

## Isolation, selection and characterization of cellulolytic fungi from cocoa (*Theobroma cacao* L) hull

### Aislamiento, selección y caracterización de hongos celulolíticos a partir de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L)

Ana L. Chafila<sup>1</sup>, Zoraya Rodríguez<sup>2</sup>, R. Boucourt<sup>2</sup>, J. Espín<sup>1</sup> and Lucia Silva<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad Estatal Amazónica, Puyo. Pastaza. Ecuador

<sup>2</sup>Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

<sup>3</sup>Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba. Ecuador

Email: achafila@uea.edu.ec

The objective of this study was to isolate, select and characterize fungi with cellulolytic capacity from fresh cocoa hulls, in order to use them as inoculum for solid fermentation of fiber residues. For taking the sampled fruits, the five points method was applied on cocoa crops (creole variety), belonging to the Center of Research and Postgraduate Courses (CIPCA, initials in Spanish) from the Universidad Estatal Amazónica, Ecuador. Samples were ground and exposed to three collection environments, with records of contamination due to microorganisms. For selecting isolates, growth in the medium, macroscopic characteristics, cellulolytic activity, measured by digestion halos and power index were considered. Out of 68 isolates, 21 strains were previously selected from the environment with the highest microbial culture diversity. Cluster analysis was applied to the characteristics of the selected colonies, as well as analysis of the obtained dendrogram, and four groups were formed. With help of taxonomical keys, nine strains of *Aspergillus*, seven of *Trichoderma*, four of *Chrysosporium* and one of *Fusarium* were identified. The 47.62% of the strains showed the highest degradation halo, which belonged to *Aspergillus* (5), *Chrysosporium* (3) and *Trichoderma* (2) genera. Strains A8 of *Aspergillus* and T1 of *Trichoderma* showed the highest power index (2.88 and 2.45 respectively), so they can be considered for their industrial use or as inocula in solid state fermentation, in order to obtain enzymes or animal feeding.

**Key words:** *degradation halo, power index, Aspergillus, Trichoderma*

Agriculture, agribusiness and industries of forestry, processing of pulp, paper and feed generate lots of residues, which are rich in lignin and cellulose and favor environmental pollution. These wastes represent losses due to the waste of matter that can be converted into several products with added values (Dashtban *et al.* 2010).

Ecuador is characterized by its great biodiversity, thanks to its geographical location and edaphoclimatic characteristics. Its economy is based on agriculture and livestock, mainly on cocoa production. In 2014, this production recorded an export of 235,000 metric tons (Castillo and Rosado 2016). Cocoa production experts have determined that this operation only uses 10 % of the weight of fresh fruit, because 90% are waste. Cocoa skin represents 75% of the total weight of harvested cobs (Barazarte *et al.* 2008). For this

El objetivo de este estudio fue aislar, seleccionar y caracterizar hongos con capacidad celulolítica a partir de cáscaras de cacao frescas, con el propósito de utilizarlos como inóculo en fermentación sólida de residuos fibrosos. Para la toma de los frutos muestreados, se aplicó el método cinco de oro en cultivos de cacao, variedad criollo, perteneciente al Centro de Investigación y Posgrado (CIPCA) de la Universidad Estatal Amazónica, Ecuador. Las muestras se molieron y expusieron a tres ambientes de colección, con historial de contaminación por microorganismos. En la selección de los aislados se consideró el crecimiento sobre el medio, características macroscópicas, microscópicas, actividad celulolítica medida por los halos de digestión y el índice de potencia. De 68 aislados, se preseleccionaron 21 cepas del ambiente con mayor diversidad de cultivos microbianos. A las características de las colonias seleccionadas se le aplicó análisis de conglomerados y del dendrograma obtenido y se conformaron cuatro grupos. Con ayuda de claves taxonómicas se identificaron nueve cepas pertenecientes al género *Aspergillus*, siete de *Trichoderma*, cuatro de *Chrysosporium* y un *Fusarium*. El 47.62% de las cepas presentaron los mayores HD, que se correspondieron con los géneros *Aspergillus* (5), *Chrysosporium* (3) *Trichoderma* (2). Las cepas A8 de *Aspergillus* y T1 de *Trichoderma* presentaron mayor índice de potencia (2.88 y 2.45 respectivamente), por lo que se podrían considerar para su empleo industrial o como inóculos en FES para la obtención de enzimas o alimento animal.

**Palabras clave:** *halo de degradación, Índice de potencia, Aspergillus, Trichoderma*

La agricultura, la agroindustria y las industrias forestal, de procesamiento de pulpa, papel y alimento generan gran cantidad de residuos ricos en lignina y celulosa que favorecen la contaminación ambiental. Estos desechos representan pérdidas por el desperdicio de materia que se puede convertir en varios productos con valor agregado (Dashtban *et al.* 2010).

Ecuador es un país que se caracteriza por su gran biodiversidad, gracias a su ubicación geográfica y peculiaridades edafoclimáticas. Basa su economía en el sector agropecuario, principalmente en la producción de cacao. Esta última en 2014 registró una exportación de 235 mil toneladas métricas (Castillo y Rosado 2016). Expertos en la producción cacaotera han determinado que en esta explotación solo se aprovecha 10 % del peso del fruto fresco, pues 90 % lo constituyen productos de desecho. La cáscara de cacao representa 75 % del peso

reason, it is necessary to optimize treatment systems for this type of waste (Arvanitoyannis and Varzakas 2008).

A use alternative with high potential is the biotechnological processing of cellulosic biomass by solid state fermentation (SSF), technology that allows to obtain human and animal feed (Chang 2007). Approximately 75-80 % of lignocellulosic residues can be degraded by the action of cellulases (Carvalho *et al.* 2013). However, hydrolytic activity of this enzyme complex is affected by physical and chemical factors, limiting the degradation of insoluble cellulose (Lee and Fan 1983).

