácido acético fue de 1:4, por cada gramo de residuo se agregan 4 mL de ácido acético y el peróxido de hidrógeno se dosificó en relación de 1:0,5, por cada gramo seco de residuo se agregaron 0,5 mL de peróxido. Los residuos fueron dispuestos en erlenmeyers de 1000 mL durante 2 días a temperatura ambiente, y luego se llevaron a la autoclave durante 1 hora a 121°C. Terminado el pretratamiento, se retiró el material del sobrenadante y se lavó con agua destilada, posteriormente se secaron a temperatura ambiente 30 °C +/- 0,15 los sustratos, y se realizó de nuevo la determinación de humedad. Se halló el rendimiento del proceso mediante los pesos por triplicado de la biomasa pretratada recién pretratada, y la biomasa pretratada que se secó a temperatura ambiente 30 °C +/- 0,15, teniendo en cuenta que, en el pretratamiento utilizado, se remueve lignina y hemicelulosas.

La ecuación (4) utilizada para hallar el rendimiento del proceso es la siguiente, según (Kruyeniski, 2017):

$$\% \text{Rendimiento} = \frac{\text{peso inicial de la muestra pretratada}}{\text{peso seco de la muestra pretratada}} * 100$$

Preparación de la fermentación en cultivo sumergido:

Los ensayos de fermentación se realizaron por duplicado con el hongo *Aspergillus niger*, se preparó el medio de cultivo correspondiente junto con el residuo pretratado, el medio de cultivo utilizado denominado medio Mandels, (Ospina, 2020), contenía 1,4 g/L de sulfato de amonio, 2g/L fosfato monopotásico, 0,4 g/L cloruro de calcio dihidratado, 0,3 g/L sulfato de magnesio, 0,5 g/L sulfato ferroso heptahidratado, 0,2 g/L sulfato de manganeso hidratado, 0,2 g/L sulfato de zinc, 0,3 g/L de urea y 2 g/L de extracto de levadura, y buffer pH 4,8 citrato de sodio. Teniendo en cuenta que se utilizó 100 mL de fermentación en erlenmeyers de 250 mL con 3% p/v de sustrato pretratado, el inóculo contenía 10⁸ esporas/mL aproximadamente (se preparó previamente en solución salina con Tween 80 al 0,1%), y correspondió al 10% v/v del volumen total de la fermentación. La fermentación se mantuvo en agitación orbital a 130 rpm bajo condiciones de temperatura ambiente por 12 días, y se llevaron a cabo cuatro muestreos para cuantificar la actividad enzimática posteriormente.

Determinación de la actividad enzimática: Se colocaron duplicados junto con un blanco de residuos sin pre-tratar. Se cuantificó la actividad de las celulasas generadas en el proceso de fermentación durante 12 días, tomando 3 mL del extracto enzimático, el cual se centrifugó a 4000 rpm durante 30 min. El sobrenadante se utilizó para medir las actividades junto con papel de filtro Whatman N° 1 y DNS según indica la norma NREL/TP-510-42628 (Adney et al., 2008). Se realizó la medición de la actividad por triplicado en diferentes concentraciones de extracto enzimático con su respectivo blanco, según indica la norma para determinación de actividad enzimática de celulasas.

La ecuación (5), utilizada para la determinación de la actividad enzimática es la siguiente:

$$FPU = \frac{0,37}{\text{Conc.de enzima para producir 2,0 mg de glucosa}}$$

FPU: Unidades de papel de filtro FPU/mL, de esta forma se expresa finalmente el resultado.

Desarrollo de análisis estadístico: Se realizó la determinación de la prueba del Test de Fisher de múltiples rangos, y gráfico correspondiente a los datos obtenidos en el seguimiento de la fermentación en estado sumergido, utilizando el software estadístico Startgraphics Centurión versión XV.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Seguidamente se detalla en la Tabla 1, características macroscópicas, microscópicas y medición de los halos

enzimáticos de los microorganismos utilizados para los ensayos realizados.

Caracterización de cepas y biomasa

Mediante el análisis de la tabla 1, donde se evidenció similitud en los resultados de producción de celulasas, para los dos microorganismos, se optó por realizar los ensayos de fermentación sumergida con *Aspergillus niger*.

