



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIA FÍSICAS Y MATEMÁTICAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

FORMACIÓN DE UN COMPLEJO ENZIMÁTICO LIGNOCELULOLÍTICO A
PARTIR DE HONGOS DE PUDRICIÓN DE LA MADERA PARA HIDROLIZAR
PAJA DE TRIGO

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS DE LA
INGENIERÍA, MENCIÓN QUÍMICA

MEDARDO ANIBAL ZAMBRANO ARCENTALES

PROFESORA GUÍA:

ORIANA SALAZAR AGUIRRE

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:

JUAN ASENJO DE LEUZE
MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS
RENÉ CARMONA CERDA

Este trabajo ha sido financiado por una beca de maestría de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) de la República de Ecuador y por el proyecto FONDECYT 1121088 de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) de la República de Chile.

SANTIAGO DE CHILE

2017

RESUMEN DE LA TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE:

Magíster en Ciencias de la Ingeniería, mención Química

POR: Medardo Anibal Zambrano Arcentales

FECHA: 27 de marzo de 2017

PROFESORA GUÍA: Oriana Salazar Aguirre

FORMACIÓN DE UN COMPLEJO ENZIMÁTICO LIGNOCELULOLÍTICO A PARTIR DE HONGOS DE PUDRICIÓN DE LA MADERA PARA HIDROLIZAR PAJA DE TRIGO

La producción de azúcares desde lignocelulosa para producir biocombustibles y otros productos de valor, ha sido un desafío de los últimos tiempos. Debido a la estructura recalcitrante del material lignocelulósico, su degradación demanda gran cantidad de enzimas, lo que encarece el proceso. Uno de los métodos más económicos estudiados consiste en usar extractos enzimáticos crudos. Estos extractos pueden obtenerse cultivando, en medio líquido, hongos de pudrición de la madera y luego utilizar el sobrenadante en una reacción de hidrólisis de lignocelulosa. Sin embargo, para estos hongos, los rendimientos han sido bajos, por debajo del 20%.

Con el objetivo de mejorar esos rendimientos desde los hongos de pudrición de la madera *Gloeophyllum trabeum*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor*, se evaluaron dos estrategias para la obtención de enzimas, en donde se utilizaron extractos extracelulares crudos (EEC) con los cuales hidrolizar paja de trigo pretratada (PTP). Una estrategia consistió en cultivar los hongos individualmente y de cada cultivo obtener un EEC. Estos EEC se mezclaron en proporciones 5:2, 1:1 y 2:5 para ser usados en las hidrólisis de PTP. En la segunda estrategia se cultivó más de un hongo en el mismo medio, y de cada uno de estos co-cultivos se obtuvo un EEC que se usó en hidrólisis de PTP.

Los resultados mostraron que los cultivos y co-cultivos con *P. chrysosporium* tuvieron muy baja producción de enzimas, alrededor de 20 veces menos, comparado con los otros hongos, por lo que se trabajó con EECs de *G. trabeum*, *T. versicolor* y con EEC del co-cultivo de estos. Los resultados de la hidrólisis de PTP mostraron que al mezclar los EEC de los hongos se produce un incremento en la producción de glucosa en comparación con la producción por los EEC en reacciones individuales. Según el análisis de actividad enzimática de los EEC se observó sinergia entre enzimas de ambos extractos. Se postula que esta sinergia es debido a un enriquecimiento enzimático o complementariedad funcional entre enzimas, ya que el EEC de un hongo presenta alta actividad enzimática donde el EEC de otro hongo presenta baja. Con respecto al co-cultivo se observó incremento en la producción de glucosa, posiblemente debido a la presencia de proteínas auxiliares que se habrían expresado en mayor cantidad en el co-cultivo.

Se concluye que existe sinergia al mezclar los EEC de *G. trabeum* y *T. versicolor* para hidrolizar PTP y que se puede obtener un EEC mejorado desde un co-cultivo de estos hongos, siendo este último más ventajoso por su facilidad de obtención. Con respecto a los rendimientos de conversión a azúcares, éstos son relativamente bajos (14%) en comparación con la literatura (entre 36% y 74%) por lo que se recomienda optimizar los medios de cultivo, modificando su composición, hacia un máximo de producción de enzimas.

DEDICATORIA

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

Presento mis agradecimientos a las personas e instituciones en el orden en que fueron apareciendo en este proyecto académico:

A mis padres por el apoyo y los ánimos para iniciar y continuar en el postgrado.

Al Gobierno de la República de Ecuador que, a través de la Senescyt, impulsó el mayor programa de becas en la historia ecuatoriana.

Al profesor Juan Asenjo que facilitó mi postulación a la maestría y estuvo atento a mis progresos académicos.

A Diego Lagos que desde el primer día de clases estuvo despejando mis dudas y fue un gran apoyo en varios ramos.

A la profesora Oriana Salazar que tuvo la dedicación y paciencia de guiarme en el laboratorio y en el desarrollo de la investigación.

A los compañeros del CeBiB que siempre me ayudaron de la mejor manera.

A todos los amigos que conocí en Chile que hicieron mi estadía muy amena.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes generales.....	1
1.2. MARCO TEÓRICO.....	2
1.2.1. Lignocelulosa.....	2
1.2.2. Aprovechamiento de lignocelulosa.....	2
1.2.3. Pretratamiento físico y químico.....	5
1.2.4. Hongos de pudrición de la madera y sus enzimas.....	6
1.2.5. Extractos enzimáticos crudos.....	9
1.3. Justificación y motivación.....	12
1.1. OBJETIVOS.....	13
1.1.1. Objetivo general.....	13
1.1.2. Objetivos específicos.....	13
2. MATERIALES Y MÉTODOS	14
2.1. Pretratamiento físico y químico de la paja de trigo.....	14
2.2. Determinación de la composición de la paja de trigo.....	14
2.3. Preparación de los inóculos y condiciones de los cultivos para producción de enzimas.....	15
2.3.1. Co-cultivos en agar PDA.....	16
2.3.2. Obtención de los extractos enzimáticos crudos.....	16
2.4. Cuantificación de proteínas.....	16
2.5. Determinación de las actividades celulolíticas, xilanolíticas y ligninolíticas de los extractos enzimáticos crudos.....	17
2.6. Hidrólisis de paja de trigo y cálculo de los efectos sinérgicos.....	18
2.7. Análisis estadísticos.....	18
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
3.1. Composición de la paja de trigo utilizada en los ensayos.....	19
3.2. Análisis de la producción de enzimas.....	20
3.2.1. Producción de enzimas desde cultivos individuales.....	20
3.2.2. Producción de enzimas desde co-cultivos.....	22
3.3. Análisis de la actividad celulolítica, ligninolítica y xilanolítica de los extractos enzimáticos crudos.....	24
3.4. Hidrólisis de paja de trigo.....	26
3.4.1. Comparación de los rendimientos con otros trabajos reportados....	30
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	33
4.1. Conclusiones.....	33
4.2. Recomendaciones.....	34

BIBLIOGRAFÍA	35
ANEXOS	40
A. ANEXOS DE LOS MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
a. Curvas estándar de los kits de glucosa y xilosa.....	41
b. Curvas estándar de concentración de proteínas con el reactivo de Bradford.	42
c. Curvas estándar de concentración de azúcares reductores para distintas actividades enzimáticas.	43
d. Cálculos en la preparación del inóculo para los cultivos de producción de enzimas.	44
B. ANEXOS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
a. Tendencia de liberación de azúcares en las hidrólisis de PTP.	45
b. Análisis estadístico en los experimentos de hidrólisis de paja de trigo pretratada.....	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Peso perdido y degradación de rastrojo de maíz tratado con enzimas lignocelulolíticas crudas por 72 h.	10
Tabla 2.1. Composición de los medios de cultivo.....	15
Tabla 3.1. Composición de la paja de trigo.....	20
Tabla 3.2. Comparación de los rendimientos de la hidrólisis de este trabajo con resultados de la literatura	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estructura de la lignocelulosa.....	2
Figura 1.2. Ciclo cerrado de CO ₂ en la producción y uso de biocombustibles.....	4
Figura 1.3. Glipolímeros en diferentes arquitecturas.....	5
Figura 1.4. Pretratamiento químico de lignocelulosa.....	6
Figura 1.5. Hidrólisis de lignocelulosa.	7
Figura 1.6. Producción de azúcares por combinación de extractos enzimáticos. ..	9
Figura 3.1 Resumen del proceso de obtención y uso de las enzimas de cada cultivo.	19
Figura 3.2 . Seguimiento de la producción de CMCasas por los hongos en cultivos individuales en medio líquido.....	21
Figura 3.3. Seguimiento de la producción de proteínas por los hongos en cultivos individuales en medio líquido.....	21
Figura 3.4. Seguimiento de la producción de enzimas MnP por los hongos en cultivos individuales en medio líquido.	22
Figura 3.5. Co-cultivos de hongos en agar PDA.....	23
Figura 3.6. Seguimiento de la producción de CMCasas por los hongos en co-cultivos en medio líquido.	24
Figura 3.7. Perfiles de actividad enzimática específica.	25
Figura 3.8. Perfiles de actividad enzimática relativa.	26
Figura 3.9. Conversión a glucosa en la hidrólisis de paja de trigo al 2% en 1 ml con 7 µg/ml (A) y 36 µg/ml (B) de carga enzimática.	27
Figura 3.10. Porcentaje de sinergia o antagonismo en la hidrólisis.	28
Figura 3.11. Conversión a azúcares reductores en la hidrólisis de paja de trigo al 2% en 1 ml con 7 µg/ml (A) y 36 µg/ml (B) de carga enzimática.....	29
Figura 3.12. Porcentajes de conversión a las 96 horas.....	30

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes generales

La producción de azúcares desde lignocelulosa para producir biocombustibles y otros productos de valor ha sido un desafío debido a lo recalcitrante de su estructura, en donde la celulosa se encuentra protegida por hemicelulosa y lignina (Lee et al 2014) en una red compleja. La estrategia consiste en pretratar, por medios físicos, químicos o biológicos, la lignocelulosa para disminuir el contenido de lignina y posteriormente usar enzimas capaces de hacerse paso a través de la protección residual y convertir la celulosa en glucosa. Sin embargo, las enzimas necesarias son caras ya que se requiere mucha cantidad para degradar la lignocelulosa (Jiang et al., 2016; Saini et al., 2016).

Uno de los métodos más económicos estudiados para la producción de estas enzimas consiste en usar extractos enzimáticos crudos. Estos extractos pueden obtenerse cultivando en medio líquido hongos de pudrición de la madera y luego utilizar las enzimas del sobrenadante en una reacción de hidrólisis de lignocelulosa (Saini et al., 2016). Sin embargo, para ciertos hongos, los rendimientos han sido relativamente bajos obteniéndose hasta 6,7 g de etanol por 100 g de lignocelulosa, correspondientes aproximadamente al 16% (Vincent et al., 2014). Por lo que se ha estudiado, por un lado, mejorar los rendimientos combinando extractos enzimáticos de hongos cuyas capacidades enzimáticas se complementen y, por otro lado, obteniendo nuevos extractos enzimáticos desde co-cultivos de estos hongos (Brink et al., 2014; Ma & Ruan, 2015).

Gloeophyllum trabeum, *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* son hongos de pudrición de la madera ampliamente estudiados debido a las enzimas que producen (Rasmussen et al., 2010, Xavier et al., 2007, Zhang et al., 2012). El primero es capaz de degradar hemicelulosa y celulosa mientras que los otros dos capaces de degradar lignina y celulosa. Esta tesis se orienta a evaluar sus capacidades enzimáticas con el objetivo de mejorar la producción de azúcares desde paja de trigo pretratada.

1.2. MARCO TEÓRICO

1.2.1. Lignocelulosa

La lignocelulosa es una estructura compuesta principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina, y a veces cantidades pequeñas de pectina (Lee et al., 2014). La celulosa es un polisacárido formado por moléculas de glucosa ocupando aproximadamente un 50% del peso de la lignocelulosa. La hemicelulosa ocupa un 25-30% del peso de la lignocelulosa, es un heteropolisacárido que a diferencia de la celulosa presenta ramificaciones en su cadena principal de xilano, este último está formado por moléculas de xilosa y corresponde al 70% de la hemicelulosa. Finalmente, la lignina es una estructura de compuestos aromáticos y azúcares que le brinda rigidez a la pared celular de las plantas, es insoluble y representa entre un 20-30% del peso de la lignocelulosa (Quiroz-Castañeda & Folch-Mallol, 2011).

Su estructura tridimensional no ha sido completamente dilucidada, pero se han propuesto varios modelos en donde las moléculas de celulosa están protegidas por cadenas de hemicelulosa unidas a su vez a cadenas de lignina (Lee et al., 2014) (Figura 1.1). Contiene una cantidad importante de azúcares fermentables, pero para acceder a ellos es necesario debilitar la estructura que la protege.

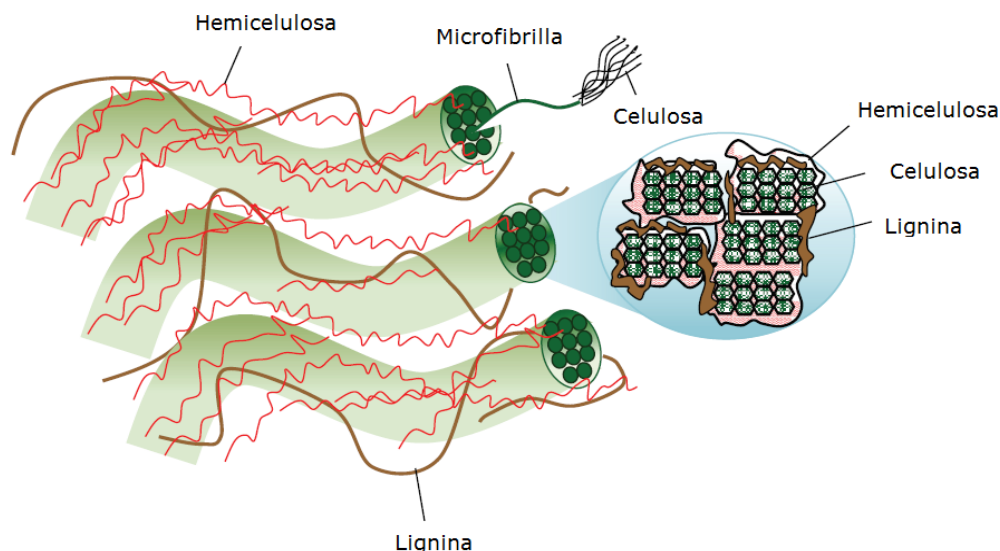


Figura 1.1. Estructura de la lignocelulosa.

Estructura de la pared celular y microfibrillas en la sección transversal; hebras de moléculas de celulosa incrustadas en una matriz de hemicelulosa y lignina (Modificado de Lee et al., 2014).

El objetivo de la lignocelulosa es la de dar soporte a la planta además de protegerla de los depredadores, sin embargo, existen organismos que han desarrollado mecanismos enzimáticos para acceder a los azúcares contenidos en esta estructura (Quiroz-Castañeda & Folch-Mallol, 2011).

1.2.2. Aprovechamiento de lignocelulosa

La biomasa vegetal lignocelulósica ha sido descrita como el mayor recurso renovable para ser explotado en biorrefinería debido a sus componentes

(Suwannarangsee et al., 2012). En promedio contiene un 60% de carbohidratos, que pueden ser convertidos en azúcares, y un 20% de lignina, el mayor recurso renovable de compuestos aromáticos (Isikgor & Remzi, 2015). El interés principal está en aprovechar los residuos lignocelulósicos provenientes de la agricultura y la actividad forestal ya que son materia prima prácticamente gratuita para la generación de productos con valor agregado. Entre las principales aplicaciones, para el uso de los carbohidratos lignocelulósicos, están la producción de biocombustibles, fuente de carbono en procesos de fermentación y alimentación de animales, desarrollo de nuevos fármacos, entre otros.

1.2.2.1. *Producción de biocombustibles de segunda generación*

Luego de varios años de estudios acerca del comportamiento climatológico del planeta, se llegó al consenso de que éste se está calentando más rápido de lo normal por causas antropogénicas. La revolución industrial y agropecuaria está generando gases de efecto invernadero que traen como resultado que el planeta retenga más calor que antes (IPCC, 2013). Esto motivó a los representantes de la mayoría de los países a comprometerse a disminuir estas emisiones en un convenio conocido como el Protocolo de Kioto (CMNUCC, 1998).

Entre las emisiones de gases de efecto invernadero que se propone disminuir en el Protocolo de Kioto, está el dióxido de carbono generado principalmente por la combustión de combustibles fósiles usados para generar energía. Para disminuir la generación de este gas se empezó a usar combustibles de origen vegetal que tienen un ciclo cerrado de dióxido de carbono; la energía solar es usada por las plantas para captar el dióxido de carbono del entorno y producir frutos que serán convertidos en combustibles que al quemarse liberan energía y dióxido de carbono (Figura 1.2).

Sin embargo, esta estrategia se ha criticado por uso de tierras cultivables con fines alimenticios para obtener combustibles, además que la producción de combustibles de origen vegetal sigue siendo más cara que la obtención de combustibles fósiles. Esto ha motivado la investigación para obtener biocombustibles de otras fuentes como los residuos vegetales de la agricultura como cascarilla de arroz, paja de trigo, residuos de maíz, entre otros (Sun & Cheng, 2002). Estos residuos contienen azúcares en forma de celulosa que pueden ser convertidos a etanol. Para eso es necesario pretratar la biomasa para eliminar parte de la hemicelulosa y lignina de manera que la celulosa quede expuesta facilitando el acceso a enzimas capaces de descomponer la celulosa en los azúcares que la conforman.

