

Guatemala, 09 de enero de 2020

Señor Director
Dr. Félix Alan Douglas Aguilar Carrera
Director General de Investigación
Universidad de San Carlos de Guatemala

Señor Director:

Adjunto a la presente el informe final “**Diversidad y bioprospección de hongos anamorfos en Guatemala (Fase III): Producción de amilasas y celulasas utilizando residuos agrícolas**” con partida presupuestal 4.8.63.6.71, coordinado por Lcda. María del Carmen Bran González y avalado por el Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas (IIQB) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Este informe final fue elaborado con base en la guía de presentación de la Dirección General de Investigación, el cual fue revisado su contenido en función del protocolo aprobado, por lo que esta unidad de investigación da la aprobación y aval correspondiente.

Así mismo, la coordinadora del proyecto, se compromete a dar seguimiento y cumplir con el proceso de revisión y edición establecido por Digi del **informe final y del manuscrito científico**. El manuscrito científico debe enviarse, por la coordinadora del proyecto, para publicación al menos en una revista de acceso abierto (*Open Access*) indexada y arbitrada por expertos en el tema investigado.

Sin otro particular, suscribo atentamente.

“Id y enseñad a todos”

Lcda. María del Carmen Bran González
Coordinadora del proyecto de investigación

Dra. María Eunice Enríquez Cottón
Director del Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Universidad de San Carlos de Guatemala
Dirección General de Investigación
Programa Universitario de Investigación en Desarrollo Industrial –PUIDI–

Informe final

Diversidad y bioprospección de hongos anamorfos en Guatemala (Fase III): Producción de amilasas y celulasas utilizando residuos agrícolas

Equipo de investigación

Lcda. María del Carmen Bran González (Coordinadora e investigadora)

Lic. Ricardo Andres Figueroa Ceballos (Investigador)

Lic. Osberth Morales Esquivel (Investigador)

Ing. Agr. Gustavo Álvarez (Investigador)

Guatemala, 09 de enero de 2020

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS –IIQB–

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

Dr. Félix Alan Douglas Aguilar
Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar
Coordinador General de Programas

Inga. Liuba María Cabrera Ovalle de Villagrán
Coordinadora de programa –PUIDI–

Licda. María del Carmen Bran González
Coordinadora de proyecto

Lic. Ricardo Andres Figueroa Ceballos
Investigador

Lic. Osberth Morales Esquivel
Investigador

Ing. Agr. Gustavo Álvarez
Investigador

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, 2020. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada por la Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de la Partida Presupuestaria 4.8.63.6.71 durante el año 2019 en el Programa Universitario de Investigación en Desarrollo Industrial –PUIDI–

Financiamiento aprobado por Digi: Q250,000.00 Financiamiento ejecutado: Q249,000.00

Índice

1. Resumen.....	4
2. Palabras clave.....	4
3. Abstract and keyword	4
4. Introducción	5
5. Planteamiento del problema.....	7
6. Preguntas de investigación.....	9
7. Delimitación en tiempo y espacio.....	9
8. Marco teórico	10
9. Estado del arte.....	15
10. Objetivo general	17
11. Objetivos específicos.....	17
12. Hipótesis.....	17
13. Materiales y métodos	18
14. Vinculación, difusión y divulgación	22
15. Productos, hallazgos, conocimientos o resultados:	25
16. Análisis y discusión de resultados:.....	28
17. Conclusiones	31
18. Impacto esperado.....	31
19. Referencias	32
20. Apéndice.....	38

Índice de figuras

Figura 1. Actividad amilolítica de las enzimas libres e inmovilizadas sobre salvado de arroz	26
Figura 2. Actividad celulolítica de las enzimas sobre bagazo de caña de azúcar	28

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Capacidad amilolítica de las enzimas fúngicas libres e inmovilizadas en alginato de calcio sobre salvado de arroz</i>	25
Tabla 2 <i>Capacidad celulolítica de las células fúngicas inmovilizadas en agar sobre bagazo de caña</i>	27

Diversidad y bioprospección de hongos anamorfos en Guatemala (Fase III): Producción de amilasas y celulasas utilizando residuos agrícolas

1. Resumen

Los desechos agroindustriales en la actualidad se generan en grandes cantidades, los cuales en la mayoría de los casos se eliminan incinerándolos o simplemente depositándolos en vertederos, lo cual constituye un problema ambiental. Dichos residuos, debido a su naturaleza lignocelulósica pueden constituirse como materia prima para otros procesos, al utilizarlos como sustrato de crecimiento para microorganismos como los hongos a través de procesos de fermentación para la producción de compuestos útiles para el hombre, ya sea en estado sólido (FES) o líquido (FL), utilizando células, así como enzimas libres o inmovilizadas. Por tales razones, este proyecto evaluó la producción de las enzimas amilasas y celulasas fúngicas a partir de dos residuos agrícolas, utilizando 20 cepas nativas de hongos anamorfos, las cuales ya evidenciaron su potencial de producción de las mismas. Se utilizó como sustrato salvado de arroz para la producción de amilasas, las cuales se evaluaron como enzimas libres o inmovilizadas en alginato de calcio. Para la producción de celulasas se evaluó en bagazo de caña de azúcar como sustrato, para lo cual se inmovilizó micelio de cada una de las cepas fúngicas en esferas de agar. Se determinó que las 20 cepas nativas de hongos anamorfos son capaces de producir amilasas utilizando salvado de arroz como sustrato, además, en el 80% de las cepas evaluadas no hubo diferencia en la actividad amilolítica de las enzimas libres respecto a las inmovilizadas. Finalmente se encontró que las 20 cepas evaluadas produjeron celulasas al estar inmovilizadas en esferas de agar utilizando como sustrato bagazo de caña. Por lo anterior se recomienda el utilizar las cepas de los hongos probados para la producción de las enzimas indicadas a una escala mayor.

2. Palabras clave

Enzimas fúngicas, hongos asexuales

3. Abstract and keywords

Agroindustrial wastes are currently generated in large quantities, which in most cases are disposed of by incineration or simply deposited in landfills, which constitutes an environmental problem. These residues, due to their lignocellulosic nature, can be constituted as raw material for other

processes, when used as a growth substrate for microorganisms such as fungi through fermentation processes for the production of compounds useful for man, through fermentation in solid state (FES) or liquid (FL), using cells, as well as free or immobilized enzymes. For these reasons, this project evaluated the production of fungal amylase and cellulase enzymes from two agricultural residues, using 20 native strains of anamorphic fungi, which already evidenced their enzymatic production potential. Rice bran was used as a substrate for the production of amylases, which were evaluated as free enzymes or immobilized in calcium alginate. For the production of cellulases, the strains were immobilized in agar spheres and bagasse sugarcane was used as substrate. It was determined that the 20 native strains of anamorphic fungi are capable of producing amylases using rice bran as a substrate, in addition that in 80% of the strains evaluated there was no difference in the amylolytic activity of free enzymes with respect to immobilized ones. Finally, it was found that the 20 fungal strains evaluated produced cellulases by being immobilized in agar spheres using cane bagasse as substrate. Therefore, it is recommended to use the strains of the fungi tested for the production of the indicated enzymes on a larger scale.

Fungal enzymes, asexual fungi

4. Introducción

Desde la antigüedad, los seres humanos han agregado productos de residuos biológicos (verduras, frutas, cáscaras, semillas, estiércol, entre otros) al suelo para fines agrícolas, actividad con la que se dio inicio al reciclaje de los residuos que las personas empezaron a generar en su entorno. De hecho, esta reutilización de desechos biológicos permitió el reciclaje de nutrientes y el aumento de materia orgánica en los suelos. Por supuesto, en el pasado, la cantidad de residuos era menor que la que se genera en el presente y, en consecuencia, el impacto ambiental es mayor en la actualidad (Yusuf, 2017).

En los últimos 50 años, la intensificación de las actividades agrícolas, ganaderas e industriales han generado un significativo aumento en la producción y acumulación de grandes cantidades de residuos (Yusuf, 2017), de manera que en el mundo se estima que tan solo los residuos agrícolas derivados de la producción de trigo y de arroz constituyen aproximadamente entre 673.3 y 709.2

millones de toneladas (t), sin contar las aproximadamente 147.2 millones de t de otros residuos industriales (Sadh, Duhan & Duhan, 2018).

Estos residuos agroindustriales son muy variables en su composición, ya que contienen principalmente polisacáridos complejos, proteínas, carbohidratos, componentes polifenólicos, entre otros, por lo que deberían considerarse como "materia prima" para otros procesos industriales en lugar de denominarlos simplemente como "desechos" (Sadh et al., 2018). Dichos compuestos químicos pueden ser utilizados como sustrato para el crecimiento de microorganismos, los cuales tienen un alto potencial para reutilizarlos como materia prima a través de procesos de fermentación, lo cual puede contribuir al reciclaje de los residuos agroindustriales al representar una posible fuente para la fabricación de bioetanol, enzimas, saborizantes, azúcares reductores y sus derivados (Nguyen et al., 2010; Sadh et al., 2018).

Por otra parte, en la actualidad la agroindustria no solo se valora por su desempeño productivo y económico, sino también por su relación con el medio ambiente, de manera que la protección de éste ya no solo es una exigencia sujeta a multas o sanciones, sino que representa amenazas, oportunidades y hasta condiciona su permanencia o salida del mercado, ya que la utilización eficaz, de bajo costo y ecológicamente racional de estos materiales es cada vez más importante, sobre todo por las restricciones legales que ya empiezan a surtir efecto en muchos países (Wadhwa & Bakshi, 2013) incluyendo el nuestro.