Los resultados obtenidos en este trabajo, son comparables con autores como (Tórtora et al., 2023), quienes hallaron halos de medición de actividad enzimática de 1,1 cm, 0,4 cm y 0,77 cm para las cepas HR5, HRE2, y HR5E3 que son aislamientos fúngicos en medio CMC, por otra parte (Campuzano et al., 2017) encontraron halos de 1,6 y 2,2 cm correspondientes a las cepas *Rhizopus sp S6* y *Rhizopus sp S14* en medio CMC, autores como (Ramírez e Isaza 2019), definieron halos de 1,2 y 0,85 para *Phanerochaete spp* y *Stereum spp* en medio Czapek's Dox y finalmente en este trabajo de hallaron halos de 0,45 y 0,40 cm para *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*. Se afirma que esta prueba es de gran importancia debido a que evidencia la hidrólisis de la fuente de carbono del medio generando un halo transparente alrededor del crecimiento del microorganismo, permitiendo así elegir cual microorganismo presenta mediciones significativas de producción de la enzima.

Caracterización de la biomasa, determinación de humedad, lignina, hemicelulosa y celulosa

En este apartado se presentan en las tablas 2 y 3 los resultados referentes a la caracterización de la biomasa, cáscaras de naranja y café, que han sido determinadas previamente en el Laboratorio de Bromatología sede Campos Elíseos, UFPS.

Analizando las tablas 2 y 3, se destaca que en el caso de las cáscaras de naranja el efecto que ejerció el pretratamiento principalmente fue eliminar de forma significativa hemicelulosas y en menor cantidad lignina, el rendimiento del proceso fue del 36,42%, debido a lo nombrado anteriormente el pretratamiento no ejerce un efecto significativo en remoción de lignina, pero si en remoción de hemicelulosas, para el caso de las cáscaras de café se presenta mayor remoción de lignina y menor de hemicelulosas, el rendimiento del proceso es del 41%, el resultado obtenido demuestra que se generó una remoción de lignina aunque no significativa, teniendo en cuenta que las cáscaras de café presentan un contenido representativo de lignina inicial (22%), llegando finalmente después del pretratamiento al 15%.

Según lo anterior se indica que para mejorar los resultados de los tratamientos, inicialmente se debe tener en

Tabla 1. Caracterización macroscópica y microscópica de cepas utilizadas.

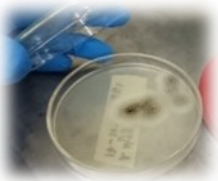
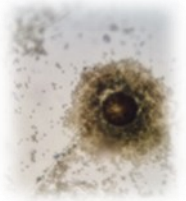
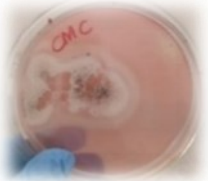
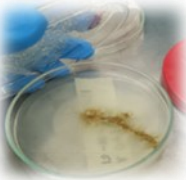
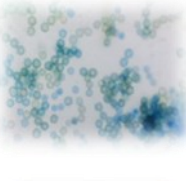

Microorganismo	Observación	Caracterización macroscópica, microscópica y medición de halos enzimáticos (cm)
<i>Aspergillus niger</i>	  	<p>En el caso de <i>Aspergillus niger</i> en medio CMC, se observan tres colonias grandes circulares con esporulado de color negro. Las colonias de este hongo se caracterizan por poseer textura polvorienta.</p> <p>La observación microscópica en el objetivo de 40X, presenta el conidióforo grande, de color café oscuro, biseriado con métula y fiálides de color marrón oscuro que cubren toda la vesícula dando la forma radiada típica.</p> <p>La medición de los halos enzimáticos formados alrededor del crecimiento fúngico es de 0,45 cm +/- 0,07.</p>
<i>Aspergillus oryzae</i>	  	<p>El hongo <i>Aspergillus oryzae</i> en medio CMC, presenta una colonia grande de color beige, internamente con crecimiento esporulado del hongo de color marrón-verdoso.</p> <p>La caracterización microscópica con azul de lactofenol indica la presencia de esporas del hongo, algunas se tiñeron de azul por el colorante y otras se visualizan de color marrón claro.</p> <p>El diámetro de los halos es de 0,40 cm +/- 0,14.</p>

Tabla 2. Caracterización cáscaras de naranja

Cáscaras de naranja sin pretratar				Cáscaras de naranja pretratadas			
Humedad%	Celulosa%	Lignina%	Hemi %	Humedad%	Celulosa%	Lignina%	Hemi %
13,40 +/- 0,020	30 +/- 0,04	7 +/- 0,17	11,00 +/- 1,0	29 +/- 0,016	32 +/- 0,95	4,4 +/- 1,0	4 +/- 1,2

Tabla 3. Caracterización cáscaras de café.