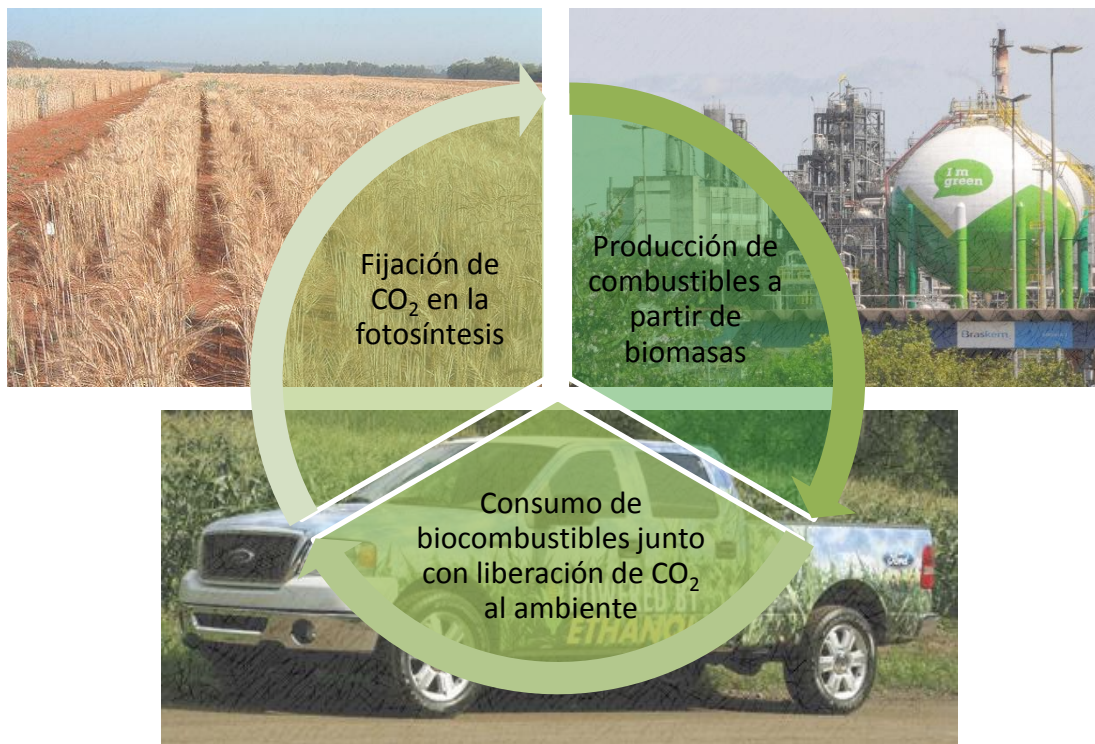


Figura 1.2. Ciclo cerrado de CO₂ en la producción y uso de biocombustibles.
 (Imágenes tomadas de varias páginas web; cultivo, www.elclarin.cl/web/index.php?option=com_content&view=article&id=3583; planta, www.ethanolproducer.com/articles/8617/feeding-the-chemical-market; camioneta, prosandconsbiomassenergy.org/tag/e85-fuel/)

1.2.2.2. Fuente de carbono

Los azúcares obtenidos desde los residuos lignocelulósicos pueden ser utilizados como fuente de carbono en fermentaciones industriales de microorganismos que producen de antibióticos, aminoácidos, enzimas y productos químicos a granel como el bioetanol (Fortes et al., 2010; Isikgor & Remzi, 2015).

Otro uso de los residuos de la agricultura ha sido el de alimentar a animales rumiantes debido a la ventaja económica que representa. Sin embargo, se han presentado problemas relacionados con la palatabilidad, es decir, poca apetencia del ganado por consumir estos residuos. Además, menos del 50% de esta biomasa es digerida por estos animales (Cunningham & Harris, 1969; Alborés et al., 2006). Esto ha motivado investigaciones sobre tratamientos enzimáticos y biológicos para predigerir los residuos lignocelulósicos logrando facilitar el aprovechamiento de estos residuos como alimento al incrementar la digestibilidad hasta un 61% y aumentando el contenido de proteínas en 200% (Villas-Bôas et al., 2002).

1.2.2.3. Desarrollo de nuevos fármacos

Los azúcares obtenidos desde lignocelulosa, como glucosa y xilosa, pueden ser incorporados a un esqueleto de un polímero convirtiéndose en un glicopolímero. Este tipo de polímeros han ganado especial atención desde el punto de vista terapéutico ya que prometen imitar la función o estructura de las glicoproteínas. Se han desarrollado varios tipos de arquitecturas de glicopolímeros (ver Figura

1.3) con el objetivo de diseñar nuevos fármacos relacionados con el combate de enfermedades como el VIH y el Alzheimer (Isikgor & Remzi, 2015; Becer, 2012).



Figura 1.3. Glipolímeros en diferentes arquitecturas.
(Modificado de Becer, 2012).

En los ejemplos mostrados existe una etapa en común y, en muchos casos, el cuello de botella para hacer económicamente poco viable el uso de los carbohidratos lignocelulósicos es la hidrólisis enzimática. Esto es debido a lo recalcitrante de la estructura de la lignocelulosa. Esta característica, atribuida principalmente a la lignina, impide el libre acceso de las enzimas capaces de convertir los carbohidratos en azúcares. Por lo tanto, es necesario utilizar una mayor carga enzimática encareciéndose de esta manera el proceso.

Para hacer más económica esta etapa se busca obtener enzimas con alta actividad, es decir, con alta capacidad para convertir la celulosa y hemicelulosa en azúcares útiles para los procesos descritos.

Se han propuesto e investigado distintas estrategias para la obtención de enzimas provenientes de microorganismos, que en la naturaleza se alimentan de lignocelulosa, como los hongos. Entre estas estrategias están el mejoramiento genético de las cepas fúngicas, combinación de enzimas producidos por distintas cepas, producción de enzimas recombinantes, co-cultivo de cepas fúngicas para producir un nuevo conjunto de enzimas, reciclaje de enzimas y/o combinaciones de estas estrategias (Saini et al., 2016). La combinación de enzimas de distintas cepas y la obtención de enzimas desde co-cultivos son las estrategias más económicas y se han observado resultados prometedores (Kolasa et al., 2014; Rana et al., 2014; Saini et al., 2016).

1.2.3. Pretratamiento físico y químico

Con el objetivo de facilitar el acceso de las enzimas a la lignocelulosa, se expone a ésta a un pretratamiento físico en donde se disminuye el tamaño de la biomasa, moliendo o cortando en pequeños pedazos, para aumentar el área de contacto. A continuación, esta biomasa es tratada con productos químicos capaces de disolver la lignina y parte de la hemicelulosa dejando así más expuesta (o menos protegida) la celulosa (Figura 1.4) (Lee et al., 2014). Finalmente, la celulosa ya menos

protegida y con mayor área de contacto es expuesta a una hidrólisis enzimática para obtener azúcares fermentables (Szczo drak, 1987).

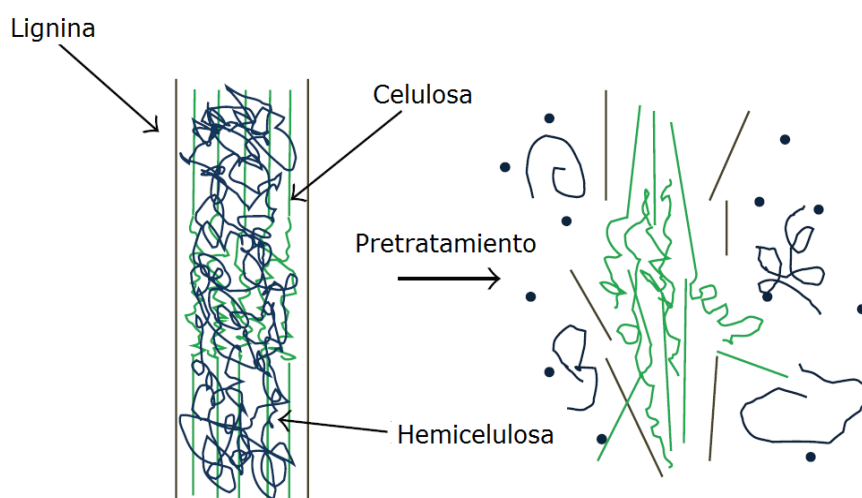


Figura 1.4. Pretratamiento químico de lignocelulosa. Es utilizado para la deconstrucción de lignocelulosa exponiendo la celulosa al remover parte de la hemicelulosa y lignina (Modificado de Lee 2014).

1.2.4. Hongos de pudrición de la madera y sus enzimas

De los organismos que han desarrollado mecanismos para acceder a la celulosa de la lignocelulosa, se ha prestado atención a los hongos de pudrición de la madera. Estos hongos crecen adheridos a restos vegetales en donde secretan enzimas que catalizan la degradación de la biomasa (Hatakka & Hammel, 2010). Entre las principales enzimas involucradas están:

Celulasas. – Son enzimas que catalizan la conversión de la celulosa en glucosa y se dividen tradicionalmente en tres clases: celobiohidrolasas que, una vez unidas al sustrato, por un módulo de unión a carbohidratos, se mueven a lo largo de la cadena de glucosa liberando celobiosa; endoglucanasas que hidrolizan enlaces internos de la cadena de celulosa dejando extremos libres como resultado; y β -glucosidasas que hidrolizan moléculas de celobiosa convirtiéndolas en glucosa. Estas enzimas, en conjunto, trabajan sinérgicamente en la hidrólisis de celulosa (Jorgensen et al., 2007; Martínez-Anaya et al., 2008).

Xilanasas. – Son enzimas que catalizan la conversión del xilano de la hemicelulosa en xilosas, lo cual deja más expuesta la celulosa para ser degradada por celulasas. Se ha observado el efecto sinérgico de las xilanasas en hidrólisis de lignocelulosa (Hu et al., 2011).

Enzimas ligninolíticas. – Son enzimas con capacidad de catalizar la degradación de la lignina o componentes de su estructura. Entre las más estudiadas están las lignino peroxidadas, manganeso peroxidadas y lacasas (Hatakka & Hammel 2010; Christopher et al., 2014).

Proteínas auxiliares. – Este tipo de proteínas, algunas sin actividad enzimática aparente, han mostrado mejorar la hidrólisis de celulosa

(Arantes & Saddler 2010; Dimarogona et al., 2012). Aquí se encuentran proteínas del tipo expansina que expanden los espacios entre cadenas de celulosa facilitando el acceso de enzimas hidrolíticas. También se encuentran enzimas como las mono oxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO) que oxidan carbonos de la celulosa dejando extremos libres (Dimarogona et al., 2012).

La acción de estas enzimas puede verse impedida o limitada por la presencia de hemicelulosa y lignina (Figura 1.5) que impiden el acceso a la celulosa por lo que es necesario la presencia de enzimas auxiliares que faciliten la hidrólisis (Jorgensen et al., 2007). Las xilanasas, que degradan parte de la hemicelulosa, y ligninasas, como la lacasa que degrada parte de la lignina, son algunas de las enzimas auxiliares.

Este proceso de hidrólisis también está en función de otros factores en el medio reaccionante como la concentración de sustrato y enzimas, el tipo de sustrato, las proporciones de las enzimas, estabilidad de las enzimas, temperatura, pH, agitación, entre otros. Esto ha llevado a gran cantidad de estudios en busca de la mejor combinación de estos factores, así como la comprensión de los resultados para diseñar nuevos experimentos (Pal & Chakraborty, 2013). El objetivo principal es lograr un proceso de obtención de azúcares fermentables a etanol económicamente viable.

Los tipos de enzimas mencionadas son secretadas en mayor o menor proporción según el tipo de hongo o si es de pudrición parda o pudrición blanca.

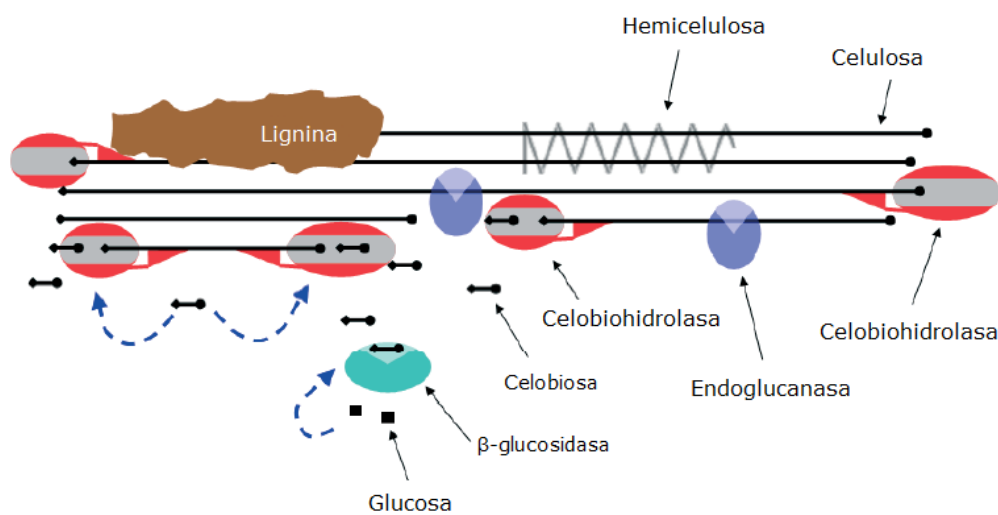


Figura 1.5. Hidrólisis de lignocelulosa. Se observa la representación de la acción sinérgica de las enzimas (modificado de Jorgensen et al., 2007).

A continuación, se mencionan tres hongos de pudrición de la madera ampliamente estudiados.

1.2.4.1. *Gloephyllum trabeum*

Es un hongo de pudrición parda. El conjunto de enzimas que produce es rico en celulasas, xilanasas y enzimas auxiliares pero carente de ligninasas, es decir, descompone la lignina en una mínima proporción, dejando un color oscuro en la madera que degrada (Hatakka & Hammel, 2010; Cotoras & Agosin, 1992). Además, se ha reportado que produce peróxido de hidrógeno y ácido oxálico que reaccionan con los iones de hierro presentes en la lignocelulosa produciendo radicales hidroxilos mediante una reacción de Fenton (Calonego et al., 2013). Esta actividad aumenta la porosidad de la pared celular vegetal permitiendo el acceso de celulasas acelerando la descomposición de la madera.

Ha sido muy estudiado por su actividad como agente patógeno a tener en cuenta en la industria de la madera (Encinas & Mora, 2003), así como un organismo de interés para obtener enzimas lignocelulolíticas (Cohen et al., 2005; Carvajal, 2014).

Entre los experimentos realizados para explotar su capacidad enzimática están hidrólisis y fermentación simultánea de lignocelulosa con enzimas producidas *in situ* y levaduras alcohólicas (Vincent et al., 2014) y experimentos en donde el mismo hongo fue responsable de la hidrólisis de la lignocelulosa y fermentación de los azúcares (Rasmussen et al., 2010). Esto muestra la versatilidad de este hongo para crecer en distintos medios y junto con otros microorganismos.

1.2.4.2. *Trametes versicolor*

Es un hongo de pudrición blanca y uno de los degradadores de lignina más eficaces. Al degradar la lignina deja expuesta la celulosa (que es blanca) razón por la cual es llamado de pudrición blanca (Hatakka & Hammel, 2010; Schlosser et al, 1997). El conjunto de enzimas que produce es rico en lacasa y además contiene celulasas y xilanasas. Debido a su producción de enzimas ha sido estudiado para ser utilizado en la preparación de biomasa útil para abono o alimento de animales en cultivos sólidos de paja de trigo (Valmaseda et al, 1991). También, se ha estudiado el uso de sus enzimas en la industria del papel y remediación ambiental (Xavier et al., 2007) y en trabajos recientes su capacidad para disminuir agentes de inhibición enzimática en hidrólisis de lignocelulosa removiendo inhibidores fenólicos y xiloligosacáridos (Kapoor et al., 2015).

1.2.4.3. *Phanerochaete chrysosporium*

Al igual que *T. versicolor*, es un hongo de pudrición blanca. Produce, además celulasas y xilanasas, enzimas con actividad ligninasa como manganoso-peroxidasas (Paszczynski, 1988) y lignino-peroxidasas (Tien & Kirk, 1988) que tienen una acción degradadora de lignina. Tiene la característica de ser termotolerante pudiendo crecer en un rango de temperatura de entre 12 a 50 °C (Sáiz-Jiménez, 1983) además de tener una rápida velocidad de crecimiento de 0.5 mm por hora en lignocelulosa de madera (Eriksson, 1981).

Entre los que se han realizado experimentos en lignocelulosa pretratada con el objetivo de aprovechar las enzimas de este hongo para obtener celulosa libre de

lignina (Zhang et al., 2012), producir etanol en co-cultivo con levaduras alcohólicas (Shrestha et al., 2008) y para mejorar o predigerir paja de trigo para alimentación de rumiantes (Raghuwanshi et al., 2014).

1.2.5. Extractos enzimáticos crudos

En busca de estrategias para disminuir costos en la etapa de hidrólisis enzimática se ha estudiado la eficiencia de los extractos enzimáticos crudos, es decir, enzimas no purificadas. Consiste en cultivar, en medio sólido o líquido, hongos productores de enzimas lignocelulolíticas induciendo su producción con productos químicos o utilizando lignocelulosa como fuente de carbono (Sharma et al., 2015). Luego de varios días se toma sobrenadante, o se concentra para conservarlo por más tiempo, y se usa en una hidrólisis de lignocelulosa.

Se ha encontrado aumento en la eficiencia de la hidrólisis debido al efecto obtenido por dos estrategias que se describen a continuación.

1.2.5.1. Efectos del uso combinado de enzimas de diferentes hongos

Se ha observado cierta mejora en la hidrólisis de lignocelulosa mezclando extractos crudos de hongos de pudrición productores de enzimas con actividades enzimáticas diferentes. El criterio de la mezcla se basa en que unos hongos son buenos productores de un tipo de enzimas y malos produciendo otras, pero al mezclar extractos de diferentes hongos se obtiene una mezcla enriquecida de enzimas lignocelulolíticas, lo cual mejoraría la hidrólisis.

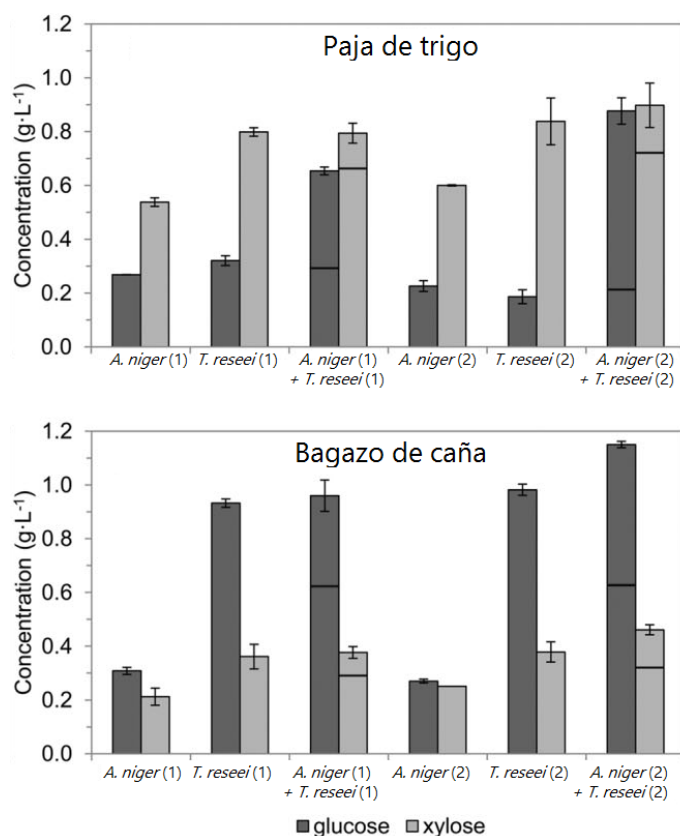


Figura 1.6. Producción de azúcares por combinación de extractos enzimáticos. La línea horizontal en las barras muestra el esperado teórico de combinar dos

cepas de *A. niger* (1) y (2) y *T. reesei* (1) y (2). (Modificado de Brink et al., 2014)

En un estudio (Brink et al., 2014) se combinó extractos crudos de *Aspergillus niger* y *Trichoderma reesei*, dos hongos con características enzimáticas distintas. El extracto de *A. niger*, rico en β -glucosidasas y celobiohidrolasas, se complementó con el extracto de *T. reesei*, rico en endoglucanasas, obteniendo aproximadamente el doble en el rendimiento de producción de azúcares, en la hidrólisis de paja de trigo y bagazo de caña, con respecto a los azúcares que se hubiesen obtenido por separado (ver Figura 1.6). En otro trabajo, usando combinaciones de enzimas producidas por los mismos hongos, se obtuvieron rendimientos de conversión de glucosa muy similares a los obtenidos con enzimas comerciales, por ejemplo, en la hidrólisis de lignocelulosa de Pino, se obtuvo un rendimiento del 55% con la combinación de extractos frente a un 58% con enzimas comerciales (Rana et al., 2014).