La agroindustria debe ser sensible a los temas ambientales y debe procurar un desarrollo creciente de conciencia social que la obliga a no producir a costa del planeta, sino más bien de una manera sostenible; ya que los subproductos agroindustriales que se generan desde el lugar de siembra hasta los que se derivan de su manejo y comercialización constituyen un serio problema (Yepes, Montoya, & Orozco, 2008). Por ello, surge la necesidad de conversión de los residuos agroindustriales en un producto útil y de mayor valor agregado, que además de solucionar un problema, genere ingresos económicos adicionales; de ahí la importancia del estudio de alternativas tecnológicas tendientes al aprovechamiento de dichos residuos (Mirabella, Castellani, & Sala, 2014; Yepes et al., 2008).

Por lo anterior, este proyecto de investigación propuso evaluar la producción de las enzimas amilasas y celulasas a partir de residuos agrícolas, utilizando 20 cepas nativas de hongos anamorfos, las cuales ya evidenciaron su potencial de producción de las mismas durante la segunda fase del proyecto “Diversidad y bioprospección de hongos anamorfos en Guatemala (fase II): Potencial biotecnológico para la producción de antibacterianos, enzimas y solubilización de compuestos inorgánicos de fósforo (Bran, Morales & Figueroa, 2018)”.

Dichas cepas se inocularon en los residuos de bagazo de caña y salvado de arroz, directamente o inmovilizadas, para producir las enzimas amilasas y celulasas, por medio de fermentación en estado sólido (FES) o fermentación líquida (FL). En el caso de las amilasas, se evaluaron como enzimas libres y también se estableció el efecto de su inmovilización en esferas de alginato de calcio. En el caso de las celulasas, el micelio de cada una de las cepas se inmovilizó en esferas de agar. Por lo anterior, esta investigación da a conocer el potencial biotecnológico de los hongos anamorfos nativos, a través de la producción de amilasas y celulasas, las cuales podrían usarse para la generación de azúcares reductores, los cuales a su vez se utilizarían en la producción de etanol, biocombustibles u otros productos.

5. Planteamiento del problema

Las industrias agrícolas producen una gran cantidad de residuos cada año. Se estima que en el mundo, los residuos agrícolas como la paja de trigo y la paja de arroz constituyen aproximadamente entre 673.3 y 709.2 millones de t, sin contar las aproximadamente 147.2 millones de t de otros desechos. Si estos residuos se liberan al medio ambiente sin un procedimiento adecuado para su tratamiento y eliminación, pueden causar contaminación ambiental y efectos nocivos en la salud humana y animal (Sadh et al., 2018).

A pesar de ello, la mayoría de los residuos agroindustriales no se tratan, y más bien se subutilizan, ya que se eliminan mediante incineración o simplemente se depositan en vertederos. La mala disposición de estos desechos crea diferentes problemas ya que entre otros, contribuyen a aumentar la cantidad de gases de efecto invernadero (Rodríguez-Couto, 2008; Sadh et al., 2018). Por lo anterior, en la actualidad es una preocupación mundial buscar la disposición más apropiada

de dichos residuos agroindustriales, así como encontrar alternativas bioenergéticas renovables (Okonko, Ogunnusi, Aloysius, Adejoye, & Adewale, 2009).

En este sentido los residuos agroindustriales son ricos en compuestos lignocelulósicos y almidones, por lo que actualmente se ha dado un gran impulso a plantear proyectos e investigaciones tendientes a propiciar el aprovechamiento de los mismos con el fin de generar diferentes alternativas para su utilización (Cury, Aguas, Martínez, Olivero, & Chams 2017).

Al respecto se ha demostrado que los hongos anamorfos saprobios o conidiales tienen un gran potencial para la producción de enzimas extracelulares a partir de la degradación de residuos agroindustriales. Dichas enzimas pueden ser utilizadas para producir compuestos renovables y económicamente rentables como etanol, aditivos alimentarios y ácidos orgánicos (Akpınar & Ozturk, 2017).

A pesar de los beneficios que los hongos anamorfos aportan al degradar los desechos agroindustriales y a la vez producir enzimas fúngicas, aún hacen falta investigaciones más detalladas sobre la producción de amilasas y celulasas a partir de bagazo de caña y salvado de arroz, por parte de cepas guatemaltecas de dichos hongos, ya que han evidenciado una alta capacidad en la producción de estas enzimas (Bran et al., 2018).

Lo anterior representa una alternativa para la utilización de los desechos agroindustriales que se producen en el país y se enmarca en los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de las Naciones Unidas, a partir de los que Guatemala desarrolló una estrategia de articulación de los ODS al Plan Nacional de Desarrollo K'atun Nuestra Guatemala 2032, específicamente en la meta priorizada 2.4 en la que la Secretaría de Planificación y Programación de la Presidencia (2017) indica que:

Para 2030, se asegure la sostenibilidad de los sistemas de producción de alimentos y apliquen prácticas agrícolas resilientes que aumenten la productividad y la producción, y que contribuyan al mantenimiento de los ecosistemas, además de que fortalezcan la capacidad de adaptación al

cambio climático, los fenómenos meteorológicos extremos, las sequías, las inundaciones y otros desastres, y mejoren progresivamente la calidad del suelo y la tierra. (p.6)

6. Preguntas de investigación

General

¿Las cepas nativas de hongos anamorfos tienen potencial para producir amilasas y celulasas utilizando residuos agrícolas?

Específicas

¿Cuál de las cepas nativas de hongos anamorfos produce más amilasas utilizando salvado de arroz como sustrato?

¿Cuál de las cepas nativas de hongos anamorfos aumenta más la actividad de amilasas al estar inmovilizada?

¿Cuál de las cepas nativas de hongos anamorfos inmovilizada en esferas de agar produce más celulasas, utilizando bagazo de caña como sustrato?

7. Delimitación en tiempo y espacio

Delimitación en tiempo: El estudio se realizó en el periodo comprendido entre febrero a diciembre de 2019. Se inició con la revitalización de las cepas en el mes de febrero, luego en el mes de marzo, se realizó una adaptación de las cepas a los medios de cultivo para favorecer la producción enzimática, posteriormente entre abril y octubre, se llevó a cabo la fase de fermentación para la producción de celulasas y amilasas, además de su inmovilización, también se evaluó la capacidad amilolítica y celulolítica. Finalmente en los meses de noviembre y diciembre se realizó el análisis de los datos y la elaboración del informe final.

Delimitación espacial: Este estudio no contempló muestreos de campo, las pruebas se realizaron a nivel de laboratorio.

8. Marco teórico

Residuos agroindustriales: generación y composición

Los residuos agroindustriales en general incluyen los que se generan en el campo después del proceso de cosecha (residuos agrícolas) o durante el procesamiento industrial de productos agrícolas (residuos industriales). Los primeros consisten en hojas, tallos, vainas de semillas y tallos, entre otros, mientras que los segundos se generan especialmente en las industrias productoras de aceites, después de la extracción a partir de semillas que generan residuos que se conocen como tortas de aceite. Ambas clases de residuos son de bajo costo y están disponibles en grandes cantidades. Los principales componentes químicos de tales residuos incluyen la celulosa, las hemicelulosas y la lignina, por lo que también se les denomina materiales lignocelulósicos (Mussatto, Ballesteros, Martins, & Teixeira, 2012). Se estima que en el mundo se producen aproximadamente entre 673.3 y 709.2 millones de t de residuos agrícolas como la paja de trigo y la paja de arroz, sin contar las aproximadamente 147.2 millones t de otros residuos industriales (Sadh et al., 2018).

Residuos agrícolas

Los residuos agrícolas se pueden dividir en dos grupos: residuos de campo y residuos del proceso. Los primeros son aquellos que se generan en el campo después del proceso de cosecha y consisten en hojas, tallos, semillas, vainas y tallos; mientras que los residuos del proceso son aquellos generados postcosecha e incluyen melazas, cáscaras, bagazos y pulpas entre otros (Sadh, et al., 2018). Ambos tipos en su mayoría son subutilizados y en la actualidad constituyen una de las principales fuentes de contaminación ya que la cantidad producida aumenta día a día debido a las actividades de industrialización (Cury et al., 2017; Sadh et al., 2018).

Uso de residuos agrícolas para la producción de metabolitos primarios y secundarios de los hongos

Los residuos agrícolas en particular pueden ser la materia prima para generar otro producto a través de procesos de biotransformación, por lo que su utilización puede darle un valor agregado (Galankis, 2012). Dicha biotransformación se produce a través de la fermentación, la cual se define como la técnica de conversión biológica de sustratos complejos en compuestos simples por diversos microorganismos tales como los hongos. En el curso de esta degradación metabólica, también liberan varios compuestos habituales (metabolitos primarios) como el etanol, ácidos orgánicos, vitaminas, polisacáridos y nucleótidos. Además generan compuestos adicionales (metabolitos secundarios), los cuales pueden ser antibióticos, alcaloides, hormonas y promotores de crecimiento, entre otros (Balakrishnan & Pandey, 1996; Subramaniyam & Vimala, 2012).

Recientemente se ha demostrado que varios de estos metabolitos son económicamente importantes, por lo que se han utilizado en diversas industrias como la farmacéutica y la de alimentos, lo cual ha llevado a que las técnicas de producción utilizadas en el laboratorio se amplifiquen a gran escala. Lo anterior ha llevado al desarrollo de técnicas como la fermentación en estado sólido (FES) y la fermentación líquida (FL), las cuales han permitido la producción industrial de metabolitos económicamente importantes. Estas técnicas se han refinado aún más a medida que se evalúan diversos sustratos, los parámetros ambientales de cultivo y los organismos utilizados para la fermentación. Con base en la investigación se ha descubierto que ciertos compuestos se producen en cantidades mayores en FES, mientras que otros compuestos se han extraído usando FL (Subramaniyam & Vimala, 2012).

