
Análisis de la capacidad de degradación de material orgánico por parte de hongos aislados del suelo para su aplicación en el cultivo de la caña de azúcar

Ximena Contreras Motta



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Análisis de la capacidad de degradación de material
orgánico por parte de hongos aislados del suelo para
su aplicación en el cultivo de la caña de azúcar**

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por
Ximena Contreras Motta para optar al grado académico de Licenciada
en Biotecnología Molecular

Guatemala,
2025

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Análisis de la capacidad de degradación de material orgánico por parte de hongos aislados del suelo para su aplicación en el cultivo de la caña de azúcar

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por
Ximena Contreras Motta para optar al grado académico de Licenciada
en Biotecnología Molecular

Guatemala,
2025

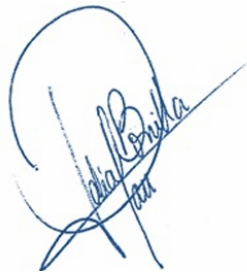
Vo.Bo.:



(f)

Ph.D. Dalia Lau-Bonilla

Tribunal examinador:



(f)

Ph.D. Dalia Lau-Bonilla

(f)



Msc. Isabella García

(f)



Ph.D. Krisztina Rios-Gonzalez

Fecha de aprobación: Guatemala, 14 de enero de 2025.

Agradezco a las personas e instituciones que estuvieron presentes o participaron en la realización de este trabajo de graduación, así como durante toda mi carrera universitaria; especialmente:

A mis papás, Andrea Motta y Renato Contreras, por nunca dudar de mi y apoyarme en estos cinco años para que lograré cumplir mis metas.

A la Dra. Dalia Lau, mi asesora, por guiarme y apoyarme a lo largo de todo el proceso. Agradezco sinceramente, todos los consejos y mentoría que me brindó. Tenerla como catedrática y asesora fue una experiencia sumamente enriquecedora.

A mi segunda asesora, Msc. Isabella García, coordinadora del proyecto por su apoyo y orientación a lo largo del trabajo de graduación, y por darme de la oportunidad de trabajar en este proyecto.

A la Dra. Krisztina Ríos por brindarme su tiempo y asesoría en todo el proceso del trabajo de graduación.

A la Dra. Patrizia Lupo, por su dedicado seguimiento y asesoramiento desde el inicio del trabajo de graduación.

Por último, quisiera agradecer a mis amigos. Especialmente a Gabriela Castillo, Mariana Rivera, Carlos Morán y Andrés Say, su compañía, sus palabras de ánimo y cariño los agradezco muchísimo.

Prefacio	III
Lista de figuras	VI
Lista de cuadros	VII
Resumen	VIII
Abstact	IX
1. Introducción	1
2. Definición del problema	3
3. Objetivos	4
3.1. Objetivo general	4
3.2. Objetivos específicos	4
4. Justificación	5
5. Marco contextual	7
6. Marco teórico	8
6.1. Agricultura en Guatemala	8
6.1.1. Industria azucarera y caña de azúcar	8
6.1.2. Residuos de la industria azucarera	9
6.1.3. Composición de los residuos vegetales lignocelulósicos	9
6.1.4. Uso de los residuos agrícolas	11
6.2. Hongos degradadores de materia vegetal	12
6.2.1. Grupos de hongos caracterizados	13
6.2.2. Abundancia de los hongos en el suelo	13
6.2.3. Sistemas enzimáticos asociados	13
6.2.4. Métodos de identificación de hongos degradadores de celulosa	15
6.2.5. Beneficios e implicaciones de la aplicación de hongos	15

7. Metodología	16
7.1. Diseño, enfoque y tipo de investigación	16
7.2. Población y muestra	16
7.2.1. Población	16
7.2.2. Muestra	16
7.3. Criterios de inclusión y exclusión	16
7.4. Variables	17
7.5. Hipótesis	17
7.5.1. Hipótesis nula	17
7.5.2. Hipótesis alternativa	17
7.6. Metodología	17
7.6.1. Resiembra de hongos	17
7.6.2. Detección de actividad celulósica	18
7.6.3. Fermentación en estado sólido para evaluación de degradación de material vegetal	18
7.6.4. Fermentación en estado líquido para evaluación de degradación de material vegetal	18
7.6.5. Determinación de la actividad enzimática de celulasas	18
7.6.6. Análisis de resultados	19
8. Resultados	20
8.1. Actividad celulolítica extracelular de las cepas de hongos	20
8.2. Evaluación del efecto del tratamiento fúngico en la degradación de residuos celulósicos	22
8.2.1. Fermentación en estado sólido	22
8.2.2. Fermentación en estado líquido	24
8.2.3. Utilización del heno como sustrato celulósico	25
8.3. Determinación de la actividad enzimática de celulasas fúngicas	25
8.3.1. Cuantificación de actividad enzimática de endo- β -1,4 glucanasa fúngica producida en fermentación en estado sólido y líquido	26
8.3.2. Cuantificación de actividad enzimática de β -glucosidasa fúngica producida en fermentación en estado sólido y líquido	27
8.4. Propuesta de formulación de hongos para mejorar la degradación de residuos celulósicos postcosecha del cultivo de caña de azúcar	27
9. Análisis de resultados	29
10. Conclusiones	38
11. Recomendaciones	39
12. Bibliografía	41
13. Anexos	51
Anexo A. Actividad celulolítica extracelular	51
Anexo B. Ensayos de actividad enzimática	53
Anexo C. Protocolos	59

Lista de figuras

Figura 1.	Rendimiento agrícola de cultivos de importancia en Guatemala	9
Figura 2.	Composición de los compuestos lignocelulósicos	11
Figura 3.	Enzimas fúngicas asociadas a la degradación de material lignocelulósico . . .	14
Figura 4.	Crecimiento de hongos filamentosos en heno como sustrato celulósico en fermentación en estado sólido.	23
Figura 5.	Crecimiento de hongos filamentosos en heno como sustrato celulósico en fermentación en estado líquido.	24
Figura 6.	Imágenes de prueba de detección de actividad celulolítica en agar CMC con resultado positivo	52
Figura 7.	Optimización de ensayo de actividad enzimática para endo- β , 1,4-glucanasa .	53
Figura 8.	Curva estándar de glucosa para cuantificación de actividad enzimática para endo- β , 1,4-glucanasa	54
Figura 9.	Optimización de ensayo de actividad enzimática para endo- β , 1,4-glucanasa .	56
Figura 10.	Curva estándar de glucosa para cuantificación de actividad enzimática para β -glucosidasa	57

Lista de cuadros

Cuadro 1.	Hongos degradadores de material lignocelulósico	12
Cuadro 2.	Definición de las variables de investigación	17
Cuadro 3.	Cribado de actividad celulolítica en medio sólido con carboximetilcelulosa	21
Cuadro 4.	Porcentaje de pérdida de masa seca del heno inoculado con hongos filamentosos con alta actividad celulolítica extracelular	25
Cuadro 5.	Actividad enzimática de endo- β -1,4 glucanasa producida por cepas fúngicas cultivadas en fermentación en estado sólido y líquido	26
Cuadro 6.	Actividad enzimática de β -glucosidasa producida por cepas fúngicas cultivadas en fermentación en estado sólido y líquido	27
Cuadro 7.	Propuesta de formulación de hongos para la degradación de residuos celulósicos	28
Cuadro 8.	Lecturas de absorbancia de método DNS para la cuantificación de actividad enzimática para endo- β , 1,4-glucanasa en fermentación en estado sólido	54
Cuadro 9.	Lecturas de absorbancia de método DNS para la cuantificación de actividad enzimática para endo- β , 1,4-glucanasa en fermentación en estado líquido	55
Cuadro 10.	Lecturas de absorbancia para la cuantificación de actividad enzimática para β -glucosidasa en fermentación en estado sólido	57
Cuadro 11.	Lecturas de absorbancia para la cuantificación de actividad enzimática para β -glucosidasa en fermentación en estado líquido	58

La caña de azúcar es uno de los principales productos de exportación en Guatemala, produciendo millones de toneladas por año. Sin embargo, durante el proceso de cosecha mecánica se generan distintos residuos celulósicos cuyo proceso de descomposición es lento. Por ello, en los últimos años, los ingenios azucareros han explorado el uso de microorganismos, como los hongos, para acelerar el proceso de degradación y así aprovechar estos residuos como fuente valiosa de materia orgánica y nutrientes para las plantas. Por consiguiente, el objetivo de este trabajo consistió en identificar cepas de hongos, aisladas de suelo, con capacidad de degradación de material celulósico para su aplicación en el cultivo de la caña de azúcar. A partir de esto, se identificaron 36 cepas de hongos capaces de degradar celulosa, las cuales presentaron diferencias en cuanto a la actividad celulolítica extracelular, siendo un total de 14 hongos los que presentaron una alta actividad extracelular celulítica, los cuales pertenecieron a diferentes especies de hongos. Asimismo, se logró cuantificar la actividad enzimática de las celulasas, endo- β -1,4 glucanasa y β -glucosidasa para las cepas analizadas, empleando como método de cultivo la fermentación en estado sólido y líquido y el heno como sustrato celulósico, lo cual reflejó el potencial degradativo y la acción sinérgica de las celulasas en la degradación de celulosa presente en el sustrato. Sin embargo, no se logró determinar con exactitud el porcentaje de pérdida de masa seca del heno atribuido a la degradación por parte de los hongos, por lo que se recomienda evaluar directamente la degradación de celulosa durante el proceso de fermentación. A partir de estos resultados, se evidenció el potencial del uso de hongos autóctonos aislados de suelo para la degradación de residuos agrícolas celulósicos derivado del cultivo de la caña de azúcar.

Palabras clave: *celulasas, residuos agrícolas, hongos filamentosos, caña de azúcar*

Sugarcane is one of Guatemala's main export products, producing millions of tons per year. However, during the mechanical harvesting process, various cellulosic residues are generated, whose decomposition process is slow. Therefore, in recent years, sugar mills have explored the use of microorganisms, such as fungi, to accelerate the degradation process and utilize these residues as a valuable source of organic matter and nutrients for plants. Consequently, the objective of this study was to identify fungal strains, isolated from soil, with the capacity to degrade cellulosic material for application in sugarcane cultivation. From this, 36 fungal strains capable of degrading cellulose were identified, showing differences in extracellular cellulolytic activity. Of these, a total of 14 fungi exhibited high extracellular cellulolytic activity and belonged to different fungal species. Additionally, the enzymatic activity of cellulases, endo- β -1,4-glucanase, and β -glucosidase was quantified for the analyzed strains, using solid-state and liquid fermentation methods with hay as the cellulosic substrate. This reflected the degradative potential and the synergistic action of cellulases in degrading cellulose present in the substrate. However, it was not possible to determine the exact percentage of dry mass loss of the hay attributable to fungal degradation, and it is therefore recommended to directly evaluate cellulose degradation during the fermentation process. Based on these results, the potential of using fungi isolated from soil for the degradation of agricultural cellulosic residues derived from sugarcane cultivation was demonstrated.

Keywords: *filamentous fungi, cellulases, agricultural residues, sugarcane*

Guatemala es un país que sobresale por su sector agrícola, siendo la tercera actividad más importante de la economía nacional (FAO, 2022). La riqueza natural del país ha contribuido al cultivo de una variedad de productos que en conjunto suman alrededor del 10.8 % del PIB y generan tanto empleo como divisas de exportación (Lara, 2021). Uno de los cultivos de exportación más tecnificados es el de la caña de azúcar, logrando tener rendimiento de decenas de toneladas por hectárea, evidenciando una producción de 26 millones de toneladas para 2022 (FAO, 2024). Adicional a esto, para el año 2022, la caña de azúcar mostró un área cultivable equivalente a 225,116 hectáreas y una productividad de 1,158,502 g/ha de acuerdo con datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2024). Esto ha ocasionado que dicho producto represente el 5 % de las exportaciones del país teniendo un valor FOB de 434. 2 en millones USD (Lara, 2021).

En el proceso de cosecha de la caña de azúcar se generan distintos residuos que equivalen a alrededor de 10-12 toneladas/hectárea de desechos, a partir de un cultivo que produce alrededor de 80-100 t/ha de caña de azúcar (Shukla *et al.*, 2019). Dicha acumulación se atribuye a la cosecha mecánica de los campos que ocasiona la generación de grandes cantidades de biomasa (Lefebvre *et al.*, 2020). Esta incluye hojas y copas de la caña de azúcar (Sindhu *et al.*, 2016), denominándose mantillo al conjunto de vainas, hojas, cogollos y trozos de cañas que quedan distribuidos en el campo como residuos (Basanta *et al.*, 2007).

El residuo poscosecha de la caña de azúcar está conformado principalmente por polisacáridos estructurales en los que se incluyen celulosa (38,1 %), hemicelulosa (29,2 %), lignina (24,7 %), cenizas (3,4 %) y extractivos (4,7 %) (Maza *et al.*, 2014). Dichos polímeros están fuertemente enlazados por medio de una matriz compleja de microfibrillas (Kumar y Chandra, 2020; Sánchez, 2009). En consecuencia, el proceso de degradación de los residuos es lento, tomando casi un año para descomponerse por completo (Maza *et al.*, 2014). Esto ha conllevado a explorar el uso de microorganismos para acelerar el proceso de degradación, ya que se ha observado que muchos son capaces de degradar los polímeros para emplearlos como fuentes de carbono y energía (Sánchez, 2009). Dentro de los microorganismos con dicha capacidad se han reportado bacterias, hongos, actinomicetos y cianobacterias, quienes poseen vías enzimáticas complejas que permiten la degradación de desechos lignocelulósicos (Kumar y Chandra, 2020).

Los hongos son conocidos por ser los principales responsables de la degradación de materiales lignocelulósicos, atribuida a sus sistemas enzimáticos extracelulares (Sánchez, 2009). Los hongos filamentosos poseen diferentes mecanismos y complejos catalíticos para lograr la hidrólisis de estos

componentes, de tal forma que se reconocen tres grupos de hongos con dicha capacidad: hongos de podredumbre blanda, podredumbre parda y podredumbre blanca (Andlar *et al.*, 2018). Se ha observado que el cultivo en estado sólido de estos hongos y la acción sinérgica de sus enzimas mejora la eficiencia en la deslignificación (Maza *et al.*, 2014). Por ello, uno de los enfoques de los últimos años ha sido la identificación de hongos con la capacidad de degradación de residuos de caña de azúcar mediante la evaluación de la actividad de enzimas lignocelulolíticas (Maza *et al.*, 2014).

En paralelo a esto, el cultivo de la caña de azúcar se caracteriza por ser una de las industrias más productivas y ambientalmente sostenibles del país debido al aprovechamiento de los residuos vegetales para producir energía, acondicionar suelos y fertilizar los cultivos (Lara, 2021). El potencial de aprovechamiento de los residuos se encuentra relacionado a que representan una fuente abundante de biomasa lignocelulósica (Sindhu *et al.*, 2016), con potencial de reutilización por su naturaleza orgánica y biodegradabilidad (Basanta *et al.*, 2007). Entre los beneficios derivados de su aprovechamiento se pueden mencionar el aumento del carbono orgánico y los nutrientes del suelo, disminución de la erosión, la escorrentía y la conservación de la humedad del suelo (White & Webber, 2018). Adicional a esto, se ha observado que crea un entorno favorable para el rizomicrobioma, lo cual conduce a una optimización de la disponibilidad de los nutrientes y el crecimiento de las plantas, por lo que se ha recomendado aplicar mulch entre las hileras de caña de azúcar (Shukla *et al.*, 2019). De la misma forma, se requiere un tratamiento con hongos para que los residuos del mulch se fraccionen en sus componentes principales y así permita que esta materia prima tenga un valor agregado en la calidad del suelo (Ajala *et al.*, 2021).

Definición del problema

Los residuos postcosecha de la caña de azúcar representan un recurso abundante y económico de biomasa lignocelulósica (Sindhu *et al.*, 2016). De la misma forma, destacan por su biodegradabilidad y por la oportunidad que representan para ser aprovechados (Basanta *et al.*, 2007). Por esta razón, la gestión sostenible de los residuos sólidos agrícolas puede enfocarse al reciclaje de estos para la producción de productos útiles (Oluseun y Adebukola, 2021).

Sin embargo, la principal limitante en el uso de los residuos agrícolas como los derivados de la cosecha de la caña de azúcar, como aditivo para el suelo, se atribuye a su alto grado de complejidad, dada su composición mixta de celulosa, hemicelulosa y lignina, esta última es el compuesto más resistente a la degradación (Dong *et al.*, 2013). Adicional a esto, el proceso biológico de descomposición de los residuos es lento debido a las condiciones microambientales como el bajo contenido en nitrógeno, baja humedad y condiciones de temperatura relativamente altas (Mhuantong *et al.*, 2015). Por esta razón, se requiere de la aplicación de microorganismos efectivos y sus complejos enzimáticos que potencien la degradación de material orgánico (Dong *et al.*, 2013).

3.1 Objetivo general

Identificar cepas de hongos con capacidad de degradación de material vegetal para el cultivo de la caña de azúcar.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar la capacidad de los hongos para degradar celulosa mediante ensayos microbiológicos in vitro.
- Evaluar el efecto del tratamiento fúngico en la degradación de residuos celulósicos por medio de una fermentación en estado sólido y líquido.
- Determinar la actividad enzimática de celulasas fúngicas por medio de un método basado en espectrofotometría UV-VIS.
- Sugerir una formulación de hongos capaces de mejorar la degradación de material vegetal empleado para el cultivo de la caña de azúcar

El sector agrícola guatemalteco se ha caracterizado por la siembra de caña de azúcar, es el quinto exportador de azúcar y el tercero más eficiente a nivel mundial. En los últimos años se ha logrado incrementar los índices de productividad de azúcar por hectárea cultivada gracias a las estrategias técnicas y mejoras ambientales implementadas (Asociación de Azucareros de Guatemala, 2017). Dicha industria también se caracteriza por producir una gran cantidad de desechos orgánicos, que equivalen a alrededor de 10-12 toneladas/hectárea de desechos a partir de un cultivo que produce alrededor de 80-100 t/ha de caña de azúcar (Shukla *et al.*, 2019).

Los residuos de la caña de azúcar están constituidos por un material lignocelulósico (Shukla *et al.*, 2019), constituido principalmente por celulosa (38,1%), hemicelulosa (29,2%), lignina (24,7%), cenizas (3,4%) y extractos (4,7%) (Maza *et al.*, 2014). En afán de aprovechar los residuos de la caña de azúcar se ha explorado su potencial como aditivo para el cultivo de dicha planta. Lo anterior se atribuye a que los materiales orgánicos, como los residuos de los cultivos, son una fuente valiosa de nutrientes y materia orgánica para las plantas (Xu *et al.*, 2021). En consecuencia, se ha observado que puede mejorar la capacidad de retención de agua del suelo, el contenido de materia orgánica y la concentración de nutrientes esenciales (potasio, nitrógeno, fósforo). Otro aspecto importante es que es un sustrato adecuado para el crecimiento de microorganismos celulíticos (Bhadha *et al.*, 2020).

Sin embargo, la principal limitante en el uso de los residuos de la caña, como aditivo para el suelo, se atribuye a su alto grado de complejidad, dada su composición mixta de celulosa, hemicelulosa y lignina, esta última es el compuesto más resistente a la degradación (Dong *et al.*, 2013). Adicional a esto, el proceso biológico de descomposición de los residuos es lento debido a las condiciones microambientales como el bajo contenido en nitrógeno, baja humedad y condiciones de temperatura relativamente altas (Mhuantong *et al.*, 2015). Por esta razón, se requiere de la aplicación de microorganismos efectivos y sus complejos enzimáticos que potencien la degradación de material orgánico (Dong *et al.*, 2013).

Para ello, deben identificarse microorganismos como los hongos, quienes son los principales responsables de la degradación de lignocelulosa, debido a que cuentan con sistemas enzimáticos hidrolíticos y oxidativos extracelulares ligninolíticos asociados a la degradación de material lignocelulósico (Sánchez, 2009). Asimismo, los hongos son capaces de producir esporas prolíficas e invadir rápidamente los sustratos debido a la presencia de enzimas celulíticas y lignolíticas (Boonyuen *et al.*, 2014). Este tipo de tratamiento es importante para que los residuos lignocelulósicos se fraccionen en sus componentes principales permitiendo que esta materia prima tenga un valor agregado en la calidad del suelo (Ajala *et al.*, 2021).

Por consiguiente, se ha desarrollado un proyecto en el que se identificarán especies de hongos que tengan la capacidad de degradar material celulósico, por medio de la determinación de la presencia de enzimas de interés con pruebas microbiológicas. Se pretende utilizar las especies de hongos identificadas para su inoculación en los residuos de la caña de azúcar y así acelerar su proceso de degradación de forma que resulte beneficioso para el cultivo de la caña.

El cultivo de la caña de azúcar en Guatemala se caracteriza por ser una de las industrias más productivas y ambientalmente sostenibles del país debido al aprovechamiento de los residuos vegetales para producir energía, acondicionar suelos y fertilizar los cultivos (Lara, 2021). A raíz de esto, surge en el año 2021, el proyecto titulado “Mejoramiento de la salud del suelo de monocultivo a través de la optimización de procedimiento de compostaje y manejo de microbiología de suelos” como resultado de una colaboración estrecha entre el Ingenio Magdalena, el Centro de Estudios Biotecnológicos (CEB) y la Universidad del Valle de Guatemala (UVG). El CEB se ha dedicado al desarrollo de soluciones biotecnológicas para la industria y agricultura, así como al desarrollo de bioproductos (UVG, 2024).

El proyecto se ha enfocado en la obtención y caracterización de bacterias y hongos, aislados de suelo, que puedan ser utilizados como biofertilizantes o bioestimulantes para el cultivo de la caña de azúcar. Lo anterior se atribuye a que el Ingenio Magdalena se ha comprometido con la adopción de prácticas agrícolas más responsables con el medio ambiente y parte de ello es reemplazar el uso de fertilizantes químicos, así como aprovechar los residuos agrícolas resultantes de la cosecha de la caña de azúcar por medio de un enfoque biotecnológico.

A partir de esto, el presente trabajo es continuación de la tesis titulada “Identificación y planteamiento de formulación de biofertilizantes de cepas fúngicas aisladas de suelos de monocultivo de *Saccharum officinarum*” presentada por Silvia Paola Vela Torres (Vela, 2023). En dicha investigación, se identificaron y analizaron cepas de hongos de interés con la capacidad de mejorar la calidad del suelo para su uso como biofertilizantes.