Cáscaras de café sin pretratar				Cáscaras de café pretratadas			
Humedad%	Celulosa %	Lignina%	Hemi %	Humedad%	Celulosa%	Lignina%	Hemi %
8,35 +/- 0,023	36,31 +/- 1,12	22,00 +/-1,17	13,6 +/- 0,75	27,55 +/- 0,01	42 +/-0,51	13,00+/-0,9	15+/-0,35

cuenta que en el proceso se utilizó ácido acético (vinagre comercial) al 5% v/v y peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) al 3% v/v, por lo que se afirma que las concentraciones de los reactivos son bajas, por ende para mejorar la efectividad del pretratamiento es necesario mejorar sustancialmente las condiciones de este, aumentando las cantidades de reactivo a utilizar, aplicando mayor tiempo de reacción en autoclave, y sometiendo la biomasa inicialmente a una reducción de tamaño, logrando de esta forma partículas más pequeñas de esta.

En el caso de las cáscaras de naranja, se recomienda realizar una extracción de aceites esenciales antes de aplicar el pretratamiento, ya que esto puede interferir en la remoción de componentes. Es importante nombrar que, mejorando los rendimientos de los procesos, se obtiene mayor remoción de compuestos, ya que se facilita la actividad del microorganismo, al hidrolizar la celulosa para producir celulasas. Comparando con otros resultados de diferentes autores que trabajaron con biomasa lignocelulósica, se presenta en la Tabla 4.

En análisis de los resultados presentados en la tabla 4, se observa que los datos obtenidos en este trabajo son comparables con los de otros autores, se evidencian rendimientos que se encuentran dentro de los rangos de varios autores, utilizando reactivos biodegradables, económicos y equipamiento de fácil acceso en un laboratorio de biotecnología.

Caracterización de la biomasa en microscopía SEM

La caracterización de la biomasa también se realizó en microscopía de barrido electrónico, a continuación, se muestran las imágenes de la biomasa antes y después de pretratada.

Las imágenes en microscopía SEM evidencian la estructura interna de la biomasa de cáscaras de café y naranja sin pretratar y pretratadas, las imágenes revelan las fibras de hemicelulosas, celulosa, lignina y estructuras de estomas que conforman la biomasa lignocelulósica, en el caso de la biomasa sin pretratar se puede visualizar claramente la presencia significativa de fibras, caso contrario en la biomasa pretratada donde hay menos presencia de fibras, debido al efecto que ejerce el pretratamiento en la estructura interna de estas, al eliminar parte

de la lignina y hemicelulosas contenidas en la biomasa. La remoción de lignina y hemicelulosas, facilita la accesibilidad a la celulosa por parte de los microorganismos para producir enzimas.

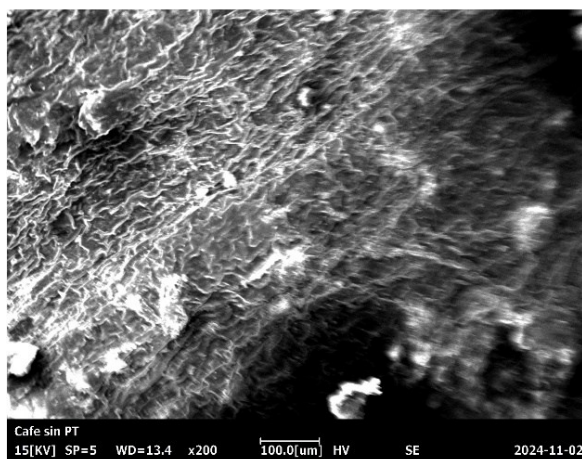
Determinación de la actividad enzimática en cáscaras de naranja y café

La cinética correspondiente a la producción de celulasas a partir de cáscaras de naranja se presenta en la Figura 1.