Fermentación en estado sólido (FES) en hongos

La FES se refiere a cualquier proceso biotecnológico en el que los organismos crecen en material no soluble o sustratos sólidos en ausencia o casi ausencia de agua libre (Bhargav, Panda, Ali, & Javed, 2008). Los sustratos usados comúnmente en la FES son granos de cereales (arroz, trigo, cebada y maíz), semillas de leguminosas, salvado trigo, materiales lignocelulósicos como paja, aserrín o virutas de madera, así como una amplia gama de desechos de plantas y animales. Estos

sustratos están compuestos por compuestos poliméricos que permanecen insolubles o escasamente solubles en agua y representan una fuente concentrada de nutrientes apropiados para el crecimiento microbiano y la mayoría de ellos tiene bajo costo y son fácilmente obtenibles. En la FES, la poca cantidad de agua o la ausencia de la misma ofrece varias ventajas, tales como la obtención de productos de fácil recuperación, bajo costo del proceso de producción, menor tamaño del fermentador y también la reducción de los requerimientos de energía para la agitación y esterilización (Pandey, 2003).

Para el éxito del proceso de la FES, deben considerarse diferentes factores antes de comenzar cualquier proceso, entre ellos, las especies de microorganismos, el soporte sólido utilizado, actividad de agua, temperatura, aireación y el tipo de fermentador utilizado. Por ejemplo, los hongos utilizados pueden estar en cultivo puro, cultivos mixtos o consorcios de microorganismos nativos. Los hongos miceliares con frecuencia se utilizan en este tipo de fermentación debido a que maximizan la elaboración de productos de valor agregado, ya que crecen naturalmente en sustratos sólidos como piezas de madera, semillas, tallos y raíces. Por otra parte, las bacterias y las levaduras también se puede utilizar para FES, pero requieren una humedad más alta para una fermentación eficiente y su rendimiento es menor (Sadh et al., 2018).

La FES es un proceso que implica los siguientes pasos: 1) Selección de sustrato; 2) pre-tratamiento del sustrato ya sea mecánico, procesamiento químico o bioquímico para mejorar la disponibilidad de los nutrientes y también a reducir el tamaño de los componentes (por ejemplo, pulverizar o triturar los materiales vegetales para optimizar los aspectos físicos del proceso, aunque el costo del pre tratamiento debe equilibrarse con el valor del producto); 3) la hidrólisis de sustratos principalmente poliméricos, por ejemplo, polisacáridos y proteínas; 4) el proceso de fermentación para utilizar productos de hidrólisis; y 5) el procesamiento posterior para la purificación y cuantificación de productos finales (Sadh et al., 2018).

Producción de enzimas fúngicas por medio de FES

La utilización de residuos agrícolas ofrece un gran potencial para reducir el costo de producción y aumentar el uso de enzimas para fines industriales. Estos residuos tales como paja de trigo,

bagazo de caña de azúcar, salvado de arroz, salvado de trigo, mazorca de maíz, entre otros, son los más baratos y tienen abundantes fuentes naturales de carbono que pueden ser utilizadas para la producción de enzimas de importancia industrial (Yusuf, 2017). De hecho, la producción de enzimas es una de las más importantes aplicaciones de la FES, ya que tiene ventajas sobre la FL debido a su alta productividad, bajo costo del equipo, mejor rendimiento del producto, menor generación de residuos y consume menos tiempo, entre otros. El rendimiento de la producción de determinada enzima está regido por diversos factores tales como el tipo de cepa, las condiciones de cultivo, la naturaleza del sustrato y la disponibilidad de los nutrientes. Algunas de las enzimas producidas por hongos son las proteasas ácidas y alcalinas, lipasas, celulasas, pectinasas, fitasas, L-glutaminasas, amilasas, ligninasas y xilanasas (Bhargav et al, 2008).

Fermentación líquida (FL)

Este tipo de técnica también se conoce como Fermentación Sumergida (FSm) y utiliza sustratos líquidos como melazas y caldos, en los que los compuestos bioactivos que se secretan en el medio de fermentación. En FL los sustratos se utilizan con bastante rapidez, por lo tanto, los nutrientes deben ser reemplazados o complementados constantemente. Esta técnica de fermentación es más adecuada para microorganismos como bacterias que requieren mucha humedad. Una ventaja adicional de esta técnica es que la purificación de productos es más fácil y por ende, la FL se usa principalmente en la extracción de metabolitos secundarios que se usan en forma líquida (Subramaniyam & Vimala 2012).

Producción de amilasas y celulasas por medio de FES y FL

La fermentación es la principal técnica para la producción de diversas enzimas y tanto FES como FL se usan para la producción de las mismas. Tanto hongos como bacterias producen una variedad invaluable de enzimas cuando se cultivan en sustratos apropiados. La FL generalmente se implementa en caso de producción de enzimas bacterianas, debido a la exigencia de mayor potencial hídrico, en tanto que FES se utiliza cuando las enzimas deben extraerse de hongos, que requieren un menor potencial de agua. Sin embargo, más del 75% de las enzimas industriales se producen con una u otra técnica (Subramaniyam & Vimala, 2012).

Amilasas fúngicas

Las amilasas tienen una aplicación potencial en numerosos procesos tales como en las industrias alimenticias, de textiles y de producción de papel. Las dos clases principales de amilasas son las glucoamilasas y α -amilasas. La FES tiene un extraordinario potencial para la producción de estas enzimas a gran escala. Por ejemplo, se ha usado cáscara de coco para la producción de amilasas por parte de *Aspergillus niger* (Bhargav et al., 2008).

Celulasas fúngicas

Las celulasas son un complejo enzimático que se ha utilizado para la conversión de residuos lignocelulósicos y se usan en la producción de etanol, proteína unicelular, blanqueamiento de pulpa en la industria papelera, en tratamiento de papel reciclado y para extracción de jugo de fruta. El tratamiento de residuos agrícolas por medio de la FES utilizando hongos, pueden reducir el costo de la producción de dichas enzimas. Es importante mencionar que la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica requiere de hidrólisis por celulasas para convertir la biomasa vegetal en biocombustible. Por ejemplo, se ha usado rastrojo de maíz para la producción de celulasas con *Trichoderma reesei* en fermentadores de bandeja poco profundas (Bhargav et al., 2008).

Inmovilización de células fúngicas y enzimas

El interés en las enzimas inmovilizadas ha aumentado desde la década de 1960, en tanto que las células inmovilizadas han recibido menos atención ya que su estudio es más tardío que el de las enzimas inmovilizadas. La definición de cada uno de estos tipos de biocatalíticos se presenta a continuación: a) **Enzimas inmovilizadas:** Se puede definir como enzimas aisladas o purificadas que se confinan o localizan en un volumen definido de espacio; b) **Células inmovilizadas:** las células inmovilizadas, también denominadas catalizadores biológicos controlados, se pueden definir como una alta densidad de células confinadas físicamente en una fase sólida en gránulos o esferas en las que el movimiento celular está restringido durante el período de uso. Ambos tipos,

enzimas o células inmovilizadas pueden utilizarse para la producción de sustancias de interés al humano, utilizando procesos de FES o FL (Okafor, 2007).

9. Estado del arte

Sustratos utilizados para la FES y FL

Orzua y colaboradores (2009) estudiaron diez residuos agroindustriales para la inmovilización de hongos y determinaron que algunos de ellos tienen un buen potencial para ser tratados por FES y FL, ya que contienen buena capacidad de absorción agua y mostraron una buena tasa de crecimiento de dichos microorganismos. También se ha investigado la potencialidad del salvado de arroz, salvado de trigo, salvado de mijo, los cuales fueron degradados por *Aspergillus niger* (Suganthi et al., 2011); la harina de soya por *A. oryzae* (Thakur, Nemade, & Sharanappa, 2015) y la cáscara de mandioca, soya, salvado de trigo y pulpa de cítricos para ser sometidos a degradación de *Rhizopus arrhizus* y *Mucor subullissimus* (Nascimento et al., 2015). Asimismo, se ha indicado que los sustratos sólidos utilizados para ser tratados con FES deben contener bajos niveles de humedad y se han encontrado buenos resultados en los residuos de arroz (*Oryza sativa*), seim (*Lablab purpureus*), frijoles blancos (*Vigna unguiculata*) y maní (*Arachis hypogea*) (Sadh et al., 2018).

Utilización de desechos agroindustriales por fermentación en estado sólido para la producción de enzimas

La diversidad de sustratos utilizados tienen diversas composiciones y sirven para la producción de diferentes valiosos productos en función de su composición (Sadh et al., 2018). En particular, para la producción de enzimas, la tasa de crecimiento de los hongos en sustratos lignocelulósicos es de suma utilidad para la producción de varias enzimas. Una de ellas, la amilasa, es utilizada en las industrias de procesamiento de almidón para la degradación de polisacáridos en azúcares (Akpan, Bankole, Adsemmowo, & Latunde-Dada, 1999; Nigam y Singh, 1995). Se ha informado que diversos tipos de cáscaras, semillas, así como salvado de arroz y trigo se pueden utilizar para la producción de amilasas por *A. awamori* (Ellaiah, Adinarayana, Pardhasaradhi, & Srinivasulu,

2002; Negi & Banerjee 2009; Suganthi et al. 2011). Del mismo modo, la producción de α -amilasa por *A. niger* se ha logrado utilizando bagazo de caña de azúcar, mazorcas de maíz y cáscaras de coco; estos mismos sustratos se pueden usar también para la producción de la enzima elagitanasa, la cual es muy utilizada para la biodegradación de ácido elágico y elagitaninos (Buenrostro et al., 2013; Duhan, Kumar, & Tanwar, 2013).

Kalogeris y colaboradores (2003) estudiaron varios residuos agrícolas para la producción de diferentes enzimas celulolíticas tales como endoglucanasa y β -glucosidasa por cultivo en estado sólido, utilizando cepas de hongos termófilos (*Thermoascus aurantiacus*). Topakas, Kalogeris, Kekos, Macris y Christakopoulos (2004) usaron mazorcas de maíz para la producción de compuestos fenólicos usando FES y acoplamiento de tratamiento enzimático. También estudiaron la producción enzimática de cinamoil esterasa y de xilanasas.

