

Evaluación de la actividad lignocelulolítica de hongos cultivados en subproductos de la palma de aceite (*Elaeis guineensis*)*

Evaluation of the lignocellulolytic activity of fungi grown on oil palm byproducts (*Elaeis guineensis*)

RUBIANO-OROZCO, LUIS-ANTONIO¹; CASTRO-PACHECO, ANDREA-CAROLINA²; JIMÉNEZ-ROJAS, FARYULY³; FRAGOSO-CASTILLA, PEDRO-JOSE⁴; IBARRA-PONTÓN, ALDO-JESUS⁵; RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ, DALIA-MILENA⁶

Historial del artículo

Recibido para evaluación: 7 de mayo 2023

Aprobado para publicación: 14 de noviembre 2023

- 1 Universidad Popular del Cesar, Facultad de Ciencias de la Salud, Grupo de investigación Parasitología Agroecología Milenio. Estudiante de Maestría en Ciencias Ambientales. Valledupar, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-2754-5348>.
- 2 Universidad Popular del Cesar, Facultad de Ciencias de la Salud, Grupo de Investigación Parasitología Agroecología Milenio. Microbióloga. Valledupar, Colombia. <https://orcid.org/0009-0003-1178-6440>.
- 3 Universidad Popular del Cesar, Facultad de Ciencias de la Salud, Grupo de investigación Parasitología Agroecología Milenio. Microbióloga. Valledupar, Colombia. <https://orcid.org/0009-0006-3722-4798>.
- 4 Universidad Popular del Cesar, Facultad de Ciencias de la Salud, Grupo de investigación Parasitología Agroecología Milenio. PhD. Medicina Tropical. Valledupar, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-3437-8664>.
- 5 Universidad Popular del Cesar, Facultad de Ciencias de la Salud, Grupo de investigación Parasitología Agroecología Milenio, MSc Ciencias Agrarias. Valledupar, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-9937-4488>.
- 6 Centro de Desarrollo Tecnológico del Cesar, MSc Ciencias Agrarias. Valledupar, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-5860-9765>

Correspondencia: luisrubiano@unicesar.edu.co

Cómo citar este artículo

RUBIANO-OROZCO, LUIS-ANTONIO; CASTRO-PACHECO, ANDREA-CAROLINA; JIMÉNEZ-ROJAS, FARYULY; FRAGOSO-CASTILLA, PEDRO-JOSE; IBARRA-PONTÓN, ALDO-JESUS; RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ, DALIA-MILENA. Evaluación de la actividad lignocelulolítica de hongos cultivados en subproductos de la palma de aceite (*Elaeis guineensis*). Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, v. 22, n. 1, 2024, p. 70-86. Doi: <https://doi.org/10.18684/rbsaa.v22.n1.2024.2304>

RESUMEN

En la cadena de producción de aceite de palma se generan grandes cantidades de subproductos con alto contenido lignocelulolítico, representando un importante recurso renovable neutral en carbono para la producción de biomateriales, sin embargo, se requiere un método de pretratamiento para superar las barreras físicas y químicas presentes en el compuesto de lignina-carbohidrato. El objetivo de esta investigación fue aislar e identificar hongos lignocelulolíticos con capacidad biodegradadora de subproductos de palma de aceite, derivados de la explotación palmera en el departamento del Cesar, Colombia. Los hongos fueron aislados en agar papa dextrosa e identificados según sus características macroscópicas y microscópicas. Se evaluó la actividad lacasa (Oxidación ABTS) y endoglucanasa (CMCasa) durante 13 días por fermentación de estado sólido de 3 subproductos: torta de palmiste, cuesco y fibra. Los subproductos biodegradados se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Se cuantificaron 12 aislamientos agrupados en 2 géneros, *Aspergillus sp* y *Trichoderma sp*. Además, del hongo *Pleurotus ostreatus*, adquirido comercialmente. La actividad endoglucanasa más alta (0,12 UI/mL) en las condiciones estudiadas, no evidenciaron significancia estadística para cada una de los hongos evaluados ($p > 0,05$), a diferencia de la actividad lacasa (203,33 UI/g) ($p < 0,05$). Los hongos aislados poseen el potencial para mejorar la biodegradabilidad de los subproductos de la palma de aceite, enfocado como estrategia ecológica y sustentable.

ABSTRACT

In the production chain of palm oil, large amounts of lignocellulosic subproducts are generated, representing an important neutral carbon renewable resource for the production of biomaterials, however, a pre-treatment method is required to overcome the physical and chemical barriers present in the lignin-carbohydrate compound. The objective of this research was to isolate and identify lignocellulolytic fungi capable of biodegrading palm oil subproducts, derived from palm exploitation in the Cesar department, Colombia. The fungi were isolated on potato dextrose agar and identified based on their macroscopic and microscopic characteristics. The laccase activity (ABTS oxidation) and endoglucanase activity (CMCase) were evaluated during 13 days through solid-state fermentation of three subproducts: palm kernel cake, palm kernel shell, and fiber. The biodegraded subproducts were analyzed using scanning electron microscopy (SEM). A total of 12 isolates were quantified and grouped into 2 genera, *Aspergillus sp* and *Trichoderma sp*. Additionally, the commercially acquired *Pleurotus ostreatus* fungus was also used in the study. The highest endoglucanase activity (0,12 IU/mL) under the studied conditions did not show statistical significance for each of the evaluated fungi ($p > 0.05$), in contrast to the laccase activity (203,33 IU/g) ($p < 0,05$). The isolated fungi have the potential to improve the biodegradability of palm oil subproducts, with a focus on an ecological and sustainable strategy.

PALABRAS CLAVES:

Hongo; Palma de aceite; Fermentación; Enzima lignocelulolítica; Subproducto; Actividad lacasa; Actividad endoglucanasa; Lignina; Celulosa; Biomasa.

KEYWORDS:

Fungi; Oil palm; Fermentation; Lignocellulolytic enzyme; Subproduct; Laccase activity; Endoglucanase activity; Lignin; Cellulose; Biomass.

INTRODUCCIÓN

Anualmente se producen a nivel mundial 200 millones de ton de subproductos derivados del sector palmero, de los cuales solo el 10 % es utilizado dado que la práctica habitual es quemarlos, favoreciendo las emisiones de CO₂ a la atmosfera (Bustamante *et al.*, 2017). De acuerdo con la Federación Nacional de Cultivadores de Palma de Aceite (FEDEPALMA), Colombia se posiciona como el cuarto país productor de aceite crudo de palma, registrando en el año 2021 más de 595.722 ha sembradas con este cultivo (*Elaeis guineensis*), con una producción neta de 1.627.550 ton de aceite, lo que equivale a un estimado de producción de 7.882.225 ton de racimos de fruta fresca y 312.512 ton de torta de palmiste como subproductos del proceso (FEDEPALMA, 2022).

La utilización de residuos agroindustriales como sustratos para procesos fermentativos ha cobrado gran importancia en la producción de bioenergía y biomateriales (Gutiérrez *et al.*, 2020). El Departamento del Cesar, con alrededor de 77.869 ha sembradas con palma de aceite, ofrece el potencial de integrar los subproductos resultantes del proceso de extracción del aceite de palma, como promisoría fuente de materia prima en el desarrollo de suplementos alimenticios para el ganado bovino, particularmente en la temporada seca, contribuyendo de esta manera a la disminución del impacto ambiental generado por estos residuos y al fortalecimiento de esta actividad agropecuaria en el departamento de manera social y rentable (Van Dam, 2016; FEDEPALMA, 2020).

Debido a la heterogeneidad estructural y la complejidad que caracterizan a los subproductos de la palma de aceite (celulosa 20-39,5 %, hemicelulosa 22-35,3 % y lignina 22-50,7 %) (Van Dam, 2016), los hongos necesitan producir un amplio conjunto de actividades glicosil hidrolasa y enzimas oxidativas para realizar la descomposición de los polisacáridos vegetales en sus constituyentes monoméricos (Piccinni *et al.*, 2019; Ma *et al.* 2021). Dentro de los componentes más importante del sistema enzimático se incluyen endoglucanasas, exoglucanasas, xilanasas, otras que degradan oligosacáridos, β -glucosidasa, óxidorreductasas, como lacasas, manganeso peroxidasa y ligninaperoxidasa (Kirk and farrell, 1987; Hernández *et al.*, 2018; Abraham *et al.* 2020).