En otro estudio se mejoró la hidrólisis de paja de trigo de un 30 a un 40% utilizando una combinación de los extractos enzimáticos de dos *Penicillium spp*, uno productor de enzimas con actividad endoglucanasa y xilanasas mejor que el otro, pero con menor actividad β -glucosidasa (Saini et al., 2016).

1.2.5.1. Efecto del uso enzimas obtenidas en co-cultivo de hongos

En otros trabajos el sinergismo se ha observado al obtener los extractos enzimáticos desde un co-cultivo, es decir, se inoculan dos hongos diferentes en un mismo medio. Los hongos en este ambiente colaboran expresando enzimas para degradar el sustrato en el que están creciendo obteniéndose un extracto enzimático nuevo ya que ambos hongos están ahora en un medio con inductores e inhibidores en distinta proporción con respecto a un cultivo individual.

En el trabajo de Ma y Ruan (2015) se obtuvo un extracto enzimático crudo desde un co-cultivo de *C. comatus*, productor de enzimas ligninolíticas, con *T. reesei*, productor de enzimas celulolíticas. El extracto enzimático se utilizó en una hidrólisis de rastrojo de maíz y se compararon los rendimientos con hidrólisis realizadas con los extractos enzimáticos desde cultivos individuales de los hongos involucrados. Se encontró que las enzimas del co-cultivo degradaron una mayor cantidad de lignina y produjeron una mayor cantidad de azúcares (ver Figura 1.7).

Tabla 1.1. Peso perdido y degradación de rastrojo de maíz tratado con enzimas lignocelulolíticas crudas por 72 h (Modificado de Ma & Ruan, 2015).

Hongo Mono o co-cultivo	Peso perdido (%)		Degradación (%)		
			Glucano	Xilano	Lignina
<i>C. comatus</i>	13,3	± 0,7	1,6 ± 1,3	2,9 ± 1,1	41,3 ± 1,6
<i>T. reesei</i>	14,4	± 0,8	15,5 ± 1,5	20,3 ± 1,3	0,5 ± 0,2
<i>C. comatus & T. reesei</i>	48,9	± 2,5	56,2 ± 2,0	59,7 ± 1,5	45,1 ± 0,7

Sin embargo, en el trabajo de Saini et al (2016), en el experimento hidrólisis de paja de trigo con enzimas de co-cultivo de dos *Penicillium spp*, no se observó mejoras en el rendimiento respecto a los cultivos individuales. En el estudio indican

que ese resultado se debió posiblemente a la incompatibilidad entre las cepas co-cultivadas, un factor a tener en cuenta en este tipo de experimentos.

1.3. **Justificación y motivación**

Este trabajo se justifica en el marco de la búsqueda de enzimas más eficientes para producir azúcares desde un residuo lignocelulósico abundante y renovable, como es la paja de trigo. Aprovechar este recurso en áreas como la producción de biocombustibles, diseño de nuevos fármacos y alimentación de animales requiere de más estudios y experimentos.

Se plantea obtener extractos enzimáticos crudos desde cultivos individuales y co-cultivos de los hongos de pudrición de la madera, *G. trabeum*, *P. chrysosporium* y *T. versicolor*, en los que se han reportado estudios sobre el uso de sus enzimas en el aprovechamiento de lignocelulosa.

1.1. **OBJETIVOS**

1.1.1. **Objetivo general**

Evaluar la capacidad para extraer azúcares, desde paja de trigo pretratada, de un complejo enzimático lignocelulolítico obtenido a partir de cultivos líquidos de hongos de pudrición de la madera.

1.1.2. **Objetivos específicos**

- 1.1.2.1. Caracterizar la composición de azúcares de la paja de trigo a utilizar en los experimentos.
- 1.1.2.2. Estudiar la producción de enzimas lignocelulolíticas, mediante su actividad enzimática, de los hongos en monocultivos y en co-cultivos.
- 1.1.2.3. Comparar la conversión a azúcares simples en hidrólisis de paja de trigo utilizando combinaciones de las enzimas obtenidas en cultivos individuales y de las enzimas obtenidas de co-cultivos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Pretratamiento físico y químico de la paja de trigo

La paja de trigo utilizada en los ensayos y cultivos fue obsequiada por una granja en la VII región del sur de Chile. Se molió con una licuadora de cocina y tamizada hasta tamaño de partícula <500 nm. Luego recibió un tratamiento químico en una solución de NaOH al 10% en la que la paja de trigo y el NaOH estaban en relación 1:1. La solución se llevó a 80 °C por 2 horas en baño de agua. Posteriormente se filtró a través de gasa y se enjuagó con agua destilada hasta alcanzar un pH 7. Se secó a 60 °C por 12 h en una estufa.

2.2. Determinación de la composición de la paja de trigo

Luego del pretratamiento la paja de trigo utilizada fue otra vez molida y tamizada por malla Nro. 35 (<500 nm). Se pesó 300 mg de paja de trigo en un tubo de ensayo de 20 ml, se agregó 3 ml de ácido sulfúrico al 72% p/p y se incubó por 1 h a 30 °C. El contenido del tubo se trasladó a un matraz de 250 ml, se agregó agua destilada (usada previamente para enjuagar el tubo de ensayo) hasta diluir el ácido sulfúrico al 4% p/p y se llevó a autoclave a 121 °C por 15 min. Una vez fría la solución fue filtrada al vacío con papel Whatman 1 y el filtrado se llevó con agua destilada a 100 ml para posteriores análisis. El filtro con residuos se secó a 55 °C por 12 h y se pesó. La diferencia de peso entre filtro con residuos y el filtro seco se reportó como lignina insoluble (Innventia, 2010).

La lignina soluble fue determinada analizando el filtrado en cubetas de cuarzo midiendo la absorbancia a 205 nm reportando las lecturas entre 0,3 y 0,7 realizando diluciones (incluido el blanco) cuando fue necesario. Los datos se ingresaron en la siguiente ecuación

$$\text{Lignina soluble} \left[\frac{g}{l} \right] = \frac{Abs_{205 \text{ nm}}}{\varepsilon \cdot b}$$

donde $\varepsilon = 110 \left[\frac{l}{g \cdot cm} \right]$ y b es el camino recorrido en cm (Innventia, 2010).

Las concentraciones de glucosa y xilosa en el filtrado fueron determinadas luego de neutralizar el filtrado con los kits Glucose GOD-PAD Assay (Randox) y D-Xylose Assay (Megazyme), respectivamente. Los protocolos de estos ensayos fueron adaptados para usar un volumen 10 veces menor y se construyeron curvas de calibración (ver ANEXO A.a). Así, para determinar la concentración de glucosa, se mezcló 200 μ l del reactivo del kit con 5 μ l de muestra o estándar o agua (blanco), se incubó por 20 min a 37 °C y se midió la absorbancia a 500 nm. Para el caso de la xilosa, se mezcló 200 μ l de agua destilada, 10 μ l de muestra o estándar o agua (blanco), 40 μ l de solución 1, 40 μ l de solución 2 y 2 μ l de solución 3, se incubó a temperatura ambiente por 5 min y se midió la absorbancia (Abs1) a 340 nm en microplacas para lectura UV, a continuación, se agregó 5 μ l de solución 4, se incubó a temperatura ambiente por 6 min y se midió la absorbancia (Abs2) a 340 nm; la absorbancia final se obtiene restando Abs2 menos Abs1.

2.3. Preparación de los inóculos y condiciones de los cultivos para producción de enzimas

La manipulación de los microorganismos se realizó bajo condiciones de esterilidad y la incubación de los cultivos se mantuvo en condiciones apropiadas para evitar contaminación cruzada entre los hongos estudiados. Las reservas de hongos estuvieron conservadas en placas de agar patata-dextrosa (PDA) a 4 °C dentro de bolsas de plástico.

De la reserva de hongos, se tomó un cuadrado de aproximadamente 1x1 cm para inocular una nueva placa de PDA y se incubó por 7 días a 30 °C. De esta nueva placa se tomó un cuadrado de aproximadamente 1x1 cm para inocular 50 ml del medio de cultivo y se incubó por 7 días a 30 °C y 80 rpm, en matraces de 250 ml con glucosa al 1% como fuente de carbono. Al terminar el cultivo se desechó el medio y se enjuagó varias veces el hongo con medio de cultivo libre de glucosa en condiciones de esterilidad. Usando bolitas de vidrio se hizo una suspensión con la masa de hongos y el medio de cultivo. Se tomaron muestras de la suspensión para determinar el contenido de humedad secando las muestras a 60 °C en estufa hasta peso constante (2 horas aprox.) (ver ANEXO A. d). Esta suspensión de hongos se usó como inóculo.

Para la producción de enzimas, los cultivos fueron inoculados con 40 mg (peso seco) de la suspensión de cada hongo en un volumen de 200 ml. Se incubaron a 30 °C y 80 rpm en matraces de 500 ml. La composición de cada medio de cultivo está en la Tabla 2.1 y corresponde a medios reportados con algunas modificaciones (Tien & Kirk, 1988; Suwannarangsee et al., 2012).

Tabla 2.1. Composición de los medios de cultivo.

Composición para 1 litro de medio de cultivo. Tiamina, sulfato de cobre y elementos traza se esterilizan por filtración. Extracto de levadura y cloruro de calcio se esterilizan cada uno por separado en 100 ml por autoclave. El resto se esteriliza junto en 800 ml por autoclave

Compuesto	<i>G. trabeum</i>	<i>T. versicolor</i>	<i>P. chrysosporium</i>	unidades
KH ₂ PO ₄	0,46	2,00	0,60	g
K ₂ HPO ₄	1,00	---	0,40	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	---	1,40	---	g
(NH ₄) ₂ PO ₄	---	---	0,26	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,05	0,30	0,50	g
Triptona	---	0,75	---	g
CO(NH ₂) ₂	---	0,30	---	g
CaCl ₂ ·7H ₂ O	1,00	0,40	0,74	g
Extracto de levadura	2,00	0,25	1,00	g
CuSO ₄	---	0,10	---	g
Tiamina·HCl	0,10	---	0,40	mg
Elementos traza*	7,00	10,0	7,00	ml

*Elementos traza (mg en 100 ml): MnSO₄·H₂O 160, CoCl₂·H₂O 200, FeSO₄·7H₂O 500 y ZnSO₄·7H₂O 140.

Para el caso de los co-cultivos, los medios consistieron en la combinación de los componentes de los medios correspondientes a los hongos a co-cultivar.

Durante el tiempo de cultivo, se midió el crecimiento con ensayos de concentración de proteínas y actividad enzimática.

2.3.1. **Co-cultivos en agar PDA**

Se realizaron co-cultivos en placas de agar PDA, inoculados desde un cuadrado de 1x1 cm de las nuevas placas cultivadas por 7 días. Esto se hizo para observar el comportamiento de los hongos al crecer en un mismo medio.

2.3.2. **Obtención de los extractos enzimáticos crudos**

En el último día de incubación de los cultivos, el contenido de los matraces se filtró al vacío a través de un filtro de membrana MCE de Advantec con tamaño de poro de 0,8 µm. Se ajustó el pH de cada filtrado con una solución de Tris-HCl 0,5 M pH 7 con un volumen tal que la concentración final del filtrado quedara en 50 mM de Tris. Luego se concentraron las enzimas por precipitación agregando sulfato de amonio a una razón de 560 g por litro de filtrado (85% de saturación según tablas de saturación). Esta sal fue agregada poco a poco con agitación lenta manteniendo el filtrado a baja temperatura con hielo y luego estuvo en agitación suave durante 24 h a 4 °C.

El volumen total de la etapa anterior fue distribuido en tubos para centrífuga de 80 ml. Se centrifugó a 10.000 rpm (12.857 g) y 4 °C por 10 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en acetato de sodio 50 mM pH 5.

Los extractos de los cultivos individuales fueron desalinizados mediante diálisis contra 500 ml de buffer acetato de sodio 50 mM pH 5, por 24 h con renovación del medio a las 12 h, a 4°C. En los extractos del co-cultivo, alternativamente, se usó cromatografía de exclusión por tamaño en una columna PD10 de Sephadex G-25 usando como fase móvil buffer acetato de sodio 50 mM pH 5.

Una vez desalinizados los extractos enzimáticos, fueron guardados a -80 °C en alícuotas de 200 µl en tubos eppendorf de 0,6 ml.

2.4. **Cuantificación de proteínas**

La determinación de la concentración de proteínas se realizó usando un método modificado de Bradford (Appendroth et al., 1982) en dos procedimientos. Para la determinación en muestras del cultivo, muestras con baja de concentración de proteínas, se mezcló 150 µl del reactivo y 150 µl de muestra. Para los concentrados enzimáticos, que poseían alta concentración de proteínas, la mezcla fue 120 µl de agua destilada, 50 µl del reactivo y 5 µl de muestra. Luego de 5 min de incubación a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 595 y 465 nm y se ingresaron las lecturas en la siguiente ecuación:

$$Abs = \frac{Abs_{muestra}^{595\text{ nm}}}{Abs_{muestra}^{465\text{ nm}}} - \frac{Abs_{blanco}^{595\text{ nm}}}{Abs_{blanco}^{465\text{ nm}}}$$

Se usó agua destilada como blanco. Se realizaron curvas de calibración con seroalbúmina de bovino como proteína estándar (ver ANEXO A.b).

2.5. Determinación de las actividades celulolíticas, xilanolíticas y ligninolíticas de los extractos enzimáticos crudos

Una vez obtenida la fracción extracelular de los cultivos concentrada se midió actividad enzimática para endoglucanasa, xilanasas, celulasa y lacasa. Se realizaron los siguientes ensayos de actividad:

CMCasa. –Se mezcló 25 µl de muestra y µl de CMC al 1% en acetato de sodio 50 mM pH 5. Se incubó a 50 °C por 1 h y se agregó 100 µl de DNS, se incubó a 95 °C por 12 min y luego de eso se enfrió en hielo. Se trasladó 100 µl a una placa de lectura y se midió la absorbancia a 550 nm. La absorbancia se convirtió a concentración con una curva estándar de glucosa (ver ANEXO A.c). Las unidades fueron expresadas como µmoles de glucosa equivalente liberadas por minuto y por miligramo de proteína utilizada.

Xilanasas. – Se mezcló 25 µl de muestra y µl de xilano de abedul al 1% en acetato de sodio 50 mM pH 5. Se incubó a 50 °C por 1 h y se agregó 100 µl de DNS, se incubó a 95 °C por 12 min y luego de eso se enfrió en hielo. Se trasladó 100 µl a una placa de lectura y se midió la absorbancia a 550 nm. La absorbancia se convirtió a concentración con una curva estándar de xilosa (ver ANEXO A.c). Las unidades fueron expresadas como µmoles de xilosa equivalente liberadas por minuto y por miligramo de proteína utilizada.

FPasa. –Se realizó el ensayo siguiendo el protocolo de Xiao et al (2004). Se mezcló 32 µl de muestra con 64 µl de acetato de sodio 50 mM pH 4.8 y se agregó como sustrato un círculo de 7 mm de diámetro de papel Whatman 1. Se incubó a 50 °C por 1 h. Se tomó 50 µl de la reacción y se mezcló con 100 µl de DNS y se incubó a 95 °C por 5 min. Se tomó 36 µl y se mezcló con 160 µl de agua destilada en una placa de lectura. La absorbancia se midió a 540 nm. La absorbancia se convirtió a concentración con una curva estándar de glucosa (ver ANEXO A.c). Las unidades fueron expresadas como µmoles de glucosa equivalente liberadas por minuto y por miligramo de proteína utilizada.

Lacasa. – Se mezcló en una placa de lectura 75 µl de muestra con 50 µl de DMP 10 mM en acetato de sodio 50 mM pH 5. Se midió la absorbancia a 468 nm cada minuto durando 10 min. Las unidades fueron expresadas como cambio de absorbancia por minuto y por miligramo de proteína utilizada.

Manganeso peroxidasa. – Se mezcló 45 µl de muestra con 50 µl de DMP 10 mM en acetato de sodio 50 mM pH 5 y 50 µl de MnSO₄ 0,4 mM. La reacción se inicia al agregar 3 µl de H₂O₂ 20 mM y se midió la absorbancia a 468 nm cada minuto durando 10 min. Las unidades fueron expresadas como unidades de absorbancia por minuto y por miligramo de proteína utilizada.

2.6. Hidrólisis de paja de trigo y cálculo de los efectos sinérgicos

Los experimentos de hidrólisis de paja de trigo se realizaron en placas de pozo profundo de 96 pocillos con 2 ml de capacidad y 1 ml de volumen reaccionante, a 50 °C y 300 rpm. Se utilizó una carga de 2% de paja de trigo pretratada, en acetato de sodio 50 mM pH 5. Contenía también 0.5% final de tween 80, 1 µg/ml de cicloheximida y µg/ml de tetraciclina como antifúngico y antibacterial respectivamente. La placa se cubrió con una tapa adhesiva de papel aluminio para prevenir evaporación.

La paja de trigo pretratada fue agregada en forma de solución en amortiguador, la solución fue de concentración uniforme gracias a agitación magnética y se tomó mediante pipeteo con puntas cortadas. El volumen de extracto enzimático agregado en cada ensayo y la concentración de paja de trigo se tomaron en cuenta para mantener las mismas concentraciones de sustrato en todos los ensayos.

La toma de muestras se realizó a las 24, 48 y 96 h a cada uno de los ensayos y al ensayo que no contiene enzimas y cuyo resultado en los análisis fue utilizado como blanco en los cálculos. En cada toma de muestra se puso la placa en hielo durante 15 min antes de destapar la placa de pozo profundo y tomaron 100 µl de muestra que fueron almacenados a -20 °C hasta el momento del análisis (1-3 días).

