



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS LIGNOCELULÍTICAS PARA LA
HIDRÓLISIS DE TRIGO POR EL HONGO *TRAMETES VERSICOLOR*

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

LISSET RENEÉ MANZANO CHÁVEZ

PROFESOR GUÍA:
ORIANA SALAZAR AGUIRRE

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS
BARBARA ANDREWS FARROW

SANTIAGO DE CHILE
ABRIL 2013

Resumen

En las últimas décadas se han estudiado y utilizado las energías renovables no convencionales como una alternativa a los combustibles fósiles. Dentro de éstas se encuentra el bioetanol de segunda generación, producido a partir de residuos lignocelulósicos, siendo la hidrólisis de celulosa una de las etapas claves en el proceso productivo. Uno de los métodos de hidrólisis, es el uso de enzimas producidas por hongos de pudrición que degradan naturalmente la madera. Bajo este marco se define el objetivo general de este trabajo, que es estudiar la producción de proteínas hidrolíticas para la degradación de lignocelulosa por el hongo de pudrición blanca *Trametes versicolor*.

La metodología se dividió en dos ejes principales: definir las condiciones de cultivo de *T. versicolor* que induzcan la producción de proteínas hidrolíticas, y caracterizar tales proteínas mediante ensayos de actividad de celulasas y ligninasas, utilizando sustratos puros y paja de trigo. El cultivo del hongo se realizó a 28°C, 50 rpm de agitación y en oscuridad. El medio elegido fue adaptado del artículo de Suwannarangsee *et al.* (2012)[1], y contenía además 1 % p/v de paja de trigo. Este cultivo se inoculó con el hongo en una preparación líquida, y se incubó por 11 días, alcanzando una actividad celulasa de 0,5 [IU/ml] (promedio de los 6 matraces) al cabo de este periodo.

La separación de proteínas obtenidas del cultivo se hizo mediante cromatografía de filtración en gel en columna Sephacryl S-100. En esta etapa se recuperó un 18 % de proteínas totales, y se logró un enriquecimiento enzimático de 35,96 [IU/mg proteína], triplicando el valor obtenido por el extracto proteico que fue cargado en la columna. Estas proteínas fraccionadas se sometieron a ensayos de celulasas y ligninasas, en los cuales se obtuvo que los mayores valores de actividad estaban entre las fracciones 23 a 28, coincidentes con el peak de absorbancia a 280 nm. Además, se pudo constatar un alto enriquecimiento de xilanasas con 32,9 [IU/mg prot.], versus el extracto proteico con 3,1 [IU/mg prot.].

Por otro lado, se realizó una hidrólisis con paja de trigo, para comparar la acción enzimática de las fracciones proteicas con respecto a Celluclast. Se pudo concluir que no existe sinergia entre ambos componentes, pero si hay una contribución a la acción de la enzima comercial por parte de las proteínas de *T. versicolor*. Esto se evidenció principalmente en la medición de xilosa, en la cual hubo un mejoramiento de un 47 % en la fracción 27. El rendimiento enzimático fue de 2,11 [mg xilosa/mg proteína], siendo más del doble de lo obtenido por las celulasas comerciales en la hidrólisis de paja de trigo.

Finalmente, se concluyó que el sistema de separación es eficiente para tener una primera aproximación de las enzimas buscadas dentro de las fracciones cromatográficas, y enriquecer tales fracciones con las proteínas de interés. También fue posible constatar que existe un gran potencial hidrolítico dado por la batería enzimática del hongo *T. versicolor*, especialmente por las xilanasas producidas por éste. Esto es muy relevante para la etapa de sacarificación, ya que el xilano como sustrato es el segundo más abundante después de la celulosa, y por ende, con gran potencial fermentativo.

A mis padres

Agradecimientos

Al fin llegó este momento, y lo primero que pienso es en lo agradecida que me siento de mi familia. A mis padres, por todo el amor y el esfuerzo que pusieron en mi enseñanza, que desde pequeña me inculcaron que debía llegar a la universidad y ser una excelente profesional. También, a mis hermanas que fueron mi modelo a seguir, siempre estudiosas, perfeccionistas en sus trabajos, esforzadas como mis padres. A ellos les agradezco todo el apoyo y la comprensión en estos 7 años... que no fueron fáciles.

Al término de esta etapa me doy cuenta que el título no es lo más importante, sino el camino que recorrí para llegar hasta acá. Estar en la universidad fue muy difícil, mucho más de lo que imaginaba cuando estaba en el colegio soñando ser científica. Sin embargo, este camino se hizo más llevadero al tener siempre a mi lado a mi compañero, mi confidente, al amor de mi vida. Cristóbal, este trabajo también te lo dedico a ti, por todo el apoyo que me has dado en estos 10 años, y que en parte fuiste responsable de que entrara a Beauchef.

Quisiera agradecerles a mis amigas de la vida, las que conocí a los 12 años en el Liceo N°1 de niñas, y que nunca me han dejado de lado: Tanya, Nicsia, María Olga, Denisse, Marcela, y en especial a mi partner María Ester. También a quienes estuvieron presentes en esos años de liceo, entregándome mucho cariño y buenos momentos. Aprovecho esta instancia de agradecer a los grandes profesores que conocí ahí, que me entregaron valiosas enseñanzas de vida y me motivaron a lograr mis metas.

En la U conocí también mucha gente valiosa, diversas personalidades, intereses y sueños, a todos ellos que humanizan esta fría facultad les doy las gracias, por las risas, los carretes, y las tardes de estudio. En un lugar especial están mis grandes amigos de primer año: Fefi, Nachi y Naty; si no los hubiera conocido a ustedes en la sección 4, quizás me hubiera rendido después de ese difícil año.

Al entrar a biotecnología me dí cuenta que todo el esfuerzo de plan común había valido la pena... era lo que siempre había querido. En el DIQBT conocí a grandes personas, a quienes les doy las gracias por soportarme y aceptarme en la gran familia que es. Javier y Gonzalo gracias por apañarme siempre en los trabajos grupales. Trini (comadre!), Carlitos, Becky, Javita, Naty buena, Naty V. Amigos y compañeros, los quiero mucho!

Finalmente quisiera mencionar a la gente del CIByB, quienes amenizaron esas largas jornadas de laboratorio. Le agradezco muchísimo toda la ayuda a Nancy, siempre con muy buena disposición a ayudar. A mi profesora guía Oriana Salazar, por ser tan comprensiva, siempre dispuesta a escucharme y aconsejarme, muchas gracias por todo.

Tabla de contenido

Índice de tablas	viii
Índice de figuras	x
1. Introducción	1
1.1. Marco teórico	3
1.1.1. Biomasa lignocelulósica	3
1.1.2. Bioetanol	5
1.1.3. Proceso productivo del bioetanol	7
1.1.4. Hongos de pudrición blanca	12
1.1.5. Enzimas hidrolíticas	13
1.2. Motivación	16
1.3. Objetivos	17
1.4. Alcances del estudio	17
2. Materiales y Métodos	18
2.1. Materiales	19
2.1.1. Material biológico	19
2.1.2. Material químico	19
2.2. Definición de condiciones de cultivo del hongo	20
2.2.1. Preparación de medios de cultivo	20
2.2.2. Preparación de pre inóculo	20
2.2.3. Pretratamiento de paja de trigo con ácido sulfúrico	21
2.2.4. Preparación de cultivo definitivo	21
2.3. Ensayos de actividad de celulasas	21
2.4. Extracción y concentración de proteínas	22
2.5. Separación de proteínas del extracto por cromatografía de filtración en gel	23
2.5.1. Ensayo Bradford	23
2.6. Ensayos de actividad específicos	23
2.6.1. Ensayos de celulasas y xilanasas	23
2.6.2. Ensayos de ligninasas	24
2.7. Hidrólisis de paja de trigo con fracciones y enzima comercial	25
2.7.1. Pretratamiento de paja de trigo con hidróxido de sodio	26
2.8. Electroforesis de fracciones	26
2.9. Estimación del rendimiento hidrolítico	26
3. Resultados y Discusión	28

3.1.	Definición de condiciones de cultivo	28
3.1.1.	Curvas de producción de celulasas por <i>T. versicolor</i>	29
3.1.2.	Medio de cultivo elegido	32
3.2.	Evaluación de la separación de proteínas de <i>Trametes versicolor</i>	33
3.2.1.	Extracción de proteínas desde el cultivo de <i>T. versicolor</i>	33
3.2.2.	Fraccionamiento de proteínas de <i>T. versicolor</i> por cromatografía de filtración	34
3.2.3.	Ensayos de actividad específicos	35
3.3.	Hidrólisis de paja de trigo por proteínas de <i>T. versicolor</i> fraccionadas en cromatografía de filtración	41
3.4.	Caracterización electroforérica de las proteínas fraccionadas de <i>T. versicolor</i>	46
3.5.	Estimación del rendimiento hidrolítico y potencial fermentativo	49
4.	Conclusiones	52
	Bibliografía	56
A.	Anexo del marco teórico	60
A.1.	Estructura de la pared celular vegetal	60
A.2.	Esquema de Hidrólisis	61
A.3.	Mecanismo de degradación de lignina	62
B.	Anexo de Metodología	64
B.1.	Composición medios de cultivo	64
B.1.1.	Medio 1	64
B.1.2.	Medio 2	66
B.1.3.	Medio 3	66
B.1.4.	Medio A	67
B.1.5.	Medio B	68
B.1.6.	Medio L1	69
B.2.	Protocolos	70
B.2.1.	Electroforesis SDS Page	70
B.2.2.	Tinción con plata	70
C.	Anexo de Resultados	71
C.1.	Figuras del cultivo de <i>T.versicolor</i>	71
C.1.1.	Experimento con distintos medios de cultivo	71
C.1.2.	Cultivo definitivo	72
C.2.	Tablas de resultados	73
C.2.1.	Actividad en distintos medios de cultivo	73
C.2.2.	Actividad en cultivo definitivo	74
C.2.3.	Bradford de fracciones cromatográficas	75
C.2.4.	Ensayos de actividad enzimáticos	76
C.2.5.	Ensayo de hidrólisis de paja de trigo	82
C.2.6.	Rendimiento hidrolítico	85
C.3.	Gráficos adicionales de la hidrólisis de paja de trigo	87
C.3.1.	Sinergismo enzimático	87
C.3.2.	Conversión de lignocelulosa a celulosa y xilosa	88

D. Curvas de calibración	89
D.1. Cromatografía	89
D.2. DNS	90
D.3. Bradford	91
D.4. Ladder electroforesis	92
E. Memoria de Cálculo	93
E.1. Actividad Enzimática	93
E.2. Recuperación porcentual de proteínas en separación	95
E.3. Rendimiento enzimático	96

Índice de tablas

1.1. Composición química de desechos agrícolas y forestales.	3
1.2. Residuos sólidos disponibles en Chile: Biomasa potencial para bioetanol. . .	7
1.3. Características principales de celulasas producidas en hongos basidomicetos.	14
3.1. Comparación entre principales componentes de los medios de cultivo de <i>T. versicolor</i>	30
3.2. Recuperación de proteínas de <i>T. versicolor</i> en las etapas de separación . . .	34
3.3. Comparación de fracciones cromatográficas con mayor actividad enzimática .	40
3.4. Enriquecimiento de la actividad lignocelulolítica de las fracciones	48
3.5. Resumen de principales resultados del potencial hidrolítico	51
B.1. Composición medio base (1) para cultivo de <i>T.versicolor</i>	64
B.2. Composición solución mineral para medio 1.	65
B.3. Composición solución vitamínica para medio 1.	65
B.4. Composición medio base (2) para cultivo de <i>T.versicolor</i>	66
B.5. Composición solución trazas para medio 2.	66
B.6. Composición medio (3) para cultivo de <i>T.versicolor</i>	67
B.7. Composición medio (A) para cultivo de <i>T. versicolor</i>	67
B.8. Composición de solución trazas de medio A.	67
B.9. Composición medio (B) para cultivo de <i>T. versicolor</i>	68
B.10.Composición de solución trazas de medio B.	68
B.11.Composición medio (L1) para cultivo de <i>T. versicolor</i>	69
B.12.Composición de solución trazas de medio L1.	69
B.13.Composición de gel de Acrilamida 12,5% para electroforesis.	70
C.1. Tabla de resultados de actividad en distintos medios de cultivo de <i>T. versicolor</i>	73
C.2. Tabla de resultados de actividad en medio de cultivo A2 de <i>T. versicolor</i> . .	74
C.3. Tabla de resultados de actividad del cultivo definitivo de <i>T. versicolor</i>	74
C.4. Concentración de proteínas en fracciones cromatográficas	75
C.5. Tabla de resultados de ensayo de actividad endoglucanasa con CMC	77
C.6. Tabla de resultados de ensayo de actividad exoglucanasa con Avicel	78
C.7. Tabla de resultados de ensayo de actividad xilanasas con Xilano	79
C.8. Tabla de resultados de ensayo de actividad lacasa con DMP	80
C.9. Tabla de resultados de ensayo de actividad MnP con DMP	81
C.10.Tabla de resultados de azúcares reductores en hidrólisis de paja de trigo . . .	83
C.11.Tabla de resultados de glucosa en hidrólisis de paja de paja de trigo	84
C.12.Tabla de resultados de xilosa en hidrólisis de paja de trigo	85

C.13.Tabla de resultados de la conversión de xilano a xilosa por las fracciones cromatográficas y Celluclast	85
C.14.Tabla de resultados del rendimiento de las proteínas en la producción de xilosa	85
C.15.Tabla de resultados de la conversión de celulosa a glucosa por las fracciones cromatográficas y Celluclast	86
C.16.Tabla de resultados del rendimiento de las proteínas en la producción de glucosa	87

Índice de figuras

1.1. Matriz energética en Chile	2
1.2. Estructura de las fibras de celulosa, hemicelulosa y lignina	3
1.3. Esquema de la estructura básica de celulosa	4
1.4. Esquema de la estructura de 2 cadenas de celulosa	4
1.5. Proceso productivo de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica	8
2.1. Metodología utilizada en la fase experimental del presente estudio.	18
3.1. Producción de celulasas en distintos medios de cultivo inductores	29
3.2. Producción de celulasas con distintos inóculos	31
3.3. Producción de celulasas en el medio A	32
3.4. Perfil cromatográfico de proteínas en columna Sephacryl S-100	35
3.5. Actividad Endoglucanasa en sustrato CMC	36
3.6. Actividad Exoglucanasa en sustrato Avicel	37
3.7. Actividad Xilanasa con sustrato xilano	38
3.8. Oxidación de DMP por Lacasas	39
3.9. Oxidación de DMP por Manganese Peroxidasas	39
3.10. Concentración de azúcares reductores en hidrólisis de paja trigo	42
3.11. Concentración de glucosa en hidrólisis de paja de trigo	43
3.12. Concentración de xilosa en hidrólisis de paja de trigo	43
3.13. Cuociente entre reacciones con fracciones proteicas y Celluclast de AR y glucosa	45
3.14. Cuociente entre reacciones con fracciones proteicas y Celluclast de xilosa . .	45
3.15. Electroforesis SDS-PAGE de las fracciones cromatográficas	46
3.16. Electroforesis y comparación con actividad de fracciones	48
3.17. Rendimiento de glucosa por cantidad de proteína en hidrólisis de paja de trigo	49
3.18. Rendimiento de etanol potencial por cantidad de proteína en hidrólisis de trigo	50
3.19. Rendimiento de xilosa por cantidad de proteína en hidrólisis de paja de trigo	51
A.1. Esquemas de la pared celular vegetal	60
A.2. Esquema general de hidrólisis de lignocelulosa	61
A.3. Mecanismo de degradación de lignina	62
C.1. Fotografías de <i>T. versicolor</i> en distintos medios de cultivo	71
C.2. Fotografías de <i>T. versicolor</i> en distintos medios de cultivo	72
C.3. Fotografías del cultivo definitivo de <i>T. versicolor</i> en medio A	72
C.4. Cuociente entre la suma real versus la suma teórica de reacciones hidrolítica	87
C.5. Conversión de celulosa en hidrólisis de paja de trigo	88

C.6. Conversión de xilano en hidrólisis de paja de trigo	88
D.1. Curvas de calibración de la Cromatografía Sephacryl S-100	89
D.2. Curva de calibración del ensayo DNS	90
D.3. Curva de calibración del ensayo DNS	90
D.4. Curva de calibración del ensayo Bradford	91
D.5. Ladder para electroforesis SDS Page	92

Nomenclatura y Abreviaciones

Abs	Absorbancia: [<i>mAU</i>]
ABTS	2,2'-azino-di-[3-etil-benzo-tiazolin-sulfonato]
AR	Azúcares reductores
BSA	Albúmina de suero bovino
CBH	Celobiohidrolasa
CBP	Bioproceso consolidado
CDH	Celobiasa deshidrogenasa
CF	Co-fermentación
CMC	Carboximetil celulosa
DMP	Dimetoxifenol
DNS	Ácido dinitrosalicílico
EP	Extracto proteico
ERNC	Energía renovable no convencional
GH	Hidrolasa Glucosidasa
IU	<i>International Units</i> : [$\mu\text{mol}/\text{min}$] de AR producidos
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
Lac	Lacasa
LiP	Lignino Peroxidasa
min	Minutos
MnP	Manganeso Peroxidasa
NM	Dato no medido
OD	Densidad óptica (idem Absorbancia): [<i>mAU</i>]
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
Redox	Reacción de óxido-reducción
SHF	Hidrólisis y fermentación separadas
SSF	Fermentación y sacarificación simultáneas
t	Tiempo: [días], [hrs], [min], [seg]
T°	Temperatura [$^{\circ}\text{C}$]
U	Unidad de actividad enzimática: [$\Delta\text{Abs}/10\text{min}$]
VP	Peroxidasa versátil
Δ	Diferencia entre una cantidad final e inicial

Capítulo 1

Introducción

En las últimas décadas la demanda energética a nivel mundial ha aumentado considerablemente, lo cual ha conllevado una disminución de las reservas de petróleo y un aumento sostenido en los precios de los combustibles derivados de éste. Lo mismo ocurre con otros combustibles fósiles como el carbón y el gas natural [2].

En Chile existe una alta dependencia energética, principalmente de petróleo y gas natural, de los cuales sobre un 90 % debe ser importado anualmente [3]. Esta dependencia se agudiza en el sector de transportes, ya que el 99 % de los combustibles son derivados del petróleo, los cuales en su totalidad son importados [3]. Por estas razones, es de gran relevancia buscar alternativas para diversificar la matriz energética. En la Figura 1.1 se muestra la composición de la matriz energética en Chile, cuya fuente principal son los combustibles fósiles: carbón, petróleo y gas natural, y en segundo lugar la hidroeléctrica. Solo un 1,8 % de la matriz corresponde a energías renovables no convencionales (ERNC), que principalmente está formada por energía a partir de biomasa (bioetanol, biodiesel y biogás) y energía eólica en menor proporción [4].

El principal problema del uso de combustibles fósiles, es la gran contaminación que éstos producen. La concentración en la atmósfera de gases de efecto invernadero como el CO_2 , ha incrementado desde 280 ppm a 365 ppm en los últimos 150 años, y unos de los principales causantes son los medios de transporte en base a estos combustibles [2]. La preocupación por el medio ambiente y el cambio climático que se está viviendo, ha llevado a firmar una serie de tratados como el protocolo de Kyoto en 1997, para reducir las emisiones de CO_2 a nivel mundial [2][5].

Por estas razones, se han buscado fuentes energéticas alternativas, que sean renovables y amigables con el medioambiente. En este sentido el avance ha sido considerable, ya que paulatinamente se han encontrado mejoras y nuevas tecnologías que han hecho disminuir los costos productivos. Dentro de las energías renovables hay una gran variedad de fuentes: eólica, mareomotriz, geotérmica, biomásica, etc., dando la oportunidad de diversificar la matriz, disminuir la dependencia de los combustibles fósiles y la liberación de gases causantes del efecto invernadero.

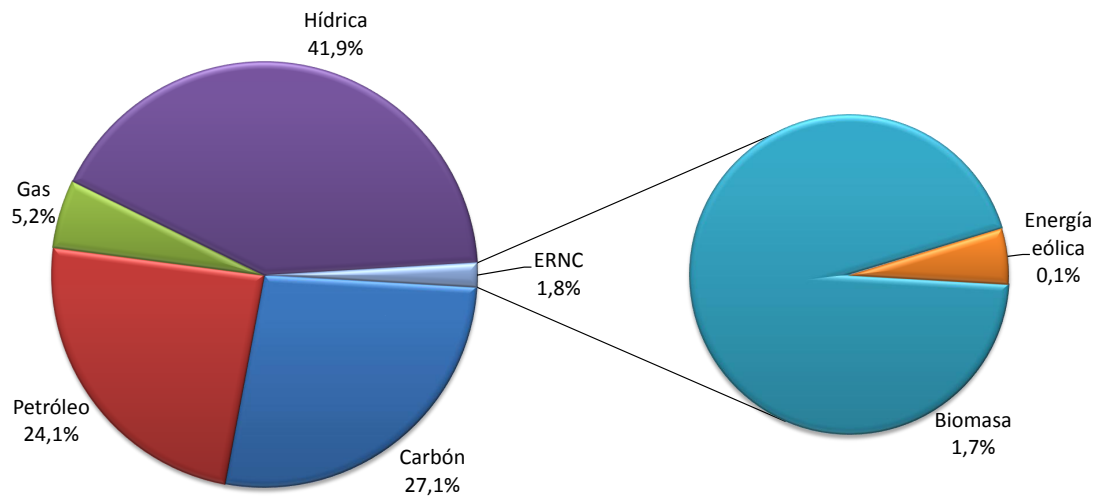


Figura 1.1: Matriz energética en Chile. Fuente CNE 2012 [4]

En nuestro país, el consumo de gasolina anualmente es aproximadamente 3,5 millones de metros cúbicos (al año 2011) [6]. Una forma de reducir su consumo es utilizando bioetanol, el cual puede reemplazar hasta un 10 % de gasolina (en mezcla), sin tener que realizar modificaciones en automóviles [2], y hasta un 100 % de etanol con cambio de tecnología. Considerando un reemplazo del 5 % con bioetanol puro (anhidro), se requeriría producir 175.000 m^3 al año. Para ser comercializado, debe cumplir con las especificaciones técnicas dadas por el Decreto N° 11/2008 del Ministerio de Economía, y debe contener sustancias desnaturalizantes autorizadas por la autoridad agrícola (SAG) ¹.

La normativa chilena indica que tanto al bioetanol, como al biodiesel, no se les aplica el impuesto específico a los combustibles contenido en el artículo 6° de la Ley N° 18.502, siendo solo gravados por el impuesto al valor agregado (IVA)². Esto sería un gran incentivo para la producción de estas ERNC, además del nicho de la potencial demanda mencionada anteriormente.

Bajo este escenario actual, se enmarcan una serie de estudios en torno a las ERNC. Uno de éstos, es el bioetanol de segunda generación producido a partir de residuos lignocelulósicos de la industria forestal, agrícola, etc. Para la producción de este combustible se deben realizar una serie de etapas, siendo claves el pretratamiento de la biomasa y la hidrólisis de celulosa. Ambos procesos deben ser optimizados, ya que requieren el uso intensivo de recursos energéticos y monetarios. Por lo tanto, actualmente se busca mejorar la tecnología existente, de manera de poder generar productos económicamente rentables, ya sea etanol, diesel u otros compuestos producidos a partir de biomasa.

¹Especificaciones técnicas para bioetanol en Chile: <http://www.cne.cl/energias/biocombustibles/tipos-de-energia/331-especificaciones-tecnicas>

²Normativa chilena sobre biocombustibles: <http://www.cne.cl/energias/biocombustibles/normativas>

1.1. Marco teórico

1.1.1. Biomasa lignocelulósica

La lignocelulosa está formada por celulosa, hemicelulosa, lignina y otros compuestos aromáticos en menor proporción. Estos 3 componentes principales forman una estructura compleja, lo cual hace difícil la degradación de la celulosa para obtener los azúcares fermentables (ver Figura 1.2). Por lo tanto, para lograr un buen rendimiento en la fermentación, es deseable que la biomasa contenga un alto porcentaje de azúcares (celulosa), y un bajo porcentaje de lignina, de manera que el pretratamiento sea menos costoso [2].

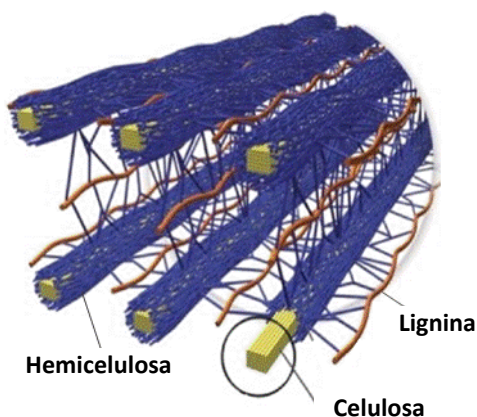


Figura 1.2: Diagrama de la estructura molecular de la pared celular vegetal formada por fibras de celulosa, hemicelulosa y lignina [7].

Para la producción de bioetanol de segunda generación es necesario conocer la composición de la biomasa, y en este caso, de los residuos agrícolas o forestales que podrían utilizarse. En la Tabla 1.1 se muestran los porcentajes de composición de algunos residuos agrícolas y forestales³.

Tabla 1.1: Composición química de desechos agrícolas y forestales.