Caracterizar nuevos aislamientos con potencial lignocelulolítico en diferentes sustratos, representa un factor esencial para el fortalecimiento de la industria biotecnológica y la comunidad científica, (Troiano *et al.*, 2020). Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue aislar e identificar hongos lignocelulolíticos con capacidad biodegradadora mediante fermentación en estado sólido de subproductos de la palma de aceite a partir de ambientes comerciales productivos influenciados por la explotación palmera en el departamento del Cesar – Colombia.

MÉTODO

Área de estudio

Los subproductos de la palma de aceite fueron obtenidos de la planta extractora Palmagro S.A (Latitud: 9°39'27.5"N. Longitud: 73°33'56.8"W), ubicada en el Km 5 Vereda el Hatillo, Corregimiento la Loma de Calentura, Departamento del Cesar, Colombia (Figura 1).

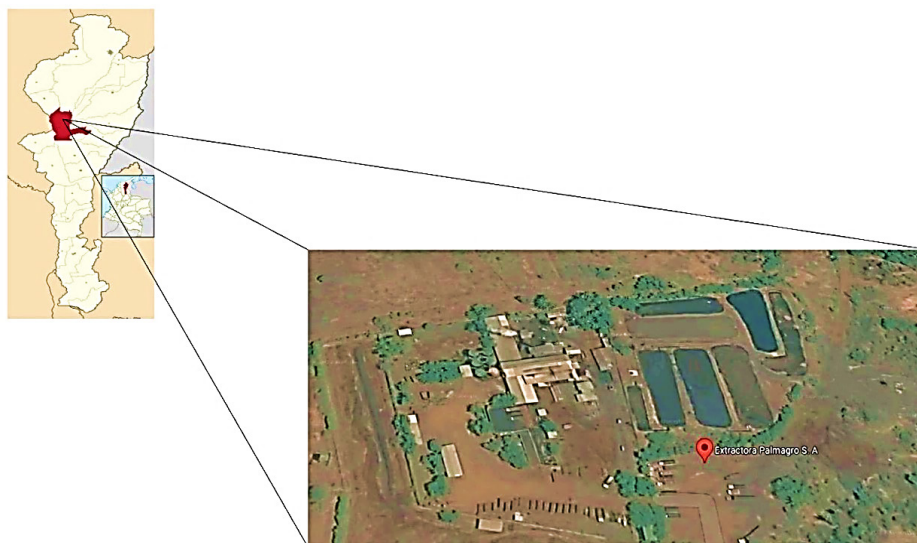


Figura 1. Planta extractora de aceite de palma Palmagro S.A.

Recolección de la muestra

Se colectaron subproductos parcialmente biodegradados y previamente descartados (torta de palmiste, fibra y cuesco), mediante la metodología de transepto y muestras integradas (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, AGROSAVIA, 2017). Las muestras se almacenaron en bolsas plásticas correctamente rotuladas y almacenadas temporalmente en refrigeración, las que posteriormente fueron trasladadas al laboratorio del grupo de investigación “Parasitología Agroecología Milenio” (PAM) de la Universidad Popular del Cesar, en la ciudad de Valledupar, para su respectivo análisis.

Aislamiento e identificación de hongos

Los hongos lignocelulolíticos fueron aislados mediante impresión directa de los residuos de la palma de aceite en cajas de Petri con agar papa dextrosa (PDA) y se incubaron a temperatura ambiente (30 ± 2 °C), durante siete días. Como control negativo, se incubó una placa del agar sin inocular. Las colonias de hongos filamentosos crecidas fueron purificadas mediante la transferencia de micelio en nuevas placas con agar PDA (Zhang *et al.*, 2021). Finalmente, los aislamientos fueron identificados hasta el género empleando las claves de Gilman (1963) y Barnett and Hunter (1998), basados en las características macroscópicas y microscópicas de las colonias, además, se incluyó el hongo de pudrición blanca *Pleurotus ostreatus*, basidiomiceto obtenido de una colección de hongos del laboratorio del grupo de investigación PAM.

Antagonismo *in vitro* por consorcios

Se evaluó la capacidad de biocontrol mutuo por antagonismo de las cepas aisladas en cultivos mixtos. La habilidad antagonista se caracterizó con el índice de biocontrol (IBC), basado en el análisis de imágenes, calculado con la siguiente ecuación: $IBC = (\text{área cm}^2 \text{ de colonia de la cepa 1} / \text{área total ocupada por las dos o tres cepas}) \times 100$ en agar PDA a 25 °C (Allaga *et al.*, 2021), aplicando tres réplicas de las combinaciones evaluadas.

Fermentación en Estado Sólido (SSF)

Se llevó a cabo la conversión de biomasa lignocelulolítica mediante un método de fermentación en estado sólido de acuerdo con la metodología propuesta por Zhou *et al.* (2015) y Chan *et al.* (2016). Los subproductos fueron secados y posteriormente cortados (≈ 2 mm Thomas Model 4 Wiley® Mill). Se realizaron cultivos de hongos en bolsas de polipropileno distribuyendo 98 % de cada residuo de la palma y 2 % de carbonato de calcio (porcentajes en base seca) al 60 % de humedad y pH 5,5. Luego fueron llevados a esterilización a 121 °C por 30 min (Montoya *et al.*, 2014) y los sustratos fueron inoculados al 4 % y llevados a incubación por 13 días en poca luz a 30 °C para cada uno de los tratamientos estipulados.

Los extractos para la determinación enzimática (endoglucanasa y lacasa) fueron obtenidos por la adición de 10 mL de agua destilada estéril neutro a 1 g de medio sólido fresco, sometido a agitación por 10 min con posterior filtración y centrifugación. La actividad se determinó en unidades internacionales (UI) de sobrenadante de acuerdo lo establecido en la Unión Internacional de química pura y aplicada (IUPAC).

Actividad endoglucanasa

Se usó Carboximetil Celulosa (CMC) como sustrato al 1 %, en buffer citrato de sodio 50 mM pH=4, en reacción con 500 μ L de extracto enzimático, por 3 horas a 50 °C (volumen total 1000 μ L). La reacción enzimática se detuvo con la adición del reactivo ácido dinitrosalicílico (DNS). Se continuó con la reacción de DNS para la determinación de azúcares reductores, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de azúcares reductores en un minuto (Piccinni *et al.*, 2019).

Actividad lacasa

Para la actividad de lacasa, la mezcla de reacción (volumen total 1000 μ L) contenía 500 μ L de extracto enzimático y 1 mM de 2,2'-Azinobis-3-etil-benzo-tiazolina-6-ácido sulfónico (ABTS) en tampón citrato de sodio 47,6 mM a pH 4,5. La reacción se controló midiendo la oxidación ABTS a 436 nm y 30 °C durante 10 minutos cada minuto. Una unidad de actividad de lacasa fue definida como la cantidad de enzima requerida para oxidar 1 μ mol de ABTS en 1 minuto (Durán *et al.*, 2022).

Análisis de microscopía electrónica de barrido

Se obtuvo una micrografía electrónica de barrido para observar y analizar los cambios físicos de los sustratos tratados. Se tomaron imágenes con un microscopio electrónico de barrido (SEM) Thermo Scientific Apreo (Quanta 250 FEG, FEI Co., Salt Lake, UT, EE. UU.). Las muestras secas a analizar se recubrieron con una fina capa de oro durante 30 segundos, utilizando un dispositivo de pulverización iónica SEM y se fijaron al portamuestras.