For this reason, the search for microorganisms with better cellulolytic capabilities is very important because they could enable new biological sources for their use as products of high added value, such as enzymes for industrial purposes.

The objective of this research was to isolate, select and characterize native fungi strains from cocoa skin with high cellulolytic activity for their use as inoculum in SSF of fiber residues destined to the obtaining of enzymes or animal feed.

### Materials and Methods

*Collection of cocoa fruit.* Fruit collection was carried out at an experimental plot from the Center of Research and Postgraduate Courses (CIPCA, initials in Spanish), belonging to the Universidad Estatal Amazónica (UEA) in Ecuador. Fruits were selected through the five points method, proposed by Bautista *et al.* (2011). The minimum number of samples for an area of 5 ha was 12 fruits per each sampling point, with a total of 60 fruits. Mature and healthy fruits were selected, with mean weight of  $478.94 \text{ g} \pm 95$  per pod.

*Processing of cocoa hulls.* An amount of 20 cocoa fruit from the total obtained, was taken through a random sampling. These fruits were divided into the half with a vertical cut, seeds were removed and only the empty pods remained. The obtained subsamples were located for 15 d in three collection places: bromatology lab (BL), agribusiness lab (AL) and microbiology lab (ML). Average room temperature during the experiment was  $23 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $82 \pm 1.8 \%$  of relative humidity. These parameters were daily registered with a digital thermometer with calibrated hygrometer (Thomas USA brand).

*Preliminary selection and isolation of microorganisms.* Out of every collection place, samples that presented fungal growth in cacao hull were taken. They were ground at particle size from 0.5 to 1 cm, in a feed grinder (Trapp-TRF brand 80/Brazil), with a sieve of 12 mm. An amount of 10 g of sample were dissolved in 20 mL of a peptone solution at 0.1% (p/v). The solution was filtered with a sterile gaze. A milliliter of the filtered was taken and added 9 mL of a saline solution at 0.09 % to achieve

total de las mazorcas cosechadas (Barazarte *et al.* 2008). Por esta razón, es necesario que se optimicen sistemas de tratamiento para este tipo de residuos (Arvanitoyannis y Varzakas 2008).

Una alternativa de aprovechamiento con alto potencial es el procesamiento biotecnológico de biomasa celulósica por fermentación en estado sólido (FES), tecnología que permite obtener alimento humano y animal (Chang 2007). Aproximadamente 75-80 % de los residuos lignocelulósicos se pueden degradar por acción de las celulasas (Carvalho *et al.* 2013). Sin embargo, la actividad hidrolíticas de este complejo de enzimas se afecta por factores físicos y químicos que limitan la degradación de la celulosa insoluble (Lee y Fan 1983).

Por esta razón, es de gran importancia la búsqueda de microorganismos con mejores capacidades celulolíticas, que pondrían a disposición nuevas fuentes biológicas para su utilización como productos de alto valor agregado, como son las enzimas para fines industriales.

El objetivo de esta investigación fue aislar, seleccionar y caracterizar cepas fúngicas autóctonas de la cáscara de cacao con elevada actividad celulolítica para utilizarlas como inóculo en FES de residuos fibrosos destinados a la obtención de enzimas o alimento animal.

### Materiales y Métodos

*Recolección de frutos de cacao.* La recolección de los frutos se realizó en la parcela experimental del Centro de Investigación y Posgrado (CIPCA), perteneciente a la Universidad Estatal Amazónica (UEA) en Ecuador. Los frutos se seleccionaron mediante la técnica cinco de oro, propuesta por Bautista *et al.* (2011). El número mínimo de muestras para un área de 5 ha, fue de 12 frutos por cada punto de muestreo, con 60 frutos en total. Se seleccionaron frutos sanos y maduros, con peso promedio de  $478.94 \text{ g} \pm 95$  por mazorca.

*Procesamiento de las cáscaras de cacao.* Mediante un muestreo aleatorio se tomaron del total obtenido, 20 frutos de cacao. Se dividieron a la mitad con un corte vertical, se retiraron las semillas y quedaron únicamente las mazorcas vacías. Las submuestras obtenidas se colocaron durante 15 d en tres sitios de recolección: laboratorio de bromatología (LB), laboratorio agroindustrial (LA) y laboratorio de microbiología (LM). La temperatura ambiental promedio durante el experimento fue de  $23 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $82 \pm 1.8 \%$  de humedad relativa. Estos parámetros se registraron diariamente con termómetro digital con higrómetro calibrado (marca Thomas USA).

*Aislamiento y selección preliminar de los microorganismos.* De cada sitio de recolección se tomaron las muestras que presentaron crecimiento fúngico en las cáscaras de cacao. Se molieron a tamaño de partícula de 0.5 a 1 cm en una trituradora de alimentos (marca Trapp-TRF 80/Brasil) con tamiz de 12 mm. Se disolvieron 10 g de muestra en 20 mL de solución peptonada al 0.1 % (p/v). La solución se filtró mediante gasa estéril. Se tomó 1 mL del filtrado y se le adicionó 9 mL de solución salina al

a dilution of  $10^{-6}$  (Stanier *et al.* 1996). Each microbial suspension to be evaluated was inoculated on filter paper circles (Whatman No.1) of 0.5 cm, located in the center of Petri dishes, containing solid medium of malt extract agar at 2% (p/v), supplemented with yeast extract 0.4% (p/v) at pH 6. For each dilution, a dish without inoculation was left as control. Dishes were located in an incubator (MEMMERT brand, model INB 400) at 30 °C for eight days. For the selection of microorganisms, those with the highest number of isolates in the collection environment were considered. Isolates were purified by exhaustion in the same medium to which chloramphenicol at 1% was added to prevent bacterial growth. For conservation, they were cultivated in potato dextrose agar (PDA), in inclined tubes and kept at 4 °C. For their study, they were periodically cultivated and incubated at 28 °C.