Sustrato	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)	Referencia
Maderas duras	40 - 45	24 - 40	18 - 25	[9]
Maderas suaves	45 - 50	25 - 35	25 - 35	[9]
Paja de Arroz	32 - 47	19 - 27	5 - 24	[10]
Paja de Trigo	35 - 45	20 - 30	8 - 15	[10]
Residuos de Maiz	42,6	21,3	8,2	[10]
Bagazo	65 (total carbohidratos)	-	18,4	[10]

La celulosa es el principal compuesto polimérico de la pared de la célula vegetal, y representa el 50 % del peso de la madera[11]. Está compuesta por residuos de D-glucosa unido

³Dentro de las "maderas duras"(angiospermas) explotadas en Chile está el Eucaliptus y el álamo, y de las "maderas suaves"(o coníferas) está el Pino radiata y el Pino oregón[8].

por enlaces β -1,4-glucosídicos, formando cadenas de glucosa de más de 10 mil monómeros [12]. La unidad más pequeña de la celulosa es la celobiosa (β -D-glucopiranosil-(1-4)- β -D-glucopiranososa), un dímero de glucosa que forma estructuras de hojas por las distintas isoformas del monómero. Por otra parte, las cadenas de celulosa además contienen extremos reductores y no reductores, como se observa en la Figura 1.3. Estos extremos reductores pueden reaccionar con distintos agentes, en particular, el ácido dinitrosalicílico (DNS) reacciona con los azúcares reductores presentes en el medio, cambiando de color, y pudiendo medir esta concentración por espectrofotometría [13].

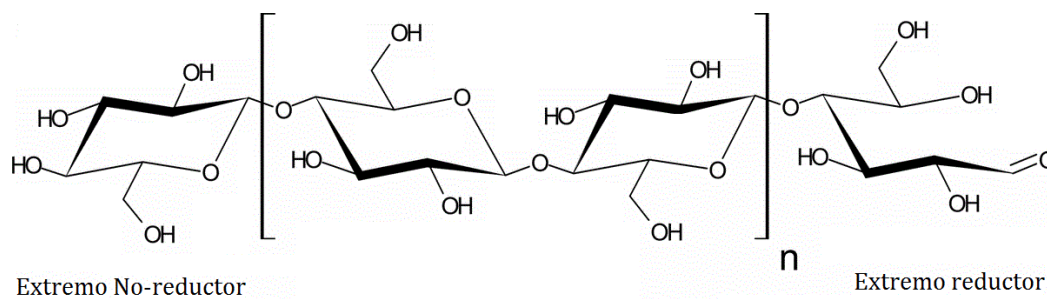


Figura 1.3: Esquema de la estructura básica de celulosa formada por unidades de celobiosa (dímero de glucosa), y donde existen extremos reductores y no reductores [14].

La celulosa, además, forma estructuras más complejas gracias a las fuerzas inter e intra moleculares. Las fuerzas de Van der Waals intra moleculares permiten la formación de la estructura de hojas de glucosa (isoforma I β); y las fuerzas inter moleculares (entre cadenas de celulosa) forman puentes de hidrógeno que permiten, a su vez, la formación de estructuras cristalinas [15](ver Figura 1.4). El grado de cristalinidad de la celulosa natural varía entre un 40 y 90 %. El resto de las regiones de la celulosa son estructuras amorfas, con interacciones al azar por puentes de hidrógenos en distintas secciones de las cadenas [15].

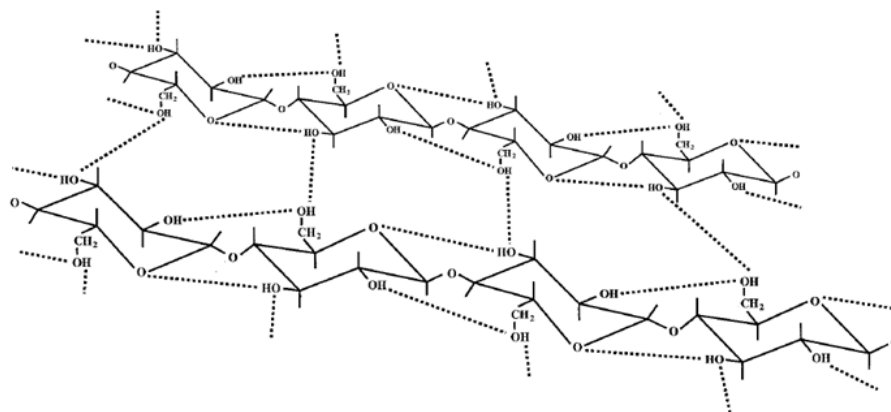


Figura 1.4: Esquema de la estructura de 2 cadenas de celulosa en paralelo, las cuales interactúan por puentes de hidrógeno (líneas punteadas)[15].

La hemicelulosa está formada por un grupo heterogéneo de polisacáridos asociados a la celulosa con un grado intermedio de complejidad, y formando una estructura ramificada [11]. La hemicelulosa representa entre un 15 a 35 % de la biomasa vegetal, y contiene distintos

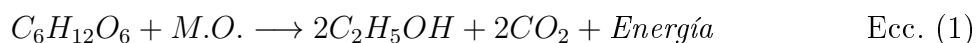
azúcares como pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (manosa, glucosa, galactosa) y/o ácidos urónicos. Los componentes más relevantes son los xilanos y glucomanosas, siendo el xilano el más abundante, constituyendo entre un 20 a 30 % de la pared celular secundaria de algunas especies vegetales, y llegando incluso a un 50 % en ciertos cereales [16].

La lignina comprende un grupo de compuestos aromáticos (no polisacáridos), y posee una estructura tridimensional altamente ramificada y con conexiones entre sí. Está compuesta por 3 principales alcoholes: p-coumarílico, conoferílico, sinapílico [15]. Además, es altamente resistente a la degradación química y biológica, y le confiere resistencia mecánica a la madera [11]. Se encuentra en mayor concentración en la lamela media del tejido vegetal, actuando como cemento entre las fibras de madera. También está presente en las capas de la pared celular, y especialmente en la pared secundaria [11](ver Figura A.1 en Apéndice A).

Finalmente, existe un grupo de componentes no estructurales, que incluye solventes orgánicos o extractivos, los cuales pueden ser polares (como fenoles o taninos), o apolares (como grasas y esteroides). Además, hay compuestos solubles en agua (azúcares y almidón), proteínas y cenizas. Generalmente, todos estos compuestos en conjunto representan menos del 5 % del peso seco de la madera [11].

1.1.2. Bioetanol

El bioetanol es alcohol etílico producido a partir de biomasa, y por ende, es una fuente de energía renovable. El bioetanol es producto de la fermentación de azúcares (carbohidratos) como la glucosa, y realizada por microorganismos (M.O.) en condiciones anaeróbicas. La reacción química básica que lo produce se muestra en la ecuación (1). Dependiendo de la fuente de carbohidratos utilizada en la fermentación, el etanol se clasifica en primera, segunda y tercera generación.



El etanol de primera generación es producido a partir de azúcares simples como glucosa y almidón provenientes del maíz, caña de azúcar, remolacha, etc., y es el biocombustible más producido a nivel mundial, siendo Brasil y EE.UU los mayores productores [5]. Su principal desventaja es que al utilizar el azúcar de maíz o la caña, se compite por suelo cultivable con fines alimenticios.

El etanol de segunda generación proviene de la fermentación de material lignocelulósico. Para producir este tipo de etanol se deben romper las cadenas de celulosa, y así obtener los monómeros de azúcares fermentables. Previamente se debe realizar un pretratamiento de la madera para la posterior hidrólisis de la celulosa, lo que hace el proceso productivo más complejo, y con menor rendimiento que el etanol de primera generación; sin embargo, la materia prima utilizada es más económica [2]. Otra desventaja es el uso de suelo cultivable, compitiendo con los productos alimenticios [17]. Para evitar este problema, es posible utilizar residuos forestales y agrícolas, aprovechando así una gran cantidad de biomasa disponible [10].

El etanol de tercera generación se produce desde biomasa no consumida (o en un bajo porcentaje) como alimento. Para ello se utilizan macroalgas, microalgas y también ciertos tipos de plantas específicas para estos fines. La ventaja de usar algas como fuente de carbohidratos, es que no se requiere el uso de tierra cultivable, ni fertilizantes [17]. Por otra parte, la cosecha de las macroalgas se puede realizar hasta 5 veces al año, dando altos rendimientos, lo cual es una gran ventaja por sobre las fuentes biomásicas de primera generación. Sin embargo, los polisacáridos fermentables están compuestos fundamentalmente por galactosa, y cuyo proceso fermentativo aun no está desarrollado a escala industrial, ya que generalmente comprende la conversión de galactosa a glucosa para luego realizar la fermentación [17].

Una característica de todos los tipos de bioetanol, es la baja emisión de gases de efecto invernadero, en comparación con los combustibles fósiles utilizados para el transporte. En el proceso productivo los sólidos no fermentados, o no convertidos en etanol, pueden ser utilizados para la combustión o gasificación, proporcionando energía al mismo [18][19]. Sin embargo, en la producción de bioetanol de primera generación existen emisiones de NO_2 , por la nitrificación y desnitrificación de los fertilizantes nitrogenados en los campos de maíz. Por esta razón, el etanol a partir de celulosa parece ser una buena opción, dando una reducción del 86 % de gases de efecto invernadero [19].

Otra preocupación acerca de estos biocombustibles es el balance energético. En estudios recientes de plantas productoras de bioetanol, se ha visto que el balance es positivo si se usan los residuos no fermentados secos o húmedos para el abastecimiento energético del proceso, y usando en baja proporción combustibles fósiles [19]. Actualmente, hay variadas tecnologías en desarrollo para mejorar los rendimientos y hacer más rentable el proceso productivo de etanol de segunda generación [18][19].

Con estos antecedentes se ve un escenario promisorio en Chile en cuanto a la producción de etanol de segunda y tercera generación. No se ve favorable fabricar etanol de primera generación dado que se requiere gran cantidad de suelos cultivables, y al ser Chile una potencia agroalimentaria en el mundo⁴, no sería conveniente destinar suelos a la producción de biocombustibles. Por otro lado, tanto en la agricultura, como en el sector forestal, se producen grandes cantidades de residuos lignocelulósicos (aproximadamente 3,8 millones de toneladas anuales de biomasa⁵), que podrían ser utilizados para la producción de bioetanol de segunda generación (ver Tabla 1.2).

El bioetanol no solo puede usarse como combustible, también podría destinarse para la producción de hidrógeno. Esta alternativa se ve más rentable principalmente por 2 razones: El etanol usado para el transporte tiene una eficiencia energética de aproximadamente el 20 %, mientras que utilizando celdas de hidrógeno como combustible, la eficiencia está sobre el 60 % [5]. Y la otra razón es el elevado costo de la destilación del etanol, donde se debe remover toda el agua de la fermentación; en cambio, al producir hidrógeno no es necesario remover el agua, haciendo el proceso considerablemente más barato [5].

⁴Chile se ubica en el lugar 28 de exportaciones silvoagropecuarias a nivel mundial al año 2011. Fuente: FAO[20]

⁵Los residuos Foresto-industrial comprenden 4.749 m^3 /año [8]. Para la conversión a toneladas se utilizó una proporción 1 : 1 de *Eucalyptus globulus* (0,8 $[ton/m^3]$) y Pino radiata (1 $[ton/m^3]$)[21], que corresponden a los principales recursos forestales explotados en Chile.

Tabla 1.2: Residuos sólidos disponibles en Chile: Biomasa potencial para bioetanol.

Fuente	Toneladas anuales	Referencia
Horto-frutícola	3.712.086	[22]
Cerveceros	15.682	[22]
Vitivinícolas (orujo)	63.960	[22]
Foresto-industrial	4.274	[8][21]
Desmalezado y poda (municipal)	27.000	[22]
TOTAL	3.823.002	

Finalmente, el bioetanol también podría utilizarse como materia prima para la fabricación de productos químicos que tengan un mayor valor en el mercado que el combustible, tales como: acetaldehído, etileno, butadieno, ácido acético, entre otros[5]. Utilizando el bioetanol como materia prima en vez de combustible, el efecto medioambiental podría ser mayor, disminuyendo las altas emisiones de CO_2 que produce la industria petroquímica. Para ello, se deben encontrar vías catalíticas para hacer el proceso más eficiente y rentable, y así poder reemplazar estos productos fósiles [5].

1.1.3. Proceso productivo del bioetanol

El proceso para obtener bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica consiste en 4 principales etapas: pretratamiento de la biomasa, hidrólisis (o sacarificación) de la celulosa, fermentación y destilación del bioetanol. En el diagrama mostrado a continuación (ver la Figura 1.5), se muestran las etapas del proceso productivo a grandes rasgos.

1) Pretratamiento

La primera etapa productiva corresponde al pretratamiento de la biomasa, la cual es previamente recolectada y molida hasta un tamaño manejable. La idea del pretratamiento es romper la matriz formada por la celulosa, hemicelulosa y lignina (ver Figura 1.2), de manera de reducir el grado de cristalinidad de la celulosa y aumentar la fracción amorfa, conveniente para el ataque enzimático en la etapa de hidrólisis [23]. Existen variados métodos para realizar el pretratamiento: físicos, fisico-químicos, químicos y biológicos. El pretratamiento más adecuado debe mejorar la liberación de azúcares en el mismo proceso o facilitarla en la sacarificación, evitar la degradación o pérdida de carbohidratos, y evitar la formación de subproductos inhibitorio de la hidrólisis y fermentación posteriores [9].

Dentro de los pretratamientos más conocidos está la trituración mecánica, pirólisis, explosión a vapor, explosión de fibras con amoníaco (AFEX), ozonólisis, hidrólisis ácida o básica, delignificación, proceso *organosolv*, entre otros. Además, dentro de los pretratamientos químicos se ha investigado el uso de líquidos iónicos. Respecto a los pretratamientos biológicos está el uso de hongos de pudrición café y blanca, los cuales crecen naturalmente en los bosques

en pudrición, degradando la madera [9]. Estos hongos son usados para hidrolizar lignina y hemicelulosa de residuos lignocelulósicos [24]. Este tipo de tratamiento tiene grandes ventajas como el bajo uso energético y ser amigable con el medioambiente. Sin embargo, la velocidad de hidrólisis generalmente es muy lenta, de manera que no sería conveniente de usar a nivel industrial [9].

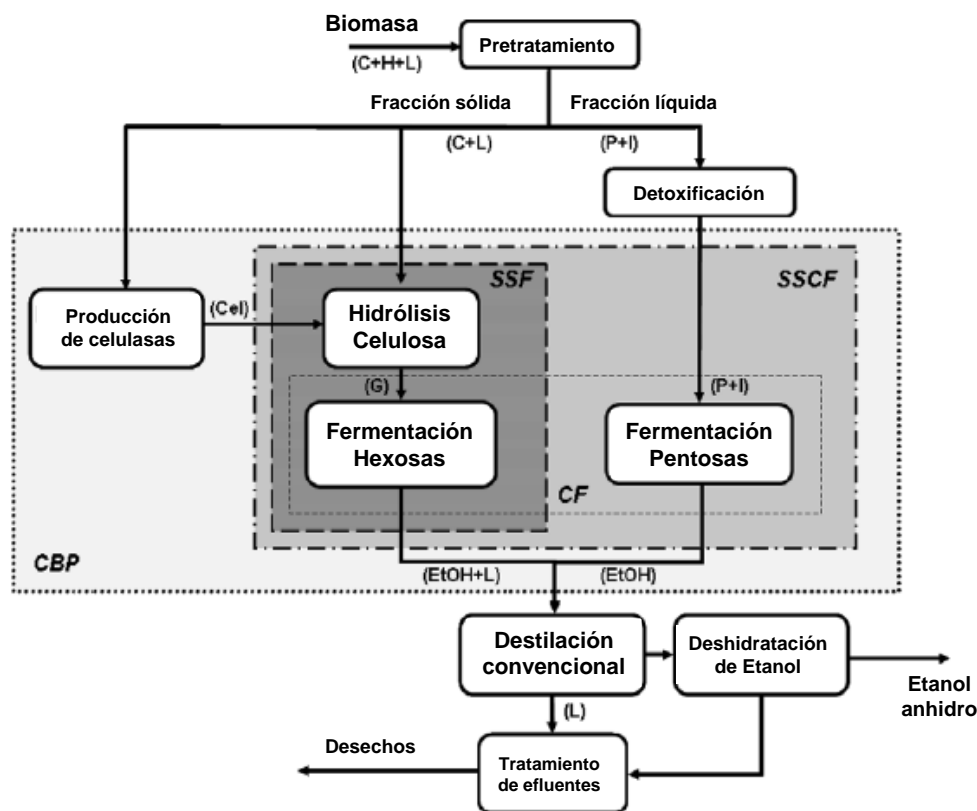


Figura 1.5: Diagrama de bloques del proceso productivo del bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica. Los recuadros grises indican distintas posibilidades de reacciones integradas: Co-fermentación (CF), sacarificación y fermentación simultáneas (SSF), sacarificación y co-fermentación (SSCF), bioproceso consolidado (CBP). Además se indican los principales componentes en cada corriente: Celulosa (C), Hemicelulosa (H), Lignina (L), Glucosa (G), Pentosas (P), Celulasas (cel), Inhibidores (I) y Etanol (EtOH) [25].

En el presente trabajo se utilizó paja de trigo pretratado para facilitar la hidrólisis enzimática, y cuyos métodos se detallan a continuación.

- **Hidrólisis ácida:** Este pretratamiento químico utiliza H_2SO_4 o HCl concentrado o diluido, que actúa como poderoso agente hidrolizante. Para hacer el proceso económicamente rentable, se puede recuperar el concentrado ácido al término del proceso, para reutilizarlo posteriormente [9]. Para el pretratamiento con ácido diluido, existen 2 métodos: Uno a altas temperatura (mayores a $160^\circ C$), cargando una baja concentración de material (5-10 % [peso sustrato/peso de mezcla]) en un flujo continuo; y el otro, es un proceso batch a bajas temperaturas (menores a $160^\circ C$) y con alta carga de sólidos (10-40 %) [26].

- **Hidrólisis alcalina:** Este pretratamiento utiliza $NaOH$ diluido, el cual provoca un aumento de volumen del material lignocelulósico, aumenta su superficie interna, disminuye el grado de polarización y cristalinidad de la celulosa, separa la estructura que forma la lignina y los carbohidratos, y provoca la ruptura de la lignina. Tanto en este tipo de hidrólisis básica, como en la ácida, es necesario lavar la biomasa con agua para llevarla a pH cercano al neutro, condición necesaria para la hidrólisis enzimática [9].

2) Hidrólisis

Una vez realizado el pretratamiento, el material lignocelulósico está en condiciones de ser hidrolizado, reacción en la cual el polímero de celulosa se rompe por la adición de una molécula de agua, obteniendo como producto monómeros de glucosa, dímeros y oligosacáridos (ver Ecc. (2)).



Esta reacción puede ser catalizada por agentes químicos (ácidos concentrados o diluidos) o por la acción biológica de enzimas, producidas por diversos microorganismos como hongos y bacterias, los cuales crecen naturalmente en maderas en pudrición [27]. Estas enzimas hidrolíticas cortan los enlaces β -1,4-glucosídicos de las cadenas de celulosa (ver Figura 1.3), liberando celobiosas, glucosas y cadenas más cortas de celulosa [12]. También existen hemicelulasas, que hidrolizan los polímeros de hemicelulosa, como el xilano. Al término de la hidrólisis se obtienen azúcares simples o monómeros, que son posteriormente fermentados por bacterias o levaduras.

Las celulasas actúan de forma sinérgica, o sea, que su actividad combinada es mayor que la suma de cada una. Al comienzo de la hidrólisis se ha propuesto que las fibras de celulosa se hinchan y se fragmentan en cadenas más cortas, proceso llamado amorfogénesis [28] (ver Figura A.2 en Apéndice A). Luego, las enzimas celobiohidrolasas, β -glucosidasas y endoglucanasas actúan en conjunto en la sacarificación de celulosa.

En principio, las endo y exoglucanasas atacan las fibras de celulosa, hidrolizando en el interior y en los extremos del polímero, respectivamente, obteniendo como producto celooligosacáridos (con grado de polimerización menor a 6 unidades)[28]. La celobiosa, liberada por la acción de las celobiohidrolasas, sirve de sustrato para las β -glucosidasas, que la degradan rápidamente, para obtener finalmente 2 moléculas de glucosa por cada reacción [2][28] (ver Figura A.2 en Apéndice A).

La acción sinérgica de las enzimas es muy relevante en la velocidad de reacción, ya que los mismos sustratos pueden actuar como fuertes inhibidores. La celobiosa, por ejemplo, es un inhibidor de varias celulasas, y la glucosa inhibe la acción de la enzima β -glucosidasa [28]. Por lo tanto, la proporción de cada enzima y las condiciones de reacción son parámetros que deben manejarse para lograr una buena sacarificación.

Los factores que influyen en la hidrólisis enzimática son variados, tales como: contenido de la materia seca, pH, temperatura y el tiempo de residencia. En general, menores concentraciones de sólidos (menor al 5 %) de biomasa, produce mayores rendimientos [2]. La temperatura y pH óptimos, son altamente dependientes del tiempo de hidrólisis; se ha sugerido que 50°C es un óptimo [2][28], pero usando tiempos de residencia mayores a 24 horas, una temperatura de 38°C también es altamente favorable [2]. Por otro lado, un pH alrededor de 5,3 reduce las variaciones de temperaturas en la reacción, y por ende es un parámetro relevante a considerar en el proceso [2].

Algunas estrategias que se están desarrollando para mejorar el rendimiento en la hidrólisis, son la mutagénesis al azar de cepas fúngicas, ingeniería genética de β -1,4-glucanasas, y la optimización de la actividad específica de las enzimas [29].

3) Fermentación

La hidrólisis y la fermentación se pueden realizar en conjunto (*Simultaneous saccharification and fermentation*, SSF) o por separado (*Separate hydrolysis and fermentation*, SHF). En la primera (SSF), la hidrólisis y la fermentación ocurren en el mismo reactor, por lo tanto, se agregan las enzimas hidrolíticas y el microorganismo fermentador al mismo tiempo, obteniendo como producto el bioetanol. En la fermentación e hidrólisis separadas (SHF), primero se realiza la hidrólisis de los carbohidratos (celulosa y hemicelulosa), y posteriormente se realiza la fermentación con el producto de la sacarificación.

La ventajas del proceso SSF son: (1) incremento en la velocidad de hidrólisis en la conversión de azúcares (éstos inhiben la actividad de celulasas cuando se acumulan), (2) menor requerimiento enzimático, (3) mayor rendimiento de bioetanol, (4) menor tiempo de producción de bioetanol, (5) menor requerimiento de equipamiento (solo se usa un reactor)[9], y (6) menor requerimiento de energía, por ende, el proceso es menos costoso [10].

Pese a lo anterior, el hecho de realizar todo en una sola etapa, desfavorece el control de las condiciones al interior del reactor. En el proceso SSF se debe trabajar a temperaturas no óptimas, y más bien, usar un consenso donde las enzimas y los microorganismo fermentativos puedan actuar [2]. Otro punto en contra, es la inhibición por etanol que puede ocurrir al final del proceso [2]. Para mejorar estas condiciones, se han desarrollado levaduras termotolerantes, de manera de poder realizar la hidrólisis a la temperatura óptima, sin que las levaduras se vean afectadas en la fermentación.

Por otra parte, la fermentación y sacarificación por separado (SHF) tiene como ventaja que cada paso se puede realizar en las condiciones óptimas de temperatura, o sea, de 45 a 50°C en la hidrólisis y alrededor de 30°C en la fermentación. Además es posible hacer la fermentación en modo continuo, no en batch como el método SSF, permitiendo reciclar las células. Sin embargo, la mayor desventaja es la inhibición enzimática por los azúcares liberados durante la hidrólisis[2].

Los microorganismos más utilizados en la fermentación son *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Zymomonas mobilis*, *Pachysolen tannophilus*, *Scheffersomyces stipitis* (*Pichia*

stipitis), *Candida brassicae*, entre otros [10]. A nivel industrial, *S. cerevisiae* es el más empleado en la producción de etanol, y que además ha probado ser muy robusto en la fermentación de biomasa lignocelulósica hidrolizada [30]. Sin embargo, esta levadura no puede utilizar pentosas (como xilosa) como sustrato fermentable [10], y en ese caso podría usarse el microorganismo *S. stipitis*, aunque su tasa de producción de etanol es por lo menos cinco veces menor que la observada con *S. cerevisiae* [31].

Otros tipos de procesos, como la co-fermentación (CF) que utiliza hexosas y pentosas, y la sacarificación y co-fermentación simultánea (SSCF), requieren un estudio extensivo sobre los microorganismos a utilizar y las condiciones que requiera la reacción. Para dar mayor flexibilidad en cuanto a estas condiciones, se están desarrollando microorganismos genéticamente modificados de manera de obtener rendimientos mayores, y con una mejor y mayor utilización de sustratos [10]. El ideal sería poder realizar un bioproceso consolidado (CBP), donde en un mismo caldo de cultivo se generen las enzimas para la hidrólisis, y ocurra la fermentación y sacarificación simultánea de hexosas y pentosas. El objetivo del CBP es reducir etapas, disminuir los costos, aumentar la producción y el rendimiento del bioetanol [25].

4) Destilación

El etanol que se obtiene en la fermentación debe pasar por una etapa de destilación y deshidratación, ya que en su estado virgen contiene cerca de un 80 % de agua, la cual debe ser removida [27]. Para obtener el etanol desde el caldo fermentativo existen diversos métodos, tales como: remoción por vacío, remoción por desorción de gas, mediante el uso de membranas, y extracción líquido-líquido (dos fases acuosas) [25].

En la destilación se separa el bioetanol de la mezcla bioetanol-agua. Primero, éste se concentra en una columna de destilación, donde se separa la mayoría del bioetanol (corriente superior), del agua y sólidos (corriente inferior)[27]. El producto obtenido contiene un 37 % de etanol, el cual pasa a una columna de rectificación para concentrarlo al 95 % (mezcla azeotrópica etanol-agua), y la corriente inferior remanente se recircula en la corriente de alimentación. Finalmente se puede lograr un 99,6 % de pureza con la destilación [27]. El bioetanol anidro para uso combustible debe tener menos de un 1 % de agua.

Esta etapa es la más costosa del proceso, llegando a representar hasta un 50 % del costo del bioetanol (la segunda más costosa es el pretratamiento que puede alcanzar un 20 %) [25]. Por esta razón, es importante considerar la integración energética entre las etapas, de manera de reducir las pérdidas energéticas, y así disminuir el costo del proceso productivo [25].

