

Artículo original

Producción de celulasas y biomasa del hongo *Trichoderma reesei* utilizando lodo papelerero como fuente de carbono

Rafael Centeno Rumbos, Domenico Pavone Maniscalco*

Centro de Biotecnología Aplicada, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.

Recibido 29 de septiembre de 2014; aceptado 16 de abril de 2015

Resumen: La producción del papel en Venezuela genera una gran cantidad de desechos de fibras de celulosa no utilizables (lodo papelerero), produciéndose problemas ambientales y de almacenamiento. La búsqueda de usos para este lodo papelerero disminuiría los problemas generados. En este trabajo, se utilizó al hongo *Trichoderma reesei* para la realización de fermentaciones líquidas y el estudio del efecto de sales minerales, tamaño de partícula del lodo y pretratamientos ácidos y básicos, sobre la producción de azúcares reductores y la actividad celulasa. También se realizaron fermentaciones sólidas para obtener biomasa (esporas) del hongo. Los resultados indicaron que el uso de lodo higiénico, sales minerales y la reducción del tamaño de partícula, mejoran el rendimiento en azúcares reductores (AR). La máxima actividad celulasa obtenida, medida con carboximetilcelulosa, fue de 2,6 mg AR/L/h. Se determinó que con el pretratamiento ácido se obtienen mayores cantidades de AR (17 mg/L) que con el básico (7,4 mg/L). Se demostró que *T. reesei* puede crecer en fermentaciones sólidas a expensas del lodo papelerero generando hasta $1,24 \times 10^8$ esporas por gramo de lodo seco. Se requiere estandarizar y escalar estas técnicas para usar al lodo papelerero como materia prima en este tipo de procesos industriales.

Palabras clave: fermentación líquida, fermentación sólida, lodo papelerero, *Trichoderma reesei*.

Production of cellulase enzymes and biomass of the fungus *Trichoderma reesei* using paper sludge as carbon source

Abstract: Paper production in Venezuela generates large amounts of cellulose fibers (paper sludge), producing environmental and storage problems. Finding uses for this papermaking sludge would decrease the problems caused. In this work the fungus *Trichoderma reesei* was used on submerged fermentation to study the effect of mineral salts, particle size and acid-alkali pretreatment of sludge on production of reducing sugars (RS) and cellulase activity. Solid fermentations were also conducted to obtain biomass (spores) of the fungus. The results indicated that the use of sanitized sludge, mineral salts and smaller particles, increased the production of reducing sugars (RS). The maximum cellulase activity, measured with carboxymethylcellulose, was RS 2.6 mg/L/h. Acid pretreatment was the best in rendering RS (17 mg/L) in comparison with alkali treatment (7.4 mg/L). It was also demonstrated that *T. reesei* can grow on paper sludge producing biomass (spores) with a yield of $1,24 \times 10^8$ spores/g of dry sludge. It is necessary to standardize and scale range these procedures in order to be able to use paper sludge to industrialize these processes.

Keywords: submerged fermentation, solid state fermentation, paper sludge, *Trichoderma reesei*.

* Correspondencia:
E-mail: dfpavone@gmail.com

Introducción

El proceso de producción de papel genera una gran cantidad de residuos, siendo algunos de éstos los lodos papeleros, los cuales se componen básicamente de fibras de celulosa defectuosas, inservibles en el proceso de fabricación del papel, rellenos inorgánicos y metales pesados [1,2]. Las características físicoquímicas y mecánicas del lodo pueden

generar riesgos de inestabilidad cuando se le dispone sobre zonas de ladera o en rellenos. Diariamente se producen alrededor de 200 toneladas de lodos por empresa papelerera, siendo utilizados en compostaje, mezclas con arcillas para elaboración de ladrillos, bloques de concreto, absorbentes de aceites, base para alimento de animales, producción de etanol, entre otros [3,4]. Sin embargo, todos estos procesos no logran utilizar la cantidad total de lodo producido,

por lo que se hace necesaria la implementación de otras alternativas para aprovechar este subproducto.

En la naturaleza existen microorganismos capaces de crecer a expensas de este tipo de sustratos, entre los cuales se encuentran bacterias y algunos hongos principalmente de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma*, todos con capacidad de producir enzimas celulolíticas [5,6]. El hongo *Trichoderma reesei* (teleomorfo *Hypocrea jecorina*, Ascomycetes), es un conocido productor de enzimas celulasas muy utilizado a escala industrial [7], por lo que pudiera tener un gran potencial para degradar el lodo papelerero. Así, en esta investigación se buscó una aplicación biotecnológica para la utilización del lodo papelerero tanto higiénico como no higiénico, usando el hongo *T. reesei*.