Los efectos sinérgicos o antagónicos de mezclar distintos extractos o de usar el extracto de co-cultivos fueron calculados con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ sinergismo/antagonismo} = 100 \cdot \frac{\text{producción experimental de azúcares}}{\text{producción teórica de azúcares}}$$

La producción teórica de azúcares de las mezclas se calculó como la suma de producción de azúcares de los extractos enzimáticos individuales de acuerdo a la proporción, en microgramos de proteína, de cada extracto enzimático en la mezcla. Para conocer el grado de validez de este cálculo, se realizaron experimentos de hidrólisis a varias concentraciones de extracto de hongos individuales encontrando así una tendencia lineal con su respectivo R².

2.7. Análisis estadísticos

Las comparaciones realizadas en los experimentos de hidrólisis fueron validadas por análisis de varianza con un $P = 0,05$ usando el programa STATGRAPHICS Centurion XVII. Los experimentos fueron realizados en triplicado y se reportó el promedio junto con sus respectivas desviaciones estándar.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El flujo de proceso que siguió cada cultivo de los cuales se obtuvieron las enzimas para las hidrólisis de paja de trigo está ejemplificado en la Figura 3.1.

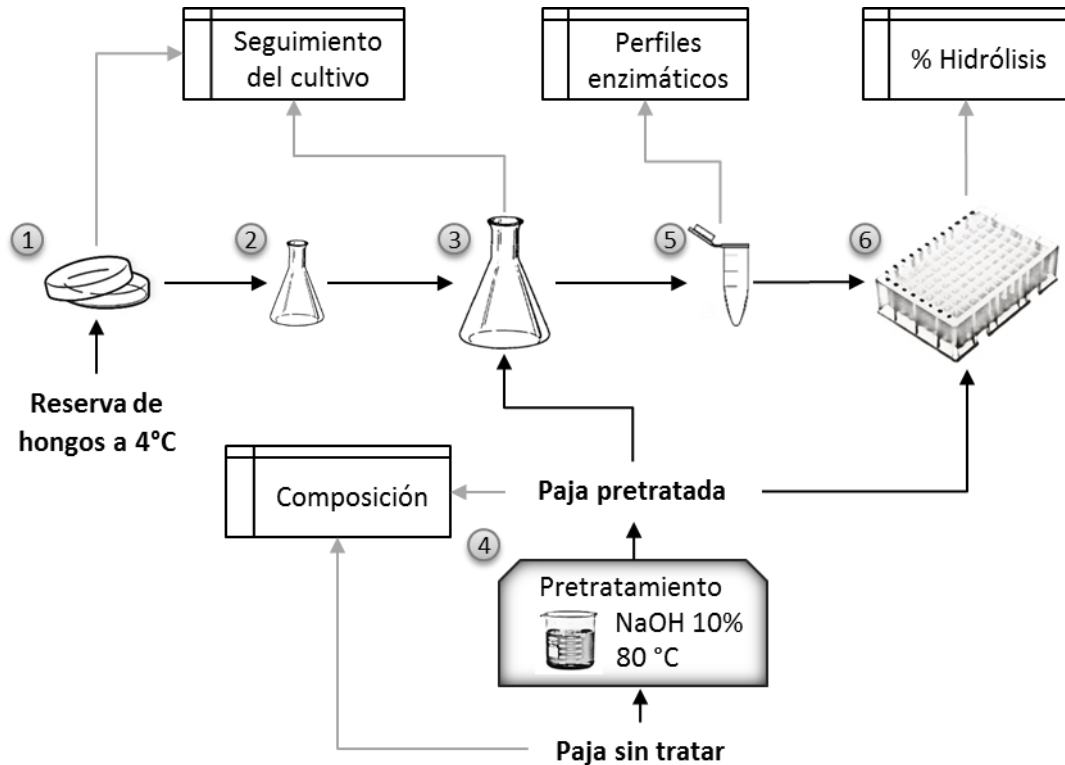


Figura 3.1 Resumen del proceso de obtención y uso de las enzimas de cada cultivo.

Las flechas negras representan el flujo material del proceso y las flechas grises indican el principal análisis realizado en una etapa. 1) inoculación en agar PDA desde la reserva a 4 °C; 2) inoculación en medio líquido con glucosa; 3) inoculación en medio líquido con paja de trigo pretratada; 4) Pretratamiento de paja de trigo; 5) concentración de enzimas; 6) Hidrólisis de paja de trigo.

3.1. Composición de la paja de trigo utilizada en los ensayos

Para calcular los porcentajes de hidrólisis de la paja de trigo pretratada fue necesario conocer su composición. Tal como se ha reportado y se puede notar en la Tabla 3.1, el tratamiento alcalino reduce drásticamente el contenido de lignina y xilosa aumentando así la concentración de glucosa y la porosidad en la biomasa (Pavlostathis & Gossett, 1985). Se aprecia así la importancia de este pretratamiento que además es relativamente barato desde el punto de vista de los insumos, al compararlo con un pretratamiento con ácido sulfúrico por ejemplo (Chen et al., 2007; Chaudhary et al., 2012), aunque el aspecto energético podría mejorar.

Este resultado es similar al de Pavlostathis y Gossett (1985) en que en ambos el pretratamiento con NaOH disuelve la lignina y xilosa de la paja de trigo, con la diferencia que en su trabajo se eliminó un 45% de lignina mientras que en este

trabajo fue del 80% (ver ANEXO A.e). Esta diferencia se debe probablemente a las condiciones de pretratamiento, ya que en su trabajo incubaron la paja de trigo por 24 horas a temperatura ambiente a diferencia del presente trabajo en donde la incubación fue por 2 horas a 80 °C.

Se observa también la eliminación de los componentes, no determinados en el análisis, que forman parte de la paja de trigo pretratada. Esos componentes corresponden a proteínas, extraíbles y componentes de la hemicelulosa (Silva-Fernandes et al., 2015).

Tabla 3.1. Composición de la paja de trigo.

Composición de biomasa seca para paja trigo sin tratar y tratada con NaOH al 10% (expresado como porcentaje en peso, n = 3).

Componentes	Sin tratar (%)	Tratada (%)
Glucosa	36,8 ± 0,38	83,3 ± 1,91
Xilosa	16,4 ± 0,58	6,50 ± 0,10
Lignina insoluble	18,7 ± 0,18	9,35 ± 0,12
Lignina soluble	1,91 ± 0,03	0,72 ± 0,01

Cabe mencionar que, aunque la glucosa bajo este pretratamiento está notablemente concentrada, se perdió un 84% de xilosa. Es importante porque es un azúcar que también sirve de nutriente a gran número de microorganismos fermentadores por lo que se sugiere, en trabajos futuros, probar otras condiciones de este pretratamiento más enfocadas a remover sólo lignina. Esto permitiría enriquecer la mezcla de azúcares para un mayor aprovechamiento de la lignocelulosa.

3.2. Análisis de la producción de enzimas

Los extractos enzimáticos crudos se obtuvieron desde cultivos de hongos en medio líquido y se tomaron muestras durante el tiempo de cultivo para conocer la producción de celulasas. Las enzimas fueron obtenidas de dos fuentes: cultivando más de un hongo en un mismo matraz y cultivando cada hongo por separado.

3.2.1. Producción de enzimas desde cultivos individuales

Se observó aumento en la producción de enzimas durante las dos semanas de cultivo a excepción del cultivo de *P. chrysosporium* que presentó un comportamiento inestable tanto en la producción de enzimas CMCasas (Figura 3.2) como en la producción total de proteínas (Figura 3.3). Además, no se encontró actividad lignino peroxidasa y casi nula actividad manganeso peroxidasa (Figura 3.4) lo cual es inesperado de acuerdo a la literatura (Michel et al 1991). Con respecto a esto, Jiménez et al. (1997) encontró que la producción de enzimas era negativamente afectada por, entre otros factores, el tamaño de los pellets del hongo formados en el cultivo y por la densidad de esporas en el inóculo. A menor cantidad de esporas y a mayor tamaño del pellet, menor producción de enzimas. Esto indica que cultivar *P. chrysosporium* desde un pre-inóculo en suspensión puede afectar su crecimiento y la producción de enzimas.

Con respecto a *G. trabeum* y *T. versicolor*, no se observaron problemas relacionados con la inoculación. La producción de enzimas CMCasas fue similar a otros trabajos con condiciones similares con la diferencia que en aquellos trabajos la inoculación fue desde pequeñas porciones de cultivos de hongos en agar PDA en lugar de un pre-inóculo en suspensión. Esa condición parece haber marcado la diferencia en la producción de enzimas debido a que el pre-inóculo en suspensión contiene mayor biomasa fúngica que en las porciones de agar PDA. La producción de CMCasas, para *G. trabeum*, fue un poco mejor (aproximadamente un 30%) respecto al trabajo de Carvajal (2014) y para el caso de *T. versicolor* fue aproximadamente el triple que en el trabajo de Manzano (2013). En el segundo caso la diferencia, además del tipo de inoculación, fue que en este trabajo el cultivo duró 3 días más.

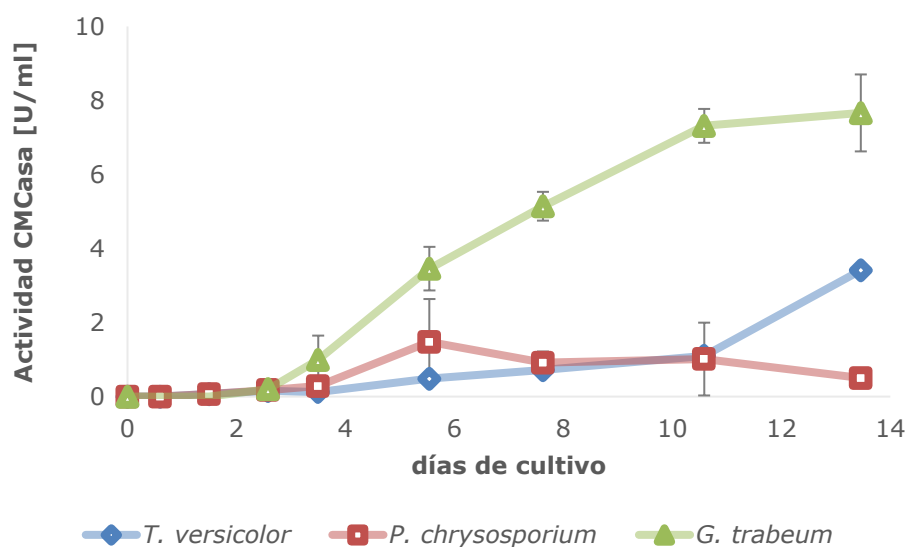


Figura 3.2 . Seguimiento de la producción de CMCasas por los hongos en cultivos individuales en medio líquido.

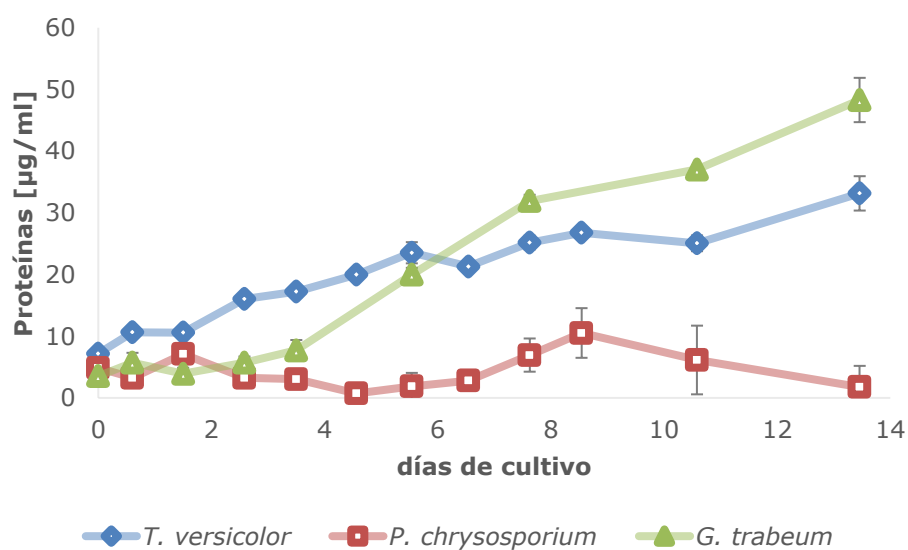


Figura 3.3. Seguimiento de la producción de proteínas por los hongos en cultivos individuales en medio líquido.

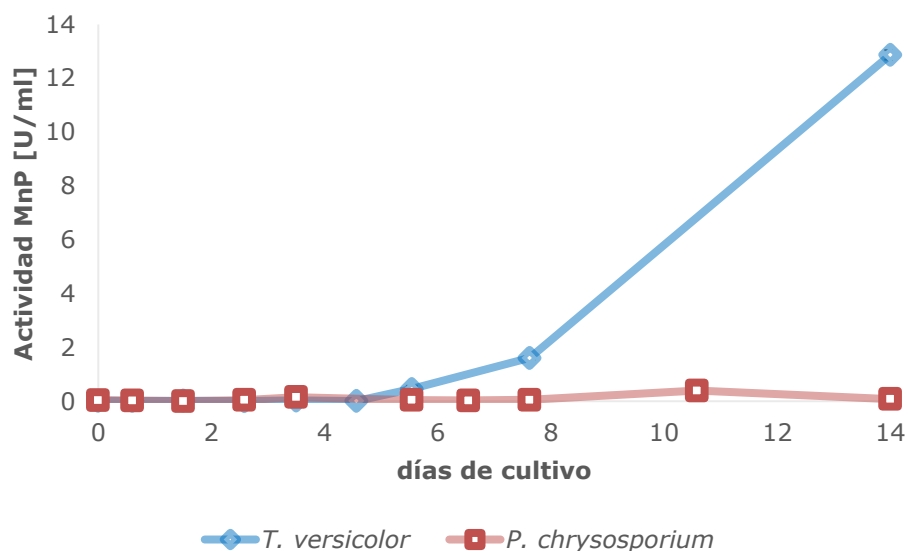


Figura 3.4. Seguimiento de la producción de enzimas MnP por los hongos en cultivos individuales en medio líquido.

3.2.2. Producción de enzimas desde co-cultivos

Además de los co-cultivos líquidos, se realizó un análisis de las interacciones entre los hongos cultivándolos en agar PDA. Esto se hizo para obtener un dato complementario que ayude explicar el comportamiento de los hongos en co-cultivo frente a los cultivos individuales.

3.2.2.1. Interacción de los hongos en co-cultivos en agar PDA

Durante las dos semanas de cultivo, se observó que la velocidad de crecimiento de *G. trabeum* y de *T. versicolor* fue menor que *P. chrysosporium*. Se observó también que, entre los hongos, en el límite en donde interactúan, existe un comportamiento del tipo *deadlock*, es decir, que ninguno de los micelios entra en el territorio ocupado por el otro (Molla et al., 2001). Este comportamiento trajo como consecuencia que en la placa en donde se cultivaron los tres hongos, *P. chrysosporium* limitara el crecimiento de *G. trabeum* y de *T. versicolor*. Por otro lado, *G. trabeum* y de *T. versicolor* crecieron a un ritmo similar (ver Figura 3.5).

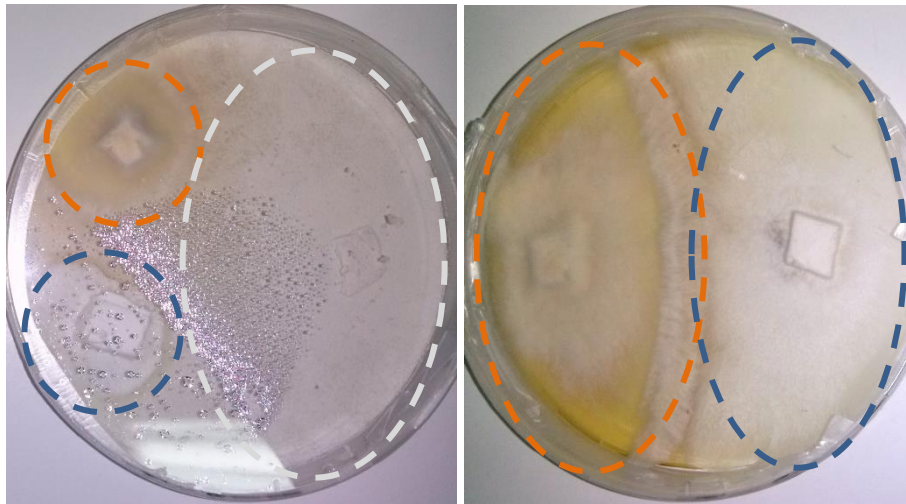


Figura 3.5. Co-cultivos de hongos en agar PDA.
Límites del crecimiento de los hongos: *G. trabeum* (naranja), *T. versicolor* (azul) y *P. chrysosporium* (blanco).

3.2.2.2. Co-cultivos en medio líquido

En los cultivos que fueron inoculados con más de un hongo se observó que la mayor producción de CMCasa se produjo en los que contenían *G. trabeum* y *T. versicolor*, cuyos valores se muestran en la Figura 3.6.

De manera similar a los cultivos individuales, los cultivos con *P. chrysosporium* mostraron baja actividad CMCasa. Esto puede explicarse, con base a lo observado en los co-cultivos en agar PDA, en que *P. chrysosporium* consume los azúcares liberados por la paja de trigo más rápido que los otros hongos limitando así el crecimiento.

Una posible solución a este problema podría lograrse tomando el ejemplo del trabajo de Kolasa et al (2014). En su trabajo encontró baja actividad enzimática en co-cultivos, respecto a los cultivos individuales, cuando estos fueron incubados (7 días) desde el momento de ser inoculados. En cambio, cuando preparó el co-cultivo con los hongos crecidos individualmente por 48 h se observó aumento en las actividades enzimáticas incluso mejores que los cultivos individuales.

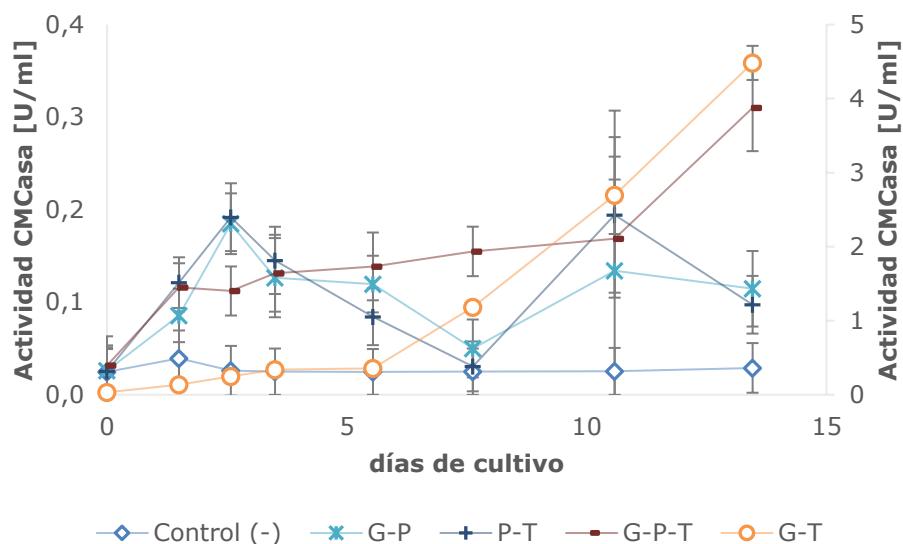


Figura 3.6. Seguimiento de la producción de CMCase por los hongos en co-cultivos en medio líquido. G, *Gloeophyllum trabeum*; P, *Phanerochaete chrysosporium*; T, *Trametes versicolor*. El eje secundario corresponde sólo al co-cultivo G-T.