La producción de la enzima lipasa y su optimización fue llevada a cabo por Oliveira, Souza y Oliveira (2017) usando tortas de aceite como sustrato con el hongo *A. ibericus*. La más alta producción de lipasa se encontró en la torta de aceite de almendra de palma. Del mismo modo, Saharan y Duhan (2017) estudiaron el papel de las enzimas α -amilasa, xilanasas y β -glucosidasa en la liberación de polifenoles y antioxidantes durante la fermentación de cereales en estado sólido. Los resultados mostraron una correlación positiva entre la concentración de polifenoles y las actividades enzimáticas.

Del mismo modo, se realizaron varios ensayos enzimáticos con α -amilasa, xilanasas, β -glucosidasa y lipasa durante la fermentación de residuos de maní con *A. oryzae*, lo cual resultó con una mejora significativa de las actividades enzimáticas en todos los ensayos (Sadh et al., 2018).

Perspectivas

La percepción global sobre los residuos agroindustriales está cambiando rápidamente en respuesta a la necesidad de sostenibilidad ambiental y conservación. En la actualidad, los desechos de residuos agroindustriales se han utilizado de varias maneras y las principales aplicaciones de los residuos incluyen la producción de biocombustibles, de enzimas, aislamiento de ácidos orgánicos,

extracción de pigmentos, aromatizantes y extracción de preservantes, producción de compuestos bioactivos, producción de polihidroxicarboxilatos biodegradables, compostajes agrícola, entre otros. Por lo tanto, la conversión de residuos agroindustriales a sustancias importantes puede no solo proporcionar un campo amplio para la investigación con el fin de conducir a la solución de problemas ambientales actuales (Yusuf, 2017).

10. Objetivo general

- Establecer el potencial de las cepas nativas de hongos anamorfos para la producción de amilasas y celulasas utilizando residuos agrícolas.

11. Objetivos específicos

- Determinar la producción de amilasas fúngicas utilizando como sustrato salvado de arroz.
- Establecer el efecto de la inmovilización de amilasas fúngicas en alginato de calcio.
- Determinar la producción de celulasas a partir de células fúngicas inmovilizadas en esferas de agar y utilizando como sustrato bagazo de caña.

12. Hipótesis

- Al menos una cepa nativa de los hongos anamorfos es capaz de producir amilasas en salvado de arroz.
- Las amilasas fúngicas de al menos una cepa de hongos anamorfos aumenta su actividad enzimática luego de la inmovilización en alginato de calcio.
- Al menos una cepa nativa de hongos anamorfos inmovilizada en esferas de agar es capaz de producir celulasas en bagazo de caña.

13. Materiales y métodos

13.1 Enfoque y tipo de investigación

13.1.1 Enfoque de la investigación: este estudio posee un enfoque cuantitativo

13.1.2 Tipo de la investigación: descriptiva y explicativa

13.2 Método: experimental

Se evaluaron 20 cepas de hongos anamorfos que mostraron la mayor actividad celulolítica y 20 cepas que mostraron la mayor actividad amilolítica en la segunda fase del proyecto de investigación “Diversidad y bioprospección de hongos anamorfos en Guatemala (fase II): Potencial biotecnológico para la producción de antibacterianos, enzimas y solubilización de compuestos inorgánicos de fósforo (Bran et al., 2018)”. Para la producción de amilasas se realizó una fermentación en estado sólido en salvado de arroz, las enzimas obtenidas fueron inmovilizadas en alginato de calcio y la producción de celulasas se realizó por fermentación en estado líquido con bagazo de caña e inmovilización del hongo en agar. Todas las evaluaciones y mediciones se llevaron a cabo a través de un diseño de bloques aleatorios completos de las cepas nativas a evaluar, con cinco repeticiones sucesivas. La variable de bloqueo la constituyeron las cepas fúngicas.

13.3 Técnicas e instrumentos:

Revitalización de cepas: A partir de las cepas de hongos anamorfos almacenadas en el cepario de hongos saprobios y micorrícicos del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, se realizaron cultivos en agar papa dextrosa (PDA) y Agar Extracto de Restos del Bosque (AERB), estos fueron incubados durante 15 días a 25 °C. Posteriormente se tomaron círculos de 0.5 cm de diámetro de cada una de las cepas fúngicas y se transfirieron en condiciones de esterilidad a agar celulosa y agar almidón, para su adaptación y producción de biomasa para los ensayos posteriores (Lagunes et al., 2015).

Evaluación de la producción de amilasas

Fermentación en estado sólido para la producción enzimática: A partir de la biomasa de las cepas fúngicas desarrolladas en agar almidón, se preparó una solución madre de las esporas de cada una de las cepas en Tween 80 al 0.1 %, a partir de la cual se preparó una solución al 1×10^6 esporas/ml en solución salina. Se agregó 1.0 ml de la solución anterior en Erlenmeyers con 5.0 g de salvado de arroz y 5.0 ml de agua destilada. Se incubaron a 28 °C durante 20 días (Pandey, Soccol, & Mitchell, 2000).

Extracción de las amilasas: Se agregaron 50.0 ml de NaCl al 1.0 % a los Erlenmeyer del paso anterior, posteriormente se agitaron durante 30 minutos y luego se filtraron con membranas de 8.0 μm , 0.80 μm y 0.45 μm (Singh, Singh, Bali, Sharma, & Mangla, 2014).

Evaluación de la actividad amilolítica: La actividad amilolítica de las enzimas extraídas en el paso anterior fue evaluada adicionando 10.0 μl del extracto enzimático a 0.5 ml de un medio con almidón soluble como fuente de carbono. La desaparición del sustrato fue evaluada por un método espectrofotométrico basado en la reacción del yodo y yoduro con el almidón a 640 nm (Singh et al., 2014). La cuantificación se realizó en unidades amilolíticas por decilitro (UA/dl), las unidades amilolíticas son la cantidad de enzima contenida en 100.0 ml de muestra, que puede hidrolizar 10.0 mg de almidón en 30 minutos.

Inmovilización de las amilasas: El extracto enzimático filtrado fue inmovilizado con alginato de calcio. Para realizar la inmovilización se agregaron 10.0 ml del extracto enzimático a 100.0 ml de alginato de sodio al 1.0 %, esta solución fue homogenizada y se agregaron gotas de 20.0 μl con una micropipeta automática en una solución de CaCl_2 0.2 M. Las esferas formadas se dejaron estabilizar durante una hora en la solución de CaCl_2 0.2 M, posteriormente fueron lavadas con buffer de acetato de sodio 0.1 M (Ertan, Yagar, & Balkan, 2007).

Evaluación de la actividad amilolítica de las enzimas inmovilizadas: Se inocularon 10.0 g de las esferas (enzimas fúngicas inmovilizadas) de cada una de las cepas en 100.0 ml del medio líquido con almidón en Erlenmeyers de 250.0 ml y se incubaron a 37 °C en una incubadora con agitación

constante durante 20 minutos. Se realizaron cinco repeticiones por cada cepa. La actividad enzimática fue evaluada a través de la determinación de la actividad amilolítica cada 5 minutos con la toma de muestras de 1.0 ml durante los 20 minutos que duró la incubación. La desaparición del sustrato fue evaluada por un método espectrofotométrico basado en la reacción del yodo y yoduro con el almidón a 640 nm (Ertan et al., 2007) La cuantificación se realizó en unidades amilolíticas por decilitro (UA/dl).

Evaluación de la producción de celulasas

Inmovilización de las células fúngicas en esferas de agar agua: A partir de la biomasa de las cepas fúngicas desarrolladas en agar celulosa, se preparó una solución madre de las esporas de cada una de las cepas en Tween 80 al 0.1 %, a partir de la cual se preparó una solución de 1×10^6 esporas/ml en solución salina. Se agregó 1.0 ml de la solución anterior a 10.0 ml de agar agua al 2% líquido a 45 °C. Para la formación de las esferas, con una micropipeta automática se agregaron microgotas de 20.0 μ l del preparado anterior a 50.0 ml de aceite vegetal a 4 °C. Las esferas formadas se lavaron con detergente comercial y se secaron en horno a 30°C en cajas de Petri de vidrio. Se preparó un total de 150.0 g en peso seco de esferas de cada cepa. La viabilidad del hongo dentro de las esferas de agar agua (inmovilización) se evaluó en el 10 % del total producido, a través de preparaciones microscópicas de dichas esferas para comprobar la producción de micelio a partir de la germinación de las esporas (Villena & Gutiérrez, 2003).

Elaboración del medio líquido con bagazo de caña como única fuente de carbono: se preparó un medio de cultivo con bagazo de caña al 2 % el cual proporciono celulosa como única fuente de carbono y se suplementó con sulfato de amonio, sulfato de magnesio y bifosfato de potasio (Alcarraz, Flores, & Godoy, 2010).

Fermentación en estado líquido para la producción de celulasas: Se inocularon 100.0 g de las esferas (células fúngicas inmovilizadas) de cada una de las cepas en 100.0 ml del medio líquido con bagazo de caña como única fuente de carbono contenidos en Erlenmeyers de 250 ml y se incubaron a 25 °C en agitación constante durante 20 días (Alcarraz et al., 2010). Se realizaron cinco repeticiones por cada cepa.