Materiales y métodos

Material biológico: Se utilizó la cepa TV219 de *T. reesei*, perteneciente al Centro de Biotecnología Aplicada, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo. La cepa fue aislada de muestras de suelo de plantaciones de maíz del estado Portuguesa, Venezuela, e identificada por metodologías moleculares [8]. El mantenimiento de la misma fue realizado por subcultivos en medio agar papa dextrosa (PDA, HiMedia).

Lodo papelerero: Las muestras provenientes de una planta procesadora de papel del estado Carabobo, Venezuela, se utilizaron como sustrato para la fermentación del lodo papelerero higiénico y no higiénico, bajo dos condiciones de cultivo distintas: sumergidos y sólidos.

Cultivos sumergidos: En cultivos sumergidos se estudió la producción de azúcares reductores (AR) al evaluar dos variables: efecto de sales minerales y disgregación de las partículas. Los lodos papeleros a una concentración final de 2% p/v se adicionaron individualmente a un medio salino propuesto por Okon *et al* [9] y constituido por: $Mg_2SO_4 (7H_2O)$ 0,2 g/L; K_2HPO_4 0,6 g/L; KCl 0,15 g/L; NH_4NO_3 1 g/L; $FeSO_4 (7H_2O)$ 0,005 g/L; $MnSO_4 (7H_2O)$ 0,006 g/L; $ZnSO_4 (7H_2O)$ 0,004 g/L; $CoCl_2$, 0,002 g/L. Se realizó un control utilizando agua destilada y lodo papelerero. Para estudiar el efecto del tamaño de partícula del lodo, el mismo fue disgregado en la solución de sales minerales con una licuadora. Se evaluaron dos tratamientos: lodo intacto y disgregado. Los medios de cultivo (100 mL) fueron procesados en un esterilizador Yamato SM 300 a 121 °C por 15 minutos y se inocularon con *T. reesei* a razón de 10^6 esporas/mL. Los tratamientos (1: sin sales, sin disgregar; 2: sin sales, disgregado; 3: con sales, sin disgregar; 4: con sales, disgregado) se incubaron a temperatura ambiente bajo agitación rotatoria constante a 90 rpm en un agitador orbital modelo Rotabit Marca PSelecta. Los AR fueron estimados por triplicado en el sobrenadante libre de células.

Pretratamientos del lodo papelerero: Una vez evaluado el

efecto de las sales minerales, tamaño de fibra y agitación sobre la producción de azúcares reductores, se procedió a realizar pretratamientos ácidos y alcalinos a los lodos papeleros para ser utilizados en cultivos sumergidos. El primer tratamiento consistió en adicionar a los lodos ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 4% (1 g de lodo en 100 mL de ácido) por 1 hora a 105 °C, mientras que en el segundo se trataron los lodos con el ácido a 60 °C por 24 horas. El tratamiento alcalino se realizó incubando el lodo en NaOH 2M (1 g de lodo en 100 mL de álcali) a 105 °C por una hora y a 60 °C por 24 horas. Como grupos controles se usaron los lodos sin pretratamiento. Luego del tratamiento químico (ácido o alcalino) se ajustó el pH a 5,2 con NaOH 2M o ácido sulfúrico al 4%, según el caso. Finalmente, los lodos pretratados se incorporaron a la solución de sales minerales (1%), se esterilizaron e inocularon con esporas de *T. reesei* (10^6 esporas/mL).

Determinación de la actividad enzimática: En cada tratamiento se tomaron alícuotas de 400 μ L del sobrenadante de las fermentaciones líquidas libre de células y de lodo (centrifugadas a 11.000 rpm por 10 minutos) y se mezclaron con 400 μ L de carboximetilcelulosa al 4% y 100 μ L de sales minerales, obteniendo un volumen de reacción de 900 μ L. Se tomaron 450 μ L para determinar inmediatamente los AR iniciales y el resto fue incubado por 24 horas a temperatura ambiente para determinar los AR finales. Se incluyó un tratamiento incubando el extracto enzimático en baño de agua hirviendo por diez minutos. La actividad enzimática fue reportada como la diferencia entre los AR finales e iniciales, en términos de mg de AR producidos/mL.h.