#### *Selection and characterization of colonies.*

From the areas that presented decomposition, repetitions were conducted in PDA, supplemented with carboxymethyl cellulose (CMC at 1% p/v) under the same conditions of the previous isolation. For selection, the morphotypes of higher size and frequency in the selective medium of each environment were considered. The characterization of fungi strains was performed by macroscopic and microscopic analysis (MOTIC stereoscope microscope) with digital camera and coupled micrometers, so the group of qualitative (growth, color and shape of the colony, medium pigmentation, reverse color, texture, exudate fluid, colony shape, conidia and mycelium shapes) and quantitative variables (lineage length, vesicle width, phialides and conidia) were determined.

Evaluation of cellulolytic ability of isolates. Petri dishes were prepared with synthetic medium, with carboxymethyl cellulose (CMC) (10 g CMC, 0.5 g  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, KCl 0.5 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001 g  $\text{L}^{-1}$ ) as the only source of carbon (Waghmare *et al.* 2014). Three dishes per each isolation were cultivated. Dishes were incubated for three days and for the disclosure of degradation halos (DH), the superficial growth was covered with lactophenol blue solution of Merck. The evaluation of cellulolytic ability was categorized by DH intensity from 1 to 3, being 1 a less visible halo and 3 a very visible one (Pedroza *et al.* 2007). To establish the differences in the degradation activity, the analysis of comparison of proportions was used according to the COMPARPRO program (Font *et al.* 2007).

To determine the power index (PI), strains with DH equal to 3 were taken from each genera, and the relationship between degradation diameter and colony diameter was calculated (Valiño 1999). These diameters were measured with Vernier caliper (Suertek brand, sensitivity of  $\pm 0.02$  mm). *A. niger* was used as reference strain, from the UEA Microbiology laboratory. Strains

0.9 % hasta logra una dilución de  $10^{-6}$  (Stanier *et al.* 1996). Cada suspensión microbiana a evaluar se inoculó sobre círculos de papel filtro (Watman No. 1) de 0.5 cm, ubicados en la parte central de las cajas Petri, que contenían el medio sólido agar extracto de malta al 2 % (p/v), suplementado con extracto de levadura al 0.4 % (p/v) a pH 6. Para cada dilución, se dejó como control una caja sin inoculación. Las cajas se colocaron en una incubadora (marca MEMMERT, modelo INB 400) a 30 °C, durante ocho días. Para la selección de microorganismos se consideraron las que presentaron mayor número de aislados en el ambiente de recolección. Los aislados se purificaron por agotamiento en el mismo medio al que se le adicionó cloranfenicol al 1% para evitar el crecimiento de bacterias. Para su conservación, se sembraron en agar papa dextrosa (APD) en tubos inclinados y se mantuvieron a 4 °C. Para su estudio, se resembraron periódicamente y se incubaron a 28 °C.

*Selección y caracterización de las colonias.* De las áreas del papel que mostraron descomposición, se realizaron repiques en APD, suplementados con carboximetil celulosa (CMC al 1% p/v) en las mismas condiciones del aislamiento anterior. Para la selección, se consideraron los morfotipos de mayor tamaño y frecuencia en el medio selectivo de cada uno de los ambientes. La caracterización de las cepas fúngicas se realizó mediante análisis macroscópico y microscópico (microscopio estereoscopio MOTIC), con cámara digital y micrómetros acoplados, con lo que se determinó el conjunto de variables cualitativas (crecimiento, color y forma de la colonia, pigmentación del medio, color del reverso, textura, líquido exudado, forma de la colonia, pigmentación del medio, forma de conidios y micelio) y variables cuantitativas (longitud de estipe, anchura vesícula, fiálides y conidios).

Evaluación de la capacidad celulolítica de los aislamientos. Se prepararon cajas Petri con medio sintético, cuya única fuente de carbono es la Carboximetil celulosa (CMC) (CMC 10 g,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, KCl 0.5 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001 g  $\text{L}^{-1}$ ) (Waghmare *et al.* 2014). Se sembraron tres cajas por aislamiento. Las cajas se incubaron por tres días y para la revelación de los halos de degradación (HD) se cubrió el crecimiento superficial con solución de azul de lactofenol de la Merck. La evaluación de la capacidad celulolítica se categorizó mediante la intensidad del HD de 1 a 3, fue 1 un halo débilmente visible y 3 muy visible (Pedroza *et al.* 2007). Para establecer las diferencias en la actividad degradativa, se utilizó el análisis de comparación de proporciones según el programa COMPARPRO (Font *et al.* 2007).

Para la determinación del índice de potencia (IP), se tomaron de cada género las cepas con HD igual a 3, y se calculó según la relación entre el diámetro de degradación y el diámetro de la colonia (Valiño 1999). Estos se midieron con pie de rey Vernier (marca Suertek de sensibilidad de  $\pm 0.02$  mm). Se utilizó como cepa de referencia *A. niger*, procedente del laboratorio de Microbiología UEA. Se seleccionaron las cepas con



with  $PI > 2$  were selected.

**Statistical analysis.** Hierarchical cluster analysis was used for forming the groups with common characteristics, according to the linking method between groups with the measure of association cosine of vector angles (Torres 2015). The method of grouping from the Euclidian distance was used. To define groups, cut was made in 0.7. Statistical analyses for characterization were performed by IBM SPSS software (IBM Corporation 2013).