Evaluación de la actividad celulolítica: Las celulasas producidas en el paso anterior fueron determinadas a través de la actividad celulolítica cada 5 días durante los 20 días que duró la incubación. Los Erlenmeyers incubados en el paso anterior se quitaron de la incubadora con agitación y se dejó que las esferas sedimentaran durante una hora y posteriormente se tomaron muestras de 1.0 ml del sobrenadante. Los Erlenmeyers se volvieron a incubar con las mismas condiciones anteriores. Las muestras tomadas se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos, y se separaron los sobrenadantes, los cuales se filtraron y luego se diluyeron 1:5 con solución salina. 1.0 ml del sobrenadante diluido se agregó a 3.5 ml de celulosa microcristalina al 1.0 % y se incubó a 50 °C durante 30 minutos. La actividad celulolítica se comprobó a través de la producción de glucosa obtenida a partir de la degradación de celulosa microcristalina por el método espectofotométrico de la glucosa oxidasa (Villena & Gutiérrez, 2003). Los resultados se expresaron en unidades celulíticas por decilitro (UC/dl), cada unidad se consideró como la cantidad de enzima que libera un μmol de glucosa por minuto.

13.4 Operacionalización de las variables o unidades de análisis

Tabla 1
Operacionalización de las variables o unidades de análisis

Objetivos específicos	VARIABLES	Forma en que se midieron
Determinar la producción de amilasas fúngicas utilizando como sustrato salvado de arroz.	Producción de amilasas	Actividad amilolítica Unidades internacionales por decilitro
Establecer el efecto de la inmovilización de amilasas fúngicas en alginato de calcio.	Amilasas fúngicas inmovilizadas	Actividad amilolítica de las enzimas inmovilizadas Unidades internacionales por decilitro
Determinar la producción de celulasas utilizando como sustrato bagazo de caña a partir de células fúngicas inmovilizados en esferas de agar.	Producción de celulasas	Actividad celulolítica Unidades internacionales por decilitro

13.5 Procesamiento y análisis de la información

El estudio de la producción de amilasas y celulasas por hongos anamorfos se llevó a cabo a través de un diseño de bloques aleatorios completos de las 20 cepas nativas a evaluar, con cinco repeticiones sucesivas y las actividades enzimáticas en ambos casos se midió en unidades internacionales por decilitro (UI/dl). Además, para evaluar el efecto de la inmovilización de las amilasas se determinó el porcentaje de eficiencia de dichas enzimas inmovilizadas en alginato de calcio frente a las enzimas producidas directamente en salvado de arroz utilizando la siguiente ecuación: % Eficiencia = $\frac{\text{actividad final (Af)} - \text{actividad inicial (Ai)}}{Ai} \times 100$.

Se calculó la media y la desviación estándar para cada cepa fúngica. Para evidenciar si existe o no diferencia de la actividad amilolítica así como la celulolítica entre las 20 cepas, se realizó un análisis de varianza (anova) y una prueba posterior de comparación de medias de Duncan, con el .05 de significancia. Los resultados fueron procesados en Excel 2013 y el programa R[®] (Zaferanloo, Bhattacharjee, Ghorbani, Mahon, & Palombo, 2014).

14. Vinculación, difusión y divulgación

Actividades de vinculación:

Con el Dr. Rafael Castañeda Ruiz de la “International Society for Fungal Conservation” para la revisión de manuscritos y asesoría técnica. Además se efectuaron las gestiones para que el Dr. Castañeda Ruiz hiciera una visita académica a la Universidad, lamentablemente debido a los problemas de cierre de la Universidad durante el mes de agosto, no fue posible concretar dicha visita.

Con la MSc. Amaranta Ramírez de la Escuela de Biología de la Universidad Autónoma de México, asesoría técnica en perspectivas moleculares relacionadas con secuenciación de hongos.

Con el Dr. Roberto Garibay Orijel de la Escuela de Biología de la Universidad Autónoma de México, asesoría técnica en perspectivas moleculares relacionadas con secuenciación de hongos.

Con el Dr. Rafael Fernández Botrán, Associate Professor, Department of Pathology and Laboratory Medicine, asesoría técnica revisión de manuscrito científico como parte de la actividad “Converciencia” organizada por CONCYT.

Con el Dr. Daniel Scott Algara, Intituto Pasteur. Información sobre procesos de elaboración de patentes como parte del II Congreso Internacional de Biotecnología en Guatemala.

Con la Dra. Pamela Pennington, Directora, Centro de Estudios en Biotecnología, Universidad del Valle de Guatemala, asesoría en la elaboración de poster científico para II Congreso Internacional de Biotecnología en Guatemala.

Cooperación y asesoría técnica con la Escuela de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras a través de la MSc. Elia Sarmiento Sánchez, directora de dicha Escuela, con respecto a evaluar el potencial de los hongos que se desarrollan en dicho país.

Actividades de difusión y divulgación:

Presentación de los resultados de la fase I, fase II y avances de la fase III del presente proyecto en la conferencia “Diversidad y potencial biotecnológico de hongos anamorfos en Guatemala” Como parte de la actividad “Nuestra biodiversidad, nuestra alimentación y nuestra salud” organizado por el Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia durante el mes de mayo de 2019.

Presentación de los resultados de la fase I, fase II y avances de la fase III del presente proyecto en el poster científico “Diversidad y potencial biotecnológico de hongos anamorfos en Guatemala” Como parte de la actividad “Nuestra biodiversidad, nuestra alimentación y nuestra salud” organizado por el Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia durante el mes de mayo de 2019.

Presentación de un poster científico de los resultados de la fase I, fase II y de la fase III del presente proyecto en la conferencia “Diversidad y biotecnología de hongos anamorfos” en el II Congreso Internacional de Biotecnología en Guatemala durante el mes de octubre de 2019.

Presentación de un manuscrito científico de los resultados de la fase III del presente proyecto en la conferencia “Potencial de los hongos anamorfos para la producción de α -amilasas utilizando cascarilla de arroz como sustrato” en el segundo módulo de las jornadas de actualización de la Dirección General de Investigación, 2019.

Publicación del artículo científico “Bran, M. C., Figueroa, R., & Morales, O. (2019). Producción de amilasas por cepas de hongos anamorfos aislados de la hojarasca de *Quercus* sp. *Revista Científica*, 29(1), 2-11.”

Actividades de docencia sobre hongos anamorfos y su potencial biotecnológico a estudiantes de la carrera de Química Biológica del 7° y 8° ciclo (en la docencia de los cursos Microbiología Industrial y Microbiología de Sistemas Naturales, respectivamente).

Actividades de gestión:

Gestión ante la Dirección General de Docencia de pasaje de avión y viáticos para realizar pasantía académica en el Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México en Secuenciación de Hongos.

Gestión de pasaje de avión de La Habana, Cuba a Guatemala y de Guatemala a La Habana, Cuba para el doctor Rafael Castañeda Ruiz ante la Dirección General de Docencia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Gestiones ante la Junta Directiva de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia para el nombramiento de la coordinación del proyecto y de investigador titular no asalariado: Lcda María del Carmen Bran y Lic. Osberth Morales, respectivamente.

Gestión ante la Dirección General de Investigación (DIGI) para el reconocimiento de la Lcda. María del Carmen Bran González como Coordinador del Proyecto.

Gestiones ante la DIGI para el nombramiento del Lic. Ricardo Andres Figueroa Ceballos como investigador del proyecto.

15. Productos, hallazgos, conocimientos o resultados:

Actividad amilolítica

Al evaluar la actividad amilolítica de las 20 cepas de hongos anamorfos se encontró que todas produjeron amilasas. De éstas, las producidas por *Aspergillus* sp SL15319 mostraron la mayor actividad tanto libres (930.26 [1.56]) como inmovilizadas (900.34 [3.21]), seguido de *Beltrania rhombica* (905.02 [10.72] y 879.07 [3.87]) y *Aspergillus* sp SL15119 (907.46 [5.17] y 875.95 [9.39]), respectivamente. La menor actividad se registró en *Chaetopsina splendida* SL10519 (39.44 [28.02] y 46.44 [6.87]) y *Brachysporiella* sp SL10319 (44.29 [37.48] y 32.33 [26.55]), respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1

Capacidad amilolítica de las enzimas fúngicas libres e inmovilizadas en alginato de calcio sobre salvado de arroz

Cepa fúngica	Enzimas libres (UI/dl) ^{1,2}	Enzimas inmovilizadas (UI/dl) ^{1,2}
<i>Aspergillus</i> sp SL15319	930.26 (1.56) ^a	900.34 (3.21) ^a
<i>Beltrania rhombica</i> SL10219	905.02 (10.72) ^a	879.07 (3.87) ^a
<i>Aspergillus</i> sp SL15119	907.46 (5.17) ^a	875.95 (9.39) ^a
<i>Penicillium</i> sp SL16419	718.25 (29.16) ^b	687.27 (17.98) ^b
<i>Penicillium</i> sp SL16119	700.84 (0.99) ^b	665.68 (9.11) ^{bc}
<i>Phialocephala humicola</i> SL11419	652.46 (12.40) ^c	641.70 (15.89) ^c
<i>Penicillium</i> sp SL16019	624.57 (6.71) ^c	597.10 (15.64) ^d
<i>Phialocephala humicola</i> TP14119	593.82 (33.55) ^d	557.05 (30.42) ^e
<i>Aspergillus</i> sp SL15219	462.35 (5.88) ^e	471.59 (33.63) ^f
<i>Aspergillus niger</i> SL14919 cepa TP16619	393.16 (37.40) ^f 346.17 (25.34) ^g	384.46 (67.73) ^g 289.58 (41.43) ^h
<i>Virgaria nigra</i> SL12519	229.63 (30.93) ^h	237.40 (49.38) ⁱ
cepa TP16719	227.03 (35.17) ^h	201.58 (28.72) ^{ji}
<i>Penicillium</i> sp SL15519	217.15 (22.92) ^{hi}	180.90 (24.12) ⁱ
<i>Penicillium</i> sp SL16319	190.04 (3.05) ⁱ	192.87 (11.89) ^{ji}
<i>Penicillium</i> sp SL15619	192.08 (34.96) ⁱ	166.14 (43.45) ^{ji}
<i>Paecilomyces</i> sp TP17119	75.26 (27.32) ^{ji}	42.17 (27.98) ^k
<i>Penicillium</i> sp SL15719	61.35 (15.03) ^{jk}	43.27 (17.16) ^k
<i>Chaetopsina splendida</i> SL10519	39.44 (28.02) ^k	46.44 (6.87) ^k
<i>Brachysporiella</i> sp SL10319	44.29 (37.48) ^{jk}	32.33 (26.55) ^k

¹Unidades amilolíticas por decilitro. ²Letras distintas en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa, de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Duncan (p = .05).