3.3. Análisis de la actividad celulolítica, ligninolítica y xilanolítica de los extractos enzimáticos crudos

En el último día de seguimiento de los cultivos, se filtró el sobrenadante y se concentraron las enzimas (o extractos enzimáticos crudos ya que no se realizó ninguna etapa de purificación). Estos extractos, que serán usados en la hidrólisis de paja de trigo, fueron analizados para conocer algunas de sus actividades enzimáticas y así facilitar la comprensión de los resultados obtenidos en las hidrólisis.

Para cada extracto enzimático se determinó la actividad enzimática específica celulolítica, ligninolítica y xilanolítica y se representan en el perfil de producción de enzimas de la Figura 3.7. Para poder comparar los perfiles, fue necesario multiplicar por un factor arbitrario la actividad en papel filtro (FPU) y la actividad lacasa porque las actividades enzimáticas en ambas no están en la misma escala que las actividades CMCase y xilanasas. Estas diferencias en la escala se deben a la naturaleza de los ensayos de actividad enzimática. En la actividad FPU la liberación de azúcares es catalizada desde un sustrato insoluble en donde los distintos tipos de celulasas trabajan sinérgicamente. Por otro lado, en la actividad CMCase el sustrato es soluble lo cual permite el acceso directo a las celulasas principalmente las endoglucanasas que hidrolizan regiones internas de la celulosa produciendo extremos reductores.

Por otro lado, la actividad Lacasa está reportada como unidades de absorbancia por minuto que no guarda ninguna relación con la escala de unidades de actividad enzimática de liberación de azúcares.

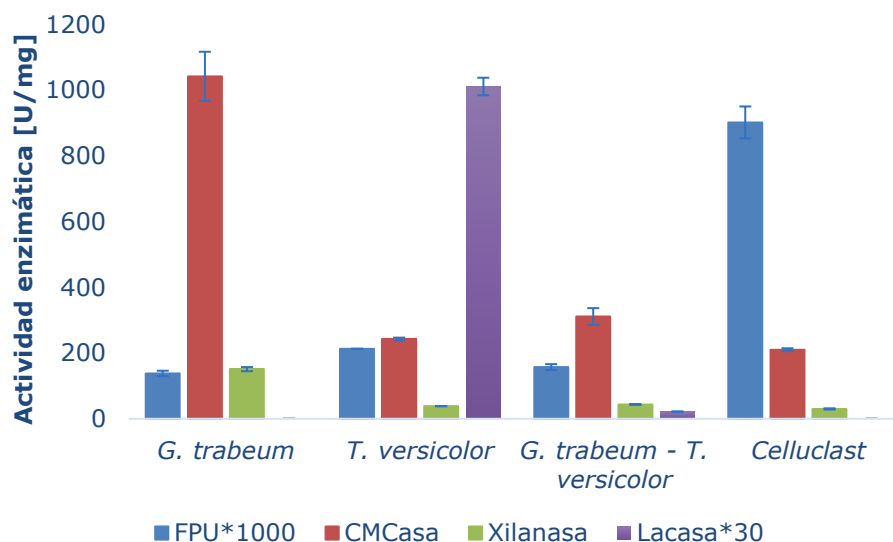


Figura 3.7. Perfiles de actividad enzimática específica. Perfiles de actividad enzimática específica de los EEC junto con un control positivo de Celluclast.

Estos valores de actividad enzimática específica son, en cierta medida, similares a los del trabajo de Vincent et al (2014) en donde los cultivos de *G. trabeum* y *P. chrysosporium* reportaron valores de 0,23 y 0,12 FPU/mg respectivamente.

Otra forma de representar los perfiles, para facilitar la comparación de los resultados de los hongos entre sí, se muestra en la Figura 3.8 en donde se quitó Celluclast y se normalizó cada actividad enzimática con respecto a la de mayor valor. Se observó ausencia de actividad lacasa, pero alta actividad CMCasa y xilanasa en *G. trabeum* mientras que en *T. versicolor* resalta la actividad lacasa y FPasa. Por otro lado, el co-cultivo muestra actividad FPasa media entre los cultivos individuales, actividad CMCasa y xilanasa similar a *T. versicolor* y poca actividad lacasa. Se observa que *T. versicolor* a pesar de producir menos actividad CMCasa que *G. trabeum*, produce alta actividad FPasa. Esto podría indicar que el extracto enzimático de *T. versicolor* contiene mayor cantidad de celobiohidrolasas, enzimas que tienen poca o nula actividad en el ensayo con CMC (Wood & Bhat, 1988) pero que colaboran sinérgicamente en la hidrólisis de la celulosa del papel filtro (Baker et al., 1998).

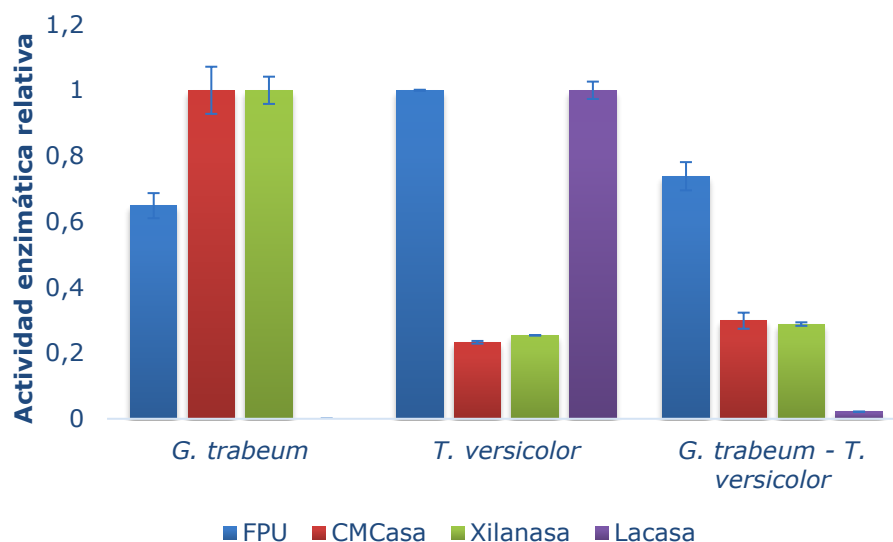


Figura 3.8. Perfiles de actividad enzimática relativa.

3.4. Hidrólisis de paja de trigo

Las hidrólisis de paja de trigo pretratada fueron realizadas en dos niveles de concentraciones de proteína total (μg de proteína por ml de medio reaccionante). En el primer nivel la concentración fue baja (Figura 3.9 A) y se realizó dentro de un rango de concentración lineal para comparar con mayor confianza la liberación de azúcares teórica con la experimental (ver ANEXO B.a). Y en el segundo nivel se usó una concentración 5 veces mayor (Figura 3.9 B).

Con respecto a la hidrólisis a concentración baja, se observa en la Figura 3.9 A, que las enzimas del co-cultivo convierten más glucosa que las enzimas de los otros ensayos a las 24 h. Sin embargo, a las 96 h se observa inhibición de su actividad. Para las mezclas, se encontró un ligero incremento en la conversión a las 24 y 48 h, pero a las 96 h no se encontró diferencias estadísticamente significativas en relación a los cultivos individuales. En las hidrólisis con mayor carga enzimática se encontró mejoras, apreciables y estadísticamente significativas, en el rendimiento de conversión a glucosa con las enzimas de las mezclas y las del co-cultivo respecto a las enzimas de los cultivos individuales en los tres tiempos de incubación (Figura 3.9 B).

El efecto sinérgico en la mezcla de extractos enzimáticos crudos puede atribuirse principalmente a complementariedad funcional que hay al mezclar las enzimas de *T. versicolor* y *G. trabeum* que tienen actividades enzimáticas diferentes (Figura 3.8). En esta mezcla, enriquecida con celulasas, xilanasas y lacasas, las enzimas estarían actuando sinérgicamente según lo reportado. Por un lado, la actividad lacasa estaría removiendo parte de la lignina residual contenida en la paja de trigo pretratada y así permitiendo el acceso de más enzimas a la celulosa y hemicelulosa (Valmaseda et al., 1991; Sharma & Arora, 2010). Por otro lado, se ha reportado un efecto sinérgico al suplementar xilanasas en hidrólisis de lignocelulosa de rastrojo de maíz (Kumar & Wyman, 2009). Al parecer la acción de las xilanasas promueve la desorción de celobiohidrolasas al liberar la celulosa de xilooligosacáridos que bloquean la acción de estas celulasas (Yang et al., 2010).

Se observa en la Figura 3.9 que la conversión por parte de las enzimas del co-cultivo presenta inhibición a medida que transcurre el tiempo de incubación, siendo más notorio en la hidrólisis con menor carga enzimática (Figura 3.10). Esto parece indicar que sus enzimas son susceptibles a la inhibición por producto, efecto que se ha observado en otros trabajos como el de Brink et al (2014). En ese trabajo se encontró una relación inversa entre la concentración de glucosa y la actividad enzimática de las enzimas encargadas de producir monómeros de azúcar de 5 y 6 carbonos.

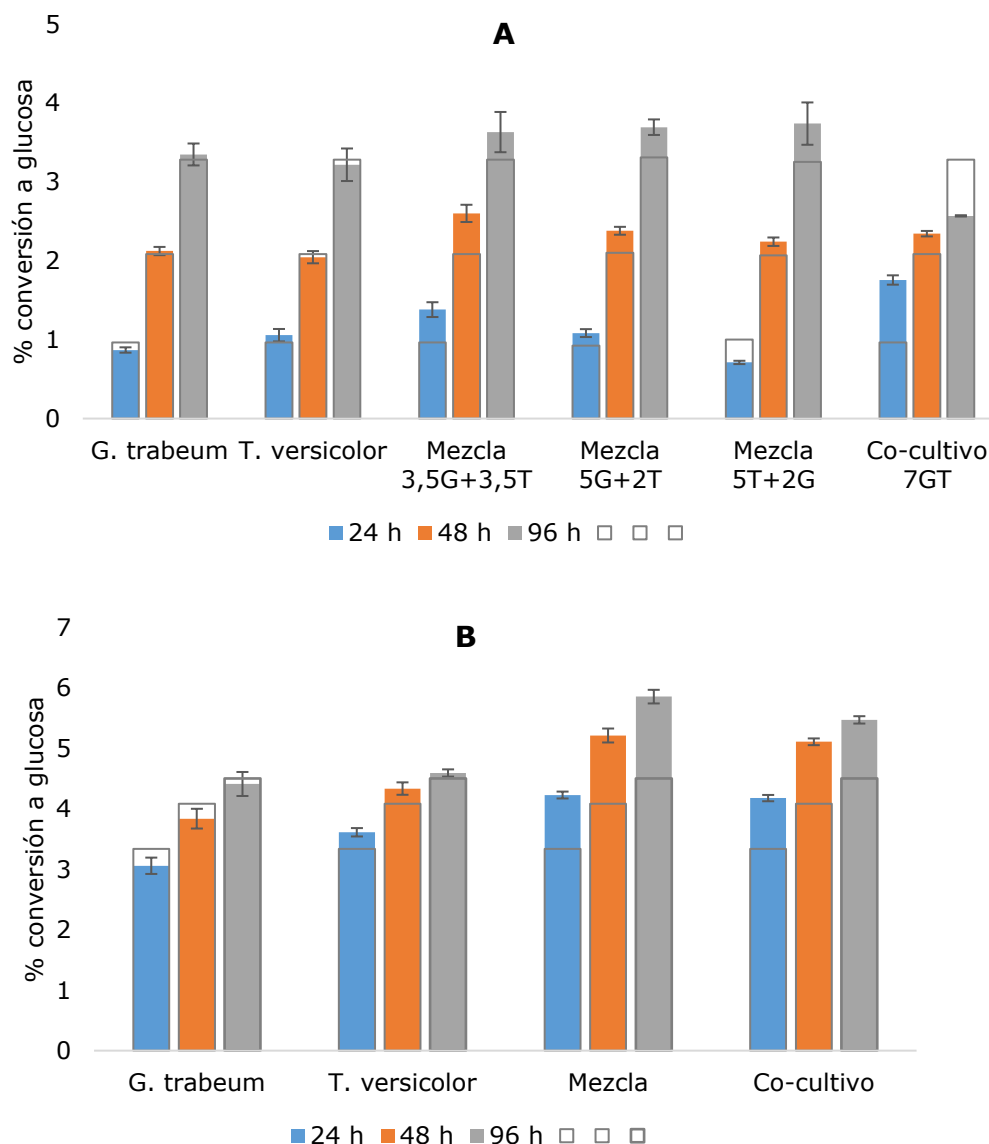


Figura 3.9. Conversión a glucosa en la hidrólisis de paja de trigo al 2% en 1 ml con 7 µg/ml (A) y 36 µg/ml (B) de carga enzimática. Las barras transparentes con bordes grises corresponden a la conversión teórica de mezclar los EEC individuales de *G. trabeum* (G) y *T. versicolor* (T) en las proporciones (µg de proteína) indicadas (A) y en proporciones iguales (B).

A pesar de esta inhibición observada, la hidrólisis con mayor carga enzimática con enzimas del co-cultivo, presenta mayor liberación de glucosa y azúcares reductores que las enzimas de los cultivos individuales posiblemente a que en su

extracto hay mayor variedad de enzimas que pueden trabajar sinérgicamente. Estas enzimas, según lo observado en las Figuras 3.9 y 3.11, son más eficientes a mayor concentración. Esto tiene que ver con el tipo de enzimas que contiene el extracto y en las proporciones en las que están, así como el sustrato en el que actúan.

La acción de unas enzimas depende de la acción de otras. Por ejemplo, las β -glucosidasas dependen de cuánto sustrato produzcan las celobiohidrolasas y éstas, a su vez, dependen de los extremos libres que generan las endoglucanasas (Jorgensen et al., 2007) así como del aporte que puedan brindar las xilanasas removiendo xilooligosacáridos (Yang et al., 2010).

Por su lado el sustrato, la paja de trigo, se va transformando en su composición, aumentando o disminuyendo la celulosa, hemicelulosa y lignina, de acuerdo a las enzimas que actúan en él y en la medida que transcurre el tiempo de reacción. Esto abre varias posibilidades en la manera en cómo serán liberados los azúcares al medio.

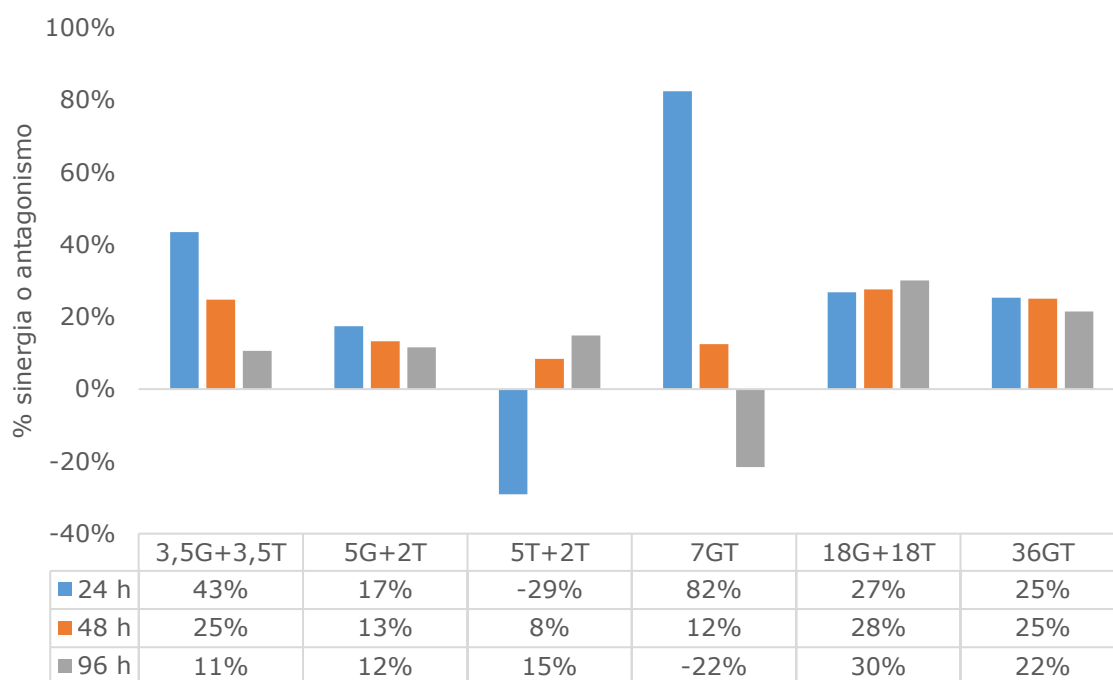


Figura 3.10. Porcentaje de sinergia o antagonismo en la hidrólisis. Porcentajes de sinergia (porcentaje positivo) o antagonismo (porcentaje negativo) de los experimentos de hidrólisis para los experimentos de las mezclas y del co-cultivo con respecto a la conversión de glucosa.

Por ejemplo, en el trabajo de Brink et al (2014) se realizó reacciones de hidrólisis con extractos enzimáticos de distintas fuentes, sobre paja de trigo sin tratar y tratada en agua a 121 °C por 20 minutos. Los resultados mostraron que para algunos extractos enzimáticos la liberación de azúcares era prácticamente la misma para la paja de trigo tratada y sin tratar, mientras que en otros casos la liberación de azúcares se duplicó.

Por lo tanto, para una misma cantidad de paja trigo, aumentar la carga enzimática de 7 a 36 $\mu\text{g/ml}$ traerá como consecuencia la posibilidad de una colaboración o sinergia diferente en las enzimas, así como una modificación diferente de los componentes de la paja de trigo durante el tiempo de reacción.