## Results and discussion

Microorganisms are spread into the surrounding medium, so to select the isolation places, characteristics that should be preserved in isolates must be taken into account (Alcarraz *et al.* 2010). In general, the more demanding is the medium, the more restricted is life diversity (Valiño 1999). Sometimes, when the characteristics of microorganism are used since the selection, some steps are saved during isolation (Guzman *et al.* 2015). For primary isolation of cellulolytic fungi, Ferrer *et al.* (2011) used a culture medium with crystalline cellulose as the only carbon source, in order to increase the number of candidates. Therefore, this study conducted the isolation in the raw material that should be transformed, and thus, the guarantee that isolates counted on enzymes or enzymatic complexes adapted to the substrate itself.

From primary isolation, 53 morphotypes of LB, 11 morphotypes of LA and 4 morphotypes for LM were obtained, indicating that selected environments actually had potential for contamination. Considering the highest number of present morphotypes, the LB was chosen for purification and 21 fungi isolates were obtained, with distinct characteristics (tables 1 and 2).

Cluster analysis was applied to the group of qualitative variables and figure 1 shows the resulting dendrogram. It was possible to combine four groups and the obtained genera were identified using taxonomic keys: nine strains of *Aspergillus* genus (LB8, LB14, LB41, LB22, LB50, LB36, LB18, LB26, LB42) with 42.86 %; seven of *Trichoderma* (LB2, LB16, LB25, LB30, LB3, LB40, LB49), which represented 33.33%; four of *Chrysosporium* (LB9, LB11, LB24, LB44) that represented 19.05 % and one of *Fusarium* (LB37) with 4.76 %.

Around 56 species of cellulose-producer filamentous fungi have been identified (Valiño 1999). From the collected material, it was possible to have a diverse and representative sample of *Aspergillus* and *Trichoderma* genera, referred to in the literature as important producers of cellulase enzymes (Hill *et al.* 2009, Llacza 2012).

Copetti *et al.* (2011), to study cocoa microbiota during drying and storage phase, observed fungal diversity in the collected samples. Among them, the most

IP  $> 2$ .

**Análisis estadístico.** Para la conformación del grupo con características comunes, se utilizó el análisis de conglomerados jerárquicos, según el método de vinculación entre grupos con la medida de asociación coseno del ángulo de vectores (Torres 2015). Se utilizó el método de agrupación a partir de la distancia euclidiana. Para definir los grupos, el corte se realizó en 0.7. Los análisis estadísticos para la caracterización se realizaron mediante el software IBM SPSS (IBM Corporation 2013).

## Resultados y discusión

Los microorganismos se encuentran difundidos en el medio circundante, por lo que para seleccionar los lugares de aislamiento se deben tener en cuenta las características que se desean preservar en los aislados (Alcarraz *et al.* 2010). En general, cuanto más exigente es el medio, más restringida es la diversidad de vida (Valiño 1999). En ocasiones, cuando se aprovechan las características del microorganismo desde la selección se ahorran pasos durante el aislamiento (Guzmán *et al.* 2015). Para el aislamiento primario de hongos celulolíticos, Ferrer *et al.* (2011) utilizaron un medio de cultivo cuya única fuente de carbono fue la celulosa cristalina, con el propósito de aumentar el número de candidatos. Por ello, en este estudio se realizó el aislamiento en la materia prima que se deseaba transformar, y así se garantizó que los aislados contaran con las enzimas o complejos enzimáticos adaptados al propio sustrato.

Del aislamiento primario, se obtuvieron 53 morfotipos del LB, seguidos del LA con 11 morfotipos y 4 morfotipos para el LM, lo que indica que los ambientes seleccionados realmente tenían potencial de contaminación. En consideración al mayor número de morfotipos presentes, se escogió el LB para la purificación y se obtuvo 21 aislados fúngicos en total, con características distintivas (tablas 1 y 2).

Al conjunto de variables cualitativas se le aplicó análisis de conglomerados y se obtuvo el dendrograma que se muestra en la figura 1. Se logró aunar cuatro grupos y con ayuda de claves taxonómicas se identificó los géneros obtenidos: nueve cepas pertenecientes al género *Aspergillus* (LB8, LB14, LB41, LB22, LB50, LB36, LB18, LB26, LB42) con 42.86 %; siete de *Trichoderma* (LB2, LB16, LB25, LB30, LB3, LB40, LB49) que representó 33.33 %; cuatro de *Chrysosporium* (LB9, LB11, LB24, LB44), que representó 19.05 % y uno de *Fusarium* (LB37) con 4.76 %.

Se han identificado aproximadamente 56 especies de hongos filamentosos productores de celulasas (Valiño 1999). A partir del material colectado, se logró contar con una muestra diversa y representativa de los géneros *Aspergillus* y *Trichoderma*, mencionadas en la literatura como importantes productores de enzimas celulasas (Colina *et al.* 2009, Llacza 2012).

Copetti *et al.* (2011), al estudiar la microbiota del cacao durante la fase de secado y el almacenamiento, observaron diversidad de hongos en las muestras