No se observó diferencia significativa entre la actividad amilolítica de las enzimas libres e inmovilizadas de la mayoría de las cepas (80%). Por el contrario, mostraron diferencia significativa las amilasas libres e inmovilizadas de *Penicillium* sp SL16119, *P. humicola* TP14119, *Penicillium* sp SL15619 y la cepa TP16619 (Figura 1).

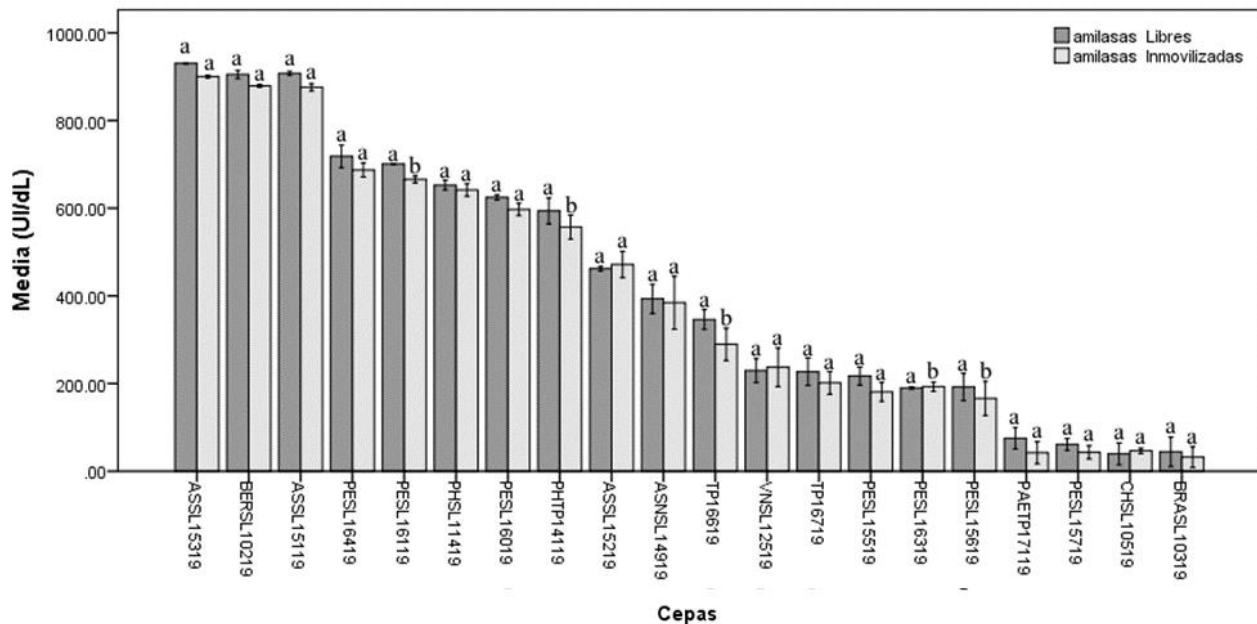


Figura 1. Actividad amilolítica de las enzimas libres e inmovilizadas sobre salvado de arroz. Letras iguales entre la actividad de la enzima libre e inmovilizada obtenida por cada cepa, indican ausencia de diferencia significativa de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Duncan ($p = .05$).

Actividad celulolítica

Al evaluar la actividad celulolítica de las 20 cepas de hongos anamorfos inmovilizados se encontró que todas produjeron celulasas. De éstas, las producidas por *Penicillium* sp SL15619 mostraron la mayor actividad (160.99 [1.00] UI/dl), seguido por *Stachybotrina* sp TP14619 (116.63 [1.49] UI/dl) y *B. querna* SL10119 (110.33 [1.74] UI/dl). La menor actividad se encontró en *Penicillium* sp SL15419 (57.68 [0.36] UI/dl) y *B. rhombica* SL10219 (45.19 [0.42] UI/dl) (Tabla 2, Figura 2).

Tabla 2

Capacidad celulolítica de las células fúngicas inmovilizadas en agar sobre bagazo de caña

Cepa fúngica	Actividad celulolítica (UI/dl) ^{1,2}
<i>Penicillium</i> sp SL15619	160.99 (1.00) ^a
<i>Stachybotrina</i> sp TP14619	116.63 (1.49) ^b
<i>B. querna</i> SL10119	110.33 (1.74) ^c
<i>T. cubensis</i> SL12219	95.64 (1.09) ^d
<i>T. nivea</i> TP14719	95.19 (1.73) ^d
<i>Penicillium</i> sp SL16419	89.72 (2.33) ^e
<i>Chloridium</i> sp TP13019	85.14 (0.63) ^f
<i>C. splendida</i> SL10519	84.59 (0.60) ^{fg}
<i>Penicillium</i> sp SL16119	84.48 (1.02) ^{fg}
<i>Penicillium</i> sp SL16319	83.98 (1.10) ^{fg}
<i>Paecilomyces</i> sp TP17019	83.48 (0.53) ^g
<i>Paecilomyces</i> sp TP17119	81.44 (1.00) ^h
<i>Paecilomyces</i> sp TP17219	80.39 (0.85) ^h
<i>Penicillium</i> sp SL15819	75.58 (1.01) ⁱ
<i>Stachybotrina</i> sp SL12019	74.59 (0.55) ⁱ
<i>Cladosporium</i> sp TP16519	66.07 (1.36) ^j
<i>P. humicola</i> SL11419	65.47 (1.28) ^j
<i>V. nigra</i> SL12519	59.56 (0.75) ^k
<i>Penicillium</i> sp SL15419	57.68 (0.36) ^l
<i>B. rhombica</i> SL10219	45.19 (0.42) ^m

¹Unidades internacionales por decilitro. ²Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa, de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Duncan ($p = .05$).

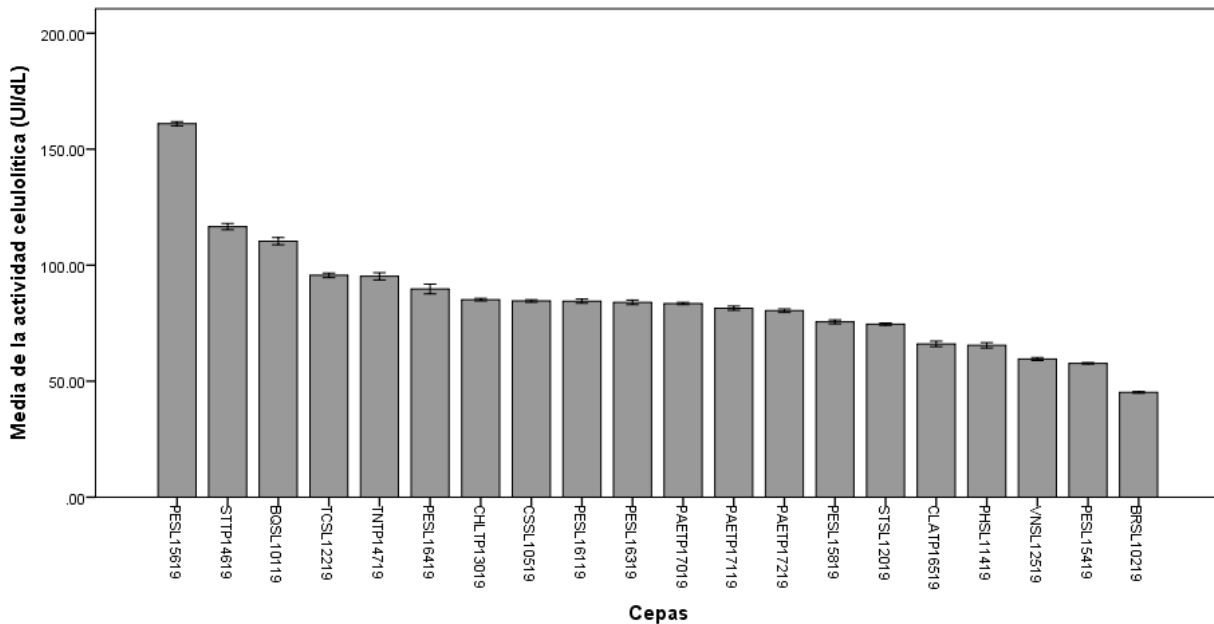


Figura 2. Actividad celulolítica de las enzimas sobre bagazo de caña de azúcar. Las barras indican la media. Las barras de error muestran más menos dos desviaciones estándar de la media.

16. Análisis y discusión de resultados:

Debido a la preocupación ambiental de la sociedad con respecto a la necesidad de conversión de los residuos agroindustriales en productos útiles y con mayor valor agregado que genere ingresos económicos adicionales, y que además se dé solución a un problema ambiental (Mirabella et al., 2014; Yepes et al., 2008), en este proyecto de investigación se evaluaron 20 cepas nativas de hongos anamorfos para la producción de las enzimas amilasas y celulasas, a partir de residuos agrícolas.