1.1.4. Hongos de pudrición blanca

Los hongos basidomicetos son los principales hongos encargados de la degradación de madera debido a su habilidad de romper sus componentes ligninocelulósicos [11]. Estos microorganismos se clasifican en hongos de pudrición blanca y hongos de pudrición café, por la coloración producida del biofilm sobre la madera cuando la consumen. Dentro de los hongos de pudrición blanca destacan *P. chrysosporium*, *T. versicolor*, *Ganoderma australe*, y *C. subvermispora*, los cuales son ampliamente usados y estudiados para la producción de enzimas hidrolíticas [12].

Estos hongos secretan enzimas extracelulares (oxidoreductasas), las cuales están involucradas en la degradación de componentes de la pared celular. Los hongos de pudrición blanca se caracterizan por su habilidad de degradar lignina, hemicelulosa y celulosa. Esta característica de degradar simultáneamente celulosa y lignina, se le denomina delignificación selectiva o degradación secuencial [11].

La mayoría de las celulasas comerciales provienen del hongo ascomiceto *Trichoderma reesei* y una pequeña porción obtenida de *A. niger*. Estas preparaciones contienen una mezcla de celulasas con al menos dos tipos de celobiohidrolasas, cinco tipos de endoglucanasas, β -glucosidasas y hemicelulasas [23]. Estas enzimas son producidas principalmente por 2 compañías, Novozyme y Genecor, pero por sus altos costos solo pueden usarse a nivel de laboratorio. De hecho, la producción de celulasas representa la mitad del costo de la hidrólisis de celulosa [2]. Por esta razón, es importante el estudio y desarrollo de nuevas tecnologías, para optimizar el cultivo de los microorganismos productores de enzimas celulolíticas.

Trametes versicolor

T. versicolor es un hongo basidomiceto conocido por su capacidad de degradar lignina, gracias a su batería enzimática. También, es capaz de degradar otros compuestos como hidrocarburos policíclicos aromáticos, mezclas de bifenilos policlorados y un gran número de tintes sintéticos. Estas características le entregan la capacidad de remover el cloro y decolorar la pulpa maderera proveniente de la industria papelera, siendo tecnologías amigables con el medio ambiente [32].

Otra importante aplicación de este hongo, es la producción a gran escala de sus enzimas lignocelulolíticas para la hidrólisis de celulosa y lignina, con la finalidad de producir bioetanol. La expresión enzimática y su aumento de actividad, pueden ser inducidas por diversos compuestos como: cobre, xilidina, alcohol veratrílico, y una mezcla de fenoles [32].

T. versicolor, al igual que otros hongos basidomicetos, es un gran catalizador natural en la degradación de madera, y sus aplicaciones biotecnológicas aun están en desarrollo, tanto en la industria papelera como en las biorrefinerías de etanol.

1.1.5. Enzimas hidrolíticas

La degradación de la lignocelulosa es realizada por un conjunto de celulasas, hemicelulasas y ligninasas, producidas principalmente por hongos basidomicetos.

Celulasas

La mayoría de las celulasas pertenecen a un grupo de enzimas conocidas como hidrolasas glucosídicas (GH). Actualmente más de 2.500 GH han sido identificadas y clasificadas en 115 familias [33].

Las enzimas fúngicas extracelulares incluyen endoglucanasas y celobiohidrolasas. Las endoglucanasas pueden hidrolizar enlaces glucosídicos en regiones internas de la celulosa, mientras las celobiohidrolasas actúan en los extremos de la cadena. Los productos de la reacción enzimática son, en su mayoría, disacáridos (celobiosa) y, en menor medida, celo-oligosacáridos que son posteriormente hidrolizados por las β -glucosidasas [33].

- **Endo-1,4- β -glucanasas:** Estas enzimas se encuentran en los hongos basidomicetos de pudrición blanca y café, y también en algunas plantas. Carboximetilcelulosa (CMC) y celulosa amorfa en general, son buenos sustratos artificiales para esta endoglucanasa, lo cual indica que la actividad enzimática está orientada hacia aquellas regiones no cristalinas de la celulosa. La forma de acción es mediante la hidrólisis de enlaces internos, y también liberando oligosacáridos solubles, por ende, actúa como endoglucanasa y celobiohidrolasa. En el hongo *P. chrysosporium* esta enzima muestra un sinergismo endo-exo con las celobiohidrolasas [12].
- **Celobiohidrolasas (CBH):** Las enzimas CBH han sido aisladas de hongos de pudrición blanca y algunas especies de plantas, pero aun no existe evidencia de su presencia en hongos de pudrición café. Actúan hidrolizando los enlaces β -1,4-glicosídicos de los extremos de la cadena de celulosa, produciendo celobiosa como producto [33]. La hidrólisis de celulosa se produce desde extremos reductores (CBH I), como no reductores (CBH II), tal como se ha visto en el hongo *P. chrysosporium*, y con una alta acción sinérgica. Esta enzima se ve inhibida por la celobiosa, que es producto de su reacción. Sin embargo, se ha propuesto que este efecto disminuye por la oxidación de celobiosa por la enzima celobiosa deshidrogenasa (CDH) [12].
- **β -glucosidasas:** Son producidas por una gran variedad de microorganismos, desde hongos basidomicetos (de pudrición blanca y café), hasta otras especies de hongos y plantas. Estas enzimas presentan una gran variabilidad estructural, dada la gran cantidad de especies que lo producen, y encontrándose tanto a nivel intracelular como extracelular. Su sustrato es el dímero de celobiosa, pero también puede escindir unidades de galactosa, fucosa y disacáridos de lactosa, aunque con bajos K_M . En el hongo *T. versicolor* es una proteína monomérica de gran tamaño (300 kDa), y con un 90 % de glicosilación. Sus principales inhibidores son glucosa (resultante de su actividad catalítica), gluconolactona y celobiolactona [12].

- **Celobiosa deshidrogenasas (CDH):** Son enzimas extracelulares producidas por hongos basidomicetos y ascomicetos, y actúan degradando celulosa, xilano y lignina en presencia de H_2O_2 e iones hierro quelados. Se producen en presencia de celulosa como fuente de carbono, al igual que otras celulasas. Esta enzima puede reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} , o Cu^{2+} a Cu^+ por la oxidación de celobiosa, la reacción siguiente entre las especies reducidas y H_2O_2 genera radicales hidroxilos, los cuales pueden modificar y depolimerizar los componentes de la pared celular vegetal. El hierro está presente en la madera y el peróxido es producido fácilmente por la misma enzima CDH o por otras enzimas redox extracelulares [12].

En la Tabla 1.3 se presenta un cuadro resumen con las principales características de celulasas.

Tabla 1.3: Características principales de celulasas producidas en hongos basidomicetos.

Enzima	Peso molecular (kDa)	pI	pH óptimo	T° óptima (°C)	Referencia
Endo-1,4- β -glucanasa (EC 3.2.1.4)	30 (*)	2,6 - 4,9	5,0 (*)	50 - 70	[12]
Celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91)	50 - 65	3,6 - 4,9	4,0 - 5,0	37 - 60	[12]
β -glucosidasa (EC 3.2.1.21)	300 (*)	3,5 - 5,2	3,5 - 5,5	45 - 75	[12]
Celobiosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.18)	97 (*)	4,2 (*)	5,0 (*)	35 - 55	[12]

Los datos marcados con (*) corresponden a valores característicos del hongo *Trametes versicolor*, el resto de los datos provienen de otros hongos basidomicetos.

Hemicelulasas

Dentro de las enzimas responsables de hidrolizar la hemicelulosa se encuentran principalmente las xilanas, las cuales degradan el xilano. Estas enzimas rompen los enlaces glicosídicos del xilano, y se diferencian en: endo- β -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8) y β -xilosidasa (EC 3.2.1.37) [16]. El rango de tamaños de las xilanasas en hongos es muy amplio, siendo aproximadamente 20 kDa en *T. reesei* [34]. En general, las endoxilanasas tienen un rango de tamaños entre 16 a 75 kDa, y en las β -xilosidasas de 90 a 122 kDa [35].

Las enzimas endo- β -1,4-xilanasas rompen la cadena principal de xilano, reduciendo el grado de polimerización del sustrato. La efectividad de la hidrólisis del xilano depende del largo de la cadena, el grado de ramificación y la presencia de sustituyentes. Por otra parte, β -xilosidasa hidroliza pequeños oligos de xilano y xilobiosa, liberando residuos de β -xilopiranosil desde los extremos no reductores [16].

La biosíntesis de xilanasas es inducida por xilano, xilosa, xilobiosa y residuos de β -xilopiranosil, que pueden ser agregados al medio de cultivo del microorganismo productor,

ya sean bacterias, hongos de pudrición blanca, u otros. Sin embargo, existe cierta represión de estas enzimas por la presencia de glucosa [16].

Ligninasas

En la Figura A.3 (Apéndice A), se muestra el mecanismo químico de la degradación de lignina, donde lacasas y lignino peroxidadas (LiP, MnP y VP) producidas por hongos de pudrición blanca, oxidan el polímero de lignina generando radicales aromáticos [11].

También existen otras enzimas extracelulares involucradas en la degradación de lignina, que son oxidasas generadoras de peróxido (H_2O_2), y deshidrogenasas asociadas al micelio que reducen compuestos derivados de la lignina. Entre éstas se encuentra la aril-alcohol oxidasa (AAO) (descrita en el hongo *P. eryngii*), la enzima glioxal oxidasa del hongo *P. chrysosporium*, aril-alcohol deshidrogenasa (AAD) y las quinona reductasas (QR) [11].

- **Lacasas (Lac):** Estas enzimas presentes en variadas plantas, hongos e insectos, tienen una variedad de roles incluyendo síntesis de pigmentos, formación de las frutas y detoxificación [11]. El interés en las lacasas ha ido en aumento dado a sus aplicaciones biotecnológicas, gracias a su habilidad de oxidar sustratos con alto potencial redox y en presencia de mediadores sintéticos, que permiten la degradación de ciertos compuestos usados en la industrial papelera.
- **Peroxidasas (LiP y MnP):** Las enzimas Lignino Peroxidasas (LiP) tienen la capacidad de degradar unidades de lignina no-fenólicas (sobre un 90 % del polímero). Mientras que las Manganese Peroxidasas (MnP) generan Mn^{3+} , que actúa como un oxidador de las unidades fenólicas y no-fenólicas de la lignina, gracias a la formación de peróxidos en las reacciones de la vía lipídica. Su acción catalítica es posible por el alto potencial redox que alcanza el intermediario oxo-ferril durante la reacción, proveniente del cofactor hemo en presencia de H_2O_2 . Esta reacción de 2 electrones permite que la enzima activada pueda oxidar 2 unidades de sustrato, el cual es reducido a un estado para volver a reaccionar [11].

En resumen, existen 2 aspectos en su estructura molecular que le entregan sus propiedades catalíticas: la presencia de grupos hemo que le confieren un alto potencial redox al complejo oxo-ferril; y la existencia de sitios específicos de unión para la oxidación de los sustratos característicos, incluyendo grupos aromáticos no-fenólicos en el caso de LiP, y el hierro manganeso en el caso de MnP [11].

Proteínas auxiliares

Existe una variedad de proteínas no enzimáticas que también están involucradas en el proceso de degradación de la madera, entre las que se encuentran: expansinas, proteínas similares a expansinas ("*expansin-like proteins*") y swolleninas. Estas proteínas contienen una superficie de unión de polisacáridos (presente también en la CBH I), y se ha sugerido que tienen la habilidad de disgregar las fibras de celulosa, sin tener actividad hidrolítica. Además,

se ha demostrado que estas proteínas pueden actuar de manera sinérgica con celulasas y otras enzimas hidrolíticas, aumentando la accesibilidad de la celulosa a la enzima [28][29].

Aún no se tiene claridad de la función hidrolítica de estas proteínas accesorias, pese a que se conoce la función de las expansinas en plantas, las cuales están involucradas en la organogénesis, iniciación de las hojas, rompimiento de las frutas, y otros procesos del desarrollo vegetal en el que se produce una modificación de la pared celular [36].

Algunas evidencias sobre su rol en la sacarificación son, por ejemplo, que las expansinas aumentan las cavidades en la pared celular por la unión de polisacáridos, y el rompimiento de enlaces no-covalentes en las microfibras de celulosa y otros polisacáridos unidos a la celulosa. Por otra parte, pese a su falta de actividad catalítica, estas proteínas han mostrado mejorar la hidrólisis enzimática de la celulosa cristalina realizada por las celulasas [28].

Recientemente hay un gran interés en este tipo de proteínas que mejorarían la acción hidrolítica de las enzimas. Además, se han reportado nuevas proteínas, como la loosenina (perteneciente al grupo de "*expansin-like proteins*") del hongo basidomiceto *Bjerkandera adusta*, la cual se une a la celulosa y disgrega sus fibras [36]. Estas últimas investigaciones tienen como principal objetivo mejorar la liberación de azúcares en el tratamiento de materiales lignocelulósicos, ya sea mediante el uso de proteínas auxiliares, o la optimización de las enzimas hidrolíticas y sus condiciones de reacción.

1.2. Motivación

La principal motivación de esta memoria es contribuir en la búsqueda de métodos óptimos en la etapa de hidrólisis de celulosa para la producción de glucosa desde biomasa lignocelulósica, con la finalidad de producir bioetanol de segunda generación u otros biocompuestos derivados de éste. Por ende, se quiere mejorar la hidrólisis tanto en el proceso como en los insumos, y fundamentalmente, en el uso de enzimas hidrolíticas más eficientes.

Dada la gran batería enzimática producida por los hongos de pudrición blanca en presencia de material lignocelulósico, es que se ha fijado la mayor atención en esta clase de organismos, y su producción de enzimas y proteínas auxiliares para la sacarificación. El estudio de estos hongos va desde su comportamiento en presencia de distintos medios de cultivo inductores, hasta las modificaciones a nivel molecular o génico, con la finalidad de lograr una mayor producción de celulasas y ligninasas, o un mejor rendimiento de éstas.

1.3. Objetivos

El objetivo general de la presente memoria es estudiar la producción de proteínas hidrolíticas para la degradación de lignocelulosa por hongos de pudrición blanca.

Los objetivos específicos son los siguientes:

- Identificar condiciones de cultivo del hongo *Trametes versicolor* apropiadas para la producción de enzimas que degraden lignocelulosa.
- Evaluar un sistema de fraccionamiento de proteínas del hongo para la identificación de proteínas lignocelulolíticas en la hidrólisis de celulosa.
- Caracterizar las fracciones obtenidas del hongo que ayudan en la hidrólisis de paja de trigo, mediante electroforesis y ensayos de actividad
- Evaluar el rendimiento hidrolítico de las proteínas del hongo *T. versicolor* en sacarificación de paja de trigo, y la potencial producción de etanol.

1.4. Alcances del estudio

Esta memoria se enmarca dentro del proyecto Fondecyt N° 1121088 que busca identificar proteínas auxiliares que ayuden en la hidrólisis de lignocelulosa, y cuya finalidad es optimizar el proceso productivo de bioetanol de segunda generación.

Dentro de los alcances se espera contribuir al proyecto estudiando las proteínas lignocelulolíticas del hongo *Trametes versicolor*. Además, definir condiciones de cultivo del hongo, probar los ensayos de actividad y caracterizar las proteínas obtenidas desde el extracto. Estos resultados, junto con los protocolos establecidos, podrían utilizarse para estudios con otros hongos de pudrición blanca, su producción enzimática, y la hidrólisis de otros materiales lignocelulósicos.

Capítulo 2

Materiales y Métodos

Para el estudio de las proteínas lignocelulolíticas del hongo *Trametes versicolor*, primero se debieron encontrar las condiciones de cultivo necesarias para la producción de éstas. Luego se procedió a realizar la separación de las proteínas, para posteriormente realizar los ensayos de actividad e hidrólisis de paja de trigo, de tal forma de poder comparar su acción con el de enzimas comerciales como Celluclast. En la Figura 2.1 se presenta un diagrama de flujo de las tareas realizadas para cumplir con los objetivos propuestos en el presente trabajo.

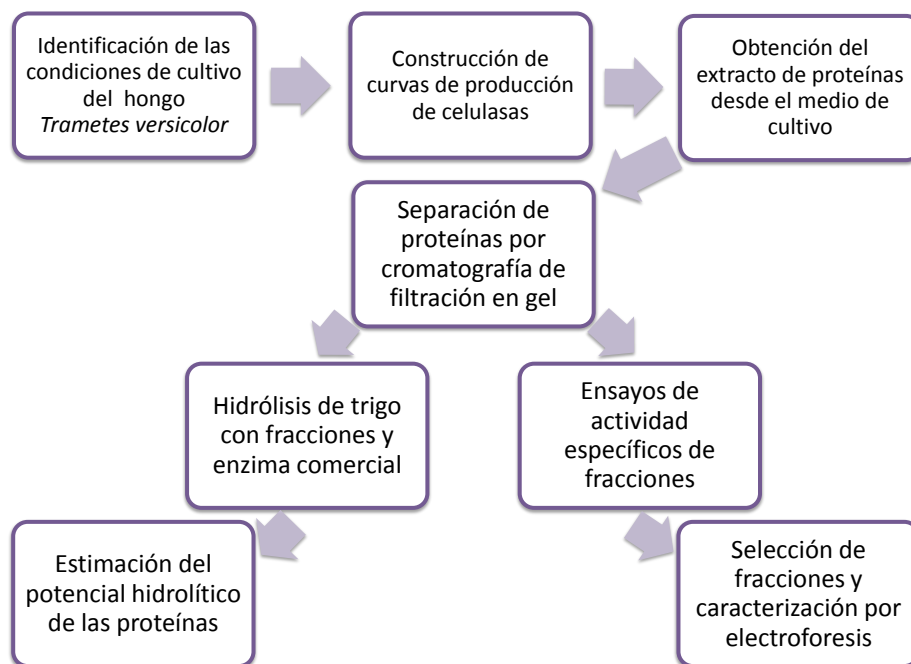


Figura 2.1: Metodología utilizada en la fase experimental del presente estudio.

2.1. Materiales

2.1.1. Material biológico

- **Hongo:** Se utilizó una cepa del hongo de pudrición blanca *Trametes versicolor* (Hongo 106), que fue provista por el profesor René Carmona de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad de Chile. Este aislado se reprodujo en placas con medio sólido, agar PDA (*potato dextrose agar*), y cultivado a 27°C.
- **Material lignocelulósico:** Se utilizó paja de trigo *Triticum spp.* pretratado por métodos químicos, para la inducción de la actividad enzimática del hongo. Por una parte, se usó paja de trigo molido pretratado con H_2SO_4 para los cultivos, y por otra, paja pretratada con $NaOH$ y molido fino, para los ensayos de hidrólisis.
- **Enzimas comerciales:** Para los ensayos de hidrólisis se usó la celobiasa Novozyme 188®, proveniente del hongo *Aspergillus niger*, y la mezcla de celulasas Celluclast®, proveniente del hongo *Trichoderma reesei*, ambos distribuidos comercialmente por la empresa Sigma-Aldrich.

2.1.2. Material químico

Para la preparación de los medios de cultivo se utilizaron sales y sustratos de grado analítico, en su mayoría de la marca Merck y Bacto.

Los sustratos utilizados en los ensayos de actividad se detallan a continuación:

- Carboximetil celulosa (CMC): marca Megazyme, de grado analítico. Utilizado para medir actividad de endoglucanasas.
- Avicel: marca Fluka, de grado analítico. Utilizado para medir actividad de exoglucanasas.
- Xilano (poli (β -D xilopiranososa [1 \rightarrow 4])): marca Sigma, de grado analítico. Utilizado para medir actividad de xilanasas.
- Dimetoxifenol (DMP): marca Aldrich, de grado analítico. Usado para medir la cinética de reacción de Lacasas y Manganese peroxidases (MnP).
- Agua oxigenada (H_2O_2): marca Merck, de grado analítico. Usado para medir la cinética de reacción de Lacasas y MnP, mediante la oxidación de DMP.

Para medir los azúcares reductores liberados de los ensayos de actividad, se utilizó la técnica de DNS [13]. El DNS se preparó con: 3,53 g de 3-5-ácido dinitrosalicílico, 6,6 g de hidróxido de sodio en pellets, 472 ml de agua destilada, 102 g de tartrato de sodio potasio, 2,53 ml de fenol (previamente calentado a 50°C), y 2,77 g de metabisulfito de sodio.

Por otra parte, se utilizaron kits para la medición de ciertos compuestos, los cuales fueron:

- Kit Gluc-Pap (Randox): Para la medición de glucosa en hidrólisis de paja de trigo.

- Kit D-Xylan (Megazyme): Para la medición de D-xilosa en hidrólisis de paja trigo.

2.2. Definición de condiciones de cultivo del hongo

2.2.1. Preparación de medios de cultivo

Se prepararon 7 matraces con 50 ml de agua destilada y 1 % p/v de paja de trigo pretratado con ácido sulfúrico (0,75 % v/v), los cuales fueron autoclavados. Los medios elegidos para este ensayo se denominaron: 1, 2, 3, A, B y L1, y cuyas composiciones están descritas en el Apéndice B.1. Cada uno de estos compuestos se preparó y esterilizó por separado en autoclave, excepto las soluciones trazas y KH_2PO_4 que se filtraron con poro de tamaño 0,2 μm .

Posteriormente, manteniendo condiciones de esterilidad, se removió el agua sobrenadante de cada uno de los matraces y cuidando de no arrastrar la paja de trigo del fondo. Luego, se preparó cada uno de los medios mezclando cada compuesto en las concentraciones indicadas (Apéndice B.1.), y el medio A se preparó en duplicado.

Para la inoculación se cortó con bisturí 3 trozos (de 8 x 8 mm) de agar PDA con el hongo *T. versicolor*, para cada uno de los 6 matraces. El séptimo matraz se inoculó con un inóculo líquido que se preparó previamente (descrito en el punto siguiente), de manera de poder comparar el crecimiento de los 2 tipos de inóculos en el medio A.

La incubación se realizó por 10 días a 27°C en shaker a 50 rpm, y en oscuridad. Para analizar el crecimiento y la producción de celulasas, se tomaron muestras diariamente de 1 ml de sobrenadante de cada matraz desde el día inicial.

2.2.2. Preparación de pre inóculo

El medio para pre inóculo contenía lo descrito en las tablas B.7 y B.8, y además, 2 % p/v de glucosa para producir un crecimiento rápido de la biomasa. Para ello, se prepararon 2 matraces con medio de cultivo, y se inocularon con 3 trozos de hongo en agar PDA. Se incubaron por una semana a 27°C en shaker a 50 rpm, y en oscuridad. Teniendo una cantidad de biomasa considerable, se extrajeron los cultivos y fueron centrifugados (en frascos previamente esterilizados) a 7.000 rpm, 4°C, por 15 minutos. Luego, se removió el sobrenadante y se agregó agua destilada para homogenizar el pellet, para volver a centrifugar otros 15 minutos en las mismas condiciones. Nuevamente se removió el sobrenadante.

Paralelamente se prepararon 20 ml de medio salino, con la misma composición detallada en la tabla B.7, pero sin triptona, ni extracto de levadura. El pellet obtenido de la última centrifugación fue resuspendido con el medio salino, y traspasado a tubos falcon para homogenizar el contenido por agitación manual y vórtex. Todas estas tareas fueron realizadas bajo mechero, para mantener condiciones de esterilidad y así no contaminar el inóculo.

2.2.3. Pretratamiento de paja de trigo con ácido sulfúrico

En un frasco de 500 ml se agregó 24 g de paja de trigo natural, y 240 ml de ácido sulfúrico al 0,75 % v/v (la biomasa y el ácido deben estar en razón 1:10). El frasco se debe llevar al autoclave por 30 minutos. Luego de enfriarse el recipiente, se neutralizó el contenido con hidróxido de sodio (2 M) hasta alcanzar un pH entre 8 y 11. Finalmente, se lavó la paja de trigo con agua destilada hasta alcanzar pH cercano a 7, se filtró usando gasa, y se secó en horno a 50°C toda la noche.

2.2.4. Preparación de cultivo definitivo

Luego de analizar la producción de celulasas de los medios probados anteriormente, se decidió realizar un nuevo cultivo con el medio A y utilizando un pre inóculo en base al mismo medio. Este cultivo es el que se utilizó posteriormente para obtener el extracto de proteínas que fueron separadas por cromatografía.

Se prepararon 6 matraces con aproximadamente 100 ml de agua destilada y 1 % p/v de paja de trigo pretratado con ácido sulfúrico, para ser autoclavados. Luego, se removió el agua de cada matraz teniendo cuidado de no desechar la paja de trigo.

Los compuestos indicados en las tablas B.7 y B.8 fueron preparados por separado, y se agregaron en condiciones estériles a cada matraz con la concentración dada por el medio A. Se agregó agua destilada estéril para completar el volumen de 100 ml.

Finalmente se inoculó cada matraz con 5 ml de pre inóculo del hongo *T. versicolor*. La incubación se realizó por 12 días a 27°C en shaker a 50 rpm, y en oscuridad. Desde el día inicial al día 11, se tomaron muestras de 1 ml de cada matraz para realizar los ensayos de actividad de las celulasas. En el día 12 se terminó el cultivo para extraer las proteínas inducidas por la biomasa lignocelulósica del medio.

2.3. Ensayos de actividad de celulasas

Durante el crecimiento del hongo en el medio inductor con paja de trigo, se tomaron muestras de sobrenadante a las cuales se realizaron ensayos de actividad con Carboximetil celulosa (CMC).

CMC es un polímero derivado de la celulosa, formado por grupos carboximetil y unido por grupos hidroxilos. Se utiliza para caracterizar endoglucasas, ya que gracias a su estructura amorfa, es fácilmente degradado por este tipo de enzimas. El producto de la degradación contiene azúcares reductores, que son fácilmente medibles mediante la reacción con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)[13].