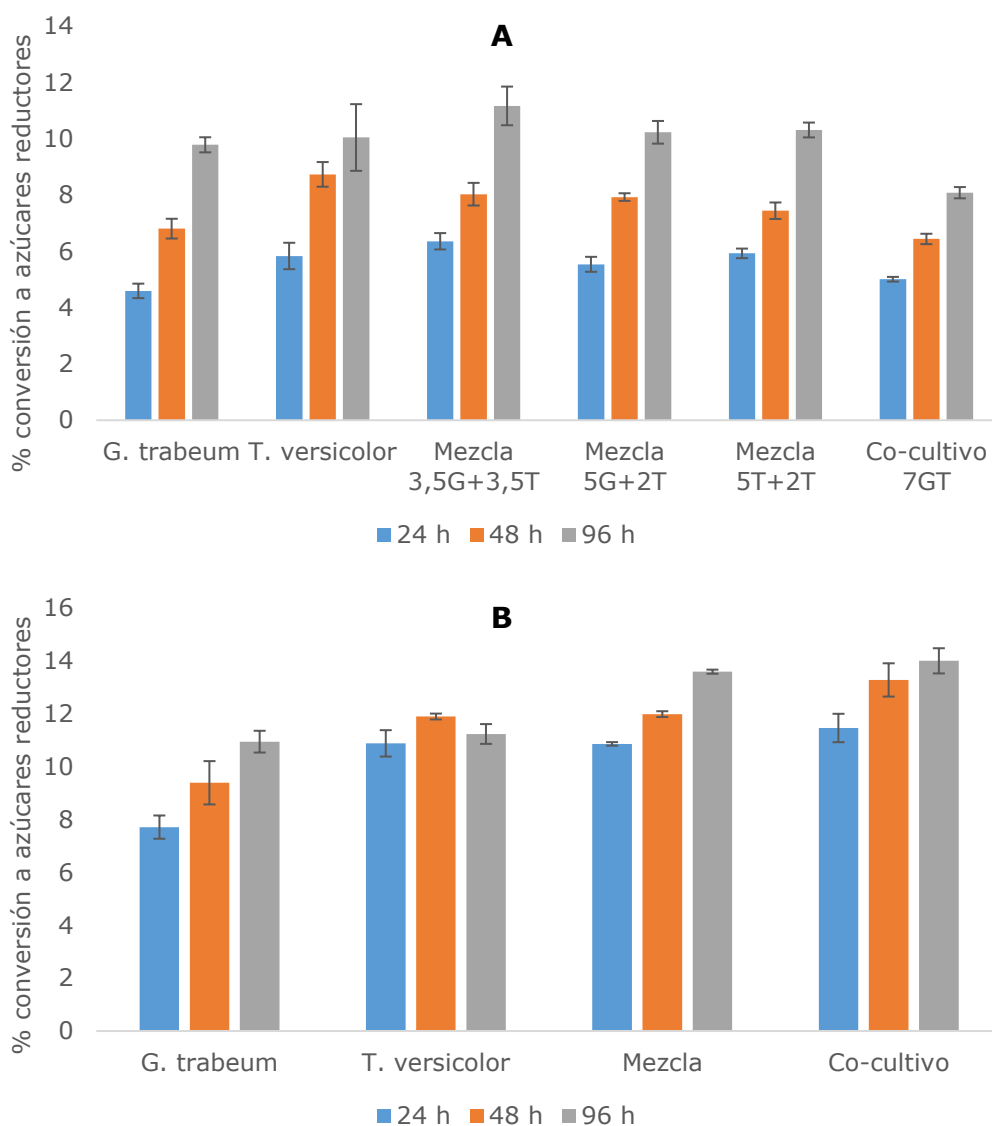


Figura 3.11. Conversión a azúcares reductores en la hidrólisis de paja de trigo al 2% en 1 ml con 7 $\mu\text{g/ml}$ (A) y 36 $\mu\text{g/ml}$ (B) de carga enzimática. *G. trabeum* (G) y *T. versicolor* (T) en μg de proteína.

Con respecto a los porcentajes de conversión a azúcares reductores, no se encontraron efectos sinérgicos en la liberación de azúcares por mezclar las enzimas de *G. trabeum* y *T. versicolor* en las hidrólisis con menos carga enzimática. En las hidrólisis con mayor carga enzimática se observó sinergia apreciable a las 96 horas. Se encontró también que los porcentajes de conversión a azúcares reductores son mucho más grandes que los porcentajes de conversión a glucosa (Figuras 3.9 y 3.11) en los tres tiempos analizados y en todos los casos ya sea con los extractos de los cultivos individuales, mezclas o el co-cultivo. Esto podría ser

debido a deficiencia de enzimas relacionadas con la conversión de los extremos libres de la celulosa, generados por las endoglucanasas, en celobiosa y glucosa como las celobiohidrolasas y las β -glucosidasas, indispensables para una mejor hidrólisis de la celulosa (Martínez-Anaya et al., 2008).

3.4.1. Comparación de los rendimientos con otros trabajos reportados

Las hidrólisis con mayor carga enzimática corresponden a hidrólisis con una concentración de proteína aproximada a la concentración promedio que tuvieron los cultivos individuales en el último día de incubación previo a la concentración de proteínas (Figura 3.3). Por lo tanto, no es tan alejado de la realidad asumir que los rendimientos obtenidos en las hidrólisis serían similares a los que se hubiesen obtenido al utilizar el sobrenadante de los cultivos directamente. Con respecto a esta concentración, las mejores hidrólisis fueron a las 96 h en donde la conversión a azúcares reductores fue de 14% para el co-cultivo y de 13,6% para la mezcla, mientras que la conversión a glucosa fue de 5,5 para el co-cultivo y de 5,9 para la mezcla (ver Figura 3.12).

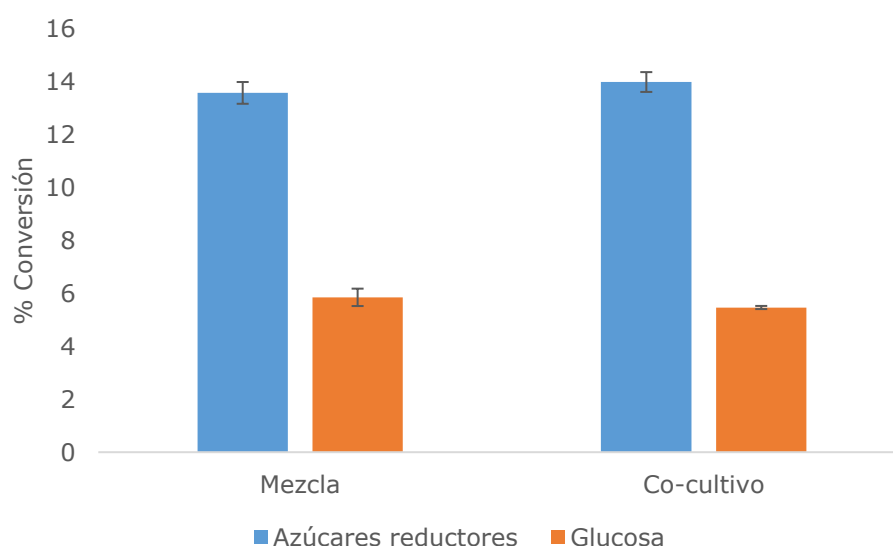


Figura 3.12. Porcentajes de conversión a las 96 horas.

Estos rendimientos son bajos comparados con los rendimientos obtenidos en otros trabajos (Kolasa et al., 2014; Adsul et al., 2014; Saini et al., 2016). Sin embargo, para un análisis más detallado del porqué de esas diferencias en los rendimientos es necesario analizar las condiciones en las que se llevaron a cabo aquellos trabajos como la carga enzimática y el tiempo de incubación.

En la Tabla 3.2 se encuentran resumidos los porcentajes de hidrólisis de paja de trigo de este trabajo y de otros trabajos reportados en la bibliografía en los cuales las hidrólisis se realizaron utilizando extractos enzimáticos crudos provenientes de co-cultivos y de mezclas de cultivos individuales. Se observa que los rendimientos

en la conversión a azúcares reductores en otros trabajos son hasta 5 veces mayores, y en un menor tiempo de hidrólisis (hasta 7 veces mayor en términos de productividad), que los obtenidos en este trabajo. Sin embargo, se observa también que la carga enzimática utilizada en aquellos trabajos fue mucho mayor. Esta elevada carga enzimática no fue porque se haya utilizado exceso de enzima, ya que los extractos enzimáticos crudos fueron sobrenadantes de los cultivos, sino porque los hongos utilizados en aquellos trabajos son hiperproductores de celulasas en los que, por ejemplo, se han encontrado concentraciones de proteínas extracelulares de 5 g/l para *Penicillium janthinellum* (Singhania et al 2014) y hasta 40 g/l para *Trichoderma reesei* (Ortega et al 2001) que contrastan bastante con las concentraciones de proteínas encontradas en este trabajo para *T. versicolor* y *G. trabeum*, alrededor de 40 mg/l.

Tabla 3.2. Comparación de los rendimientos de la hidrólisis de este trabajo con resultados de la literatura

Porcentajes de hidrólisis de paja de trigo junto con las condiciones en las que se realizaron los experimentos.

Fuente del extracto enzimático crudo	Carga enzimática FPU/g PT*	Carga enzimática mg proteína/g PT*	%Hidrólisis Azúcares reductores	%Hidrólisis Glucosa	Tiempo de hidrólisis h	Fuente
Co-cultivo <i>G. trabeum</i> + <i>T. versicolor</i>	0,28	1,8	14,0	5,5	96	Este trabajo
Mezcla <i>G. trabeum</i> + <i>T. versicolor</i>	0,32	1,8	13,6	5,9	96	
Co-cultivo <i>P. funiculosum</i> + <i>P. janthinellum</i>	10,0	-	36,1	-	72	Saini et., al 2016
Mezcla <i>P. funiculosum</i> + <i>P. janthinellum</i>	16,9	40	74,0	-	72	
Mezcla de <i>P. janthinellum</i> + <i>T. reesei</i> + <i>A. tubingensis</i>	16,9	-	63,0	-	72	Adsul et al., 2014

*PT = Paja de trigo.

Para tratar de acercarse a los rendimientos que se muestran en la Tabla 3.2 utilizando las enzimas de *T. versicolor* y *G. trabeum* sería necesario utilizar grandes cantidades del extracto enzimático crudo. Esto, aunque llegase a funcionar, agregaría costos adicionales al proceso de obtención de azúcares desde paja trigo debido a que, en la etapa de producción de los extractos enzimáticos crudos, sería indispensable una etapa de concentración de proteínas la cual requiere grandes cantidades ya sea de productos químicos, energía o ambos.

Sin embargo, resulta interesante notar que, con una carga enzimática 50 veces menor en unidades de papel filtro y 20 veces menor en cantidad de proteína, se obtuvo una hidrólisis del 14%. Esto se le puede atribuir a las enzimas auxiliares

como xilanasas y lacasas identificadas y otras proteínas auxiliares, como las monooxigenasas líticas de polisacáridos, no identificadas en este trabajo pero que se ha conocido que las produce *G. trabeum* y se ha reportado su aporte en la hidrólisis de lignocelulosa (Jung et al., 2015).

Debido a estas observaciones y otras reportadas en la literatura sobre su capacidad para remover lignina y aumentar la porosidad en lignocelulosa (Valmaseda et al., 1991; Calonego et al., 2013; Zhi & Wang, 2014; Kapoor et al., 2015) estos hongos podrían utilizarse juntos o separados para pretratar la lignocelulosa. Esta sería una alternativa para disminuir el consumo de productos químicos como ácidos y álcalis, así como la energía utilizada en los pretratamientos convencionales.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

Se evaluó la capacidad para extraer azúcares desde paja de trigo pretratada de dos complejos enzimáticos lignocelulolíticos obtenidos a partir de cultivos líquidos de hongos de pudrición de la madera.

La paja de trigo utilizada como modelo de lignocelulosa fue analizada para conocer su contenido de glucosa, xilosa y lignina. Con esto, se pudo constatar el efecto que tiene el pretratamiento alcalino en la composición de la paja de trigo. El contenido de lignina pasó de 20,6% a 10,1% y el contenido de xilosa, principal componente de la hemicelulosa, pasó de 16,4% a 6,5%. Esta remoción de lignina y hemicelulosa aumentó el contenido de glucosa, la cual se encuentra en forma de celulosa, de 36,8% a 83,3%.

Se obtuvieron las enzimas de los hongos *G. trabeum* y *T. versicolor*, pero no las de *P. chrysosporium*. Este último hongo presentó problemas en la expresión de proteínas probablemente por la manera en la que fue inoculado. Además, en los co-cultivos en donde estuvo presente, inhibió la producción de proteínas de los demás hongos. Se concluye que en co-cultivos líquidos sólo son compatibles *G. trabeum* y *T. versicolor*.

Se determinó la actividad enzimática en los extractos enzimáticos crudos de *G. trabeum*, *T. versicolor* y el co-cultivo de ambos. *G. trabeum* presentó mayor actividad CMCasa y xilanasas, pero no actividad lacasa; en *T. versicolor* se encontraron la mayor cantidad de enzimas FPasas y lacasas; y el co-cultivo presentó actividades aproximadas al promedio de ambos hongos, pero con baja actividad lacasa.

Existe sinergia en la mezcla de enzimas de *G. trabeum* y *T. versicolor* para hidrolizar paja de trigo pre-tratada. A las 96 horas de reacción, con la mezcla se obtuvo 13,6% en liberación de azúcares reductores y 5,9% en liberación de glucosa. Estos rendimientos son un 24% superiores a los obtenidos en la hidrólisis con enzimas de los hongos sin mezclar.

Un co-cultivo de *G. trabeum* y *T. versicolor* puede producir enzimas con mejor capacidad para obtener azúcares de paja de trigo pretratada que las enzimas de los hongos por separado. A las 96 horas de reacción, con las enzimas del co-cultivo se obtuvo 14% en liberación de azúcares reductores y 5,5% en liberación de glucosa. Estos rendimientos son un 25% superiores a los obtenidos en la hidrólisis con enzimas de los hongos sin mezclar con respecto a la liberación de azúcares reductores y 18% con respecto a la liberación de glucosa.

Se concluye que un complejo enzimático obtenido a partir de mezclas de enzimas de *G. trabeum* y *T. versicolor* y a partir de un co-cultivo de esos hongos, es más eficiente para hidrolizar paja de trigo que usar las enzimas de los hongos individualmente. No existe una diferencia significativa entre los rendimientos de

conversión a azúcares utilizando las enzimas de la mezcla y el co-cultivo, pero este último se considera más ventajoso ya que para su obtención serían necesarios menos equipos fermentadores.

A pesar del mejoramiento logrado en las hidrólisis de paja de trigo con las mezclas de enzimas y con las enzimas del co-cultivo, los rendimientos de liberación de azúcares de 14% son bajos comparados con otros trabajos que también utilizan extractos enzimáticos crudos en donde los rendimientos están alrededor del 75%. Luego de un análisis de aquellos trabajos se encontró que utilizaron una carga enzimática 20 veces mayor en concentración de proteínas y 50 veces mayor en FPU, obtenida desde hongos hiperproductores de celulasas.

4.2. **Recomendaciones**

Con respecto al hongo del que no se obtuvieron las enzimas, se recomienda cultivar a *P. chrysosporium* a partir de esporas. Para co-cultivos con este hongo, se recomienda hacer crecer los hongos en cultivos individuales y posteriormente trasladarlos en un solo cultivo para evitar problemas relacionados con el crecimiento.

Se recomienda probar el pretratamiento alcalino a menores temperaturas y menores concentraciones de NaOH para tratar de disminuir costos asociados a energía y químicos, así como evaluar otros pretratamientos con el objetivo de eliminar lignina, pero no hemicelulosa ya que contiene cantidades importantes de azúcar.

Se recomienda también probar, en cultivos individuales y co-cultivos, distintos tipos de inductores de expresión de proteínas con el objetivo de obtener mayor cantidad de enzimas por masa de hongos.

Ya que, con poca carga enzimática se logró una hidrólisis del 14%, se recomienda experimentar con *G. trabeum* y *T. versicolor*, juntos o por separado, cultivándolos en lignocelulosa como pretratamiento biológico.

BIBLIOGRAFÍA

- Alborés S., Pianzzola M., Soubes M., Cerdeiras M. 2006. Biodegradation of agroindustrial wastes by *Pleurotus spp* for its use as ruminant feed. *Electronic Journal of Biotechnology*. 9, 215-220.
- Appenroth K., Augsten H., Liebermann B., Feist H. 1982. Effects of Light Quality on Amino Acid Composition of Proteins in *Wolffia arrhiza* (L.) WIMM. using a Specially Modified BRADFORD Method. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 177, 251-258.
- Arantes V., Saddler J. 2010. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels* 3, 1-11.
- Baker J., Ehrman C., Adney W., Thomas S., Himmel M. 1998. Hydrolysis of Cellulose Using Ternary Mixtures of Purified Cellulases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 70, 395-403.
- Becer C. 2012. The Glycopolymer Code: Synthesis of Glycopolymers and Multivalent Carbohydrate–Lectin Interactions. *Macromol. Rapid Commun*. 33, 1-11.
- van den Brink J., Maitan-Alfenas G., Zou G., Wang C., Zhou Z., Valéria Monteze V., de Vries R. 2014. Synergistic effect of *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* enzyme sets on the saccharification of wheat straw and sugarcane bagasse. *Biotechnol. J.* 9, 1329–1338.
- Calonego F., Nogueira de Andrade M., Rodrigues D., Dias C., Teixeira de Almeida M., Latorraca J., Durgante E. 2013. Behavior of the Brown-rot Fungus *Gloeophyllum trabeum* on Thermally-modified *Eucalyptus grandis* Wood. *Floresta e Ambiente*. 20, 417-423.
- Carvajal L., G. N. 2014. Búsqueda de enzimas LPMO de hongos para la producción de bioetanol a partir de material lignocelulósico. Tesis para Magíster en Ciencias de la Ingeniería, mención Química. Santiago. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. 30p.
- Chaudhary G., Singh L., Ghosh S. 2012. Alkaline pretreatment methods followed by acid hydrolysis of *Saccharum spontaneum* for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 124, 111–118.
- Chen Y., Sharma-Shivappa R., Keshwani D., Chen C. 2007. Potential of Agricultural Residues and Hay for Bioethanol Production. *Appl Biochem Biotechnol*. 142, 276–290.
- CMNUCC 1998. Protocolo de Kioto sobre el cambio climático (Consultado en http://unfccc.int/portal_espanol/informacion_basica/protocolo_de_kyoto/items/6215.php por última vez el 09 de marzo de 2017).
- Cotoras M., Agosin E. 1992. Regulatory aspects of endoglucanase production by the brown-rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. *Experimental Mycology* 16, 253-260.