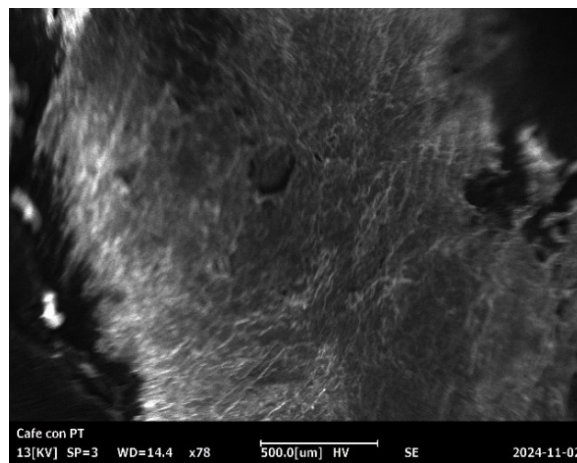
En base a los resultados que se presentan en la Figura 2, se observa que a las 96 horas se presentan actividades similares para los dos tipos de cáscaras, a las 264 horas en el caso de la cáscara de naranja se ha presentado una elevación significativa en la actividad enzimática, finalizando a las 312 horas, se genera un leve descenso de la actividad, sugiriendo que sería necesario seguir monitoreando después de este tiempo para determinar si continúa disminuyendo la actividad o empieza a mantenerse constante, caso contrario sucede en las cáscaras de café que a las 264 horas llegan a su mayor actividad enzimática y de ahí en adelante el descenso de la actividad es significativo, indicando que el tiempo óptimo de producción de la enzima para las cáscaras de café es 12 días, un dato interesante también en cuanto a la utilización de las cáscaras de naranja para producción de enzimas, es que estos residuos han sido principalmente estudiados para producción de enzimas pectinasas, (Arellano *et al.*, 2015), pero en este trabajo se demostró que se pueden obtener celulasas de esta materia prima.

En comparación con la obtención enzimática de otros autores como (Sosa 2019), también reportaron celulasas a partir del *Aspergillus niger*, mediante el uso de residuos como bagazo de caña, bagazo de sorgo, rastrojo de maíz, cáscara de arroz y paja de cebada, se generaron resultados similares a esta investigación con actividad enzimática de 0,215 FPU/ml. En otra investigación (Mueses *et al.*, 2018), quienes trabajaron con el microorganismo, *P. ostreatus*, obtuvieron resultados significativos en la producción enzimática con el bagazo de fique con un total de 0,9978 FPU/mL con un intervalo de tiempo de 20 días, en comparación a esta investigación que se trabajó durante 12 días, y se cuantificaron resultados considerables, por lo que se recalca que el tiempo es una variable muy importante a la hora de llevar a

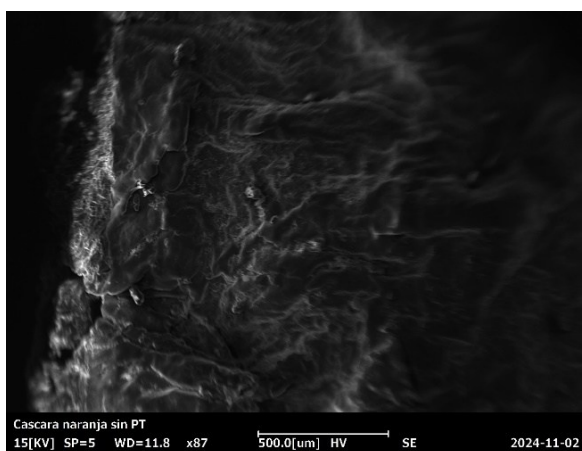
a)



b)



c)



d)

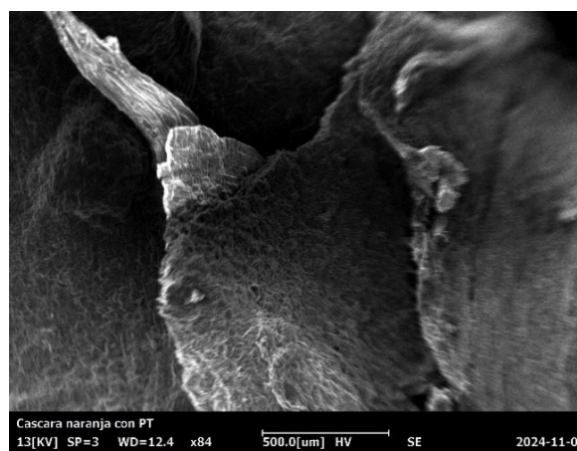


Figura 1. a) Cáscara de café sin pretratamiento, b) Cáscara de café con pretratamiento, c) Cáscara de naranja sin pretratamiento, d) Cáscara de naranja con pretratamiento.