Determinación de azúcares reductores: Para la determinación de azúcares reductores se usó el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNSA) [10]. Se tomaron 1,5 mL del sobrenadante de las distintas fermentaciones y se centrifugó por 10 minutos a 11.000 rpm en una centrifuga (marca PSelecta, modelo CENTROLIT II-BL). El sobrenadante libre de células fue dividido en tres fracciones de 400 μ L a cada uno de los cuales se le agregó 100 μ L de solución DNS (DNSA 1 g, tartrato de sodio 30 g, NaOH 2N 30 mL, en 100 mL de agua destilada). Las muestras fueron calentadas en baño de agua hirviendo durante 5 minutos y luego se dejaron reposar hasta alcanzar temperatura ambiente. Finalmente, se determinó la densidad óptica (DO) a 540 nm en un espectrofotómetro Spectronic™ GENESYS™ 2.0. Se realizó una curva de calibración a partir de una solución patrón de glucosa 0,5 g/L. Todas las determinaciones fueron hechas por triplicado.

Producción de esporas en cultivos en sustrato sólido: Se tomaron 150 g de lodo higiénico agregando diferentes volúmenes de sales minerales (40 mL, 85 mL, 175 mL), para obtener tratamientos con distintos contenidos de agua. Todos los tratamientos fueron procesados en una licuadora y se esterilizaron en autoclave (121 °C por 15 minutos). Luego de la esterilización se sirvieron los contenidos en bandejas

de aluminio desechables estériles. A cada tratamiento se le agregó 5 mL de una suspensión de esporas de *T. reesei* a razón de 10^6 esporas/mL. Adicionalmente, se preparó un tratamiento con 150 g de lodo sin sales minerales inoculado. Se realizó un tratamiento control agregando 150 g de lodo y 85 mL de sales minerales sin inóculo. Las bandejas fueron envueltas en bolsas de plástico transparentes e incubadas a temperatura ambiente por siete días. Finalmente se determinó el número de esporas por gramo de lodo con la ayuda de una cámara de Neubauer en un microscopio con un aumento de 400X. El rendimiento obtenido se reportó como esporas/g de lodo seco.

Análisis estadístico: Los resultados obtenidos fueron procesados a través de un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias (Tukey), para determinar diferencias significativas entre los tratamientos aplicados. Para aquellos datos que no cumplieran con los supuestos del análisis de varianza se utilizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (K-W) para verificar diferencias significativas y la comparación de medias con la prueba de U – Mann-Whitney. Para esto se utilizó el programa Statistica v 6.0.

Resultados y discusión

Efecto de la presencia de sales minerales y tamaño de partícula sobre el crecimiento de *T. reesei*: Uno de los primeros pasos para la utilización del lodo papelerero en procesos biotecnológicos usando a *T. reesei* es corroborar la factibilidad de producir AR por parte del microorganismo a expensas del lodo como única fuente de carbono y comparar si se puede utilizar tanto al lodo higiénico como no higiénico indistintamente para fines industriales. Esto permitiría manejar ambos materiales sin discriminación, lo cual disminuiría los costos de manejo y producción de derivados.

En la figura 1 puede apreciarse el estudio de algunas

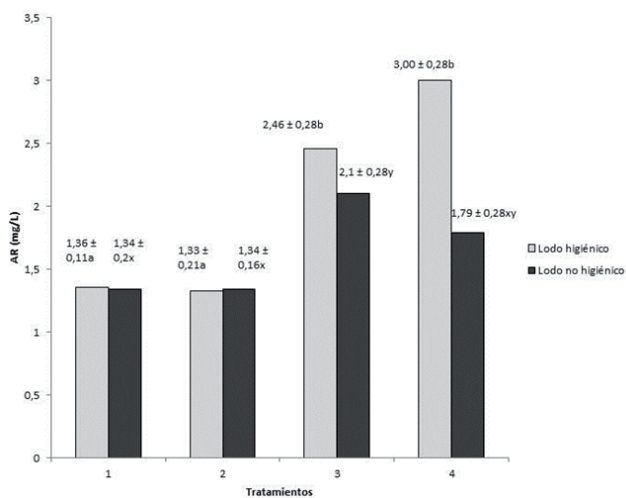


Figura 1. Producción de AR en medio líquido con lodo higiénico o no higiénico como sustrato. Tratamientos: 1: sin sales, sin disgregar. 2: sin sales, disgregado. 3: con sales, sin disgregar. 4: con sales, disgregado.

variables de la fermentación como el tamaño de partícula del lodo y presencia de sales minerales en el día cuatro del proceso. La mayor producción de AR se observó en el proceso con sales minerales y lodo higiénico disgregado con $3 \pm 0,28$ mg/L, encontrándose diferencias significativas en relación al resto de los tratamientos. De forma similar, los resultados con el lodo no higiénico bajo iguales tratamientos (Figura 1), indicaron que los mayores valores de AR se obtuvieron en el tratamiento con sales pero con lodo no disgregado ($2,10 \pm 0,28$ mg/L), sin diferencias significativas con el tratamiento con sales disgregado ($1,79 \pm 0,28$ mg/L). Así, los resultados sugieren que el lodo higiénico es la mejor fuente de carbono para obtener AR en comparación con el no higiénico, además de requerir del agregado de sales minerales para la fermentación.

