

**ESTUDIO DE LA BIOQUIMICA DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS**

**YASNEIRA CASTRO SAYA**

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN, PROYECCIÓN Y DESARROLLO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA  
AGROINDUSTRIAL  
ESPECIALIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL  
MANIZALES  
2013**

**ESTUDIO DE LA BIOQUIMICA DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS**

**YASNEIRA CASTRO SAYA**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:  
Especialista en Microbiología Industrial**

**Director:**

**JAVIER GUILLERMO MANTILLA AFANADOR**

Biólogo

Instituto de Microbiología y Biotecnología Agroindustrial - IMBA

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN, PROYECCIÓN Y DESARROLLO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGIA Y BIOTECNOLOGÍA  
AGROINDUSTRIAL  
ESPECIALIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL  
MANIZALES  
2013**

**Nota de aceptación**

---

---

---

---

---

---

---

---

**Firma del Director del Trabajo de Grado**

---

**Firma del Presidente del Comité de Programa**

---

**Firma de integrante del Comité de Programa**

**Manizales, 27 de Agosto de 2013**

A Dios, por darme la oportunidad de alcanzar un logro más en mi vida,  
a mis padres por ser incondicionales y brindarme su apoyo sincero.

## **AGRADECIMIENTOS**

A todas las personas que siempre estuvieron atentas en brindarme su apoyo de la mejor manera, en especial a mi madre (María Luz Saya) por ser la persona que siempre estuvo y estará cuando más lo necesite.

A Javier Guillermo Mantilla por sus grandes aportes en conocimiento profesional para el desarrollo de este trabajo.

## CONTENIDO

	Pág.
GLOSARIO.....	11
RESUMEN.....	14
ABSTRACT.....	15
INTRODUCCIÓN.....	16
1. OBJETIVOS.....	19
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	19
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
2. MARCO TEORICO.....	20
2.1 GENERALIDADES EN BIOQUÍMICA DE ENZIMAS .....	20
2.1.1 Funcionamiento.....	21
2.1.2 Cinética enzimática por Michaelis-Menten .....	23
2.1.3 Clasificación de las enzimas según el tipo de reacción que catalizan.....	24
2.1.3.1 Óxidoreductasas.....	24
2.1.3.2 Transferasas.....	25

2.1.3.3	Hidrolasas.....	25
2.1.3.4	Liasas.....	25
2.1.3.5	Ligasas.....	25
2.1.3.6	Isomerasas.....	25
2.2	TIPOS Y FUENTES DE OBTENCIÓN DE ENZIMAS.....	26
2.2.1	Enzimas microbianas.....	26
2.2.2	Enzimas vegetales.....	27
2.2.3	Enzimas animales.....	27
2.3	PRINCIPALES ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS.....	29
2.3.1	Lignina peroxidasa (LiP).....	32
2.3.2	Manganeso peroxidasa (MnP).....	33
2.3.3	Lacasa.....	35
2.3.4	Celulasa.....	36
2.4	ACTIVIDAD DE DIFERENTES ENZIMAS SOBRE SUSTRATOS ESPECÍFICOS LIGNOCELULOSOS.....	37
2.5	USOS Y APLICACIONES DE LAS PRINCIPALES ENZIMAS LIGNOCELULOLITICAS A NIVEL INDUSTRIAL.....	41

2.6 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ENZIMAS LIGNOCELULOLITICAS.....	45
3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	48
4. PERSPECTIVAS.....	50
BIBLIOGRAFÍA.....	51



## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Encaje de la enzima al sustrato.....	21
Figura 2. Efecto del incremento en la concentración de sustrato sobre la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente.....	24
Figura 3. Conformación lignocelulósica de una célula vegetal.....	29
Figura 4. Estructura tridimensional de la celulosa.....	30
Figura 5. Estructura química de la lignina.....	31
Figura 6. Conformación bioquímica de estructura lignocelulósica.....	36

## LISTA DE CUADROS

Pág.

Cuadro 1. Residuos agroindustriales lignocelulósicos utilizados para generar productos de valor agregado.....	45
---	----

## GLOSARIO

**APOENZIMAS:** son enzimas que carecen de los componentes químicos apropiados para realizar la actividad catalítica, por ello, se ayudan de otras sustancias no proteicas, ya sean iones metálicos (Fe, Cu, Mg, etc.) u orgánicos denominados cofactores que fijados en su superficie mediante enlaces covalentes o débiles le aportan a la enzima los grupos y funciones químicas que necesita. En estos casos, la parte proteica de la enzima se denomina apoenzima y la fracción no proteica es el cofactor.

**BIOMASA:** materia total de los seres que viven en un lugar determinado, expresada en peso por unidad de área o de volumen. 2. Materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía.

**CATALIZADOR:** sustancia que se combina de un modo transitorio con los reaccionantes de manera que éstos alcanzan un estado de transición de menor energía de activación; cuando se forman los productos se regenera el catalizador libre. Es una sustancia que, sin consumirse en el proceso, aumenta la velocidad de una reacción química rebajando la barrera de energía de activación.

**CELULOSA:** es un polímero de D-glucosa unida por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 que se estructuran en largas cadenas lineales (microfibrillas) unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals intramoleculares, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática.

**CENTRO ACTIVO:** es una cavidad existente en la superficie de la enzima que está forrada interiormente por una serie de restos de aminoácidos. Por regla

general los aminoácidos que forman parte del centro activo no se encuentran contiguos en la cadena polipeptídica, sino ocupando posiciones a veces muy alejadas en la misma.

**COENZIMAS:** compuestos orgánicos termoestables que ayudan a las enzimas a cumplir con su función catalítica, generalmente tienen bajo peso molecular y suelen ser claves en el mecanismo catalítico.

**COFACTORES ENZIMATICOS:** son sustancias no proteicas que requieren muchas enzimas para que puedan catalizar eficientemente. Generalmente, se sitúan en el sitio activo de la enzima, en donde se fijan de manera específica (en forma covalente o no). Entonces, los cofactores actúan modificando la estructura 3D de la enzima sobre el sustrato incrementando al máximo la interacción de éstos.

**COMPLEJO ENZIMA-SUSTRATO:** unión temporal entre la enzima y el sustrato, momento en el que el sustrato es convertido en producto.

**ENZIMAS:** biomoléculas especializadas en la catálisis de las reacciones químicas que tienen lugar en la célula aumentando la velocidad de reacción sin consumirse en ella, ni formar parte de los productos, además son altamente específicas ya que cada una de ellas induce la transformación de un sólo tipo de sustancia y no de otras que se puedan encontrar en el medio de reacción.

**HOLOENZIMA:** es una enzima que está formada por una proteína (apoenzima) y un cofactor, que puede ser un ion o una molécula orgánica compleja unida (grupo prostético) o no (una coenzima). En resumidas cuentas, es una enzima completa y activada catalíticamente.

**LIGNINA:** es un polímero presente en las paredes celulares de organismos del reino Plantae y también en las Dinophytas del reino Chromalveolata. La palabra

lignina proviene del término latino *lignum*, que significa 'madera'; así, a las plantas que contienen gran cantidad de lignina se las denomina leñosas. La lignina se encarga de engrosar el tallo, los tejidos lignificados resisten el ataque de los microorganismos, impidiendo la penetración de las enzimas destructivas en la pared celular.

LIGNOCELULOSA: (celulosa, hemicelulosa y lignina) es el principal y más abundante componente de la biomasa producida por la fotosíntesis, anualmente se forman 200.000 millones de toneladas en el mundo. La pared celular de las plantas está formada por lignocelulosa, la composición y porcentajes de los polímeros varían entre las especies de plantas, incluso entre la edad y la etapa de crecimiento.

PRODUCTO: es el resultado de la reacción enzimática.

SITIO ACTIVO: es el lugar de la enzima donde ocurre la reacción química con el sustrato.

SUSTRATO: es la molécula que se une al sitio activo en donde va a ser transformada en producto.

## RESUMEN

La degradación de la biomasa vegetal es un proceso complejo que involucra la acción sinérgica de un gran número de enzimas extracelulares. Hasta ahora, en los procesos de degradación de material lignocelulósico a nivel industrial se requiere de etapas de pretratamiento para facilitar el acceso a los azúcares fermentables. Éstos pueden ser físicos, químicos, enzimáticos o con participación de microorganismos. Asimismo, la factibilidad de cada tratamiento depende del consumo de energía, selectividad, costos de procesos y velocidad de degradación. Sin embargo, para una eficiente hidrólisis de lignocelulosa hasta azúcares simples, se requiere una buena combinación sinérgica de enzimas capaces de degradar lignina y de hidrolizar celulosa y hemicelulosa (Quevedo, 2011). Uno de los aspectos más importantes para hacer un buen uso de éste arsenal enzimático es conocer la bioquímica de las mismas y mejorar su aplicabilidad para diversos sustratos.

Palabras clave: Lignocelulosa, enzimas, bioquímica, degradación.