Table 1. Macroscopic characteristics of isolated colonies

Strain	Growth	Colony color	Reverse color	Texture	Exudate fluid	Colony shape	Medium pigmentation
LB2	fast	olive green	greenish yellow	floccose	without exudate	irregular round	light yellow
LB3	moderate	white	brown	spongy	without exudate	ring-shaped rounds	it is not observed
LB8	moderate	dark green	ocher	floccose	light yellow	irregular round	it is not observed
LB9	fast	olive green	greenish yellow	powdery	without exudate	irregular round	light yellow
LB11	fast	olive green	greenish yellow	powdery	transparente	irregular round	dark yellow
LB14	slow	dark green	coffee	velvety	light yellow	irregular oval	it is not observed
LB16	moderate	olive green	amarillo	floccose	without exudate	irregular round	light yellow
LB18	fast	dark green	ocher	velvety	light yellow	irregular oval	it is not observed
LB22	moderate	dark green	ocher	floccose	light yellow	irregular oval	it is not observed
LB24	moderate	olive green	greenish yellow	floccose	without exudate	irregular round	light yellow
LB25	moderate	white	brown	spongy	without exudate	ring-shaped rounds	it is not observed
LB26	slow	dark green	coffee	velvety	light yellow	irregular oval	it is not observed
LB30	moderate	white	brown	spongy	without exudate	ring-shaped rounds	it is not observed
LB36	moderate	dark green	ocher	floccose	light yellow	irregular oval	it is not observed
LB37	fast	olive green	greenish yellow	floccose	without exudate	irregular round	dark yellow
LB40	moderate	white	brown	spongy	without exudate	ring-shaped rounds	it is not observed
LB41	moderate	dark green	coffee	velvety	light yellow	irregular oval	it is not observed
LB42	moderate	dark green	ocher	wooly	light yellow	irregular oval	it is not observed
LB44	fast	white	amarillo	aterciopelado	without exudate	ellipsoidal	it is not observed
LB49	fast	olive green	greenish yellow	floccose	without exudate	irregular round	light yellow
LB50	moderate	dark green	coffee	wooly	light yellow	irregular oval	it is not observed

Table 2. Microscopic characteristics of isolated colonies

Strain	Lineage longitude (μm)	Vesicle wide (μm)	Phialide (μm)	Phialide (μm <sup>2</sup> )	Conidia (μm)	Conidia (μm <sup>2</sup> )	Conidia shape	Pigment	Mycelium
LB2	50	5	4.0x2.5	10.0	2.5x1.8	4.5	ovoids	light green	greenish white
LB3	50	10	1.0x2.0	2.0	3.5x2.2	7.7	anamorphic	ivory	white
LB8	250	30	6.0x4.0	24.0	2.0x3.0	6.0	balloon-shaped	greenish brown	yellowish
LB9	25	5	6.0x3.1	18.6	2.2x1.5	3.3	ovoids	light green	greenish white
LB11	25	5	5.0x2.8	14.0	3.2x2.4	7.7	ovoids	light green	greenish white
LB14	250	30	8.0x3.0	24.0	2.0x3.0	6.0	balloon-shaped	greenish brown	yellowish
LB16	75	5	5.0x2.8	14.0	3.5x2.2	7.7	ovoids	light green	greenish white
LB18	350	30	8.0x3.0	24.0	2.5x3.0	7.5	balloon-shaped	yellowish	white
LB22	320	30	6.0x2.0	12.0	2.5x3.0	7.5	balloon-shaped	yellowish	yellowish
LB24	30	15	7.0x3.6	25.2	2.3x1.8	4.1	ovoids	light green	greenish white
LB25	50	20	1.0x2.0	2.0	3.5x3.0	10.5	anamorphic	ivory	white
LB26	350	35	6.0x4.0	24.0	2.5x3.5	8.8	balloon-shaped	greenish brown	white
LB30	50	20	1.0x2.0	2.0	2.0x3.0	6.0	anamorphic	ivory	white
LB36	300	35	7.0x2.0	14.0	2.5x3.0	7.5	balloon-shaped	yellowish	yellowish
LB37	10	20	6.5x3.0	19.5	3.2x2.5	8.0	ovoids	light green	greenish white
LB40	30	20	1.0x2.0	2.0	3.5x3.0	10.5	anamorphic	ivory	white
LB41	350	35	10.0x4.0	40.0	2.5x3.5	8.8	balloon-shaped	greenish brown	yellowish
LB42	350	35	10.0x3.0	30.0	2.5x3.5	8.8	balloon-shaped	greenish brown	orange
LB44	20	10	12.0 x2.5	30.0	3.5x3.6	12.6	false heads	orange	beige
LB49	30	15	4.8x2.2	10.6	3.4x2.2	7.5	ovoids	light green	greenish white
LB50	350	35	8.0x3.0	18.0	2.5x3.5	8.8	balloon-shaped	colorless	white

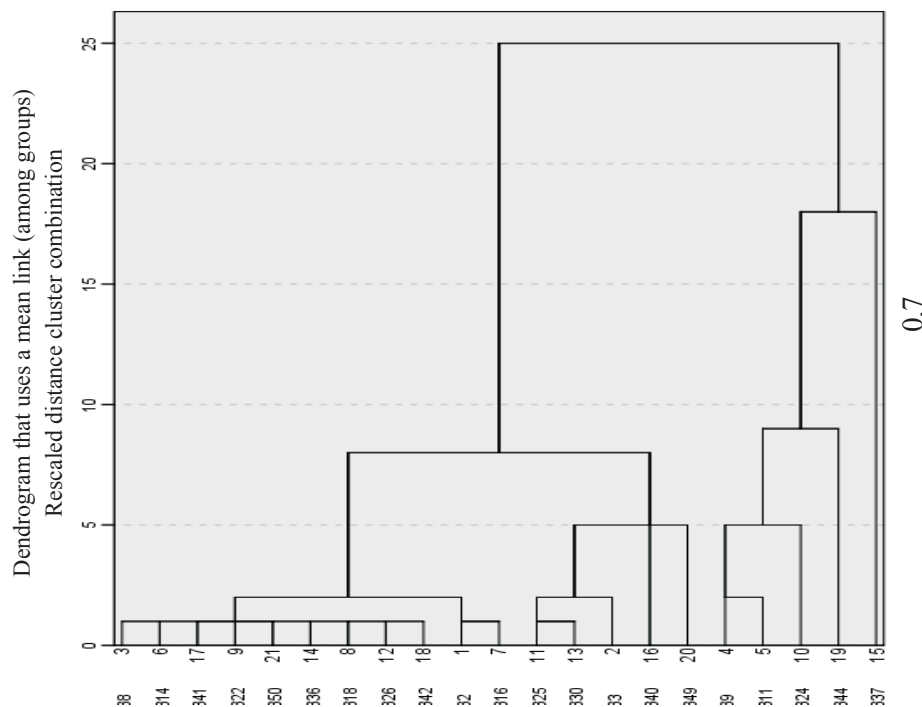


Figure 1. Cluster analysis of analyzed strains, based on a group of macroscopic and microscopic variables

frequent were: *Absidiacorymbiferanov*, *Penicillium* and *Aspergillus*, the latter reported as the most frequent in this research.