Los lodos utilizados en el presente estudio se diferencian en su origen y en la composición de algunas sustancias. Las empresas productoras de papel han realizado estudios de la composición de los diferentes lodos, señalándose mayor presencia de metales pesados en el lodo no higiénico que en el higiénico. Este hecho podría explicar la menor actividad biológica en el lodo no higiénico, ya que los metales pesados se han reportado como compuestos capaces de afectar negativamente el crecimiento del género *Trichoderma* [11,12]. Por otro lado, en el caso del lodo no higiénico, se pudo apreciar a lo largo de este estudio la presencia de un olor característico, evidencia del crecimiento de microorganismos propios de aguas residuales. La presencia, crecimiento y productos del metabolismo de estos organismos, podría generar condiciones que no son óptimas para el desarrollo de *T. reesei*. Ésta es un área de estudio que queda por ser desarrollada.

El tamaño de partícula resulta fundamental para el desarrollo de la fermentación ya que está estrechamente relacionado con la accesibilidad del hongo al sustrato. Esta accesibilidad resulta crucial para la adherencia y posterior utilización del mismo. Así, mientras más accesible esté el sustrato, más fácil será para el hongo degradarlo. Al realizar las comparaciones entre cada uno de los tratamientos aplicados a los lodos, se puede observar que para el lodo higiénico mejora el rendimiento en AR al disgregar el material, mientras que para el no higiénico, no hubo diferencias cuando éste fue disgregado, en comparación con el sustrato original.

En algunas fermentaciones donde el sustrato principal es de forma particulada, como es el caso de este estudio, se pueden identificar dos grupos de factores que afectan el desarrollo de hongos filamentosos: (1) la macromorfología de las partículas (tamaño, forma, relación superficie-masa, porosidad, propiedades de adsorción, entre otros) y (2) la actividad de las enzimas involucradas en la hidrólisis de la macromolécula (pH, temperatura, humedad, entre otros). Todos estos factores afectan la velocidad a la cual los distintos compuestos asimilables se hacen disponibles. Si el sustrato debe estar disuelto para poder ser utilizado por el microorganismo, en la medida en que su solubilización se haga más rápida que su consumo su concentración en la

fase acuosa del medio será saturante [13]; en cuyo caso la velocidad de consumo no dependerá de la macromorfología de las partículas o de la actividad enzimática, sino de la concentración celular [14,15]. Lo contrario sucede si la velocidad de solubilización del sustrato es menor que la velocidad de consumo del microorganismo; y la velocidad específica de crecimiento del microorganismo va a depender de los factores que afectan la accesibilidad y/o disponibilidad de nutrientes [16]. La mayor producción de azúcares reductores en los tratamientos disgregados en comparación con los no disgregados, está relacionada con los factores que afectan la accesibilidad del sustrato al hongo, evidenciado al disminuir el tamaño de partícula del lodo y aumentos en el rendimiento de AR.

Las sales minerales son esenciales para el desarrollo de *T. reesei*, sin embargo se desconoce el contenido real de sales minerales de los lodos. Los resultados de este trabajo sugieren que la adición de sales minerales en el medio de fermentación es fundamental para el desarrollo del hongo.

Pretratamiento del lodo papelerero: Con la finalidad de mejorar el rendimiento en AR se realizaron cuatro pretratamientos, para modificar ciertas características en el lodo que le permitieran al hongo aprovecharlo mejor. Los resultados obtenidos se describen en la figura 2. Durante los cuatro primeros días de medición los AR obtenidos no superaron los 2 mg/L (datos no mostrados), mientras que al sexto día de crecimiento se observaron los mayores rendimientos (17 mg/L). Los pretratamientos ácidos presentaron valores de AR entre 10 y 17 mg/L, mientras que los básicos nunca excedieron los 4 mg/L. Los análisis estadísticos arrojaron un valor de $p < 0,05$ lo que indica diferencias significativas entre los tratamientos. El aumento en AR del mejor pretratamiento (ácido, 60 °C, 24 horas) fue de 8,7 veces, en comparación con el control sin pretratamiento.