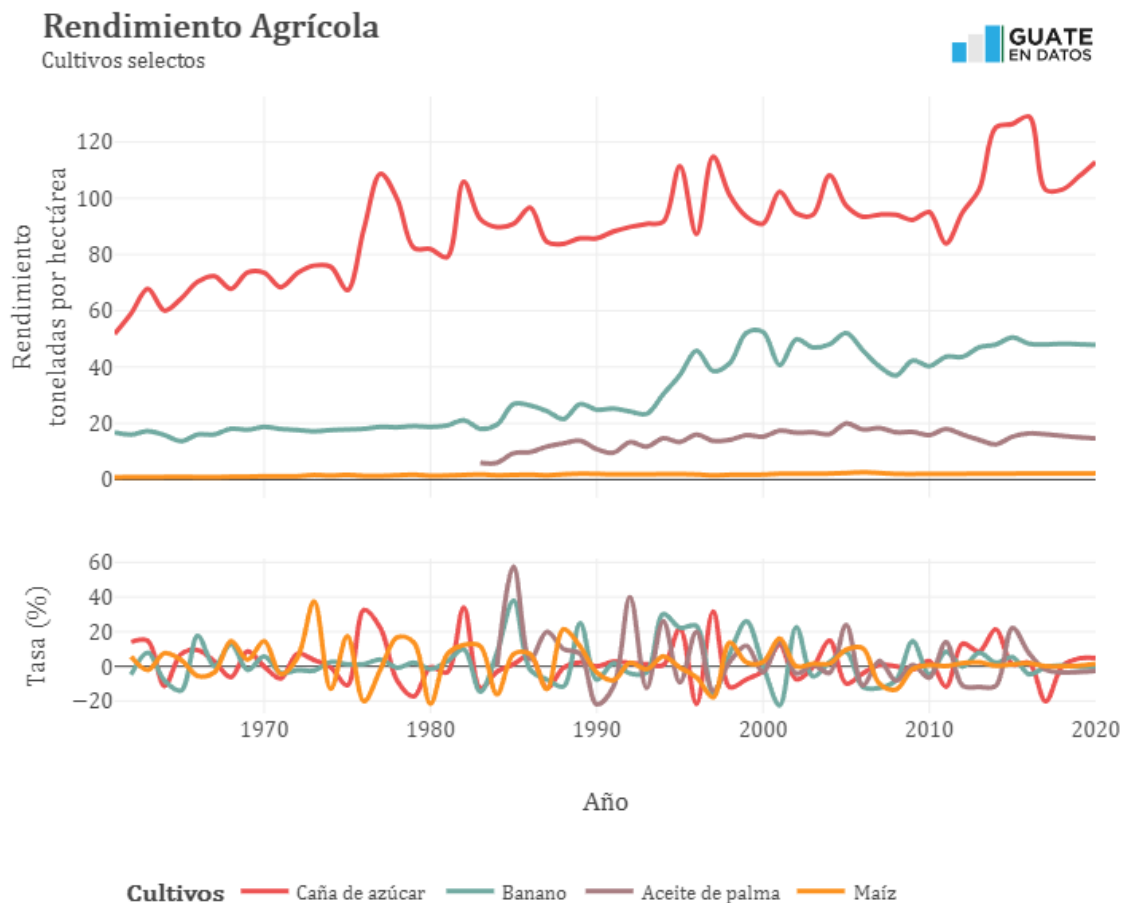
6.1 Agricultura en Guatemala

La riqueza natural del país ha permitido que Guatemala sea un territorio principalmente agrícola a tal grado que representa la economía más importante de Centroamérica (FAO, 2024). De esta forma, la estructura productiva del país está influenciada fuertemente por el sector agrícola, representando una contribución del 10.8 % al PIB nacional (Lara, 2021) y empleando a casi un tercio de la de la población económicamente activa (FAO, 2024). La gran variedad de cultivos ha favorecido que una parte de la producción se destine al consumo interno, como es el caso del maíz y del frijol, y otra parte a la exportación en la que el país tiene una participación importante en los mercados internacionales (AO, 2024; OES, 2020). Los principales productos de exportación para el año 2020 fueron el cardamomo, banano, café, el aceite de palma africana, el azúcar de caña, frutas, legumbres y hortalizas (Lara, 2020).

6.1.1 Industria azucarera y caña de azúcar

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum L.*) representa uno de los productos de mayor valor económico y rendimiento agrícola, evidenciando una cantidad equivalente de 26 millones de toneladas producidas y una productividad de 158,502 g/ha para el año 2,022 (FAO, 2024). Asimismo, genera 507,970.70 millones de dólares en divisas de exportaciones (Ochoa, 2022). Esto ha convertido a Guatemala en el tercer mayor exportador de azúcar en Latinoamérica y el sexto en el mundo (Asociación de Azucareros de Guatemala, 2017). En la *Figura 1*, se evidencia el rendimiento agrícola de los principales cultivos en Guatemala, siendo uno de ellos, la caña de azúcar.

Figura 1
Rendimiento agrícola de cultivos de importancia en Guatemala



Nota. Obtenido de Observatorio Económico Sostenible (2020).

6.1.2 Residuos de la industria azucarera

El aumento en la producción de la caña de azúcar conlleva un incremento proporcional en la cantidad de desechos agrícolas (Bhatnagar *et al.*, 2016). La caña de azúcar, en particular, es un cultivo que genera una gran cantidad de biomasa; en el proceso de cosecha se producen distintos residuos que equivalen a alrededor de 10-12 toneladas/hectárea de desechos de cultivo a partir de un cultivo que produce alrededor de 80-100 t/ha de caña de azúcar (Shukla *et al.*, 2019). Lo anterior se atribuye a la práctica de cosecha mecánica empleada en la industria azucarera, la cual deja grandes cantidades de biomasa en el campo (Lefebvre *et al.*, 2020). En Guatemala, la cosecha mecanizada representa el 36.5 % del total de la caña molida recolectada (Villatoro y Barrera, 2018). Los principales residuos generados por la industria azucarera incluyen hojas verdes y senescentes, entrenudos inmaduros y trozos de tallos maduros (White y Webber, 2018).

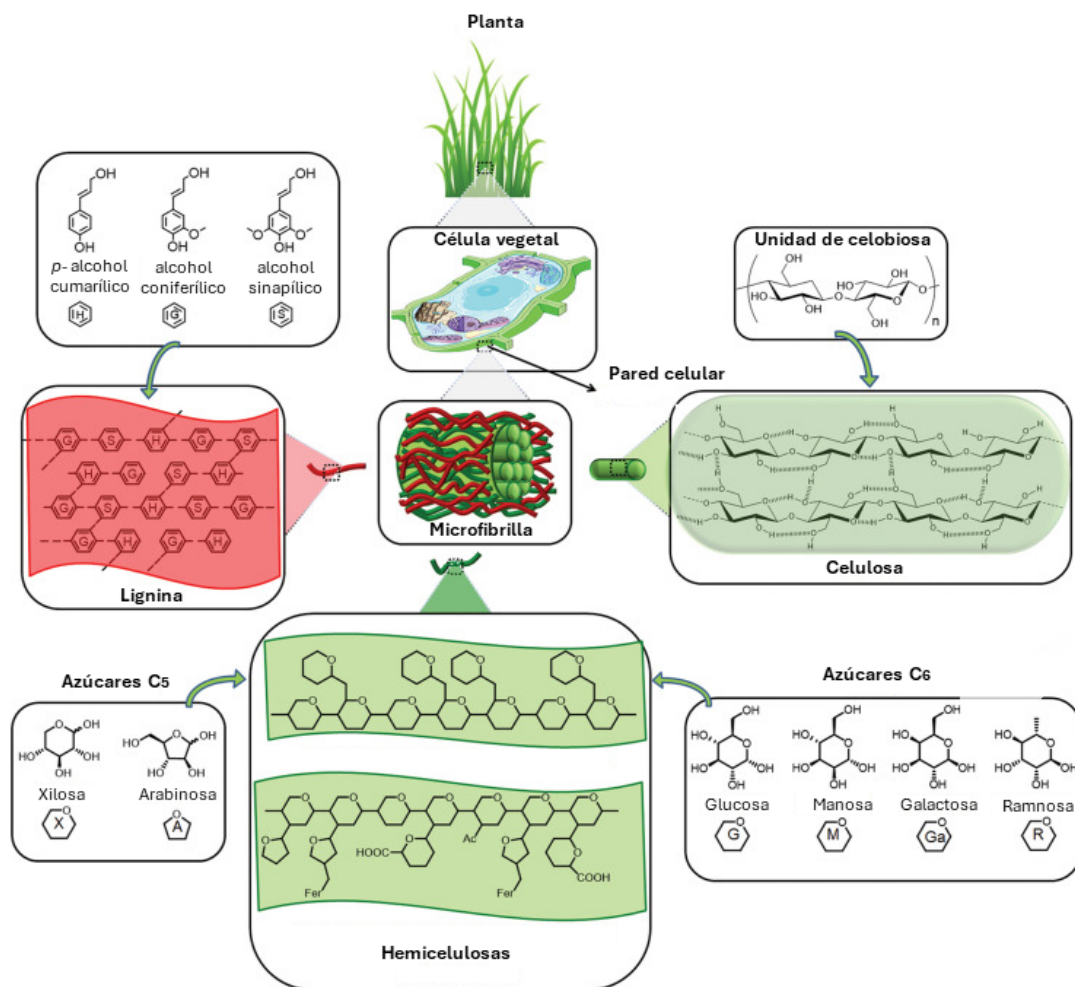
6.1.3 Composición de los residuos vegetales lignocelulósicos

Los residuos agrícolas generados en la industria azucarera destacan principalmente por su naturaleza lignocelulósica por lo que contienen celulosa (40-50 %), hemicelulosa (25-30 %) y

lignina (15-20 %) (Kumar y Chandra, 2020; Shukla *et al.*, 2019). La celulosa y la hemicelulosa se caracterizan por ser macromoléculas constituidas por azúcares, mientras que la lignina es un polímero aromático (Gil, 2021). Dichos polímeros dan lugar una matriz tridimensional compleja no uniforme y composición relativa variable (Isikgor y Becer, 2015). En la *Figura 2*, se ilustra la composición de los materiales lignocelulósicos.

La celulosa es el componente más abundante y se encuentra conformada por miles de unidades de D-glucosa enlazadas en lo que se conoce como microfibrillas (Kumar y Chandra, 2020). Los enlaces que unen a dichas moléculas la hacen resistente a los ataques enzimáticos (Gil, 2021). En el caso de la hemicelulosa, contiene polisacáridos ramificados (xilano y mananos), polisacáridos heterogéneos (xilosa y arabinosa), hexosas (glucosa, manosa y galactosa) y ácidos azucarados (Kumar y Chandra, 2020). La hemicelulosa se incrusta en la pared celular de la planta, y forma una matriz al unirse con las fibrillas de la celulosa y formar una red con la lignina (Isikgor y Becer, 2015). Por último, la lignina es un biopolímero de alto peso molecular, de gran complejidad y de baja biodegradabilidad, por lo cual los materiales lignocelulósicos se conocen como recalcitrantes (Kumar y Chandra, 2020). Este polímero se encuentra formado principalmente por unidades de fenilpropano unidas por diferentes tipos de enlaces (Gil, 2021).

Figura 2
Composición de los compuestos lignocelulósicos



Nota. Adaptado y traducido de Isikgor & Becer, (2015).

6.1.4 Uso de los residuos agrícolas

Los residuos postcosecha de la caña de azúcar representan un recurso abundante y económico de biomasa lignocelulósica (Sindhu *et al.*, 2016). De la misma forma, destacan por su biodegradabilidad y por la oportunidad que representan para ser aprovechados (Basanta *et al.*, 2007). Por esta razón, la gestión sostenible de los residuos sólidos agrícolas puede enfocarse al reciclaje de estos para la producción de productos útiles (Oluseun y Adebukola, 2021).

Uno de los usos que se le puede dar a los residuos de la caña de azúcar es emplearlo como enmienda agrícola para la mejora de la calidad del suelo (Basanta *et al.*, 2007). Esto se debe a que favorece un aumento en el carbono orgánico del suelo, nitrógeno y de los nutrientes, disminución de la erosión y escorrentía, conservación de la humedad del suelo. Además, favorece la creación de un microambiente favorable para el establecimiento del rizomicrobioma, una comunidad microbiana presente en la rizosfera (Jamil *et al.*, 2022), de forma que todos estos factores contribuyan a la optimización del crecimiento del cultivo (Shukla *et al.*, 2019; White y Webber, 2018). No obstante, el

proceso de descomposición es demasiado lento, por lo que se demora casi un año en descomponerse por completo, lo cual puede conducir a efectos perjudiciales derivados de la acumulación de biomasa en la superficie del suelo (Maza *et al.*, 2014).

6.2 Hongos degradadores de materia vegetal

Otra de las principales limitantes en el uso de residuos de la caña de azúcar, como aditivo para el suelo, se atribuye a su alto grado de complejidad, dada su composición mixta de celulosa, hemicelulosa y lignina, siendo esta última el compuesto más resistente a la degradación (Dong *et al.*, 2013). No obstante, se ha observado que existen microorganismos con la capacidad de degradar materiales lignocelulósicos y emplearlos como fuente de carbono y energía (Sánchez, 2009). Entre estos destacan los hongos, quienes se conocen por ser los principales responsables de la degradación de materiales lignocelulósicos (Sánchez, 2009), ya que incluso se ha evidenciado que lo hacen a una velocidad más rápida que las bacterias por lo que tienen un papel clave en el reciclaje del carbono dentro del ecosistema (Singh y Singh, 2016). Dicha capacidad se atribuye principalmente a sus complejos enzimáticos con actividad catalítica que permite la hidrólisis de materias primas como lo son los residuos agrícolas (Andlar *et al.*, 2018). En el Cuadro 1 se detallan algunos hongos degradadores de residuos lignocelulósicos.

Cuadro 1: Hongos degradadores de material lignocelulósico

Especie	Sustrato	Referencia
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Bagazo de caña de azúcar	(Machado & Ferraz, 2017)
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>		
<i>Schizophyllum commune</i>		(Kumar <i>et al.</i> , 2015)
<i>Tremetes villosa</i>		(Silva <i>et al.</i> , 2014)
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>		(Machado & Ferraz, 2017)
<i>Phanerochaete sp.</i>		(Maza <i>et al.</i> , 2014)
<i>Pleurotus sp.</i>		
<i>Myrothecium sp.</i>		
<i>Lentinula edodes</i>	Paja de trigo	(Van Kuijk <i>et al.</i> , 2017)
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>		
<i>Inonotus obliquus</i>		(Xu <i>et al.</i> , 2017)
<i>Irpex lacteus</i>		(García-Torreiro <i>et al.</i> , 2016)
<i>Tricholoma giganteum</i>		(Patel & Gupte, 2016)
<i>Irpex lacteus</i>	Rastrojo de maíz	(García-Torreiro <i>et al.</i> , 2016)
<i>Inonotus obliquus</i>		(Xu <i>et al.</i> , 2017)
<i>Myrothecium verrucaria</i>		(Su <i>et al.</i> , 2018)
<i>Inonotus obliquus</i>	Paja de arroz	(Xu <i>et al.</i> , 2017)
<i>Pleurotus ostreatus</i>		(Mustafa <i>et al.</i> , 2016)

6.2.1 Grupos de hongos caracterizados

Los hongos de descomposición de materiales lignocelulósicos se clasifican en tres grupos: hongos blancos, marrones y de pudrición blanda (Nadir *et al.*, 2019).

- Hongos de podredumbre marrón: Son principalmente basidiomicetos que se caracterizan por tener la capacidad de metabolizar rápidamente la celulosa y la hemicelulosa, pero al no contar con enzimas degradadoras de lignina únicamente pueden modificarla ligeramente (Andlar *et al.*, 2018). Cabe mencionar que si bien representan menos del 10 % de la diversidad taxonómica de basidiomicetes que pudren la madera, son un grupo frecuente en la naturaleza (Arantes *et al.*, 2012).
- Hongos de podredumbre blanda: Hongos que en su mayoría pertenecen a los ascomicetos y que tienen capacidades intermedias de degradación de madera (Hildén y Mäkelä, 2018). Al igual que los hongos de podredumbre parda, estos hongos únicamente pueden degradar los carbohidratos de la pared celular (Zabel y Morrell, 2020). Para ello emplean mecanismos poco estudiados como la formación de cavidades en las paredes celulares y la erosión de los componentes de la pared celular (Schilling *et al.*, 2020).
- Hongos de podredumbre blanca: A diferencia de los otros dos grupos, estos hongos cuentan con sistemas enzimáticos que les permiten degradar la lignina, celulosa y hemicelulosa (Andlar *et al.*, 2018). Emplean procesos enzimáticos en los que están involucrados hidrolasas y oxidorreductasas, así como mecanismos no enzimáticos (Suryadi, *et al.*, 2022). Se cree que estos organismos son los únicos con la capacidad de descomponer por completo la lignina en productos solubles (Suryadi, *et al.*, 2022). Adicional a esto, producen patrones de descomposición simultáneos y selectivos, en donde la pared celular es degradada por las hifas del hongo que crecen dentro del lumen celular (Bari *et al.*, 2020).

6.2.2 Abundancia de los hongos en el suelo

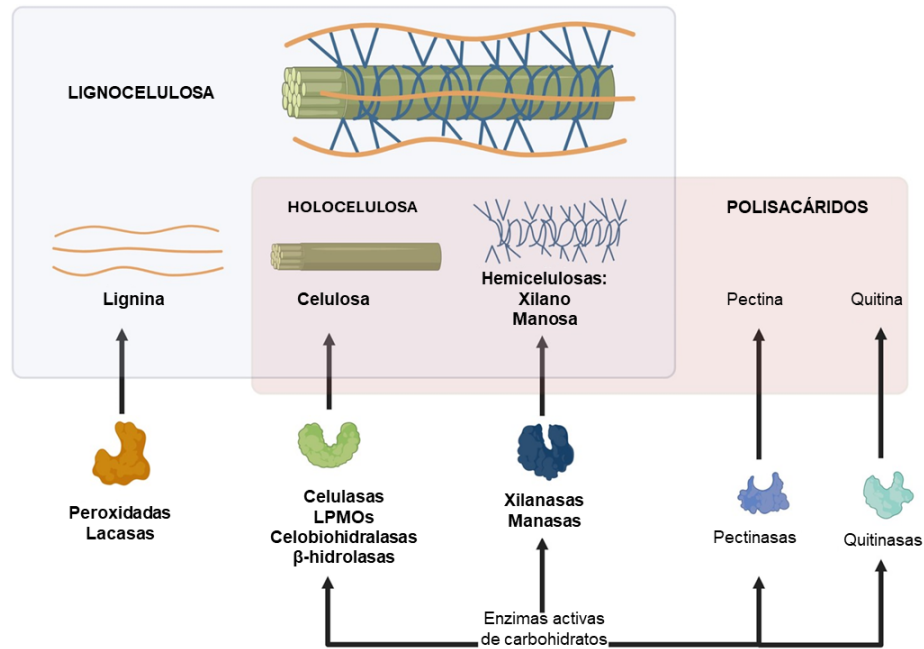
Los hongos son microorganismos que debido a su alta plasticidad han logrado adaptarse a diferentes condiciones y habitar distintos ambientes. Parte del éxito se atribuye a su habilidad de descomponer diferentes tipos de materia orgánica y componentes del suelo, contribuyendo de esta manera al ciclo de carbono y al reciclaje de nutrientes (Frac *et al.*, 2018). Los hongos tienen un rol importante en los ecosistemas forestales, donde los principales degradadores de lignocelulosa son hongos asociados con la degradación de la madera, quienes se caracterizan por su estilo de vida altamente adaptativo lo cual se ve evidenciado en su diversidad fenotípica y gran filogenética (Andlar *et al.*, 2018). Dicha capacidad la tienen principalmente hongos en descomposición de la madera.

6.2.3 Sistemas enzimáticos asociados

La capacidad efectiva de degradación de los residuos de la caña de azúcar por parte de los hongos se atribuye principalmente a que cuentan con sistemas enzimáticos eficientes capaces de superar la estabilidad física y química de la lignocelulosa (Andlar *et al.*, 2018). Dichos sistemas pueden ser hidrolíticos, los cuales son los encargados de la degradación de celulosa y hemicelulosa, así como pueden tener sistemas ligninolíticos extracelulares oxidativos que pueden degradar lignina (Maza *et al.*, 2014). Dichas enzimas son liberadas al medio ambiente y utilizan los diferentes mecanismos enzimáticos a medida que van degradando el material lignocelulósico (Benz y Schipper, 2020). En la *Figura 3* se observan los sistemas fúngicos enzimáticos asociados a la degradación de material lignocelulósico.

Figura 3

Enzimas fúngicas asociadas a la degradación de material lignocelulósico



Nota. Traducida y adaptada de Gurovic et al., (2023).

La lignina es el componente más resistente a la degradación debido a la red tridimensional formada por la unión de los enlaces de hidrógeno entre la celulosa y la hemicelulosa (Nadir *et al.*, 2019). La degradación de este componente debe tener lugar antes de la hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa, debido a la compleja estructura e hidrofobicidad de este polímero (Gurovic *et al.*, 2023). Las enzimas responsables de la descomposición de este componente y la apertura de los anillos fenilo son las lacasas, peroxidadas dependientes de manganeso (MnP), peroxidadas de lignina (LiP) y peroxidadas versátiles (VP) (Andlar *et al.*, 2018)

Por otro lado, la hidrólisis de la hemicelulosa requiere la acción concertada de varios mecanismos enzimáticos en los diferentes niveles de la matriz vegetal, debido a que la hemicelulosa se encuentra unida a los otros componentes de la pared celular (Andlar *et al.*, 2018). Para ello, deben actuar endoenzimas que corten internamente la estructura del polímero, exoenzimas encargadas de la liberación de azúcares monoméricos y por último enzimas asociadas que permiten la escisión de las cadenas laterales de los polímeros u oligosacáridos de forma que puedan liberarse los monosacáridos o disacáridos (Gurovic *et al.*, 2023).

En cuanto a la celulosa, las características de este polímero como su grado de polimerización, cristalinidad, tamaño de partícula y área superficial influyen en la eficiencia de la hidrólisis enzimática (Andlar *et al.*, 2018). Para ello, deben actuar tres conjuntos principales de enzimas. Las endoglucanasas, las exoglucanasas y las β -glucosidasas (Gurovic *et al.*, 2023). Las endoglucanasas atacan de manera aleatoria los enlaces β -1,4-glicosídicos de los sitios internos de la fibra de celulosa de forma que queden abiertos para la acción de las exoglucanasas (Sánchez, 2009). Las exoglucanasas actúan en los extremos de la cadena eliminando los dímeros (celobiosa) (Andlar *et al.*, 2018; Gurovic *et al.*, 2023). Por último, las β -glucosidasas hidrolizan los dímeros de glucosa o bien los oligosacáridos de celulosa a glucosa (Sánchez, 2009).

6.2.4 Métodos de identificación de hongos degradadores de celulosa

La etapa de cribado permite seleccionar cepas fúngicas aisladas que tengan una mayor producción y actividad de enzimas de interés, de forma que evidencien una alta degradación del sustrato lignocelulósico (Nadir *et al.*, 2019). Para ello, puede emplearse una estrategia de cribado, en donde en el cribado primario se seleccionan las cepas que presenten actividad celulítica y actividad enzimática oxidativa (Maza *et al.*, 2014).

6.2.5 Beneficios e implicaciones de la aplicación de hongos

Se ha observado que los hongos pueden mostrar diferentes patrones de degradación, así como mecanismos enzimáticos dependiendo del sustrato lignocelulósico empleado (Nurika *et al.*, 2020). En consecuencia, suele recomendarse el uso de un consorcio de hongos debido a que proporciona ventajas como la mejora en la actividad enzimática en cuanto a la mayor diversidad de enzimas y aumento de la expresión, los distintos metabolitos secundarios y un mejor aprovechamiento del sustrato (Cui *et al.*, 2021). Adicionalmente, factores como la cepa fúngica, humedad, aireación, pH, temperatura, los suplementos nutricionales y el tiempo de incubación pueden influir en la degradación del material (Nadir *et al.*, 2019).

El tratamiento de los residuos de la caña de azúcar con un consorcio fúngico permitiría, a largo plazo, que el suelo tenga una capa considerable de materia orgánica que disminuya la dependencia del uso de fertilizantes comerciales (Beary *et al.*, 2002). De la misma forma, permitiría un aumento en la fertilidad y porosidad del suelo favoreciendo un aumento en el rendimiento de los cultivos (Beary *et al.*, 2002).

7.1 Diseño, enfoque y tipo de investigación

El diseño experimental de la investigación es de naturaleza cuasi experimental no aleatorizado debido a que se tomará como variable dependiente la capacidad de degradación de material celulósico y la variable independiente está representada por las cepas de hongos seleccionadas previamente.

7.2 Población y muestra

7.2.1 Población

La población del estudio pertenece a un cepario de hongos obtenido de muestras de suelo del ingenio Magdalena. Las muestras fueron recolectadas y procesadas por la tesista Aouda Sánchez.

7.2.2 Muestra

Se estableció como muestra cuarenta y dos cepas de hongos aisladas previamente.

7.3 Criterios de inclusión y exclusión

Las cepas de hongos que presenten una reacción positiva con una fuerte actividad extracelular para el ensayo en placa de la producción de celulasas se analizarán en la etapa de fermentación en estado sólido y se cuantificará la actividad enzimática de las celulasas.