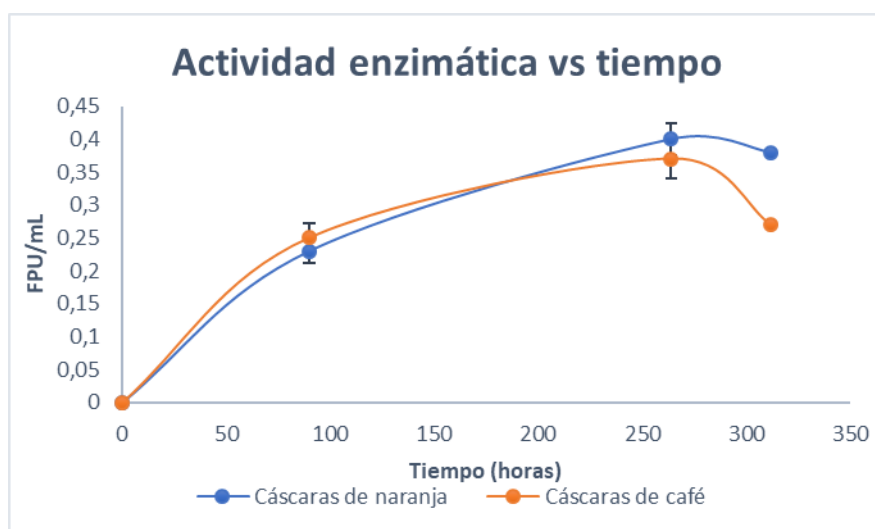


Figura 2. Actividad enzimática vs tiempo

Tabla 4. Comparación pretratamientos para pretratar biomasa lignocelulósica

Pretratamiento	% Rendimiento del proceso	Referencia bibliográfica
Bagazo de caña panelera y hojarasca mezclados en proporción de 90:10 pretratados con peróxido de hidrógeno alcalino, 40 min a temperatura de 25°C, pH 11,5.	61,67%	(Suárez, 2017)
Tallos de yuca pretratados al 1% p/v, 5% de H ₂ O ₂ y a un tamaño de partícula de 0,6 mm, hojas al 5% de H ₂ O ₂ y 0,6mm de tamaño de partícula.	Hojas 8,52%, tallos 13%	(Niño <i>et al.</i> , 2013)
Hojarasca de residuos de poda reduciendo el tamaño de partícula de biomasa, y aplicando un pretratamiento en condiciones de 50:50 v/v agua/ácido acético, a temperatura de 70°C, tiempo de 90 minutos.	80%	(Kildegaard <i>et al.</i> , 2021)
Cascarilla de arroz pretratada con ácido y álcali, mezclando el material seco con una solución de ácido sulfúrico diluido y álcali al 10% p/v, en una relación sólido-líquido de 1:10.	46,7%	(Jaramillo <i>et al.</i> , 2017)
Bagacillo de caña, y polvillo de fique, pretratado con bisulfito de sodio comercial al 4% p/p, se operó en relación sólido-líquido del 6% p/v en un sistema de digestión en paralelo	32,26% en bagacillo de caña, y 62,72% en polvillo de fique	(Pantoja-Matta <i>et al.</i> , 2015)
Cáscaras pretratadas con ácido acético y peróxido de hidrógeno en autoclave durante 1 hora.	Cáscaras de naranja 36% Cáscaras de café 41%	(Este trabajo)

cabo un proceso, ya que mayor tiempo puede implicar mayor actividad enzimática, pero se pueden elevar costos de producción a la hora de pretender industrializar el proceso. En la investigación de (Cardona 2023), se observa que los resultados que presentaron son menores a los de este trabajo, en su procedimiento con medios no convencionales obteniendo 0,130 FPU/mL de actividad de celulasas a partir de residuos de la producción de flores y papa, lo anterior permite afirmar que el proceso de fermentación sumergido para producción a

partir de cáscaras de naranja y de café es promisorio, si se desea continuar en la investigación.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Análisis cáscaras de naranja

Los resultados de la prueba de múltiples rangos para las cáscaras de naranja son los siguientes.

En el caso de la prueba de múltiples rangos de Fischer se observa que existen diferencias significativas en todos los tiempos excepto de las 264 a 312 horas, demostrando esta significancia con un **valor -p** de 0,0010 intra grupal como se identificó en el análisis de varianza.

En el caso de las cáscaras de naranja se observa que existe diferencias significativas en las medias de todos los tiempos, excepto de 264 a 312 horas. Del tiempo 0 a 90 horas va en aumento el promedio de la actividad enzimática de la celulasa, el tiempo donde el promedio presentó el mayor aumento de la actividad enzimática es a las 264 horas, disminuyendo a las 312 horas.