El ensayo de actividad se realizó tomando 25 μ L de muestra y 50 μ L de solución de CMC al 1 % p/v preparado con buffer Acetato de Sodio (50 mm, pH 5). La reacción se preparó

en microplacas de 96 pocillos, y se incubó a 50°C en thermomixer (sin agitación), por 30 minutos. Posteriormente, se agregaron 75 μL (relación 1:1) de reactivo DNS, y se incubó a 100°C por 10 minutos. Para detener la reacción se puso la microplaca en hielo por 5 minutos. Se tomaron 100 μL del producto de la reacción y se pusieron en placas de 96 pocillos, para luego leer absorbancia a 550 nm.

Las curvas de calibración del método DNS utilizadas, se presentan en el Apéndice D.2.

2.4. Extracción y concentración de proteínas

Con la información del ensayo de actividad con CMC, se obtuvo una curva de producción de celulasas, con lo que fue posible decidir el momento del término del cultivo y la extracción de las proteínas del medio extracelular.

- **Extracción de proteínas del cultivo:** Primero, los cultivos obtenidos se filtraron en una unidad de filtración con bomba de vacío, utilizando un filtro de fibra de vidrio. Se removió la paja de trigo y los restos del hongo. Se realizó una segunda filtración utilizando la misma unidad por vacío, pero un filtro con poro de 8 μm .
- **Precipitación con Sulfato de Amonio:** Midiendo el volumen obtenido con las proteínas, se determinó la cantidad de buffer Acetato de Sodio (0,5 M, pH 6) y agua destilada a agregar para completar 500 ml. Para tal volumen, se prosiguió a agregar 280,5 g de Sulfato de Amonio para una concentración final del 80 %. Para proceder, se puso el líquido en un vaso precipitado dentro de un recipiente con hielo. Luego, se fue agregando lentamente el Sulfato de Amonio, y se mezcló por agitación magnética durante todo el proceso. El líquido obtenido se dejó toda la noche a 4°C con agitación suave. Al día siguiente, se centrifugó todo el líquido a 7.000 rpm por 45 minutos a 4°C, y se desechó el sobrenadante.
- **Diálisis:** El pellet obtenido de la precipitación con sulfato se resuspendió con aproximadamente 5 ml de buffer Acetato de Sodio (50 mM, pH 5, preparado con agua desionizada). Paralelamente, se deben hidratar las bolsas de diálisis por 1 hora en agua desionizada. El líquido resuspendido se puso dentro de una bolsa de diálisis, y se sumergió en un vaso precipitado con 2 litros de buffer Acetato de Sodio (50 mM, pH 5, preparado con agua desionizada). La diálisis se mantuvo con agitación suave toda la noche, y a 4°C.
- **Centrifugación con *Centricon*:** Para concentrar por centrifugación se utilizaron unas columnas con membrana o *Centricon*. Primero se saturaron las columnas con 1 ml de solución de tween 20 al 0,1 %, centrifugando 15 minutos a 6.000 rpm. Luego se desechó el contenido y se cargó el líquido obtenido de la diálisis. Se centrifugó por 1 hora a 6.000 rpm, para luego recuperar el líquido que queda en la parte superior del *Centricon*, el cual contiene las proteínas concentradas (extracto proteico o EP).

2.5. Separación de proteínas del extracto por cromatografía de filtración en gel

Para la separación de las proteínas se utilizó un cromatógrafo ÄKTA, con el software Unicorn 5.11, y una columna de filtración Sephacryl S-100. La columna tiene las siguientes características: 30 cm de alto, y 1,5 cm de diámetro, con un volumen de 53 ml y cuyo flujo máximo es de 1 ml/min.

Se ocupó como buffer de elución Acetato de Sodio 20 mM con 0,1 M de NaCl, ajustado a pH 6, preparado con agua desionizada y filtrado con poro de 0,2 μm . Se cargaron aproximadamente 200 μL de muestra, de los cuales solo 100 μL entran a la columna, y el resto queda en el loop. El flujo de elución fue de 1 ml/min, con presión máxima de 0,1 MPa, obteniendo fracciones de 1 ml. Se midió la densidad óptica del flujo de elución a 280 nm y 409 nm, con lo cual se obtuvo un perfil cromatográfico medido hasta la fracción N° 52.

2.5.1. Ensayo Bradford

Para estimar la concentración de proteínas de las fracciones obtenidas de la separación por cromatografía, se realizaron mediciones mediante el ensayo de Bradford. En cubetas plásticas para medición de absorbancia, se agregó: 1,2 ml de agua destilada, 50 μL de muestra y 0,5 ml de reactivo de Bradford. Como blanco del ensayo se reemplazó la muestra por agua destilada. Luego, para obtener las concentraciones, se mide absorbancia a 595 nm y 465 nm para cada muestra, incluyendo el blanco. Posteriormente, para cada muestra se calcula el valor dado por la ecuación (3):

$$\Delta Abs = \frac{(Muestra)_{OD595nm}}{(Muestra)_{OD465nm}} - \frac{(Blanco)_{OD595nm}}{(Blanco)_{OD465nm}} \quad \text{Ecc. (3)}$$

Estos valores se correlacionan con una curva de calibración de BSA ([mg/ml] de BSA versus su respectiva relación de absorbancia (3)), para obtener la concentración de proteínas en [mg/ml]. La curva de calibración utilizada se presenta en la Figura D.4 (Apéndice D).

2.6. Ensayos de actividad específicos

Las fracciones obtenidas de la cromatografía se sometieron a una serie de ensayos de actividad de celulasas, xilanasas y ligninasas, los cuales se detallan a continuación.

2.6.1. Ensayos de celulasas y xilanasas

- **Celulasas con CMC:** En este ensayo se detecta principalmente la actividad de endoglucanasas, el cual se realizó utilizando el mismo protocolo de la sección 2.2, tomando

25 μL de muestra y 50 μL de CMC al 1%. Las fracciones que se encuentran en el peak de absorbancia a 280 nm se diluyeron 5 veces, o sea, 5 μL de muestra y 20 μL de buffer Acetato de Sodio (50 mM, pH 5), para luego agregar los 50 μL de CMC al 1%. Se midió absorbancia a 550 nm.

- **Celulasas con Avicel:** El sustrato Avicel es celulosa sintetizada con estructura cristalina, y es principalmente degradada por exoglucanasas, ya que las endoglucanasas difícilmente pueden romper su estructura compleja e insoluble en agua. En este ensayo se agregó la muestra y el sustrato Avicel al 1% (con buffer Acetato de Sodio, 50 mM, pH 5) en la misma proporción que en el ensayo con CMC, pero con 50 μL de muestra y 100 μL de Avicel. La incubación se realiza a 50°C en thermomixer con agitación a 1.000 rpm por 18 horas. Luego, la microplaca donde se realizó la reacción es centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos y a 4°C. Se tomaron 70 μL del sobrenadante de cada pocillo para traspasarlos a una nueva microplaca, cuidando de no remover el Avicel depositado en el fondo. A la nueva microplaca se agregaron 70 μL de DNS a cada pocillo, y se incubó a 100°C por 10 minutos. Se midió absorbancia a 550 nm.
- **Xilanasas:** El xilano, principal componente de la hemicelulosa, es degradado por las xilanasas, por lo que éstas pueden ser inducidas por el medio con paja de trigo. Para medir la actividad de xilanasas, se realiza el mismo ensayo que con CMC, pero como sustrato se utiliza una solución de Xilano al 1% preparado con buffer Acetato de Sodio (50 mM, pH 5). Las condiciones de incubación son las mismas, y se miden azúcares reductores mediante DNS de la misma forma que en los ensayos anteriores.

Para pasar los datos de absorbancia a 550 nm a unidades de actividad (IU, *International Units*), se utilizó una curva de calibración para el ensayo DNS con glucosa (ver Figura D.3, Apéndice D). La actividad enzimática se definió según IUPAC [37], como:

$1[IU] = 1[\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}]$ de glucosa o azúcares reductores formados en la reacción de hidrólisis por minuto.

2.6.2. Ensayos de ligninasas

- **Lacasas:** Se preparó 4 mM de Dimetoxifenol (DMP) en buffer tris Acetato de Sodio (0,1 M, pH 7); esta solución debe prepararse fresca en cada ensayo. En una microplaca se agregó en cada pocillo 75 μL de muestra y 25 μL de DMP. La reacción comienza de inmediato a temperatura ambiente. Se midió absorbancia a 468 nm cada un minuto, por un periodo de 20 minutos, de manera de obtener una cinética de oxidación del sustrato.
- **Manganeso Peroxidasas:** Se preparó 10 mM de Dimetoxifenol (DMP) en buffer Acetato de Sodio (0,1 M, pH 5); esta solución debe prepararse fresca en cada ensayo. Adicionalmente, se preparó 0,4 mM de Sulfato de Manganeso en buffer Acetato de Sodio (0,1 M, pH 5), y 20 mM de peróxido (H_2O_2) fresco. En una microplaca se agregó 45 μL de muestra, 50 μL de DMP y 50 μL de Sulfato. La reacción comienza al agregar 3 μL de peróxido. Al igual que en el ensayo anterior, se midió absorbancia a 468 nm

cada un minuto, por un periodo de 20 minutos, para obtener una cinética de oxidación del sustrato.

Para ambos ensayos de actividad con DMP se usó la conversión de absorbancia (medida a 468 nm) a unidades de actividad enzimática utilizada en el trabajo de Schlosser *et. al* (1997)[38], donde 1 unidad de actividad $[U]$ corresponde al cambio de absorbancia en un periodo de 10 minutos, o equivalentemente:

$$1[U] = 2 \cdot \frac{\Delta OD_{468nm}}{\Delta t}, \text{ donde } \Delta t = 20[\text{min}] \text{ de reacción.}$$

Este valor medido en $[U]$ se dividió por el volumen total en el ensayo, o sea: $[U]/0,1[\text{ml}] = [U/\text{ml}]$, teniendo así la actividad enzimática por unidad de volumen de la muestra.

2.7. Hidrólisis de paja de trigo con fracciones y enzima comercial

Para los ensayos de hidrólisis se utilizó paja de trigo pretratada con hidróxido de sodio al 10 % p/v, y se realizaron 3 tipos de reacciones: con fracciones proteicas de *T. versicolor* (obtenidas de la cromatografía), con fracciones del hongo más Celluclast, y otra reacción sólo con Celluclast.

Primero se preparó buffer Acetato de Sodio (50 mM, pH), con el que se realizaron las soluciones siguientes:

- 5 % p/v de paja de trigo pre tratado con NaOH.
- Tween 20 a una concentración de 25 mg/ml.
- Novozyme a una concentración de 0,1 mg/ml (Concentración envase: 35,53 mg/ml).
- Celluclast a una concentración de 0,4 mg/ml (Concentración envase: 53,47 mg/ml).

Cada reacción contenía: 100 μ L de solución de paja de trigo 5 %, 100 μ L de Tween 20, 32 μ L de Novozyme. Además, cada reacción contenía un componente enzimático distinto:

Reacción 1 (R1): 20 μ L de la fracción proteica proveniente del sobrenadante de cultivo del hongo *T. versicolor*.

Reacción 2 (R2): 25 μ L de la enzima comercial Celluclast.

Reacción 3 (R3): 20 μ L de la fracción proteica y 25 μ L de Celluclast.

Cada reacción tenía 1 ml de volumen final, que se completó con buffer Acetato de Sodio. Como blanco se hizo un mix con la misma composición que la reacción 1, pero la fracción proteica se reemplazó por buffer.

Este ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos, donde cada reacción se hizo en duplicado, y la reacción 2 se hizo en sextuplicado. La incubación se realizó a 50°C por 18 horas con agitación a 250 rpm.

Al término de la hidrólisis se tomaron muestras de cada pocillo para los ensayos respectivos. Se midieron azúcares reductores mediante DNS, Glucosa con el kit Gluc-Pap (Randox) y D-xilosa con el kit D-xylan (Megazyme). Las placas de hidrólisis se guardaron congeladas.

2.7.1. Pretratamiento de paja de trigo con hidróxido de sodio

Primero se preparó $NaOH$ al 10 % p/v. Luego, en un frasco cerrado se puso 40 g de paja de trigo y 200 ml del $NaOH$ 10 %. Se dejó el frasco en un baño caliente a 80°C por 90 minutos, y posteriormente se dejó enfriar. La paja de trigo se lavó con agua destilada y se filtró con gasa, hasta alcanzar un pH cercano a 7. Finalmente, se deja secar la paja en horno seco a 60°C toda la noche.

2.8. Electroforesis de fracciones

Se hizo una electroforesis SDS-PAGE con gel al 12,5 % de Acrilamida Bisacrilamida (29:1). Se preparó el gel de acuerdo a las especificaciones mostradas en la Tabla B.13 (Apéndice B.2), el día anterior a la realización de la electroforesis.

Se prepararon las muestras tomando 5 μL de cada fracción proteica de *T. versicolor* (obtenidas de la cromatografía) a analizar, y 25 μL de buffer de carga, luego calentando 10 min a 100°C. De cada muestra se cargaron 13 μL en cada pocillo del gel. La electroforesis se corrió por 40 min a 440 V, y posteriormente se realizó la tinción del gel con plata (Ver protocolo en Apéndice B.2).

2.9. Estimación del rendimiento hidrolítico

Para determinar la eficiencia hidrolítica del extracto proteico y de las fracciones cromatográficas, se consideraron las mediciones de los ensayos de actividad enzimáticos de celulasas y xilanasas, así como también los datos de hidrólisis de paja de trigo con las fracciones proteicas. Se definió la conversión de celulosa y hemicelulosa (xilano) en la hidrólisis de paja de trigo como:

$$\text{Conversión} = \frac{\text{Cantidad de glucosa o xilosa liberada [mg/ml]}}{\text{Cantidad de celulosa o xilano en paja de trigo [mg/ml]}}$$

El producto de la hidrólisis, a su vez, se relacionó con la cantidad de proteína que produce tal nivel de azúcares, obteniendo un “rendimiento proteico”, o sea:

$$\text{Rendimiento enzimático} = \frac{\text{Glucosa o xilosa producida [mg]}}{\text{Cantidad de proteína en la hidrólisis [mg]}}$$

Para determinar la cantidad potencial de etanol a producir en la fermentación, se consideró la cantidad de glucosa y xilosa producida en la hidrólisis de paja de trigo (azúcares fermentables), por el factor de conversión (FC) dado por la estequiometría de las reacciones para producir etanol a partir de hexosas y pentosas. Luego:

$$\text{Etanol potencial} = (\text{Cantidad de glucosa o xilosa producida en hidrólisis [mg/ml]} \cdot (\text{FC}))$$

Esta cantidad potencial de etanol se estimó considerando un 100 % de conversión teórica de azúcares a etanol, pese a que en la realidad el rendimiento puede ser mucho menor.

$$\text{Rendimiento enzimático (etanol)} = \frac{\text{Etanol potencial [mg]}}{\text{Cantidad de proteína en la hidrólisis [mg]}}$$

El detalle de los cálculos realizados se encuentra en el Apéndice E (Memoria de cálculo).

Capítulo 3

Resultados y Discusión

3.1. Definición de condiciones de cultivo

La primera etapa del estudio consistió en la identificación de las condiciones de cultivo para *T. versicolor*. En base a la bibliografía de diversos cultivos de hongos de pudrición blanca, se decidió fijar ciertos parámetros como: temperatura de cultivo, agitación (aireación) e iluminación. El pH del medio también era una condición limitante para el cultivo, siendo óptimo un pH cercano a 5, para el crecimiento de este hongo y la producción enzimática (ver Tabla 1.3). Sin embargo, no fue posible fijarlo al momento de hacer los medios, ya que cada compuesto fue preparado y esterilizado por separado, y al momento de mezclar los componentes variaba el pH.

Pese a lo anterior, se midieron los pH luego de mezclar los medios, y se encontraban en un rango de 4,5 a 5,5, por lo que estaban dentro de las condiciones deseadas. La temperatura de cultivo fue de 28°C, con baja agitación (50 rpm) y en oscuridad, parámetros fijados en base a la literatura [39] [40]. Además, para inducir la producción de proteínas lignocelulolíticas, se agregó 1 % p/v de paja de trigo [1]. En cultivos previos semi-sólidos preparados con concentraciones de trigo de 5 % p/v, se vio que era muy difícil tomar muestras del sobrenadante, ya que el hongo cubría de micelio la superficie y “solificaba” todo el medio. Además, se detectó actividad celulolítica cercana a cero en la mayoría de éstos.

Respecto a la composición de los medios de cultivo, se consideraron aquellos utilizados en *T. versicolor* y otros hongos de pudrición blanca, y que indujeran la producción enzimática vistos en la bibliografía (ver composición de medios en Apéndice B.1). Las condiciones de preparación para todos los medios fueron las mismas, manteniendo esterilidad en todo el proceso preparativo y en la toma de muestras.

En una primera etapa, todos los medios se inocularon con micelio del hongo en agar PDA (trozos de aproximadamente 8 mm de diámetro), pero también se probó con un inóculo líquido con 2 % de glucosa preparado previamente. Este último resultó ser una mejor opción, dado que la fase lag del crecimiento fue más corta, permitiendo alcanzar una alta actividad enzimática en menor tiempo. Los resultados experimentales de los medios de cultivo e inóculos

se presentan en los gráficos de las Figuras 3.1 y 3.2.

3.1.1. Curvas de producción de celulasas por *T. versicolor*

El gráfico siguiente muestra la actividad de las celulasas producidas por el hongo *T. versicolor* en los distintos medios de cultivo, lo cual fue medido mediante ensayos de azúcares reductores con el sustrato CMC.

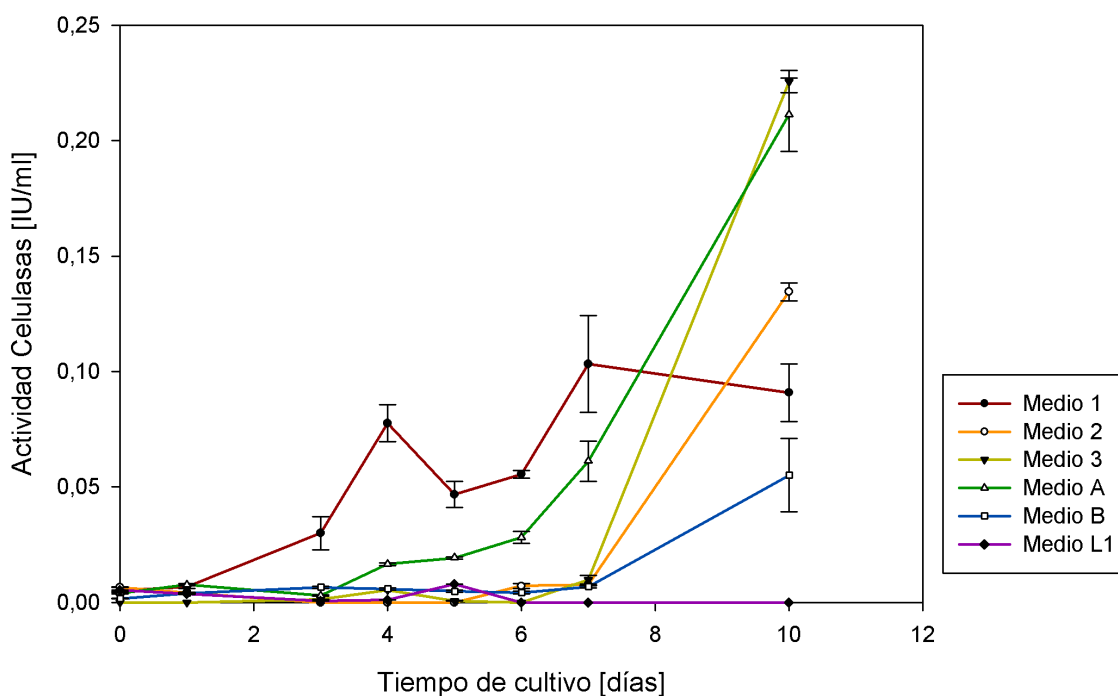


Figura 3.1: Producción de celulasas por el hongo *Trametes versicolor* en distintos medios de cultivo inductores. Error promedio de la medición de actividad: 8 %.

En la Figura 3.1 se observa la progresión de la actividad enzimática en los distintos medios de cultivo inductores. Los medios 3 y A son los que mostraron mayor producción de celulasas. Cabe mencionar que las curvas de estos gráficos corresponden a la producción enzimática durante el cultivo, y no el crecimiento celular de *T. versicolor*, aunque teóricamente exista relación entre la biomasa producida y la actividad enzimática.

Llama la atención que en los medios 2, 3 y B no se detecte actividad enzimática sino hasta el séptimo día, mostrando un alza de actividad en el último día. Parte de la baja actividad mostrada por estos medios, podría explicarse por el congelamiento y descongelamiento de las muestras, previamente a la realización de los ensayos de DNS. Por otro lado, dada la tendencia en los otros medios de cultivo, y el bajo porcentaje de error, es posible distinguir cuales obtuvieron los mejores resultados y cuales no.

Luego, para elegir el mejor medio, se tomó en cuenta solo los resultados del décimo día,

donde claramente los medios 3 y A fueron los que arrojaron mayores valores de actividad celulasa. El medio L1 no mostró actividad, ya que el hongo creció muy poco y el trigo se aglutinó en torno de uno de los trozos de agar (ver Figura C.2 en Apéndice C).

Para analizar las diferencias de los medios de cultivo se construyó la Tabla 3.1. En ella se comparan las concentraciones de los distintos nutrientes: fuente de carbono, nitrógeno, sales, metales trazas y vitaminas (ver detalle de las composiciones de cada medio en Apéndice B.1). En base a esto se hizo una graduación simbólica desde “más concentrado” a “menos concentrado”. En esta tabla no se muestra la comparación entre las sales, ya que en todos los medios las concentraciones eran similares y consistían principalmente en los mismos compuestos: KH_2PO_4 , $MgSO_4$ y $CaCl_2$.

Tabla 3.1: Comparación entre los principales componentes de los medios de cultivo utilizados para *T. versicolor*.

Medio de Cultivo	Fuente de C ⁽¹⁾	Fuente de N ⁽²⁾	Metales trazas	Vitaminas ⁽³⁾
1	0	+	+++	+++
2	+++	++	+	+
3	+++	+++	0	+
A	+	++	+	0
B	0	++	+	++
L1	+++	+	+++	++

⁽¹⁾ Como fuente de carbono se considera la glucosa y triptona, y se excluye el 1% de paja de trigo agregado a cada medio. ⁽²⁾ Se considera el tartrato de amonio y otros nitratos.

⁽³⁾ Corresponde a Tiamina principalmente. Nomenclatura: + Baja concentración, menor a 2 [g/L] (en metales trazas menor a 50 [mg/ml]). ++ Concentración media: 2 - 8 [g/L] (en metales trazas de 50 - 200 [mg/ml]). +++ Alta concentración: mayor a 8 [g/L] (en metales trazas mayor a 200 [mg/ml]). 0 Indica sin componente.

En la Tabla 3.1 se puede ver que los medios tienen grandes diferencias en cuanto a la fuente de carbono, la concentración y los tipos de metales trazas presentes, y si tienen o no Tiamina. En relación a los resultados vistos en la Figura 3.1, los medios 3 y A que produjeron la mayor actividad celulasa, ambos tienen baja o nula concentración de Tiamina y metales trazas, y concentraciones similares de amonio. La gran diferencia entre estos dos medios, es la concentración de fuente de carbono adicional al trigo; mientras que el medio 3 contiene una alta concentración de glucosa, el medio A tiene una baja concentración de triptona (compuesta por una variedad de aminoácidos) y sin glucosa.

La presencia de glucosa como fuente de carbono pudo haber producido una represión de la producción de celulasas en los medios 2, 3 y L1 (que tienen alta concentración de glucosa inicial), los cuales presentan una baja actividad hasta el séptimo día. Esta represión se ha reportado en la literatura para el hongo *P. chrysosporium* [41]. Otra posibilidad es que al tener glucosa disponible, el metabolismo del hongo se pudo inclinar hacia el crecimiento celular y reproducción, sin dejar lugar a la producción de proteínas celulolíticas. Este crecimiento del hongo se evidencia en la fotografía mostrada en la Figura C.1 (Apéndice C), donde en el medio 3 se formó gran cantidad de biomasa en comparación a los otros cultivos.

Por otra parte, el hongo en el medio A tuvo un buen crecimiento y producción enzimática, pese a tener baja concentración de nutrientes en general. La baja concentración de carbono y nitrógeno, y la presencia de manganeso son factores inductores de las enzimas Manganese peroxidases [38]. Además varios azúcares actúan como represores de la producción de lacasas [38]. Por ende, este medio podría ser un buen productor de MnP y lacasas.

Sin embargo, el cultivo presentaba una fase lag de crecimiento muy extensa cuando se inoculó el hongo en agar, alcanzando una buena producción enzimática en mayores tiempos de incubación. Este problema pudo resolverse al realizar un pre inóculo, donde se cultivó el hongo con 2% de glucosa para tener un crecimiento rápido, y del cual se obtuvo un inóculo líquido con una alta concentración de biomasa. Este inóculo líquido permitió una alta producción enzimática en el medio A y en menor tiempo (ver Figura 3.2).