Al lodo no higiénico se le aplicaron los mismos pretratamientos que fueron aplicados al lodo higiénico (datos no mostrados) siendo el mayor rendimiento de 7,49 mg/L de AR y un incremento en el rendimiento de 4,8 veces en comparación con el control, cuando se aplicó el tratamiento ácido a 60 °C por 24 horas.

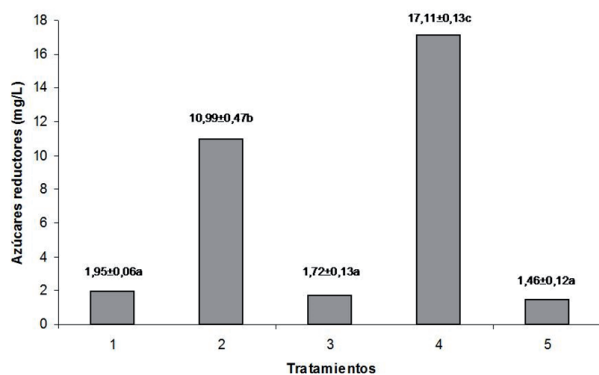


Figura 2. Producción de AR, en medios con lodo higiénico pretratado. Tratamientos: 1: sin pretratamiento. 2: ácido a 105 °C por 1 hora. 3: NaOH a 105 °C por 1 hora. 4: ácido a 60 °C por 24 horas. 5: NaOH a 60 °C por 24 horas. Las letras distintas indican diferencias significativas.

Al realizar un pretratamiento al material celulósico se busca, mediante la acción química de ácidos o bases, romper la estructura cristalina de la celulosa que puede dificultar la accesibilidad del microorganismo a esta última, permitiendo que el hongo la utilice [17]. En el caso de la madera, el pretratamiento ácido actúa principalmente hidrolizando a la hemicelulosa, dejando una estructura porosa formada principalmente por celulosa y lignina por separado [18], removiendo así la hemicelulosa de manera casi completa e incrementando el rendimiento de AR provenientes de la hidrólisis enzimática de la celulosa [19]. Por su parte, el tratamiento con sustancias alcalinas abre la estructura del material, incrementa el área interfacial y reduce el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, favoreciendo su sacarificación enzimática [20]. En el caso de los pretratamientos ácidos usados, en ambos tipos de lodos, el tratamiento a 60 °C por 24 horas mostró ser el más efectivo. Con respecto al lodo higiénico los resultados obtenidos son 60% superiores a los reportados en otro trabajo, que usaron desperdicios de papel hidrolizándolo con H_2SO_4 al 1,1% a una temperatura de 160 °C por 10 minutos, además se usó Tween 80 como surfactante y *T. reesei* como microorganismo degradador. Estos investigadores obtuvieron rendimientos de 10 mg/L de AR; sin embargo, los encontrados en el lodo no higiénico de este trabajo fueron 30% menores [21].

Los resultados obtenidos con los pretratamientos básicos fueron similares entre sí y a su vez al control, lo que indica que este pretratamiento no fue efectivo en la mejora de la accesibilidad del hongo al sustrato. En contraste con estos resultados, se ha usado aserrín pretratado con H_2SO_4 al 5% y NaOH al 3% como sustrato de la celulosa comercial Celluclast, reportando que el pretratamiento básico fue 3,5 veces superior al ácido en cuanto a AR obtenidos [18]. Los autores indicaron que la eficacia del pretratamiento depende del material a hidrolizar, así como de las condiciones del pretratamiento.

Otros autores han encontrado que la eliminación de las cenizas del lodo papelerero y el fraccionamiento del mismo, pueden aumentar significativamente los rendimientos en AR [22,23]. Estos procedimientos serán evaluados próximamente en nuestro laboratorio.

Actividad celulasa: La actividad enzimática es otra de las variables a estudiar para verificar el posible aprovechamiento del lodo papelerero, en este caso como inductor de enzimas celulasas en *T. reesei*. Si se logra inducir esta actividad en una cantidad suficiente, estaríamos frente a un sustrato muy económico que permitiría producir estas enzimas industrialmente a bajo costo. La figura 3 muestra las actividades enzimáticas producidas por *T. reesei* en medio con lodo higiénico disgregado o no y sales minerales. Las mayores actividades enzimáticas se obtuvieron con el lodo disgregado (2,64±0,04 mg de AR/L.h) en comparación con el tratamiento no disgregado (2,29±0,27 mg de AR/L/h). Los análisis estadísticos muestran que no existen diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$), determinándose que la condición para obtener la mayor