## ABSTRACT

Degradation of plant biomass is a complex process that involves the synergistic action of a large number of extracellular enzymes. So far, the processes of degradation of lignocellulosic material at industrial level requires pretreatment steps to facilitate access to fermentable sugars. These can be physical, chemical, enzymatic or involving microorganisms. Also, the feasibility of each treatment depends on the energy consumption, selectivity, process costs and degradation rate. However, for efficient hydrolysis of lignocellulose to simple sugars, it requires good synergistic combination of enzymes capable of degrading lignin and hydrolyze cellulose and hemicellulose (Quevedo, 2011). One of the most important aspects to make good use of this enzyme is known arsenal biochemistry of them and improve their applicability to various substrates.

Keywords: lignocellulose, enzymes, biochemical degradation.

## INTRODUCCION

El material lignocelulósico principalmente está conformado por tres estructuras lignina, celulosa y hemicelulosa, sin embargo dependiendo del tipo de material lignocelulósico se encuentran otras estructuras en menores o mayores proporciones como son el xilano, la pectina, entre otros. Lo anterior le confiere ciertas características de rigidez e impenetrabilidad como método de defensa contra patógenos habituales de las plantas, sin embargo, algunos organismos como ciertas especies de hongos son capaces de producir enzimas extracelulares (que no sólo participan en el ciclo del carbono, también se consideran como factores de virulencia de fitopatógenos, los cuáles son activados por señales ambientales) que degradan este tipo de material y hacen posible su reciclaje porque se alimentan de los mismos. Es una solución bastante ventajosa considerando que el material lignocelósico es el más duradero y abundante de los residuos vegetales entre ellos tenemos: la cascarilla de arroz, bagazo de caña de azúcar, residuos del café, de floricultura, y demás residuos agrícolas post-cosecha. Por supuesto es claro que si no fueran degradados rápidamente, la humanidad se encontraría en serios aprietos por la excesiva acumulación de estos desechos.

Como ha sido costumbre a través de toda la historia evolutiva y de generación de nuevas tecnologías el hombre ha obtenido ventajas al manipular los demás seres vivientes buscando un beneficio a partir de actividades que los organismos inferiores realizan de manera natural en busca de fuentes de energía para su propia supervivencia. Es así como se evidencia que la producción de enzimas extracelulares por parte de organismos como hongos y algunas bacterias, es útil en la degradación de material lignocelulósico para finalmente obtener los azúcares que conforman éstas estructuras y aprovecharlos en diversos procesos que



demanden una utilidad económica e industrial; por ejemplo, obtención de biocombustibles de segunda generación, diferentes usos en la industria del papel, textilera, alimenticia entre otras.

Pese al gran potencial que tiene el uso de este tipo de desechos naturales, para su aprovechamiento se hace necesario saber de antemano cuál es su composición más aproximada, con el fin de escoger y aplicar el tratamiento adecuado, también se requiere saber cómo actúan y/o funcionan las enzimas lignocelulolíticas que son el recurso más amigable con el medio ambiente para degradar este tipo de materiales.

Igualmente se hace necesario conocer todas las características bioquímicas propias de las enzimas lignocelulolíticas en busca de mejorar los procesos en los cuales serán usadas, con el propósito de obtener los mejores rendimientos en el proceso y minimizar al máximo los impactos negativos hacia el medio ambiente durante el proceso degradativo. El uso de enzimas en este proceso tiene algunas ventajas sobre otros pretratamientos además de ser amigable con el medio ambiente, permite buen control de temperaturas porque se pueden usar enzimas termoestables para evitar etapas como el enfriamiento de la materia orgánica para luego fermentar los azúcares libres, lo que conllevaría inmediatamente a la reducción del tiempo y costos en enfriamiento; otra forma de ahorrar dinero es llevar a cabo todo el proceso degradativo directamente con los organismos que producen las enzimas y no con las enzimas ya purificadas (lo que es más costoso porque implica tener que comprar cada una de las enzimas).

Por las anteriores razones expuestas, es pertinente saber cuáles son los organismos y/o microorganismos especializados en producir enzimas lignocelulolíticas y al mismo tiempo conocer los requerimientos de los mismos para ejecutar el proceso.

Finalmente, se ha estimado que los mayores retornos en ahorro de costos de procesamiento degradativo de material lignocelulósico se verán mediante la mejora de la conversión de biomasa en azúcares (aumentar el rendimiento de hidrólisis, eliminación o reducción de pretratamiento, y la consolidación de un bioprocesamiento), además, uno de los medios más eficaces para optimizar la bioconversión es el desarrollo de cócteles de enzimas para disminuir las grandes cantidades comerciales actualmente utilizadas. Es de destacar que la importancia de los hongos en el ciclo del carbono y la biotecnología como vehículo de sobreexpresión de enzimas de interés industrial han promovido el interés en la comprensión de la producción de las enzimas extracelulares lignocelulolíticas. (Ortiz, 2009).

## **1. OBJETIVOS**

### **1.1 OBJETIVO GENERAL**

Documentar el estado del arte de la bioquímica de las enzimas lignocelulíticas en el contexto de los residuos agrícolas y forestales.

### **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Rastrear en bases de datos e identificar las principales enzimas lignocelulolíticas.

Describir y caracterizar la actividad de diferentes enzimas sobre sustratos específicos lignocelulosos.

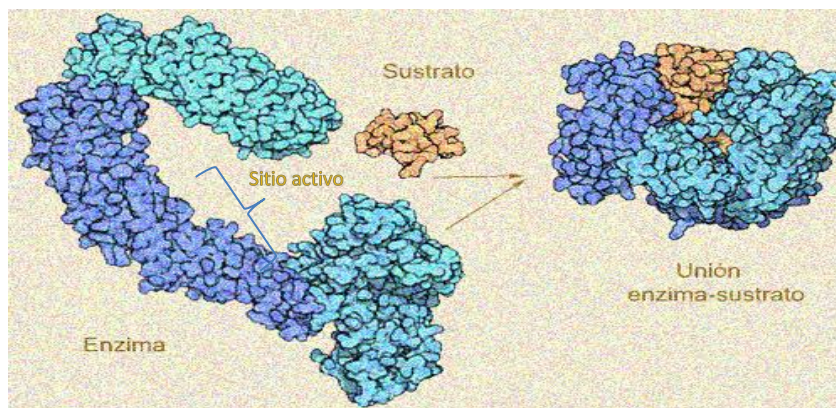
Distinguir los usos y aplicaciones de las enzimas lignocelulolíticas a nivel industrial.

Mostrar los principales microorganismos productores de enzimas lignocelulolíticas.

## 2. MARCO TEORICO

### 2.1 GENERALIDADES EN BIOQUIMICA DE LAS ENZIMAS

Las enzimas son catalizadores biológicos, (generalmente son proteínas) las cuales generan un efecto acelerador en las reacciones mediante la disminución de la energía de activación sin sufrir modificaciones al final del proceso; esto significa que pueden ser utilizadas una y otra vez. Las enzimas tienen uno o más lugares llamados sitios activos a los cuales se une con el sustrato (sustancia sobre la que actúa la enzima). El sustrato es modificado y convertido en 1 o más productos, de esta manera, la enzima tiene un sitio activo complementario para el sustrato el cual le confiere especificidad porque allí se encuentran los grupos químicos responsables de la catálisis (Figura 1). Algunas enzimas requieren cofactores para su actividad, por ejemplo los citocromos contienen un grupo prostético formado por un complejo metaloporfirínico. Otras enzimas emplean pequeñas moléculas no proteicas llamadas coenzimas que se unen durante la reacción para activar a la enzima. Sin embargo, a diferencia de las enzimas, las coenzimas se modifican y consumen durante la reacción química; por ejemplo, el  $\text{NAD}^+$  se reduce a  $\text{NADH}$  cuando acepta dos electrones (y un protón) y por tanto se agota; cuando el  $\text{NADH}$  libera sus electrones se recupera el  $\text{NAD}^+$ , que de nuevo puede actuar como coenzima. De esta manera, la apoenzima es la parte proteica de una enzima desprovista de los cofactores o coenzimas que puedan ser necesarios para que la enzima sea funcionalmente activa. Esta apoenzima es catalíticamente inactiva y cuando se une la coenzima o cofactor adecuados, constituye lo que se denomina holoenzima (Leiva, 2007).



**Figura 1.** Encaje de la enzima al sustrato

### 2.1.1 Funcionamiento

Las enzimas funcionan mediante una teoría denominada: “encaje inducido” que es un sistema por el cual la enzima se une al sustrato para formar así el complejo Enzima-Sustrato [ES], este complejo cataliza o acelera la reacción generando así el producto más la enzima.