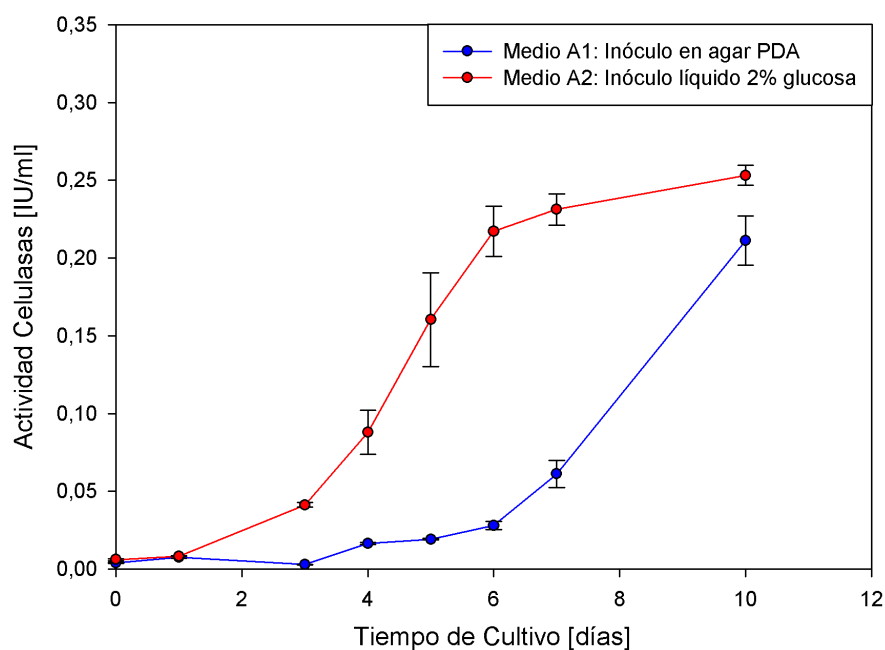


Figura 3.2: Producción de celulasas en dos tipos de inóculo de *Trametes versicolor* en el medio A. El medio A1 corresponde al medio A inoculado con hongo en agar PDA, y el medio A2 es inoculado con el hongo crecido en un medio líquido con 2% de glucosa. Error promedio de la medición de actividad: 8%.

En la Figura 3.2 se muestra la comparación entre el inóculo convencional (micelio del hongo en agar), con el inóculo líquido preparado previamente. El crecimiento del hongo en el medio A2 tiene una fase lag de aproximadamente 24 horas, donde al cabo de este tiempo comienza la fase exponencial de actividad hasta el sexto día. En cambio con el medio A1 la fase lag se extiende hasta el quinto o sexto día, y recién después del día 6 se observa un crecimiento exponencial.

3.1.2. Medio de cultivo elegido

Con los antecedentes mostrados anteriormente, se decidió realizar los cultivos definitivos con el medio A con inóculo líquido, incubado a 28°C, a 50 rpm de agitación y en oscuridad. Además, en base a experimentos previos, se pudo ver que existía una mejor producción enzimática en cultivos con poco volumen, quizás por el mayor contacto del micelio del hongo con la paja de trigo depositada en el fondo del matraz. Por esa razón, se decidió hacer un cultivo de 600 ml dividido en 6 matraces con los mismos componentes (100 ml en cada uno).

En la Figura 3.3, se presenta la actividad enzimática de *T. versicolor* cultivado en 6 matraces con el medio A, de los cuales se tomaron muestras del sobrenadante diariamente. En este gráfico se observan diferencias entre cada matraz, lo cual evidencia crecimientos distintos, posiblemente debido a distintas concentraciones de inóculo. Cabe mencionar que se agregó 5 ml de inóculo líquido en cada matraz, pero la cantidad de hongo en cada inóculo es variable. El matraz 1 fue el que presentó menor producción enzimática, y esto se podría explicar porque se usó un inóculo antiguo refrigerado, con el fin de probar si los hongos seguían viables para su reproducción. El resto de los matraces se inocularon con una preparación fresca, tal como se detalla en Materiales y Métodos (Capítulo 2).

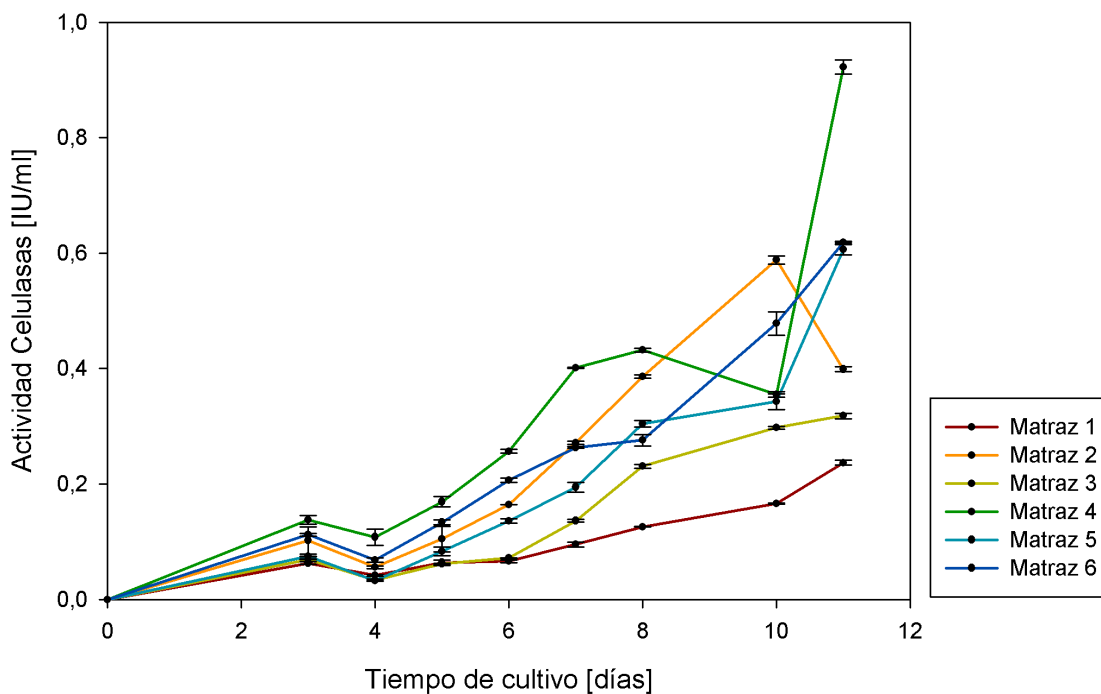


Figura 3.3: Producción de celulasas en por el hongo *T. versicolor* en el medio A (6 matraces de 100 ml). Error promedio de la medición de actividad: 3 %.

En el gráfico anterior, se observa que la actividad enzimática está entre 0,2 y 0,6 [IU/ml] en el día 11, y solo un matraz alcanza una actividad sobre 0,9 [IU/ml]. La actividad promedio es de 0,5 [IU/ml], y con un error de medición cercano al 3 %, por lo cual los datos son confiables. Se destaca que los valores obtenidos en este cultivo fueron superiores a los obtenidos en el cultivo realizado previamente con las mismas condiciones (ver Figura 3.2), cuyo máxima

actividad alcanzada al décimo día fue cerca de 0,25 [IU/ml], o sea, se obtuvo el doble de actividad enzimática en promedio. Cabe destacar que las condiciones de cultivo de ambos experimentos fueron las mismas, y la actividad se midió mediante el ensayo de DNS bajo los mismos parámetros.

3.2. Evaluación de la separación de proteínas de *Trametes versicolor*

La idea de separar las proteínas lignocelulolíticas, desde el medio de cultivo de *T. versicolor*, es principalmente poder identificar aquellas fracciones cromatográficas que tengan mayor actividad enzimática. Para poder realizar la cromatografía de filtración en gel, primero se deben extraer y concentrar las proteínas desde el medio, para luego cargar parte del extracto en la columna. La finalidad de la cromatografía no fue purificar las proteínas, sino que separarlas en fracciones, y luego evaluar su actividad por medio de ensayos de específicos y la hidrólisis de paja de trigo.

3.2.1. Extracción de proteínas desde el cultivo de *T. versicolor*

La extracción de proteínas se realizó al día 12 de cultivo, luego éstas se precipitaron con sulfato de amonio para concentrarlas, y se dializó para eliminar las sales residuales. Posteriormente se hizo una nueva concentración por centrifugación con *Centricon*, obteniendo un extracto proteico (EP).

La concentración de proteínas del extracto fue medido por el método de Bradford, obteniendo 0,9 [mg/ml]. Además, se midió la actividad de celulasas con CMC, obteniendo 9,74 [IU/ml]. En esta etapa se recuperó solo un 5% de la actividad total con respecto a la suma de la actividad de los cultivos en el día 11 (ver Tabla 3.2). Esto quiere decir, que se perdió un 95% de actividad enzimática en la etapa de concentración de las proteínas desde el medio de cultivo, mediante la precipitación por sulfato de amonio, diálisis y centrifugación con *Centricon*.

Para evaluar la recuperación proteica y su actividad en las etapas de extracción y separación por cromatografía, se consideraron los datos obtenidos por los ensayos de Bradford y azúcares reductores con el sustrato CMC. Se calcularon porcentajes de recuperación con respecto a la etapa anterior, tanto para la cantidad de proteínas, como para la actividad enzimática (ver Tabla 3.2). El detalle de los cálculos realizados se muestran en el Apéndice E (memoria de cálculo).

Tabla 3.2: Recuperación de las proteínas extraídas desde el cultivo de *T. versicolor* en las distintas etapas de separación.

Etapa de separación	Proteína total [mg]	Recuperación de proteína ⁽¹⁾	Actividad total CMCasa [IU]	Recuperación de actividad ⁽²⁾	Enriquecimiento [IU/mg prot.]
Sobrenadante de cultivo	NM	100 %	273,00	100 %	NA
Extracción y concentración	1,31	NM	13,64	5 %	10,41
Cromatografía de filtración	0,23	18 %	8,27	61 %	35,96

⁽¹⁾ Corresponde a la recuperación de proteína total (en [mg]) con respecto a la etapa anterior.

⁽²⁾ Es la recuperación de actividad total (en [IU]) de las celulasas con CMC con respecto a la etapa anterior. NM: Dato no medido. NA: No aplica.

3.2.2. Fraccionamiento de proteínas de *T. versicolor* por cromatografía de filtración

Para la separación de las proteínas del extracto del medio extracelular de *T. versicolor*, se realizó una cromatografía de filtración en gel en columna Sephacryl S-100, donde se cargó 200 μ L del extracto proteico, con una concentración de 0,93 [mg/ml]. En la Figura 3.4 se muestra el perfil cromatográfico de absorbancia medida a 280 nm y 409 nm.

En la Figura 3.4 se muestra la absorbancia a 280 nm y a 409 nm, esta última indicaría cierta densidad óptica de centros hemo que tienen las enzimas peroxidasas [42]. La elución de las proteínas comienza cerca de los 15 ml (fracción N°15), y el peak de absorbancia a 280 nm se obtiene a los 24 ml (fracción N°24) con un valor de de 28,1 [mAU]. Además, en esta figura se muestra la concentración proteica de las fracciones obtenidas de la cromatografía, cuya medición se realizó por el método de Bradford.

Al comparar el perfil de absorbancia a 280 nm y el gráfico de concentraciones proteicas, es posible notar que coinciden ambos peaks. También se observa que las fracciones fuera del peak de elución tienen nula concentración, pero esto podría explicarse por tener un contenido proteico bajo el umbral de medición por este método. Dada la correlación entre el peak absorbancia a 280 nm y la concentración de proteínas, es posible también relacionar este perfil con los ensayos de actividad mostrados a continuación.

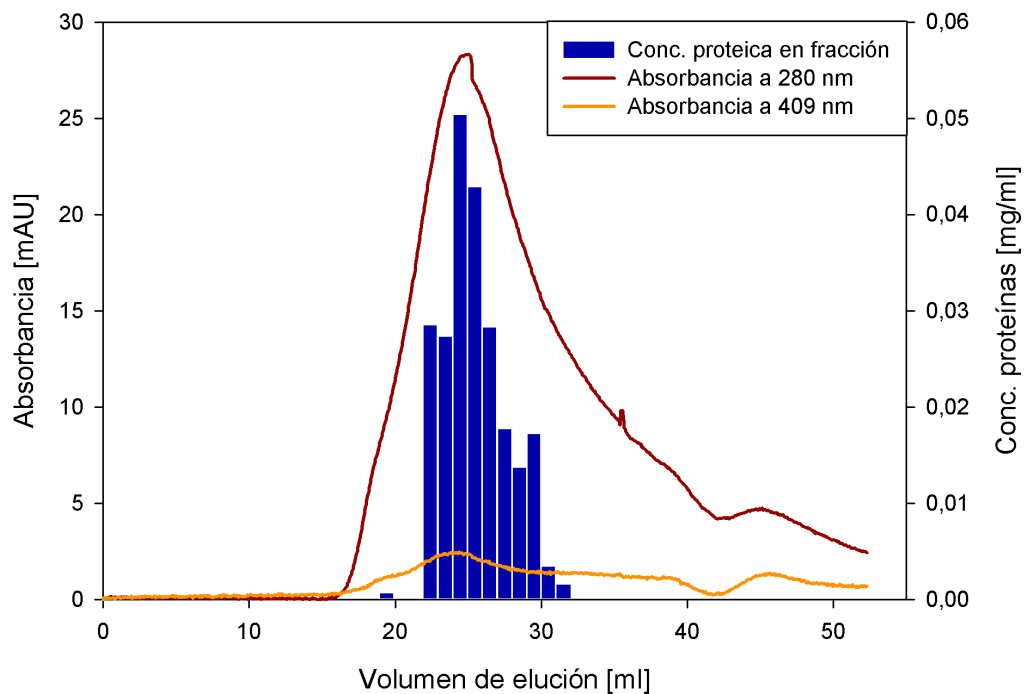


Figura 3.4: Perfil cromatográfico de absorbancia a 280 nm y 409 nm de la separación de proteínas del hongo *T. versicolor*, obtenidas del sobrenadante del cultivo. Se utilizó una columna de filtración Sephacryl S-100, con buffer de elución Acetato de Sodio 20 mM con 0,1 M de NaCl (pH 6). El gráfico de barras indica la concentración proteica de las fracciones cromatográficas medidas por el método de Bradford.

3.2.3. Ensayos de actividad específicos

Para evaluar la separación de las proteínas realizada en la cromatografía, se realizaron ensayos de actividad específicos de celulasas y ligninasas, de manera de poder completar el perfil cromatográfico con los valores de actividad enzimática obtenida. En las Figuras 3.5 y 3.6 se muestra la actividad de celulasas frente a dos sustratos celulósicos: CMC y Avicel. En la Figura 3.7 se presenta la actividad de xilanasas frente al sustrato Xilano, que es el mayor componente de la hemicelulosa. Y finalmente, en las Figuras 3.8 y 3.9 están los gráficos de actividad de las Manganese peroxidases (MnP) y Lacasas (Lac).

En la Figura 3.5 se muestra la actividad endoglucanasa de las fracciones proteicas en el ensayo de azúcares reductores con CMC, la cual se contrasta con el perfil de absorbancia a 280 nm. En este gráfico se observa que los mayores valores de actividad se obtuvieron dentro del peak de absorbancia.

Las fracciones que presentaron mayor actividad fueron la número 25 y 28, con valores cercanos a 1 [IU/ml]. En este gráfico se observa, además, una alta actividad enzimática al comparar con los ensayos de actividad de exoglucanasas y xilanasas, dada la gran cantidad de extremos reductores que se liberan en la hidrólisis de la estructura amorfa de CMC.

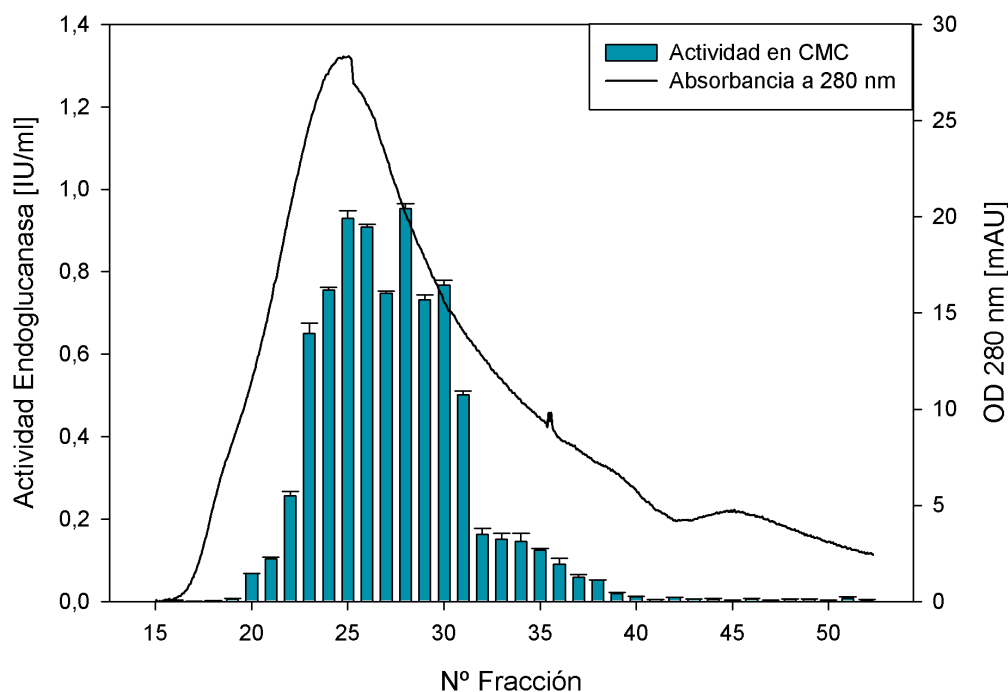


Figura 3.5: Actividad Endoglucanasa en las fracciones cromatográficas del sobrenadante del cultivo del hongo *T. versicolor* con el sustrato CMC. Comparación con perfil de absorbancia a 280 nm. Error promedio de la medición de actividad: 10 %.

Por otra parte, al comparar el perfil de absorbancia a 280 nm con las curvas de calibración de la cromatografía de distintas proteínas estándar realizados en las mismas condiciones, la elución en el peak de actividad se puede comparar con el peak obtenido a los 25 ml de la proteína Quimiotripsina cuyo tamaño es de aproximadamente 25 *kDa* (ver curva de calibración, Apéndice D.1). Según la literatura, las endoglucanasas tienen un tamaño promedio de 30 *kDa* en el hongo *T. versicolor* [12], lo que indicaría que las fracciones del peak de elución tendrían gran cantidad de estas enzimas con ese tamaño molecular.

En la Figura 3.6 se observa el ensayo de fracciones cromatográficas con el sustrato Avicel. Este compuesto es insoluble en agua, y tiene una estructura cristalina formada por polímeros de celulosa. Estas características hacen que sea hidrolizado mayormente por exoglucanasas (CBH), ya que las endoglucanasas tienen muy poca capacidad de degradar tales estructuras. Además, al ser un sustrato insoluble en agua, éste tiende a depositarse en el fondo de la solución, a pesar de la agitación. Por estas razones, la hidrólisis se ve menos favorecida que la reacción con CMC, y la liberación de azúcares reductores es mucho menor.

Se observa en el gráfico de Avicel, que en el peak de absorbancia a 280 nm se concentra la mayor actividad enzimática, aunque también hay actividad considerable en el segundo peak cercano a la fracción 40. Se ve que no hay una tendencia muy marcada, alcanzando máximos de actividad cerca de las fracciones 17, 25, 40 y 47, pero hay que considerar que en general la actividad es muy baja (del orden de $2 \cdot 10^{-4}$ [IU/ml]). La fracción N°24 es la que presenta el mayor valor de actividad con aproximadamente $4 \cdot 10^{-4}$ [IU/ml]. Es importante destacar la alta variabilidad del ensayo, con un error promedio de un 15%, que podría explicarse

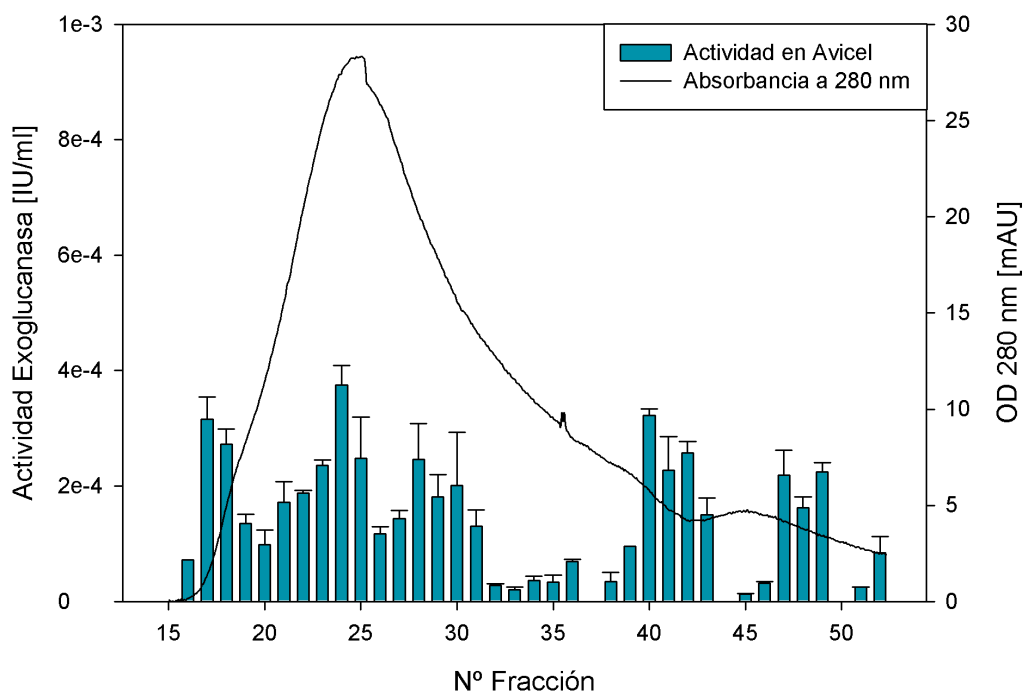


Figura 3.6: Actividad Exoglucanasa en las fracciones cromatográficas del sobrenadante del cultivo del hongo *T. versicolor* con el sustrato Avicel. Comparación con perfil de absorbancia a 280 nm. Error promedio de la medición de actividad: 15 %.

por la baja densidad óptica detectada en las muestras en comparación al blanco utilizado (superando al blanco en un 20 % en promedio). Este error de medición se podría disminuir realizando el ensayo en triplicado, y tomando muestras en un tiempo intermedio (por ejemplo, a las 6 horas y luego a las 12 horas), de manera de ver si hay consecuencia entre los valores de actividad a distintos tiempos.

El rango de tamaños de las exoglucanasas en hongos basidomicetos va desde los 50 kDa a 65 kDa [12], por lo que coincidiría con los peaks de actividad de las fracciones 19 y 24, cuyos tamaños de proteínas podrían estar dentro de ese rango de acuerdo a la comparación con la curva de calibración (ver Apéndice D.1). Cerca de las fracciones 40 y 47 también hay actividad enzimática comparable a los otros dos peaks, aunque en estas fracciones estarían presentes proteínas o subunidades de menor tamaño (bajo los 10 kDa). Sin embargo, no es posible afirmar que estos niveles de actividad sean atribuibles a proteínas de bajo peso molecular u otros factores del medio reactivo.

En la Figura 3.7, se muestra la actividad xilanasas en las fracciones proteicas y el perfil de absorbancias a 280 nm. El máximo valor de actividad corresponde a la fracción N°28 con 0,45 [IU/ml].

Se aprecia que la actividad con xilano es comparable a lo obtenido con el sustrato CMC (ver Figura 3.5). Esto se explica porque el xilano tiene una estructura ramificada, y pese a ser insoluble en agua, es fácilmente degradado por las hemicelulasas de las fracciones, dando como producto polisacáridos con extremos reductores. El xilano es un componente muy abundante

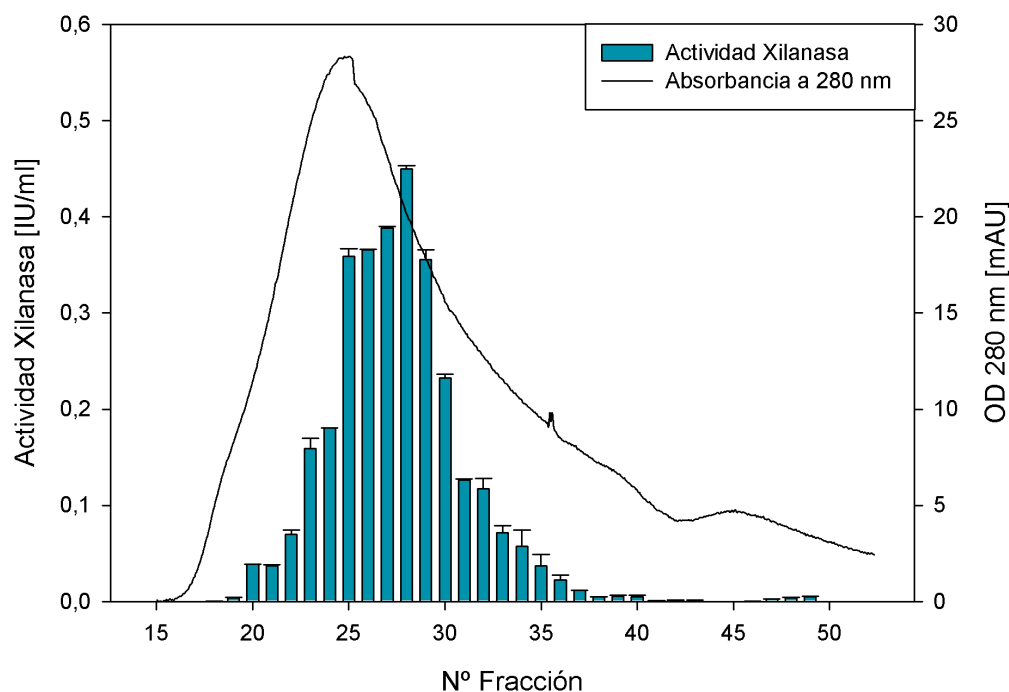


Figura 3.7: Ensayo de actividad Xilanasica en las fracciones cromatográficas del sobrenadante del cultivo del hongo *T. versicolor* con el sustrato xilano. Comparación con perfil de absorbancia a 280 nm. Error promedio de la medición de actividad: 10 %.

en el material ligninolítico (en la hemicelulosa), y actúa como inductor de la producción de xilanasicas [16]. Por ende, en las fracciones proteicas puede que exista una cantidad considerable de estas enzimas, lo cual se refleja en los niveles de actividad observados.

Respecto del peak de actividad también es posible estimar el tamaño de las proteínas que contiene la fracción 28 y las cercanas a ésta. Comparando este peak con la curva de calibración de quimiotripsina (ver Apéndice D.1), donde el peak de elución está cercano a 27 ml, es posible decir que las xilanasicas que se encuentran en esta fracción tendrían un tamaño aproximado a los 25 kDa. De la literatura se sabe que el rango de tamaño de las endoxilanasicas va desde los 16 a 75 kDa [35], y que podrían corresponder a las enzimas presentes en estas fracciones, así como también otras xilanasicas de pesos moleculares similares.