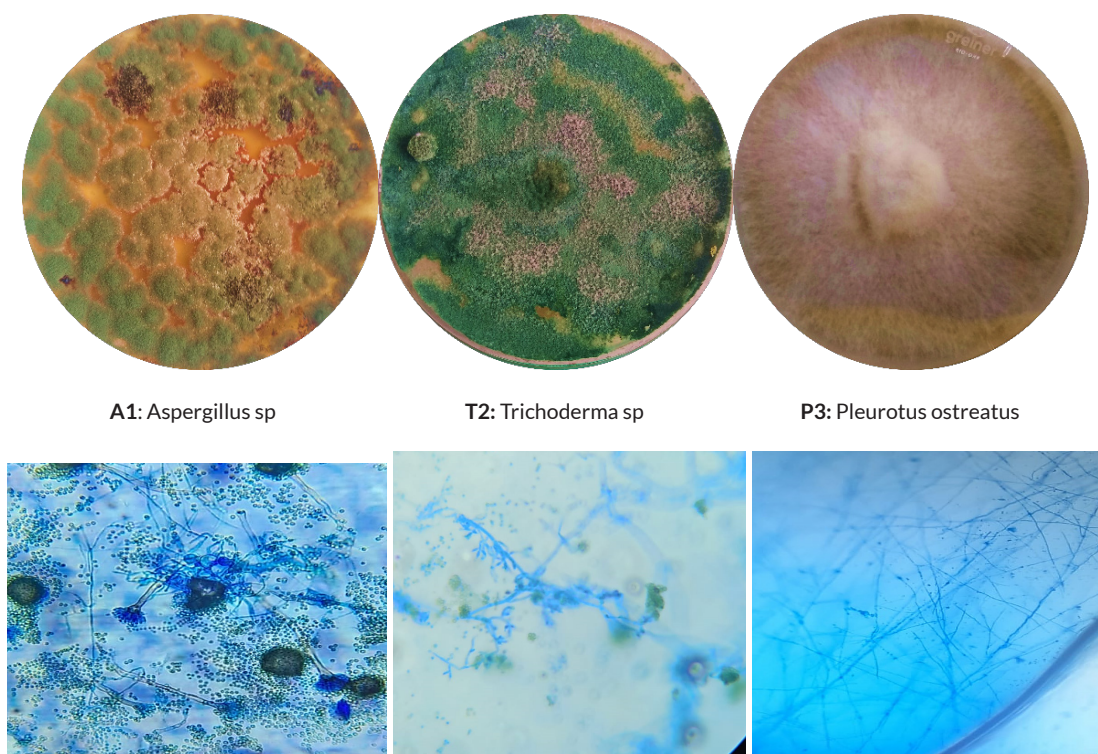
Análisis de variables

Una vez comprobados los supuestos del análisis de varianza, los datos experimentales se analizaron mediante ANOVA (multifactorial) y prueba de comparación de medias (Test de Duncan) con un nivel de confianza del 95 %, mediante el software estadístico R studio versión 4.1., tomando como factores las cepas a 4 niveles, 3 subproductos y 5 horas de estudio diferentes. Como variable de respuesta la actividad endoglucanasa y lacasa.

RESULTADOS

Aislamiento e identificación de hongos filamentosos

Se lograron cuantificar un total de 12 aislamientos agrupados en 2 géneros (con las mismas características en cada grupo). El número de aislamientos más frecuentes correspondió al género *Aspergillus* (A1), obteniendo el 67 % respecto del total y, en menor porcentaje, se identificó el género *Trichoderma* (T2) con el 33 %. Además, se logró aislamiento del hongo basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* (P3) (Figura 2).



Conidióforos teñidos con azul de lactofenol (40X).

Figura 2. Morfología macroscópica y microscópica de los aislamientos A1; T2; P3 en agar PDA.

El porcentaje de ocurrencia y diversidad obtenida entre *Aspergillus* y *Trichoderma* en el proceso de aislamiento, puede estar atribuida a la capacidad productora de enzimas lignocelulolíticas que son excretadas al medio, las cuales promueven la hidrólisis de las estructuras complejas formadas por la lignocelulosa presente, respondiendo de esta manera a las condiciones ambientales y nutricionales (Zubieta *et al.*, 2021), tal como lo menciona Nirmalasari *et al.* (2022), donde la sombra y la ubicación geográfica de un cultivo, la edad del material vegetal, así como la presencia o ausencia de microbiota, patógena son factores determinantes en la presencia de dichos hongos.

La dinámica de los géneros aislados a partir de los residuos de la palma de aceite en descomposición, exhibió un nicho ecológico apropiado para el aislamiento de cepas fúngicas con potencial enzimático. En estudios similares se describió el aislamiento de hongos productores de celulasas en residuos de palma de aceite, específicamente por *Aspergillus terreus* (Shahriarinnour *et al.*, 2011), similar a lo obtenido por Hernández *et al.* (2018), donde

lograron el aislamiento y caracterización molecular (ITS1 e ITS4) de *Trichoderma koningiopsis* y *Trichoderma asperellum*, a partir de racimos vacíos de palma en descomposición, cuya variedad fúngica presentó un potencial enzimático para dicho residuo.

Prueba de antagonismo

En el cuadro 1 se detallan los resultados del índice de biocontrol de la prueba antagónica, basada en la adaptación y crecimiento de los consorcios de los hongos aislados.

Cuadro 1. Valores de índice de Biocontrol (IBC) de cepas cultivadas en agar PDA.

Área total (cm ²) ocupada por el enfrentamiento de hongos aislados								
Enfrentamiento 1		Enfrentamiento 2		Enfrentamiento 3		Enfrentamiento 4		
A1	T2	A1	P3	T2	P3	A1	T2	P3
10,529 ± 0,806	89,471 ± 0,226	3,669 ± 0,426	96,331 ± 0,878	56,841 ± 0,264	43,159 ± 0,581	7,275 ± 0,323	38,479 ± 0,367	54,253 ± 0,465

Medias de 3 repeticiones ± desviaciones estándar. A1: *Aspergillus sp*; T2: *Trichoderma sp*; P3: *Pleurotus ostreatus*.

La agresividad de control entre las cepas se consideró alta, moderada y baja si los valores de IBC eran >85, 60-85 y <60, respectivamente. Se logró observar que A1 fue controlada de manera agresiva por las cepas T2 y P3 (IBC: 89,471 y 96,331), colonizando al menos 2/3 del medio, y que el efecto es similar cuando se crecen las tres cepas en consorcio (Figura 3). Probablemente T2 y P3 poseen algún mecanismo de antagonismo frente A1, que le otorga ventajas competitivas por espacio y posiblemente por nutrientes, sin embargo, estas capacidades no son determinantes sobre la actividad lignocelulolítica.

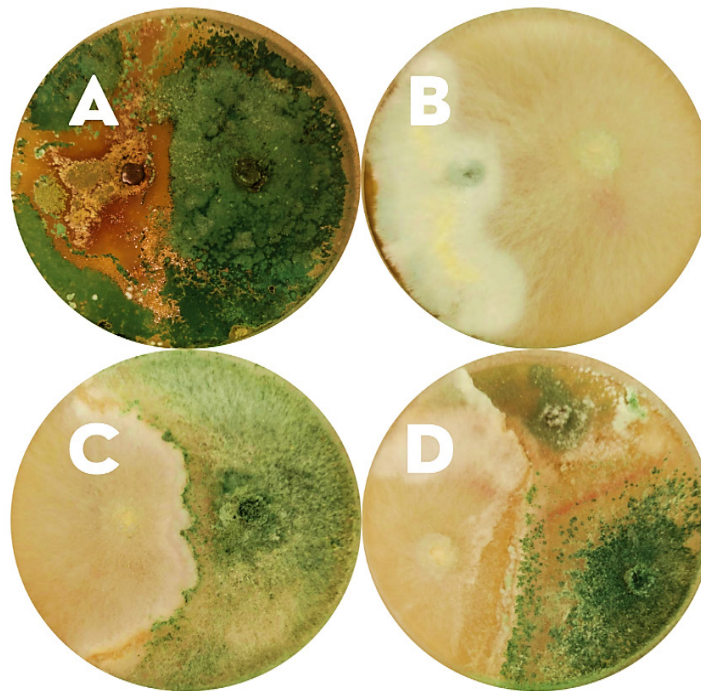


Figura 3. Aspecto de confrontación antagónica en agar PDA. A. A1 vs. T2. B. A1 vs P3. C. P3 vs T2. D. A1 vs T2 vs P3.

El comportamiento antagónico obtenido puede atribuirse a la capacidad de estos hongos, especialmente *Trichoderma*, de excretar complejos enzimáticos (lignocelulolíticas, quitinolíticas, proteolíticas, y glucanolíticas) involucrados en procesos como autólisis, germinación de esporas, ramificación y desarrollo de micelios, crecimiento de hifas, nutrición, separación de células y micoparasitismo (Zeilinger *et al.*, 2016; Di Cologna *et al.*, 2018), así mismo por la secreción de metabolitos con acción antibiótica, que suministran tolerancia a condiciones estresantes y favorecen la competencia por espacio y sustrato (Segaran and Sathiavelu, 2019).