Por otra parte, los grupos prostéticos forman parte estructural (estable) de las enzimas. Puesto que un grupo prostético es el componente no aminoacídico que forma parte de la estructura de algunas proteínas y que se halla fuertemente unido al resto de la molécula. Las proteínas con grupo prostético reciben el nombre de heteroproteínas o proteínas conjugadas. En pocas palabras el grupo prostético es la porción no proteica de la molécula de las heteroproteínas. Hay enzimas que son proteínas conjugadas, se trata de enzimas que requieren algún cofactor (metálico u orgánico) y éste se halla ligado con fuerza de manera permanente en la estructura molecular. Si un cofactor enzimático (metálico u orgánico) sólo se une a la enzima durante la catálisis no debe ser considerado un grupo prostético. El

HEMO constituye un grupo prostético esencial para la estructura y la actividad de numerosas proteínas. Aunque la estructura de las hemoproteínas mantiene este grupo en forma estable como la hemoglobina, los citocromos y las peroxidasas, estudios recientes han mostrado que juega un rol importante en ciertas proteínas (factores transcripcionales, canales iónicos). Algunos ejemplos de grupos prostéticos: FAD, FMN, PPT, Biot. Los metales Co, Cu, Mg, Se y Zn forman metaloenzimas.

De esta manera, los cofactores se enlazan de manera transitoria y disociable a la enzima o al sustrato. Ejemplos: el ATP e iones metálicos libres. También funcionan como lanzaderas de grupos desde el lugar donde se generan hacia el lugar donde se utilizan y pueden trasladar hidrógenos y diferentes grupos como metilo, acilo y oligosacáridos.

Las Isozimas son formas “distintas” de una misma función enzimática, que se originaron en diferente tejido o célula: Ejemplos: Lactato-deshidrogenasa (DHL) con sus subunidades H y M, Creatina fosfocinasa (CPK) con sus subunidades M y B. No obstante, las enzimas pueden ser reguladas respecto a su funcionamiento o capacidad catalítica a través de inhibidores, los cuales son sustancias que se adhieren a la enzima evitando que el sustrato lo haga, por lo cual la reacción no se cataliza con la misma velocidad.

Hay dos clases de inhibidores; los competitivos son aquellos que tienen una estructura similar a la del sustrato y se adhieren a la enzima por el sitio activo al igual que lo haría el sustrato; con este tipo de inhibidores se reduce la velocidad de reacción pero la velocidad máxima (concentraciones de sustrato grandes) sigue siendo la misma; en cambio cuando en la enzima actúa un inhibidor de carácter no competitivo éste se fija a un punto diferente del sitio activo y no necesariamente tiene una estructura similar a la del sustrato, es por ello que en la cinética de

Michaelis-Menten el inhibidor reduce la velocidad máxima pero  $K_m$  (la afinidad de la enzima por el sustrato) sigue siendo la misma.

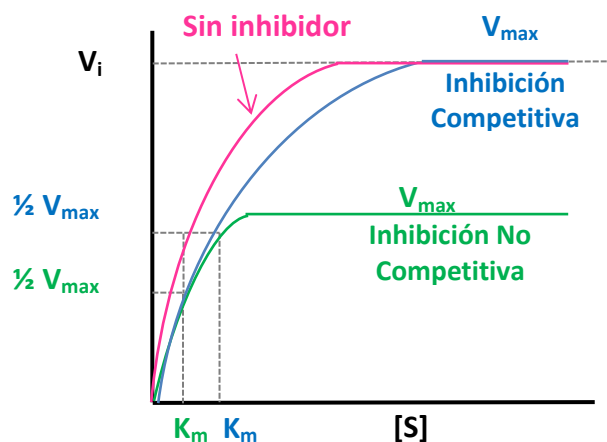
### 2.1.2 Cinética enzimática por Michaelis-Menten

La cinética enzimática que proponen estos dos investigadores nos muestra la forma de actuar de las enzimas en presencia de inhibidores o en su estado de funcionamiento óptimo en la cual se grafica la concentración del sustrato [S] vs la velocidad máxima (Figura 2). Este modelo sólo es válido cuando la concentración del sustrato es mayor que la concentración de la enzima y para condiciones de estado estacionario, es decir, cuando la concentración del complejo enzima-sustrato es constante. En la Figura 2, se muestra un carácter asintótico hacia la velocidad máxima que se alcanza para formar el producto en presencia de la enzima.

Tiene la siguiente fórmula:

$$V = V_{\max} [S] / ([S] + K_m)$$

Donde  $K_m$  es aquella concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción se hace la mitad de su valor máximo.



**Figura 2.** Efecto del incremento en la concentración de sustrato sobre la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente. En saturación (línea punteada superior), el aumento de la concentración de sustrato no se refleja en la velocidad de catálisis. Efecto sin inhibidor (línea color fucsia), con inhibidor competitivo (línea color azul) y con inhibidor no competitivo (línea color verde).

### 2.1.3 Clasificación de las enzimas según el tipo de reacción que catalizan:

Existen múltiples clasificaciones otorgadas por diferentes autores dependiendo de la característica que se desea estudiar en las enzimas como catalizadores biológicos naturales y una bastante común es la que se hace dependiendo del tipo de reacción que catalizan, aquí encontramos 6 grandes grupos:

#### 2.2.1.1 Óxidoreductasas

Como su nombre lo indica, son enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción en las cuales se ganan o se pierden electrones.



### **2.1.3.2 Transferasas**

Son aquellas que tienen la capacidad de transferir grupos funcionales en una reacción, los principales grupos que se transfieren son: amino, carboxilo, fosfato, metilo y fosforilo.

### **2.1.3.3 Hidrolasas**

Son aquellas que catalizan reacciones en las cuales se presenta una hidrólisis en la cual se rompen los enlaces por acción del agua.

### **2.1.3.4 Liasas**

Son aquellas que catalizan reacciones en las cuales se eliminan grupos ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{NH}_3$ ) para formar dobles enlaces.

### **2.1.3.5 Ligasas**

Catalizan reacciones en las cuales se forman enlaces entre dos moléculas de sustrato.

### **2.1.3.6 Isomerasas**

Son aquellas que catalizan reacciones en las cuales el producto es un isómero del sustrato.

No obstante, se deben tener en cuenta una serie de consideraciones a la hora de seleccionar las enzimas adecuadas para un proceso determinado: especificidad, consideraciones del pH, térmicas, activadores e inhibidores, métodos de análisis, disponibilidad, soportes técnicos, costos.

Por el lado del pH, se sabe que las enzimas poseen grupos químicos ionizables (carboxilos  $-\text{COOH}$ ; amino  $-\text{NH}_2$ ; tiol  $-\text{SH}$ ; imidazol, etc.) en las cadenas laterales de sus aminoácidos y según el pH del medio estos grupos pueden tener carga eléctrica positiva, negativa o neutra. Como la conformación de las proteínas depende en parte, de sus cargas eléctricas, habrá un pH en el cual la conformación será la más adecuada para la actividad catalítica. La mayoría de las enzimas son muy sensibles a los cambios de pH. Desviaciones de pocas décimas por encima o por debajo del pH óptimo pueden afectar drásticamente su actividad. En cuanto al efecto que produce la temperatura en general, los incrementos aceleran las reacciones químicas. Sin embargo, al ser proteínas, a partir de cierta temperatura se empiezan a desnaturalizar por el calor y pierden su efecto catalizador. También es importante saber cuál es la especificidad del sustrato porque de esta manera se logra obtener mayor velocidad de reacción y por consiguiente mayor eficiencia en el proceso.

## **2.2 TIPOS Y FUENTES DE OBTENCIÓN DE ENZIMAS**

Las enzimas generalmente provienen de tres fuentes: vegetal, animal y microbiano, siendo las de ésta última fuente más útiles que los derivados de las plantas o animales por la gran variedad de actividades catalíticas de que disponen y porque usualmente pueden obtenerse en cantidades abundantes, baratas, de forma regular y de calidad uniforme.

### **2.2.1 Enzimas microbianas**

Las enzimas producidas por la fermentación de microorganismos representan aproximadamente el 90% de todas las enzimas producidas para los procesos

industriales. La inmensa mayoría de las enzimas microbianas se producen a partir de aproximadamente 25 organismos, incluyendo una docena de hongos, pero se ha calculado que sólo aproximadamente el 2% de los microorganismos existentes en el mundo han sido estudiados como fuentes de enzimas.

### **2.2.2 Enzimas vegetales**

La mayoría de las enzimas vegetales se encuentran disponibles en forma de polvo sin una purificación muy elevada, aunque las papaínas (proveniente de la papaya), bromelaínas (proveniente de la piña) y ficina (proveniente de higos) se usan para ablandar carnes y están disponibles en estado purificado.

### **2.2.3 Enzimas animales**

Aquí se incluyen lipasas pancreáticas y proteasas, pepsinas, estereasas pregástricas. La lipasa se produce en la mucosa gástrica, las fosfatasas se obtiene de tejidos animales óseo y muscular, la tripsina y quimotripsina se produce en el páncreas. Son producidas ultrapuras en cantidades industriales.

Adicionalmente las enzimas microbianas son generalmente más estables que sus homólogos animales y vegetales, además, su proceso de producción es más fácil y seguro. La manipulación genética y ambiental para incrementar el rendimiento o la actividad enzimática de las células puede llevarse a cabo fácilmente utilizando células microbianas debido a su corto periodo de regeneración, a sus relativamente simples exigencias nutritivas y a que los procedimientos de tamizaje para las características deseadas son más fáciles.

En todas las enzimas existe una zona que comparte una complementariedad tridimensional con el sustrato, esto gracias a las cargas o densidades de carga del sustrato; lo cual depende de los aminoácidos que queden en esa zona que a su vez corresponderá en última instancia a la estructura primaria de la proteína.