- Anthony W., Cunningham J., Harris R. 1969. Hardwood Sawdust as Feed for Ruminants. *Advances in Chemistry. Cellulases and Their Applications*. 19, 315-327.
- Dimarogona M., Topakas E., Olsson L., Christakopoulos P. 2012. Lignin boosts the cellulase performance of a GH-61 enzyme from *Sporotrichum thermophile*. *Bioresource Technology*. 110, 480-487.
- Encinas O., Mora N. 2003. Patrones de degradación de las maderas de Pino caribe, Curarire y Drago por *Gloeophyllum trabeum*, *Trametes versicolor* y *Pycnoporus sanguineus*. *Revista Forestal Venezolana*. 47, 1-14.
- Eriksson K. 1981. Fungal degradation of wood components. *Pure & Appl. Chem*. 53, 33-43.
- Fortes L., Oliveira R., da Silva E. 2010. Cellulases, xylanases, B-glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biochemical Engineering Journal*. 51, 72-78.
- Hatakka A., Hammel K. 2010. Fungal Biodegradation of Lignocelluloses. *Industrial Applications 2nd Ed. The Mycota*. 10, 319-340.
- Hu J., Arantes V., Saddler J. 2011. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? *Biotechnology for Biofuels*. 4, 1-13.
- IPCC 2013. *Climate Change 2013: The Physical Science Basis* (revisado en <http://www.ipcc.ch/report/ar5/wg1/> por última vez el 27 de diciembre de 2016).
- Innventia 2010. Protocol for round robin test of lignin content in lignin samples (COST FP0901). Version 3 (2010-12-14).
- Isikgor F., Remzi C. 2015. Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Platform for Production of Bio-Based Chemicals and Polymers. *Polym. Chem*. 6, 4497-4559.
- Jiménez-Tobon G., Penninckx M., Lejeune. 1997. The relationship between pellet size and production of Mn(II) peroxidase by *P. chrysosporium* in submerged culture. *Enzyme and Microbial Technology*. 21, 537-542.
- Jorgensen H., Bach J., Felby C. 2007. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 1, 119-134.
- Jung S., Song Y., Myeong H., Bae H. 2015. Enhanced lignocellulosic biomass hydrolysis by oxidative lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) GH61 from *Gloeophyllum trabeum*. *Enzyme and Microbial Technology*. 77, 38-45.
- Kapoor R., Rajan K., Carrier D. 2015. Applications of *Trametes versicolor* crude culture filtrates in detoxification of biomass pretreatment hydrolyzates. *Bioresource Technology*. 189, 99-106.

- Kumar R., Wyman C. 2009. Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pretreatment technologies. *Bioresource Technology*. 100, 4203–4213.
- Lee H., Hamid S., Zain S. 2014. Conversion of Lignocellulosic Biomass to Nanocellulose Structure and Chemical Process. *The Scientific World Journal*. 631013, 1-20.
- Ma K., Ruan Z. 2015. Production of a lignocellulolytic enzyme system for simultaneous bio-delignification and saccharification of corn stover employing co-culture of fungi. *Bioresource Technology*. 175, 586–593.
- Manzano Ch., L. R. 2013. Estudio de la producción de proteínas lignocelulíticas para la hidrólisis de trigo por el hongo *Trametes versicolor*. Memoria para Ingeniera Civil en Biotecnología. Santiago. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. 32p.
- Martínez-Anaya C., Balcázar-López E., Dantán-González E., Folch-Mallol J. 2008. Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Rev Latinoam Microbiol*. 50, 119-131.
- Michel F., Dass S., Grulke E., Reddy C. 1991. Role of Manganese Peroxidases and Lignin Peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* in the Decolorization of Kraft Bleach Plant Effluent. *Applied and Environmental Microbiology*. 57, 2368-2375.
- Molla A., Fakhru'l-Razi A., Hanafi M., Alam Z. 2001. In-vitro compatibility evaluation of fungal mixed culture for bioconversion of domestic wastewater sludge. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 17, 849–856.
- Ortega N., Busto M., Perez-Mateos M. 2001. Kinetics of cellulose saccharification by *Trichoderma reesei* cellulases. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 47, 7-14.
- Pal R., Chakraborty S. 2013. A novel mixing strategy for maximizing yields of glucose and reducing sugar in enzymatic hydrolysis of cellulose. *Bioresource Technology*. 148, 611–614.
- Paszczynski A., Crawford R., Huynh V. 1988. Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: Purification. *Methods in Enzymology*. 161, 264-270.
- Pavlostathis S., Gossett J. 1985. Alkaline treatment of wheat straw for increasing anaerobic biodegradability. *Biotechnology and Bioengineering*. 27, 334-344.
- Qing Q., Yang B., Wyman C. 2010. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresource Technology*. 101, 9624–9630.
- Quiroz-Castañeda R., Folch-Mallol J. 2011. Plant cell wall degrading and remodeling proteins, current perspectives. *Biotecnología Aplicada*. 28, 205-215.

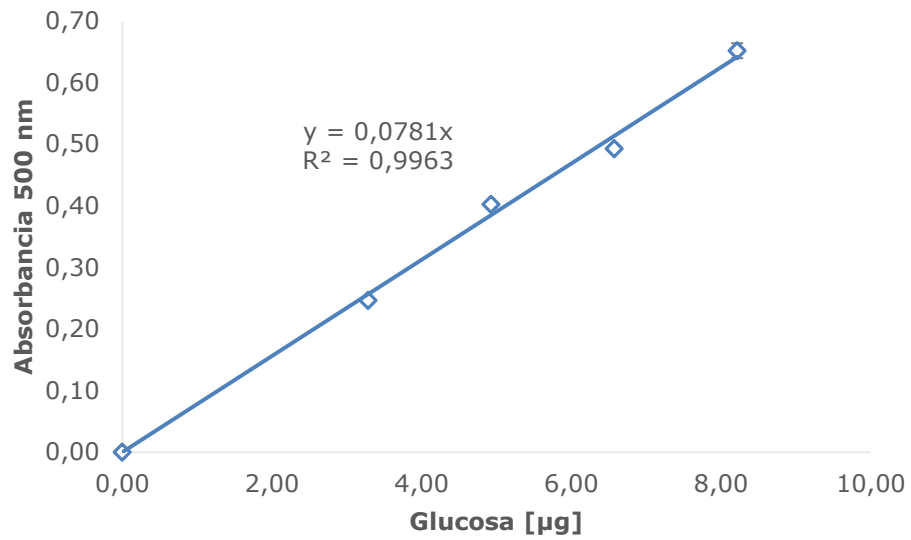
- Raghuwanshi S., Misra S., Saxena R. 2014. Treatment of wheat straw using tannase and white-rot fungus to improve feed utilization by ruminants. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 5, 1-8.
- Rana V., Eckard A., Teller P., Ahring B. 2014. On-site enzymes produced from *T. reesei* RUT-C30 and *Aspergillus saccharolyticus* for hydrolysis of wet exploded corn stover and loblolly pine. *Bioresource Technology*. 154, 282–289.
- Rasmussen M., Shrestha P., Khanal S., Pometto A., van Leeuwen J. 2010. Sequential saccharification of corn fiber and ethanol production by the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. *Bioresource Technology*. 101, 3526–3533.
- Saini J., Singhanian R., Satlewal A., Saini R., Gupta R., Tuli D., Mathur A., Adsul M. 2016. Improvement of wheat straw hydrolysis by cellulolytic blends of two *Penicillium spp.* *Renewable Energy*. 98, 43-50.
- Sáiz-Jiménez C. 1983. Posibles aplicaciones del hongo *Phanerochaete chrysosporium* Burds. en Biotecnología. Libro de Comunicaciones II Reunión Científica de Microbiología Industrial. Sevilla, España. 2-9.
- Schlosser D., Grey R., Fritsche W. 1997. Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. *Appl Microbiol Biotechnol*. 47, 412-418.
- Sharma B., Agrawal R., Rani R., Satlewal A., Mathur A., Tuli D., Adsul M. 2015. Untreated wheat straw: Potential source for diverse cellulolytic enzyme secretion by *Penicillium janthinellum* EMS-UV-8 mutant. *Bioresource Technology*. 196, 518–524.
- Sharma R., Arora D. 2010. Production of lignocellulolytic enzymes and enhancement of in vitro digestibility during solid state fermentation of wheat straw by *Phlebia floridensis*. *Bioresource Technology*. 101, 9248-9253.
- Shrestha P., Rasmussen M., Khanal S., Pometto III A., van Leewen J. 2008. Solid-Substrate Fermentation of Corn Fiber by *Phanerochaete chrysosporium* and Subsequent Fermentation of Hydrolysate into Ethanol. *J. Agric. Food Chem*. 56, 3918–3924.
- Silva-Fernandes T., Duarte L., Carvalheiro., Marques S., Loureiro-Dias M., Fonseca C., Gírio F. 2015. Biorefining strategy for maximal monosaccharide recovery from three different feedstocks: Eucalyptus residues, wheat straw and olive tree pruning. *Bioresource Technology*. 183, 203–212.
- Singhanian R., Kumar J., Saini R., Adsul M., Mathur A., Gupta R., Kumar D. 2014. Bioethanol production from wheat straw via enzymatic route employing *Penicillium janthinellum* cellulases. *Bioresource Technology*. 169, 490–495.
- Sun Y., Cheng J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. 83, 1–11.

- Suwannarangsee S., Bunterngsook B., Arnthong J., Paemenee A., Thamchaipenet A., Eurwilaichitr L., Laosiripojana N., Champreda V. 2012. Optimisation of synergistic biomass-degrading enzyme systems for efficient rice straw hydrolysis using an experimental mixture design. *Bioresource Technology*. 119, 252–261.
- Szczodrak J. 1987. The enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*. 32, 771-776.
- Tien M., Kirk T. 1988. Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymology*. 161, 238-249.
- Valmaseda M., Martínez M., Martínez A. 1991. Kinetics of wheat straw solid-state fermentation with *Trametes versicolor* and *Pleurotus ostreatus* - lignin and polysaccharide alteration and production of related enzymatic activities. *Appl Microbiol Biotechnol*. 35, 817-823.
- Villas-Bôas S., Esposito E., Mitchell D. 2002. Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 98, 1–12.
- Wood T., Bhat K. 1988. Methods for Measuring Cellulase Activities. *Methods in Enzymology*. 160, 87-112.
- Xavier A., Mora A., Ferreira R., Amado F. 2007. *Trametes versicolor* growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry. *Electron. J. Biotechnol*. 10, 444-451.
- Yang B., Dai Z., Ding S., Wyman C. 2011. Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass. *Biofuels*. 2, 421-449.
- Zhang S., Jiang M., Zhou Z., Zhao M., Li Y. 2012. Selective removal of lignin in steam-exploded rice straw by *Phanerochaete chrysosporium*. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 75, 89-95.
- Zhi Z., Wang H. 2014. White-rot fungal pretreatment of wheat straw with *Phanerochaete chrysosporium* for biohydrogen production: simultaneous saccharification and fermentation. *Bioprocess Biosyst Eng*. 37,1447-1458.

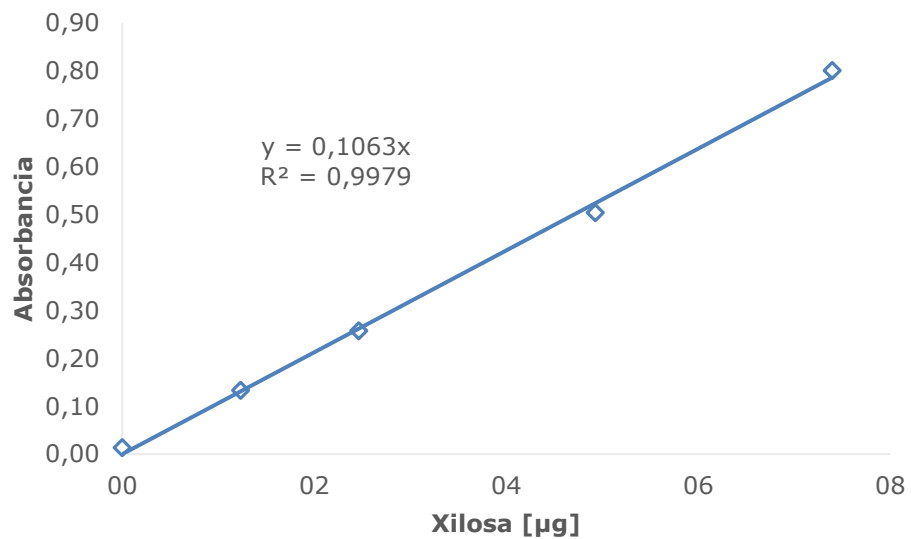
ANEXOS

A. ANEXOS DE LOS MATERIALES Y MÉTODOS

a. Curvas estándar de los kits de glucosa y xilosa.

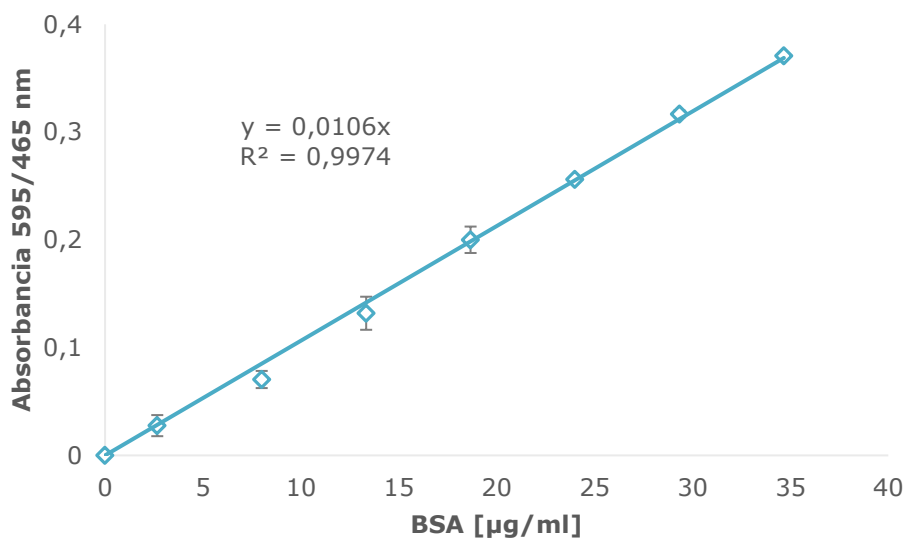


Curva estándar de glucosa con kit GOD-PAD de Randox escalado para concentraciones 10 veces menores al protocolo original.

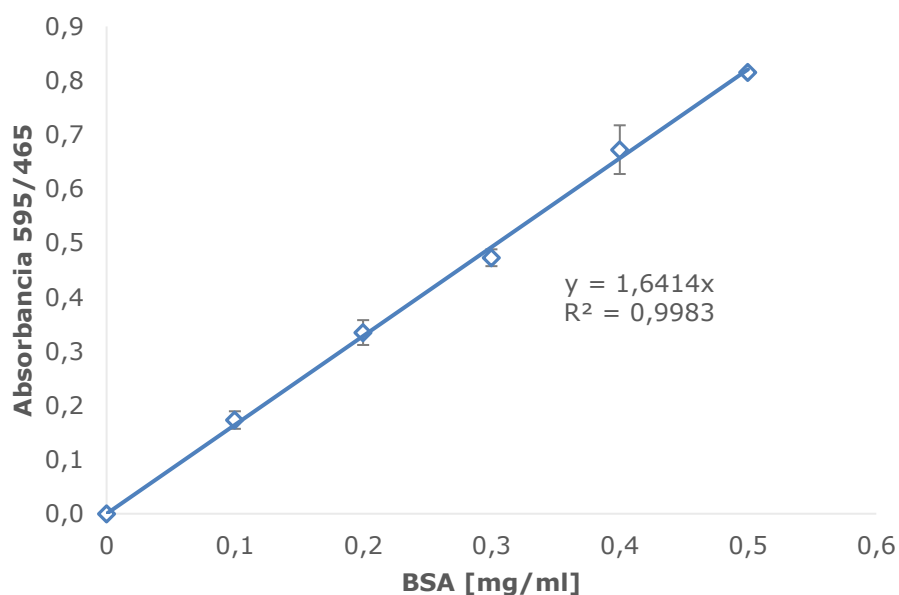


Curva estándar de xilosa con kit D-Xylose de Megazyme escalado para concentraciones 10 veces menores al protocolo original.

b. Curvas estándar de concentración de proteínas con el reactivo de Bradford.

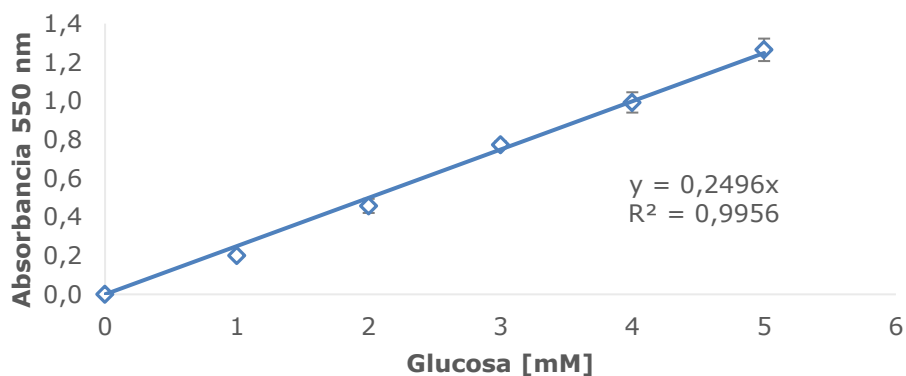


Curva estándar de proteínas para muestras con bajas concentraciones de proteína.

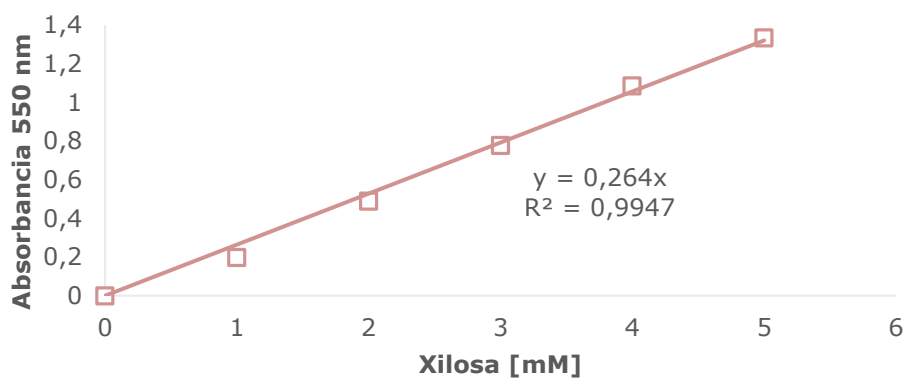


Curva estándar de proteínas para muestras con altas concentraciones de proteína.

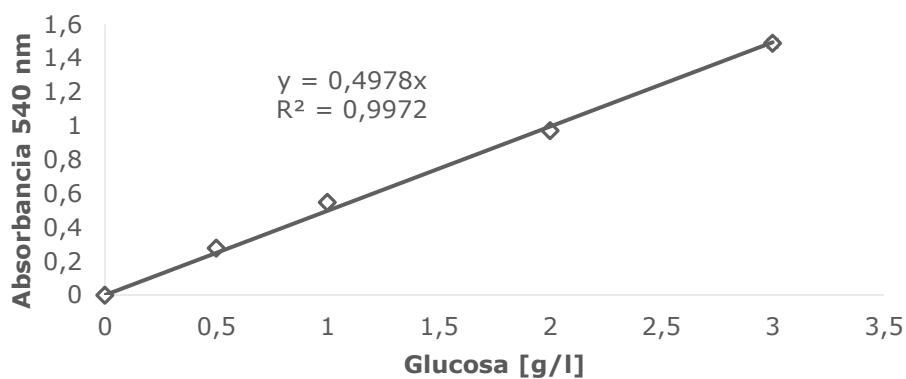
c. Curvas estándar de concentración de azúcares reductores para distintas actividades enzimáticas.