7.4 Variables

Cuadro 2

Definición de las variables de investigación

Variable	Definición conceptual	Naturaleza	Nivel de medición	Definición operacional
Actividad celulolítica	Conjunto de enzimas involucradas en la hidrólisis enzimática de la biomasa celulósica (Guo <i>et al.</i> , 2023).	Cualitativa	Nominal	Ensayos en placa para la identificación de cepas que presentan actividad celulolítica
Degradación de residuos vegetales	Fraccionamiento de los residuos celulósicos en sus componentes principales (Ajala <i>et al.</i> , 2021).	Cuantitativa	Razón	Porcentaje de pérdida de residuos sólidos en los desechos de cultivo de la caña de azúcar
Actividad enzimática de celulasas	Una unidad (U) de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que produce 1 umol de producto por minuto en condiciones de ensayo (Strahsburger <i>et al.</i> , 2017).	Cuantitativa	Razón	Determinación de la actividad enzimática de celulasas por medio de espectrofotometría UV-VIS

Nota. Elaboración propia.

7.5 Hipótesis

7.5.1 Hipótesis nula

Las muestras de hongos de suelo tienen la capacidad de degradar residuos celulósicos para incrementar el contenido de materia orgánica y nutrientes para el cultivo de la caña de azúcar.

7.5.2 Hipótesis alternativa

Las muestras de hongos de suelo no tienen la capacidad de degradar residuos celulósicos para incrementar el contenido de materia orgánica y nutrientes para el cultivo de la caña de azúcar.

7.6 Metodología

7.6.1 Resiembra de hongos

Se esterilizó previamente el área de trabajo. Con un asa estéril se tomó esporas de un trozo de algodón de un tubo Falcón que contenía la cepa de hongo preservada. Posteriormente, se sembraron

las esporas en placas de rosa de Bengala para crecer las cepas de hongos y se dejó incubando durante dos semanas. Transcurrido este tiempo se verificó el crecimiento de la cepa de interés y la ausencia de hongos contaminantes.

7.6.2 Detección de actividad celulósica

En el Protocolo estándar 1 (POE) se describe la metodología de la evaluación de actividad celulolítica para las cepas de hongos. Para ello, con un asa estéril se tomó esporas del hongo sembrado en una placa de Rosa de Bengala y se inoculó en agar de extracto de malta (MEA). Las placas se dejaron incubando durante ocho días a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se tomó un trozo de agar con micelio y se inoculó en agar CMC para determinar la actividad celulolítica. Dichas placas se incubaron durante 48 horas a temperatura ambiente y luego se tiñeron con una solución de Rojo Congo al 1% durante 15 minutos. Por último, se lavó la placa con una solución de NaCl 1M y se tomó la formación de un halo claro alrededor de la colonia como indicador de que la cepa produce celulasas. Los hongos que produjeron celulasas se utilizarán para los análisis posteriores.

7.6.3 Fermentación en estado sólido para evaluación de degradación de material vegetal

En el POE 2, se describe la metodología para la fermentación en estado sólido. En un frasco de vidrio, se inocularon 2g de heno estéril, con el micelio de las cepas de hongos seleccionadas en el análisis previo y se incluyó un control negativo sin inoculación. Se dejó fermentar durante 21 días a temperatura ambiente y en la oscuridad. Posterior a este tiempo, se recolectó el extracto enzimático obtenido y se utilizó para el ensayo de actividad enzimática con espectrofotometría UV-VIS. Por último, se determinó el porcentaje de pérdida de masa seca para cada una de las muestras inoculadas, el cual se calculó a partir de la diferencia entre masa seca en sustratos con, y sin inoculación.

7.6.4 Fermentación en estado líquido para evaluación de degradación de material vegetal

En el POE 2, se describe la metodología para la fermentación en estado líquido. En un frasco de vidrio, se inocularon 2g de heno estéril y 25 mL de caldo Saboraud, con el micelio de las cepas de hongos seleccionadas en el análisis previo y se incluyó un control negativo sin inoculación. Se dejó fermentar durante 21 días a temperatura ambiente y en la oscuridad. Posterior a este tiempo, se recolectó el extracto enzimático obtenido y se utilizó para el ensayo de actividad enzimática con espectrofotometría UV-VIS. Por último, se determinó el porcentaje de pérdida de masa seca para cada una de las muestras inoculadas, el cual se calculó a partir de la diferencia entre masa seca en sustratos con, y sin inoculación.

7.6.5 Determinación de la actividad enzimática de celulasas

En el POE 3 se detalla la metodología para la cuantificación de la actividad enzimática de las celulasas, específicamente endo- β -1,4-glucanasa y β -glucosidasa. Se analizó la actividad enzimática del filtrado líquido recuperado de la fermentación en estado sólido y líquido para cada una de las cepas fúngicas seleccionadas. Para ello, en el caso de la endo- β -1,4-glucanasa, se utilizó una metodología basada en la hidrólisis del sustrato artificial, CMC y los azúcares reductores producidos se cuantificaron por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) por espectrofotometría UV-VIS. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μ mol de azúcares reductores por minuto en las condiciones del ensayo. Por otro lado, en el caso de β -glucosidasa, la actividad enzimática se determinó a partir del p-nitrofenol liberado por la hidrólisis de p-nitro

fenil β -D-glucopiranosido (pNPG), cuya concentración se midió por espectrofotometría UV-VIS. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto en las condiciones del ensayo

7.6.6 Análisis de resultados

A partir del ensayo en placa se determinó la capacidad de las cepas fúngicas para la producción de celulasas. Las cepas con una reacción positiva con un fuerte halo extracelular se seleccionaron para evaluar su efecto en la degradación de residuos vegetales y a partir de ello se determinó la actividad enzimática de las celulasas de interés, así como la pérdida de masa seca. Dichos resultados se compararon entre cada cepa para identificar las que presentaron una mayor actividad celulósica con la capacidad de degradar el material residual vegetal.

8.1 Actividad celulolítica extracelular de las cepas de hongos

Se utilizó un método basado en la inoculación de cepas fúngicas en placas con agar CMC para evaluar la actividad celulolítica extracelular en las 41 cepas de hongos analizadas. La actividad se determinó según el tamaño del halo extracelular observado, clasificándose los resultados de la siguiente manera: un halo extracelular con radio de 0.1 a 0.3 cm se consideró positivo (+); un halo con radio de 0.3 a 0.5 cm, doble positivo (++); y un halo con radio mayor a 0.5 cm, triple positivo (+++). La ausencia de halo se interpretó como un resultado negativo (-).

Cuadro 3

Cribado de actividad celulolítica en medio sólido con carboximetilcelulosa

Cepa	Especie	Zona clarificada
1CA10	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	+++
1CA11	<i>Penicillium pimiteouiense</i>	+++
1CA13	<i>Setophaeosphaeria badalingensis</i>	+++
1CA14	<i>Cladosporium asperulatum</i>	+++
4AB9	<i>Neopyrenochaeta chiangraiensis</i>	+++
2AB28	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	+++
4AP14	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	+++
1BP24	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	+++
3BP21	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	+++
3BP23	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	+++
3BP26	NI	+++
4MO17	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	+++
5MO18	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	+++
6MO10	<i>Setophaeosphaeria badalingensis</i>	+++
2AB23	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	++
3AB10	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	++
3AP28	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	++
1BP25	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	++
2BP18	<i>Neopyrenochaeta triseptatispora</i>	++
3BP19	<i>Setophaeosphaeria badalingensis</i>	++
3BP22	<i>Pleosporales sp</i>	++
3BP25	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	++
1MO28	<i>Talaromyces funiculosus</i>	++
1MO32	<i>Setophaeosphaeria badalingensis</i>	++
4MO14	NI	++
6MO12	NI	++
1AP30	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	+
4BP13	<i>Setophaeosphaeria badalingensis</i>	+
3BP18	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	+
3BP24	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	+
1MO31	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	+
4MO12	<i>Setophaeosphaeria sidae</i>	+
4MO13	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	+
5MO17	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	+
5MO19	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	+
5MO20	<i>Bjerkandera adusta</i>	+
4AB8	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	-
2AB21	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-
1MO29	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	-
1MO34	NI	-
5MO16	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i>	-

Nota. NI: No identificada
Elaboración propia.

El Cuadro 3 muestra que, de las cuarenta y un cepas evaluadas, cinco cepas tuvieron un resultado negativo (-) y treinta y seis cepas presentaron un resultado positivo para la producción de celulasas. De estas cepas, diez presentaron una reacción positiva con un radio entre 0.1 y 0.3 cm (+), doce tuvieron una reacción positiva con un radio mayor a 0.3 y menor a 0.55 cm (++) y

catorce presentaron una reacción positiva con un tamaño mayor a 0.55 cm (+++) para el radio del halo extracelular. Estas catorce cepas fueron las que presentaron una mayor actividad celulolítica extracelular en comparación con el resto de las cepas fúngicas.

A partir de estos resultados se evidencia que las cepas con alta actividad extracelular celulolítica pertenecen a seis especies diferentes. Las cepas 1CA10, 4AP14, 1BP24, 3BP21, 4MO17 y 5MO18 pertenecen a la especie *Setophaeosphaeria hemerocallids*; las cepas 1CA13 y 6MO10 pertenecen a la especie *Setophaeosphaeria badalingensis*; las cepas 2AB28 y 3BP23 pertenecen a la especie *Cladosporium cladosporioides* y las cepas 1CA11, 1CA14 y 4AB9, pertenecen a las especies *Penicillium pimateouiense*, *Cladosporium sperulatum* y *Neopyrenochaeta changraiensis*, respectivamente. A su vez, este análisis permitió seleccionar a las catorce cepas que presentaron una alta actividad celulolítica extracelular para evaluar el efecto de su inoculación en la degradación del heno y cuantificar la actividad enzimática de las celulasas de interés producidas por dichas cepas.

8.2 Evaluación del efecto del tratamiento fúngico en la degradación de residuos celulósicos

8.2.1 Fermentación en estado sólido

Se evaluó el efecto de la inoculación de las 14 cepas de hongos que presentaron un halo con radio mayor a 0.5 cm, debido a que esto indicaba una mayor producción de celulasas por parte de dichas cepas. Para ello, se empleó como sustrato el heno para llevar a cabo una fermentación en estado sólido, ya que el heno contiene un porcentaje considerable de celulosa equivalente al 20-30 % de su peso seco.

Figura 4

Crecimiento de hongos filamentosos en heno como sustrato celulósico en fermentación en estado sólido.



*Nota. A. 6MO10. B. 5MO18. C. 4AB9. D. 3BP23. E. 1CA13. F. 1CA14. G. 1CA11. H. 3BP21. I. 1BP24. J. 4AP14. K. 3BP26. L. 1CA10. M. 2AB28. N. 4MO17. Ñ. Control negativo
Elaboración propia.*

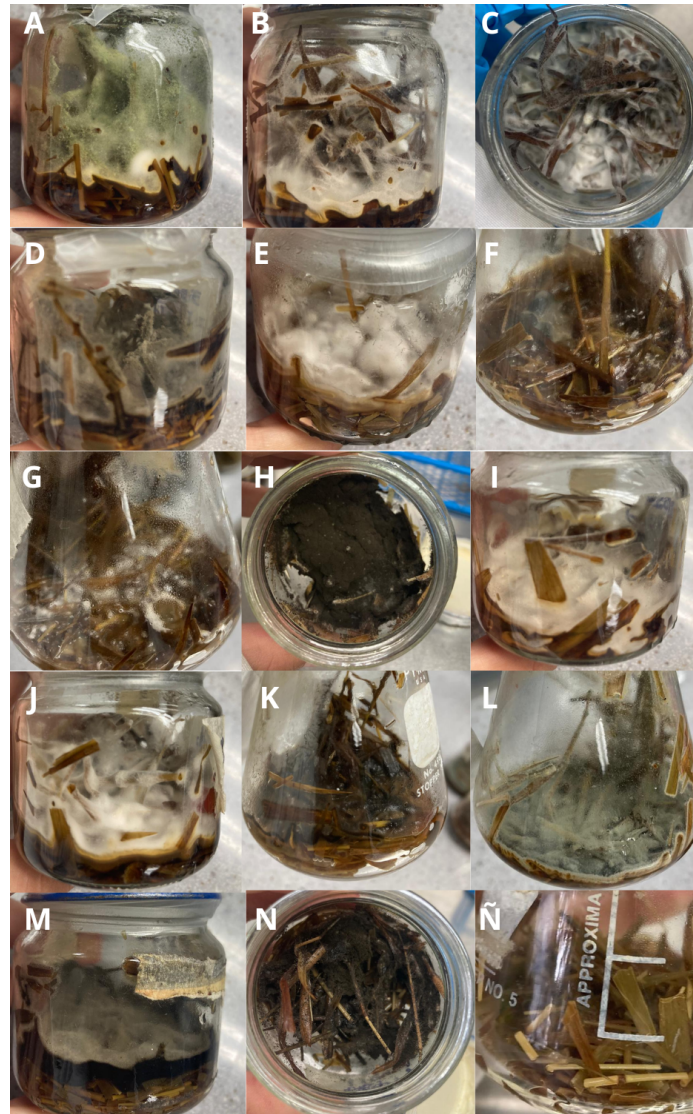
La *Figura 4* corresponde a los resultados del proceso de fermentación en estado sólido, en donde se muestra el crecimiento de los hongos después de tres semanas de incubación en el heno, excepto para las cepas 1CA10, 3BP26 y 2AB28 que tienen diez días de incubación. Se evidenció que todas las cepas lograron crecer en el heno, pero mostraron diferencias en la cantidad de sustrato colonizado, ya que cepas como 6MO10 y 3BP23 presentaron una mayor masa micelial en comparación de cepas como 1CA13. Se incluyó un control negativo en el que se evidencia la ausencia de crecimiento micelial. Asimismo, cabe destacar que no se registraron cambios en la apariencia física del heno como color.

8.2.2 Fermentación en estado líquido

Asimismo se evaluó el efecto de la inoculación de los 14 hongos con la mayor actividad extracelular celulolítica realizando una fermentación en estado líquido, empleando como sustrato el heno y se agregó caldo Saboraud como aditivo nutritivo.

Figura 5

Crecimiento de hongos filamentosos en heno como sustrato celulósico en fermentación en estado líquido.



*Nota. A. 6MO10. B. 5MO18. C. 4AB9. D. 3BP23. E. 1CA13. F. 1CA14. G. 1CA11. H. 3BP21. I. 1BP24. J. 4AP14. K. 3BP26. L. 1CA10. M. 2AB28. N. 4MO17. Ñ. Control negativo
Elaboración propia.*

La *Figura 5* corresponde a los resultados de la fermentación en estado líquido, por lo que muestra el crecimiento de los hongos después de tres semanas de incubación, excepto para las cepas 1CA10, 3BP26, 1CA14 y 1CA11 que tienen 10 días de incubación. Se evidencia un mayor crecimiento miceliar y producción de esporas, en comparación con la fermentación en estado sólido, excepto para las cepa 1CA11 y 1CA14.

8.2.3 Utilización del heno como sustrato celulósico

Para evaluar el grado de degradación, como resultado del tratamiento fúngico, se determinó el porcentaje de pérdida de masa seca del heno, atribuible a la utilización de este sustrato celulósico como fuente de carbono por parte de los hongos en fermentaciones en estado sólido y líquido.

Cuadro 4: Porcentaje de pérdida de masa seca del heno inoculado con hongos filamentosos con alta actividad celulolítica extracelular

Cepa	Especie	Fermentación en estado sólido (%)	Fermentación en estado líquido (%)
4MO17	<i>S.hemerocallidis</i>	25.43	10.43
3BP23	<i>C.cladosporioides</i>	24.00	12.21
6MO10	<i>S.badalingensis</i>	23.53	13.69
4AB9	<i>N.chiangraiensis</i>	22.32	9.96
5MO18	<i>S.hemerocallidis</i>	20.24	11.20
4AP14	<i>S.hemerocallidis</i>	24.28	11.96
1CA14	<i>C.asperulatum</i>	24.44	25.24
1CA13	<i>S.badalingensis</i>	20.36	12.12
1CA11	<i>P.pimiteouiense</i>	21.86	18.41
1BP24	<i>S.hemerocallidis</i>	28.32	16.51
3BP21	<i>S.hemerocallidis</i>	22.55	11.14
2AB28	<i>C.cladosporioides</i>	25.12	5.84
1CA10	<i>S.hemerocallidis</i>	22.56	12.07
3BP26	NI	17.92	15.43
C-	No aplica	20.84	2.49

Nota. C-: Control negativo. NI: No identificada. Fuente: Elaboración propia.

El *Cuadro 4* presenta el porcentaje de pérdida de masa seca del heno con respecto a la masa inicial del sustrato. A partir de esto, se evidencia que en la fermentación en estado sólido el control negativo presentó una pérdida de masa y todos los hongos presentaron un porcentaje superior a este, excepto para las cepas 5MO18, 1CA13 y 3BP26. En el caso, de la fermentación en estado líquido, se evidencia que el tratamiento del heno con todas las cepas fúngicas condujo a una pérdida de masa superior al control negativo.

8.3 Determinación de la actividad enzimática de celulasas fúngicas

La cuantificación de la actividad enzimática de celulasas fúngicas de interés, específicamente de endo- β -1,4 glucanasa y β -glucosidasa, permitió evaluar el papel de los hongos aislados del suelo en la utilización del heno como sustrato celulósico.

8.3.1 Cuantificación de actividad enzimática de endo- β -1,4 glucanasa fúngica producida en fermentación en estado sólido y líquido

Cuadro 5: Actividad enzimática de endo- β -1,4 glucanasa producida por cepas fúngicas cultivadas en fermentación en estado sólido y líquido

Cepa fúngica	Fermentación estado sólido (U/g sustrato)	Desviación estándar(σ)	Fermentación estado líquido (U/g sustrato)	Desviación estándar(σ)
4MO17	2.12	0.16	2.25	0.01
3BP23	1.47	0.20	4.89	0.17
6MO10	3.30	0.59	2.32	0.07
4AB9	0.47	0.16	1.08	0.23
5MO18	0.89	0.21	0.85	0.56
4AP14	1.19	0.28	0.79	0.28
1CA14	2.03	0.18	ND	ND
1CA13	0.23	0.05	5.83	0.76
1CA11	2.55	0.94	1.14	0.38
1BP24	1.09	0.12	0.40	0.27
3BP21	3.22	0.27	7.88	0.49
2AB28	0.20	0.05	0.24	0.12
1CA10	1.63	0.52	6.14	0.39
3BP26	0.21	0.10	ND	ND

Nota. ND: no se logró determinar bajo las condiciones de ensayo. El límite de detección corresponde a 0.2 mg/mL de glucosa. Elaboración propia.

En el Cuadro 5, se presenta la cuantificación de la actividad enzimática para la endo- β -1,4 glucanasa recuperada del extracto de la fermentación en estado sólido y líquido. Dicha cuantificación se realizó de acuerdo con el método DNS, para detectar los azúcares reductores resultantes de la degradación de la carboximetilcelulosa (CMC) empleada como sustrato específico para dicha enzima.

Se observa que las cepas 6MO10 y 3BP21 presentaron la actividad enzimática más alta en la fermentación en estado sólido. Por otro lado, en la fermentación en estado líquido la actividad enzimática más alta la presentaron las cepas 3BP21, 1CA10 y 1CA13. La cepa 2AB28 presentó la actividad enzimática más baja para ambas condiciones de cultivo. Por otro lado, se evidenció que para las cepas 4MO17, 3BP23, 4AB9, 1CA13, 2AB28, 1CA10 y 3BP21, la actividad enzimática para la endo- β -1,4-glucanasa fue más alta en la fermentación en estado líquido. En cambio, para las cepas 6MO10, 5MO18, 4AP14, 1CA11 y 1BP24, la actividad enzimática fue más alta en la fermentación en estado sólido. Para las cepas 1CA14 y 3BP26 únicamente se logró detectar actividad enzimática en la fermentación en estado sólido.

8.3.2 Cuantificación de actividad enzimática de β -glucosidasa fúngica producida en fermentación en estado sólido y líquido

Cuadro 6: Actividad enzimática de β -glucosidasa producida por cepas fúngicas cultivadas en fermentación en estado sólido y líquido

Cepa fúngica	Fermentación estado sólido (U/g sustrato)	Desviación estándar(σ)	Fermentación estado líquido (U/g sustrato)	Desviación estándar(σ)
4MO17	2.55	0.25	65.90	9.80
3BP23	14.84	2.19	125.62	1.00
6MO10	25.44	5.27	8.19	1.14
4AB9	9.13	2.35	14.40	0.46
5MO18	8.22	0.66	8.11	1.84
4AP14	6.41	1.55	8.39	0.39
1CA14	30.48	1.29	1.10	2.01
1CA13	2.15	1.45	ND	ND
1CA11	31.66	2.11	4.06	1.84
1BP24	5.26	0.82	ND	ND
3BP21	64.11	4.44	131.66	0.19
2AB28	8.47	1.78	103.13	0.82
1CA10	19.15	2.04	98.35	0.17
3BP26	9.07	1.23	86.95	0.72

Nota. ND: no se logró determinar bajo las condiciones de ensayo. El límite de detección corresponde a 0.2 mg/mL de p-nitrofenol.

Elaboración propia.

En el *Cuadro 6*, se presenta la cuantificación de la actividad enzimática para β -glucosidasa recuperada del extracto de la fermentación en estado sólido y líquido. Para ello, se realizó la cuantificación del producto p-nitrofenol (pNP) resultante de la degradación del sustrato pNPG p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido por parte de la β -glucosidasa.

Se evidenció que la cepa 3BP21 presentó la actividad enzimática más alta tanto para la fermentación en estado sólido como en estado líquido. Asimismo, se observó que las cepas 4MO17, 3BP23, 4AB9, 4AP14, 3BP21, 2AB28, 1CA10 y 3BP26 presentaron una mayor actividad enzimática en la fermentación en estado líquido. Por el contrario, las cepas 6MO10, 5MO18, 1CA14 y 1CA11 presentaron una mejor actividad enzimática en la fermentación en estado sólido. En el caso de las cepas 1CA13 y 1BP24 únicamente se detectó actividad enzimática en la fermentación en estado sólido.

8.4 Propuesta de formulación de hongos para mejorar la degradación de residuos celulósicos postcosecha del cultivo de caña de azúcar

En el *Cuadro 7* se muestran las propuestas de formulación de hongos para mejorar la degradación de material celulósico resultante de la cosecha de la caña de azúcar. Estas formulaciones se propusieron con base a las cepas que presentaron una alta actividad enzimática para β -glucosidasa y/o endo- β -1,4-gluconasa en la fermentación en estado sólido. Las primera propuesta contienen 3 especies distintas de hongos, mientras que la segunda propuesta contiene 5 especies diferentes de hongos. De acuerdo con los resultados reportados previamente, las cepas 1CA11, 1CA14 y 1CA10 no son antagonicas, mientras que para las cepas 3BP21, 6MO10 y 3BP23 no se ha determinado su

antagonismo (Vela, 2023).

Cuadro 7: Propuesta de formulación de hongos para la degradación de residuos celulósicos

No	Cepa fúngica	Especie
1	1CA10, 1CA11, 1CA14	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i> , <i>Penicillium pimateouiense</i> , <i>Cladosporium asperulatum</i>
2	3BP21, 1CA11, 1CA14, 6MO10, 3BP23	<i>Setophaeosphaeria hemerocallidis</i> , <i>Penicillium pimateouiense</i> , <i>Cladosporium asperulatum</i> , <i>Setophaeosphaeria badalingensis</i> , <i>Cladosporium cladosporioides</i>

Nota. Elaboración propia.

Análisis de resultados

En el presente estudio se tenía como objetivo identificar cepas de hongos con capacidad de degradación de material vegetal para el cultivo de la caña de azúcar. Dicha investigación se realizó mediante ensayos microbiológicos *in vitro*, una evaluación de la degradación de residuos celulósicos y la cuantificación de la actividad enzimática de celulasas de interés (endo- β -1,4 glucanasa y β -glucosidasa) por su relación con la degradación con residuos agrícolas.