Este sitio activo tiene unas características propias tales como: responder a una porción relativamente pequeña del volumen total de la enzima, es una entidad tridimensional, los sustratos se unen a las enzimas por numerosas fuerzas débiles, presentan forma de hendidura, por lo tanto la especificidad depende de la disposición definida de los átomos del centro activo.

Todo lo anterior es imprescindible tenerlo en cuenta en el momento de usar cualquier tipo de enzima en un proceso industrial, de esta forma se tiene garantía previa del éxito en la escogencia del sustrato adecuado para determinada enzima. Además de especificidad de sustrato, las clasificaciones modernas cada vez más implican la consideración del carácter estructural y características de la molécula enzimática.

## 2.3 PRINCIPALES ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS

La pared celular vegetal contiene celulosa, hemicelulosa, pectina y el polímero fenólico lignina. La celulosa es el polisacárido más abundante en la naturaleza y el principal constituyente de la pared celular vegetal proveyéndole rigidez, está formada por unidades de D-glucosa unidas por enlaces  $\beta$  1-4 que forman cadenas poliméricas lineares de aproximadamente 8000-12000 unidades de glucosa (figuras 3 y 4) (Ortiz, 2009).

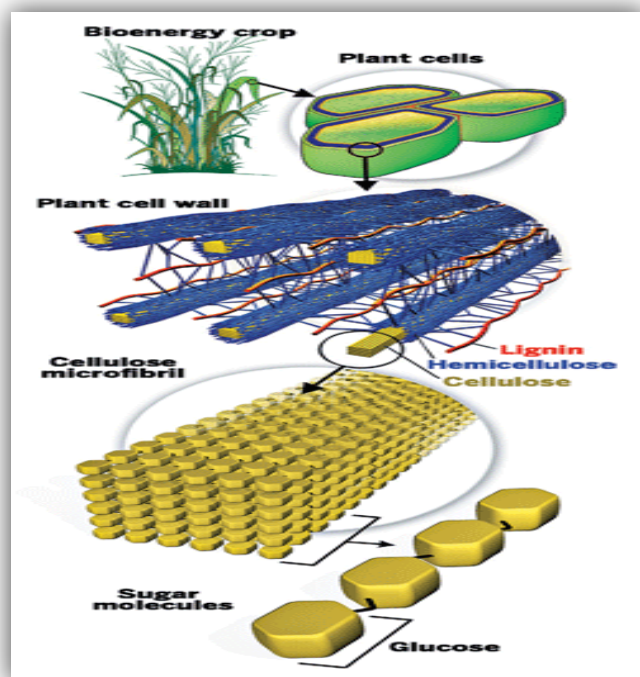


Figura 3. Conformación lignocelulósica de una célula vegetal.

Tomado de: <http://cen.acs.org/articles/86/i49/Lignocellulose-Complex-Biomaterial.html>

Las hemicelulosas, son los segundos polímeros en importancia, tienen una composición heterogénea de varios tipos de unidades de azúcares son usualmente clasificadas de acuerdo al residuo de azúcar principal en la estructura del polímero. Las más importantes son el xilano, encontrado en diferentes tipos de plantas y el (galacto) glucomanano en las maderas, están formados por D-xilosas o D-manosas unidos por enlaces  $\beta$  1-4, respectivamente. Las menos frecuentes son el arabinano formado por unidades de L-arabinosa con enlaces  $\alpha$  1-5 y galactano que posee unidades de D-galactosa asociadas por enlaces  $\beta$  1-3. La cadena principal de azúcares de las hemicelulosas es modificada por varios grupos sustituyentes como el ácido 4-Ometilglucorónico, arabinosa, galactosa y

acetil, haciendo a las hemicelulosas ramificadas y con estructura variable (Timell, 1967; Wilkie, 1979).

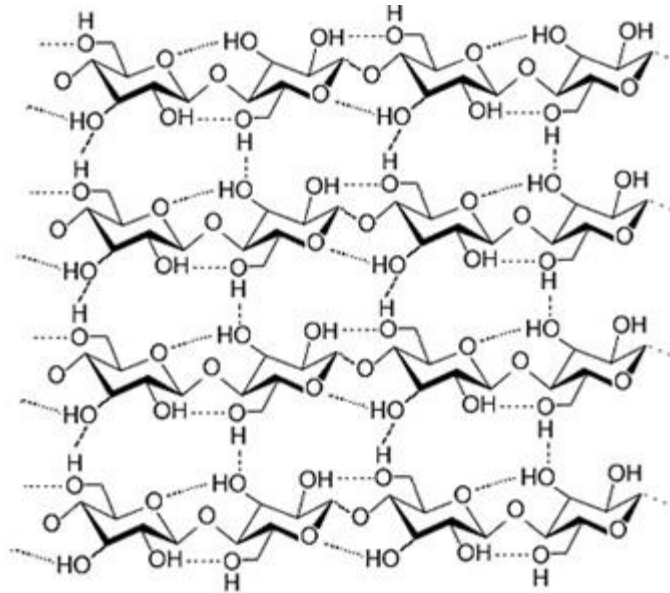


Figura 4. Estructura tridimensional de la celulosa.

Tomado de: <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%207/6.html>

De igual manera, las pectinas son una familia de polisacáridos complejos que contiene unidades de ácido D-galacturónico unidas por enlaces  $\alpha$  1-4. Las pectinas contienen dos diferentes tipos de regiones de acuerdo a su apariencia en las microfotografías electrónicas. En la región "lisa" de la pectina hay residuos de ácido D-galacturónico metilados o acetilados, mientras que en la región "ramificada" hay D-xilosa sustituida con galacturano y ramnogalacturano, las cadenas de arabinano y galactano se unen por los residuos de ramnosa (Aro *et al.*, 2005).

En contrapartida, la pared de celulosa es reforzada por la lignina, un polímero insoluble, complejo y ramificado de unidades fenilpropano sustituidas las cuáles se unen por enlaces éter o Carbono-Carbono formando una extensa red dentro de la pared celular vegetal; estos enlaces hacen que sea un polímero recalcitrante (figura 5). Este polímero es el producto de la condensación de varias moléculas y

no es formado por una vía enzimática, lo cual determina que su estructura sea altamente variable dependiendo el tipo de planta, su estado fenológico y tasa fotosintética (Ortiz, 2010).

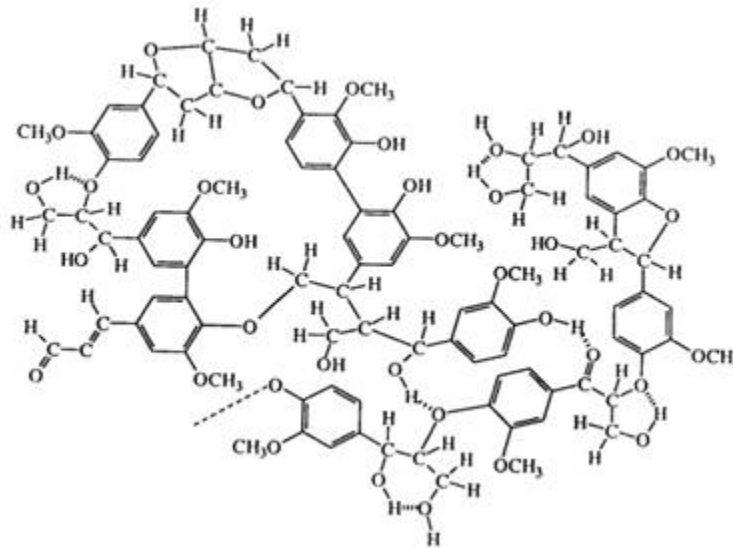


Figura 5. Estructura química de la lignina.

Tomado de: <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%207/6.html>

Para la degradación de la lignocelulosa se han usado diferentes metodologías buscando la máxima conversión pero en algunos casos esto implica tiempos largos de proceso, medios sintéticos o el empleo de enzimas comerciales en altas dosis incrementando los costos.

Sin embargo, para tener éxito a largo plazo y especialmente al escalar los procesos a nivel industrial deben plantearse análisis que demuestren sostenibilidad ambiental y viabilidad económica. Entre los factores que afectan la hidrólisis enzimática de los residuos se pueden mencionar algunos de gran importancia como la concentración del sustrato, porque de ésta depende la cantidad de azúcares que se puede obtener, el pH, que tiene implicaciones en el crecimiento microbiano y en la producción de enzimas, el contenido de metales

como el cobre, el manganeso, el zinc, el hierro, el calcio, entre otros, que son necesarios para el metabolismo, el desarrollo, las funciones celulares y la reproducción que están relacionados con la expresión de las enzimas (Montoya, 2008).