Por otra parte, se midió la actividad específica de Lacasas y Manganese peroxidasas mediante la oxidación del compuesto dimetoxifenol (DMP). Para la construcción de los gráficos, se midió la cinética de oxidación para cada fracción (cambio de absorbancia en el tiempo), y se hizo la conversión a unidades de actividad enzimática de acuerdo a la convención utilizada en el trabajo de Schlosser *et al.* (1997) [38].

La Figura 3.8 muestra la actividad de lacasas. En la mayoría de las fracciones se tienen valores cercanos a 0,1 y 0,2 [U/ml]. El peak de absorbancia a 280 nm coincide con el de actividad, y donde el mayor resultado lo obtuvo la fracción N°23 con 0,36 [U/ml]. Comparando estos resultados con la Figura 3.9, en este último se obtuvo una mayor actividad MnP, logrando un peak de 1,1 [U/ml] en la fracción N°25, y 1[U/ml] en la misma fracción 23.

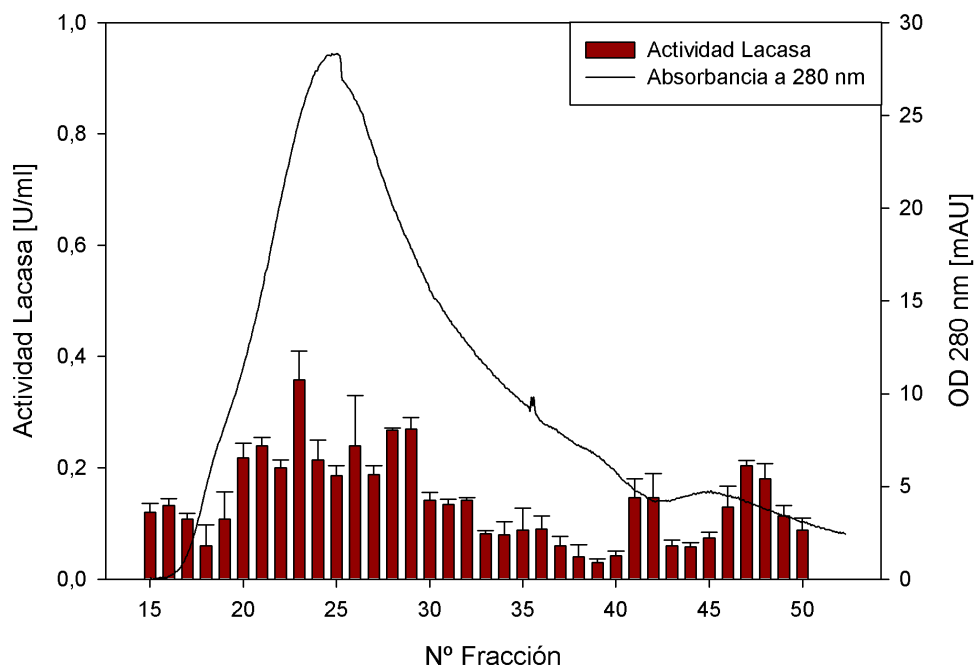


Figura 3.8: Oxidación de DMP por Lacasas del hongo *T. versicolor* en las fracciones cromatográficas, y comparación con perfil de absorbancias a 280 nm.

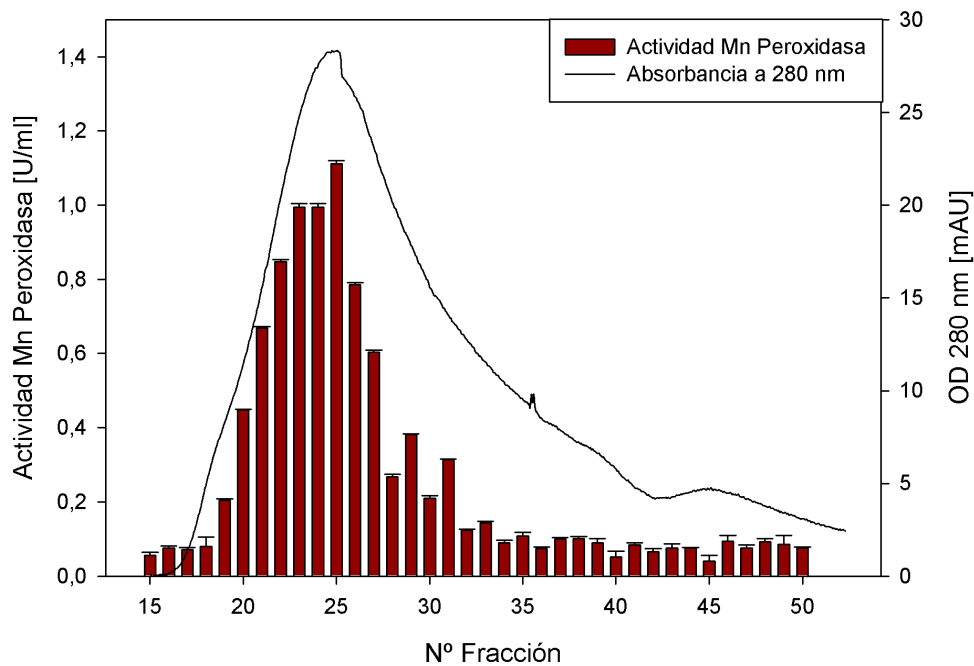


Figura 3.9: Oxidación de DMP por Mn Peroxidasas del hongo *T. versicolor* en las fracciones cromatográficas, y comparación con perfil de absorbancias a 280 nm.

Estos resultados no fueron los esperados, ya que en la literatura se ha visto que la actividad de las lacasas es superior a la de Manganese peroxidases en hongos de pudrición blanca como *T. versicolor*[38] y *C. subvermispora*[43]. Sin embargo, el error de medición de MnP es bajo (alcanzando el 8%), por lo que los resultados son confiables. En el caso de la medición de lacasas el error de medición es sobre el 19%, pero incluso considerando este error no superaría el nivel de actividad de las enzimas MnP en el peak de actividad (fracción 23).

En el ensayo de lacasas (Figura 3.8) el peak de actividad está en la fracción 23, donde las proteínas que contiene tendrían un tamaño aproximado de 45 kDa, al compararlo con la curva de calibración de Ovalbúmina (Apéndice D.1). En el caso de las Mn peroxidases (Figura 3.9), cuyos máximos de actividad están entre las fracciones 22 y 25, podría indicarse que tienen un tamaño molecular similar a las lacasas.

A continuación, se presenta la Tabla 3.3 a modo de resumen de los ensayos de actividad. En ésta se indican las fracciones que tuvieron mayor actividad enzimática en cada ensayo, y se comparan con los valores medidos del extracto proteico (EP) para cada caso. Además se muestra el enriquecimiento proteico, es decir, cuántas unidades de actividad hay por milígramo de proteína, tanto en la fracciones, como en el extracto.

En esta tabla se muestra que, pese a que la actividad enzimática es mucho menor en las fracciones que en el extracto (por tener una menor concentración de proteínas), el enriquecimiento es mayor en casi todas las fracciones. Esto quiere decir que cada fracción está enriquecida en las enzimas lignocelulolíticas, presentando una mayor actividad enzimática por milígramo de proteína que el extracto. Por lo tanto, en la separación por cromatografía se logró separar las fracciones con actividad específica, de aquellas proteínas sin valor hidrolítico.

Tabla 3.3: Comparación entre fracciones cromatográficas con mayor actividad enzimática y el extracto proteico (EP).

Ensayo	Fracción cromatográfica			Extracto proteico	
	N°	Actividad [U/ml]	Enriquecimiento [U/mg prot.]	Actividad [U/ml]	Enriquecimiento [U/mg prot.]
Endoglucanasa	28	0,95	69,49	9,74	10,45
Exoglucanasa	24	$4 \cdot 10^{-4}$	0,01	$2 \cdot 10^{-2}$	0,02
Xilanasas	28	0,45	32,91	2,89	3,10
Lacasa	23	0,36	13,19	NM	NM
Mn Peroxidasa	25	1,11	25,94	19,31	20,71

La actividad de glucanasas y xilanasas se mide en [IU/ml], y la actividad de ligninasas (Lac y MnP) se mide en [U/ml]. NM: Dato no medido.

3.3. Hidrólisis de paja de trigo por proteínas de *T. versicolor* fraccionadas en cromatografía de filtración

Aparte de los ensayos con sustratos puros, se evaluó la actividad enzimática de las fracciones cromatográficas mediante la hidrólisis de material lignocelulósico, y cuyos resultados serían los más relevantes para futuras aplicaciones. En este caso se utilizó paja de trigo pretratada con hidróxido de sodio (NaOH) y molida a polvo fino, de manera que las fracciones pudieran hidrolizar de mejor forma este sustrato. La idea de este experimento era comparar la hidrólisis realizada por las proteínas fraccionadas, con respecto a la hidrólisis usando las mismas proteínas adicionadas a una cantidad fija de celulasas comerciales (Celluclast). El objetivo era ver la contribución de las fracciones proteicas a la acción de la enzima comercial, teniendo la misma cantidad de trigo a sacarificar y con las mismas condiciones experimentales.

En las Figuras 3.10 y 3.11 se presentan los resultados de azúcares reductores y glucosa en solución, medidos al cabo de 18 horas de hidrólisis a 50°C. También se midió la concentración de xilosa (monómero de xilano) presente en algunas reacciones de la misma hidrólisis (ver Figura 3.12).

Para entender estos gráficos considerar la siguiente nomenclatura:

R1: Corresponde a la reacción de hidrólisis de paja de trigo con cada una de las fracciones cromatográficas provenientes del sobrenadante de cultivo del hongo *T. versicolor*.

R2: Reacción de hidrólisis de paja de trigo que contiene solo las enzimas de Celluclast.

R3: Reacción de hidrólisis de paja de trigo con una mezcla 1:1 de fracciones cromatográficas y de Celluclast.

Cabe destacar que R1, R2 y R3 contienen la misma cantidad de Novozyme, por lo que esta sería la “actividad basal” en la hidrólisis. El blanco utilizado en el experimento consistía en una mezcla con los mismos componentes de las reacciones, incluyendo Novozyme, pero sin Celluclast, ni fracción proteica.

Se observa que la reacción de hidrólisis con las proteínas fraccionadas (R1) tiene muy bajo rendimiento, tanto en el gráfico de azúcares reductores (Figura 3.10), como en el de glucosa (Figura 3.11). Esto se explica porque se agregó muy poca cantidad de proteína. En este experimento el volumen de cada fracción era fijo, pero la concentración proteica en cada uno era distinta.

Los resultados de la reacción R3 si son comparables con los de R2, ya que como el volumen de cada fracción proteica era el mismo en cada uno, es posible notar la contribución de las enzimas del hongo respecto de la enzima comercial. En la Figura 3.10, las fracciones que obtuvieron mayor concentración de azúcares reductores fueron desde la N° 22 a 26, y desde la N° 28 a 32, superando los 0,5 [mg/ml] que libera la reacción solo con Celluclast (R2). Incluso considerando las desviaciones estándar mostradas por las barras de error, es posible ver que existe un aumento en los niveles de AR en las fracciones 23 y 30, y en menor medida en las fracciones 25 y 31. El brusco descenso mostrado en la fracción 27 puede explicarse por algún error experimental o de medición, ya que la desviación es cercana al 30 %.

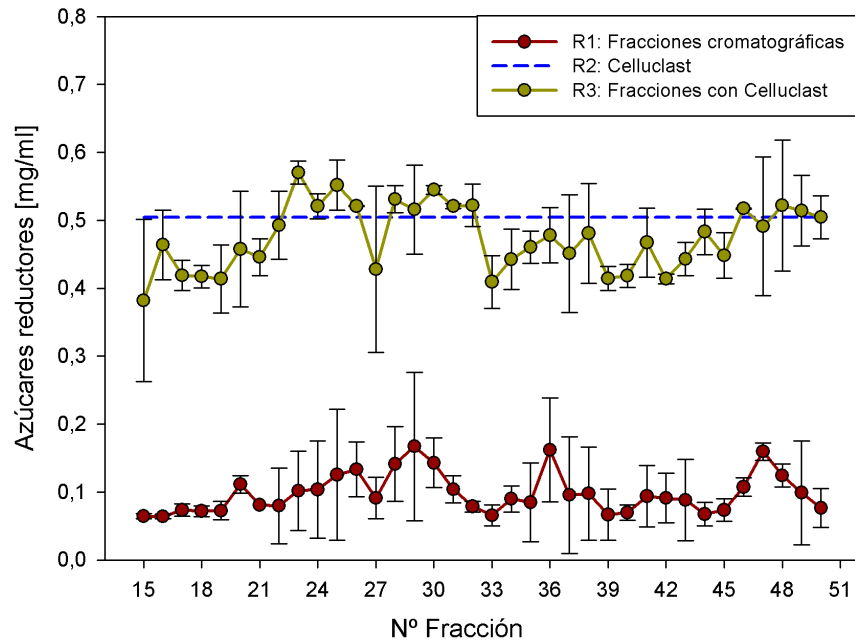


Figura 3.10: Concentración de azúcares reductores en hidrólisis de paja de trigo. R1: Hidrólisis con fracciones fraccionadas por cromatografía del sobrenadante del cultivo de *T. versicolor*, R2: Hidrólisis solo con Celluclast, y R3: Hidrólisis con fracciones y Celluclast.

Un comportamiento similar se observa en el gráfico de la Figura 3.11, donde hay una baja concentración de glucosa en R1, y concentraciones más altas en R2 y R3. Los valores de glucosa son mucho más bajos que los de azúcares reductores, lo cual es lógico, dado que los AR representan cualquier extremo reductor de oligosacáridos, incluyendo monómeros con extremos reductores, dentro de los que podría estar la glucosa.

Respecto de la reacción R3 en el gráfico de glucosa (Figura 3.11) las fracciones 19, 20, y desde la N° 23 a la 33 (sin contar la N° 27), mostraron concentraciones superiores a la reacción con Celluclast (R2). Esta tendencia es la misma a la vista en la Figura 3.10 de azúcares reductores. Estos resultados reafirmarían la presencia de mayor actividad hidrolítica en las fracciones del peak cromatográfico, que puede explicarse por la mayor concentración de celulasas que complementan la acción de Celluclast.

Comparando los gráficos de AR y glucosa con los resultados de actividades endoglucanasas y exoglucanasas de las Figuras 3.5 y 3.6, se ve que los datos son consistentes. Los mayores valores de actividad celulasa de las fracciones, coinciden con las máximas concentraciones de los azúcares obtenidos en la hidrólisis de paja de trigo.

En el gráfico de la Figura 3.12 se muestran los resultados de xilosa en algunas fracciones (20, 23, 25, 27, 41 y 47). En este ensayo solo las fracciones 25 y 27 de la reacción R3 superaron la cantidad de xilosa liberada en la hidrólisis con Celluclast (R2). Las concentraciones de xilosa son bajas con respecto a los azúcares reductores y menores que la glucosa, pero esto era esperable ya que esta pentosa está en mucho menor proporción que los monómeros de celulosa en la paja de trigo.

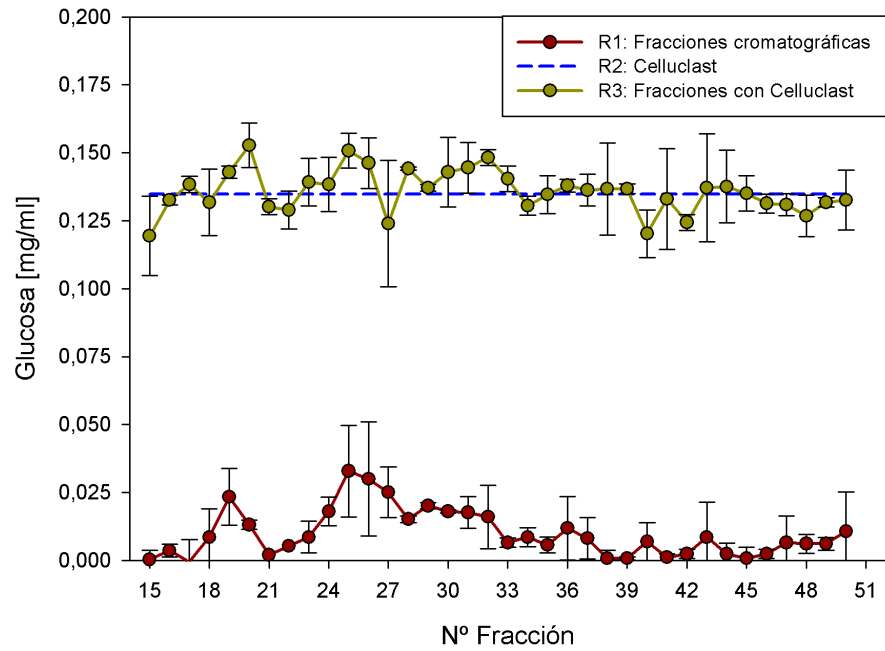


Figura 3.11: Concentración de glucosa en hidrólisis de paja de trigo. R1: Hidrólisis con fracciones fraccionadas por cromatografía del sobrenadante del cultivo de *T. versicolor*, R2: Hidrólisis solo con Celluclast, y R3: Hidrólisis con fracciones y Celluclast.

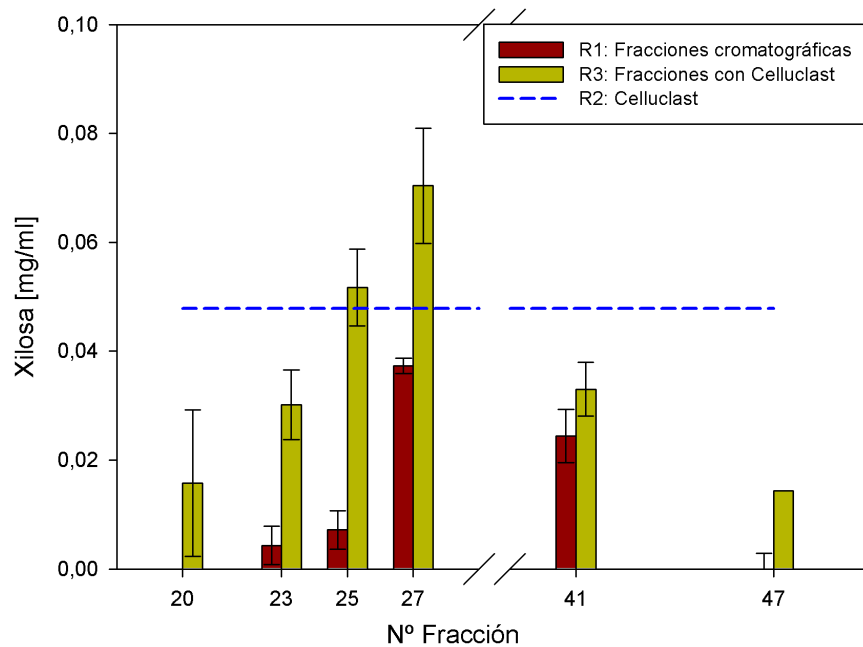


Figura 3.12: Concentración de xilosa en hidrólisis de paja de trigo. R1: Hidrólisis con fracciones fraccionadas por cromatografía del sobrenadante del cultivo de *T. versicolor*, R2: Hidrólisis solo con Celluclast, y R3: Hidrólisis con fracciones y Celluclast.

Al comparar los resultados de xilosa en hidrólisis de paja de trigo con la hidrólisis de xilano puro (ver Figura 3.7), es posible observar que la mayor actividad de xilanasas (en ensayo con xilano) coincide con la mayor concentración de xilosa en la hidrólisis de paja de trigo, que ocurre entre las fracciones 25 a 28. Por lo tanto, estos datos son consistentes.

Para visualizar la contribución realizada por las fracciones proteicas del hongo *T. versicolor* a la hidrólisis con Celluclast, se calcularon los cuocientes $R3/R2$, de manera de estimar en cuánto aporta la acción de las proteínas fraccionadas a la actividad de la enzima comercial. En la Figura 3.13 se muestran los cuocientes calculados para los datos de azúcares reductores (AR) y glucosa, obtenidos en las fracciones con mayor actividad hidrolítica en R2. Además, en la Figura C.4, se muestran los cuocientes calculados para la xilosa. La línea entrecortada indica el cuociente igual a 1, por lo que los valores sobre esta recta indican una contribución positiva o mejoramiento a la hidrólisis con Celluclast.

Con estos cuocientes se puede ver que existe una contribución a la actividad hidrolítica de Celluclast, lo cual se observa en las Figuras 3.13 y C.4. En la Figura 3.13 las fracciones N°23 y 25 presentan un aumento 13 % de AR y 10 % de glucosa con respecto a la hidrólisis con Celluclast. Sin embargo, dado el error asociado a la medición, esta tendencia no da la certeza de la contribución de las enzimas de *T. versicolor* sobre la acción de Celluclast.

Este aumento de actividad se puede atribuir a que hay una mayor cantidad de enzimas en el medio, que podrían ser celulasas, ligninasas, o incluso proteínas auxiliares. Sin embargo, no se puede decir que hubo sinergia entre las fracciones y Celluclast. La sinergia se evidenciaría si la suma real de las fracciones con Celluclast (R3), fuera superior a la suma teórica de la actividad de los componentes por separado (R1 + R2). Esto se muestra en el gráfico de la figura C.4 (Apéndice C), en el cual los cuocientes de la suma real versus la suma teórica son menores a 1 en la mayoría de los casos, por ende, no existiría sinergia en esta hidrólisis.

Por otra parte, al calcular los cuocientes de xilosa, se ve claramente una contribución en la hidrólisis de paja de trigo por la fracción 27, mejorando en un 47 % la acción de la enzima comercial. Y, en menor medida, se ve una contribución por la fracción 25. En este sentido, sería interesante poder estudiar a futuro en mayor profundidad las xilanasas producidas por este hongo, y sus aplicaciones en la hidrólisis de lignocelulosa.

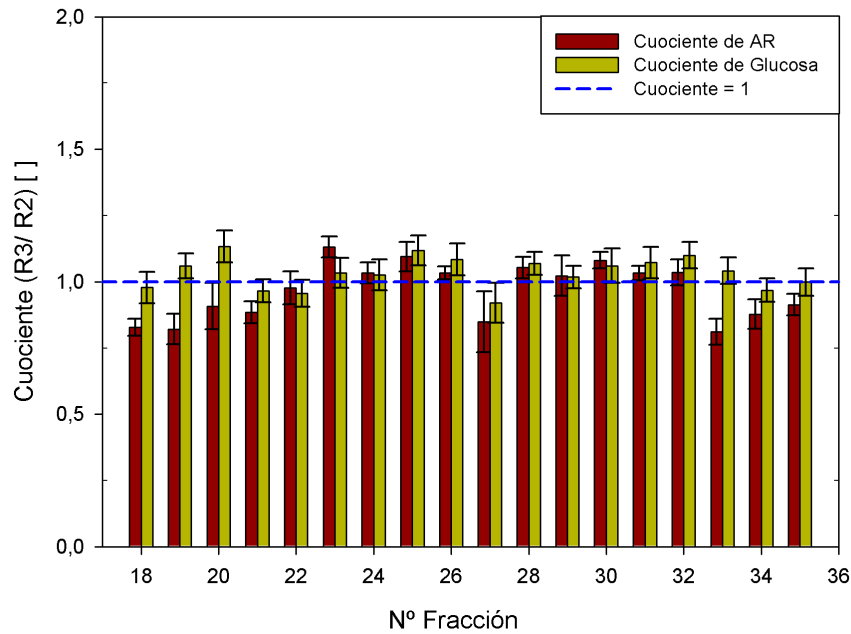


Figura 3.13: Cuociente de los resultados de AR y glucosa entre la reacción R3 (Hidrólisis de proteínas fraccionadas de *T. versicolor* con Celluclast) y la reacción R2 (sólo Celluclast). Cuocientes mayores a 1 (línea azul) indican un mejoramiento de la hidrólisis de paja de trigo.

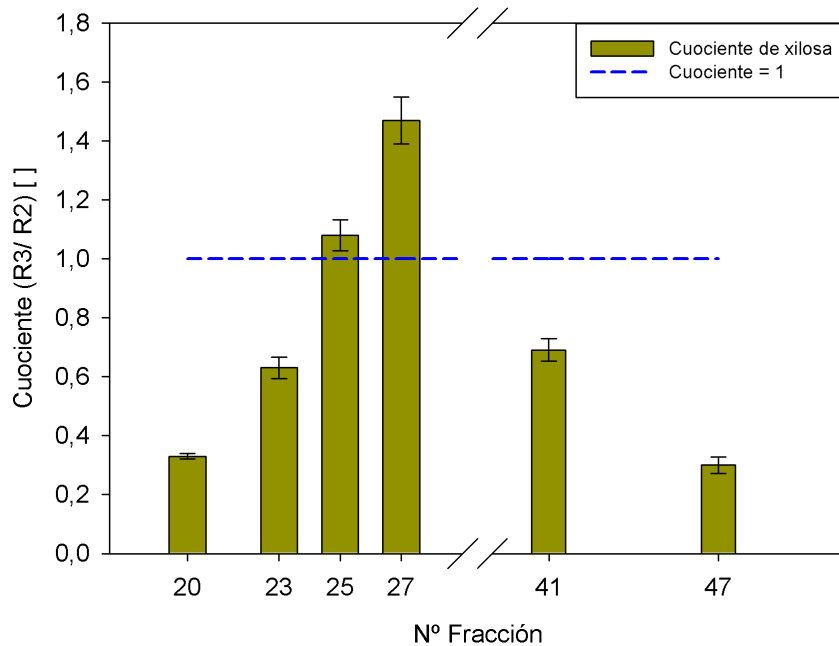


Figura 3.14: Cuociente de los resultados de xilosa entre la reacción R3 ((Hidrólisis de proteínas fraccionadas de *T. versicolor* con Celluclast) y la reacción R2 (sólo Celluclast). Cuocientes mayores a 1 (línea azul) indican un mejoramiento de la hidrólisis de paja de trigo.