En primer lugar, se identificaron las cepas de hongos que presentaban actividad de celulasa extracelular por medio del cultivo en agar de carboximetilcelulosa (CMC). A partir de esto, se encontró que, de 41 cepas evaluadas, 36 de ellas presentaron un resultado positivo (*ver Cuadro 3*), indicando que estas cepas fúngicas pueden utilizar la celulosa como fuente de carbono (Bentil *et al.*, 2018). De estas 36 cepas, catorce presentaron un halo extracelular con un radio de halo mayor a 0.55 cm; 12 cepas presentaron un radio de halo entre 0.55 y 0.3 cm y 10 cepas presentaron un radio de halo menor a 0.3 cm (*ver Cuadro 3*). La detección se logró gracias a la tinción con el colorante Rojo Congo, el cual evidencia las regiones de la placa de cultivo en donde el CMC estuvo expuesto a la actividad celulolítica, de forma que las áreas expuestas a la celulosa aparecen como halos claros que rodean la fuente de la enzima (Johnsen y Krause, 2014).

Es importante mencionar que se logró identificar hongos productores de celulasas provenientes de todos los puntos de muestreo del suelo del Ingenio Magdalena en áreas de alta productividad (AP), baja productividad (BP), áreas boscosas (AB), caña con áreas anegadas (CA), así como áreas con mayor contenido de materia orgánica (MO). Esto refleja el potencial de utilizar hongos autóctonos para la degradación de residuos agrícolas celulósicos para así evitar la introducción de hongos exóticos a los campos de cultivo y también permitiendo que sean una alternativa a la quema o descarte de los residuos de la cosecha (Maza *et al.*, 2013).

Un punto a destacar es que se esperaba una mayor abundancia de organismos celulolíticos en las áreas boscosas y de contenido de materia orgánica, ya que son factores que favorecen la presencia de estos organismos especializados (Kalntremtziou *et al.*, 2023). Sin embargo, de acuerdo con los resultados presentados en el *Cuadro 3*, se evidenció que algunas de las cepas provenientes de áreas boscosas (4AB8 y 2AB21) no presentaron actividad enzimática así como cepas provenientes de áreas con alto contenido de materia orgánica (1MO31, 4MO12, 4MO13, 5MO17, 5MO19, 5MO20, 1MO29, 1MO34 y 5MO16) presentaron una baja o nula actividad celulolítica extracelular.

Sorprendentemente, se encontró que todas las cepas aisladas en puntos de muestreo de caña con áreas anegadas presentaron una alta actividad extracelular celulolítica. Estas zonas se caracterizan por presentar una saturación de agua en el suelo, en donde la presencia de bacterias anaeróbicas, podría contribuir a una mayor degradación de la materia orgánica (Kozłowski y Pallardy, 1997). Asimismo, el estrés abiótico presente en estas áreas podría contribuir a la selección de organismos capaces de degradar celulosa (Soares *et al.*, 2012). Sin embargo, se recomienda realizar un estudio más profundo sobre la correlación entre las condiciones fisicoquímicas y ambientales del suelo y la abundancia de hongos que degradan celulosa, para comprender mejor qué factores influyen en una mayor abundancia de los hongos especializados en la degradación de celulosa.

De la misma forma, hay que resaltar que se encontró que las diferentes especies así como las cepas de una misma especie variaron en su capacidad de degradación de celulosa. Esto concuerda con lo reportado en estudios anteriores, ya que se ha observado que las actividades enzimáticas de los hongos varían entre géneros y especies así como también entre las cepas individuales de cada especie (Eida *et al.*, 2011). La variación entre cepas individuales pudo estar influida por el lugar de aislamiento, factor que incide en la producción de enzimas (Eida *et al.*, 2011). Lo anterior, se evidencia en los resultados obtenidos para las cepas de la especie *S.hemerocallidis*, en donde las cepas provenientes de lugares de caña con áreas anegadas (1CA14) presentaron una alta actividad extracelular celulolítica, en cambio, las cepas provenientes de áreas boscosas (2AB23 Y 3AB10) presentaron una menor actividad extracelular.

En cuanto a las especies de hongos que tuvieron un resultado positivo para la producción de celulasas corresponden a las especies *S. hemerocallidis*, *P.pimiteouiense*, *S. badalingensis*, *Pleosporales sp.*, *C. asperulatum*, *N. chiangraiensis*, *C.cladosporioides*, *N.triseptatispora*, *C.pseudocladosporioides*, *T. funiculosus*, *S. sidae* y *B. adusta*. Las cepas con alta actividad extracelular celulolítica pertenecen a las especies *S. hemerocallidis*, *P. pimiteouiense*, *S.badalingensis*, *C. asperulatum*, *N. chiangraiensis* y *C. cladosporioides*. Esto concuerda con lo reportado por estudios previos para cepas de las especies *P. pimiteouiense* (Zhang *et al.*, 2019), *C. cladosporioides* (Srivastava *et al.*, 2020), *Pleosporales sp.* (Lee *et al.*, 2019), *C. pseudocladosporioides* (Civzele y Mezule, 2024), *T. funiculosus* (Syrchin *et al.*, 2023) y por último la especie *B. adusta*, un hongo que pertenece al grupo de podredumbre blanca, los cuales se caracterizan por ser descomponedores de biomasa lignocelulósica en los ecosistemas naturales (Santos *et al.*, 2021).

En cambio para las especies *S. hemerocallidis*, *S. badalingensis*, *N. chiangraiensis*, *S. sidae*, *C. asperulatum* y *N. triseptatispora* no se cuentan con antecedentes que reporten la producción de celulasas. Por ello, estos resultados representan un precedente importante para futuros estudios, ya que ocho cepas pertenecientes al género *Setophaeosphaeria* presentaron alta actividad extracelular, especie que no se había reportado previamente como potencial degradadora de celulosa.

Para determinar la capacidad de utilización de sustratos celulósicos por parte de hongos filamentosos, se seleccionaron las catorce cepas fúngicas que presentaron alta actividad celulolítica extracelular en el ensayo microbiológico con agar CMC, de acuerdo con el tamaño del halo extracelular (*ver Cuadro 3*). Para ello, se evaluó el efecto de la inoculación de las cepas fúngicas empleando como sustrato celulósico el heno, y se realizó una fermentación en estado sólido y en estado líquido como métodos de cultivo. La fermentación en estado sólido es un proceso en el que los microorganismos crecen en un ambiente sin agua o con muy bajo contenido de agua libre. Esto imita el hábitat natural de la mayoría de los microorganismos (principalmente hongos y moho) (Soccol *et al.*, 2017). Por otro lado, la fermentación en estado líquido es un método que requiere el cultivo microbiano en un sustrato continuo en fase líquida que contenga más del 95 % de humedad (Aidoo *et al.*, 2023).

La realización del proceso de fermentación del heno para ambos métodos de cultivo tenía dos objetivos principales. Uno de ellos, consistía en identificar el porcentaje de pérdida de masa seca para cada tipo de fermentación y para cada una de las cepas fúngicas. Dicho porcentaje es relevante para el estudio ya que refleja la utilización de la celulosa contenida en el heno por parte de los hongos analizados. El segundo objetivo se basó en la cuantificación de la actividad enzimática de celulasas

(endo- β -1,4 glucanasa y β -glucosidasa) que pudieran ser recuperadas en el extracto enzimático crudo obtenido de la fermentación. Ambas celulasas son importantes ya que están involucradas en el proceso de degradación de este polisacárido y su presencia evidencia que los hongos cuentan con el perfil enzimático completo para emplear la celulosa como fuente de carbono (De Oliveira Rodrigues *et al.*, 2019). Ambos análisis experimentales contribuirían a evaluar la capacidad de utilización de la celulosa por parte de hongos filamentosos aislados de suelo.

Tomando en cuenta lo anterior, se esperaba que el tratamiento fúngico del heno permitiera identificar una pérdida de masa considerable del sustrato y se detectará una actividad enzimática alta para ambas celulasas en los hongos analizados. Asimismo, se esperaban mejores resultados en la fermentación en estado sólido. Pero también se quería determinar si la adición del caldo nutritivo en estado líquido incrementaría la colonización del sustrato por los hongos. Lo anterior se atribuye a que si bien el método de cultivo en estado sólido simula de mejor manera el hábitat natural de los hongos y las celulasas producidas tienen una mejor eficiencia de hidrólisis (Yoon, *et al.*, 2014), la presencia de un caldo nutritivo con una fuente de nitrógeno es un factor que influye en la producción de biomasa (Yoon, *et al.*, 2014).

A partir de esto, se identificó que todos los hongos evaluados lograron crecer en un sustrato celulósico como el heno para ambos métodos de cultivo, pero existen diferencias en la cantidad de sustrato colonizado entre las diferentes cepas evaluadas (*ver Figura 4 y 5*). Lo anterior, se puede atribuir al hecho de que la tasa de degradación y la tasa de crecimiento de las hifas sea inherente a la cepa fúngica por lo que algunas cepas requieren un mayor tiempo para lograr una colonización completa (Kuribayashi *et al.*, 2023). Por otro lado, es importante mencionar que se evidenció una mayor colonización del sustrato en la fermentación en estado líquido en donde se empleó caldo Saboraud como aditivo nutritivo (*ver Figura 5*). Esto puede atribuirse a que la peptona presente en el caldo Saboraud, representa una fuente de nitrógeno, la cual juega un papel importante en la producción de biomasa fúngica (Yoon *et al.*, 2014b).

Por otro lado, el porcentaje de humedad es un factor que pudo haber influido en el crecimiento microbiano durante la fermentación en estado sólido, ya que una humedad adecuada es esencial para el desarrollo de los microorganismos (Singh *et al.*, 2021). No obstante, en este estudio no se registró el nivel de humedad del sustrato durante el proceso de fermentación, por lo que se desconoce el contenido inicial de humedad del heno. Esta falta de control en la humedad pudo haber afectado negativamente el proceso: una humedad insuficiente puede limitar la solubilidad de los nutrientes y dificultar su absorción por parte de los hongos, mientras que un exceso de humedad puede incrementar el riesgo de contaminación (Yoon *et al.*, 2014). Estudios previos han empleado un contenido inicial de humedad del 80% en la fermentación en estado sólido de bagazo de caña de azúcar (Maza *et al.*, 2013) y rastrojo de maíz (Panagiotou *et al.*, 2003). Por lo tanto, se recomienda asegurar que el sustrato empleado alcance el nivel óptimo de humedad para favorecer el crecimiento de los microorganismos.

De acuerdo con lo mencionado anteriormente, la utilización del heno como sustrato celulósico por parte de los hongos, se evaluó con relación a la pérdida de masa seca de dicho sustrato, después del proceso de fermentación. Esto debido a que se esperaba que los hongos que se seleccionaron con base en su alta actividad celulolítica extracelular fueran capaces de emplear la celulosa presente en el heno como fuente de carbono, logrando un porcentaje significativo de pérdida de masa seca (Bentil *et al.*, 2018). Esto sería un indicador que dichos hongos tendrían el potencial de utilizar la celulosa presente en los residuos postcosecha del cultivo de la caña de azúcar y convertirla en nutrientes valiosos para el suelo. A partir de esto, se evidenció una pérdida de masa seca para todas las cepas evaluadas tanto en la fermentación en estado sólido como líquido (*ver Cuadro 4*).

La pérdida de masa seca concuerda con lo esperado, ya que durante el proceso de degradación, el carbono orgánico se convierte en dióxido de carbono y energía como productos finales metabólicos (Kausar *et al.*, 2010). En el caso de la fermentación en estado sólido, la pérdida de masa seca se encontró en un rango de 18-28%, en donde el mayor porcentaje de pérdida de masa lo tuvo la cepa

1BP24 y el menor la cepa 3BP26. Sin embargo, es importante mencionar que se encontró una pérdida de masa para el control negativo equivalente al 20.84 %, en donde dicho porcentaje fue mayor en comparación con algunas de las cepas como 3BP26, 5MO18 y 1CA13. Esto podría atribuirse a que el heno empleado como inóculo para dicha muestra haya contado con un porcentaje de humedad, en donde el contenido de agua inicial se perdió como resultado del proceso de secado. Esto se debe a que se ha reportado un porcentaje de humedad para el heno que se encuentra entre 15-18 % (Gay, *et al.*, 2003). Por otro lado, en la fermentación en estado líquido se evidenció un porcentaje de pérdida de masa seca para todas las cepas fúngicas evaluadas, en un rango de 6-25 %, cuyo porcentaje fue mayor en comparación con el control negativo, cuya pérdida de masa seca fue equivalente a 2.49 %. Para este tratamiento, el mayor porcentaje de pérdida de masa seca lo tuvo la cepa 1CA14 y el menor porcentaje la cepa 2AB28.

Los porcentajes de degradación obtenidos fueron similares a los reportados en otros estudios. En una investigación realizada por Maza y otros (2013), durante la fermentación en estado sólido, se reportó una pérdida de masa seca de entre el 20-30 % para las especies *Bjerkandera sp.* y *Phanerochaete sp.*, los cuales son hongos de podredumbre blanca. Por otro lado, para las especies *Hypocrea nigricans* y *Myrothecium sp.* se alcanzó un porcentaje de pérdida de masa seca equivalente al 10 %, mientras que para hongos como *Pleurotus sp.* no logró detectarse una pérdida de masa seca después de 14 días de incubación en la fermentación en estado sólido (Maza, *et al.*, 2013).

No obstante, un punto importante a resaltar es que se observó que el porcentaje de pérdida de masa seca para los controles negativos de ambas fermentaciones varió considerablemente, en donde el control negativo para la fermentación en estado sólido perdió diez veces la cantidad de masa en comparación con el control de la fermentación en estado líquido. Esto podría reflejar un desbalance en el porcentaje de humedad del heno inicial y/o final, lo cual pudo haber influido significativamente en la exactitud del porcentaje de pérdida de masa seca reportado para cada una de las muestras como resultado del tratamiento fúngico. Considerando esto, se recomienda que para futuras experimentaciones, se determine el porcentaje de humedad inicial del sustrato celulósico empleado y se ajuste la humedad de todas las muestras a un porcentaje previamente establecido y que haya sido identificado como óptimo de acuerdo con lo realizado en otros estudios (Maza *et al.*, 2013; Panagiotou *et al.*, 2003). Asimismo, se aconseja que posterior al proceso de secado se mida el porcentaje de humedad de cada una de las muestras para que todas sean ajustadas al mismo valor.

Considerando los resultados anteriores, no se puede confirmar con exactitud que el porcentaje de pérdida de masa seca corresponda a la utilización de la celulosa como fuente de carbono contenida en el heno, bajo las condiciones de ensayo, considerando la posible variación en el porcentaje de humedad. Por ello, se recomienda que la degradación del sustrato sea analizada directamente como el contenido de celulosa residual con respecto al contenido inicial de este polisacárido. Lo anterior ha sido realizado en otros estudios en donde se ha empleado el método de la fibra detergente neutra (FDN) y la fibra detergente ácida (FDA) (Kausar *et al.*, 2010) o el método Goering-Van Soest (Kerem *et al.*, 1992) para determinar el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina. Esto se atribuye a que si bien la celulosa representa uno de los polímeros más abundantes, en donde representa el 20-30 % del peso total del heno, existen otros polisacáridos estructurales en menor cantidad como la hemicelulosa y lignina u otros componentes como la ceniza que forman parte del peso total del heno (Cornell Waste Management Institute, 1996). Sin embargo, hay que tener en cuenta que dichos métodos son complejos por lo que, requieren equipo especializado para la filtración de la muestra y el uso de una cantidad considerable de reactivos específicos como amilasa resistente al calor (Van Soest *et al.*, 1991). Por esta razón, el análisis de una gran cantidad de muestras podría ser costoso y requerir una cantidad considerable de tiempo.

A partir de lo anterior, se ha reportado una reducción del 5-12 % en el contenido de celulosa después de 15 días de incubación para aislamientos fúngicos de paja de arroz y suelos descompuestos de granjas lecheras y caprinas y campos de arroz (Kausar *et al.*, 2010). De la misma forma, se han encontrado porcentajes de degradación de celulosa más altos para especies de hongos de podredumbre blanca, alcanzando una degradación de celulosa del 70 % para *Phanerochaete chrysosporium* y del

30% para *Pleurotus ostreatus* después de 30 días de incubación (Kerem *et al.*, 1992). No obstante, también es necesario considerar que podría requerirse un mayor tiempo de incubación para alcanzar una degradación significativa del sustrato. Dicho tiempo será variable para cada una de las cepas, debido a que los hongos actúan de manera diferente en la degradación de sustratos lignocelulósicos con relación al patrón de descomposición de los polisacáridos y los cambios estructurales de los sustratos degradados (Yoon *et al.*, 2014).

Como parte de esta investigación, también se recuperó el extracto enzimático crudo resultante de la fermentación en estado sólido y líquido y se cuantificó la actividad enzimática para endo- β -1,4 glucanasa y β -glucosidasa. Es importante mencionar que los resultados reportados se basan en la actividad enzimática medida a partir de las celulasas recuperadas después de tres semanas de incubación. El estudio se basó en dichas enzimas extracelulares debido a que forman parte del complejo catalítico de celulasas necesarias para hidrolizar la celulosa de sustratos celulósicos en azúcares simples, por lo que forman parte del proceso de biodegradación de residuos celulósicos (Eida *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2021). Dicha cuantificación se realizó para identificar especies de hongos que puedan ser beneficiosas para mejorar el proceso de biodegradación de materiales celulósicos como lo son los residuos postcosecha de la caña de azúcar. De esto, se esperaba identificar a los hongos que presentaran una alta actividad enzimática para ambas celulasas, debido a que esto representa un indicador de su capacidad para utilizar la celulosa presente en los residuos (Eida *et al.*, 2011). Asimismo, de acuerdo con lo mencionado anteriormente, se esperaba que las enzimas recuperadas de la fermentación en estado sólido presentarán una mayor actividad enzimática en comparación con las recuperadas de la fermentación en estado líquido (Yoon *et al.*, 2014).

En cuanto a la enzima endo- β -1,4 glucanasa se empleó el método DNS, el cual permite cuantificar la concentración de azúcares reductores solubles como resultado de la degradación de una fuente de celulosa artificial como el CMC (Wood & Bhat, 1988). De acuerdo con los resultados, se detectó actividad enzimática para todas las cepas (*ver Cuadro 5*) indicando que las cepas son capaces de producir dicha enzima y por lo tanto llevar a cabo la hidrólisis de un derivado de la celulosa a azúcares bajo las condiciones de ensayo de este estudio. La endo- β -1,4-glucanasa es fundamental en la degradación de la celulosa, ya que realiza la hidrólisis primaria del polímero. Su acción consiste en romper los enlaces glucosídicos internos de la cadena celulósica, lo que reduce su longitud y genera nuevos extremos libres. Esto facilita la acción posterior de otras enzimas celulolíticas (Singh *et al.*, 2021). Es importante mencionar que se obtuvieron valores relativamente bajos para la actividad enzimática de endo- β -1,4 glucanasa para ambos métodos de cultivo (*ver Cuadro 5*), en comparación con lo reportado en la literatura. Un estudio realizado por Maza y otros (2014) en el que se emplearon hongos aislados de campos de cultivo de caña de azúcar, se evidenció una actividad enzimática para endo- β -1,4 glucanasa en un rango de 100-500 U/g de sustrato para la fermentación en estado sólido y una actividad en un rango de 5-16 U/g para la fermentación en estado líquido (Maza *et al.*, 2014).

Para la fermentación en estado sólido realizada en el presente trabajo, la actividad más alta de endo- β -1,4 glucanasa la presentó la cepa 6MO10, seguida de la cepa 3BP21, 1CA11, 4MO17, 1CA14, 1CA10, 3BP23, 4AP14, 1BP24, 5MO18, 4AB9, 1CA13, 3BP26 y 2AB28. En cuanto a la fermentación en estado líquido, la actividad más alta la presentó la cepa 3BP21, seguida de 1CA10, 1CA13, 3BP23, 6MO10, 4MO17, 1CA11, 4AB9, 5MO18, 4AP14, 1BP24 y 2AB28. En cambio, para las cepas 3BP26 y 1CA14 no se logró detectar la actividad enzimática bajo las condiciones de ensayo, cuyo límite de detección equivale a 0.1 mg/mL de glucosa. Esto pudo atribuirse al menor crecimiento que presentaron estas cepas, ya que el crecimiento de los hongos tiene relación con la productividad enzimática (Singh *et al.*, 2021).

Sin embargo, para las cepas evaluadas no se cuentan con datos publicados en la literatura de mediciones de actividad enzimática que se hayan realizado para la endo- β -1,4-glucanasa, excepto para cepas de *C. cladosporioides* (Srivastava *et al.*, 2020). En la investigación realizada por Srivastava y otros (2020), se reportó una actividad enzimática de 150 IU/gds para *C. cladosporioides* NS2 en una fermentación en estado sólido empleando como sustrato bagazo de caña de azúcar (Srivastava *et al.*, 2020). Dicho valor es superior al valor reportado en este estudio de 1.47 y 0.20 U/g sustrato

para las cepas 3B23 y 2AB28 respectivamente (*ver Cuadro 5*). Dicha diferencia puede atribuirse a que en dicho estudio se optimizaron las condiciones de temperatura, pH y humedad, los cuales son factores que juegan un papel crucial en la productividad enzimática (Yoon *et al.*, 2014). De la misma forma, se cuenta con antecedentes que reportan la producción de celulasas, en cepas diferentes a las reportadas en este estudio, por parte de *P. pimateouiense* y *C. cladosporioides* en un ensayo empleando un medio de cultivo artificial (Zhang *et al.*, 2019). En dicha investigación se reportó una mayor actividad de celulasa (IU/mg) por parte de una cepa *P. pimateouiense* siendo el valor máximo equivalente a 0.06 IU/mg, en comparación con el valor máximo de *C. cladosporioides* equivalente a 0.02 IU/mg (Zhang *et al.*, 2019). Esto concuerda con los resultados de la fermentación en estado sólido reportados en este estudio donde *P. pimateouiense* presentó una mayor actividad enzimática en comparación con *C. cladosporioides*. Sin embargo, en la fermentación en estado líquido una cepa de *C. cladosporioides* (3BP23) presentó mayor actividad enzimática en comparación con la cepa de *P. pimateouiense*.

Para la enzima β -glucosidasa se cuantificó la actividad enzimática con base a la detección del producto p-nitrofenol como resultado de la hidrólisis de p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido, un sustrato caracterizado para dicha enzima (Teunissen *et al.*, 1992). De acuerdo con los resultados obtenidos, se logró detectar actividad enzimática para todas las cepas (*ver Cuadro 6*). Esto evidenció que todas las cepas fúngicas evaluadas son capaces de producir la enzima necesaria para completar el proceso de hidrólisis de la celulosa, de forma que convierten la celobiosa producida por las exoglucanasas en glucosa (Singh *et al.*, 2021). Adicionalmente, se observó que para esta enzima se obtuvieron valores de actividad enzimática más altos en comparación que con los de endo- β -1,4 glucanasa. Para la fermentación en estado sólido, la actividad más alta de β -glucosidasa, la presentó la cepa 3BP21, seguida de 1CA11, 1CA14, 6MO10, 1CA10, 3BP23, 4AB9,3BP26, 2AB28, 5MO18, 4AP14, 1BP24, 4MO17 y 1CA13. En cuanto a la fermentación en estado líquido, la cepa 3BP21 presentó la actividad enzimática más alta, seguida de 3BP23, 2AB28, 1CA10, 3BP26, 4MO17, 4AB9, 4AP14, 6MO10, 5MO18, 1CA11 y 1CA14. Sin embargo, para las cepas 1CA13 y 1BP24 no se logró detectar actividad enzimática bajo las condiciones de ensayo.

Sin embargo, para la enzima β -glucosidasa, no se cuentan con datos publicados en la literatura sobre mediciones de su actividad enzimática para las cepas evaluadas, excepto para cepas de *C. cladosporioides* (Srivastava *et al.*, 2020). En el estudio realizado por Srivastava y otros (2020), se obtuvo una actividad enzimática equivalente a 200 IU/gds para β -glucosidasa (Srivastava *et al.*, 2020). Esto representa un gran contraste con el valor reportado en este estudio equivalente a 14.84 y 8.47 U/g sustrato para las cepas 3BP23 y 2AB28 respectivamente (*ver Cuadro 6*). Dicha diferencia puede atribuirse a lo mencionado anteriormente con respecto a que en la investigación realizada por Srivastava y otros (2020) se optimizaron las condiciones del medio de cultivo que tenían un papel relevante en la actividad enzimática de las celulasas.