Se puede resaltar entonces que las principales enzimas de carácter lignocelulolítico son:

### **2.3.1 Lignina peroxidasa (LiP)**

Conocida como ligninasa es una de las enzimas más importantes involucradas en la degradación de la lignina (figura 5). Fue descubierta en 1983 a partir del hongo de pudrición blanca *P. chrysosporium*. La lignina está ubicada en la lámina secundaria de las paredes celulares y es el componente de las plantas degradado más lentamente. No es químicamente uniforme y tiene una estructura muy compleja. Los monómeros son todos derivados del fenilpropano, principalmente alcohol coniferilo (Carrillo, 2003). Las LiPs son glicoproteínas del tipo oligomanosa con un peso molecular en el intervalo de 38 a 43 KDa. Esta enzima tiene un alto potencial redox, puede oxidar compuestos fenólicos y no fenólicos (Niladevi, 2009). Las unidades fenilpropano están entrecruzadas por múltiples enlaces éter y C-C, que son extremadamente resistentes al ataque enzimático.

Las reacciones catalizadas por la LiP incluyen enlaces C $\alpha$ -C $\beta$  de los lados de la cadena propil, hidroxilación de grupos metileno bencílico, oxidación de alcohol bencílico para obtener aldehídos o cetonas, oxidación de fenoles y rompimiento de anillos aromáticos de los compuestos no fenólicos de la lignina. Esta peroxidasa hemo tiene el mecanismo catalítico típico de las peroxidases, por lo que requiere



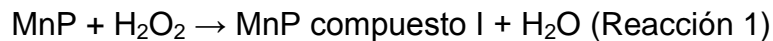
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La enzima nativa es oxidada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y genera un compuesto I deficiente en dos electrones. Este compuesto puede oxidar un compuesto y puede ser reducido a un compuesto II, el cual es deficiente en un electrón. Luego de la oxidación de otra molécula por el componente II, la LiP regresa a su estado nativo. Cuando hay un exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> éste se combinaría con el compuesto II de la LiP, generando un compuesto III el cual es una forma inactiva de la enzima. Sin embargo, en muchos casos los sustratos no tienen acceso al grupo hemo de la LiP y la oxidación del sustrato no ocurre.

En tales casos se involucra un mediador redox que juega un papel importante. El veratril alcohol es un excelente sustrato para la LiP el cual actúa como mediador redox para la oxidación indirecta de otros sustratos. El veratril alcohol estimula la oxidación previniendo la inactivación de la enzima y este se oxida a radical catiónico, que es fuertemente oxidante y actúa transfiriendo un electrón a la reacción catalítica de la LiP (Niladevi, 2009).

### **2.3.2 Manganeso peroxidasa (MnP)**

Se encontró por primera vez en cultivos ligninolíticos de *P. chrysosporium*, por Kuwahara y col. (1984) Posteriormente se halló en otros hongos de la podredumbre blanca y en otros Basidiomycetos, como *Agaricus bisporus*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Citocybula duseinii*, *L. edodes*, *Nemtoloma forwardii*, *Panus tigrinus*, *Phlebia radiata*, *P. ostreatus*, *Rigidoporus lignosus*, *Stropharia rugosoannulata* y *T. versicolor* (Niladevi, 2009). La MnP es otra peroxidasa importante en la degradación de la lignina. Es también una hemo peroxidasa y requiere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para su actividad. El potencial redox del sistema MnP es más bajo que el de la LiP y normalmente no oxida compuestos no fenólicos. Sin embargo, se ha reportado que MnP a partir de *Panus tigrinus* es capaz de

degradar compuestos no fenólicos. La oxidación de la lignina y otros fenoles por la MnP es dependiente de iones libres de Mn<sup>+2</sup>. La MnP muestra una fuerte preferencia por el sustrato Mn (II). Esta enzima oxida Mn<sup>+2</sup> a Mn<sup>+3</sup>, el cual es estabilizado por ácidos orgánicos como oxalato, malonato, glioxilato, etc., y actúa a su vez como mediador redox que ataca la degradación de residuos agroindustriales para la obtención de azúcares mediante enzimas lignocelulolíticas, oxida varios compuestos inespecíficamente vía Hidrógeno y ocurre abstracción de un electrón. Los ácidos orgánicos también facilitan la liberación del Mn (III) a partir del sitio activo de la enzima. La oxidación de Mn (II) a Mn (III) ocurre en las siguientes etapas:



El Mn<sup>+2</sup> reduce el componente I y el componente II, generando Mn<sup>+3</sup>, el cual posteriormente oxida el sustrato orgánico (Niladevi, 2009).

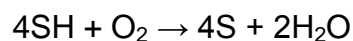
Esta enzima es producida en combinación con la LiP o la lacasa. Algunos ejemplos son: Morais y col. (2002) que evaluaron la producción de la MnP a partir de *P. ostreatus* y encontraron grandes diferencias dependiendo del medio de cultivo y el tiempo de fermentación. Kumar y col. (2006) también produjeron esta enzima en fermentación sólida sobre hojas de *Achras zapota* (planta de la india) a partir de *P. chrysosporium*. Otros autores como Boer y col. (2006) y Kamitsuji y col. (2004) la han purificado a partir de *L. edodes* y *P. ostreatus* respectivamente (Quevedo, 2011).

También, la regulación de los genes codificantes para las enzimas ligninolíticas ha sido estudiada a nivel del mRNA principalmente en *P. chrysosporium*. Estudios en

la expresión de los genes de la manganeso peroxidasa (*MnP*) y lignina peroxidasa (*LiP*) son complicados por el hecho de que la mayoría de hongos ligninolíticos posee varios genes *LiP* y *MnP* cercanamente relacionados pero regulados de forma diferente. Por ejemplo, *P. chrysosporium* tiene al menos 10 genes *LiP* (Ortiz, 2009).

### 2.3.3 Lacasa

Es una polifenol oxidasa que pertenece a la familia de las multicobre azul oxidasas y se caracterizan por su capacidad de catalizar la reacción de reducción de oxígeno molecular a agua, acoplada a la oxidación de diferentes sustratos como pueden ser fenoles, aminas, ligninas y otros compuestos inorgánicos de acuerdo con la siguiente reacción:



Como ventaja adicional, con la presencia de mediadores las lacasas presentan una gama amplia de sustratos (S) y luego son capaces de oxidar compuestos con un potencial redox superior al propio. A diferencia de la *LiP* y la *MnP* no requiere  $\text{H}_2\text{O}_2$  para oxidar sus sustratos. El sitio activo de cada molécula de lacasa tiene cuatro iones cobre, uno tipo I (T1), uno tipo 2 (T2) y dos tipo 3 (T3). Los sitios de los dos iones cobre T3 están antiferromagnéticamente acoplados. Los sitios T2 y T3 están organizados en un único grupo que es capaz de ligarse al oxígeno, el cual es el aceptor final de electrones. Su actividad está ampliamente distribuida entre los diferentes grupos de hongos, bacterias y también en algunas plantas e insectos (Niladevi, 2009).



Por otro lado, la celobiosa también puede ser atacada por la celobiosa deshidrogenasa oxidando celobiosa a celobiolactona bajo la reducción del oxígeno a peróxido de hidrógeno y  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$  (Quevedo, 2011).

## **2.4 ACTIVIDAD DE DIFERENTES ENZIMAS SOBRE SUSTRATOS ESPECÍFICOS LIGNOCELULOSOS**

Las enzimas celulolíticas están agrupadas en al menos 15 de las más de 80 estructuras conocidas de las familias glicosil hidrolasas (M. L. Rabinovich, 2002). Pero a pesar de que la enzimología de degradación de la lignina por hongos de pudrición blanca ha sido ampliamente estudiada durante las últimas décadas, se sabe más bien poco sobre la expresión de las diferentes isoenzimas LiP, MnP y lacasa durante la degradación de lignocelulosa como sustrato para el crecimiento de hongos en sustratos más comunes como madera o paja. Dado que algunas de las isoformas se expresan claramente sólo bajo condiciones de estado sólido, es importante para el estudio de la producción de las enzimas en astillas de madera u otro material rígido, con el fin de elucidar el papel de las enzimas de degradación de lignina selectiva. (Quintero, 2006).

En algunos estudios se observó que *Physisporinus rivulosus* secreta ácido oxálico extracelular como el único ácido orgánico durante la etapa de crecimiento en astillas de madera, la producción de ácido oxálico durante la primera etapa de crecimiento de hongos puede tener varias funciones tales como bajar el pH cerca de la solución óptima de las enzimas ligninolíticas, agentes quelantes el  $\text{Mn}^{3+}$  -cationes formados por la MnP y la creación de un sustrato para la formación de especies reactivas de oxígeno (Terhi K. Hakala , 2004).

Dentro de los conceptos generales se sabe que la celulosa es el componente básico de los vegetales y consta de unidades de  $\beta$ -D- glucopiranosas reunidas por enlaces 1,4-glicosídicos. La molécula de celulosa tiene regiones cristalinas alternadas con zonas amorfas. La insolubilidad de la celulosa y su alta resistencia mecánica se debe a la presencia de puentes de hidrógeno inter e intramoleculares y a fuerzas de Van der Waals (Carrillo, 2003).