With respect to cellulolytic activity, performed to 21 isolated strains by determination of degradation halo (HD), although there were no significant differences ( $P > 0.05$ ) in the degrading activity, 10 strains (47.62 %) were obtained, which presented DH equals three. Out of these, *Aspergillus* genus showed the highest frequency (figure 2).

In the consulted literature, there were no results from degrading activity by this method in strains isolated from cocoa skin. However, Cruz *et al.* (2009) obtained 34.7% of the *Aspergillus* genus with DH equals three in isolates from agricultural residues. Ferrer *et al.* (2011) found only 10% of fungi, isolated from sugar cane bagasse, and showed good crystalline cellulose degradation, measured by methods as those used in this study. Several studies with fungi found that enzymatic activity depends heavily on the evaluated

recolectadas. Entre ellos, los de mayor frecuencia fueron: *Absidia corymbifera* nov., *Penicillium* y *Aspergillus*, este último informado como el de mayor frecuencia en esta investigación.

Con respecto a la actividad celulolítica realizada a las 21 cepas aisladas mediante la determinación del halo de degradación (HD), aunque no hubo diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre la actividad degradativa se obtuvieron 10 cepas (47.62 %) que presentaron HD igual a tres. De ellas, el género *Aspergillus* fue el que mostró mayor frecuencia (figura 2).

En la literatura consultada no se encontraron resultados de la actividad de degradación por este método en cepas aisladas de cáscara de cacao. Sin embargo, al analizar otras fuentes encontramos que Cruz *et al.* (2009) obtuvieron 34.7 % del género *Aspergillus* con HD igual a tres en aislados de residuos agrícola. Mientras que Ferrer *et al.* (2011) solo encontraron que 10 % de los hongos, aislados del bagazo de caña, presentaron buena degradación de la celulosa cristalina medida mediante métodos como los empleados en

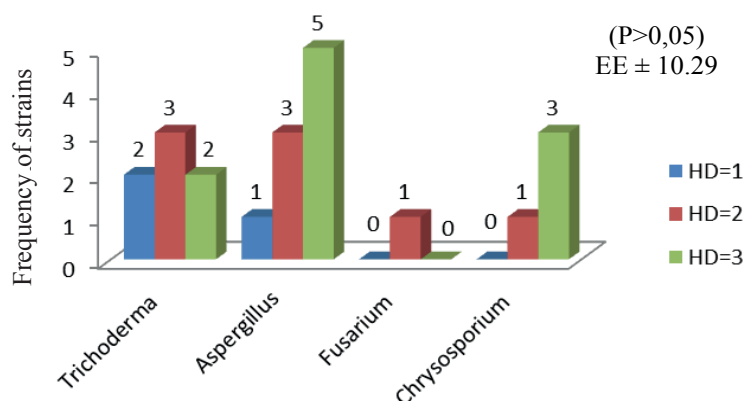


Figure 2. Degradation halo in strains of morphotypes isolated from cocoa hull

species and on factors like pH, temperature, nitrogen concentration and processes of inhibition by reaction products or the presence of proteases (Valiño 1999, Verlent *et al.* 2005).

Regarding PI values, table 3 shows that all evaluated strains with DH equal 3 presented PI values higher than those determined in the control strain. Out of them, T1 and A8 strains showed PI values higher than 2. This is an indicator of intense production of organic matter degrading cellulases, which colonize and hydrolyze these organic compounds very fast (Pérez *et al.* 2010).

Ferrer *et al.* (2011), after selecting five strains of fungi, isolated from sugar cane bagasse with degrading activity on crystalline cellulose, in which

este trabajo. En diferentes estudios realizados con hongos, se encontró que la actividad enzimática depende mucho de la especie evaluada y de factores como el pH, temperatura, concentración de nitrógeno y procesos de inhibición por productos de reacción o de la presencia de proteasas (Valiño 1999, Verlent *et al.* 2005).

Respecto a los valores de IP, en la tabla 3 se muestra que todas las cepas evaluadas con HD igual 3 presentaron IP mayores a los determinados en la cepa control. De ellas, las cepas T1 y A8 presentaron IP mayor que 2. Esto es un indicador de la intensa producción de celulasas degradadoras de la materia orgánica que colonizan e hidrolizan muy rápido estos compuestos orgánicos (Pérez *et al.* 2010).