Llama la atención que todas las cepas de hongos analizados presentaron actividad tanto amilolítica como celulolítica utilizando salvado de arroz y bagazo de caña de azúcar como sustrato, respectivamente. Esto demuestra el potencial enzimático de estos hongos para ser usados en procesos biotecnológicos para el tratamiento de desechos agroindustriales, debido al bagaje enzimático que poseen, puesto que en la naturaleza se encargan de los procesos de degradación de materia orgánica compuesta tanto por moléculas simples como complejas, entre ellas el almidón y la celulosa. Cabe mencionar que en trabajos anteriores ya se había evidenciado la actividad

amilolítica de estas cepas sobre afrecho así como la actividad celulolítica utilizando el reactivo carboximetil celulosa (Bran et al., 2018).

Respecto a la actividad amilolítica, como se mencionó anteriormente todas las cepas probadas produjeron amilasas libres utilizando como sustrato salvado de arroz. Aliyah, Alamsyah, Ramadhani y Hermansyah (2017) utilizando el mismo sustrato, encontraron actividad de 659.5 UA/dl en una cepa de *A. niger*, el cual es más alto que la mostrada por la cepa *A. niger* SL14919 utilizada en este estudio. Sin embargo otras cepas nativas del mismo género (*Aspergillus* sp SL15319, *Aspergillus* sp SL15119), así como también *Beltrania rhombica* SL10219, *Penicillium* sp SL16419 y *Penicillium* sp SL16119, mostraron actividades mayores que la indicada para *A. niger*. Los resultados obtenidos por estas cepas las hace promisorias para ser utilizadas como productoras de amilasas a través de la degradación de desechos agrícolas, por lo que se recomienda evaluar otros residuos agroindustriales como sustratos para la producción de amilasas fúngicas, tales como el bagazo de caña o el olote (raquis del maíz).

Con relación al efecto de la inmovilización de las amilasas en alginato de calcio, las cuales fueron producidas por las cepas de hongos anamorfos evaluadas, no se observó diferencia significativa entre la actividad amilolítica de las enzimas libres e inmovilizadas de la mayoría de las cepas. Lo anterior es de gran importancia tomando en cuenta que con la inmovilización se busca que la actividad de la enzima se mantenga (a pesar de cambios de temperatura, pH y otros factores del entorno) e incluso que la enzima pueda reutilizarse y que el producto no necesite de una purificación posterior (Santos, Sarrouh, Rivaldi, Converti, & Silva, 2008). Por ejemplo, He y colaboradores (2017) utilizando otra técnica de inmovilización lograron mantener la estabilidad de α -amilasas a cambios de temperatura y pH. Por lo anterior se recomienda efectuar estudios de los factores que influyen en la actividad de las amilasas producidas, al ser inmovilizadas en alginato de calcio.

Por otra parte, en algunas cepas evaluadas en este estudio se evidenció disminución en la actividad amilolítica cuando las enzimas fueron inmovilizadas. Lo anterior pudo deberse a que el atrapamiento de las amilasas en el alginato de calcio es un proceso físico que puede bloquear el sitio activo de las enzimas inmovilizadas, lo que ocasionaría la reducción de la actividad de la

enzima (Sethi, Jana, Nanda, & Dasmohapatra, 2016). Kumar, Muthukumar y Garg (2012), al inmovilizar α -amilasas de *Fusarium solani* en esferas de alginato de calcio encontraron una actividad menor al de las enzimas libres (81%), sin embargo determinaron que las inmovilizadas funcionaban mejor que las libres a 40 °C y su actividad se mantenía hasta por 180 minutos, mientras que la actividad de las enzimas libres se vio disminuida en un 80% en 60 minutos.

Aunque la inmovilización no modifica o en algunos casos disminuye la actividad respecto a las enzimas libres es un proceso recomendable, debido a que brinda estabilidad a las enzimas respecto a las fluctuaciones de temperatura, pH y otros factores. Además puede ayudar a mantener la actividad durante mayor tiempo que las enzimas libres (Kumar et al., 2012).

Respecto a la actividad celulolítica, todas las cepas probadas produjeron celulasas utilizando como sustrato bagazo de caña de azúcar. En este trabajo se obtuvieron actividades de entre 45.19 y 160.99 UI/dL, valores que superan la actividad máxima de 30 UI/dl encontrada por Alcarraz y colaboradores (2003) al utilizar esporas de *A. niger* inmovilizadas en agar en el mismo sustrato. En otro estudio, Ranjith, Kanchana y Pratheep (2018) utilizaron una cepa de *A. niger* aislada de paja de arroz, la cual evidenció actividades enzimáticas de hasta 18 UI/dL luego de optimizar las condiciones de temperatura y pH. Por lo anterior se recomienda efectuar estudios de optimización de diversos factores para mejorar la actividad de la enzimática de las celulasas producidas por los hongos evaluados.

La actividad celulolítica mostrada por los hongos anamorfos evaluados responde a la naturaleza biológica de los mismos ya que son degradadores de hojarasca, de la cual obtienen una fuente de energía a partir de sustratos ricos en celulosa. Al respecto, Amore, Giacobbe y Faraco (2013) indican que la producción de enzimas es un proceso que consume bastante energía y que las celulasas se producen solo bajo condiciones donde los hongos necesiten usar los polímeros de las plantas como fuente de carbohidratos.

En otro estudio, Hui, Amirul y Yahya (2010) luego de inmovilizar células de *A. terreus* en almohadillas de nylon y de optimizar factores de crecimiento en un medio químicamente definido (concentración de celulosa, fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico, pH y

temperatura), encontraron actividades celulolíticas de hasta 1200 UI/dL y determinaron también que las células inmovilizadas mantenían la actividad durante más tiempo que las libres.

En conclusión se puede indicar que este estudio no solo contribuye a la búsqueda de alternativas para el aprovechamiento de los residuos agrícolas para la obtención de compuestos de interés industrial y económico a través de la producción de amilasas y celulasas, sino que además demuestra el potencial que poseen los hongos anamorfos de Guatemala como productores de enzimas, con lo cual se abre la posibilidad de iniciar estudios piloto para su producción a nivel local. Por tales razones se hace necesario continuar haciendo estudios en este ámbito ya que contribuyan no solamente al desarrollo de la biotecnología en Guatemala, sino que también se contribuye con el cumplimiento de los ODS enmarcados en el Plan Nacional de Desarrollo K'atun Nuestra Guatemala 2032 (meta priorizada 2.4).

17. Conclusiones

- Se determinó que las 20 cepas nativas de hongos anamorfos son capaces de producir amilasas utilizando salvado de arroz como sustrato.
- En el 80% de las cepas evaluadas no hubo diferencia en la actividad amilolítica de las enzimas libres respecto a las inmovilizadas en esferas de alginato de calcio.
- Las 20 cepas fúngicas evaluadas produjeron celulasas al ser inmovilizadas en esferas de agar utilizando como sustrato bagazo de caña.

18. Impacto esperado

Este estudio no solo contribuye a la búsqueda de alternativas para el aprovechamiento de los residuos agrícolas para la obtención de compuestos de interés industrial a través de la producción de amilasas y celulasas, para la obtención de bienes y servicios de índole económico, sino que además resulta de beneficio para resaltar el valor agregado que poseen los hongos anamorfos de Guatemala como productores de enzimas a nivel local. Además se contribuye con el cumplimiento

de los ODS enmarcados en el Plan Nacional de Desarrollo K'atun Nuestra Guatemala 2032 (meta priorizada 2.4).

19. Referencias

- Akpan, I., Bankole, M., Adsemowo, A., & Latunde-Dada, G. (1999). Production of amylase by *A. niger* in cheap solid medium using rice bran and agricultural materials. *Tropical Science*, 39, 77-79.
- Akpinar, M., & Ozturk, R. (2017). Peach and cherry agroindustrial wastes: New and economic sources for the production of lignocellulolytic enzymes. *Acta Chimica Slovenica*, 64, 422–430. doi: 10.17344/acsi.2017.3265
- Alcarraz, M., Flores, A., & Godoy, J. (2010). Producción de celulasas por inmovilización celular para el tratamiento de efluentes industriales lignocelulósicos. *Revista del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Geología, Minas, Metalurgia y Ciencias Geográficas*, 13(26), 97–102.
- Aliyah, A., Almsyah, G., Ramadhani, R., & Hermansyah, H. (2017). Production of α -Amylase and β -Glucosidase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation method on biomass waste substrates from rice husk, bagasse and corn cob. *Energy Procedia*, 136, 418–423. doi: 10.1016/j.egypro.2017.10.269
- Amore, A., Giacobbe, S., & Faraco, V. (2013). Regulation of cellulase and hemicellulase gene expression in fungi. *Current Genomics*, 14, 230–249.
- Balakrishnan, K., & Pandey, A. (1996). Production of biologically active secondary metabolites in solid state fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 55, 365–372.
- Bhargav, S., Panda B., Ali, M., & Javed, S. (2008). Solid-state fermentation: An overview. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 22(1), 49–70.
- Bran, M., Morales, O., & Figueroa, R. (2018). Diversidad y bioprospección de hongos anamorfos en Guatemala (fase II): Potencial biotecnológico para la producción de antibacterianos, enzimas y solubilización de compuestos inorgánicos de fósforo. Programa Universitario de Investigación en Desarrollo Industrial, Proyecto