En el proceso de degradación de celulosa participan principalmente tres enzimas:

- Endo- $\beta$ -1,4-glucanasa que ataca los enlaces  $\beta$ -1,4 en las regiones amorfas internas de la macromolécula dando largos fragmentos solubles (oligosacáridos),
- Exo- $\beta$ -1,4-glucanasa que separa el disacárido celobiosa desde los extremos de la molécula
- $\beta$ -glucosidasa que hidroliza la celobiosa con formación de glucosa (Carrillo 2003).

Este proceso ocurre naturalmente en el rúmen de algunos animales bajo condiciones anaeróbicas, la celulosa es atacada por bacterias y unos pocos hongos anaeróbicos del grupo Chytridiomycetes. Los hongos tienen más éxito que las bacterias durante la celulólisis en los suelos ácidos o en la madera (lignocelulosa). Excretan celulasas que pueden ser aisladas del medio de cultivo así como del micelio. Las bacterias deslizantes y las mixobacterias no excretan celulasas al medio pero se adhieren a las fibras de celulosa para digerirlas (Carrillo, 2003). El crecimiento aeróbico, por otra parte, capacita a algunos organismos para oxidar completamente cierta fracción del sustrato y extraer así la máxima energía para convertir el resto del sustrato en masa celular.

Por el lado del almidón, tenemos que es el material de reserva que predomina en las plantas y comúnmente se presenta en gránulos con una típica estructura en capas. Está compuesto de dos glucanos: amilosa y amilopectina. La amilosa consiste de una cadena helicoidal no ramificada de unas 200 - 500 unidades de D-

glucosa con enlaces 1,4- $\alpha$ -glicosídicos. La amilopectina es también un polímero 1,4- $\alpha$ -D-glucosa que, como el glicógeno está ramificado por enlaces 1,6- $\alpha$ -glicosídicos aproximadamente cada 25 unidades de glucosa (Carrillo, 2003).

Hay tres tipos de descomposición enzimática de los glucanos: fosforólisis, hidrólisis y transglicosilación. La fosforólisis por la  $\alpha$ -1,4-glucanfosforilasa sólo ocurre intracelularmente. La transglicosilación es la formación de ciclodextrinas con 6-8 unidades de glucosa a partir del almidón. El ataque extracelular del almidón es debido a la acción hidrolítica de las amilasas. La  $\alpha$ -amilasa ataca los enlaces 1,4- $\alpha$ -glicosídicos aún en el centro de la cadena por lo que se la conoce como endoamilasa, produciendo glucosa, maltosa y oligómeros de 3 a 7 unidades. La  $\beta$ -amilasa, presente en plantas y bacterias, también degrada los enlaces 1,4- $\alpha$ -glicosídicos pero comienza su acción por el extremo libre no reductor del almidón, liberando maltosa. La hidrólisis se detiene en los puntos de ramificación de la amilopectina y el residuo se conoce como dextrina límite. La pululanasa o isoamilasa hidroliza los enlaces 1,6- $\alpha$ -glicosídicos quitando las ramas de la amilopectina o las dextrinas. La maltasa hidroliza la maltosa a glucosa. Si estas enzimas acompañan a las anteriores se logra una degradación total del almidón (Carrillo, 2003).

De igual importancia, las hemicelulosas consisten en polímeros de pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (glucosa, manosa, galactosa) o ácidos urónicos (glucurónico, galacturónico) son sustancias de soporte o de almacenamiento en las plantas, el xilano es el polisacárido más abundante después de la celulosa, tiene cadenas de 30 - 100 unidades de  $\beta$ -D-xilopiranosas con enlaces 1,4-glicosídicos. Algunos xilanos también presentan arabinosa, glucosa, galactosa y glucuronato en ramas laterales unidas al C3 de la xilosa. El xilano es degradado más rápidamente que la celulosa. Los mananos constituyen el 11% del peso seco de la madera de algunas coníferas. Son hidrolizados por muchos organismos que también actúan sobre galactomananos y glucomananos. Los galactanos son degradados más lentamente que otras hemicelulosas y tienen enlaces  $\beta$ -1,4 y  $\beta$ -

1,3 glicosídicos. Las galactanasas microbianas producen galactosa, galactobiosa y galactotriosa. Sin embargo, la degradación de las hemicelulosas está determinada por la disponibilidad de nitrógeno como ocurre con la descomposición de la celulosa (Carrillo, 2003).

De igual manera, las pectinas están constituídas por cadenas no ramificadas de ácido D-galacturónico con enlaces 1,4- $\alpha$ -glicosídicos, parcial o completamente esterificadas con metanol en las pectinas insolubles (protopectina) las cadenas están entrecruzadas por cationes  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  unidos a los grupos carboxilos.

No obstante, la degradación de lignina ocurre en presencia de oxígeno y glucosa. El sistema enzimático contiene peroxidasas que catalizan la ruptura oxidativa de los enlaces  $\beta$ -O-4 éter y los C-C de la lignina y requieren  $\text{H}_2\text{O}_2$  proveniente de la oxidación por la glucosa-oxidasa. La formación de peroxidasas es promovida por la limitación de nitrógeno y la descomposición de la lignina parece tener como principal objetivo el acceso a los componentes nitrogenados de la madera y sobre los compuestos fenólicos de bajo peso molecular liberados actúan luego las fenoloxidasas (Carrillo, 2003).

Durante la etapa de hidrólisis se provoca la ruptura de los polímeros de celulosa y hemicelulosa obteniéndose los monómeros respectivos. La hidrólisis completa de celulosa da exclusivamente el monómero D-glucosa, mientras que a partir de las hemicelulosas se obtienen un conjunto de pentosas y hexosas, como manosa, glucosa, xilosa, etc. Aclarando que los azúcares de cinco carbonos son difíciles de fermentar por los microorganismos comunes. La etapa de hidrólisis puede realizarse mediante catálisis química o enzimática aunque existen otros métodos menos utilizados y poco estudiados como la irradiación gamma y la utilización de microondas, entre otros (Dagnino *et- al*).

Así, la hidrólisis enzimática presenta ventajas frente a la hidrólisis química entre las cuales pueden mencionarse que no genera gran corrosión, bajo consumo de



enzima y baja toxicidad de los hidrolizados. También son menores los costos de equipamiento debido a que se realiza a presión atmosférica y a temperatura próxima a la ambiental los rendimientos son mayores, no necesita utilizar agentes químicos, no produce compuestos inhibidores de la fermentación y se pueden obtener rendimientos cercanos al 100%; sin embargo la gran desventaja de la hidrólisis enzimática es el tiempo necesario para que ocurra la reacción, ya que a menudo son varios días en comparación con la hidrólisis química que son unos pocos minutos. Otra gran desventajas son los altos precios de las enzimas requeridas en el proceso aunque ya se está mejorando el aspecto económico para facilitar la adquisición de estas enzimas (Novozyme S.A., 2013).

## **2.5 USOS Y APLICACIONES DE LAS PRINCIPALES ENZIMAS LIGNOCELULOLITICAS A NIVEL INDUSTRIAL**

Para que una enzima sea útil industrialmente debe ser barata en comparación al precio del proceso global y debe ser activa en las condiciones en que se realiza el proceso sin la enzima. Si esto no ocurriese, sería más conveniente emplear otra enzima que sea activa en dichas condiciones a variar las condiciones en las que se efectúa el proceso. La enzima debe ser estable (muchas enzimas empleadas en procesos industriales operan a temperaturas alrededor de los 50°C), adicionalmente debe estar disponibles en cantidades relativamente elevadas y debe ser segura. La estabilidad de las preparaciones enzimáticas durante su almacenamiento es muy importante. Las enzimas empleadas en la industria rara vez son cristalinas, químicamente puras o solamente proteínas. Las posibles impurezas que presenten no deben interferir en la actividad enzimática a pesar de que en ocasiones pueden catalizar la formación de subproductos o pueden ser

tóxicos. Además, tener en cuenta que las moléculas más comunes que contaminan la enzima son las propias enzimas inactivas.

Después de todo, el empleo de enzimas es ventajoso porque actúan en condiciones de pH, temperatura y presión que son compatibles con el mantenimiento de la estructura y otras propiedades del producto; además minimiza los requerimientos energéticos del proceso. Por lo que las variaciones de las condiciones del proceso podrían hacer perder las propiedades deseadas del producto que se pretende obtener.

Resaltando la importancia del aprovechamiento de residuos vegetales en grandes cantidades que unido a su lenta degradación y dificultad en el manejo se convierten en un problema de alto impacto ambiental, pérdida de espacio físico, generación de plagas e impacto negativo sobre el paisaje. En la mayoría de los casos dentro del programa de gestión ambiental, los residuos vegetales se tratan en pilas de compostaje, aunque siguen siendo desechos de post-cosecha subutilizados y con bajo o ningún valor económico.

La hidrólisis enzimática de residuos vegetales agroindustriales es una alternativa para su aprovechamiento en la producción de azúcares, sin la necesidad de reemplazar tierras que en la actualidad se usan para cultivos alimenticios por los llamados cultivos energéticos, con lo cual no se pondría en riesgo la seguridad alimentaria. De hecho, la hidrólisis enzimática tiene ventajas sobre la hidrólisis ácida, especialmente porque las condiciones de operación son menos críticas, temperatura cercana a la ambiente, pH moderado, entre 4 y 6, y medios no corrosivos y de menor impacto ambiental, lo que la hace atractiva desde el punto de vista industrial. Sin embargo, el alto costo de la enzima y la necesidad de un pre-tratamiento químico o biológico para eliminar la lignina, son las principales desventajas frente a los catalizadores ácidos.