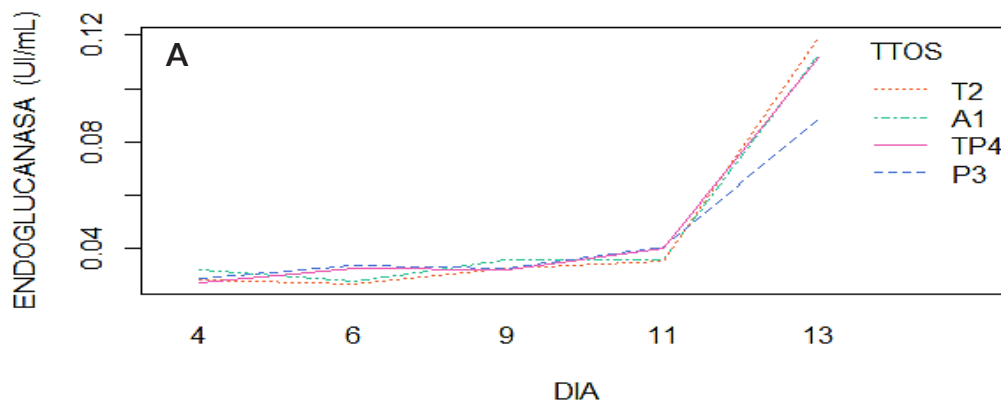
El bajo crecimiento de *Aspergillus* en este estudio fue similar a lo encontrado por Zubieta *et al.* (2021), la cual fue inhibida en más de un 71,9 % al ser enfrentada contra tres cepas de *Trichoderma sp*, cuyo comportamiento vario dependiendo la composición nutricional del medio de cultivo. El enfrentamiento de *Trichoderma* y *Pleurotus* evidenció que ambos colonizaron más de 1/3 del medio de cultivo (% IBC: 56,8 y 43,2) representando una baja competencia por espacio, similar a lo encontrado por Innocenti *et al.* (2019), los cuales evidenciaron que el micelio de *Trichoderma* es más competitivo que el micelio del hongo *Pleurotus*, por espacio y nutrientes, mientras que no se observó interacción de hifas ni ningún efecto por metabolitos volátiles o no volátiles. La prueba antagónica permitió establecer un total de 4 tratamientos a evaluar (Cuadro 2).

Cuadro 2. Tratamientos establecidos para la fermentación en fase sólida.

TRATAMIENTOS (TTOS)	CEPAS
A1	<i>Aspergillus sp</i>
T2	<i>Trichoderma sp</i>
P3	<i>Pleurotus ostreatus</i>
TP4	<i>Trichoderma sp</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i>

Actividad endoglucanasa

La actividad endoglucanasa de las cepas en estudio se presentan en la Figura 4. Se realizaron a partir de 96 horas teniendo en cuenta una curva patrón con glucosa 0;1, 0,7, 1, 2 y 3 mg/mL con DNS.



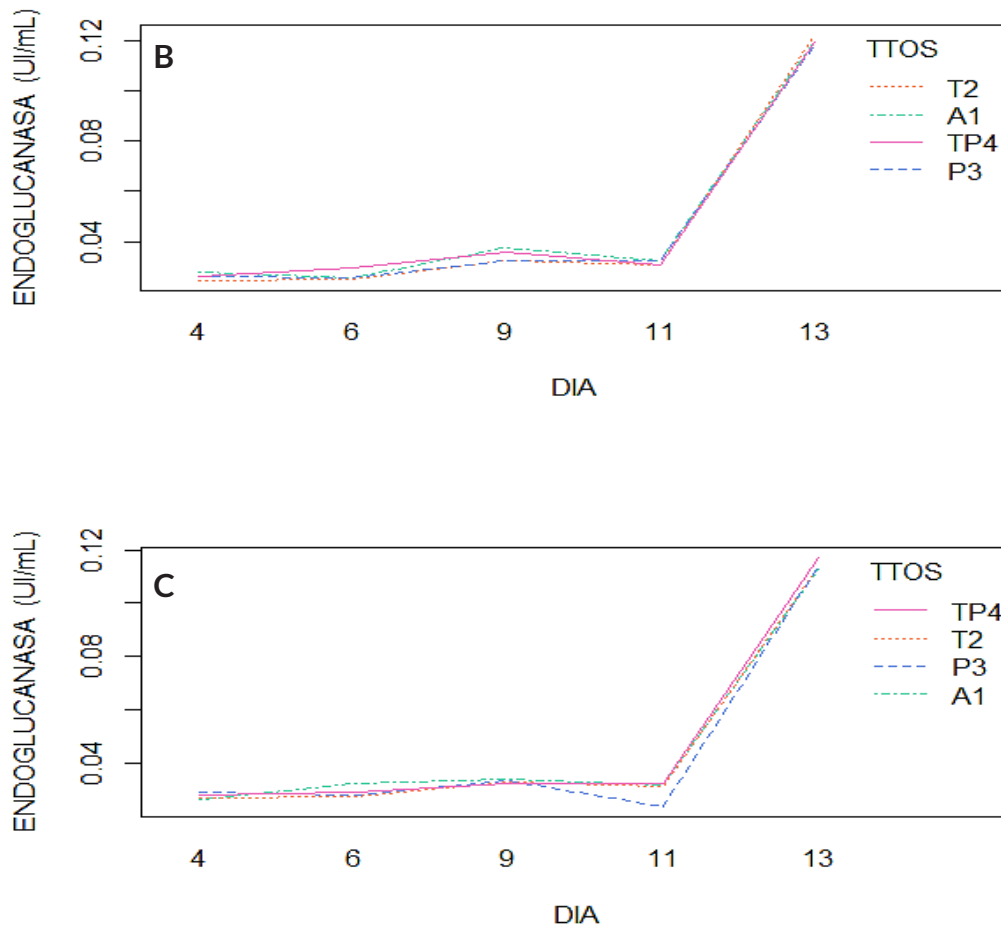


Figura 4. Actividad endoglucanasa (UI/mL) de las cepas en estudio a los 13 días de cultivo. A. Torta de palmiste. B. Cuesco. C. Fibra.

En los tres residuos de la palma de aceite, las cepas en estudio mantuvieron un comportamiento similar a lo largo del tiempo evaluado ($p > 0,05$), con actividades que oscilaron entre 0,02 y 0,12 UI/mL. Destaca la cepa T2 por alcanzar la actividad enzimática más alta, registrando 0,119 y 0,122 UI/mL en torta de palmiste y cuesco, respectivamente. La cepa TP4, compuesta por los hongos *Trichoderma* y *Pleurotus*, también exhibió una actividad notable de 0,117 UI/mL sobre fibra, resultados que podrían verse influenciados por factores de represión enzimática inducida por azúcares reductores, que funcionan como mecanismo de retroalimentación negativa para regular la producción en sustratos con diferentes niveles de celulosa (Zilly *et al.*, 2012).

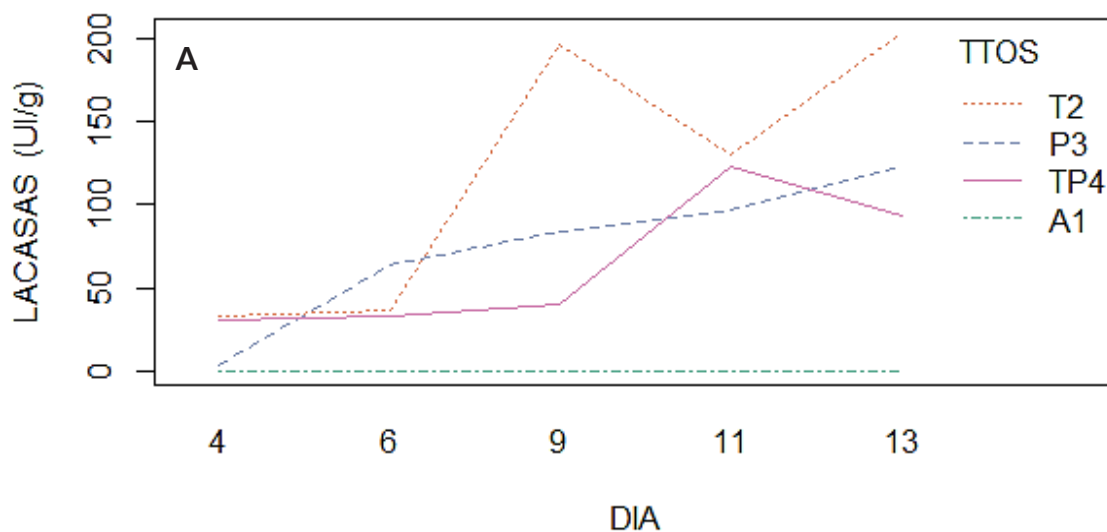
En comparación con otras cepas evaluadas en subproductos de palma de aceite, Hernández *et al.* (2018), aislaron 8 cepas de *Trichoderma* a partir de racimos de palma de aceite y obtuvieron una producción promedio de celulasas sobre papel filtro de 0,07 UI/mL, actividad inferior a la obtenida en esta investigación. Estas diferencias podrían estar relacionadas con la concentración total de celulosa en los sustratos, la proporción de endo/exocelulasas, el tiempo de reacción y las características del sustrato (Ramírez and Izasa, 2019).