4.8.63.6.10. Universidad de San Carlos de Guatemala. Dirección General de Investigación, Guatemala.

- Buenrostro, J., Ascacio, A., Sepulveda, L., de la Cruz, R., Prado-Barragan, A., Aguilar-González, M. ... Aguilar, C. (2013). Potential use of different agro-industrial by products as supports for fungal ellagitannase production under solid state fermentation. *Food and Bioproducts Processing*, 92(4), 376-382. doi:10.1016/j.fbp.2013.08.010.
- Cury, R., Aguas, M., Martínez, A., Olivero, R., & Chams, L. (2017). Residuos agroindustriales su impacto, manejo y aprovechamiento. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 9, 122–132. doi: 10.24188/recia.v9.nS.2017.530.
- Duhan, J., Kumar, A., & Tanwar, S. (2013). Bioethanol production from starchy part of tuberous plant (potato) using *Saccharomyces cerevisiae* MTCC-170. *African Journal of Microbiology Research*, 7(46), 5253–5260. doi:10.5897/AJMR2013.6122
- Ellaiah, P., Adinarayana, K., Pardhasaradhi, S., & Srinivasulu, B. (2002). Isolation of alkaline protease production bacteria from Visakhapatnam soil. *Indian Journal of Microbiology*, 42, 173-175.
- Ertan, F., Yagar, H., & Balkan, B. (2007). Optimization of α -amylase immobilization in calcium alginate beads. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 37(3), 195–204. doi: 10.1080/10826060701386679.
- Galankis, G. (2012). Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, 26(2), 68-87. doi: 10.1016/j.tifs.2012.03.003.
- He, L., Mao, Y., Zhang, L., Wang, H., Alias, S. A., Gao, B., & Wei, D. (2017). Functional expression of a novel α -amylase from Antarctic psychotolerant fungus for baking industry and its magnetic immobilization. *Biotechnology*, 17(22), 1–13. doi: 10.1186/s12896-017-0343-8
- Hui, Y., Amirul, H. A., & Yahya, M. (2010). Cellulase production by free and immobilized *Aspergillus terreus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 79–84. doi: 10.1007/s11274-009-0145-9
- Kalogeris, E., Christakopoulos, P., Katapodis, P., Alexiou, A., Vlachou, S., Kekos, D., & Macris, B. (2003). Production and characterization of cellulolytic enzymes from the

- thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. *Process Biochemistry*, 38(7), 1099–1104. doi:10.1016/S0032-9592(02)00242-X
- Kumar, D., Muthukumar, M., & Garg, N. (2012). Kinetics of fungal extracellular D -amylase from *Fusarium solani* immobilized in calcium alginate beads. *Journal of Environmental Biology*, 33, 1021-1025.
- Lagunes, M., López, A., Ramos, A., Trigos, A., Salinas, A., & Espinoza, C. (2015). Actividad antibacteriana de extractos metanol:cloroformo de hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 33(1), 87–94.
- Mirabella, N., Castellani, V., & Sala, S. (2014). Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of Cleaner Production*, 65, 28–41. doi: 10.1016/j.jclepro.2013.10.051
- Mussatto, S., Ballesteros, L., Martins, S., & Teixeira, J. (2012). Use of agro-industrial wastes in solid state fermentation processes. In K. Show & X. Guo (Eds). *Industrial Waste* (pp. 121–140). Lisbon: Intech Europe.
- Nascimento, T., Sales, A., Porto, C., Pedrosa, R., Campos, G., Couto, J. ... Figueiredo, A. (2015). Production and characterization of new fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 in solid-state fermentation. *Advances in Enzyme Research*, 3, 81-91. doi:10.4236/aer.2015.33009
- Negi, S., & Banerjee, R. (2009). Optimization of extraction and purification of glucoamylase produced by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14, 60-66. doi:10.1007/s12257-008-0107-3
- Nguyen, T., Kim, K., Han, S., Cho, H., Kim, J., Park, S. ... Sim, S. (2010). Pretreatment of rice straw with ammonia and ionic liquid for lignocellulose conversion to fermentable sugars. *Bioresource Technology*, 101(19), 7432–7438. doi:10.1016/j.biortech.2010.04.053.
- Nigam, P., & Singh, D. (1995). Enzyme and microbial systems involved in starch processing. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(9), 770-778. doi:10.1016/0141-0229(94)00003-A

- Okafor, N. (2007). *Modern industrial Microbiology and Biotechnology*. New Jersey: Science Publishers.
- Okonko, I., Ogunnusi, T., Aloysius, F., Adejoye, O., & Adewale, O. (2009). Utilization of food wastes for sustainable development. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 8(4), 263–286.
- Oliveira, F., Souza, C., & Oliveira, V. (2017). Optimization of lipase production by *Aspergillus ibericus* from oil cakes and its application in esterification reactions. *Food and Bioproducts Processing*, 102, 268-277. doi:10.1016/j.fbp.2017.01.007.
- Orzua, M., Mussatto, S., Contreras-Esquivel, J., Rodriguez, R., de la Garza, H., Teixeira, J., & Aguilar, C. (2009). Exploitation of agro industrial wastes as immobilization carrier for solid-state fermentation. *Industrial Crops and Products*, 30(1), 24–27. doi:10.1016/j.indcrop.2009.02.001
- Pandey, A. (2003). Solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2), 81–84. doi:10.1016/S1369-703X(02)00121-3.
- Pandey, A., Soccol, C., & Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, 35(10), 1153–1169. doi: 10.1016/S0032-9592(00)00152-7.
- Ranjith, S., Kanchana, D., & Pratheep, S. (2018). Cellulase Production from *Aspergillus niger* using Paddy Straw as a Substrate and Immobilization. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 6(2), 1081–1084. doi: 10.18782/2320-7051.6339
- Rodríguez-Couto, S. (2008). Exploitation of biological wastes for the production of value-added products under solid-state fermentation conditions. *Biotechnology Journal*, 3(7), 859–870. doi: 10.1002/biot.200800031.
- Sadh, P., Duhan, S., & Duhan, J. (2018). Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 1–15. doi: 10.1186/s40643-017-0187-z.
- Santos, D. T., Sarrouh, B. F., Rivaldi, J. D., Converti, A., & Silva, S. S. (2008). Use of sugarcane bagasse as biomaterial for cell immobilization for xylitol production. *Journal of Food Engineering*, 86, 542–548. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2007.11.004

- Saharan, P., & Duhan, J. (2013). Studies on antioxidant activity, total phenolic and flavanoid contents of leaf extracts of *Thuja orientalis*. In D. Khanna, A. Chopra, G. Matta, V. Singh, & R. Bhutiani (Eds). *Impact of global climate change on earth ecosystem* (pp. 193–203). New Delhi: Biotech Books.
- Secretaría de Planificación y Programación de la Presidencia (2017). Objetivos de desarrollo sostenible, metas priorizadas Guatemala. Recuperado de <http://www.segeplan.gob.gt/nportal/index.php/biblioteca-documental/file/587-ods-metas-priorizadas>
- Sethi, B. K., Jana, A., Nanda, P. K., & Dasmohapatra, P. K. (2016). Production of α -amylase by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using pearl millet and its structural characterization. *Frontiers in Plant Science*, 7(639), 1–13. doi: 10.3389/fpls.2016.00639
- Singh, S., Singh, S., Bali, V., Sharma, L., & Mangla, J. (2014). Production of fungal amylases using cheap, readily available agroresidues, for potential application in textile industry. *BioMed Research International*, 48, 1–9. doi: 10.1155/2014/215748
- Subramaniam, R., & Vimala, R. (2012). Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *International Journal of Science and Nature*, 3(3), 480–486.
- Suganthi, R., Benazir, J., Santhi, R., Ramesh, V., Anjana, H., Nitya, M. ... Lakshmi, R. (2011). Amylase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation using agroindustrial wastes. *International Journal of Engineering Science and Technology*, 3(2), 1756–1763.
- Thakur, S., Nemade, S., & Sharanappa, A. (2015). Solid state fermentation of overheated soybean meal (waste) for production of protease using *Aspergillus oryzae*. *International Journal of Innovative Research in Science Engineering and Technology*, 4(1), 18456–18461. doi:10.15680/IJRSET.2015.0401008
- Topakas, E., Kalogeris, E., Kekos, D., Macris, B., & Christakopoulos, P. (2004). Production of phenolics from corn cobs by coupling enzymic treatment and solid state fermentation. *Engineering in Life Sciences*, 4(3), 283–286. doi:10.1002/elsc.200420025

- Villena, G., & Gutiérrez, M. (2003). Biopelículas de *Aspergillus niger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. *Revista Peruana de Biología*, 10(1), 78–87. doi: 10.15381/rpb.v10i1.2483.
- Wadhwa, M., & Bakshi, M. (2013). *Utilization of fruit and vegetable wastes as livestock feed and as substrates for generation of other value added products*, Bangkok, Tailandia: RAP publication.
- Yepes, S., Montoya, L., & Orozco, F. (2008). Valorización de residuos agroindustriales -frutas- en Medellín y el Sur del Valle del Aburrá, Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 61(1), 4422–4431.
- Yusuf, M. (2017). Agro-industrial wastes materials and their recycled value-added applications: Review. In L. Martínez, O. Kharissova & B. Kharisov (eds). *Handbook of Ecomaterials* (pp. 1–9). Cham: Springer.
- Zaferanloo, B., Bhattacharjee, S., Ghorbani, M., Mahon, P., & Palombo, E. (2014). Amylase production by *Preussia minima*, a fungus of endophytic origin: optimization of fermentation conditions and analysis of fungal secretome by LC-MS. *BMC Microbiology*, 14(55), 1–12. doi: 10.1186/1471-2180-14-55.

20. Apéndice

Listado de los integrantes del equipo de investigación

Contratados por contraparte y colaboradores

Nombre	Firma
Lcda. María del Carmen Bran González (Coordinadora)	
Lic. Osberth Morales Esquivel	
Ing. Agr. Gustavo Álvarez	

Contratados por la Dirección General de Investigación

Nombre	Categoría	Registro de Personal	Pago		Firma
			SI	NO	
Lic. Ricardo Andres Figueroa Ceballos	Investigador	20151723	X		

Guatemala, 09 de enero de 2020

Licda. María del Carmen Bran González
Coordinadora del proyecto de Investigación (4.8.63.6.71)

Inga. Liuba Cabrera
Coordinador PUIDI

Ing. Rufino Salazar
Coordinador general de programas