Análisis para cáscaras de café

Los resultados de los análisis de la cáscara de café son los siguientes.

Tabla 5. Pruebas de Múltiple Rangos para FPU/mL por Tiempo hora.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 90	*	-0,225	0,0675099
0 - 264	*	-0,395	0,0675099
0 - 312	*	-0,38	0,0675099
90 - 264	*	-0,17	0,0551216
90 - 312	*	-0,155	0,0551216
264 - 312		0,015	0,0551216

Método: 95,0 porcentaje LSD

* indica una diferencia significativa.

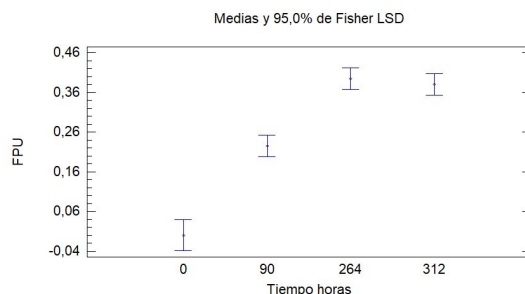


Figura 3. Actividad enzimática FPU/mL vs tiempo para cáscaras de naranja.

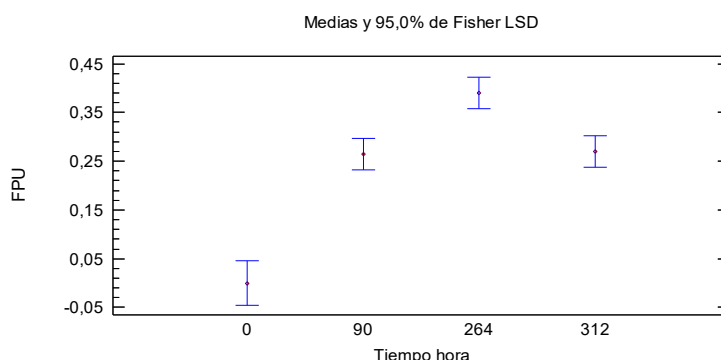


Figura 4. Actividad enzimática FPU/ml vs tiempo para cáscaras de café.

Tabla 6. Pruebas de Múltiple Rangos para FPU/mL por Tiempo hora.
Método: 95,0 porcentaje LSD

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 90	*	-0,265	0,0795612
0 - 264	*	-0,39	0,0795612
0 - 312	*	-0,27	0,0795612
90 - 264	*	-0,125	0,0649615
90 - 312		-0,005	0,0649615
264 - 312	*	0,12	0,0649615

* indica una diferencia significativa.

En el caso de la prueba de múltiples rangos para la cáscara de café se observa que hay diferencias significativas en todos los tiempos excepto en los tiempos de 90 a 312 horas, la significancia intra grupal se demuestra con un **valor- p** de 0,0023 como se identificó en el análisis de la varianza.

En análisis de la figura 4, se observa que el aumento del promedio de la actividad enzimática se da mayoritariamente desde el tiempo 0 a 90 horas, seguidamente el mayor

resultado de actividad enzimática se reporta a las 264 horas, descendiendo significativamente a las 312 horas.

CONCLUSIONES

En base a los resultados que se obtuvieron en el trabajo se puede concluir, que el pretratamiento propuesto para este proyecto removi6 componentes de las biomásas, sin embargo puede ser interesante seguirlo manejando en futuros ensayos, si se mejoran las condiciones de operación, también se puede afirmar que la utilización de cáscaras de naranja y café son opciones llamativas para producir extractos enzimáticos, ya que cabe destacarse que la opcion de producir enzimas a partir de estos residuos, conllevaría a grandes impactos positivos a nivel ambiental y económico.