En resumen, teniendo en cuenta los resultados de actividad enzimática para β -glucosidasa y endo- β -1,4-glucanasa, la baja actividad enzimática reportada o incluso la ausencia de actividad para algunas de las cepas (*ver Cuadro 5 y 6*) evidencia que para futuras investigaciones es necesario considerar que factores como el pH, temperatura, humedad, cantidad de inóculo, tipo de sustrato y nutrientes disponibles son parámetros que influyen en la actividad enzimática de las celulasas (Yoon *et al.*, 2014). Por esta razón, la optimización de estas condiciones podría contribuir a incrementar significativamente la actividad enzimática de las celulasas. Otro factor a tener en cuenta es que las características morfológicas del hongo, pueden llegar a representar un desafío debido a que las enzimas pueden quedar atrapadas en las hifas o adherirse a sustratos insolubles durante la hidrólisis enzimática (Valášková y Baldrian, 2005). Esto dificulta el proceso de recuperación de las enzimas, ya que, para los hongos productores de hifas, una cantidad considerable de las enzimas extracelulares está asociada con las estructuras miceliales de las hifas y/o sustratos de crecimiento (Bentil *et al.*, 2018). Lo anterior se debe a que las enzimas extracelulares se secretan muy cerca de las estructuras de las hifas de forma que los productos de la acción enzimática puedan ser asimilados por el hongo en el crecimiento (Bentil *et al.*, 2018). Dichos aspectos podrían explicar el por qué se obtuvieron actividades enzimáticas bajas para las celulasas recuperadas o bien por qué no se logró detectar

dicha actividad para algunos de los hongos.

Otro punto importante a resaltar es que se esperaba que la actividad enzimática para ambas celulasas fuera mayor en la fermentación en estado sólido. Esto se atribuye a que, de acuerdo con lo reportado en estudios previos, la fermentación en estado sólido se caracteriza por un mayor rendimiento del producto en comparación con la fermentación en estado líquido, debido a la mayor producción de enzimas concentradas (Singh *et al.*, 2021). De la misma forma, se ha observado que las celulasas producidas en la fermentación en estado sólido tienen un mejor rendimiento en términos de eficiencia de hidrólisis en comparación con las producidas a partir del cultivo líquido (Yoon *et al.*, 2014). Dicho comportamiento se observó para las cepas 6MO10, 5MO18 y 1CA11, las cuales presentaron una actividad enzimática más alta en la fermentación en estado sólido. Sin embargo, las cepas 4MO17, 3BP23, 4AB9, 1CA13, 2AB28, 1CA10 y 3BP21 presentaron una actividad enzimática más alta para ambas enzimas en la fermentación en estado líquido, y para las cepas 3BP26, 1CA14, 1CA13 y 1BP24 no se logró determinar debido a que su actividad enzimática no fue detectada en la fermentación en estado líquido para una de las dos enzimas.

Un factor que podría explicar el comportamiento observado es el hecho que el punto máximo de actividad enzimática para cada cepa individual pudo ser alcanzado en intervalos de tiempo distintos, de acuerdo con lo reportado en la literatura (De Oliveira Rodrigues *et al.*, 2019; Kerem *et al.*, 1992); mientras que en este estudio la actividad enzimática para ambas celulasas se midió después de tres semanas de incubación. Se ha reportado que la actividad de la celulasa alcanza su punto máximo durante la fase de colonización del crecimiento fúngico y cuando la actividad metabólica se encuentra en su valor más alto (Yoon *et al.*, 2014). Por esta razón, se recomienda cuantificar la actividad enzimática en diferentes intervalos de tiempo durante el proceso de fermentación. Esto a su vez permitiría correlacionarlo con la tasa de degradación de celulosa en el sustrato empleado para comprender de mejor forma el patrón de consumo de celulosa para cada una de las cepas y los métodos de cultivo. De la misma manera, se aconseja realizar una curva de crecimiento para cada cepa fúngica para identificar en qué momento cada cepa alcanza la fase de colonización en el sustrato empleado y de esta forma, cuantificar la actividad enzimática en este punto. Lo anterior, se atribuye al hecho de que en la fase de colonización es donde se producen las enzimas necesarias para degradar el sustrato en moléculas solubles, de modo que puedan ser absorbidas como nutrientes por el hongo (Yoon *et al.*, 2014).

Tomando en cuenta los resultados de los ensayos enzimáticos para ambas celulasas, se evidenció que los hongos filamentosos aislados del suelo tienen potencial degradativo celolítico. Lo anterior, se atribuye a que se evidenció la presencia de las enzimas endo- β -1,4-glucanasa y β -glucosidasa en las cepas fúngicas evaluadas, las cuales forman parte del complejo celolítico necesario para llevar a cabo la hidrólisis eficiente de la celulosa. De la misma forma, otro punto importante a resaltar es que la presencia de endo- β -1,4-glucanasa y β -glucosidasa sugiere una acción sinérgica de las celulasas en la degradación de la celulosa presente en el heno. Esto se debe a que la enzima β -glucosidasa es la última enzima implicada en la degradación de la celulosa, ya que cataliza la hidrólisis de los celobiosedímeros liberados previamente por la acción de las otras celulasas (De Oliveira Rodrigues *et al.*, 2019).

No obstante, a pesar de la detección de actividad enzimática para ambas celulasas, no todas las cepas presentaron una alta actividad enzimática. Los hongos pueden presentar una deficiencia de componentes particulares de la celulasa o producirlas en bajas concentraciones (Yoon *et al.*, 2014). De acuerdo, con estudios previos, se ha reportado que, por ejemplo, especies como *Trichoderma reesei* no producen una cantidad suficiente de β -glucosidasa o en el caso de *Aspergillus niger* la endoglucanasa y la exoglucanasa se encuentran ausentes en el sistema de celulasa de este hongo (Yoon *et al.*, 2014). Por ello, se pueden llegar a necesitar dos o más especies de hongos diferentes para lograr degradar sustratos celulósicos. Una solución a ello, es el cocultivo de hongos, el cual se considera un enfoque económico y factible para mejorar el rendimiento de la producción de celulasas (Yoon *et al.*, 2014).

En consecuencia, se sugirió una formulación de hongos (*ver Cuadro 7*) con el propósito de aumentar la producción de cócteles enzimáticos con alto potencial catalítico para así promover la degradación de la celulosa presente en los residuos agrícolas. Dicha formulación se seleccionó con base en los resultados de actividad enzimática obtenidos mediante fermentación en estado sólido, ya que en este método de cultivo los hongos filamentosos crecen de manera similar a su entorno natural (Singh *et al.*, 2021). De esta forma, se seleccionó a las cinco cepas fúngicas que presentaron la actividad enzimática más alta para ambas enzimas y se tomaron en cuenta los resultados de la prueba de antagonismo reportados previamente para algunas de las cepas fúngicas en el estudio realizado por Vela, 2023. La primera formulación contiene las cepas 1CA10, 1CA11 y 1CA14, las cuales son tres de las cinco cepas que presentaron la actividad enzimática más alta para ambas enzimas (*ver Cuadro 7*). Otro aspecto importante es que se ha reportado que estas cepas son capaces de crecer en conjunto, lo que indica que no presentan antagonismo entre sí (Vela, 2023). En cuanto a la segunda formulación, contiene las cepas 3BP21, 1CA11, 1CA14, 6MO10 y 3BP23, que fueron cinco de las cepas que presentaron una alta actividad enzimática para ambas enzimas en comparación con otras cepas. Sin embargo, para las cepas 3BP21, 6MO10 y 3BP23 no se ha determinado su antagonismo, por lo cual se aconseja evaluar este aspecto, ya que debe evitarse que exista una competencia entre ellas que pueda tener un efecto negativo en su crecimiento (Hu *et al.*, 2010).

Se espera que las cepas propuestas para cada formulación produzcan el conjunto completo de celulasas necesarias para la hidrólisis eficiente de la biomasa celulósica e incluso contribuya a incrementar la actividad enzimática (Yoon *et al.*, 2014). Asimismo, el uso de un cocultivo favorecería una mejor utilización del sustrato, mayor adaptabilidad al entorno cambiante, un mayor rendimiento y productividad enzimática. Estos factores en conjunto permitirían una mayor degradación del sustrato celulósico (Singh *et al.*, 2021), ya que estudios previos han demostrado que los componentes lignocelulósicos se despolimerizan en mayor medida cuando los hongos se cocultivan en sustrato lignocelulósico durante la fermentación en estado sólido (Stepanova *et al.*, 2003). De igual forma, se sugiere evaluar el efecto de esta formulación en la degradación de sustratos celulósicos debido a que algunos estudios han reportado que el nivel de producción de celulasas no parece tener una correlación con el patrón de degradación (Yoon *et al.*, 2014).

Considerando lo anterior, la presencia de una alta actividad extracelular celulolítica para endo- β -1,4-glucanasa y β -glucosidasa, en cepas de hongos filamentosos indicaría que presentan el perfil de celulasas necesario para llevar a cabo la hidrólisis completa de la celulosa. Por ese motivo, tienen el potencial para ser empleadas en la degradación de residuos celulósicos resultantes de la cosecha de la caña de azúcar. De esta forma, los productos resultantes de la degradación de celulosa pueden funcionar como enmienda para el suelo agrícola y mejorar el crecimiento y rendimiento de la cosecha de la caña de azúcar (Kausar *et al.*, 2010). Esto concuerda con lo reportado en estudios previos en donde se ha evidenciado un efecto positivo en la degradación y producción de celulasas por parte de hongos filamentosos al emplear como sustrato residuos del cultivo de caña de azúcar, demostrando que es un sustrato adecuado para apoyar el crecimiento de los hongos (De Oliveira Rodrigues *et al.*, 2019; Maza *et al.*, 2013). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la actividad enzimática podría llegar a variar debido a que se ha observado que el tipo de sustrato, la composición del medio de cultivo y el modo de cultivo de las especies fúngicas tienen un papel importante en la productividad de las enzimas y también afectan el perfil de la actividad enzimática resultante (Elisashvili *et al.*, 2008).

De acuerdo con lo anterior, se aconseja que el siguiente paso en el estudio sea evaluar *in situ* el efecto de la inoculación de los hongos que presentaron alta actividad enzimática para las dos celulasas evaluadas, en los residuos postcosecha de la caña de azúcar (mulch). Esto, con el propósito de determinar cómo las condiciones ambientales y la composición del medio de cultivo afectan la productividad enzimática y la hidrólisis de la celulosa presente en el mulch. Lo anterior se atribuye a que factores como una humedad inadecuada, un gradiente de temperatura desfavorable y un desequilibrio en la cantidad de nitrógeno o de sales, pueden influir negativamente en la producción de celulasas y en el crecimiento de los hongos (Elisashvili *et al.*, 2008; Yoon *et al.*, 2014). En consecuencia, la adición de un suplemento de nitrógeno y de sales inorgánicas podría ser necesaria para compensar

la variación de pH durante el crecimiento y también brindar estabilidad a las enzimas extracelulares (Bentil *et al.*, 2018).

Por otro lado, dicha evaluación *in situ* permitiría también identificar el método de inoculación más adecuado de las cepas fúngicas para tratar el mulch directamente en el campo. Se recomienda un enfoque de fermentación en estado sólido, ya que el cultivo de hongos en el mulch mediante este método sería más ventajoso que la fermentación en estado líquido. Esto se debe a que proporcionaría ventajas como menor costo, menor riesgo de contaminación bacteriana, menor requerimiento de agua, mayor producción de enzimas concentradas, así como una mejor eficiencia de hidrólisis de los sustratos (Singh *et al.*, 2021). Alternativamente, si no se desea aplicar directamente los hongos, puede considerarse el uso de la solución enzimática cruda obtenida de la fermentación en estado sólido, la cual puede aplicarse directamente para hidrolizar el sustrato (Yoon *et al.*, 2014). No obstante, sería necesario evaluar previamente la estabilidad enzimática bajo estas condiciones.

En conclusión, el uso de hongos filamentosos para la degradación de residuos celulósicos tienen el potencial de contribuir a promover la agricultura sostenible, mejorando las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (Kausar *et al.*, 2010). De esta forma se aprovecharían los residuos generados por la cosecha de la caña de azúcar para emplearlos como aditivo para el cultivo de la planta y contribuir a mejorar su rendimiento y crecimiento.

Conclusiones

1. A partir del ensayo microbiológico en medio de cultivo CMC se logró identificar 36 cepas de hongos filamentosos que presentan actividad celulolítica extracelular. De estas se identificaron 14 cepas con una alta capacidad de utilización de celulosa como fuente de carbono.
2. No se logró determinar con exactitud el porcentaje de pérdida de masa seca derivada de la degradación del heno, por lo que dicha pérdida no pudo atribuirse a la utilización de la celulosa por parte de las cepas fúngicas evaluadas.
3. Se determinó que las catorce cepas de hongos presentaron actividad enzimática para las celulasas endo- β -1,4-glucanasa y β -glucosidasa, en los métodos de cultivo evaluados.
4. Se propuso una primera formulación de hongos con las cepas 1CA10, 1CA11 y 1CA14 debido a que presentaron una alta actividad enzimática para ambas celulasas en la fermentación en estado sólido y son capaces de crecer en conjunto.
5. Se propone una segunda formulación con las cepas 1CA11, 1CA14, 6MO10, 3BP21 y 3BP23, la cual cuenta con cinco especies diferentes que presentan una alta actividad enzimática para ambas celulasas. Sin embargo, no se ha determinado el antagonismo para las últimas tres cepas mencionadas.

Recomendaciones

1. Se recomienda realizar un estudio más profundo sobre la correlación entre las condiciones fisicoquímicas y ambientales del suelo y la abundancia de hongos que degradan celulosa, para comprender mejor qué factores influyen en una mayor abundancia de los hongos especializados en la degradación de celulosa.
2. Se aconseja que para futuras experimentaciones, se determiné el porcentaje de humedad inicial del sustrato celulósico empleado y se ajuste la humedad de todas las muestras a un porcentaje previamente establecido y que haya sido identificado cómo óptimo de acuerdo con lo realizado en otros estudios. Esto con el objetivo de asegurar que la exactitud del porcentaje de pérdida de masa reportado para cada cepa y que dicho valor corresponda a la utilización de la celulosa como fuente de carbono contenida en el heno.
3. Se sugiere evaluar el crecimiento de los hongos y degradación del sustrato de interés en un mayor intervalo de tiempo, ya que la tasa de degradación para cada cepa fúngica es diferente.
4. Se recomienda determinar la concentración de celulosa residual para establecer el efecto directo del tratamiento fúngico en la degradación de este polisacárido.
5. Se aconseja optimizar el medio de cultivo empleado para la fermentación en estado sólido de los hongos ya que factores como la temperatura, humedad y pH así como la presencia de una concentración equilibrada de carbono y nitrógeno y de sales inorgánicas juegan un papel importante en el crecimiento de los hongos, la productividad de las enzimas y en el perfil de la actividad enzimática resultante.
6. Se recomienda cuantificar la actividad enzimática en diferentes intervalos de tiempo durante el proceso de fermentación, de forma que pueda correlacionarse con la tasa de degradación de celulosa en el sustrato empleado. Esto permitiría comprender de mejor forma el patrón de consumo de celulosa para cada una de las cepas y los métodos de cultivo.
7. Se aconseja realizar una curva de crecimiento para cada cepa fúngica para identificar en qué momento cada cepa alcanza la fase de colonización en el sustrato empleado y de esta forma, cuantificar la actividad enzimática en este punto. Lo anterior, se atribuye al hecho de que en la fase de colonización es donde se producen las enzimas necesarias para degradar el sustrato en moléculas solubles.

8. Analizar la capacidad de degradación de la formulación propuesta de hongos con fuerte actividad celulítica extracelular en residuos producidos en la cosecha de caña de azúcar para evaluar su aplicabilidad para proporcionar nutrientes para el cultivo y mejorar la calidad del suelo.
9. Se aconseja que el siguiente paso en el estudio sea evaluar in situ el efecto de la inoculación de los hongos que presentaron alta actividad enzimática para las dos celulasas evaluadas, en el mulch. Esto, con el propósito de determinar cómo las condiciones ambientales y la composición del medio de cultivo afectan la productividad enzimática y la hidrólisis de la celulosa presente en el mulch.

- Aidoo, R., Kwofie, E. M., Adewale, P., Lam, E., & Ngadi, M. (2023). Overview of single cell protein: Production pathway, sustainability outlook, and digital twin potentials.[Visión general de la proteína unicelular: Ruta de producción, perspectiva de sostenibilidad y potenciales del gemelo digital]. *Trends In Food Science & Technology*, *138*, 577-598. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.07.003>
- Ajala, E. O., Ighalo, J. O., Ajala, M. A., Adeniyi, A. G., & Ayanshola, A. M. (2021). Sugarcane bagasse: A biomass sufficiently applied for improving global energy, environment and economic sustainability.[Bagazo de caña de azúcar: Una biomasa con aplicaciones suficientes para mejorar la sostenibilidad energética, ambiental y económica global].*Bioresources and Bioprocessing*, *8*(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00440-z>
- Andlar, M., Rezić, T., Mardetko, N., Kracher, D., Ludwig, R., & Šantek, B. (2018). Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. [Degradación de la lignocelulosa: descripción general de los hongos y las enzimas fúngicas involucradas en la degradación de la lignocelulosa].*Engineering in Life Sciences*, *18*(11), 768–778. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800039>
- Arantes, V., Jellison, J., & Goodell, B. (2012). Peculiarities of brown-rot fungi and biochemical Fenton reaction with regard to their potential as a model for bioprocessing biomass. [Peculiaridades de los hongos de podredumbre parda y la reacción bioquímica de Fenton con respecto a su potencial como modelo para el bioprocesamiento de biomasa]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *94*(2), 323–338. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3954-y>
- Arreola-Enriquez, J., Palma-López, D. J., Salgado-García, S., Camacho-Chiu, W., Obrador-Olán, J. J., Juárez-López, J. F., & Pastrana-Aponte, L. (2004). Evaluación de abono organo-mineral de cachaza en la producción y calidad de la caña de azúcar. *Terra Latinoamericana*, *22*(3), 351-357.
- Asociación de Azucareros de Guatemala. (2017). Azúcar de Guatemala. Obtenido de: <https://sugarforgood.com/conocenos/?lang=es#historia>

- Bari, E., Daniel, G., Yilgor, N., Kim, J. S., Tajick-Ghanbary, M. A., Singh, A. P., & Ribera, J. (2020). Comparison of the Decay Behavior of Two White-Rot Fungi in Relation to Wood Type and Exposure Conditions. [Comparación del comportamiento de descomposición de dos hongos de podredumbre blanca en relación con el tipo de madera y las condiciones de exposición. Microorganismos]. *Microorganisms*, 8(12), 1931. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121931>
- Basanta, R., Delgado, M. A. G., Martínez, J. E. C., Vázquez, H. M., & Vázquez, G. B. (2007). SOSTENIBILIDAD DEL RECICLAJE DE RESIDUOS DE LA AGROINDUSTRIA AZUCARERA: UNA REVISIÓN SUSTAINABLE RECYCLING OF WASTE FROM SUGARCANE AGROINDUSTRY: A REVIEW. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(4), 293-305. <https://doi.org/10.1080/11358120709487704>
- Beary, T. P., Boopathy, R., & Templet, P. (2002). Accelerated decomposition of sugarcane crop residue using a fungal-bacterial consortium. [Descomposición acelerada de residuos de cultivos de caña de azúcar utilizando un consorcio fúngico-bacteriano]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 50(1), 41-46. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00056-2](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00056-2)
- Bentil, J. A., Thygesen, A., Mensah, M., Lange, L., & Meyer, A. S. (2018). Cellulase production by white-rot basidiomycetous fungi: solid-state versus submerged cultivation. [Producción de celulasa por hongos basidiomicetos de pudrición blanca: cultivo en estado sólido frente a cultivo sumergido]. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 102(14), 5827-5839. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9072-8>
- Benz, J. P., & Schipper, K. (Eds.). (2020). *Genetics and Biotechnology*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-49924-2>
- Bhadha, J. H., Xu, N., Khatiwada, R., Swanson, S., & LaBorde, C. (2020). Bagasse: A Potential Organic Soil Amendment Used in Sugarcane Production.. [Bagazo: Una Potencial Enmienda Orgánica del Suelo Usada en la Producción de Caña de Azúcar]. *EDIS*, 2020(5), 5. <https://doi.org/10.32473/edis-ss690-2020>
- Bhatnagar, A., Kesari, K. K., & Shurpali, N. (2016). Multidisciplinary Approaches to Handling Wastes in Sugar Industries. [Enfoques multidisciplinarios para el manejo de residuos en las industrias del azúcar]. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(1), 11. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2705-y>
- Bomfim, C. A., Coelho, L. G. F., Vale, H. M. M. D., De Carvalho Mendes, I., Megías, M., Ollero, F. J., & Reis, F. B. D., Junior. (2021). Brief history of biofertilizers in Brazil: from conventional approaches to new biotechnological solutions. [Breve historia de los biofertilizantes en Brasil: de los enfoques convencionales a las nuevas soluciones biotecnológicas]. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 52(4), 2215-2232. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00618-9>
- Boonyuen, N., Manoch, L., Luangsa-ard, J. J., Piasai, O., Chamswarnng, C., Chuaseeharonnachai, C., Ueapattanakit, J., Arnthong, J., & Sri-indrasutdhi, V. (2014). Decomposition of sugarcane bagasse with lignocellulose-derived thermotolerant and thermoresistant *Penicillia* and *Aspergilli*. [Descomposición de bagazo de caña de azúcar con *Penicillium* y *Aspergillus* termotolerantes y termorresistentes derivados de la lignocelulosa]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 92, 86-100. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.04.013>
- Chaitanya, K. V. (2019). *Genome and Genomics: From Archaea to Eukaryotes*. [Genoma y Genómica: De Arqueas a Eucariotas]. Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-0702-1>
- Chaudhary, P., Singh, S., Chaudhary, A., Sharma, A., & Kumar, G. (2022). Overview of biofertilizers in crop production and stress management for sustainable agriculture. [Resumen de los biofertilizantes en la producción de cultivos y la gestión del estrés para una agricultura sostenible]. *Frontiers In Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.930340>

- Civzele, A., & Mezule, L. (2024). Isolation and screening of wood-decaying fungi for lignocellulolytic enzyme production and bioremediation processes. [Aislamiento y selección de hongos degradadores de madera para la producción de enzimas lignocelulolíticas y procesos de biorremediación]. *Frontiers In Fungal Biology*, 5. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2024.1494182>
- Cornell Waste Management Institute. (1996). Substrate Composition Table. [Tabla de Composición del Sustrato]. Cornell University. Obtenido de: <https://compost.css.cornell.edu/calc/lignin.noframes.html>
- Cui, T., Yuan, B., Guo, H., Tian, H., Wang, W., Ma, Y., Li, C., & Fei, Q. (2021). Enhanced lignin biodegradation by consortium of white rot fungi: Microbial synergistic effects and product mapping. [Biodegradación mejorada de la lignina por un consorcio de hongos de putrefacción blanca: Efectos sinérgicos microbianos y mapeo de productos]. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), 162. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-02011-y>
- De Araújo, J. A., Ferreira, N. R., Da Silva, S. H. M., Oliveira, G., Monteiro, R. C., Alves, Y. F. M., & Lopes, A. S. (2019). Filamentous fungi diversity in the natural fermentation of Amazonian cocoa beans and the microbial enzyme activities. [Diversidad de hongos filamentosos en la fermentación natural de granos de cacao amazónicos y las actividades enzimáticas microbianas]. *Annals of Microbiology*, 69(9), 975-987. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01488-1>
- De Oliveira Rodrigues, P., Gurgel, L. V. A., Pasquini, D., Badotti, F., Góes-Neto, A., & Baffi, M. A. (2019). Lignocellulose-degrading enzymes production by solid-state fermentation through fungal consortium among Ascomycetes and Basidiomycetes. Producción de enzimas degradadoras de lignocelulosa mediante fermentación en estado sólido a través de un consorcio fúngico entre Ascomycetes y Basidiomycetes]. *Renewable Energy*, 145, 2683-2693. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.08.041>
- Dong, X. Q., Yang, J. S., Zhu, N., Wang, E. T., & Yuan, H. L. (2013). Sugarcane bagasse degradation and characterization of three white-rot fungi. [Degradación de bagazo de caña de azúcar y caracterización de tres hongos de descomposición blanca]. *Bioresource Technology*, 131, 443-451. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.182>
- Eida, M. F., Nagaoka, T., Wasaki, J., & Kouno, K. (2011). Evaluation of Cellulolytic and Hemicellulolytic Abilities of Fungi Isolated from Coffee Residue and Sawdust Composts. [Evaluación de las capacidades celulolíticas y hemicelulolíticas de hongos aislados de composts de residuos de café y aserrín]. *Microbes And Environments*, 26(3), 220-227. <https://doi.org/10.1264/jsme2.me10210>
- Eklblom, R., & Wolf, J. B. W. (2014). A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation. [Una guía de campo para la secuenciación de genoma completo, ensamblaje y anotación]. *Evolutionary Applications*, 7(9), 1026-1042. <https://doi.org/10.1111/eva.12178>
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., & Penninckx, M. (2008). Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. [Efecto del sustrato de crecimiento, el método de fermentación y la fuente de nitrógeno en la producción de enzimas degradadoras de lignocelulosa por basidiomicetos de podredumbre blanca]. *Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(11), 1531-1538. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0454-2>
- Fraç, M., Hannula, S. E., Beřka, M., & Jędryczka, M. (2018). Fungal Biodiversity and Their Role in Soil Health. [La biodiversidad fúngica y su papel en la salud del suelo]. *Frontiers in Microbiology*, 9, 707. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00707>

