

Caracterización de crudos enzimáticos del hongo *Trichoderma koningiopsis* Th003 para ser usados como aditivos de ensilaje

Eddy J Bautista¹, Ana M Jiménez, Vanessa Chavarro-Anzola, y Martha I Gómez
Corporación colombiana de investigación agropecuaria - AGROSAVIA.
Sede Central- Km 14 Vía Bogotá, Mosquera - Mosquera, Cundinamarca, Colombia.

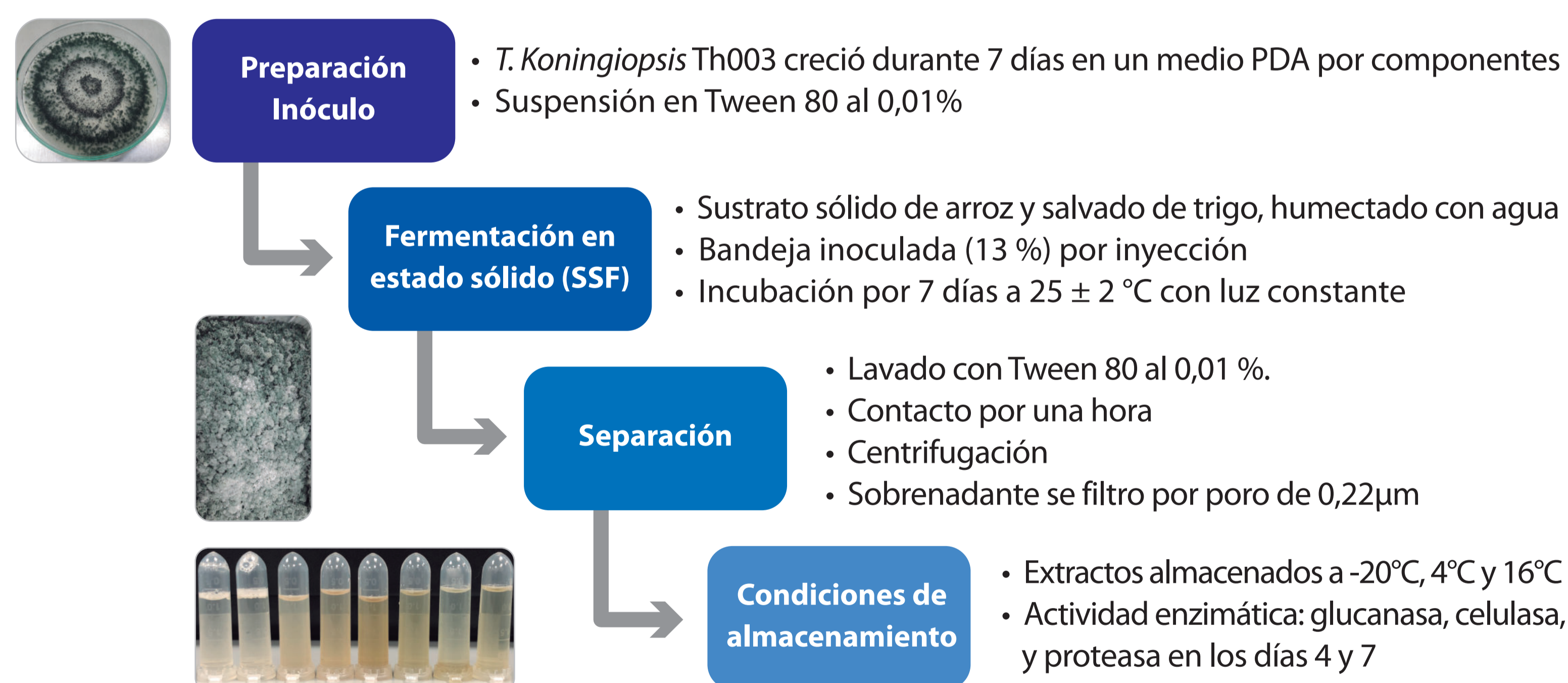
¹ Correo electrónico: ebautista@agrosavia.co

Introducción

Los sistemas de ensilado de forrajes se presentan como alternativa para garantizar la disponibilidad de alimento en diferentes épocas del año, manteniendo el valor nutricional de los mismos. Además, el forraje ensilado puede sustituir o completar el uso de concentrados en la alimentación, reduciendo los costos, pero al mismo tiempo manteniendo calidad en la alimentación de los animales. Sin embargo, es importante realizar un proceso de ensilaje utilizando prácticas adecuadas que mantengan la estabilidad aeróbica del silo y que no permita la colonización de microorganismos indeseables, entre otros (Herrera 2014).