AGRADECIMIENTOS

Se expresan agradecimientos en este trabajo al Ingeniero Fredy Camperos y a la Ingeniera Claudia Yohana Lizcano quienes forma parte del equipo de Biotecnología, Sena, Cúcuta, Norte de Santander, por el apoyo en la realización de parte de este trabajo, al ceder el espacio para utilizar el microscopio electrónico de barrido SEM, para análisis de las biomásas utilizadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Adney, B y Baker, J. NREL (2008). Medición de la actividad de celulastas: procedimiento analítico de laboratorio (LAP). <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42628.pdf>.
- Alvarado, T., y Hernández, A. (2018). Revisión de alternativas sostenibles para el aprovechamiento del orujo de naranja. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 5(2), 9-32. doi: <http://dx.doi.org/10.23850/24220582.1393>.
- Arellano, J., Ilich, S., Salazar, M., Rodríguez, Torres, P., Alarcón, W. (2015). Producción de pectinasas a partir de *Bacillus spp* a partir de cáscaras de naranja y de toronja como fuente de carbono. *REBIOL. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas*. 35(1), 62-69. <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/faccbiol/article/view/877/806>.
- Bhardwaj, N., Kumar, B., Agrawal, K., Verma, P. (2021). Current perspective on production and applications of microbial cellulases: A review. *Bioresources and Bioprocessing*, 8(1), 1-34. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00447-6>.
- Campuzano, S., Urquijo, L., Valderrama, J. (2017). Evaluación de la actividad celulolítica y quitinolítica de hongos filamentosos aislados de rizósfera de cultivos de papa para control de *Rhizoctonia solani*. *NOVA*. 15(28), 45-55. <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/568/938>.
- Cardona, S. (2023). Evaluación medios de cultivo no convencionales empleando residuos del sector floricultor y papicultor para la producción de enzimas con potencial ambiental e industrial a partir de hongos nativos del Oriente Antioqueño. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia, p 10. https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/33900/1/SotoJuliana_2023_Evaluaci%cc3%b3nMediosHongos.pdf.
- Escudero, J. (2022). Estudio del potencial biotecnológico de actinobacterias de cuatro ciénegas Coahuila con actividad celulolítica. México: Universidad Autónoma de Nuevo León, p-53. <http://eprints.uanl.mx/23854/1/1080328528b.pdf>.
- Janke, L., Weinrich, S., Leite, A., Filippi, K., Terzariol, F., Nikolausz, M., Nelles, M., Stinner, W. (2016). "Improving anaerobic digestion of sugarcane straw for methane production: Combined benefits of mechanical and sodium hydroxide pretreatment for process designing". *Energy Conversion and Management*. 141, 378-389. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2016.09.083>.
- Jaramillo, D., Morales, P., Quintero, J. (2017). Evaluación de pretratamientos químicos sobre materiales lignocelulósicos. *Ingeniare. Revista chilena de ingeniería*, 25 (4), 733-743. <https://www.scielo.cl/pdf/ingeniare/v25n4/0718-3305-ingeniare-25-04-00733.pdf>.
- Khatiwada, P., Ahmed, J., Sohag, M., Islam, K., Azad, A. (2016). Isolation, Screening and Characterization of Cellulase Producing Bacterial Isolates from Municipal Solid Wastes and Rice Straw Wastes. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*. 6(4), 1-5. DOI: 10.4172/2155-9821.1000280.
- Kildegaard, G., Balbi, M., Salierno, G., De Blasio, C., Galvagno, M, Cassanello, M. (2021). Deslignificación de residuos forestales urbanos optimizada por diseño de experimento (Póster). Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. https://www.researchgate.net/publication/360626722_Deslignificacion_de_residuos_forestales_urbanos_optimizada_por_diseno_de_experimento#fullTextFileContent.
- Kruyeniski, J. (2017). Influencia del pretratamiento de residuos foresto industriales sobre la producción de bioetanol. Misiones, Argentina: Universidad Nacional de Misiones, p 45-49. https://rid.unam.edu.ar/bitstream/handle/20.500.12219/2388/KRUYENISKI%20Julia_2017_%20Influencia%20del%20pretratamiento%20de%20residuos%20forestoidustriales.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Liu, Ch., Xiao, L., Jiang, J., Wang, W., Gu, F., Song, D., Yi, Z., Jin, Y., Li, L. (2013). Food and Energy Security. 2 (1), 12-19. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/fes3.19>.
- Mueses, R y Romo, J. (2018). Utilización de celulastas obtenidas por fermentación en estado sólido de *Pleurotus*. Nariño, Colombia: Universidad de Nariño, p 8-9. <https://sired.udenar.edu.co/8219/1/92592.pdf>.
- Muñoz, L., Bulla, E., Sanabria, I. (2022). Estudio del Impacto Ambiental y Propuesta de un Plan de Manejo de Residuos Generado por las Cáscara de Naranja Desechadas por los Puestos de Bebida que se Encuentran los Domingos en la Jornada de Ciclovía en Usaquén. Bogotá, Colombia. Universidad EAN, p 5. <https://repository.universidadean.edu.co/items/86527006-8b0a-4edc-b7b7-1b7827063b57>.
- Niño, L., Acosta, A., Gelves, R. (2013). Evaluación de pretratamientos químicos para la hidrólisis enzimática de residuos lignocelulósicos de yuca (*Manihot esculenta Crantz*). *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia N*, 69 (1), 317-326. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-62302013000400025.
- Ospina, N. (2020). Optimización de la producción de celulasa a partir de *Fusarium sp*. Medellín, Colombia. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Minas, p-34. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/81428/1107036049.2020.pdf?sequence=5>.