- García-Torreiro, M., López-Abelairas, M., Lu-Chau, T. A., & Lema, J. M. (2016). Fungal pretreatment of agricultural residues for bioethanol production. [Pretratamiento fúngico de residuos agrícolas para la producción de bioetanol]. *Industrial Crops and Products*, *89*, 486–492. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.05.036>
- Gay, S. Grisso, R. Smith, R. (2003). Determining Forage Moisture Concentration. [Determinación de la concentración de humedad en el forraje]. *Biological Systems Engineering*.
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. [Medición de las actividades de la celulasa]. *Pure and Applied Chemistry*, *59*(2), 257–268. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>
- Gil, A. (2021). Current insights into lignocellulose related waste valorization. [Perspectivas actuales sobre la valorización de residuos relacionados con la lignocelulosa]. *Chemical Engineering Journal Advances*, *8*, 100186. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.100186>
- Gunasekara, A. W. A. C. W. R., Rajapaksha, L. G. T. G., & Tung, T. L. (2022). Whole-genome sequence analysis through online web interfaces: A review. [Análisis de secuencias genómicas completas a través de interfaces web en línea: Una revisión]. *Genomics & Informatics*, *20*(1), e3. <https://doi.org/10.5808/gi.20038>
- Gurovic, M. S. V., Viceconte, F. R., Bidegain, M. A., & Dietrich, J. (2023). Regulation of lignocellulose degradation in microorganisms. [Regulación de la degradación de lignocelulosa en microorganismos]. *Journal of Applied Microbiology*, *134*(1), lxac002. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxac002>
- Hildén, K., & Mäkelä, M. R. (2018). Role of Fungi in Wood Decay. [Rol de los hongos en la descomposición de la madera]. En *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.12424->
- Hu, H., Van Den Brink, J., Gruben, B., Wösten, H., Gu, J., & De Vries, R. (2010). Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi. [Mejora en la producción de enzimas mediante la co-cultivación de *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* junto con otros hongos]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *65*(1), 248–252. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.11.008>
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. [Tecnologías de secuenciación de próxima generación: Una visión general]. *Human Immunology*, *82*(11), 801–811. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
- Isikgor, F. H., & Becer, C. R. (2015). Lignocellulosic biomass: A sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. [Biomasa lignocelulósica: Una plataforma sostenible para la producción de productos químicos y polímeros de base biológica]. *Polymer Chemistry*, *6*(25), 4497–4559. <https://doi.org/10.1039/C5PY00263J>
- Jamil, F., Mukhtar, H., Fouillaud, M., & Dufossé, L. (2022). Rhizosphere Signaling: Insights into Plant–Rhizomicrobiome Interactions for Sustainable Agronomy. [Señalización en la Rizósfera: Perspectivas sobre las Interacciones entre Plantas y el Rizomicrobioma para una Agronomía Sostenible]. *Microorganisms*, *10*(5), 899. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050899>
- Johnsen, H., & Krause, K. (2014). Cellulase Activity Screening Using Pure Carboxymethylcellulose: Application to Soluble Cellulolytic Samples and to Plant Tissue Prints. [Cribado de actividad celulasa utilizando carboximetilcelulosa pura: aplicación a muestras solubles celulolíticas y a impresiones de tejido vegetal]. *International Journal Of Molecular Sciences*, *15*(1), 830–838. <https://doi.org/10.3390/ijms15010830>
- Kalntremtziou, M., Papaioannou, I. A., Vangalis, V., Polemis, E., Pappas, K. M., Zervakis, G. I., & Typas, M. A. (2023). Evaluation of the lignocellulose degradation potential of Mediterranean

- forests soil microbial communities through diversity and targeted functional metagenomics. [Evaluación del potencial de degradación de la lignocelulosa de las comunidades microbianas del suelo de los bosques mediterráneos mediante diversidad y metagenómica funcional dirigida]. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1121993. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1121993>
- Kausar, H., Sariah, M., Saud, H. M., Alam, M. Z., & Ismail, M. R. (2010). Development of compatible lignocellulolytic fungal consortium for rapid composting of rice straw. [Desarrollo de un consorcio fúngico lignocelulolítico compatible para el compostaje rápido de paja de arroz]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *64*(7), 594-600. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.06.012>
- Kerem, Z., Friesem, D., & Hadar, Y. (1992). Lignocellulose Degradation during Solid-State Fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. [Degradación de la lignocelulosa durante la fermentación en estado sólido: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*]. *Applied And Environmental Microbiology*, *58*(4), 1121-1127. <https://doi.org/10.1128/aem.58.4.1121-1127.1992>
- Kozłowski, T. T., & Pallardy, S. G. (1997). Environmental Regulation of Vegetative Growth. [Regulación ambiental del crecimiento vegetativo]. En *Growth Control in Woody Plants*. Elsevier.(pp. 195-322) <https://doi.org/10.1016/B978-012424210-4/50005-X>
- Kumar, A., & Chandra, R. (2020). Ligninolytic enzymes and its mechanisms for degradation of lignocellulosic waste in environment. [Enzimas ligninolíticas y sus mecanismos para la degradación de residuos lignocelulósicos en el medio ambiente]. *Heliyon*, *6*(2), e03170. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03170>
- Kumar, S., Diksha, N., Sindhu, S. S., & Kumar, R. (2021). Biofertilizers: An ecofriendly technology for nutrient recycling and environmental sustainability. [Biofertilizantes: Una tecnología ecológica para el reciclaje de nutrientes y la sostenibilidad ambiental]. *Current Research In Microbial Sciences*, *3*, 100094. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100094>
- Lara, H. (2021). Sector agrícola en Guatemala. ICEX España. Lefebvre, D., Williams, A., Meersmans, J., Kirk, G. J. D., Sohi, S., Goglio, P., & Smith, P. (2020). Modelling the potential for soil carbon sequestration using biochar from sugarcane residues in Brazil. [Modelando el potencial de secuestro de carbono en el suelo usando biocarbón a partir de residuos de caña de azúcar en Brasil]. *Scientific Reports*, *10*(1), 19479. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76470-y>
- Lee, S., Park, M. S., Lee, H., Kim, J., Eimes, J. A., & Lim, Y. W. (2019). Fungal Diversity and Enzyme Activity Associated with the Macroalgae, *Agarum clathratum*. [Diversidad Fúngica y Actividad Enzimática Asociadas con la Macroalga *Agarum clathratum*]. *Mycobiology*, *47*(1), 50-58. <https://doi.org/10.1080/12298093.2019.1580464>
- Lizardi-Jiménez, M. A., & Hernández-Martínez, R. (2017). Solid state fermentation (SSF): Diversity of applications to valorize waste and biomass. [Fermentación en estado sólido (FES): Diversidad de aplicaciones para valorizar residuos y biomasa]. *Biotech*, *7*(1), 44. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0692-y>
- Machado, A. D. S., & Ferraz, A. (2017). Biological pretreatment of sugarcane bagasse with basidiomycetes producing varied patterns of biodegradation. [Pretratamiento biológico del bagazo de caña de azúcar con basidiomicetos que producen patrones variados de biodegradación]. *Bioresource Technology*, *225*, 17-22. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.053>
- Maza, M., Pajot, H. F., Amoroso, M. J., & Yasem, M. G. (2014). Post-harvest sugarcane residue degradation by autochthonous fungi. [Degradación de residuos de caña de azúcar poscosecha por hongos autóctonos] *International Biodeterioration & Biodegradation*, *87*, 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.10.020>

- Melgar, M., Meneses, A., Orozco, H., Pérez, O., & Espinosa, R. (Eds.). (2012). *El cultivo de la Caña de Azúcar en Guatemala*. CENGICANÑA, Centro Guatemalteco de Investigación y Capacitación de la Caña de Azúcar: Artemis Edinter.
- Mhuantong, W., Charoensawan, V., Kanokratana, P., Tangphatsornruang, S., & Champreda, V. (2015). Comparative analysis of sugarcane bagasse metagenome reveals unique and conserved biomass-degrading enzymes among lignocellulolytic microbial communities. [Análisis comparativo del metagenoma del bagazo de caña de azúcar revela enzimas únicas y conservadas para la degradación de biomasa entre comunidades microbianas lignocelulolíticas]. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0200-8>
- Molina-Santiago, C., & Matilla, M. A. (2019). Chemical fertilization: a short-term solution for plant productivity? [Fertilización química: ¿una solución a corto plazo para la productividad vegetal?]. *Microbial Biotechnology*, 13(5), 1311-1313. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13515>
- Mustafa, A. M., Poulsen, T. G., & Sheng, K. (2016). Fungal pretreatment of rice straw with *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma reesei* to enhance methane production under solid-state anaerobic digestion. [Pretratamiento fúngico de paja de arroz con *Pleurotus ostreatus* y *Trichoderma reesei* para aumentar la producción de metano en digestión anaerobia en estado sólido]. *Applied Energy*, 180, 661-671. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.07.135>
- Nadir, N., Liyana Ismail, N., & Shah Hussain, A. (2019). Fungal Pretreatment of Lignocellulosic Materials. [Pretratamiento fúngico de materiales lignocelulósicos]. En A. El-Fatah Abomohra (Ed.), *Biomass for Bioenergy—Recent Trends and Future Challenges*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84239>
- Novohradská, S., Ferling, I., & Hillmann, F. (2017). Exploring Virulence Determinants of Filamentous Fungal Pathogens through Interactions with Soil Amoebae. [Explorando los determinantes de virulencia de los patógenos fúngicos filamentosos a través de interacciones con amebas del suelo]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 497. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00497>
- Nurika, I., Suhartini, S., & Barker, G. C. (2020). Biotransformation of Tropical Lignocellulosic Feedstock Using the Brown rot Fungus *Serpula lacrymans*. [Biotransformación de Materia Prima Lignocelulósica Tropical Usando el Hongo de Pudrición Marrón *Serpula lacrymans*]. *Waste and Biomass Valorization*, 11(6), 2689-2700. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00581-5>
- Observatorio Económico sostenible. (2020). Producción y cobertura agrícola. Guate en datos. Obtenido de: <https://guateendatos.org.gt/seguridad-alimentaria-y-nutricional/agricultura/>
- Ochoa, P. (2022). El Agro en Cifras 2021. Gobierno de Guatemala. Oluseun Adejumo, I., & Adebukola Adebisi, O. (2021). Agricultural Solid Wastes: Causes, Effects, and Effective Management. [Residuos Sólidos Agrícolas: Causas, Efectos y Gestión Efectiva]. En H. M. Saleh (Ed.), *Strategies of Sustainable Solid Waste Management*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.93601>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2022). FAO hace un llamado a la transformación sostenible de los sistemas agroalimentarios en Guatemala.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2024). Guatemala en una mirada. Obtenido de: <https://www.fao.org/guatemala/fao-en-guatemala/guatemala-en-una-mirada/es/>

- Panagiotou, G., Kekos, D., Macris, B. J., & Christakopoulos, P. (2003). Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. [Producción de enzimas celulolíticas y xilanolíticas por *Fusarium oxysporum* cultivado en rastrojo de maíz en fermentación en estado sólido]. *Industrial Crops And Products*, *18*(1), 37-45. [https://doi.org/10.1016/s0926-6690\(03\)00018-9](https://doi.org/10.1016/s0926-6690(03)00018-9)
- Rauwane, M. E., Ogugua, U. V., Kalu, C. M., Ledwaba, L. K., Woldeamay, A. A., & Ntushelo, K. (2020). Pathogenicity and Virulence Factors of *Fusarium graminearum* Including Factors Discovered Using Next Generation Sequencing Technologies and Proteomics. [Factores de Patogenicidad y Virulencia de *Fusarium graminearum*, Incluyendo Factores Descubiertos Usando Tecnologías de Secuenciación de Nueva Generación y Proteómica]. *Microorganisms*, *8*(2), 305. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020305>
- Sánchez, A. (2023). *Metagenómica fúngica y caracterización de hongos filamentosos con fenotipos de interés agrícola en suelos utilizados para el monocultivo de *Saccharum officinarum**. Tesis de pregrado. Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala, Guatemala.
- Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. [Residuos lignocelulósicos: Biodegradación y bioconversión por hongos]. *Biotechnology Advances*, *27*(2), 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>
- Saqib, A. A. N., & Whitney, P. J. (2011). Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars.[Comportamiento diferencial del reactivo de ácido dinitrosalicílico (DNS) hacia azúcares mono y disacáridos]. *Biomass and Bioenergy*, *35*(11), 4748–4750. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.09.013>
- Satam, H., Joshi, K., Mangrolia, U., Waghoo, S., Zaidi, G., Rawool, S., Thakare, R. P., Banday, S., Mishra, A. K., Das, G., & Malonia, S. K. (2023). Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. [Tecnología de Secuenciación de Nueva Generación: Tendencias Actuales y Avances]. *Biology*, *12*(7), 997. <https://doi.org/10.3390/biology12070997>
- Sharma, R. K., & Arora, D. S. (2013). Fungal degradation of lignocellulosic residues: An aspect of improved nutritive quality. [Degradación fúngica de residuos lignocelulósicos: Un aspecto de la mejora en la calidad nutritiva]. *Critical Reviews In Microbiology*, *41*(1), 52-60. <https://doi.org/10.3109/1040841x.2013.791247>
- Schilling, J. S., Kaffenberger, J. T., Held, B. W., Ortiz, R., & Blanchette, R. A. (2020). Using Wood Rot Phenotypes to Illuminate the “Gray” Among Decomposer Fungi.[Usando fenotipos de pudrición de la madera para iluminar lo “gris” entre los hongos descomponedores]. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1288. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01288>
- Sharma, A., Tewari, R., Rana, S. S., Soni, R., & Soni, S. K. (2016). Cellulases: Classification, Methods of Determination and Industrial Applications.[Celulasas: Clasificación, Métodos de Determinación y Aplicaciones Industriales]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *179*(8), 1346–1380. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2070-3>
- Shukla, S. K., Solomon, S., Sharma, L., Jaiswal, V. P., Pathak, A. D., & Singh, P. (2019). Green Technologies for Improving Cane Sugar Productivity and Sustaining Soil Fertility in Sugarcane-Based Cropping System. [Tecnologías verdes para mejorar la productividad del azúcar de caña y mantener la fertilidad del suelo en sistemas de cultivo basados en caña de azúcar]. *Sugar Tech*, *21*(2), 186–196. <https://doi.org/10.1007/s12355-019-00706-z>
- Silva, M. L. C., Souza, V. B. D., Santos, V. D. S., Kamida, H. M., Vasconcellos-Neto, J. R. T. D., Góes-Neto, A., & Bello Koblitz, M. G. (2014). Production of Manganese Peroxidase on Unexpensive Substrate and Its Application in the Removal of Lignin from Agricultural Wastes. [Producción de Manganese Peroxidasa en sustrato económico y su aplicación en la eliminación de lignina de residuos agrícolas]. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, *05*(14), 1067-1077.

<https://doi.org/10.4236/abb.2014.514122>

- Sindhu, R., Gnansounou, E., Binod, P., & Pandey, A. (2016). Bioconversion of sugarcane crop residue for value added products – An overview. [Bioconversión de los residuos de cultivos de caña de azúcar para productos de valor agregado – Una visión general]. *Renewable Energy*, *98*, 203–215. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.02.057>
- Singh, T., & Singh, A. P. (2016). White and Brown Rot Fungi as Decomposers of Lignocellulosic Materials and Their Role in Waste and Pollution Control. [Hongos de Podredumbre Blanca y Marrón como Descomponedores de Materiales Lignocelulósicos y su Papel en el Control de Residuos y Contaminación]. En D. Purchase (Ed.), *Fungal Applications in Sustainable Environmental Biotechnology*. Springer International Publishing. (pp. 233–247). . https://doi.org/10.1007/978-3-319-42852-9_9
- Singh, A., Bajar, S., Devi, A., & Pant, D. (2021). An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. [Una visión general sobre los desarrollos recientes en la producción de celulasas fúngicas y sus aplicaciones industriales]. *Bioresource Technology Reports*, *14*, 100652. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100652>
- Soccol, C. R., Costa, E. S. F. da, Letti, L. A. J., Karp, S. G., Woiciechowski, A. L., & Vandenberghe, L. P. de S. (2017). Recent developments and innovations in solid state fermentation. [Desarrollos recientes e innovaciones en la fermentación en estado sólido]. *Biotechnology Research and Innovation*, *1*(1), 52–71. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.01.002>
- Soares, F. L., Melo, I. S., Dias, A. C. F., & Andreote, F. D. (2012). Cellulolytic bacteria from soils in harsh environments. [Bacterias celulolíticas de suelos en ambientes extremos]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*(5), 2195–2203. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1025-2>
- Srivastava, N., Elgorban, A. M., Mishra, P., Marraiki, N., Alharbi, A. M., Ahmad, I., & Gupta, V. K. (2020). Enhance production of fungal cellulase cocktail using cellulosic waste. [Mejorar la producción de cóctel de celulasas fúngicas utilizando desechos celulósicos]. *Environmental Technology & Innovation*, *19*, 100949. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100949>
- Strahsburger, E., De Lacey, A. M. L., Marotti, I., DiGioia, D., Biavati, B., & Dinelli, G. (2017). In vivo assay to identify bacteria with β -glucosidase activity. [Ensayo in vivo para identificar bacterias con actividad de β -glucosidasa]. *Electronic Journal of Biotechnology*, *30*, 83–87. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.08.010>
- Suryadi, H., Judono, J. J., Putri, M. R., Ecessia, A. D., Ulhaq, J. M., Agustina, D. N., & Sumiati, T. (2022). Biodesignificación de lignocelulosa mediante enzimas ligninolíticas de hongos de podredumbre blanca. *Heliyon*, *8*(2), e08865. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08865>
- Syrchin, S., Yurieva, O., Pavlychenko, A., & Kurchenko, I. (2023). Statistics-Based Optimization of Cellulase and Xylanase Production by the Endophytic Fungus *Talaromyces Funiculosus* using Agricultural Waste Materials. [Optimización basada en estadística de la producción de celulasa y xilanasa por el hongo endófito *Talaromyces funiculosus* utilizando materiales de desecho agrícola]. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal*, *85*(1), 12–25. <https://doi.org/10.15407/microbiolj85.01.012>
- Teunissen, M. J., Lahaye, D. H. T. P., Veld, J. H. J. H. I. '., & Vogels, G. D. (1992). Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2. [Purificación y caracterización de una β -glucosidasa extracelular del hongo anaerobio *Piromyces* sp., cepa E2]. *Archives Of Microbiology*, *158*(4), 276–281. <https://doi.org/10.1007/bf00245245>
- Valášková, V., & Baldrian, P. (2005). Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*

- and *Piptoporus betulinus*. [Estimación de las fracciones unidas y libres de enzimas degradadoras de lignocelulosa de los hongos que pudren la madera *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* y *Piptoporus betulinus*]. *Research In Microbiology*, 157 (2), 119-124. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.06.004>
- Van Kuijk, S. J. A., Sonnenberg, A. S. M., Baars, J. J. P., Hendriks, W. H., Del Río, J. C., Rencoret, J., Gutiérrez, A., De Ruijter, N. C. A., & Cone, J. W. (2017). Chemical changes and increased degradability of wheat straw and oak wood chips treated with the white rot fungi *Ceriporiopsis subvermisporea* and *Lentinula edodes*. [Cambios químicos y mayor degradabilidad de la paja de trigo y astillas de roble tratadas con los hongos de pudrición blanca *Ceriporiopsis subvermisporea* y *Lentinula edodes*]. *Biomass and Bioenergy*, 105, 381–391. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.07.003>
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. [Métodos para la fibra dietética, la fibra detergente neutra y los polisacáridos no amiláceos en relación con la nutrición animal]. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583-3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Vela, S. (2023). *Identificación y planteamiento de formulación de biofertilizantes de cepas fúngicas aisladas de suelos de monocultivo de Saccharum officinarum*. Tesis de pregrado. Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala, Guatemala.
- Villatoro, B. Barrera, C. (2018). *Guía de Cosecha Mecanizada*. Cengicana. Obtenido de: <https://cengicana.org/files/20180919084740699.pdf>
- White, P. M., & Webber, C. L. (2018). Green-Cane Harvested Sugarcane Crop Residue Decomposition as a Function of Temperature, Soil Moisture, and Particle Size. [Descomposición de residuos de cultivo de caña de azúcar cosechada con caña verde como función de la temperatura, humedad del suelo y tamaño de partícula]. *Sugar Tech*, 20(5), 497–508. <https://doi.org/10.1007/s12355-017-0579->
- Wood, T. M., & Bhat, K. (1988). Methods for measuring cellulase activities. [Métodos para medir las actividades de la celulasa]. En *Methods in enzymology on CD-ROM/Methods in enzymology* (pp. 87-112). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)60109-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)60109-1)
- Worsfold, P. J. (2005). SPECTROPHOTOMETRY | Overview. [ESPECTROFOTOMETRÍA | Resumen]. En *38 Encyclopedia of Analytical Science* (pp. 318–321). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00714-7>
- Xu, N., Bhadha, J. H., Rabbany, A., Swanson, S., McCray, J. M., Li, Y. C., Strauss, S. L., & Mylavarapu, R. (2021). Crop Nutrition and Yield Response of Bagasse Application on Sugarcane Grown on a Mineral Soil. [Nutrición de Cultivos y Respuesta del Rendimiento a la Aplicación de Bagazo en Caña de Azúcar Cultivada en un Suelo Mineral]. *Agronomy*, 11(8), 1526. <https://doi.org/10.3390/agronomy11081526>
- Ye, L., Zhao, X., Bao, E., Li, J., Zou, Z., & Cao, K. (2020). Bio-organic fertilizer with reduced rates of chemical fertilization improves soil fertility and enhances tomato yield and quality. [El fertilizante bio-orgánico con tasas reducidas de fertilización química mejora la fertilidad del suelo y aumenta el rendimiento y la calidad del tomate]. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56954-2>
- Yin, R., Kwok, C. K., Zheng, J. (2019). Whole Genome Sequencing Analysis. [Análisis de Secuenciación del Genoma Completo]. En *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology* (pp. 176–183). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20095-2>
- Yoon, L. W., Ang, T. N., Ngoh, G. C., & Chua, A. S. M. (2014). Fungal solid-state fermentation