Algunas enzimas fibrolíticas se adicionan como aditivos a los ensilajes para favorecer el proceso de fermentación, así como para aumentar el valor nutricional del mismo. Estas enzimas son producidas principalmente por hongos filamentosos mediante fermentación en estado sólido (SSF) (Daguette et al. 2014). Actualmente, Agrosavia utiliza los conidios de un hongo filamentoso nativo de Colombia, *Trichoderma koningiopsis* Th003 para producir por SSF el bioplaguicida Tricotec®. Durante este proceso, queda un sobrenadante producto de la separación de los conidios del sustrato sólido, el cual contiene las enzimas que el hongo ha secretado, y que podría ser utilizados como un subproducto, dando un valor agregado al proceso. Por lo tanto, en este estudio se presenta la caracterización de las enzimas del sobrenadante, y el efecto de la temperatura y tiempo de almacenamiento sobre actividad enzimática. Se encontró que el sobrenadante presenta una baja actividad enzimática de proteasa (U/gss) 0,509 ± 0,060, amilasa (U/gss) 2,563 ± 0,117, una actividad enzimática media de CMCasa (U/gss) 10,949 ± 0,276, y Fpasa (U/gss) 11,149 ± 0,523. Mientras que presenta alta actividad enzimática de β (1,3)-glucanasa (U/gss) 20,873 ± 1,666, demostrando la capacidad de esta cepa para producción de enzimas pertenecientes al complejo celulolítico. En cuanto al efecto de la temperatura se concluye, que el extracto enzimático se puede almacenar a cualquier temperatura (-20 °C, 4 °C o 16 °C) sin tener ninguna diferencia significativa entre actividades enzimáticas en el día siete. La actividad enzimática de CMCasa y Fpasa aumento en el tiempo, mientras que la actividad enzimática que β (1,3)-glucanasa y proteasas disminuyo en el tiempo.

Metodología



Técnicas actividades enzimáticas

- Las técnicas utilizadas se presentan en la Tabla 1.
- El estándar utilizado para las curvas de calibración del método de Nelson-Somogyi y DNS fue glucosa, mientras que para el método de Reissig fue N-acetilglucosamina.
- Ensayos realizados por triplicado, y los datos fueron calculados como el promedio ± desviación estándar.
- Una unidad de actividad enzimática (UAE) es la cantidad de enzima que libera una µmol de glucosa o n-acetilglucosamina por minuto bajo las condiciones del ensayo.
- Se determinó el porcentaje de humedad (%) presente en el sustrato utilizando el método de peso constante, para posteriormente realizar la corrección de las actividades enzimáticas a unidades de actividades enzimáticas por gramos de sustrato seco (UAE/gss)

Tabla 1. Métodos empleados para determinación de actividades enzimáticas

Enzima	Sustrato	Solución tapón	Temperatura reacción (°C)	Tiempo de reacción (min)	Método colorimétrico
Alpha amilasa	Almidón	Acetato de sodio pH 6.0	50	30	Nelson – Somogyi
β 1,3-Glucanasa	Laminarina	Acetato de sodio pH 5.5	37	30	Nelson – Somogyi
Celulasa (CMCasa)	Carboximetil-celulosa	Citrato de sodio pH 4.8	50	30	DNS
Papel filtro (Fpasa)	Papel filtro Whatman 1	Citrato de sodio pH 4.8	50	30	DNS
Proteasa	Caseína	Fosfato de potasio pH 7.5	37	10	Folin & Ciocalteus Fenol

Resultados

El sobrenadante proveniente de la separación de la fermentación de *T. koningiopsis* Th003, presento actividad enzimática baja para proteasa (U/gss) 0,509 ± 0,060, seguida por amilasa (U/gss) 2,563 ± 0,117, CMCasa (U/gss) 10,949 ± 0,276, y Fpasa (U/gss) 11,149 ± 0,523. Mientras que la actividad enzimática más alta fue β (1,3) glucanasas (U/gss) 20,873 ± 1,666.