Ferrer *et al.* (2011), al seleccionar cinco cepas

Table 3. Power index of strains with higher degradation halo of isolated fungi genera

Genera	Strain	Colony diameter ± SE, mm	Halo diameter ±SE, mm	Power index
Trichoderma	T1	8±1.5	19±0.46	2.45
	T4	11± 03	18±0.33	1.64
Aspergillus	A2	11±0.31	18±0.47	1.64
	A4	12±0.39	21±1.15	1.75
	A5	15±0.32	26±0.17	1.73
	A8	8±0.47	23±0.89	2.88
	A9	14±0.65	19±0.74	1.36
Fusarium	F1	21±0.83	26±0.21	1.24
Chrysosporium	C1	19±1.55	23±0.17	1.22
	C2	17±0.93	21±0.56	1.24
	C4	14±1.12	19±0.07	1.37
* <i>Aspergillus niger</i>	AN	26±1.3	31±0.83	1.19

\*Control strain

a similar rate to that of this study was calculated, found values inferior to the unit. However, the best diameters of cellulolytic activity found in this study were inferior to halos of 5 and 3 cm, which were produced by *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*, respectively, reported by Gutiérrez *et al.* (2012). They were also inferior to clearing zones of 7.5 cm for fungi from *Trichoderma* genus in studies of Ponce and Castillo (2011). However, due to the amount of factors that may affect the enzymatic activity, a better optimization of culture medium, supplemented with carbon and nitrogen sources and other surfactant substances, is required, besides adjusting the culture conditions to know the true cellulolytic potential of all the fungi found in all the different sampling sites.

An amount of 21 strains, with superior cellulolytic capacity to the reference strain, were isolated. A8 and T1 strains of *Aspergillus* and *Trichoderma* genera, respectively, showed power indexes superior to 2, indicating high cellulolytic capacity. These strains,

de hongos aislados de bagazo de caña con actividad degradadora sobre celulosa cristalina, en los que se calculó una razón similar a la de este estudio, encontraron valores inferiores a la unidad. Sin embargo, los mejores diámetros de actividad celulolítica encontrados en este trabajo fueron inferiores a los halos de 5 y 3 cm, que produjeron *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger*, respectivamente, informados por Gutiérrez *et al.* (2012). También resultaron inferiores a las zonas de aclaramiento de 7.5 cm para hongos del género *Trichoderma* en los trabajos de Ponce y Castillo (2011). Pero, por la cantidad de factores que pueden afectar la actividad enzimática, se requiere mayor optimización del medio de cultivo suplementado con fuentes de carbono y nitrógeno y sustancias surfactantes; además de ajustar las condiciones de cultivo para conocer el verdadero potencial celulolítico de la totalidad de hongos encontrados en los diferentes sitios de muestreo.

Se aislaron 21 cepas con capacidad celulolítica superior a la cepa de referencia. Las cepas A8 y T1 de los géneros *Aspergillus* y *Trichoderma* respectivamente,



native from cocoa skin, could be considered for its industrial use or as inocula in SSF to obtain enzymes or animal feed.

fueron las que presentaron índices de potencia superiores a 2, lo que indica elevada capacidad celulolítica. Estas cepas autóctonas de la cáscara de cacao, podrían considerarse para su empleo industrial o como inóculos en FES para la obtención de enzimas o alimento animal.