Por otro lado, la especificidad de sustrato y el modo de acción no son ya el único criterio para la asignación de la enzima (Carrillo, 2003), se puede asegurar que la naturaleza del sustrato y el método de pretratamiento usado influyen sobre la eficiencia de degradación del material lignocelulósico cuando se utilizan enzimas (López, 2008). El pretratamiento es un factor importante a tener en cuenta en los procesos de hidrólisis de materiales lignocelulósicos. Estos pretratamientos facilitan el ataque de las enzimas a la matriz lignocelulósica (Salcedo, 2011).

Para la degradación biocatalítica existe un gran espectro de enzimas degradadoras de polisacáridos que actúan en forma compleja (pectinasas, celulasas, oxidoreductasas y hemicelulasas, entre otras). La acción de una enzima es restringida por la accesibilidad al sustrato. En el caso de las celulasas, disminuyen su acción sobre la celulosa por la presencia de otros polisacáridos. También es conocido que la combinación de enzimas degradadoras de polisacáridos actúa sinérgicamente en la degradación de la matriz de la pared celular (Salcedo, 2011).

De igual manera, la velocidad y extensión de la hidrólisis de sustratos lignocelulósicos se ve influenciada no solamente por la eficiencia de las enzimas, sino también por las características fisicoquímicas y morfológicas expresadas en la heterogeneidad de los sustratos lignocelulósicos. Por esto, se hace necesaria la utilización de sistemas muy selectivos (enzimas), para la degradación de este tipo de materiales.

En general el pretratamiento alcalino es el que más favorece la hidrólisis enzimática, ya que produce los rendimientos más altos de azúcares reductores. Con este pretratamiento se obtiene un rendimiento de sacarificación 134 % mayor que con el pretratamiento con ácido sulfúrico y 246 % mayor que el de explosión de vapor (López, 2008).

Se sabe que la producción de enzimas es costosa; por lo que una alternativa para abatir costos es obtenerlas de subproductos agroindustriales a partir de hongos filamentosos aislados de los mismos residuos. La ventaja de utilizar hongos aislados de los subproductos agroindustriales es que ya estarían adaptados al sustrato para la producción de las enzimas antes mencionadas. La producción de enzimas ligninolíticas y la biodegradación de contaminantes, se favorece cuando estos hongos se inoculan en el suelo mezclados con materiales lignocelulósicos que les suministran la fuente de carbono necesaria para sostener su crecimiento e inducir la producción del complejo enzimático (Quintero, 2006).

Muchas de las enzimas degradadoras de biomasa vegetal han recibido considerable atención por sus potenciales aplicaciones en las industrias de alimentos, concentrados, agropecuarias, textiles, del papel y petrolera (Buchert *et al.*, 1998; van Wyk, J., 2001).

Por otra parte existe una gran variedad de enzimas disponibles que difieren en la fuente biológica, actividad y pureza. Tan amplia es la variedad de enzimas disponibles que algunas preparaciones comerciales se asocian con aplicaciones industriales concretas, llegándose incluso a realizar preparaciones a medida para diferentes aplicaciones: en la industria de la cerveza, detergentes, farmacéutica, procesado del almidón, papel, textil, cuero, vino, zumos de fruta, entre otros.

Todos los organismos producen enzimas de actividad muy variada y en general en cantidades bajas que son únicamente para sus procesos celulares. Un caso particular es el de los microorganismos que pueden producir algunas enzimas en concentraciones muy altas y las excretan al medio (como ocurre con los hongos). Las enzimas extracelulares son capaces de digerir muchos materiales poliméricos insolubles como celulosa, almidón, proteínas; cuyos monómeros son utilizados como nutrientes por los microorganismos.

Algunos ejemplos de este tipo de producción se muestran en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Residuos agroindustriales lignocelulósicos utilizados para generar productos de valor agregado.

<b>Residuo utilizado</b>	<b>Enzimas / microorganismos implicados</b>	<b>Producto obtenido</b>	<b>Rendimiento</b>	<b>Bibliografía</b>
Limón, naranja y maracuyá	Hongo <i>Geotrichum klebahnii</i> , (protopectinasa)	Peptina	En investigación	ww.agenciadenoticias.unal.edu.co
Uva	<i>Aspergillus awamori</i>	Celulasas, xilanasas y pectinasas	En investigación	<a href="http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2012_2">http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2012_2</a>
Naranja, piña y cachaza de caña panelera	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Dextrano y fructosa	En investigación	<a href="http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2012_2">http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2012_2</a> (Rodríguez & Hansen, 2007).
Mango	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> spp.	Alcohol etílico	0,76 %	Mejía Luis, <i>et-al.</i> , Hidrólisis y fermentación alcohólica simultánea (HFS) del residuo agroindustrial del mango común ( <i>Mangifera indica</i> L) utilizando levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> spp y cepa recombinante RH 218. Revista Científica Guillermo de Ockham. Vol. 7, No. 2. Julio - Diciembre de 2009 - ISSN: 1794-192X. pp. 51-64
Tallo de maíz, bagazo de caña, aserrín de establos, café	<i>Pleurotus ostreatus</i> spp.	Cuerpos fructíferos	40-48 %	Garzón Juan P., Cuervo Jairo L., Producción de <i>Pleurotus ostreatus</i> sobre residuos sólidos lignocelulósicos de diferente procedencia. ISSN:1794-2470 Vol. 6 N° 10 Julio-Diciembre 2008: 101-236

## 2.6 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS

Es necesario resaltar que los principales productores de enzimas lignocelulolíticas son los hongos (en especial los de tipo filamentoso), básicamente deben hacerlo

puesto que la composición de los sustratos de los que se alimentan tiene estructuras muy complejas que son difíciles de degradar.

Sin embargo, en suelos con pH 6,5 - 7,5 se encuentran bacterias como *Cellulomonas*, a pH 5,7 - 6,2 se desarrollan otras como la *Cytophaga* y si la acidez descende predominan los hongos. Se pueden encontrar bacterias celulolíticas anaerobias también en suelos ácidos con pH 4,3. Sin embargo, las mixobacterias son las más sensibles a la acidez por lo que se las encuentra en el mantillo de huertos, en suelos abonados y en suelos ricos en calcio (Carrillo, 2003).

Por el lado de los hongos, dos grupos se distinguen entre los destructores de madera: los que causan la podredumbre parda que degradan celulosa y hemicelulosas dejando la lignina como residuo y los que provocan la podredumbre blanca que degradan lignina. Entre estos últimos se encuentran *Stereum*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Ganoderma*, *Polyporus*, *Xylaria* (Carrillo, 2003).

La degradación de la biomasa vegetal es un proceso complejo que involucra la acción sinérgica de un gran número de enzimas extracelulares (Aro *et al.*, 2005). Los hongos filamentosos más estudiados con respecto a sus enzimas degradadoras de biomasa vegetal son *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.* y el basidiomiceto ligninolítico *Phanerochaete chrysosporium* (Ortiz, 2009). Estas enzimas han sido ampliamente estudiadas y caracterizadas especialmente a partir de *Trichoderma reesei*. Pero este hongo no tiene la capacidad de degradar lignina dada la importancia en la degradación de lignocelulosa.

Sin embargo, Muñoz y col. (2001) investigaron las celobiohidrolasas (CBH) del hongo *P. chrysosporium*, observando sinergia entre las celulasas de *P. chrysosporium* y una acción sobre la celulosa similar a la que se había encontrado para *Trichoderma reesei*. Los resultados mostraron que las CBH son enzimas

claves para la degradación de la celulosa y sugieren que podrían permitir una gran eficiencia en aplicaciones particulares (Quevedo, 2011).

Y en otros estudios, el cultivo de *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius* en pulpa de café durante 40 y 50 días respectivamente llevó a la producción de carboximetilcelulasa (CMCasa), celobiohidrolasa (CBH), MnP y lacasa a través del tiempo. Las actividades más altas de CMCasa y CBH estuvieron relacionadas con la formación del cuerpo fructífero, mientras que la lacasa y MnP fueron detectadas en diferentes períodos de incubación (Quevedo, 2011).

Por otro lado, los microorganismos extremófilos son capaces de crecer a altas temperaturas, en algunos casos por encima de la temperatura de ebullición del agua. Los hipertermófilos son capaces de crecer a estas temperaturas tan altas porque producen moléculas estables al calor, incluidas enzimas. Se utiliza el nombre de extremozima para referirse a enzimas que funcionan a temperaturas extremadamente altas, pero también a aquellas que funcionan bien a cualquier condición, frío o altas concentraciones salinas o pH ácidos.