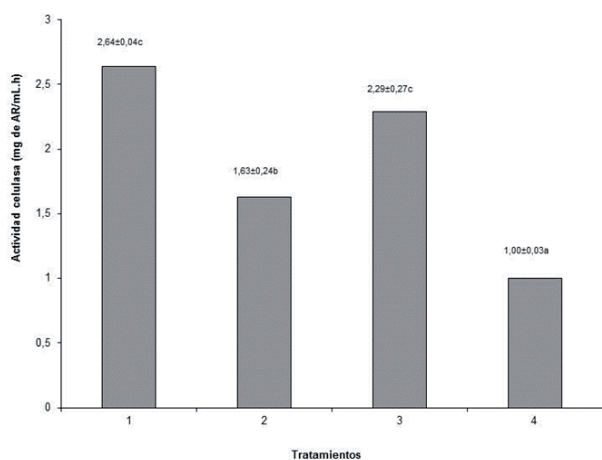


Figura 3. Actividad celulasa producida por *T. reesei* en medios con lodo papelerero como única fuente de carbono en el día 3 de la fermentación. Tratamientos, 1: disgregado. 2: disgregado enzimas desnaturalizadas. 3: no disgregado. 4: no disgregado enzimas desnaturalizadas. Las letras distintas indican diferencias significativas.

actividad celulasa, es indistintamente la fermentación con lodo disgregado o sin disgregar. Estos resultados sugieren que las enzimas celulasas son inducidas de igual forma por el lodo disgregado o no. Las diferencias en la accesibilidad de cada tratamiento son las que determinarán el rendimiento final en AR. En la figura 3 también se muestran la actividad celulasa de muestras desnaturalizadas (tratamientos 2 y 4), las cuales siempre fueron menores a los tratamientos sin calentar.

Varios autores han reportado actividades enzimáticas de *Trichoderma* spp., sobre diversos sustratos como arroz y trigo, de 9 mg de AR/L.h y de hasta 0,57 UI/MI y sobre lodo papelerero usando cultivos mixtos con *Aspergillus niger* y *T. reesei*, en el cual se obtuvo un rendimiento de 8 mg de AR/L.h [24-26]. Con estos resultados se verifica el potencial uso del pool enzimático de *T. reesei* para obtener AR a partir del lodo papelerero.

En el presente trabajo no se caracterizó la microflora presente naturalmente en ambos lodos, por lo que para corroborar la hipótesis de presencia de sustancias u organismos inhibidores del crecimiento y actividad enzimática de *T. reesei*, es necesario determinar la cantidad y tipo de microorganismos presentes en el lodo, lo cual será tema de estudios posteriores en Centro de Biotecnología Aplicada de la Universidad de Carabobo.

Fermentación en estado sólido: Otra posible aplicación del lodo papelerero, es la obtención de biomasa fúngica de *T. reesei*, específicamente esporas. Este tipo de biomasa (esporas) es la principal forma de aplicación de otras especies de *Trichoderma* en programas de manejo integrado de enfermedades en cultivos agrícolas. Para ello es necesaria la aplicación de fermentaciones en sustrato sólido, ya que en las líquidas, no existe producción de este tipo de estructuras reproductivas. La tabla 1, muestra los rendimientos obtenidos para cada tratamiento, donde se evaluó el contenido de agua en el medio de fermentación.

Tabla 1. Biomasa (esporas) de *T. reesei* producida en fermentaciones en estado sólido en medios con lodo higiénico como única fuente de carbono y diferentes contenidos de humedad.

Tratamiento	Rendimiento (esporas/g de lodo)
1	5×10^7
2	$7,8 \times 10^7$
3	$1,2 \times 10^8$
4	0
5	$1,8 \times 10^7$

1: 40 mL de sales minerales. 2: 85 mL de sales minerales. 3: 175 mL de sales minerales. 4: control (85 mL de sales minerales sin inóculo) 5: sin sales con inóculo.

Los mayores valores se obtuvieron en el tratamiento con 175 mL de sales minerales ($1,24 \times 10^8$ esporas /g de lodo seco).

En una fermentación en estado sólido, el sustrato debe tener la humedad suficiente como para permitir el crecimiento del microorganismo y que éste pueda llevar a cabo todos los procesos metabólicos, además debe servir como soporte para el crecimiento del microorganismo [27,28]. En este tipo de fermentaciones, el contenido de agua es fundamental, debido a que está íntimamente relacionada con la actividad acuosa en un sustrato determinado [29]. Los resultados demostraron que los mejores rendimientos se obtuvieron en el tratamiento con 175 mL de sales.