## References

- Alcarraz, C. M., Flores, P. A. & Godoy, A. J. de D. 2010. "Producción de celulasas por inmovilización celular para el tratamiento de efluentes industriales lignocelulósicos". *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica*, 13(26): 97–102, ISSN: 1682-3087.
- Arvanitoyannis, I. S. & Varzakas, T. H. 2008. "Vegetable Waste Treatment: Comparison and Critical Presentation of Methodologies". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(3): 205–247, ISSN: 1040-8398, 1549-7852, DOI: 10.1080/10408390701279798.
- Barazarte, H., Sangronis, E. & Unai, E. 2008. "La cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.): una posible fuente comercial de pectinas". *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 58(1): 64–68, ISSN: 0004-0622.
- Bautista, F., Palacio, J. L. & Delfin, H. 2011. *Técnicas de muestreo para manejadores de recursos naturales*. 2nd ed., México: Universidad Nacional Autónoma de México, 670 p., ISBN: 978-607-02-21297-9, Available: <[http://www.ciga.unam.mx/publicaciones/images/abook\\_file/tmuestreo.pdf](http://www.ciga.unam.mx/publicaciones/images/abook_file/tmuestreo.pdf)>, [Consulted: November 10, 2016].
- Carvalho, A. F. A., Neto, P. de O., da Silva, D. F. & Pastore, G. M. 2013. "Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis". *Food Research International*, 51(1): 75–85, ISSN: 0963-9969, DOI: 10.1016/j.foodres.2012.11.021.
- Castillo, C. & Rosado, C. 2016. Análisis de la exportación de cacao y elaborados periodo 2004-2015 y evaluación de estrategias que contribuyan al crecimiento del sector considerando el cambio de la matriz productiva. Graduated Thesis, Universidad Católica Santiago de Guayaquil, Ecuador, 119 p., Available: <<http://repositorio.ucsg.edu.ec/handle/3317/5226>>, [Consulted: November 10, 2016].
- Chang, S. T. 2007. "Mushroom cultivation using the ZERI principle: potential for application". *Micología Aplicada Internacional*, 19(2): 33–34, ISSN: 1534-2581.
- Colina, A., Ferrer, A. & Urribarri, L. 2009. "Cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 from different cellulosic substrates". *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia*, 32(2): 152–159, ISSN: 0254-0770.
- Copetti, M. V., Iamanaka, B. T., Pereira, J. L., Fungaro, M. H. & Taniwaki, M. H. 2011. "Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa". *International Journal of Food Microbiology*, 148(2): 141–144, ISSN: 0168-1605, DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.020.
- Cruz, N., Castellanos, D. & Argüello, H. 2009. "Degradación de celulosa y xilano por microorganismos aislados de dos tipos de compost de residuos agrícolas en la Sabana de Bogotá". *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 3(2): 237–249, ISSN: 2011-2173, DOI: 10.17584/rcch.2009v3i2.1215.
- Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T. A. & Qin, W. 2010. "Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin". *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1(1): 36–50, ISSN: 2152-4114.
- Ferrer, M. Y., León, R. M., Michelena, Á. G., Dustet, M. J. C., Duque, O. A., Ibañez, F. M. L. & Tortoló, C. K. 2011. "Selección de hongos aislados de bagazo de caña con actividad celulasa sobre celulosa cristalina para posibles aplicaciones industriales". *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 45(1): 3–12, ISSN: 0138-620.
- Font, H., Noda, A., Torres, V., Herrera, M., Lizazo, D., Sarduy, L. & Rodríguez, L. 2007. *Comparpro. version 1.0*, La Habana, Cuba: Instituto de Ciencia Animal, Departamento de Biomatemática.
- Gutiérrez, R. L. A., Pérez, B. J. A. & Uribe, M. A. 2012. "Evaluación *in vitro* de celulasas producidas por cepas nativas de *Trichoderma reesei*, *Cladosporium herbarum* y *Aspergillus niger*". *Journal of Agriculture and Animal Sciences*, 1(1): 7–15, ISSN: 2256-3342.
- Guzmán, C. Á. M., Zambrano, P. D. E., Rivera, F. R. D., Rondón, A. J., Laurencio, S. M. & Pérez, Q. M. 2015. "Aislamiento y selección de bacterias autóctonas de Manabí-Ecuador con actividad celulolítica". *Cultivos Tropicales*, 36(1): 7–16, ISSN: 0258-5936.
- IBM Corporation. 2013. *IBM SPSS Statistics. version 22*, [Windows], U.S: IBM Corporation, Available: <<http://www.ibm.com>>.
- Lee, Y. H. & Fan, L. T. 1983. "Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: (II). Analysis of extended hydrolysis times". *Biotechnology and Bioengineering*, 25(4): 939–966, ISSN: 1097-0290, DOI: 10.1002/bit.260250406.
- Llaza, H. 2012. Evaluación de la actividad celulolítica del complejo enzimático celulasa en cepas fúngicas de los departamentos de Cajamarca, Lima, Junín, Huánuco. Graduated Thesis, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú, 68 p.
- Pedroza, R. A. M., Matiz, V. A. & Quevedo, H. A. M. 2007. *Manual de Laboratorio de Procesos Biotecnológicos*. (ser. Apuntes), Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana, 9 p., ISBN: 97895876029, Available: <<http://catalogo.udes.edu.co/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=8486>>, [Consulted: November 4, 2016].
- Pérez, B. Y., Rebollido, R. R. & Martínez, S. J. 2010. "Aislamiento e identificación de hongos en compost elaborado a partir de residuos sólidos urbanos". *Agro Sur*, 38(1): 1–7, ISSN: 0304-8802, DOI: 10.4206/agrosur.2010.v38n1-01.
- Ponce, K. & Castillo, E. 2011. Aislamiento y caracterización morfológica y enzimo-funcional de hongos lignino-celulolíticos procedentes de la corteza de aliso (*Alnus acuminata*), Arrayán (*Myrciantheshallii*) y Pumamaqui (*Oreopanax heterophyllum*) presentes en las manchas del bosque nativo del Paschoa, bajo condiciones de laboratorio. Graduated Thesis, ESPE,

- Sangolquí, Ecuador, 73 p.
- Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L. & Painter, P. R. 1996. Microbiología. Villanueva, J. R. (ed.), Reverte, 776 p., ISBN: 978-84-291-1868-1, Available: <[https://books.google.com/cu/books/about/Microbiolog%C3%ADa.html?id=2u-6Q2XCMDgC&redir\\_esc=y](https://books.google.com/cu/books/about/Microbiolog%C3%ADa.html?id=2u-6Q2XCMDgC&redir_esc=y)>, [Consulted: November 4, 2016].
- Torres, V. 2015. "Aspectos estadísticos a considerar en el diseño, muestreo, procesamiento e interpretación de datos en la investigación de sistemas productivos agropecuarios". In: Vargas, B. J. C., Benítez, J. D., Bravo, C., Leonard, I., Pérez, M., Torres, V., Ríos, S. & Torres, A., Retos y posibilidades para una ganadería sostenible en la provincia Pastaza de la Amazonía Ecuatoriana, Puyo, Ecuador: Universidad Estatal Amazónica, pp. 83–108, ISBN: 978-9942-932-16-7, Available: <[https://www.researchgate.net/publication/295548677\\_Retos\\_y\\_posibilidades\\_para\\_una\\_ganaderia\\_sostenible\\_enla\\_provincia\\_de\\_Pastaza\\_de\\_la\\_Amazonia\\_Ecuatoriana](https://www.researchgate.net/publication/295548677_Retos_y_posibilidades_para_una_ganaderia_sostenible_enla_provincia_de_Pastaza_de_la_Amazonia_Ecuatoriana)>, [Consulted: November 4, 2016].
- Valiño, E. 1999. Fermentación en estado sólido del bagazo de caña de azúcar por hongos conidiales productores de celulasas. Ph.D. Thesis, Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba.
- Verlent, I., Smout, C., Duvetter, T., Hendrickx, M. E. & Van Loey, A. 2005. "Effect of temperature and pressure on the activity of purified tomato polygalacturonase in the presence of pectins with different patterns of methyl esterification". *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(3): 293–303, ISSN: 1466-8564, DOI: 10.1016/j.ifset.2005.02.003.
- Waghmare, P. R., Kshirsagar, S. D., Saratale, R. G., Govindwar, S. P. & Saratale, G. D. 2014. "Production and characterization of cellulolytic enzymes by isolated *Klebsiella* sp. PRW-1 using agricultural waste biomass". *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26(1): 44–59, ISSN: 2079-052X, 2079-0538, DOI: 10.9755/ejfa.v26i1.15296.

**Received: February 2, 2016**