3.4. Caracterización electroforética de las proteínas fraccionadas de *T. versicolor*

Con los datos obtenidos tanto en los ensayos enzimáticos específicos, como en los ensayos de hidrólisis con paja de trigo, fue posible identificar las fracciones cromatográficas que tienen mayor actividad lignocelulolítica. En estos ensayos, las fracciones con mayor actividad fueron las N° 23, 25 y 28 (ver Tabla 3.3), que coinciden con los resultados de azúcares reductores, glucosa y xilosa medidos en la hidrólisis.

Respecto a los cuocientes de la hidrólisis de paja de trigo (ver Figura 3.13), la fracción N°23 presentó un aumento de un 13% en la medición de azúcares reductores, y la fracción N°25 un aumento de un 12% con respecto a la reacción con Celluclast. Por otra parte, también hay una alta actividad entre las fracciones 26 a la 32, con contribuciones sobre el 5% en promedio. Considerando que el error de medición de AR es cercano al 9%, y 5% en la medición de glucosa, estos valores de aumento de actividad no parecen ser muy significativos. Sin embargo, en el peak de actividad (fracciones N° 23, 25, 28) si es considerable esta diferencia. Además, en el gráfico de xilosa de la Figura C.4, las fracciones 25 y 27 tuvieron contribuciones significativas en la hidrólisis.

Teniendo estos antecedentes, se eligieron algunas de las fracciones mencionadas para la caracterización por electroforesis, además del extracto proteico, de manera de poder visualizar tamaños aproximados de las proteínas obtenidas del hongo *T. versicolor*. En la Figura 3.15 se presenta la fotografía de la electroforesis SDS-PAGE realizada.

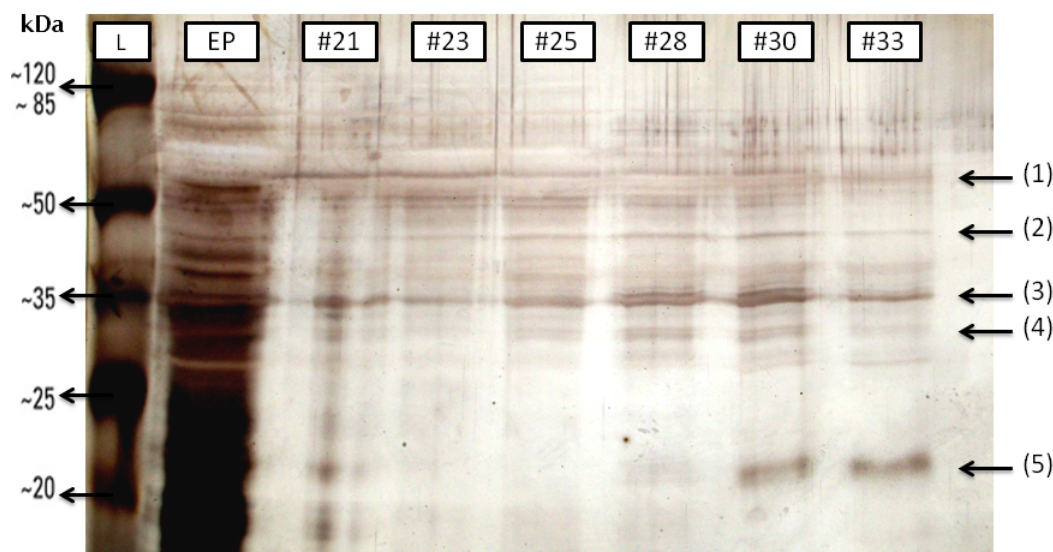


Figura 3.15: Electroforesis SDS-PAGE de las proteínas fraccionadas de *T. versicolor*. (L) corresponde al Ladder con los pesos moleculares de proteínas estándar (kDa). Las muestras son: (EP) Extracto proteico, y fracciones de cromatografía N° 21, 23, 25, 28, 30 y 33. Se indican algunos tamaños de migración: (1) ~ 60 kDa, (2) ~ 45 kDa, (3) ~ 35 kDa, (4) ~ 30 kDa y (5) ~ 20 kDa.

Las bandas que se ven más marcadas en las fracciones del gel corresponden a las denotadas

con los números (1) al (5). La banda (1) indica un peso molecular aproximado de 60 *kDa* respecto al ladder, valor que coincidiría con el rango de tamaño de las Celobiohidrolasas (entre 50 - 65 *kDa*), y se ve en todas fracciones, pero con mayor intensidad en las fracciones 21, 23 y 25. Por otro lado, la banda (3), con aproximadamente 35 *kDa*, se muestra con gran intensidad en todas las fracciones, lo que podría indicar la presencia de enzimas endo-1,4- β -glucanasas. La banda (4) también puede ser una endoglucanasa, de acuerdo al rango de tamaños reportados (ver Tabla 1.3).

De acuerdo a la literatura la enzima β -glucosidasa tiene un tamaño de 300 *kDa* en el hongo *T. versicolor* [12], banda que no es apreciable en la electroforesis. Esto se explicaría porque estas enzimas de mayor tamaño eluyeron en fracciones anteriores a la N^o 20, ya que en el sistema de separación cromatográfico estas enzimas son las que primero debieran salir de la columna de filtración.

La banda (5), que se ve exclusivamente en las fracciones 30 y 33, tiene un tamaño cercano a los 20 *kDa*. Estas bandas podrían corresponder a subunidades (monómeros), o fragmentos de proteínas de mayor tamaño que hayan sido hidrolizadas por proteasas del medio. También podría tratarse de xilanasas, dado que se vio una alta actividad en los ensayos con xilano e hidrólisis de paja de trigo, y cuyas bandas estarían en el rango de tamaños visto en la literatura [34]. Otra opción sería que se tratara de proteínas auxiliares, ya que se han reportado expansinas con tamaños aproximados de 27 *kDa* [28] en hongos basidomicetos, o quinona reductasas con 22 *kDa* de peso molecular [12]. Estas últimas no son proteínas ligninolíticas en sí, pero están involucradas en el proceso oxidativo en la pudrición de madera por los hongos basidomicetos, y actúa en conjunto con celobiosas deshidrogenasas (CDH) [12].

En la Figura 3.16, se presenta la fotografía de la electroforesis y un cuadro resumen con la actividad enzimática en los ensayos específicos de celulasas, xilanasas y ligninasas, de las respectivas fracciones caracterizadas. En esta tabla se ve que las fracciones 25 y 28 presentan las mayores actividades en los ensayos enzimáticos, y en la electroforesis las bandas más marcadas son la (1), (2) y (3), esta última con mayor intensidad. Estos datos indicarían la presencia de enzimas CBH y endoglucanasas, que son inducidas en presencia de lignocelulosa y en ausencia de glucosa [12].

Para tener una caracterización más detallada y certera de los tamaños moleculares de las proteínas y su correspondiente actividad enzimática, se recomienda realizar un zimograma. Este método consiste en una electroforesis SDS con ensayo de actividad incorporado, y en el cual las proteínas no se denaturan completamente, a diferencia del SDS-PAGE, de manera que no pierdan su capacidad catalítica frente a un sustrato específico agregado al gel.

En la Tabla 3.4 se muestran los valores de enriquecimientos calculados en base a los resultados de hidrólisis de paja de trigo. Para ello, se calcularon las unidades de actividad enzimáticas correspondientes a los niveles de azúcares (AR, glucosa y xilosa) liberados en la hidrólisis, tanto de las fracciones como de Celluclast (reacción R1 y R2 respectivamente). En la tabla se observa que las fracciones 27 y 28 tuvieron los mayores enriquecimientos enzimáticos, siendo cercanos a lo obtenido por Celluclast. Se destaca el enriquecimiento enzimático de la fracción 27 en la liberación de xilosa, siendo más del doble del enriquecimiento de la enzima comercial, lo cual es consistente con el enriquecimiento calculado en el ensayo con xilano puro (ver Tabla 3.3).

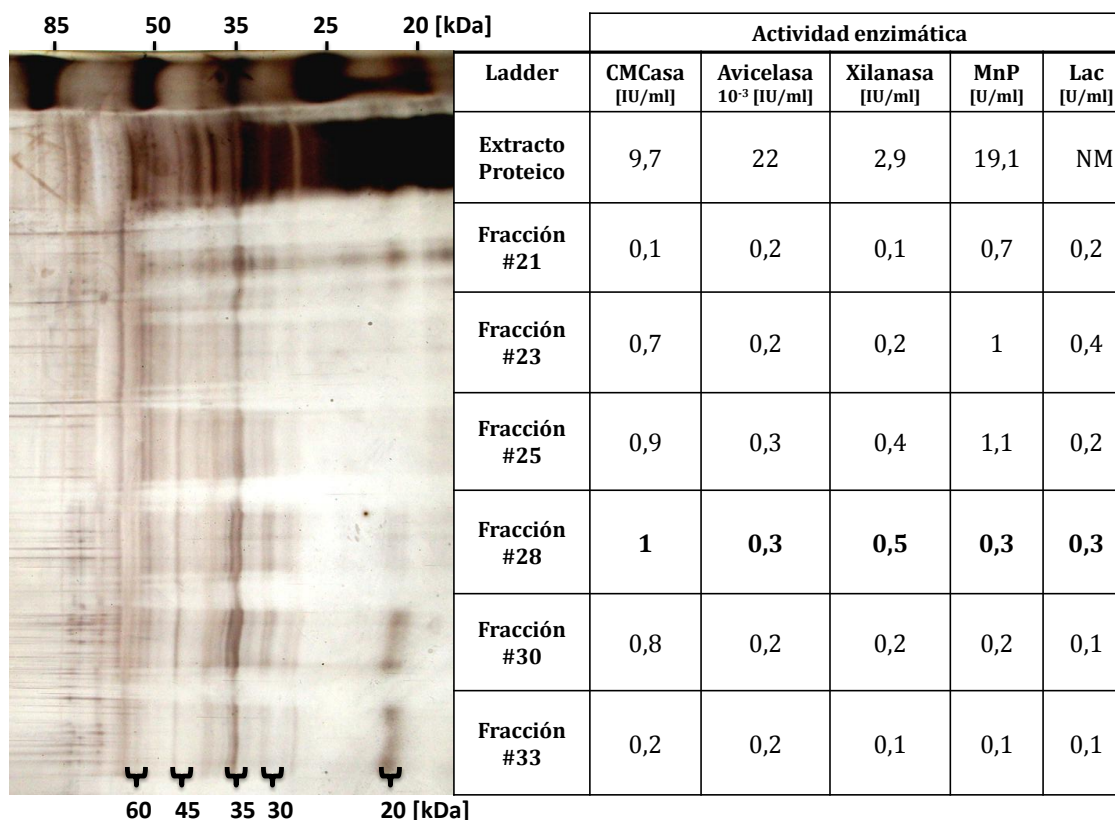


Figura 3.16: Electroforesis SDS-PAGE de fracciones cromatográficas N° 21, 23, 25, 28, 30 y 33, y del extracto proteico completo. Se anexa tabla con resultados de actividad enzimática específica de las muestras. En la fotografía de electroforesis se indican algunos tamaños de migración: (1)~ 60 kDa, (2)~ 45 kDa, (3)~ 35 kDa, (4)~ 30 kDa y (5)~ 20 kDa.

Tabla 3.4: Enriquecimiento de la actividad lignocelulolítica de las proteínas fraccionadas de *T. versicolor* y de Celluclast.

Muestra	Enriquecimiento [10 ⁻² U/mg prot.]		
	AR	Glucosa	Xilosa
Fracción 23	4,20	0,16	0,10
Fracción 25	2,96	0,39	0,10
Fracción 27	6,17	0,73	1,30
Fracción 28	9,87	0,57	NM
Fracción 30	4,05	2,77	NM
Celluclast	6,43	1,39	0,59

NM: Dato no medido.

3.5. Estimación del rendimiento hidrolítico y potencial fermentativo

La última parte del estudio consistió en estimar el rendimiento de las proteínas fraccionadas de *T. versicolor* en la hidrólisis de paja de trigo, y compararlas con Celluclast (celulasas del hongo *T. reesei*). Además, se calculó el potencial fermentativo, es decir, conociendo los niveles de glucosa y xilosa liberados en la hidrólisis, cuánto podría transformarse a etanol considerando un rendimiento teórico del 100 % en la fermentación.

Primero se calculó la conversión de celulosa a glucosa en la hidrólisis de paja de trigo, lo que se muestra en la Figura C.5 (Apéndice C.3). La estimación de la biomasa se hizo en base a un 35 % de celulosa en paja de trigo [10], y considerando 5 [mg] de ésta en 1 ml de reacción. En este gráfico se aprecia que la conversión de celulosa por Celluclast es cercana al 8 %, y en las fracciones apenas alcanza el 2 % en la fracción N°25. Sin embargo, como en las reacciones de hidrólisis se agregó un volumen fijo de cada fracción, la concentración de proteínas era variable. Luego, teniendo estas diferencias de concentración, se normalizaron los rendimientos por milígramo de proteína en todas las muestras, de manera de tener una mejor comparación de los resultados de hidrólisis.

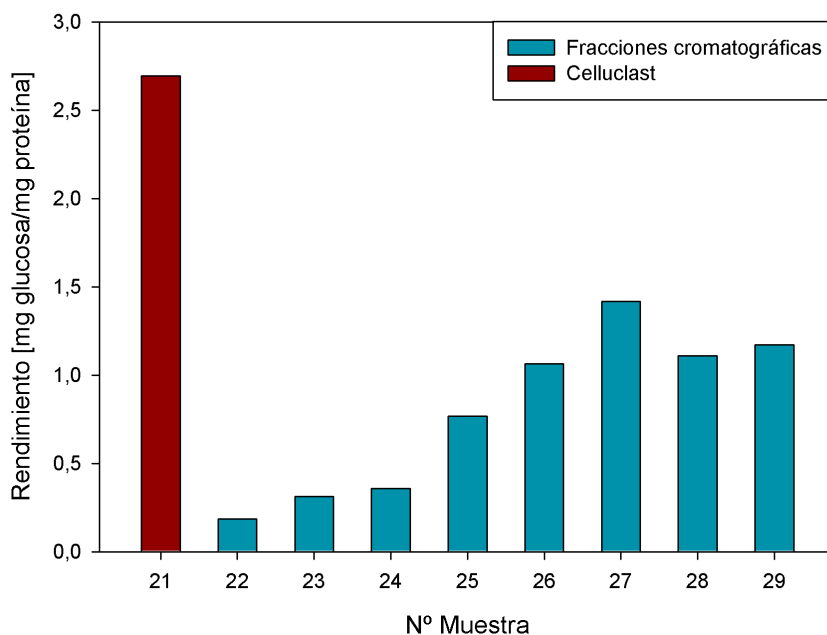


Figura 3.17: Rendimiento de glucosa por cantidad de proteína utilizada en hidrólisis de paja de trigo. Se compara el rendimiento de las fracciones con las mayores concentraciones de proteína (muestras N° 22 a 29) y el rendimiento de Celluclast (muestra N° 21).

En el gráfico de la Figura 3.17 se muestran los rendimientos medidos por la cantidad de glucosa liberada con respecto a la cantidad de proteína en la hidrólisis de paja de trigo. El mejor rendimiento lo obtuvo la fracción N° 27 con 1,4 [mg glucosa/mg proteína], pero que es casi la mitad del rendimiento entregado por Celluclast. Esto era esperable, ya que esta

preparación comercial está más enriquecida en celulasas, que las fracciones cromatográficas obtenidas desde el cultivo de *T. versicolor*.

Con los datos de azúcares formados en la hidrólisis, también se pudo estimar la cantidad de etanol que se podría producir considerando un rendimiento teórico de un 100 %, es decir, por cada mol de glucosa se forman 2 moles de etanol. En base a este supuesto se calculó el rendimiento de etanol potencial, estimado como la cantidad de glucosa producida en la reacción de hidrólisis por el factor de conversión (considerado como 0,5 []), versus la cantidad de proteína en la reacción.

En la Figura 3.18 se presentan los resultados de los rendimientos de potenciales de etanol. En este gráfico se observa que Celluclast tiene un rendimiento sobre 1,3 [mg de etanol/mg de proteína], y la fracción N° 27 alcanza 0,7 [mg de etanol/mg de proteína].

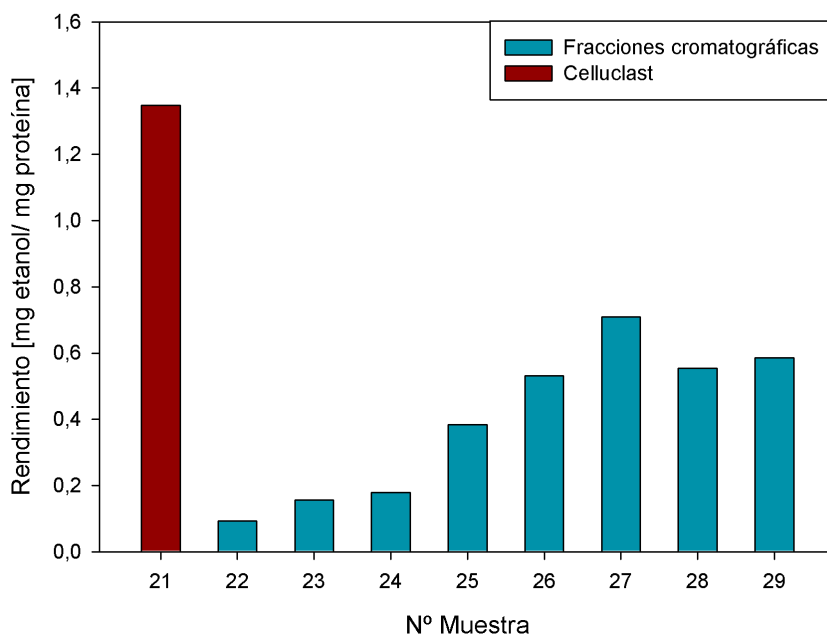


Figura 3.18: Rendimiento del etanol potencial (respecto a la glucosa producida) por cantidad de proteína utilizada en hidrólisis de trigo. Se compara el rendimiento de las fracciones con mayor concentración de proteína (muestras N° 22 a 29) y el rendimiento de Celluclast (muestra N° 21).

Por otro lado, se calcularon los rendimientos a partir de la xilosa formada en la misma hidrólisis de paja de trigo analizada anteriormente. En el gráfico de la Figura 3.19 se muestran los rendimientos de las fracciones 23, 25 y 27, y se comparan con el rendimiento de Celluclast (Muestra N° 22). Las fracciones 23 y 25 entregaron rendimientos menores que Celluclast, no así la fracción N°27, la cual duplica al rendimiento de la enzima comercial. Este resultado reafirmaría los datos obtenidos anteriormente, en el que las proteínas presentes en esta fracción mejoran la acción hidrolítica de Celluclast, y además, tienen un mayor rendimiento por milígramo de proteína.

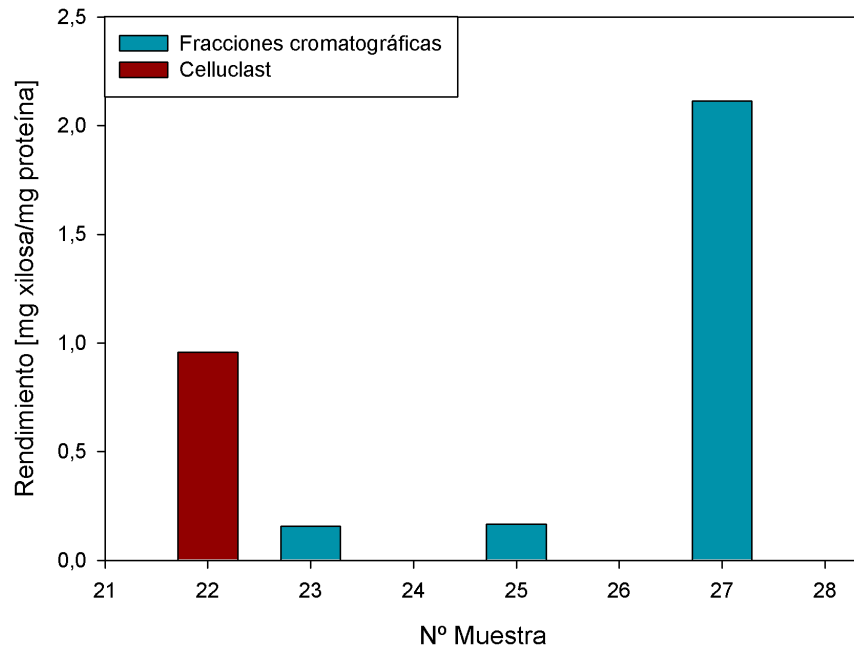


Figura 3.19: Rendimiento de glucosa por cantidad de proteína utilizada en hidrólisis de paja de trigo. Se compara el rendimiento de las fracciones N° 23, 25 y 27, con lo obtenido por Celluclast (Muestra N° 22).

Finalmente se presenta la Tabla 3.5 con los principales resultados de los rendimientos de glucosa, xilosa y etanol potencial. Como dato anexo, se calculó el rendimiento de glucosa y xilosa en la suma de las fracciones, considerado como la sumatoria de los azúcares formados en todas las fracciones, normalizados por la cantidad de proteína total.

En la Tabla 3.5 se muestra que el rendimiento de glucosa por la suma de las fracciones es levemente superior a la fracción 27, pero inferior a Celluclast, pese a tener una concentración de proteínas mayor. Esto reafirma que lo que importa es la actividad hidrolítica y no la cantidad de proteínas presentes en la reacción. Además, en este cuadro se da cuenta que los mejores rendimientos son de la fracción 27, en cuanto a la xilosa producida y el etanol potencial a partir de ésta, llegando a superar en un 100 % al rendimiento de Celluclast.

Tabla 3.5: Resumen de principales resultados de rendimiento proteicos en la formación de glucosa en la hidrólisis de trigo, y en la potencial producción de etanol.

Muestra	Proteína total [mg]	Rendimiento de			
		Glucosa ⁽¹⁾	Xilosa ⁽²⁾	Etanol (glucosa) ⁽³⁾	Etanol (xilosa)
Celluclast	0,05	2,70	0,96	1,35	0,57
Fracción N° 27	0,02	1,42	2,11	0,71	1,27
Suma de fracciones	0,23	1,57	0,83	0,78	0,50

⁽¹⁾ [mg de glucosa/mg de proteína]. ⁽²⁾ [mg de xilosa/mg de proteína]. ⁽³⁾ [mg de etanol potencial/mg de proteína].

Capítulo 4

Conclusiones

El presente estudio se enmarca en la optimización de la hidrólisis de celulosa a partir de residuos lignocelulósicos. Una de las aplicaciones sería poder mejorar el proceso productivo de bioetanol de segunda generación, cuyo uso aportaría a la diversificación de la matriz energética en Chile, disminuyendo la dependencia por combustibles fósiles como el petróleo.

El objetivo general de esta memoria era poder estudiar la producción de proteínas hidrolíticas para la degradación de lignocelulosa por el hongo de pudrición blanca *Trametes versicolor*. Este objetivo se dividió en dos ejes principales: primero definir condiciones de cultivo del hongo que indujeran la producción de proteínas hidrolíticas; y segundo, estudiar y caracterizar tales proteínas mediante ensayos de actividad de celulasas y ligninasas utilizando sustratos puros y paja de trigo.

De acuerdo al primer objetivo específico de este trabajo, se pudieron identificar condiciones de cultivo del hongo *T. versicolor* apropiadas para la producción de enzimas lignocelulolíticas. Los parámetros fijados para el cultivo fueron: 28°C, 50 rpm de agitación (baja aireación) y en oscuridad. El pH del medio no se fijó previo a la inoculación, sin embargo, los medios presentaron rangos de acidez entre 4,5 y 5,5. El medio elegido fue el medio “A”, adaptado del artículo de Suwannarangsee *et al.* (2012)[1], el cual presentó la mejor actividad celulolítica. Este medio se caracteriza por tener una baja concentración de nutrientes, específicamente de glucosa y metales trazas, y carente de vitaminas.

Para acelerar y mejorar la producción enzimática, se determinó agregar un inóculo líquido preparado previamente. El pre inóculo se cultivó una semana antes del cultivo definitivo, en el mismo medio “A” con 2% p/v de glucosa y sin paja de trigo, de manera de acelerar el crecimiento de la biomasa. Además, el cultivo se realizó en volúmenes pequeños (de 100 ml cada uno) con un total de 6 matraces, ya que experimentalmente se observó un mejor crecimiento del hongo, y una mayor actividad enzimática en volúmenes no mayores a 200 ml. La actividad obtenida al cabo de 11 días de cultivo alcanzó 0,5 [IU/ml] en promedio, con un error de medición cercano al 3%.

La etapa siguiente fue la extracción de las proteínas desde los cultivos, y la separación de éstas por cromatografía de filtración en gel (Sephacryl S-100). El perfil de absorbancia a 280

nm tuvo un peak a los 24 ml, cuya absorbancia fue de 28,1 [mAU]. En esta etapa se recuperó un 18 % de proteínas con respecto al extracto proteico cargado a la columna de filtración. Además, se recuperó un 61 % de actividad endoglucanasa (con el sustrato CMC) en la suma de las fracciones, con respecto a la actividad del extracto. El enriquecimiento enzimático al cabo de la separación fue de 35,96 [IU/mg proteína], triplicando el valor obtenido antes de realizar esta etapa.

Para evaluar la actividad enzimática de las proteínas fraccionadas en la cromatografía, se realizaron ensayos con los sustratos CMC, Avicel y xilano, para ver la hidrólisis de celulasas y xilanasas; y con DMP, para estimar la actividad de Manganese peroxidases (MnP) y Lacasas. Las fracciones que obtuvieron los mejores resultados fueron la 23, 24, 25 y 28, las cuales se encuentran dentro del peak de absorbancia a 280 nm. De estos resultados, se pudo concluir que la separación cumplió con el objetivo de enriquecer las fracciones en las enzimas hidrolíticas, ya que la actividad enzimática por milígramo de proteína en la muestra es mucho mayor al enriquecimiento del extracto proteico, calculado para los mismos ensayos. El enriquecimiento de xilanasas obtuvo el mayor valor con 32,9 [IU/mg prot.], versus el extracto proteico con 3,1 [IU/mg prot.].