En otros trabajos, se ha reportado un rendimiento $8,44 \times 10^9$ esporas /g de sustrato usando *T. koningii* como organismo y cáscaras de arroz con salvado de trigo como sustrato [23]. Adicionalmente, en fermentaciones de *T. harzarium* sobre arroz como sustrato, se han obtenido rendimientos de $1,80 \times 10^9$ esporas/g [30]. Obviamente que los sustratos de estos trabajos no son comparables con el usado en nuestro estudio, en cuanto a la accesibilidad y disponibilidad de nutrientes, y en la composición de los polisacáridos que generalmente es almidón. La ventaja que posee el lodo papelerero, es su bajo costo y alta disponibilidad. En todo caso, se deben estudiar las variables de producción para determinar la factibilidad económica de usar el lodo papelerero, a pesar de los bajos rendimientos obtenidos. Probablemente, el bajo costo compense la menor producción en términos de rentabilidad. Adicionalmente se pueden estudiar otros factores, como pretratamientos, adición de otros subproductos, entre otros. Finalmente, la mezcla de lodo papelerero fermentado con esporas de *Trichoderma* spp., pudiera utilizarse en la enmienda y control fitosanitario de suelos agrícolas.

Conclusiones y recomendaciones

T. reesei es un microorganismo capaz de degradar la celulosa que forma parte del lodo papelerero tanto higiénico como no higiénico, dando como resultado azúcares reductores en fermentaciones sumergidas, aunque los

rendimientos obtenidos bajo las condiciones de estudio, no son suficientes para utilizarlos a escala industrial en procesos como producción de bioetanol. Las condiciones para obtener los mayores rendimientos de AR son medios con sales minerales y lodo higiénico disgregado. Los pretratamientos ácidos ayudaron a incrementar el rendimiento en AR en fermentaciones sumergidas; estos podrían ser la clave para obtener los rendimientos necesarios para su uso a escala industrial. La actividad enzimática celulasa obtenida podría ser utilizada en la generación de productos comerciales, para lo cual es necesario estandarizar los parámetros de producción. Es posible obtener biomasa de *T. reesei* en fermentaciones sólidas a partir del lodo papelerero higiénico, pudiéndose utilizar este sustrato a escala industrial.

Se recomienda: (a) estudiar el efecto que microorganismos autóctonos del lodo, tanto higiénico como no higiénico, puedan tener sobre la producción de azúcares reductores por parte de *T. reesei*. (b) Caracterizar la microflora presente naturalmente en ambos lodos, para poder corroborar la hipótesis de presencia de sustancias u organismos inhibidores del crecimiento y actividad enzimática de *T. reesei*. (c) Estudiar las variables que puedan afectar tanto de forma positiva como negativa la producción de biomasa de *T. reesei* usando el lodo papelerero higiénico como fuente de carbono en fermentaciones sólidas. (d) Evaluar otros pretratamientos con miras a aumentar el rendimiento en AR que incluyan ácidos más económicos. (e) Realizar un estudio de factibilidad económica que permita conocer la rentabilidad o no de producir biomasa (esporas) de *Trichoderma* spp. a expensas del lodo papelerero. (f) Mejorar las variables de producción enzimática, incluyendo pasos de purificación, concentración y formulación, con miras a obtener un producto comercial con base en celulasas de *T. reesei* obtenidas de medios con lodo papelerero como única fuente de carbono.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Dr. Oscar Valbuena y al Prof. Carlos Moreno, por la revisión crítica de este trabajo; así como a la Lic. Esther Torquati por todo el apoyo logístico y técnico.