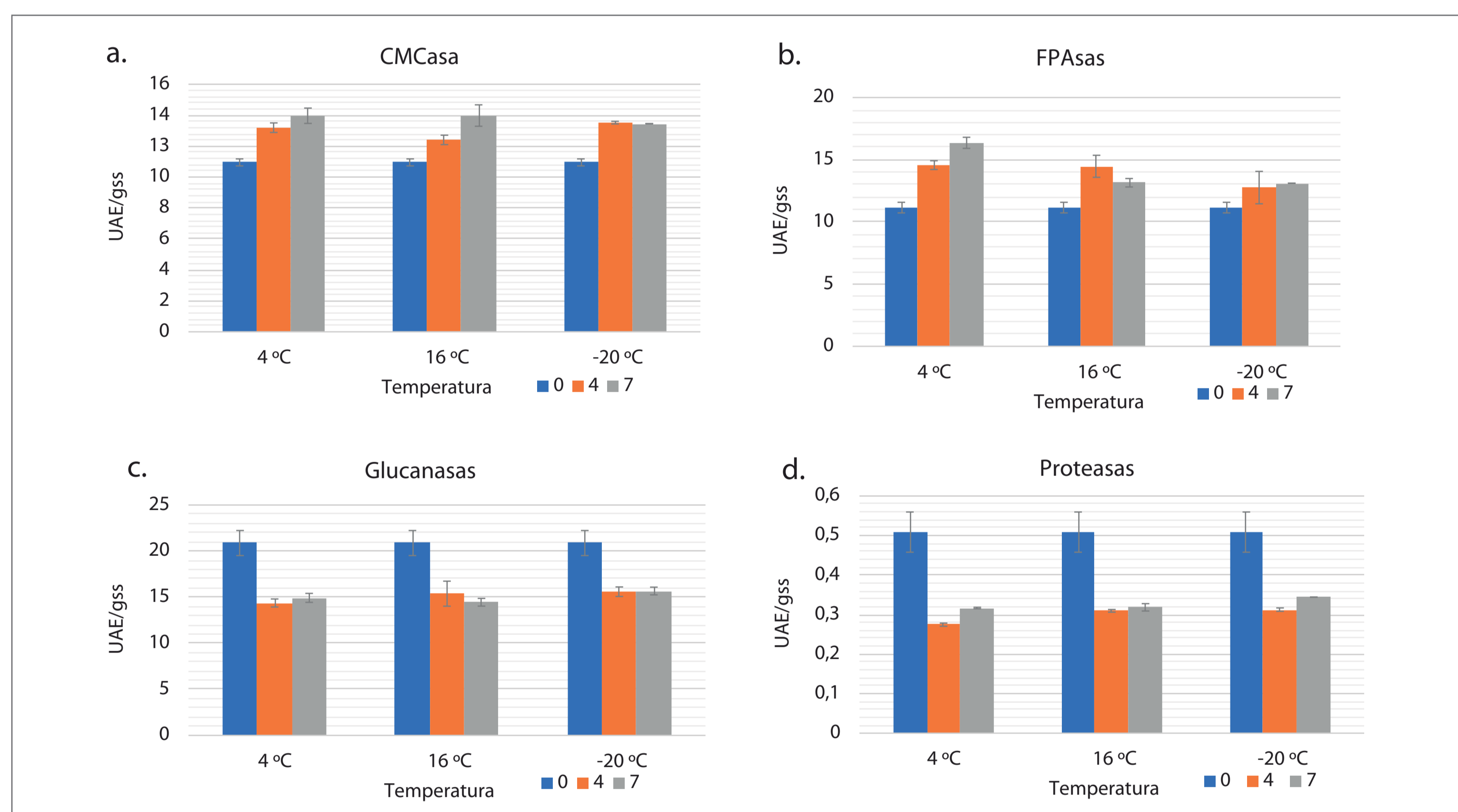


Figura 1. Evaluación del efecto de la conservación de los extractos enzimáticos a diferentes temperaturas y en el tiempo a los 0, 4, y 7 días. a. Celulasa por el método CMCasa. b. Celulasa por FPasa. c. β 1,3 -glucanasa. d. Proteasa. Los datos se presentan como el promedio de los experimentos por triplicado ± la desviación estándar.

Conclusiones

- Los resultados reportados en este estudio demuestran el potencial del hongo *T. koningiopsis* Th003 para producción de enzimas celulolíticas, abriendo la posibilidad de que estas enzimas se puedan usar como aditivos para mejorar la calidad de los ensilajes.
- Se encontró una baja producción de enzimas proteolíticas, esto podría favorecer la estabilización del concentrado crudo enzimático.
- Durante el proceso de almacenamiento, se observó un incremento en la actividad enzimática de CMCasa y Fpasa después de siete días de almacenamiento bajo las tres temperaturas evaluadas (figura 1a y 1b), debido posiblemente al uso del polisorbato Tween 80 en la solución de extracción.
- El extracto puede ser almacenado a temperatura ambiente reduciendo los gastos energéticos por refrigeración.

Referencias Bibliográficas

- Daguette, Yohann, Katarzyna Siegel, Véronique Edel-Hermann, and Christian Steinberg. 2014. "Fungal Proteins and Genes Associated with Biocontrol Mechanisms of Soil-Borne Pathogens: A Review." *Fungal Biology Reviews*.
- Herrera, Luisa. 2014. "Costos de Producción En Un Sistema de Ensilaje." Corporación Universitaria Lasallista.