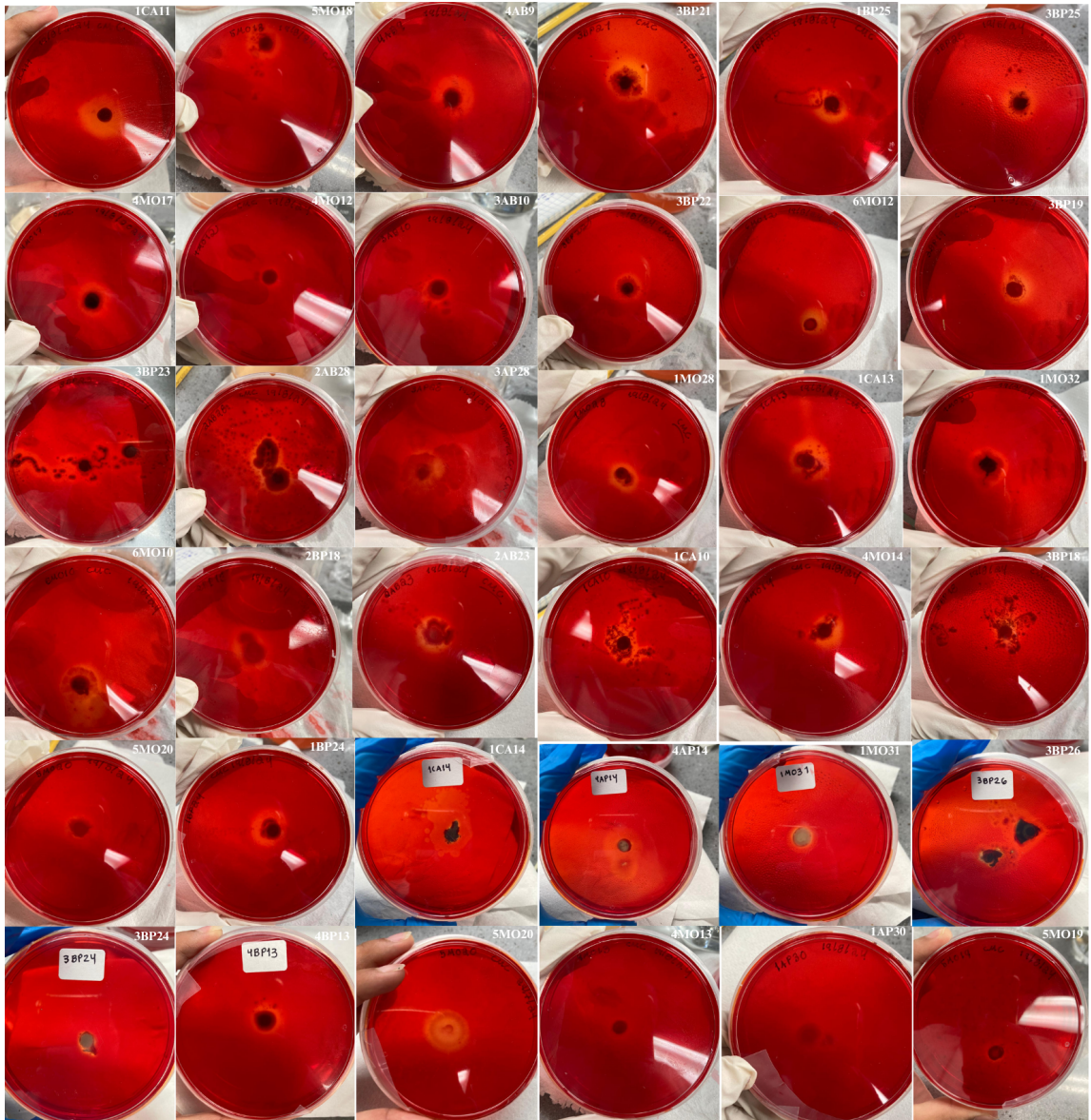
- and various methods of enhancement in cellulase production. [Fermentación sólida fúngica y varios métodos de mejora en la producción de celulasa]. *Biomass And Bioenergy*, 67, 319-338. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.05.013>
- Zabel, R. A., Morrell, J. J. (2020). Chemical changes in wood caused by decay fungi. [Cambios químicos en la madera causados por hongos de la pudrición]. En *Wood Microbiology* (pp. 215-244). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819465-2.00008-5>
- Zhao, G., Zhu, X., Zheng, G., Meng, G., Dong, Z., Baek, J. H., Jeon, C. O., Yao, Y., Xuan, Y. H., Zhang, J., & Jia, B. (2023). Development of biofertilizers for sustainable agriculture over four decades (1980-2022). [Desarrollo de biofertilizantes para la agricultura sostenible durante cuatro décadas (1980-2022)]. *Geography And Sustainability*, 5(1), 19-28. <https://doi.org/10.1016/j.geosus.2023.09.006>
- Zhang, F., Li, L., Sun, M., Hu, C., Zhang, Z., Liu, Z., Shao, H., Xi, G., & Pan, J. (2019). Fungal Community Analyses of a Pirogue from the Tang Dynasty in the National Maritime Museum of China. [Análisis de la comunidad fúngica de una piragua de la dinastía Tang en el Museo Nacional Marítimo de China]. *Applied Sciences*, 9(19), 4129. <https://doi.org/10.3390/app9194129>

Anexo A Actividad celulolítica extracelular

La sección de Anexos A presenta las imágenes obtenidas durante la prueba de detección de actividad celulolítica extracelular en las cepas de hongos evaluadas. Estas fotografías muestran la producción de celulasas por parte de varias cepas fúngicas evidenciada por la formación de un halo claro alrededor de la colonia. Estas imágenes complementan los resultados presentados en el cuerpo principal del trabajo ofreciendo una representación visual de la actividad celulolítica extracelular en ensayos de placa por parte de varias cepas fúngicas.

Figura 6

Imágenes de prueba de detección de actividad celulolítica en agar CMC con resultado positivo

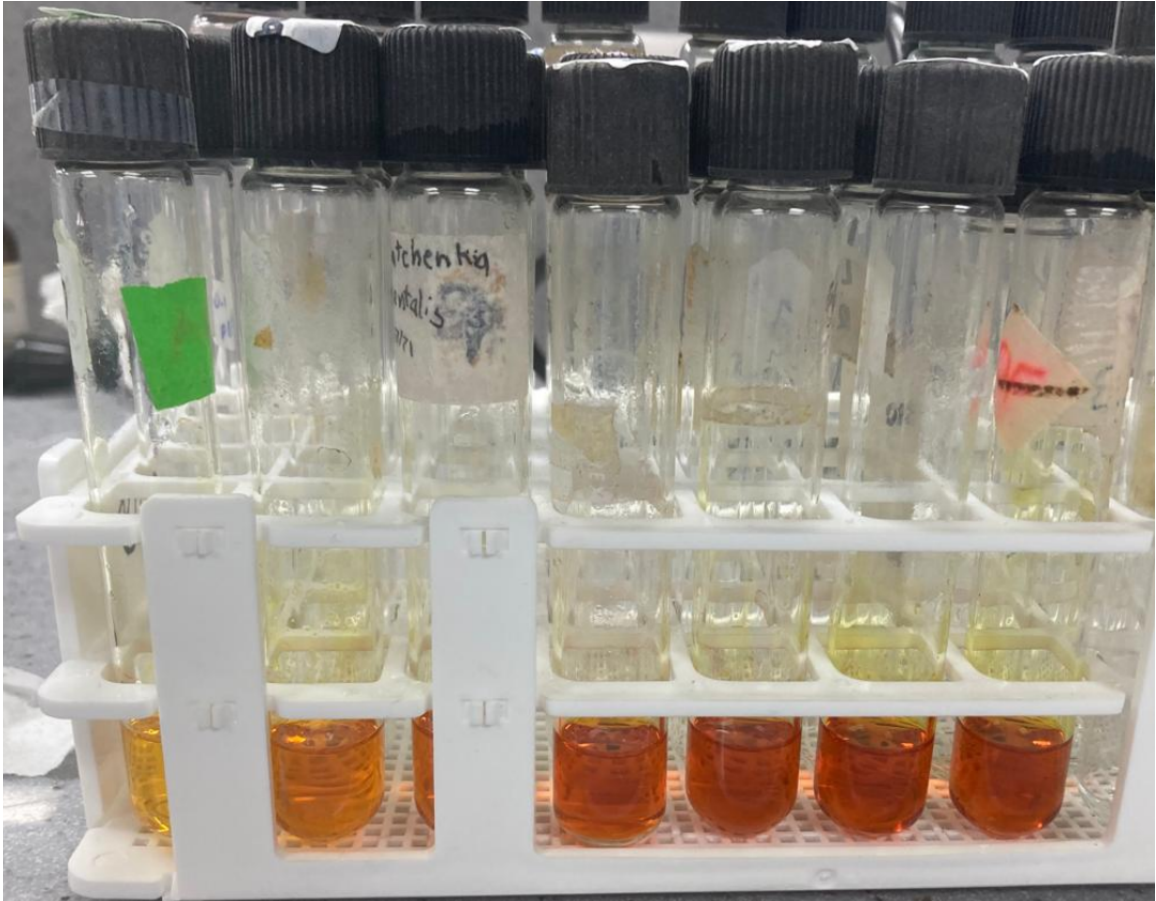


Nota. Elaboración propia.

Anexo B Ensayos de actividad enzimática

Figura 7

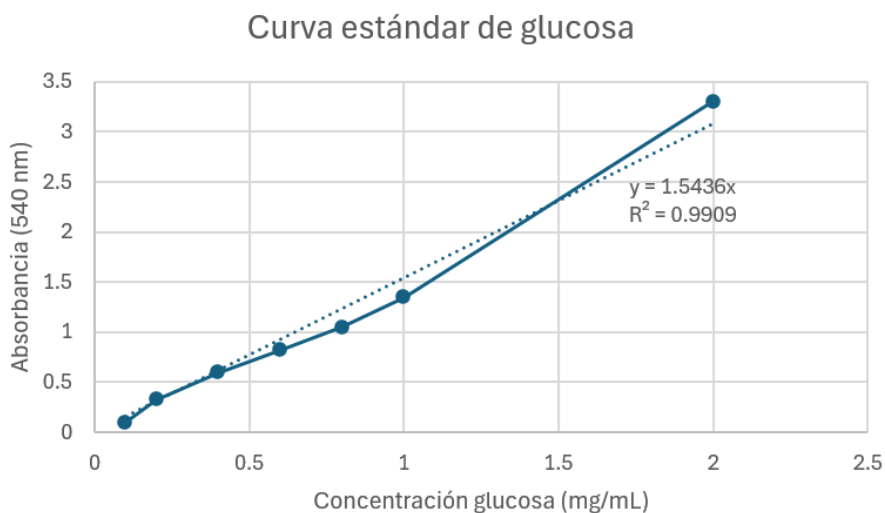
Optimización de ensayo de actividad enzimática para endo- β , 1,4-glucanasa



Nota. Elaboración propia. De izquierda a derecha: Blanco de reacción, blanco enzimático, 500 μ L de enzima y 500 μ L de CMC, 600 μ L de enzima Y 400 μ L de CMC, 700 μ L de enzima y 300 μ L de CMC, 800 μ L de enzima y 200 μ L de enzima y por último 900 μ L de enzima y 100 μ L de CMC.

Figura 8

Curva estándar de glucosa para cuantificación de actividad enzimática para endo- β , 1,4-glucanasa



Nota. Elaboración propia.

Cuadro 8

Lecturas de absorbancia de método DNS para la cuantificación de actividad enzimática para endo- β , 1,4-glucanasa en fermentación en estado sólido

Cepa	Absorbancia blanco enzima	RP1	RP2	RP3
4MO17	0.604	0.84	0.877	0.852
3BP23	0.374	0.564	0.531	ND
6MO10	0.801	1.124	1.263	1.187
4AB9	0.513	0.555	0.581	0.51
5MO18	0.432	0.555	0.51	0.55
4AP14	0.34	0.506	0.444	0.495
1CA14	0.365	0.629	0.601	0.587
1CA13	0.339	0.366	0.362	0.374
C-	1.352	1.372	1.396	1.493
1CA11	0.457	0.698	0.885	0.689
1BP24	0.252	0.368	0.386	0.398
3BP21	0.72	1.072	1.092	1.135
1CA10	0.586	0.71	0.808	0.823
2AB28	0.207	0.236	0.233	0.225
3BP26	0.258	0.264	0.292	0.275

Nota. Elaboración propia.

Cuadro 9

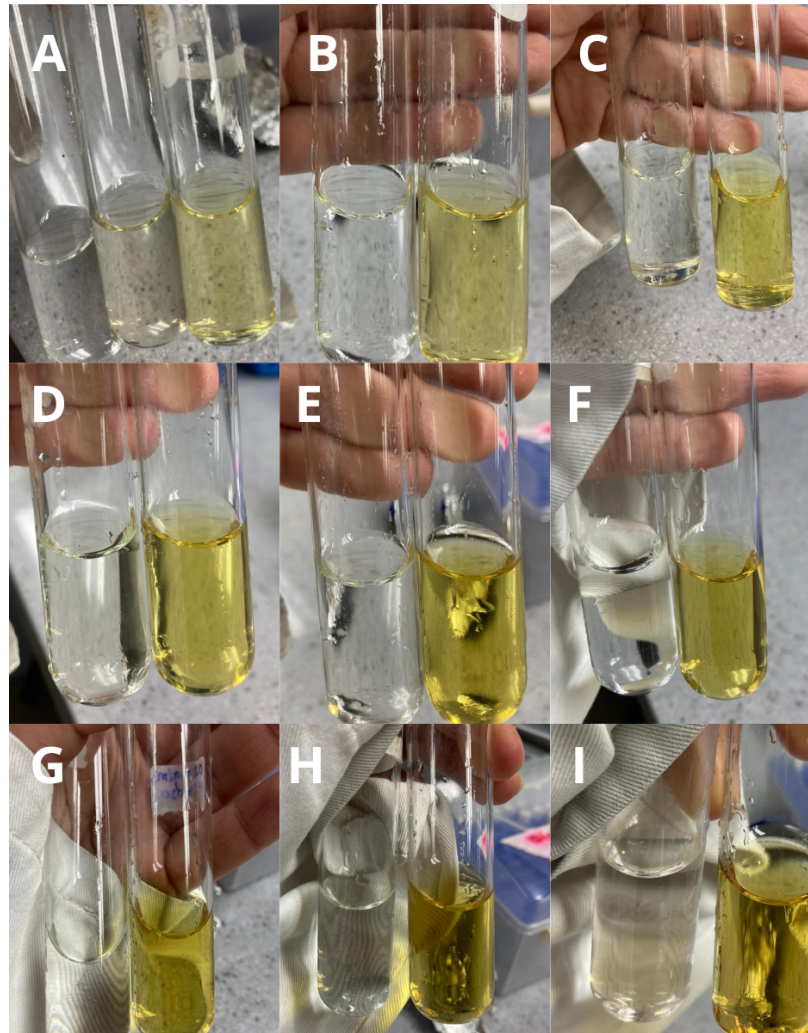
Lecturas de absorbancia de método DNS para la cuantificación de actividad enzimática para endo- β , 1,4-glucanasa en fermentación en estado líquido

Cepa	Absorbancia blanco enzima	RP1	RP2	RP3
1CA13	2.193	2.267	2.951	2.823
4AP14	1.455	1.565	1.508	1.567
4AB9	1.116	1.259	1.264	1.214
3BP23	1.119	1.684	1.721	1.716
C-	3.53	3.53	3.53	3.53
1BP24	1.043	1.1	1.056	1.118
6MO10	2.198	2.478	2.466	ND
5MO18	1.405	1.458	1.395	1.552
3BP21	1.402	2.379	ND	2.296
4MO17	1.095	1.36	1.362	1.096
1CA10	2.147	2.94	2.861	2.858
3BP26	1.224	1.218	1.215	1.209
1CA11	1.498	1.626	1.681	1.591
1CA14	3.387	2.953	3.162	3.278
2AB28	0.795	0.814	0.834	ND

Nota. Elaboración propia.

Figura 9

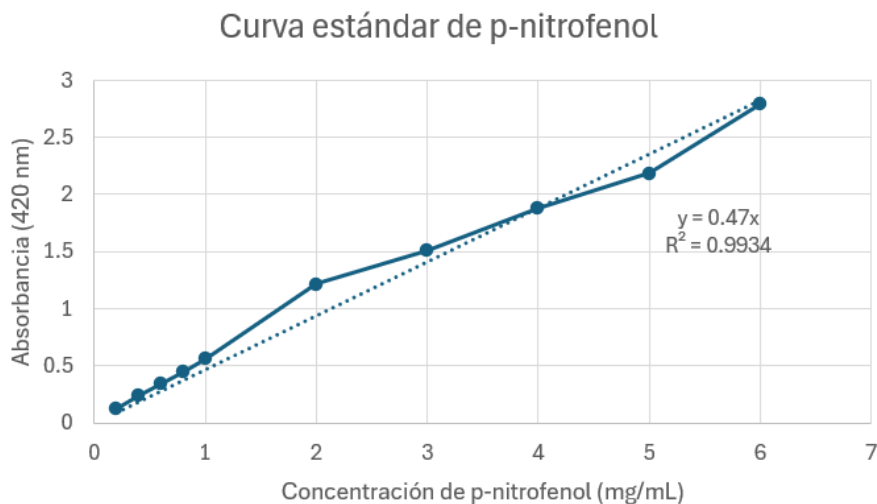
Optimización de ensayo de actividad enzimática para endo- β , 1,4-glucanasa



Nota. Elaboración propia. A. 200 uL de enzima y 1 mL de sustrato. B. 300 uL de enzima y 900 uL de sustrato. C. 400 uL de enzima y 800 uL de sustrato. D. 500 uL de enzima y 700 uL de sustrato. E. 600 uL de enzima y 600 uL de sustrato. F. 700 uL de enzima y 500 uL de sustrato. G. 800 uL de enzima y 400 uL de sustrato. H. 900 uL de enzima y 300 uL de sustrato. I. 1 mL enzima y 200 uL de sustrato.

Figura 10

Curva estándar de glucosa para cuantificación de actividad enzimática para β -glucosidasa



Nota. Elaboración propia.

Cuadro 10

Lecturas de absorbancia para la cuantificación de actividad enzimática para β -glucosidasa en fermentación en estado sólido

Cepa	Absorbancia blanco enzima	RP1	RP2	RP3
4MO17	0.316	0.362	0.367	0.358
6MO10	0.628	1.186	1.087	0.995
4AB9	0.573	0.637	0.768	0.708
5MO18	0.46	0.602	0.619	0.705
4AP14	0.448	0.545	0.545	0.585
1CA14	0.4	0.934	0.98	0.949
1CA13	0.481	0.513	0.499	0.551
C-	0.456	0.477	0.493	0.491
1CA11	0.429	1.038	0.962	1.001
1BP24	0.273	0.387	0.357	0.367
1CA10	0.442	0.83	0.787	0.756
2AB28	0.347	0.48	0.542	0.491
3BP26	0.386	0.544	0.58	0.538
3BP21	0.533	1.763	1.708	1.605
3BP23	0.472	0.749	0.698	0.776

Nota. Elaboración propia.

Cuadro 11

Lecturas de absorbancia para la cuantificación de actividad enzimática para β -glucosidasa en fermentación en estado líquido

Cepa	Absorbancia blanco enzima	RP1	RP2	RP3
2AB28	0.761	2.643	2.671	2.667
3BP21	0.655	3.05	3.046	3.053
4MO17	2.102	3.17	2.454	3.421
5MO18	1.617	1.792	1.771	1.727
6MO10	2.016	2.145	2.186	2.162
1BP24	1.618	1.473	1.502	1.488
C-	1.599	1.386	1.418	1.42
3BP23	0.881	3.215	3.179	3.191
4AB9	1.275	1.547	1.535	ND
4AP14	1.392	1.543	1.555	1.542
1CA13	1.103	0.999	ND	ND
1CA10	1.545	3.359	3.363	3.357
3BP26	1.497	3.09	3.098	3.116
1CA11	1.945	1.753	2.042	1.995
1CA14	1.565	1.55	1.582	1.625

Nota. Elaboración propia.

Anexo C Protocolos

Procedimiento Normado de Operación	SOP 1 Proyecto Suelos Ingenio Magdalena
	Páginas Totales: 3
Método para detección de actividad celulósica en hongos	Autores: Ximena Contreras

1. Propósito

Realizar un método para la detección de la actividad celulósica de hongos por medio de ensayos microbiológicos en placas.

2. Aplicación

Los hongos se conocen por ser los principales responsables de la degradación de materiales lignocelulósicos, lo cual se debe a que cuentan con sistemas enzimáticos hidrolíticos y oxidativos extracelulares ligninolíticos (Sánchez, 2009). Dichas enzimas son liberadas al medio ambiente y los hongos emplean los diferentes mecanismos enzimáticos a medida que van degradando el material lignocelulósico. La estrategia de cribado en dos pasos para la evaluación de la actividad lignocelulolítica permite la identificación de enzimas que puedan estar involucradas en la degradación de material lignocelulósico. Para ello, se realiza un cribado primario para identificar las cepas que presenten actividad enzimática celulítica relacionada con la producción de celulasas. El tratamiento de los residuos lignocelulósicos con hongos que tengan dicha capacidad permite que el material se fraccione en sus componentes principales de forma que tenga un valor agregado en la calidad del suelo (Ajala *et al.*, 2021).

3. Referencias

3.1. Maza, M., Pajot, H. F., Amoroso, M. J., & Yasem, M. G. (2014). Post-harvest sugarcane residue degradation by autochthonous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 87, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.10.020>

4. Terminología

- 4.1. Actividad celulósica: Conjunto de enzimas involucradas en la hidrólisis enzimática de la biomasa celulósica (Guo et al., 2023).
- 4.2. Celulasas: Se refiere a un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de celulosa en azúcares (Kasana et al., 2008).
- 4.3. Celulosa: Es el carbohidrato más abundante de las plantas (Kasana et al., 2008).

5. Documentos asociados

- 5.1. Ajala, E. O., Ighalo, J. O., Ajala, M. A., Adeniyi, A. G., & Ayanshola, A. M. (2021). Sugarcane bagasse: A biomass sufficiently applied for improving global energy, environment and economic sustainability. *Bioresources and Bioprocessing*, 8(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00440-z>
- 5.2. Guo, H., Zhao, Y., Chang, J.-S., & Lee, D.-J. (2023). Enzymes and enzymatic mechanisms in enzymatic degradation of lignocellulosic biomass: A mini-review. *Bioresource Technology*, 367, 128252. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.128252>
- 5.3. Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27(2), 185–194. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.001>

6. Seguridad

6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:

- 6.1.1. Formación de aerosoles.
- 6.1.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de microorganismos. Concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.
- 6.1.3. Exceso de material o personal.

6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

- 6.2.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
- 6.2.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.
- 6.2.3. Limitar el acceso al laboratorio.
- 6.2.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.
- 6.2.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles .
- 6.2.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.
- 6.2.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.
- 6.2.8. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).
- 6.2.9. Ser precavido al usar objetos punzantes.
- 6.2.10. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.
- 6.2.11. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1. Equipo

7.1.1. Autoclave

7.2. Materiales/ Cristalería

7.2.1. Erlenmeyer de 1000mL

7.3. Reactivos

7.3.1. NaNO₃

7.3.2. K₂HPO₄

7.3.3. MgSO₄

7.3.4. KCl

7.3.5. CMC sal de sodio

7.3.6. Peptona

7.3.7. Agar

7.3.8. Medio MEA

7.3.9. Solución de rojo Congo al 1 %

7.3.10. NaCl

7.4. Medicamentos

7.4.1. No aplica

7.5. Material biológico

7.5.1. Cepario de hongos

8. Procedimiento

8.1. Preparación de medios de cultivo

8.1.1. Agar CMC

8.1.1.1. Para un litro de agar carboximetilcelulosa (CMC) se debe pesar: 2.0 g de NaNO₃, 1.0 g K₂HPO₄, 0.5 g MgSO₄, 0.5 g KCl, 2.0 g CMC sal de sodio, 0.2 g peptona y 17.0 g agar.