La celulólisis puede producirse en un amplio rango de temperatura que va de 5 a 65°C. Entre los microorganismos termófilos que degradan lignocelulosa se encuentran *Clostridium*, *Streptomyces*, *Chaetomium*, *Humicola*, presentes en el estiércol y los vegetales en descomposición. Cabe resaltar que los microorganismos celulolíticos del suelo son principalmente mesófilos y que muchos hongos del suelo así como bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* entre otras producen amilasas (Carrillo, 2003).

### 3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Es conveniente tener presente que antes de realizar cualquier aplicación industrial usando enzimas de tipo lignocelulósico debe tenerse en cuenta su funcionamiento bioquímico porque serán piezas claves y determinantes en todo el proceso que se desee ejecutar. Lo anterior con el propósito de tener un conocimiento más amplio de la interacción bioquímica del sustrato con la enzima, con un resultado final dirigido hacia la obtención de mayor productividad en el proceso industrial.

Las publicaciones actualmente disponibles en línea que hacen referencia al tema bioquímico de enzimas lignocelulósicas en realidad son muy pocas, la información respecto al tema bioquímico es limitada y desconocida, algunos autores han hecho acercamientos al posible funcionamiento de estas enzimas pero no son reportes con suficiente información gráfica o esquemática que permita hacer un acercamiento más detallado de las reacciones químicas que allí ocurren; la información que se encuentra es bastante teórica, además, otras investigaciones aún están en desarrollo por lo tanto la información disponible es limitada y de difícil acceso.

Las bases de datos consultadas en busca de información bibliográfica referentes al tema tratado en esta monografía tampoco tienen mucha información específica del tema consultado, se encuentran algunos artículos científicos que brindan información muy generalizada, sin mencionar que algunos artículos son de acceso limitado puesto que se requiere certificar una suscripción en bases de datos para tener libre acceso a la información allí publicada.

No obstante, las publicaciones encontradas hacen mayor referencia a enzimas celulasas, lacasas, lignina y manganeso peroxidasas principalmente. Esto debido a que son las que están en mayor proporción en los residuos agroindustriales más estudiados, sin embargo también se habla de xilanasas, glioxal oxidasa, aril



alcohol oxidasa, que son enzimas que también participan en el proceso degradativo aunque en menor proporción.

Actualmente en Colombia los residuos lignocelulósicos están siendo subutilizados, lo cual causa serios problemas de contaminación ambiental por su deficiente disposición final, pese a que son potencialmente buenos para ser utilizados como materia prima en la producción de azúcares, alimentos concentrados para animales, biomasa microbiana, producción de ácidos orgánicos, entre otros usos.

Se resaltó el uso y aplicación a nivel industrial de las enzimas lignocelulolíticas con recursos aplicados en diferentes campos como la industria textil y papelera, alimentos de consumo humano y animal, detergentes, combustibles, entre otros.

También se hizo una distinción de los principales microorganismos productores de enzimas lignocelulolíticas. Resaltando que su uso en los procesos industriales resulta benéfico y económico ya que los microorganismos por si mismos son unas pequeñas fábricas del arsenal enzimático necesario para la degradación del material vegetal de cualquier tipo. El microorganismo que se usa con mayor frecuencia para el proceso fermentativo es *Saccharomyces cerevisiae* porque es una levadura que además de reproducirse rápidamente es de fácil manipulación y poco exigente en aspecto nutricional y de condiciones ambientales. Sin embargo, los hongos han sido ampliamente estudiados en el proceso degradativo por ser organismos que cuentan con un arsenal de potentes enzimas ligninolíticas que resultan eficaces cuando se requiere degradar residuos lignocelulósicos comunes.

#### 4. PERSPECTIVAS

Diversas estrategias han sido elaboradas para producir biocatalizadores intrínsecamente más estables buscando incrementar la estabilidad durante el proceso catalítico. Entre las estrategias elaboradas para producir enzimas más estables y para incrementar la estabilidad durante el proceso catalítico se encuentra el uso de microorganismos extremófilos y de organismos mutantes y recombinantes, obtenidos por técnicas de mutagénesis dirigida e ingeniería genética como fuentes de enzimas de elevada estabilidad. Otra estrategia para asegurar la estabilidad es el uso de enzimas soportadas o contenidas en matrices y el uso de enzimas en medios de reacción no convencionales. Las enzimas inmovilizadas pueden ser notablemente más estables que sus contrapartes solubles, al reducirse la movilidad molecular y crearse un microambiente eventualmente protector.

Muchos procesos industriales funcionan mejor a altas temperaturas, por lo que las extremozimas provenientes de microorganismos hipertermófilos se están haciendo cada vez más atractivas como biocatalizadores para las aplicaciones industriales y también para uso en investigaciones que requieren enzimas. Algunos ejemplos de las enzimas más conocidas son la Taq y Pfu polimerasas que se utilizan en la reacción de la PCR.

## BIBLIOGRAFÍA

ARO N, Pakula T, Penttilä M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005; 29:719-739.

BUCHERT J, *et-al.*, Applications of *Trichoderma reesei* enzymes in the pulp and paper industry (Harman, G., and Kubicek, C., Eds) *Trichoderma and Gliocladium*, 1998. Taylor & Francis, London. Vol 2, pp. 343-364.

CARRILLO, Leonor. Actividad microbiana. *Microbiología agrícola*, 2003. 1-28.

DAGNINO Eliana P. *et-al.* Hidrólisis enzimática de cascarilla de arroz pretratada con ácido diluido para evaluar la eficacia de la etapa de pretratamiento. EN. II Jornada de investigación en ingeniería del NEA y países limítrofes (Argentina). 5 p.

GONZÁLEZ Carlos A. Enzimas. Argentina. [Artículo en línea], disponible desde internet en: <<http://www.botanica.cnba.uba.ar/Pakete/6to/Enzimas.htm>> [con acceso el 22-04-13].

LEIVA Mynor, Generalidades de enzimas, Guatemala, Universidad de San Carlos, 2007. 39 p.

LOPEZ Javier *et-al* "Optimización del proceso de obtención enzimática de azúcares fermentables a partir de aserrín de pino." *Rev. Int. Contam. Ambient.* 2008. : 95-102 p.

M. L. RABINOVICH, M. S. Melnick, and A. V. Bolobova. The Structure and Mechanism of Action of Cellulolytic Enzymes. Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninsky pr. 33, Moscow, Rusia, 2002, 22 p.

MONTOYA BARRETO Sandra, Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos orgánicos y generación de biomasa útil del macromiceto *Grifola frondosa*. Trabajo de grado maestría en ingeniería química. Manizales, Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ingeniería. 2008. 96 p.

NILADEVI, K.N. Ligninolytic enzymes. In P. Singh & A. Pandey (Eds.), *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. Dordrecht: Springer Netherlands. 2009, pp. 398-410.

NOVOZYME S.A. Enzymes at work. Disponible desde Internet: ([http://www.novozymes.com/en/about-us/brochures/Documents/Enzymes\\_at\\_work.pdf](http://www.novozymes.com/en/about-us/brochures/Documents/Enzymes_at_work.pdf)). [con acceso el 20-04-13].

ORTIZ MORENO Martha L. Evaluación preliminar de la abundancia de hongos lignolíticos cultivables y su actividad peroxidasa, obtenidos a partir de suelos con diferentes usos agrícolas en zona rural de Villavicencio. *Orinoquia*, vol. 14, núm. 1, Diciembre, 2010, pp. 171-177, Universidad de Los Llanos, Colombia.

ORTIZ, Martha L. Aproximaciones a la comprensión de la degradación de la lignina, *Orinoquia*, Redalyc, Vol. 13, núm. 2, Diciembre, 2009, pp 137-144.

QUEVEDO HIDALGO Balkys E. Evaluación de la degradación de residuos de floricultura para la obtención de azúcares con el uso de tres hongos lignocelulolíticos. Doctorado en ingeniería química. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ingeniería química y ambiental. 2011, 178 p.

QUINTERO D., J. C. G., Feijoo C.; Lema R., Juan m. "Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos." *Redalyc* Vol. 13, núm. 2,; 2006 pp 61-67.

RODRIGUEZ de Stouvenel, A. and Sernal, C., Economical Production of Lactic Acid Using Sugar Cane Wastes and Juice (*Saccharum officinarum L.*). *Agricultura Técnica*, 1:Vol. 67, pp. 29-38, 2007.

SALCEDO M. JAIRO G., LOPEZ GALAN J. E., FLOREZ PARDO L. M. Evaluación de enzimas para la hidrólisis de residuos (hojas y cogollos) de la cosecha caña de azúcar. 2011. pp. 182-190.

TERHI K. Hakala. Characterization of the lignin-modifying enzymes of the selective white-rot fungus *Physisporinus rivulosus*. University of Helsinki, 2007. ISBN 978-952-10-4173-0 (PDF). 60 p.

TIMELL T. Recent progress in the chemistry of Wood hemicelluloses. *Wood Science and Technology*. 1967;1:45-70.

VAN - WIK J. Biotechnology and the utilization of biowaste as a resource for bioproduct development, *Trends in Biotechnology*. 2001; 19 (5):172-177.

WILKIE K. Hemicelluloses of grasses and cereals, *Advanced Carbohydrate Chemistry*. 1979; 36:215-264.