En un estudio similar publicado por Manjarrés *et al.* (2011), se evaluó la actividad endoglucanasa mediante el cocultivo de *Aspergillus sp* y *Trichoderma sp* en fase sólida de racimos vacíos de palma, durante 16 días de cultivo, tras un pretratamiento previo con *Pleurotus ostreatus*. Los mayores valores se obtuvieron con *Aspergillus sp* como cepa individual (0,329 UI/mL) a los 2 días de cultivo y luego disminuyó durante el tiempo del ensayo, comportamiento que puede estar atribuido a la necesidad metabólica del hongo, en producir endoglucanasas para degradar el sustrato en su primera fase de crecimiento.

La máxima actividad celulolítica de los hongos aislados en esta investigación se registró entre los días 11 y 13 de fermentación, indicando que en este período la biomasa fúngica es más eficiente en la producción de endoglucanasas. Este tiempo puede estar influenciado por la presencia de una sola fuente de carbono en el cultivo y la ausencia de inductores. Según Zhang *et al.* (2021), las enzimas producidas en cultivos de *Trichoderma* y *Pleurotus* sobre tallo de maíz permanecieron activas durante 30 días, aunque con variabilidad entre cepas debido a diferencias en la tasa de crecimiento, adaptabilidad y expresión enzimática en las etapas iniciales de fermentación, por lo tanto, un período de fermentación superior a 11 días se consideraría esencial para la producción de enzimas con los aislados fúngicos obtenidos.

Actividad lacasa

En cuanto a la actividad lacasa, se logró observar que la cepa T2 alcanzó la actividad enzimática más alta (203,33 UI/g) en torta de palmiste, seguido de P3 y TP4 con 123,33 UI/g a partir del día 11 de cultivo, mientras que para la cepa A1 fue significativamente bajo ($p < 0,05$). Los subproductos cuesco y fibra, representaron un sustrato poco estimulante para la actividad lacasa para cada uno de los tratamientos (Figura 5).



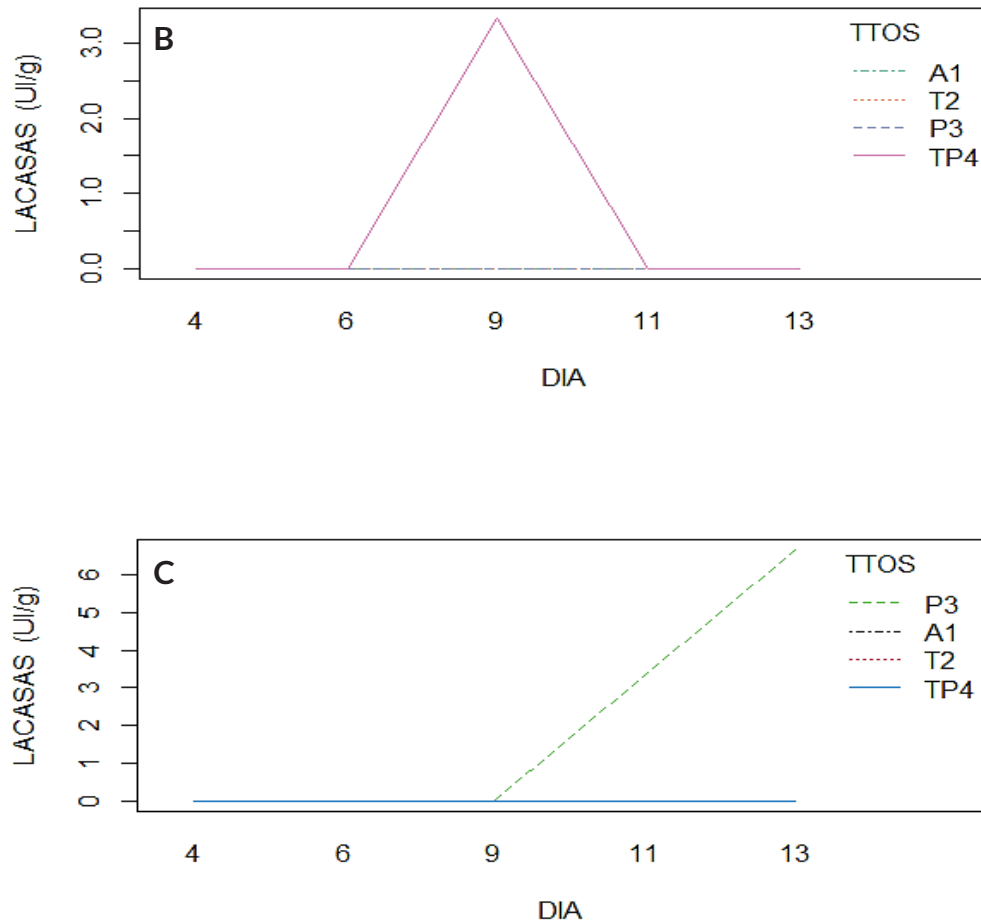


Figura 5. Actividad lacasa (UI/g) de las cepas en estudio a los 13 días de cultivo. A. Torta de palmiste. B. Cuesco. C. Fibra.

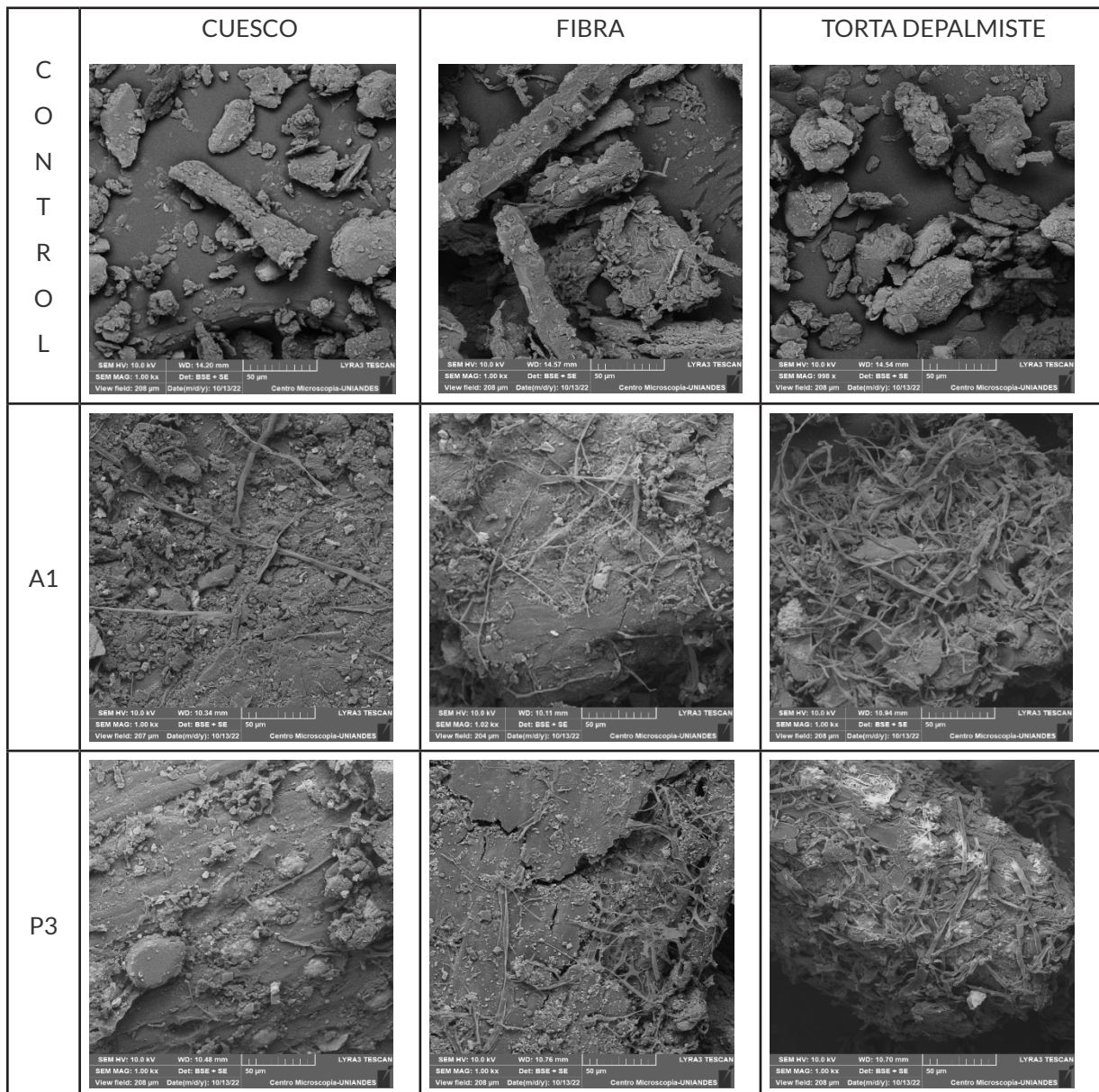
En estudios similares se ha determinado la producción de lacasa por diferentes géneros pertenecientes a las clases de hongos ascomycota y basidiomycota. Meehnian *et al.* (2017), mediante una fermentación de estado sólido con el cocultivo *A. flavida* y *P. radiatas* sobre tallos de algodón, luego de un periodo de 20 días, registraron una actividad lacasa máxima de 14,19 UI/g. Por otra parte, Hafid *et al.* (2021), evaluaron el cultivo estático de *P. sanguineus* utilizando racimos vacío de fruto de palma previamente tratados, obteniendo la actividad lacasa más alta (11,901 U/mL) a 30 °C, detectando una disminución de la actividad al incrementar la temperatura a 35 °C. Una temperatura inestable durante el proceso fermentativo reduce las actividades enzimáticas, a causa de cambios conformacionales como el plegamiento, en consecuencia, menor absorción enzima/sustrato (Baig, 2020), dicha variable pudo influir en el comportamiento obtenido en esta investigación.