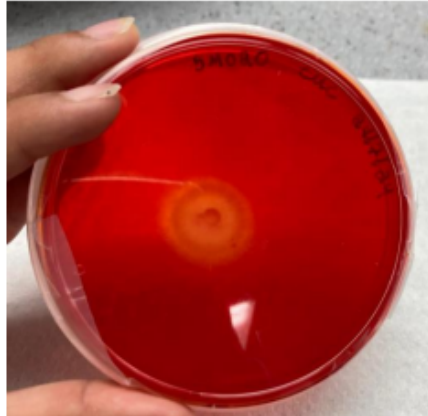
8.2. Cribado primario de la actividad lignocelulolítica

8.2.1. Actividad celulítica extracelular en placas de agar

8.2.1.1. Se debe tomar un inóculo que consiste en un pedazo de agar (6mm de diámetro) obtenido del borde de la hifa de cultivos de 8 días de edad cultivados en medio MEA. Se debe sembrar el inóculo en placas de agar CMC y dejar incubar 48 horas a 30 °C previo a medir la actividad celular de la celulosa.

8.2.1.2. Inundar las placas con una solución de rojo Congo al 1 % durante 15 minutos.

8.2.1.3. Medir el diámetro de la zona clara formado alrededor de las colonias. El diámetro de la zona clara se expresa como el Índice de Actividad Enzimática Relativa (I_{CMC}).



9. Esterilización de material

Se debe autoclavar el agar CMC previo a preparar las placas. Asimismo, se recomienda esterilizar pinzas y asas bacteriológicas.

10. Cálculos

Se calcula la relación entre el diámetro de la zona clara y el diámetro de la colonia y se expresa como Índice de Actividad Enzimática Relativa (ICMC)

11. Control de calidad

- 11.1. Verificar con un check list que se llevó al lugar los implementos necesarios
- 11.2. Verificar que el almacenamiento de muestras y reactivos sea el adecuado 4°C, -20°C o -80°C.

12. Conflict solution policy

No aplica.

Procedimiento Normado de Operación	SOP Proyecto Suelos Ingenio Magdalena
	Páginas Totales: 3
Fermentación en estado sólido y líquido	Autores: Dra. Dalia Lau y Ximena Contreras

1. Propósito

Determinar el efecto del tratamiento fúngico en la degradación del residuo de caña de azúcar.

2. Aplicación

La fermentación en estado sólido ha sido empleada en los últimos años, ya que permite el aprovechamiento de los residuos sólidos agroindustriales como sustrato para la producción de metabolitos como enzimas, antibióticos, ácidos orgánicos, biosurfactantes y compuestos aromáticos (Lizardi-Jiménez & Hernández-Martínez, 2017). De esta manera, se ha observado que permite una mayor productividad enzimática (Soccol *et al.*, 2017). Esto se atribuye a que imita el hábitat natural de microorganismos como los hongos filamentosos y les proporciona una fuente de carbono y nutrientes (Soccol *et al.*, 2017). De esta forma, a partir de su metabolismo natural pueden secretar enzimas, mientras crecen en el sustrato sólido (Lizardi-Jiménez & Hernández-Martínez, 2017). Por otro lado, la fermentación en estado líquido se prefiere a nivel industrial debido a que permite un mayor control de las condiciones, así como una fácil recuperación del producto, sin embargo, da lugar a una mayor dilución de las enzimas (Singh, et al., 2021).

3. Referencias).

3.1. Maza, M., Pajot, H. F., Amoroso, M. J., & Yasem, M. G. (2014). Post-harvest sugarcane residue degradation by autochthonous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 87, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.10.020>

4. Terminología

4.1. Fermentación en estado sólido: es un proceso en el que los microorganismos crecen en un ambiente sin agua o con muy bajo contenido de agua libre. Esto imita el hábitat natural de la mayoría de los microorganismos (principalmente hongos y moho) (Soccol *et al.*, 2017).

4.2. Fermentación en estado líquido: También se denomina fermentación sumergida, este método requiere el cultivo microbiano en un sustrato continuo en fase líquida que contenga más del 95% de humedad (Aidoo *et al.*, 2023).

5. Documentos asociados

5.1. Aidoo, R., Kwofie, E. M., Adewale, P., Lam, E., & Ngadi, M. (2023). Overview of single cell protein: Production pathway, sustainability outlook, and digital twin potentials. *Trends In Food Science & Technology*, 138, 577-598. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.07.003>

5.2. Lizardi-Jiménez, M. A., & Hernández-Martínez, R. (2017). Solid state fermentation (SSF): Diversity of applications to valorize waste and biomass. *3 Biotech*, 7(1), 44. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0692-y>

5.3. Singh, A., Bajar, S., Devi, A., & Pant, D. (2021). An overview on the recent developments in fungal cellulase production and their industrial applications. *Bioresource Technology Reports*, 14, 100652. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100652>

5.4. Soccol, C. R., Costa, E. S. F. da, Letti, L. A. J., Karp, S. G., Woiciechowski, A. L., & Vandenberghe, L. P. de S. (2017). Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, 1(1), 52–71. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2017.01.002>

6. Seguridad

6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:

- 6.1.1. Formación de aerosoles.
- 6.1.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de microorganismos. Concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.
- 6.1.3. Exceso de material o personal.

6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

- 6.2.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
- 6.2.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.
- 6.2.3. Limitar el acceso al laboratorio.
- 6.2.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.
- 6.2.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles .
- 6.2.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.
- 6.2.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.
- 6.2.8. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).
- 6.2.9. Ser precavido al usar objetos punzantes.
- 6.2.10. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.
- 6.2.11. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1. Equipo

- 7.1.1. Autoclave
- 7.1.2. Shaker
- 7.1.3. Centrifugadora
- 7.1.4. Balanza

7.2. Materiales/ Cristalería

- 7.2.1. Erlenmeyer de 50 mL

7.3. Reactivos

- 7.3.1. Acetato de sodio
- 7.3.2. Ácido acético
- 7.3.3. Agua destilada

7.4. Medicamentos

- 7.4.1. No aplica

7.5. Material biológico

- 7.5.1. Cepas de hongos

8. Procedimiento

8.1. Preparación de buffer de acetato de sodio (Receta para un litro)

- 8.1.1. Agregar 800 mL
- 8.1.2. Pesar 1.846 gr de acetato de sodio
- 8.1.3. Medir 1.76 mL de ácido acético
- 8.1.4. Ajustar el pH de la solución usando HCl o NaOH. Llevar el volumen final a 1 L.

8.2. Fermentación en estado sólido

- 8.2.1. Usar como inóculo 3 trozos de agar (6mm de diámetro) obtenidos del borde de la hifa de cultivos de 8 días de edad cultivados en medio MEA.
- 8.2.2. Pesar 2 g de residuo de caña y dejar remojando toda la noche en agua. Posteriormente, esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

- 8.2.3. Cultivar el hongo en un erlenmeyer de 50 mL que contenga los 2 g de residuo de caña de azúcar esterilizado. Incubar a 30 °C durante 21 días en la oscuridad.
- 8.2.4. Las muestras se dejaron de fermentar a los 21 días de incubación. Incluir un control abiótico (sin inoculación)
- 8.2.5. Suspender los sustratos sólidos totales en 25 mL de buffer de acetato de sodio (50 mM, pH 4.5) y se extraen en un agitador orbital (3 horas a 150 rpm y 30 °C).
- 8.2.6. Filtrar las muestras con papel filtro Whatman N 1 y centrifugar a 9000 rpm a 4 °C durante 15 minutos.
- 8.2.7. Recoger las fracciones solubles en agua para ensayos posteriores de actividad enzimática.
- 8.2.8. Secar los sustratos sólidos durante 24 horas a 105 °C y luego pesarlos. La degradación del residuo de caña de azúcar se expresa como la pérdida masa seca (%), calculada como la diferencia entre masa seca en sustratos con, y sin inoculación.

8.3. Fermentación en estado líquido

- 8.3.1. Usar como inóculo 3 trozos de agar (6mm de diámetro) obtenidos del borde de la hifa de cultivos de 8 días de edad cultivados en medio MEA.
- 8.3.2. Pesar 2 g de residuo de caña y agregar 25 mL de caldo Saboraud. Posteriormente, esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
- 8.3.3. Cultivar el hongo en un erlenmeyer de 50 mL que contenga los 2 g de residuo de caña de azúcar y el caldo Sabouraud. Incubar a 30 °C durante 21 días en la oscuridad.
- 8.3.4. Las muestras se dejaron de fermentar a los 21 días de incubación. Incluir un control abiótico (sin inoculación)
- 8.3.5. Extraer en un agitador orbital (3 horas a 150 rpm y 30 °C).
- 8.3.6. Filtrar las muestras con papel filtro Whatman N 1 y centrifugar a 9000 rpm a 4 °C durante 15 minutos.
- 8.3.7. Recoger las fracciones solubles en agua para ensayos posteriores de actividad enzimática.
- 8.3.8. Secar los sustratos sólidos durante 24 horas a 105 °C y luego pesarlos. La degradación del residuo de caña de azúcar se expresa como la pérdida masa seca (%), calculada como la diferencia entre masa seca en sustratos con, y sin inoculación.

9. Esterilización de material

Se debe esterilizar los erlenmeyers a utilizar, así como los residuos de la caña de azúcar

10. Cálculos

- 10.1. La degradación del residuo de caña de azúcar se expresa como la pérdida masa seca (%), calculada como la diferencia entre masa seca en sustratos con, y sin inoculación.

11. Control de calidad

- 11.1. Verificar con un check list que se llevó al lugar los implementos necesarios
- 11.2. Verificar que el almacenamiento de muestras y reactivos sea el adecuado 4°C, -20°C o -80°C.

12. Conflict solution policy

- 12.1. Posible contaminación de los inóculos por lo que se recomienda sellar los erlenmeyers con Parafilm para evitar el crecimiento de otros microorganismos.

Procedimiento Normado de Operación	SOP Proyecto Suelos Ingenio Magdalena
	Páginas Totales: 4
Ensayo para determinación de la actividad enzimática de celulasas	Autores: Dra. Dalia Lau y Ximena Contreras

1. Propósito

Determinar la actividad enzimática de celulasas fúngicas por medio de un método basado en espectrofotometría UV-VIS.

2. Aplicación

Las celulasas microbianas son de especial interés debido al potencial que presentan para el procesamiento de la biomasa celulósica. La degradación enzimática completa de la celulosa a glucosa involucra la acción sinérgica de tres enzimas, incluyendo endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas. Los métodos existentes para la determinación de la actividad de la celulasa incluyen la cuantificación de la concentración de productos acumulados después de la hidrólisis del sustrato, como los azúcares reductores. Uno de los métodos comúnmente utilizados para la medición de la actividad de celulasa es el método del ácido salicílico dinitro (DNS), ya que tiene un amplio rango de detección de azúcares reductores, así como una baja interferencia de proteínas (Sharma *et al.*, 2016). Asimismo, para la medición de la actividad de enzimas como la endoglucanasa, puede emplearse derivados solubles de la celulosa, como la carboximetilcelulosa (CMC) (Sharma *et al.*, 2016). La actividad de la β -glucosidasa, se puede determinar utilizando un sustrato artificial, el cual se convierte en un producto coloreado que puede detectarse espectrofotométricamente debido a que la presencia de β -glucosidasa convierte el sustrato en p-nitrofenol (pNP), una molécula que puede medirse mediante espectrofotometría (Strahsburger *et al.*, 2017).

3. Referencias

- 3.1. Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59(2), 257–268. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>
- 3.2. Boonyuen, N., Manoch, L., Luangsa-ard, J. J., Piasai, O., Chamswarnng, C., Chuaseeharonnachai, C., Ueapattanakit, J., Arnthong, J., & Sri-indrasudhi, V. (2014). Decomposition of sugarcane bagasse with lignocellulose-derived thermotolerant and thermoresistant *Penicillia* and *Aspergilli*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 92, 86–100. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.04.013>
- 3.3. Strahsburger, E., De Lacey, A. M. L., Marotti, I., DiGioia, D., Biavati, B., & Dinelli, G. (2017). In vivo assay to identify bacteria with β -glucosidase activity. *Electronic Journal of Biotechnology*, 30, 83–87. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.08.010>
- 3.4. Worsfold, P. J. (2005). SPECTROPHOTOMETRY | Overview. En *Encyclopedia of Analytical Science* (pp. 318–321). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00714-7>
- 3.5. Wood, T. M., & Bhat, K. (1988). Methods for measuring cellulase activities. En *Methods in enzymology on CD-ROM/Methods in enzymology* (pp. 87-112). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)60109-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)60109-1)

4. Terminología

- 4.1. Actividad enzimática: Una unidad (U) de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de producto por minuto en condiciones de ensayo (Strahsburger *et al.*, 2017).
- 4.2. Espectrofotometría: La espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-visible) se refiere a una técnica analítica cuantitativa que abarca la absorción de radiación UV cercana (180-390 nm) o visible (390-780 nm) por especies químicas en solución. En condiciones experimentales controladas, la cantidad de radiación absorbida puede estar directamente relacionada con la concentración del analito en solución (Worsfold, 2005).

5. Documentos asociados

- 5.1. Sharma, A., Tewari, R., Rana, S. S., Soni, R., & Soni, S. K. (2016). Cellulases: Classification, Methods of Determination and Industrial Applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179(8), 1346–1380. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2070-3>
- 5.2. Saqib, A. A. N., & Whitney, P. J. (2011). Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars. *Biomass and Bioenergy*, 35(11), 4748–4750. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.09.013>

6. Seguridad

6.1. Debe de tomarse condiciones especiales en caso de:

- 6.1.1. Formación de aerosoles.
- 6.1.2. Trabajo con grandes cantidades o concentraciones de microorganismos. Concentraciones elevadas se necesita trabajar en campana de flujo laminar para evitar propagación de aerosoles.
- 6.1.3. Exceso de material o personal.

6.2. Aplicar prácticas estandarizadas en laboratorio

- 6.2.1. Lavado frecuente de manos, especialmente después de quitarse los guantes y antes de salir del laboratorio.
- 6.2.2. Mantener una puerta cerrada mientras se trabaja.
- 6.2.3. Limitar el acceso al laboratorio.
- 6.2.4. No fumar, comer, beber, o almacenar alimentos en el laboratorio.
- 6.2.5. Colocar especial atención en condiciones en las que se puedan crear salpicaduras y aerosoles .
- 6.2.6. Descontaminar superficies de trabajo después de uso y después de cualquier derrame.
- 6.2.7. Descontaminar desechos del laboratorio o mandarlos a planta de tratamiento.
- 6.2.8. Utilizar pipetas mecánicas (no usar la pipeta por medio de succión oral).
- 6.2.9. Ser precavido al usar objetos punzantes.
- 6.2.10. Mantenimiento de un programa de control de insectos y roedores.
- 6.2.11. Uso de equipo de protección personal (bata de laboratorio, guantes de látex y protección para los ojos o máscaras para el rostro).

7. Equipo, materiales y reactivos

7.1. Equipo

- 7.1.1. Baño maría
- 7.1.2. Espectrofotómetro UV/VIS
- 7.1.3. pH metro

7.2. Materiales/ Cristalería

- 7.2.1. Erlenmeyer de 1000mL
- 7.2.2. Tubos de ensayo
- 7.2.3. Cubetas para espectrofotómetro
- 7.2.4. Kimwipes
- 7.2.5. Estufa
- 7.2.6. Termómetro

7.3. Reactivos

- 7.3.1. CMC
- 7.3.2. Ácido cítrico dihidratado
- 7.3.3. Ácido cítrico
- 7.3.4. NaOH
- 7.3.5. Glucosa anhidra
- 7.3.6. 3,5-ácido dinitrosalicílico
- 7.3.7. Sales de Rochelle (Tartarato de Na-K)

- 7.3.8. Agua destilada
- 7.3.9. Carbonato de sodio
- 7.3.10. p-nitro fenil β -D-glucopiranosido (pNPC)
- 7.3.11. P-nitrofenol (pNP)

7.4. Medicamentos

- 7.4.1. No aplica

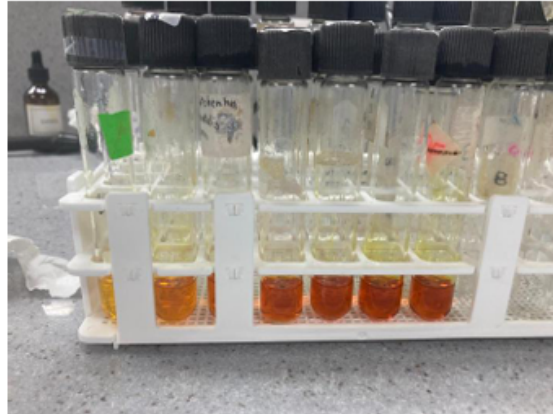
7.5. Material biológico

- 7.5.1. Fracción soluble recuperada de la fermentación en estado sólido (Ver SOP 21)

8. Procedimiento

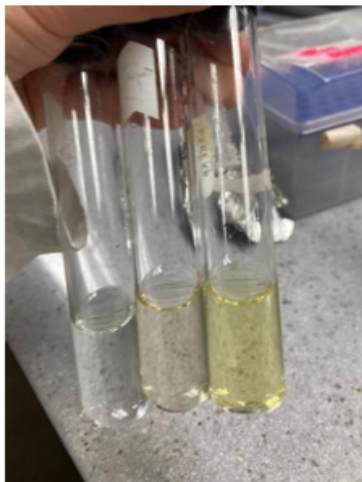
- 8.1. Preparación buffer de citrato 0.05 M (pH 4.8).
 - 8.1.1. En 800 mL de agua destilada, agregar 7.832 g de citrato de sodio dihidratado y 2.68 mL de ácido cítrico.
 - 8.1.2. Ajustar la solución al pH deseado con HCl o NaOH
 - 8.1.3. Agregar agua destilada hasta un volumen final de 1L.
- 8.2. Preparación de buffer acetato de sodio 0.1 M pH 4.8 (Receta para 1 litro)
 - 8.2.1. Pesar 2.396 g de acetato de sodio y agregar a 700 mL de agua destilada.
 - 8.2.2. Agregar 1.19 mL de ácido acético glacial dentro de campana.
 - 8.2.3. Ajustar la solución al pH deseado con HCL o NaOH
 - 8.2.4. Agregar agua destilada hasta un volumen final de 1 L.
- 8.3. Preparación de buffer de glicina 0.4 M pH 10-8 (Receta para 200 mL)
 - 8.3.1. Pesar 6.0056 g de glicina y disolver en 100 mL de agua destilada.
 - 8.3.2. Ajustar pH a 10.8 con HCL o NaOH según corresponda.
 - 8.3.3. Aforar con agua destilada hasta un volumen final de 200 mL.
- 8.4. Preparación del reactivo DNS (Receta para 1 litro)
 - 8.4.1. Pesar 10 gramos de ácido dinitrosalicílico (DNS) y 300 g de tartrato sódico-potásico (sal de Rochelle). Añadir a 800 mL de NaOH 0.5 N
 - 8.4.2. Calentar suavemente para disolver los reactivos
 - 8.4.3. Aforar con agua destilada hasta 1.0 L
- 8.5. Preparación de solución CMC al 1 % (Receta para 100 mL)
 - 8.5.1. Pesar 1 g de CMC y disolver en 100 mL de buffer citrato 0.05 M (pH 4.8)
- 8.6. Evaluación de la actividad enzimática de endo- β -1,4-glucanasa y carboximetilcelulosa
 - 8.6.1. Preparación de estándares de glucosa
 - 8.6.1.1. Preparar soluciones estándar de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 mg de glucosa/mL.
 - 8.6.2. Atemperar a 50 °C el extracto enzimático y la solución de CMC al 1 %.
 - 8.6.3. Se preparó un blanco de enzima, inactivando la enzima por medio de un calentamiento a 100 °C en un baño maría durante 15 minutos.
 - 8.6.4. Para un volumen final de 1.0 mL de mezcla de reacción, agregar 0.7 mL de la muestra de enzima y 0.3 mL de una solución de CMC al 1 % (p/v) en 50 mM de buffer de citrato (pH 4.8).
 - 8.6.5. Incubar la muestra, los estándares de glucosa, el blanco de reacción y el blanco de enzima a 50 °C durante 30 minutos en un baño maría.
 - 8.6.6. Agregar 3.0 mL de DNS a las muestras, a los estándares de glucosa, al blanco de la reacción y al blanco de enzima.
 - 8.6.7. Ebulir por 5 minutos exactos en un baño de agua vigoroso que contenga suficiente agua. Todas las muestras, blancos y estándares de glucosa y el cero del espectro deben ser ebulidos juntos. Transcurrido este tiempo, transferir inmediatamente a un baño de agua frío.
 - 8.6.8. Mezclar invirtiendo completamente el tubo varias veces para que la solución se separe del fondo del tubo en cada inversión.

- 8.6.9. Medir el color formado del espectro cero a 540 nm. El color formado en el blanco de enzima es restado del valor de la muestra.
- 8.6.10. Emplear la absorbancia del tubo de muestra para determinar la producción de glucosa durante la reacción utilizando una curva estándar de glucosa.
- 8.6.11. Construir una curva de concentración de glucosa vs la absorbancia registrada a 540 nm. Usando la curva estándar, emplear los valores de absorbancia de los tubos de la muestra (después de la sustracción del blanco de enzima) en concentración de glucosa (μg de glucosa producida durante la reacción).
- 8.6.12. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima requerida para liberar $1 \mu\text{mol}$ de azúcares reductores por minuto en las condiciones del ensayo.



A la izquierda se observa el blanco de la reacción, seguida del blanco de enzima y las muestras del extracto enzimático

- 8.7. Determinación de la actividad de β -glucosidasa
 - 8.7.1. Preparación de estándares de p-nitrofenol
 - 8.7.1.1. Preparar soluciones estándar de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 y 6.0 mg de glucosa/mL a partir de una solución madre de 20 mg/mL de p-nitrofenol.
 - 8.7.2. Atemperar a 50°C el extracto enzimático.
 - 8.7.3. Se preparó un blanco de enzima, inactivando la enzima por medio de un calentamiento a 100°C durante 15 minutos.
 - 8.7.4. En un tubo de ensayo, agregar 1.8 mL de buffer acetato 0.1 M pH 4.8 y 0.4 mL de una solución 5 mM p-nitrofenol- β -D-glucósido en buffer de acetato de sodio 0.1 M pH 4.8. Equilibrar en un baño maría a 50°C .
 - 8.7.5. Agregar 0.8 mL de la muestra de enzima. Incubar durante 30 minutos a 50°C . Incluir un blanco de reacción y un blanco de enzima (inactivada)
 - 8.7.6. Agregar 4.0 mL de buffer de glicina para detener la reacción.
 - 8.7.7. Mezclar invirtiendo completamente el tubo varias veces para que la solución se separe del fondo del tubo en cada inversión.
 - 8.7.8. Medir el color formado del espectro cero a 430 nm. El color formado en el blanco de enzima es restado del valor de la muestra.
 - 8.7.9. Emplear la absorbancia del tubo de muestra para determinar la producción de p-nitrofenol durante la reacción utilizando una curva estándar de p-nitrofenol.
 - 8.7.10. Construir una curva de concentración de p-nitrofenol vs la absorbancia registrada a 430 nm. Usando la curva estándar, emplear los valores de absorbancia de los tubos de la muestra (después de la sustracción del blanco de enzima) en concentración de p-nitrofenol (μmol de p-nitrofenol producida durante la reacción).
 - 8.7.11. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima requerida para liberar $1 \mu\text{mol}$ de p-nitrofenol por minuto en las condiciones del ensayo.



A la izquierda se observa el blanco de la reacción, seguida del blanco de enzima y la muestra del extracto enzimático

9. Esterilización de material

No aplica

10. Cálculos

$$\frac{U}{g} = \frac{\mu\text{mol producto}}{\text{tiempo de reacción} \times \text{volumen enzima} \times \text{peso del sustrato empleado}} \times \text{volumen extracto enzimático recuperado}$$

11. Control de calidad

11.1. Se trabajará en triplicado

11.2. Verificar que el almacenamiento de muestras y reactivos sea el adecuado 4°C, -20°C o -80°C.

12. Conflict solution policy

12.1. Se puede llegar a requerir un mayor volumen de extracto enzimático crudo y un menor volumen de sustrato para mejorar la detección de actividad enzimática, en caso de que la enzima esté muy diluida.