- Pangsri, P., Wuttiornpun, T., Songserm, W. (2021). Mannanase and Cellulase Enzyme Production from the Agricultural Wastes by the *Bacillus subtilis* P2-5 Strain. *Applied Science and Engineering Progress*. 14 (3), 425-434. DOI: 10.14416/j.asep.2020.05.002.
- Pantoja-matta, A., Cuatin-inguilán, M., Muñoz, D (2015). Efecto del pretratamiento químico y enzimático en la deslignificación de biomasa agroindustrial típica del cauca. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 13 (1), 45-53. <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/371/555>.
- Peñaranda, L., Montenegro, S., Giraldo, P. (2017). Aprovechamiento de residuos agroindustriales en Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 8 (2), 141-150. <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/2040/2293>.
- Puente-Urbina, A. (2022). Caracterización de biomasa lignocelulósicas y su procesamiento térmico: estado y oportunidades en el Instituto Tecnológico de Costa Rica. *Tecnología en Marcha*. 35(7), 119-128. <https://doi.org/10.18845/tm.v35i7.6343>.
- Ramírez, S e Isaza, M. (2019). Actividad celulolítica de hongos aislados del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira. *MICRO-CIENCIA, Investigación, Desarrollo e Innovación*. 8, 12-19.
- Ralph, J., Lapierre, C., Boerjan, W. (2019). "Lignin structure and its engineering," *Current Opinion in Biotechnology*. 56, 240-249. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.019>.
- Rodríguez, N. Informe anual de actividades 2006-2007. Chinchiná (Colombia), Cenicafe. Disciplina de Calidad y Manejo Ambiental, 2007. <https://publicaciones.cenicafe.org/index.php/infanual/article/view/686/856>.
- Sluiter, A., Hames, B., Hyman, D., Payne, C., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J. D. J. Wolfe., NREL (2008). Determinación de sólidos totales en biomasa y sólidos disueltos totales en muestras de procesos líquidos: procedimiento analítico de laboratorio (LAP). <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42621.pdf>.
- Sinjaroonsak, Santat., Chaiyas, T., Kittikun A. (2020). Optimization of Cellulase and Xylanase Productions by *Streptomyces thermocoprophilus* TC13W Using Low Cost Pretreated Oil Palm Empty Fruit Bunch. *Waste and Biomass Valorization*. 11, p. 3925-3936. https://www.researchgate.net/publication/333552351_Optimization_of_Cellulase_and_Xylanase_Productions_by_Streptomyces_thermocoprophilus_TC13W_Using_Low_Cost_Pretreated_Oil_Palm_Empty_Fruit_Bunch.
- Sosa, M. (2019). Producción de celulasas de *Aspergillus niger* ITV-02. Veracruz, México: Instituto Tecnológico de Veracruz, p 5. <https://rinacional.tecnm.mx/jspui/handle/TecNM/2605>.
- Suárez, S. (2017). Evaluación del desempeño del pretratamiento con peróxido de hidrógeno sobre mezclas de biomasa lignocelulósicas (bagazo de caña panelera y hojarasca). Bucaramanga, Colombia: Universidad Santo Tomás, p -10. <https://repository.usta.edu.co/bitstream/handle/11634/10461/SoleidySuarez-2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Torres, F., Contreras, M., Molina, E. (2012). Evaluación del rendimiento de la hidrólisis enzimática de bagazo, con pretratamiento alcalino. *Ingeniería. Revista de la Universidad de Costa Rica*, 22(1), 29-44. <https://www.redalyc.org/pdf/441/44170527003.pdf>.
- Tórtora, M., Nuñez, M., Fernández de Ulivarri, J., Leggio -Neme, F., Romero, E., Digonzelli, P. (2023). Descomposición del residuo de cosecha de la caña de azúcar por una cepa fúngica autóctona de *Trichocladium pyriforme*. *Cultivos Tropicales*. 44 (1), 1-7. <https://cu-id.com/2050/v44n1e04>.