Teniendo en cuenta los patrones de producción de enzimas de una serie de cepas de hongos de pudrición blanca, Kuhar *et al.* (2007), propuso su división en cuatro categorías: (i) lacasa y dos peroxidasa (MnP, LiP); (ii) lacasa y una peroxidasa; (iii) lacasa únicamente; y (iv) peroxidasa(s) solamente, por consiguiente, los niveles obtenidos por T2, P3 y TP4, en relación a A1 estarían involucrados con el sinergismo de las vías metabólicas del complejo enzimático (Bugg *et al.*, 2011; Abdel-Hamid *et al.*, 2013), especialmente con la enzima manganeso peroxidasa; cuyos valores ocurren a partir del día 8 o 10 de cultivo (Cruz *et al.*, 2020)

El método utilizado en esta investigación para medir la actividad lacasa, puede proporcionar una buena aproximación, sin embargo, cada cepa de hongo produce diferentes tipos de lacasas con una afinidad específica por el compuesto de referencia (ABTS), por lo que se recomienda realizar análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para controlar la oxidación de estructuras fenólicas “similares a la lignina” (es decir, OH-dilignol) (Durán *et al.*, 2021).

Análisis de microscopía electrónica de barrido

Las imágenes SEM evidenciaron los cambios físicos ocurridos durante la fermentación en estado sólido (Figura 6). En el caso de los subproductos sin tratar, presentaron una estructura fibrilar, áspera y compacta, posiblemente por el proceso previo de molienda y la concentración de CaCO_3 utilizada.



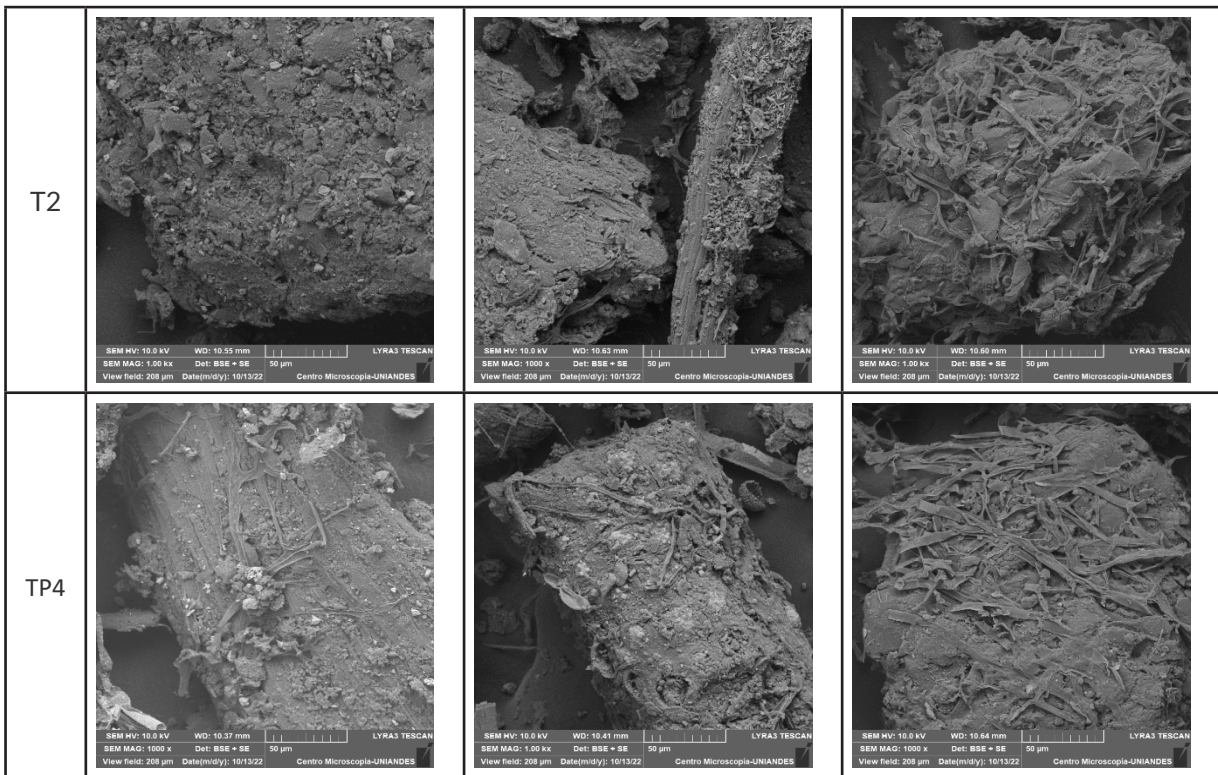


Figura 6. Imágenes de microscopio electrónico de barrido(aumento de 1,00 kx) de subproductos de palma de aceite después de 13 días de fermentación.

Todos los tratamientos mostraron una tendencia de crecimiento fúngico en la región exterior de los subproductos, con una biodegradación somera dentro de las estructuras internas, siendo la torta de palmiste el subproducto con la mayor adsorción hifa/ sustrato, fenómeno que puede estar atribuido a la alta rugosidad y la baja composición lignocelulolítica de este sustrato en comparación con los demás, siendo estos factores determinantes a la hora de lograr interacciones específicas e inespecíficas de las enzimas frente al material orgánico a tratar (Baig, 2016), limitada al tiempo de contacto de las enzimas (tiempo de incubación) y su concentración (Baig, 2020). Por otro lado, la variación estructural de la biomasa tratada está asociada al comportamiento de unión enzima- sustrato y, a su vez, por las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas de la estructura modular de las enzimas lignocelulolíticas caracterizados por un dominio de unión a carbohidratos (DUC), dominio catalítico (DC) o núcleo y el conector que une un DUC y un DC (Srisodusk *et al.*, 1993).