Curva estándar de concentración de azúcares reductores con glucosa para la actividad CMCasa.



Curva estándar de concentración de azúcares reductores con xilosa para la actividad xilanasa.



Curva estándar de concentración de azúcares reductores con glucosa para la actividad en papel filtro, FPU.

d. Cálculos en la preparación del inóculo para los cultivos de producción de enzimas.

Cantidad de inóculo agregado a para los cultivos de producción de enzimas

Hongo/repetición	caja seca [g]	caja + muestra seca [g]	muestra seca [g]	muestra, [mg/ml]	promedio	error	tomar para 40 mg
<i>T. versicolor</i> (1)	0.6214	0.6279	0.0065	13.0	13.2	± 0.28	3.03 ml
<i>T. versicolor</i> (2)	0.7454	0.7521	0.0067	13.4			
<i>G. trabeum</i> (1)	0.7325	0.7395	0.007	14.0	14.5	± 0.71	2.76 ml
<i>G. trabeum</i> (2)	0.6751	0.6826	0.0075	15.0			

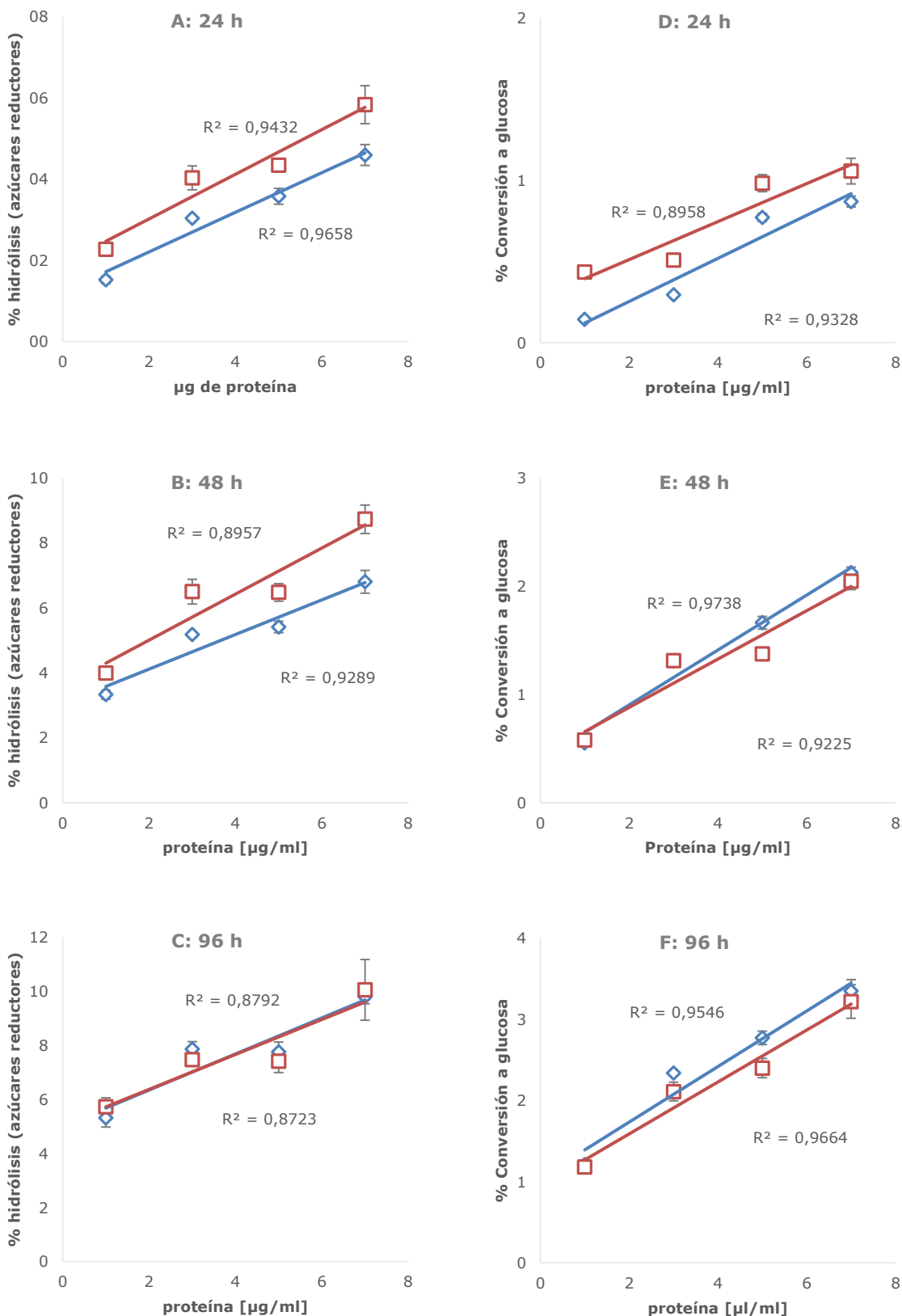
e. Balance de materia en el pretratamiento alcalino.

Balance de materia para 100 g de paja de trigo a tratar.

Componentes	Sin tratar (%)	Tratada (%)	Agua de lavado (g)	Masa residual (g)	% pérdidas.
Glucosa	36.8	83.3	4.05	32.8	10.9
Xilosa	16.4	6.50		2.56	84.4
Lignina	20.6	10.1		3.98	80.7

B. ANEXOS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a. Tendencia de liberación de azúcares en las hidrólisis de PTP.



Tendencia de liberación de azúcares reductores (A, B y C) y de glucosa (E, F y G) en tres tiempos de hidrólisis de paja de trigo al 2% para varias concentraciones de EEC de *G. trabeum* (rombo) y *T. versicolor* (cuadrado).

b. Análisis estadístico en los experimentos de hidrólisis de paja de trigo pretratada.

Los análisis se realizaron con ayuda del programa STATGRAPHICS Centurion XVII. Se realizaron los siguientes análisis:

➤ Tabla ANOVA

La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Si el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 4 variables con un nivel del 95,0% de confianza.

➤ Pruebas de Múltiple Rangos

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Se muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 4 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

A continuación, se muestran los análisis estadísticos descritos correspondientes a los tipos de conversión y a los distintos tiempos.

Porcentaje de conversión a azúcares reductores con 7 µg/ml: 24 horas.

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	62261,3	5	12452,3	12,87	0,0003
Intra grupos	10642,5	11	967,5		
Total (Corr.)	72903,8	16			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95,0 porcentaje LSD

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
G. trabeum - T. versicolor	*	-124,0	55,8982
G. trabeum - Mezcla 3.5G+3.5T	*	-175,833	62,4961
G. trabeum - Mezcla 5G+2T	*	-94,3333	55,8982
G. trabeum - Mezcla 2G+5T	*	-133,333	55,8982
G. trabeum - Co-cultivo		-21,0	55,8982
T. versicolor - Mezcla 3.5G+3.5T		-51,8333	62,4961
T. versicolor - Mezcla 5G+2T		29,6667	55,8982
T. versicolor - Mezcla 2G+5T		-9,33333	55,8982
T. versicolor - Co-cultivo	*	103,0	55,8982
Mezcla 3.5G+3.5T - Mezcla 5G+2T	*	81,5	62,4961
Mezcla 3.5G+3.5T - Mezcla 2G+5T		42,5	62,4961
Mezcla 3.5G+3.5T - Co-cultivo	*	154,833	62,4961
Mezcla 5G+2T - Mezcla 2G+5T		-39,0	55,8982
Mezcla 5G+2T - Co-cultivo	*	73,3333	55,8982
Mezcla 2G+5T - Co-cultivo	*	112,333	55,8982

* indica una diferencia significativa.

Porcentaje de conversión a azúcares reductores con 7 µg/ml: 48 horas.

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	285543,	5	57108,5	1,34	0,3110
Intra grupos	509769,	12	42480,8		
Total (Corr.)	795312,	17			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95,0 porcentaje LSD

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
G. trabeum - T. versicolor		-192,667	366,667
G. trabeum - Mezcla 3.5G+3.5T		165,667	366,667
G. trabeum - Mezcla 5G+2T		-112,0	366,667
G. trabeum - Mezcla 2G+5T		-154,0	366,667
G. trabeum - Co-cultivo		59,0	366,667
T. versicolor - Mezcla 3.5G+3.5T		358,333	366,667
T. versicolor - Mezcla 5G+2T		80,6667	366,667
T. versicolor - Mezcla 2G+5T		38,6667	366,667
T. versicolor - Co-cultivo		251,667	366,667
Mezcla 3.5G+3.5T - Mezcla 5G+2T		-277,667	366,667
Mezcla 3.5G+3.5T - Mezcla 2G+5T		-319,667	366,667
Mezcla 3.5G+3.5T - Co-cultivo		-106,667	366,667
Mezcla 5G+2T - Mezcla 2G+5T		-42,0	366,667
Mezcla 5G+2T - Co-cultivo		171,0	366,667
Mezcla 2G+5T - Co-cultivo		213,0	366,667

* indica una diferencia significativa.

Porcentaje de conversión a azúcares reductores con 7 µg/ml: 96 horas.

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	176386,	5	35277,1	8,88	0,0014
Intra grupos	43713,3	11	3973,94		
Total (Corr.)	220099,	16			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95,0 porcentaje LSD

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
G. trabeum - T. versicolor		-26,0	113,288
G. trabeum - Mezcla 3.5G+3.5T	*	-138,333	113,288
G. trabeum - Mezcla 5G+2T		-44,0	113,288
G. trabeum - Mezcla 2G+5T		-52,6667	126,66
G. trabeum - Co-cultivo	*	189,0	113,288
T. versicolor - Mezcla 3.5G+3.5T		-112,333	113,288
T. versicolor - Mezcla 5G+2T		-18,0	113,288
T. versicolor - Mezcla 2G+5T		-26,6667	126,66
T. versicolor - Co-cultivo	*	215,0	113,288
Mezcla 3.5G+3.5T - Mezcla 5G+2T		94,3333	113,288
Mezcla 3.5G+3.5T - Mezcla 2G+5T		85,6667	126,66
Mezcla 3.5G+3.5T - Co-cultivo	*	327,333	113,288
Mezcla 5G+2T - Mezcla 2G+5T		-8,66667	126,66
Mezcla 5G+2T - Co-cultivo	*	233,0	113,288
Mezcla 2G+5T - Co-cultivo	*	241,667	126,66

* indica una diferencia significativa.

Porcentaje de conversión a glucosa con 7 µg/ml: 24 horas.

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	48447,8	5	9689,57	18,81	0,0000
Intra grupos	6182,67	12	515,222		
Total (Corr.)	54630,5	17			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95,0 porcentaje LSD

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
G. trabeum - T. versicolor		-18,6667	40,3806
G. trabeum - Mezcla 3.5:3.5		-32,6667	40,3806
G. trabeum - Mezcla 5:2		-21,3333	40,3806
G. trabeum - Mezcla 2:5		-26,0	40,3806
G. trabeum - Co-cultivo	*	-156,333	40,3806
T. versicolor - Mezcla 3.5:3.5		-14,0	40,3806
T. versicolor - Mezcla 5:2		-2,66667	40,3806
T. versicolor - Mezcla 2:5		-7,33333	40,3806
T. versicolor - Co-cultivo	*	-137,667	40,3806
Mezcla 3.5:3.5 - Mezcla 5:2		11,3333	40,3806
Mezcla 3.5:3.5 - Mezcla 2:5		6,66667	40,3806
Mezcla 3.5:3.5 - Co-cultivo	*	-123,667	40,3806
Mezcla 5:2 - Mezcla 2:5		-4,66667	40,3806
Mezcla 5:2 - Co-cultivo	*	-135,0	40,3806
Mezcla 2:5 - Co-cultivo	*	-130,333	40,3806

* indica una diferencia significativa.

Porcentaje de conversión a glucosa con 7 µg/ml: 48 horas.

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	5286,28	5	1057,26	3,46	0,0362
Intra grupos	3663,33	12	305,278		
Total (Corr.)	8949,61	17			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95,0 porcentaje LSD

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
G. trabeum - T. versicolor		7,33333	31,083
G. trabeum - Mezcla 3.5:3.5		-29,6667	31,083
G. trabeum - Mezcla 5:2		-26,3333	31,083
G. trabeum - Mezcla 2:5		-12,3333	31,083
G. trabeum - Co-cultivo		17,3333	31,083
T. versicolor - Mezcla 3.5:3.5	*	-37,0	31,083
T. versicolor - Mezcla 5:2	*	-33,6667	31,083
T. versicolor - Mezcla 2:5		-19,6667	31,083
T. versicolor - Co-cultivo		10,0	31,083
Mezcla 3.5:3.5 - Mezcla 5:2		3,33333	31,083
Mezcla 3.5:3.5 - Mezcla 2:5		17,3333	31,083
Mezcla 3.5:3.5 - Co-cultivo	*	47,0	31,083
Mezcla 5:2 - Mezcla 2:5		14,0	31,083
Mezcla 5:2 - Co-cultivo	*	43,6667	31,083
Mezcla 2:5 - Co-cultivo		29,6667	31,083

* indica una diferencia significativa.

Porcentaje de conversión a glucosa con 7 µg/ml: 96 horas.

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	25166,7	5	5033,33	5,61	0,0068
Intra grupos	10765,3	12	897,111		
Total (Corr.)	35932,0	17			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95,0 porcentaje LSD

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
G. trabeum - T. versicolor		13,0	53,2842
G. trabeum - Mezcla 3.5:3.5		-28,3333	53,2842
G. trabeum - Mezcla 5:2		-34,6667	53,2842
G. trabeum - Mezcla 2:5		-39,0	53,2842
G. trabeum - Co-cultivo	*	69,0	53,2842
T. versicolor - Mezcla 3.5:3.5		-41,3333	53,2842
T. versicolor - Mezcla 5:2		-47,6667	53,2842
T. versicolor - Mezcla 2:5		-52,0	53,2842
T. versicolor - Co-cultivo	*	56,0	53,2842
Mezcla 3.5:3.5 - Mezcla 5:2		-6,33333	53,2842
Mezcla 3.5:3.5 - Mezcla 2:5		-10,6667	53,2842
Mezcla 3.5:3.5 - Co-cultivo	*	97,3333	53,2842
Mezcla 5:2 - Mezcla 2:5		-4,33333	53,2842
Mezcla 5:2 - Co-cultivo	*	103,667	53,2842
Mezcla 2:5 - Co-cultivo	*	108,0	53,2842

* indica una diferencia significativa.

Porcentaje de conversión a azúcares reductores con 36 µg/ml: 24 horas.

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2622,25	3	874,083	44,82	0,0000
Intra grupos	156,0	8	19,5		
Total (Corr.)	2778,25	11			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95,0 porcentaje LSD

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
G. trabeum - T. versicolor	*	-31,6667	8,31444
G. trabeum - Mezcla	*	-31,6667	8,31444
G. trabeum - Co-cultivo	*	-37,6667	8,31444
T. versicolor - Mezcla		0	8,31444
T. versicolor - Co-cultivo		-6,0	8,31444
Mezcla - Co-cultivo		-6,0	8,31444

* indica una diferencia significativa.

Porcentaje de conversión a azúcares reductores con 36 µg/ml: 48 horas.

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2230,92	3	743,639	28,88	0,0001
Intra grupos	206,0	8	25,75		
Total (Corr.)	2436,92	11			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95,0 porcentaje LSD

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
G. trabeum - T. versicolor	*	-21,3333	9,55442
G. trabeum - Mezcla	*	-26,0	9,55442
G. trabeum - Co-cultivo	*	-37,6667	9,55442
T. versicolor - Mezcla		-4,66667	9,55442
T. versicolor - Co-cultivo	*	-16,3333	9,55442
Mezcla - Co-cultivo	*	-11,6667	9,55442

* indica una diferencia significativa.

Porcentaje de conversión a azúcares reductores con 36 µg/ml: 96 horas.

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2030,55	3	676,848	48,35	0,0000
Intra grupos	98,0	7	14,0		
Total (Corr.)	2128,55	10			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95,0 porcentaje LSD

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
G. trabeum - T. versicolor		-2,66667	8,07675
G. trabeum - Mezcla	*	-26,6667	8,07675
G. trabeum - Co-cultivo	*	-30,6667	8,07675
T. versicolor - Mezcla	*	-24,0	7,22406
T. versicolor - Co-cultivo	*	-28,0	7,22406
Mezcla - Co-cultivo		-4,0	7,22406

* indica una diferencia significativa.

Porcentaje de conversión a glucosa con 36 µg/ml: 24 horas.

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	27219,0	3	9073,0	45,57	0,0000
Intra grupos	1592,67	8	199,083		
Total (Corr.)	28811,7	11			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95,0 porcentaje LSD

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
G. trabeum - T. versicolor	*	-55,6667	26,5664
G. trabeum - Mezcla	*	-117,0	26,5664
G. trabeum - Co-cultivo	*	-112,0	26,5664
T. versicolor - Mezcla	*	-61,3333	26,5664
T. versicolor - Co-cultivo	*	-56,3333	26,5664
Mezcla - Co-cultivo		5,0	26,5664

* indica una diferencia significativa.

Porcentaje de conversión a glucosa con 36 µg/ml: 48 horas.

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	38518,9	3	12839,6	40,58	0,0000
Intra grupos	2531,33	8	316,417		
Total (Corr.)	41050,3	11			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
G. trabeum - T. versicolor	*	-49,6667	33,4923
G. trabeum - Mezcla	*	-137,333	33,4923
G. trabeum - Co-cultivo	*	-127,333	33,4923
T. versicolor - Mezcla	*	-87,6667	33,4923
T. versicolor - Co-cultivo	*	-77,6667	33,4923
Mezcla - Co-cultivo		10,0	33,4923

* indica una diferencia significativa.

Porcentaje de conversión a glucosa con 36 µg/ml: 96 horas.

Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	34602,3	3	11534,1	17,80	0,0007
Intra grupos	5182,67	8	647,833		
Total (Corr.)	39784,9	11			

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
G. trabeum - T. versicolor		6,0	47,9233
G. trabeum - Mezcla	*	-120,0	47,9233
G. trabeum - Co-cultivo	*	-81,6667	47,9233
T. versicolor - Mezcla	*	-126,0	47,9233
T. versicolor - Co-cultivo	*	-87,6667	47,9233
Mezcla - Co-cultivo		38,3333	47,9233

* indica una diferencia significativa.