Referencias

- Quinchía A, Restrepo C, Betancourt G. Análisis prospectivo de aprovechamiento y disposición de lodos provenientes de industrias papeleras. Escuela de Ingeniería de Antioquia. Medellín, Colombia. 2005.
- Velásquez J, Cuartas P, Henao E, Castro C, Chris D, Quintana G, Garcés B. Aprovechamiento no convencional de los lodos primarios y del licor negro resultante de la fabricación de papel. Universidad Pontificia Bolivariana. Medellín, Colombia. 2005.
- Quinchía A, Valencia M, Giraldo G. Uso de lodos provenientes de la industria papelerera en la elaboración de paneles prefabricados para la construcción. Rev EIA. 2007; 8:9-19.
- Madrid L, Quintero J. Ethanol production from paper sludge using *Kluyveromyces marxianus*. DYNA. 2011; 78: 185-91.
- Marín S, Sáenz R, Vinas M. Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium* spp. from maize grain. J Appl Microbiol. 1998; 84:25-36.
- Druzhinina I, Komon M, Atanasova L, Seidl V, Kubicek C. Evolution and ecophysiology of the industrial producer *Hypocrea jecorina* (Anamorph *Trichoderma reesei*) and a new sympatric agamo species related to It. PLoS One. 2010; 5:191-206.
- Kuhls K, Lieckfeldt E, Samuels G, Kovacs W, Meyervii W, Petrini O, Gams W, Börner T, Kubicek C. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. Proc Nati Acad Sci. 1996; 93:7755-60.
- Pavone D, Dorta B. Diversidad del hongo *Trichoderma* spp. en plantaciones de maíz de Venezuela. Interciencia. 2015; 40:23-31.
- Haran S, Schickler H, Oppenheim A, Chet I. New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum*. Mycol Res. 1995; 99:441-6.
- Miller G. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem. 1959; 31:426-8.
- Argumendo R, Alarcón A, Ferrera R, Peña J. El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. Rev Int Contam Ambient. 2009; 25:257-69.
- López Errasquín E, Vázquez C. Tolerance and uptake of heavy metals by *Trichoderma atroviride* isolated from sludge. Chemosphere. 2003; 50:137-43.
- Moo Y, Moreira A, Tangerdy A. Principles of solid-substrate fermentation. In: Smith J, Berry D, Kristiansen B, editors. The filamentous fungi. Vol IV. (Fungal Technology). London: Edward Arnold Publisher Ltd.; 1983. 117-44 pp.
- Raimbault M. Croissance de champignons filamenteux sur substrate amylacés. These de Doctorat, U.P.S. Toulouse. 1980.
- Viesturs UE, Aspate AF, Laukevics JJ, Ose VP, Bekers MJ. Solid state fermentation of wheat straw with *Chaetomium cellulolyticum* and *Trichoderma lignorum*, Biotechnol Bioeng Symp. 1981; 11:359-69..
- Huang S, Chou M. Kinetic model for microbial uptake of insoluble solid state substrate. Biotechnol Bioeng. 1989; 35:547-58.
- Kumar P, Barrett D, Delwiche M, Stroeve P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. Ind Eng Chem Res. 2009; 48:3713-29.
- López J, Soto N, Rutiaga O, Medrano H, Arevalo K. Optimización del proceso de obtención enzimática de azúcares fermentables a partir de aserrín de pino. Rev

- Int Contam Ambient. 2009; 25:95-102.
19. Wyman C. Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics and opportunities. *Bioresource Technol.* 1994; 50:3-15.
 20. Hendriks A, Zeeman G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technol.* 2009; 100:10-8.
 21. Wu J, Kwang J. Enhancing enzymatic saccharification of waste newsprint by surfactant addition. *Biotechnol Progress.* 1998; 14:649-52.
 22. Wang W, Kang L, Lee Y. Production of cellulase from kraft paper mill sludge by *Trichoderma reesei* rut C-30. *Appl Biochem Biotechnol.* 2010; 161:382-94.
 23. Chen H, Han Q, Daniel K, Venditti R, Jameel H. Conversion of industrial paper sludge to ethanol: Fractionation of sludge and its impact. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014 [En prensa. doi: 10.1007/s12010-014-1083-z].
 24. Cruz L. Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Tesis de Grado en Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. 2007. Bogotá-Colombia. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis23.pdf>. Acceso: Abril 2014.
 25. Colina A, Ferrer A, Urribarri L. Cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 from different cellulosic substrates. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia;* 2009, 32:152-9.
 26. Maheswari D, Gohade S, Varma P. Paper mill sludge as a potential source for cellulase production by *Trichoderma reesei* QM9123 and *Aspergillus niger* using mixed cultivation. *Carbohydr Polymer.* 1994; 23:161-3.
 27. Pandey A. Solid-stated fermentation. *Biochem Engineering J.* 2003; 13:81-4.
 28. Demain A, Hilton M. Manual of industrial microbiology and biotechnology. Second edition. Washington: ASM Press; 2000.
 29. Corry J. Relationship of water activity to fungal growth. In: Beuchat L. (ed) Food and beverage mycology. Connecticut, USA: Avi Publishing Company, Westport; 1978.
 30. Pérez L, Ramírez C. Efecto de las variables, condiciones de la fermentación y del sustrato en la producción *Trichoderma hazarium*. Tesis de Pregrado. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 2000.