Diversos estudios de pretratamientos biológicos sobre desechos lignocelulolíticos, entre ellos racimos de frutos vacíos de palma de aceite, evidencian que los hongos tienen una tendencia a debilitar las fibras externas vegetales (Arbaain *et al.*, 2019). Zhang *et al.* (2021), mediante una fermentación de estado sólido de tallos de maíz, observaron que los hongos apenas crecen dentro de los materiales afectando principalmente la región exterior, mientras que las bacterias logran entrar a través de las roturas de la estructura natural y crecer en el interior, fenómeno que puede atribuirse a la ventaja que tienen ciertas enzimas lignolíticas bacterianas en comparación a las fúngicas en términos de altas temperaturas óptimas, fácil expresión, bajos potenciales redox y mayor estabilidad (Bugg *et al.*, 2011; Chauhan *et al.*, 2017)

CONCLUSIONES

El análisis efectuado a nivel de campo y laboratorio permite concluir lo siguiente: 1. La actividad más alta de endoglucanasa (0,12 UI/mL) en las condiciones estudiadas, no evidenciaron significancia estadística para cada uno de los tratamientos evaluados ($P > 0,05$), a diferencia de la actividad lacasa (203,33 UI/g) por parte del hongo *Trichoderma sp* sobre torta de palmiste ($P < 0,05$). 2. Entre los días 11 y 13 de fermentación se observó la mejor adaptabilidad y expresión enzimática de los hongos evaluados. 3. La composición estructural del subproducto y las condiciones ambientales de fermentación inciden en la expresión enzimática obtenida en este trabajo. 4. La estandarización del proceso fermentativo permitiría desarrollar tecnologías sostenibles eficientes y económicamente viables.

REFERENCIAS

- ABDEL-HAMID, AHMED; SOLBIATI, JOSE; CANN, ISAAC. Insights into lignin degradation and its potential industrial applications. *Advances in applied microbiology*. Academic Press, v. 82, 2013, p. 1-28.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407679-2.00001-6>
- ABRAHAM, AMITH; MATHEW, ANIL; PARK, HYOUNG; CHOI, OKKYOUNG; SINDHU, RAVEENDRAN; PARAMESWARAN, BINOD; PANDEY, ASHOK; PARK, JUNG_HAN; SANG, BYOUNG-IN. Pretreatment strategies for enhanced biogas production from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 301, 2020, p. 122725.
- AGROSAVIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. ¡Antes de sembrar, el suelo debe analizar!: Procedimiento para la toma de muestras y análisis de suelos, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Bogotá (Colombia): 2017, 6 p.
- ALLAGA, HENRIETTA; ZHUMAKAYEV, ANUAR; BÜCHNER, RITA; KOCSUBÉ, SÁNDOR; SZÜCS, ATTILA; VÁGVÖLGYI, CSABA; KREDICS, LÁSZLÓ; HATVANI, LÓRÁNT. Members of the *Trichoderma harzianum* species complex with mushroom pathogenic potential. *Agronomy*, v. 11, 2021, n. 12, p. 2434.
<https://doi.org/10.3390/agronomy11122434>
- ARBAAIN, ENIS-NATASHA; BAHRIN, EZYANA-KAMAL; IBRAHIM, MOHAMAD-FAIZAL; ANDO, YOSHITO; ABD-AZIZ, SURAINI. Biological pretreatment of oil palm empty fruit bunch by *Schizophyllum commune* ENN1 without washing and nutrient addition. *Processes*, v. 7, 2019, n 7, p. 402.
<https://doi.org/10.3390/pr7070402>
- BAIG, KHURRAM-SHAHZAD. Interaction of enzymes with lignocellulosic materials: causes, mechanism and influencing factors. *Bioresources and bioprocessing*, v. 7, 2020, n. 1, p. 1-19.
<https://doi.org/10.1186/s40643-020-00310-0>
- BAIG, KHURRAM-SHAHZAD; TURCOTTE, G.; DOAN, HUU. Adsorption of cellulose enzymes on lignocellulosic materials and influencing factors: a review. *International Journal of Waste Resource*, v. 6, 2016, n.3. 10.4172/2252-5211.1000239
- BARNETT, HORACE-LESLIE; HUNTER, BARRY. Illustrated genera of imperfect fungi 4th ed. The American Phytopathological Society. Minnesota (United States of America): 1998, 240 p, ISBN 9780890541920.
- BUGG, TIMOTHY; MARK, AHMAD; HARDIMANA, ELIZABETH; RAHMANPOURA, RAHMAN. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Natural product reports*, v. 28, 2011, n. 12, p. 1883-1896.
<https://doi.org/10.1039/c1np00042j>
- BUSTAMANTE, CARLOS; CAMPOS, RÓMULO; SÁNCHEZ, HUGO. Production and composition of buffalo milk supplemented with agro industrial byproducts of the African palm. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, v. 70, n. 1, 2017, p. 8085-8090.
<https://doi.org/10.15446/rfna.v70n1.61767>

- CHAN-CUPUL, WILBERTH; HEREDIA-ABARCA, GABRIELA-PATRICIA; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, REFUGIO. Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática ligninolítica de macromicetos del estado de Veracruz, México. *Revista internacional de contaminación ambiental*, v. 32, n. 3, 2016, p. 339-351.
<https://doi.org/10.20937/RICA.2016.32.03.08>
- CHAUHAN, PRAKRAM-SINGH; GORADIA, BINDI; SAXENA, ARUNIKA. Bacterial laccase: recent update on production, properties and industrial applications. *3 Biotech*, vol. 7, n. 5, 2017, p. 323.
<https://doi.org/10.1007/s13205-017-0955-7>
- COLOMBIA. FEDEPALMA. La palma de aceite en Colombia, Federación Colombiana de Cultivadores de Palma. Colombia, 2022. p. 1. [consultado noviembre 18 de 2022].
https://web.fedepalma.org/sites/default/files/files/Infografia_Colombia_2022_en_Espannol.pdf
- COLOMBIA. FEDEPALMA., La palma de aceite en el departamento del Cesar, Federación Colombiana de Cultivadores de Palma. Colombia, 2020, p.1. [consultado noviembre 18 de 2022].
<https://repositorio.fedepalma.org/bitstream/handle/123456789/141265/Infograf%C3%ADa%20Cesar.pdf?sequence=6&isAllowed=y>
- CRUZ, YTALLO; VIEIRA, YAGO; VILAR, DÉBORA; TORRES, NÁDIA; AGUIAR, MARIO; CAVALCANTI, ELIANE; AMÉRICO-PINHEIRO, JULIANA; SORIANO, RENATO; BHARAGAVA, RAM; LIMA, ÁLVARO; FERREIRA, LUIZ. Pulp wash: a new source for production of ligninolytic enzymes and biomass and its toxicological evaluation after biological treatment. *Environmental Technology*, v. 41, n. 14, 2020, p. 1837-1847.
<https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1551428>
- DI COLOGNA, NICHOLAS-DE MOJANA; GÓMEZ-MENDOZA, DIANA-PAOLA; FONSECA-ZANOELO, FABIANA; GIOVANA.CRISTINA, GIANNESI; CAVALIERI-DE ALENCAR- GUIMARÃES, NELCIELE; DE SOUZA-MOREIRA, LEONORA-RIOS; FERREIRA-FILHO, EDIVALDO-XIMENES; ORNELAS-RICART, CARLOS-ANDRÉ. Exploring Trichoderma and Aspergillus secretomes: proteomics approaches for the identification of enzymes of biotechnological interest. *Enzyme and microbial technology*, v. 109, 2018, p. 1-10.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.08.007>
- DURÁN-ARANGUREN, DANIEL-DAVID; MELÉNDEZ-MELO, JUAN-PABLO; COVO-OSPINA, MARÍA-CAMILA; DÍAZ-RENDÓN, JOAQUÍN; REYES-GUTIÉRREZ, DEIBYD-NICOLÁS; CRUZ-REINA, LUIS; DURÁN-SEQUEDA, DINARY; SIERRA, ROCÍO. Biological pretreatment of fruit residues using the genus Pleurotus: a review. *Bioresource Technology Reports*, v. 16, 2021, p. 100849.
<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100849>
- DURÁN-SEQUEDA, DINARY; SUSPES, DANIELA; MAESTE, ESTIBENSON, ALFARO, MANUEL; PEREZ, GUMER; RAMÍREZ, LUCIA; PISABARRO, ANTONIO; SIERRA, ROCÍO. Effect of nutritional factors and copper on the regulation of laccase enzyme production in *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Fungi*, v. 8, n.1, 2022, p. 7.
<https://doi.org/10.3390/jof8010007>
- GILMAN, JOSEPH. *Manual de los hongos del suelo*. CECSA. México, D.F. (México): 1963, p. 572.
- GUTIÉRREZ-ANTONIO, CLAUDIA; DE LIRA-FLORES, JULIO-ARMANDO; QUIROZ-PÉREZ, EFRAÍN; MARTÍNEZ-GUIDO, SERGIO-IVÁN. Conversión de residuos agroindustriales para la generación de biocombustibles, productos de valor agregado y bioenergía. *Digital Ciencia@ UAQRO*, v. 3, n. 4, 2020, p. 27-35.
- HAFID, HALIMATUN-SAADIAH; BAHARUDDIN, AZHARI-SAMSU; MOKHTAR, MOHD-NORIZNAN; OMAR, FARAH-NADIA; MOHAMMED, MOHD-AFANDI; WAKISAKA, MINATO. Enhanced laccase production for oil palm biomass delignification using biological pretreatment and its estimation at biorefinery scale. *Biomass and Bioenergy*, v. 144, 2021, p. 105904.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105904>
- HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, JAVIER; PÉREZ, ELIA-ELIZABETH; PIÑEROS-CASTRO, YINETH. Identificación y evaluación de actividad celulolítica en aislamientos nativos de *Trichoderma* spp obtenidos de biomasa de palma de aceite. *Revista Colombiana de Biotecnología*, v. 20, n. 1, 2018, p. 59-67.
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.73693>

- INNOCENTI, GLORIA; MONTANAI, MATTEO; RIGHINI, HILLARY; ROBERTI, ROBERTA. Trichoderma species associated with green mould disease of Pleurotus ostreatus and their sensitivity to prochloraz. Plant Pathology, v. 68, n 2, 2019, p. 392-398.
<https://doi.org/10.1111/ppa.12953>
- KIRK, KENT; FARRELL, ROBERTA. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. Annual Reviews in Microbiology, v. 41, n. 1, 1987, p. 465-501.
<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.002341>
- KUHAR, SARIKA; KAPOOR, MUKESH; KAPOOR, RAJEEV; SHARMA, KRISHNA-KANT; SINGH, AJAY; KUHAD, RAMESH-CHANDER. Biodiversity of ligninolytic fungi. Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects; Kuhad, RC, Singh, A., Eds, 2007, p. 37-53.
- MA, YAN; LING, TIE-JUN; SU, XIAO-QIN; JIANG, BIN; NIAN, BO; CHEN, LI-JIAO; LIU, MING-LI; ZHANG, ZHENG-YAN; WANG, DAO-PING; MU, YONG-YING; JIAO, WEN-WEN; LIU, QIAN-TING; PAN, YING-HONG; ZHAO, MING. Integrated proteomics and metabolomics analysis of tea leaves fermented by Aspergillus niger, Aspergillus tamarii and Aspergillus fumigatus. Food Chemistry, v. 334, 2021, p. 127560.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127560>
- MANJARRÉS, KATHERINE; PIÑEROS, YINETH; RODRÍGUEZ-SANDOVAL, EDUARDO. Evaluación del complejo enzimático producido mediante el cocultivo de Aspergillus sp. y Trichoderma sp. en fase sólida sobre residuos de palma. Bioagro, v. 23, n. 1, 2011, p. 19-26.
- MEEHNIAN, HARMANPREET; JANA, ASIM; JANA, MITHU-MAITI. Pretreatment of cotton stalks by synergistic interaction of Daedalea flavida and Phlebia radiata in co-culture for improvement in delignification and saccharification. International Biodeterioration & Biodegradation, v. 117, 2017, p. 68-77.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.11.022>
- MONTOYA, SANDRA; SÁNCHEZ, OSCAR-JULIÁN; LEVIN, LAURA. Evaluación de actividades endoglucanasa, exoglucanasa, lacasa y lignina peroxidasa en diez hongos de pudrición blanca. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial, v. 12, n. 2, 2014, p. 115-124.
- NIRMALASARI, INTAN; SANTOSA, DWI-ANDREAS; PRASTOWO, ERWIN. Characterization of lignocellulolytic fungi isolated from cocoa rhizosphere under different cropping patterns. En IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. IOP Publishing, 2022, p. 012008.
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/980/1/012008>
- PICCINNI, FLORENCIA-ELIZABETH; ONTAÑÓN, ORNELLA-MAILÉN; GHIO, STEFANO; SAUKA, DIEGO; RIVAROLA, MAXIMO; VALACCO, MARIA PIA; CAMPOS, ELEONORA. Secretome profile of Cellulomonas sp. B6 growing on lignocellulosic substrates. Journal of applied microbiology, v. 126, n. 3, 2019, p. 811-825.
<https://doi.org/10.1111/jam.14176>
- RAMÍREZ, LUZ-STELLA; ISAZA, MARIA-CAMILA. Actividad celulolítica de hongos aislados del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira. Microciencia, v. 8, 2019, p. 12-19.
- SEGARAN, GAYATHRI; SATHIAVELU, MYTHILI. Fungal endophytes: A potent biocontrol agent and a bioactive metabolites reservoir. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 21, 2019, p. 101284.
- SHAHRIARINOUR, MAHDI; WAHAB, MOHD-NOOR; MUSTAFA, SHUHAIMI; MOHAMAD, ROSFARIZAN; ARIFF, ARBAKARIYA. Effect of various pretreatments of oil palm empty fruit bunch fibres for subsequent use as substrate on the performance of cellulase production by Aspergillus terreus. BioResources, v. 6, n. 1, 2011, p. 291-307.
<http://ncsu.edu/bioresources/>
- SRISODSUK, MALEE; REINIKAINEN, TAPANI; PENTTILÄ, MERJA; TEERI, TUULA. Role of the interdomain linker peptide of Trichoderma reesei cellobiohydrolase I in its interaction with crystalline cellulose. Journal of Biological Chemistry, v. 268, n. 28, 1993, p. 20756-20761.
- TROIANO, DEREK; ORSAT, VALERIE; DUMONT, MARIE-JOSÉE. Status of filamentous fungi in integrated biorefineries. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 117, 2020, p. 109472.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109472>
- VAN-DAM, JAN. Subproductos de la palma de aceite como materias primas de biomasa. Palmas, v. 37, 2016, p. 149-156.

- ZEILINGER, SUSANNE; GRUBER, SABINE; BANSAL, RAVINDRA; MUKHERJEE, PRASUN. Secondary metabolism in *Trichoderma*—chemistry meets genomics. *Fungal biology reviews*, v. 30, n. 2, 2016, p. 74-90.
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.05.001>
- ZHANG, ZICHEN; SHAH, AABID-MANZOOR; MOHAMED, HASSAN; TSIKLARI, NINO; SONG, YUANDA. Isolation and screening of microorganisms for the effective pretreatment of lignocellulosic agricultural wastes. *BioMed Research International*, v. 2021, 2021.
<https://doi.org/10.1155/2021/5514745>
- ZHOU, SIMENG; RAOUCHE, SANA; GRISEL, SACHA; NAVARRO, DAVID; SIGOILLOT, JEAN-CLAUDE. Solid-state fermentation in multi-well plates to assess pretreatment efficiency of rot fungi on lignocellulose biomass. *Microbial biotechnology*, v. 8, n. 6, 2015, p. 940-949.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12307>
- ZILLY, ADRIANA; DOS SANTOS-BAZANELLA, GISELE-CRISTINA; VIEIRA-HELM, CRISTIANE; VAZ-ARAÚJO, CAROLINE-APARECIDA; MARQUES-DE SOUZA, CRISTINA-GIATTI; BRACHT, ADELAR; PERALTA, ROSANE. Solid-state bioconversion of passion fruit waste by white-rot fungi for production of oxidative and hydrolytic enzymes. *Food and Bioprocess Technology*, v. 5, n. 5, 2012, p. 1573-1580.
<https://doi.org/10.1007/s11947-011-0532-8>
- ZUBIETA-CORONADO, DIEGO-ARTURO; ECHEVERRY-PRIETO, LENA-CAROLINA; ZAFRA-MEJÍA, CARLO-ALFONZO. Antagonismo in vitro por consorcios de *Trichoderma* sp. y *Aspergillus* sp. contra el fitopatógeno *Sclerotinia* sp. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, v. 19, n. 1, 2021, p. 16-31.
<https://doi.org/10.18684/bsaa.v19.n1.2021.1293>