También se probó la actividad de las fracciones en la hidrólisis de paja de trigo, cuyo objetivo era poder determinar si existía sinergia entre las fracciones y la enzima comercial Celluclast, o un mejoramiento en la acción de esta última. Al término de la reacción se midieron azúcares reductores, glucosa y xilosa, y se calculó el cociente entre las reacciones mixtas (fracciones con Celluclast) versus las reacción solo con Celluclast. De estos resultados, se pudo concluir que en la medición de azúcares reductores y glucosa existe un leve aumento de la actividad de Celluclast en la reacción con las fracciones, alcanzando un 13 % de mejora en la fracción 23. Esta contribución a la acción de la enzima comercial es aun mayor en la medición de xilosa, donde se vio un aumento de un 47 % en la fracción 27.

Por lo tanto, se concluye que el sistema de separación es eficiente para tener una primera aproximación de las enzimas buscadas dentro del pool de proteínas en las fracciones. Además, se logró enriquecer las fracciones en las enzimas de interés, mejorando incluso a Celluclast en algunas de ellas.

Aparte de la caracterización de actividad enzimática, se realizó una caracterización electroforética de las fracciones N° 21, 23, 25, 28, 30 y 33, mediante la técnica SDS-PAGE. De este ensayo se pudo notar que algunas bandas coincidían con tamaños de enzimas celolíticas reportadas en la literatura, y consistentes con los ensayos de actividad. De acuerdo a esto, estarían presentes Celobiohidrolasas (con tamaño de 50 - 65 *kDa* [12]) en la banda de 60 *kDa*, que se ve intensamente en las fracciones 21, 23 y 25; y también endo-1,4- β -glucanasas de aproximadamente 35 *kDa*. También, se observó una banda de bajo peso molecular marcada intensamente solo en las fracciones 30 y 33. Esta banda podría tratarse de proteínas pequeñas como expansinas (de 27 *kDa* [28]), quinona reductasas (de 22 *kDa* [12]), algunas xilanasas, o ser fragmentos o subunidades de proteínas de mayor peso molecular que hayan sido hidrolizadas; sin embargo, no es posible determinar su naturaleza con estos resultados.

Finalmente, el último objetivo era poder evaluar el rendimiento enzimático en la hidrólisis de paja de trigo de las proteínas de *T. versicolor* obtenidas en la cromatografía, y compararlas con Celluclast (celulasas del hongo *T. reesei*). De esto se concluye que es posible obtener

rendimientos iguales o superiores que Celluclast en la liberación del azúcar xilosa, pero no así en cuanto a la glucosa. La fracción 27, obtuvo un rendimiento de 2,11 [mg xilosa/mg proteína], siendo más del doble de lo obtenido por las celulasas comerciales en la hidrólisis de paja de trigo.

Por otro lado, se calculó el rendimiento potencial en la producción de etanol a partir de glucosa y xilosa. El rendimiento de etanol a partir de xilosa fue superior a lo obtenido a partir de glucosa en la fracción 27 (con 1,27 [mg etanol/mg prot.]), superando también el etanol potencial producido por los azúcares liberados por la acción de Celluclast (con 0,57 [mg etanol/mg prot.]).

Al cabo de este estudio fue posible constatar que existe un gran potencial hidrolítico dado por el cultivo del hongo *T. versicolor*, especialmente en cuanto a las xilanasas (hemicelulasas) producidas por éste, ya que en los ensayos realizados se obtuvieron altos niveles de actividad en la hidrólisis de xilano y paja de trigo.

Recomendaciones

En cuanto al cultivo del hongo *T. versicolor* se recomienda continuar utilizando el medio adaptado del artículo de Suwannarangsee [1]. Además, dados los niveles de actividad enzimática obtenidos con este medio, se podría disminuir el volumen a 500 ml y extraer las proteínas al décimo día, sin perder mucha actividad.

Si se desea tener una separación proteica más refinada, se debería realizar una cromatografía de afinidad o por intercambio iónico como una etapa adicional de fraccionamiento. De manera de poder discriminar entre enzimas con tamaños similares, pero con otras características distintas. Aunque se debe hacer un *trade off* entre hacer otro paso de separación para ganar enriquecimiento enzimático y especificidad en la acción, versus el costo que esto implica.

Para poder caracterizar de manera más certera los tamaños de las proteínas hidrolíticas presentes en las fracciones cromatográficas, se debería realizar un zimograma, que es una electroforesis con baja denaturación en la que además se puede medir actividad enzimática. Por lo tanto, las enzimas podrían migrar de acuerdo a su tamaño y capacidad de reaccionar frente a un sustrato específico, lo cual permitiría una mejor diferenciación entre ellas.

Con respecto a los ensayos de actividad específicos, para complementar la actividad ligninasa, se debería realizar un ensayo de la enzima Lignino Peroxidasa (LiP), tanto en las fracciones cromatográficas de *T. versicolor*, como en el extracto proteico.

Como recomendaciones finales se sugiere repetir el experimento de hidrólisis utilizando la misma concentración de proteínas de Celluclast y de las fracciones cromatográficas, para ver si la cantidad de proteínas es la que influye o no en el potencial hidrolítico. Y complementariamente, una hidrólisis usando las mismas unidades de actividad enzimática de Celluclast y de las fracciones, que se pueden medir previamente por un ensayo con CMC. Por otro lado, se recomienda realizar la reacción de sacarificación de paja de trigo con el extracto proteico, de manera de tener una mejor estimación del rendimiento y enriquecimiento en la etapa

posterior de cromatografía.

Con estos resultados sería posible evaluar el costo y la ganancia en la separación de las proteínas, y estimar un escalamiento a volúmenes mayores para posibles aplicaciones a nivel industrial.

Bibliografía

- [1] S. Suwannarangsee, B. Bunternngsook, J. Arnthong, A. Paemanee, A. Thamchaipenet, L. Eurwilaichitr, N. Laosiripojana, and V. Champreda, “Optimisation of synergistic biomass-degrading enzyme systems for efficient rice straw hydrolysis using an experimental mixture design,” *Bioresource Technology*, vol. 119C, pp. 252–261, 2012.
- [2] M. Galbe and G. Zacchi, “A review of the production of ethanol from softwood,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 59, pp. 618–628, 2002.
- [3] A. Garcia, R. Carmona, M. Lienqueo, and O. Salazar, “The current status of liquid biofuels in Chile,” *Energy*, vol. 36, pp. 2077–2084, 2011.
- [4] G. de Chile. Comisión Nacional de Energía (Ministerio de Energía), “Antecedentes sobre la matriz energética en Chile y sus desafíos para el futuro.” Presentación PDF. URL: <http://www.cne.cl/estadisticas/balances-energeticos> [Visita: 18 enero, 2013].
- [5] J. Rass-Hansen, H. Falsig, B. Jorgensen, and C. Christensen, “Perspective bioethanol: fuel or feedstock?,” *Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 82, pp. 329–333, 2007.
- [6] G. de Chile. Ministerio de Energía, “Balance nacional de energía 2011.” Archivo excel (BNE2011.xls), 2012. URL: <http://www.cne.cl/estadisticas/balances-energeticos> [Visita: 18 enero, 2013].
- [7] W. Doherty, P. Mousavioun, and C. Fellow, “Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers.,” *Industrial crops and products*, vol. 33, pp. 259–276, 2011.
- [8] G. de Chile. Comisión Nacional de Energía (Ministerio de Energía), “Potencial de generación de energía por residuos del manejo forestal en Chile.” Archivo PDF, 2008. URL: http://www.inapiprojecta.cl/605/articles-1661_recurso_1.pdf [Visita: 19 enero, 2013].
- [9] Y. Sun and J. Cheng, “Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review,” *Bioresource Technology*, vol. 83, pp. 1–11, 2002.
- [10] N. Sarkar, S. Kumar Ghosh, S. Bannerjee, and K. Aikat, “Bioethanol production from agricultural wastes: An overview,” *Renewable Energy*, vol. 37, pp. 19–27, 2012.
- [11] W. Doherty, P. Mousavioun, and C. Fellow, “Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin,” *International Microbiology*, vol. 8, pp. 195–204, 2005.

- [12] P. Baldrian and V. Valášková, "Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi," *FEMS Microbiol Rev.*, vol. 32, pp. 501–521, 2008.
- [13] G. L. Miller, "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar," *Analytical Chemistry*, vol. 31, no. 3, pp. 426–428, 1959.
- [14] M. P. Coughlan, "Enzymatic hydrolysis of cellulose: An overview," *Bioresource Technology*, vol. 39, pp. 107–115, 1999.
- [15] L. Hildén, *The Characterization of Wood and Wood Fibre Ultrastructure Using Specific Enzymes*. PhD thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, 2004.
- [16] F. Gírio, C. Fonseca, F. Carvalheiro, L. Duarte, S. Marques, and R. Bogel-Lukasik, "Hemicelluloses for fuel ethanol: A review," *Bioresource Technology*, vol. 101, pp. 4775–4800, 2010.
- [17] C. S. Goh and K. T. Lee, "A visionary and conceptual macroalgae-based third-generation bioethanol (TGB) biorefinery in Sabah, Malaysia as an underlay for renewable and sustainable development," *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 14, pp. 842–848, 2010.
- [18] C. E. Wyman, "Biomass ethanol: Technical progress, opportunities, and commercial challenges," *Annu. Rev. Energy Environ.*, vol. 24, pp. 189–226, 1999.
- [19] M. Wang, M. Wu, and H. Huo, "Life-cycle energy and greenhouse gas emission impacts of different corn ethanol plant types," *Environmental research letters*, vol. 2, pp. 1–13, 2007.
- [20] M. de Agricultura (ODEPA), "Nuevos enfoques para Chile potencia alimentaria y forestal." Archivo "PotenciaForestalAlimentariaChile.pdf", 2011. URL: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/AGRO_Noticias/docs/ [Visita: 20 enero, 2013].
- [21] M. d. G. Agricultura y Pesca (FAO), "Estudio de tendencias y perspectivas del sector forestal en América Latina." Página web, 2004. Anexo 1, URL: <http://www.fao.org/docrep/007/j2807s/j2807s00.htm> [Visita: 19 enero, 2013].
- [22] G. de Chile. Comisión Nacional de Energía (Ministerio de Energía), "Identificación y clasificación de los distintos tipos de biomasa disponibles en Chile para la generación de biogás." Presentación PDF, 2007. URL: http://www.inapiprojecta.cl/605/articles-1660_recurso_1.pdf [Visita: 19 enero, 2013].
- [23] O. Sanchez and C. Cardona, "Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks," *Bioresource Technology*, vol. 99, pp. 5270–5295, 2008.
- [24] J. Schurz in *Bioconversion of Cellulosic Substances into Energy Chemicals and Microbial Protein* (T. Ghose, ed.), p. 37, Indian Institute of Technology, New Delhi, 1978.
- [25] C. Cardona and O. Sanchez, "Fuel ethanol production: Process design trends and inte-

- gration opportunities,” *Bioresource Technology*, vol. 98, pp. 2415–2457, 2007.
- [26] A. Esteghlalian, A. Hashimoto, J. Fenske, and M. Penner, “Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass,” *Bioresource Technology*, vol. 59, pp. 129–136, 1997.
- [27] M. Balat, H. Balat, and C. Öz, “Progress in bioethanol processing,” *Progress in Energy and Combustion Science*, vol. 34, pp. 551–573, 2008.
- [28] V. Arantes and J. Saddler, “Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis,” *Biotechnology for Biofuels*, vol. 3, pp. 1–11, 2010.
- [29] A. Berlin, N. Gilkes, D. Kilburn, R. Bura, A. Markov, A. Skomarovsky, O. Okunev, A. Gusakov, V. Maximenko, D. Gregg, A. Sinitsyn, and J. Saddler, “Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates, evidence for the role of accessory enzymes,” *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 37, pp. 175–184, 2005.
- [30] L. Olsson and B. Hahn-Hägerdal, “Fermentative performance of bacteria and yeasts in lignocellulose hydrolysates,” *Process Biochem.*, vol. 28, pp. 249–257, 1993.
- [31] J. Xu, N. Takakuwa, M. Nogawa, H. Okada, and Y. Morikawa, “A third xylanase from *trichoderma reesei* pc-3-7,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 49, no. 6, pp. 718–724, 1998.
- [32] A. Rebelo, A. Mora, R. Ferreira, and F. Amado, “*Trametes versicolor* growth and laccase induction with by-products of pulp and paper industry,” *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 10, no. 3, 2007.
- [33] M. Dashtban, H. Schraft, and W. Qin, “Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities and perspectives,” *International Journal of Biological Sciences*, vol. 5, no. 6, pp. 578–595, 2009.
- [34] Q. K. Beg, M. Kapoor, L. Mahajan, and G. S. Hoondal, “Microbial xylanases and their industrial applications: a review,” *Appl. Microbiol. Biotechnology*, vol. 56, p. 326338, 2001.
- [35] T. KIRK and D. Cullen, *Enzymology and Molecular Genetics of Wood Degradation by White-Rot Fungi*. 1998.
- [36] R. Quiroz-Castañeda, C. artínez Anaya, L. Cuervo-Soto, L. Segovia, and J. Folch-Mallol, “Loosenin, a novel protein with cellulosedisrupting activity from *bjerkandera adusta*,” *Microbial Cell Factories*, vol. 10, no. 8, pp. 1–11, 2011.
- [37] T. K. Ghose, “Measurement of cellulase activities,” *Pure and Applied Chemistry*, vol. 59, no. 2, pp. 257–268, 1987.
- [38] D. Shlosser, R. Grey, and W. Fritsche, “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.*, vol. 47, pp. 412–418, 1997.
- [39] P. Collins, K. M., J. Field, and A. Dobson, “Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *trametes versicolor*,” *Appl. and Environ. Microbiology*, vol. 62, no. 12, pp. 4563–4567, 1996.
- [40] J. Osma, U. Moilanen, J. Toca-Herrera, and S. Rodriguez-Couto, “Morphology and laccase production of white-rot fungi grown on wheat flakes under semi-solid-state fermentation conditions,” *FEMS Microbiol. lett.*, vol. 318, pp. 27–34, 2011.
- [41] M. Smith and M. Gold, “*Phanerochaete chrysosporium* fl-glucosidases: Induction, cellular localization, and physical characterization,” *Appl. and Environ. Microbiology*, vol. 37, no. 5, pp. 938–942, 1979.
- [42] M. Tien, T. K. Kirk, P. Kersten, B. Kalyanaraman, K. Hammel, and R. Farrell, *Methods in enzymology*, vol. 188. Academic Press Inc., 1990.
- [43] A. Ferraz, A. Cordova, and A. Machuca, “Wood biodegradation and enzyme production by *ceriporiopsis subvermisporea* during solid-state fermentation of *eucalyptus grandis*,” *Enzyme and microbial technol.*, vol. 32, pp. 59–65, 2003.
- [44] A. Farrell, R. Plevin, B. Turner, A. Jones, M. O’Hare, and D. Kammen, “Ethanol can contribute to energy and environmental goals,” *Science*, vol. 311, pp. 506–508, 2006.
- [45] G. Manegement, “Biofuels: Promises and challenges.” Página web de National Academy of Sciences. URL: http://dels-old.nas.edu/plant_genome/booklet_part_3.shtml [Visita: 20 enero, 2013].
- [46] M. W. Davidson, “Plant cell wall.” Página web Molecular expressions. Florida State University. URL: <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/plants/cellwall.html> [Visita: 22 enero, 2013].
- [47] D. Cahela, Y. Lee, and R. Chambers, “Modeling of percolation process in hemicellulose hydrolysis,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 25, pp. 3–17, 1997.
- [48] T. L. Highley, “Influence of carbon source on cellulase activity of white-rot and brown-rot fungi,” *Wood and Fiber Science*, vol. 5, no. 1, pp. 50–58, 1973.
- [49] F. Archibald, “A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure b,” *Appl. and Environ. Microbiology*, vol. 58, no. 9, pp. 3110–3116, 1992.
- [50] Thermo-scientific, “Prestained protein molecular weight marker.” URL: <http://www.thermoscientificbio.com/protein-electrophoresis/prestained-protein-molecular-weight-marker/> [Visita: 2 marzo, 2013].

Apéndice A

Anexo del marco teórico

A.1. Estructura de la pared celular vegetal

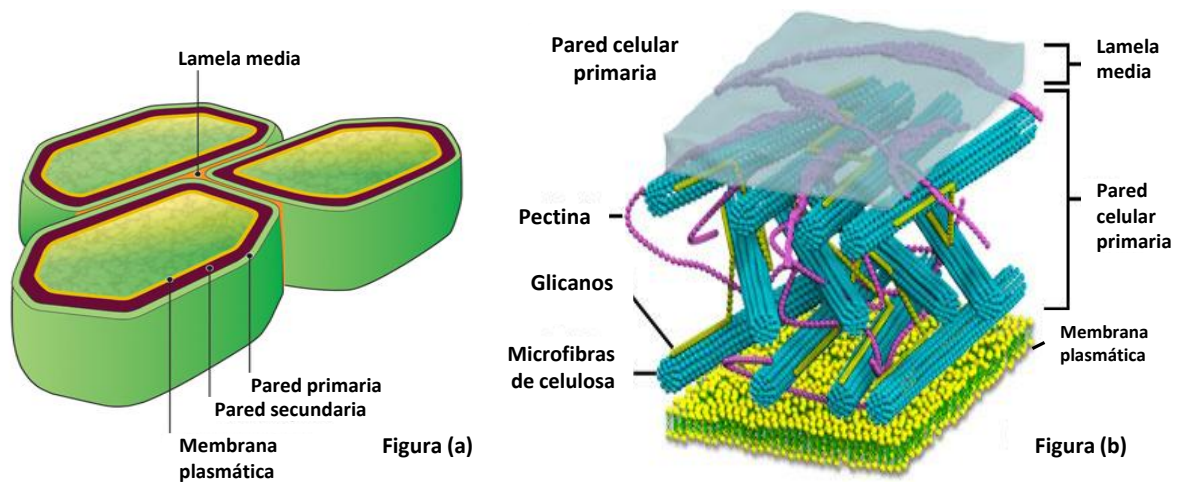


Figura A.1: (a) Esquema de células vegetales, indicando la pared primaria y secundaria [45]. (b) Esquema de la estructura de la pared celular primaria y sus principales componentes [46].

A.2. Esquema de Hidrólisis

La siguiente figura del artículo de Arantes *et al.* (2010) [28], muestra el mecanismo propuesto de amorfogénesis de la celulosa (proceso sin agentes hidrolizantes), y las posteriores etapas que ocurren en la hidrólisis.

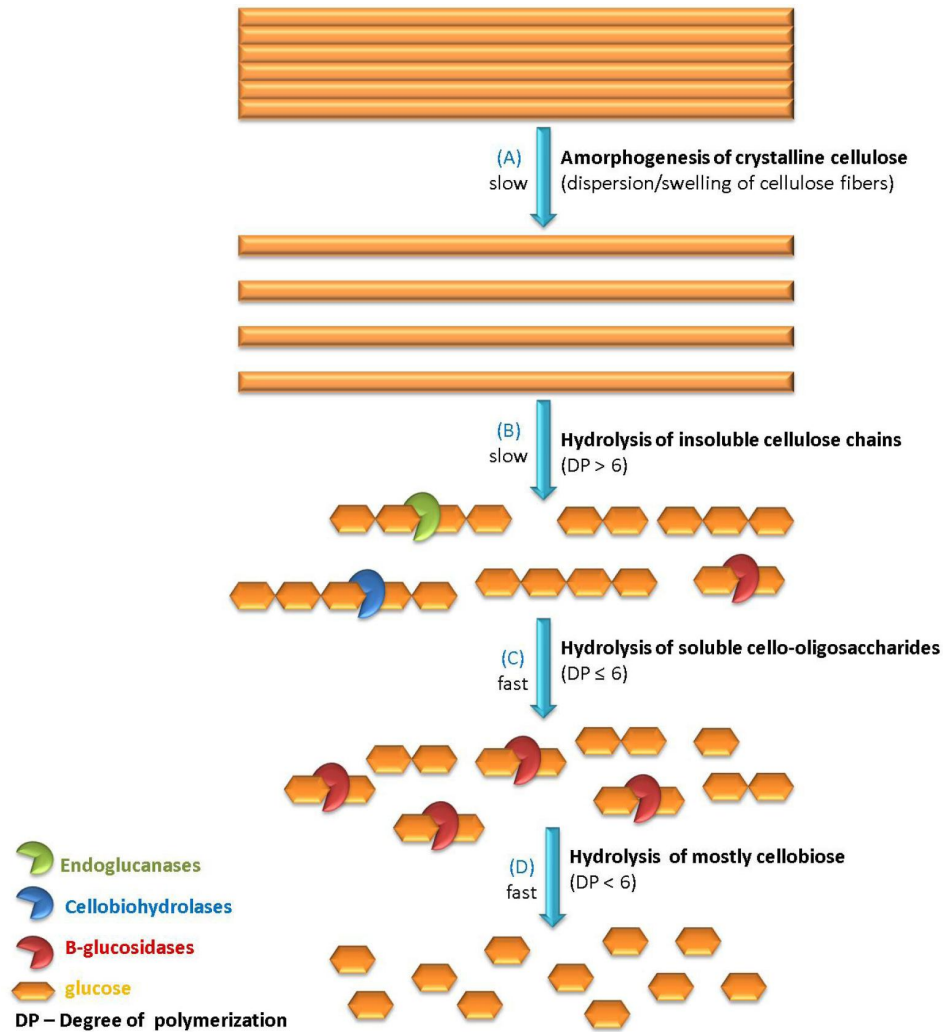


Figura A.2: Esquema general de la amorfogénesis e hidrólisis de lignocelulosa [28]. (A) Amorfogénesis de celulosa cristalina (dispersión de las fibras de celulosa), (B) Hidrólisis de cadenas de celulosa insoluble, (C) Hidrólisis de cello-oligosacáridos solubles, (D) Hidrólisis de celobios. Las reacciones A y B ocurren lento, C y D rápido. DP: grado de polimerización.

resultando p-quinonas.

Quinonas de la reacción (g) y/o (k) contribuyen a la activación de oxígeno en reacciones cíclicas redox que involucran quinona-reductasas (QR), lacasas y peroxidasas (l, m). Esto resulta en la reducción hierro-férrico presente en la madera (n), ya sea por el catión radical superóxido o directamente por los radicales semiquinona, y su reoxidación con la consecuente reducción de H_2O_2 al radical hidroxilo libre ($OH\cdot$) (o). Este último es un oxidante muy fuerte que puede iniciar el ataque a la lignina (p) en las etapas iniciales de la degradación de madera, cuando los poros en la pared celular intacta tiene un tamaño pequeño que previenen la penetración de enzimas ligninolíticas.

Apéndice B

Anexo de Metodología

B.1. Composición medios de cultivo

A continuación se detallan las composiciones de los distintos medios de cultivo utilizados para el crecimiento e inducción de celulasas de *Trametes versicolor*, los cuales fueron probados en la fase inicial experimental en la definición de las condiciones de cultivo del hongo.

B.1.1. Medio 1

Este medio fue extraído del artículo de Schlosser *et al.* (1997)[38], al cual se adicionó 1 % p/v de biomasa lignocelulósica, además de 10 ml de Solución Mineral y 1,5 ml de Solución Vitamínica. Tanto la solución mineral como la vitamínica fueron esterilizadas por filtración con poro de $0,5\mu m$, al igual que la solución de KH_2PO_4 . El pH del medio base es ajustado a 4,5 previamente a ser esterilizado en autoclave.

Medio Base

Tabla B.1: Composición medio base (1) para cultivo de *T.versicolor*.

Compuesto	Concentración [g/L]
KH_2PO_4	2
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,41
Ácido 2,2-dimetilsuccínico	4,4
Tartrato de diamonio	0,11

Solución Mineral

Tabla B.2: Composición solución mineral para medio 1.

Compuesto	Concentración [mg/L]
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3000
Nitriloacetato	1500
$NaCl$	1000
$MnSO_4 \cdot H_2O$	500
$CoSO_4 \cdot 7H_2O$	181,2
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	178
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	100
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	100
$AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	18,4
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	12
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	10
H_3BO_3	10

Solución Vitamínica

Tabla B.3: Composición solución vitamínica para medio 1.

Compuesto	Concentración [mg/L]
Clorhidrato de piridoxina	10
Ácido 4-aminobenzoico	5
DL- pantotenato de calcio	5
Ácido lipónico	5
Ácido nicótico	5
Rivoflavina	5
Clorhidrato de tiamina	5
Biotina	2
Ácido fólico	2
Cianocobalamina	0,1

B.1.2. Medio 2

Este medio fue adaptado del artículo de Collins *et al.*(1996)[39], al cual se adicionó 1 % p/v de biomasa lignocelulósica. La solución de trazas fue esterilizada filtración con poro de $0,5\mu m$, al igual que la solución KH_2PO_4 . El pH del medio base es ajustado a 5 con buffer ácido 2,2- dimetilsuccínico (20 mM) previo a ser esterilizado en autoclave.

Medio Base

Tabla B.4: Composición medio base (2) para cultivo de *T.versicolor*.

Compuesto	Concentración [g/L]
Glucosa	10
Tartrato de diamonio	4
KH_2PO_4	1
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	0,26
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,01

Solución Trazas

Tabla B.5: Composición solución trazas para medio 2.

Compuesto	Concentración [mg/L]
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	6,6
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5
Clorhidrato de tiamina	0,1

B.1.3. Medio 3

El siguiente medio de Osma *et al.*(2011)[40], se preparó sin modificaciones y sólo se adicionó 1 % de biomasa lignocelulósica. El medio fue esterilizado en autoclave, excepto la vitamina Tiamina y la solución de KH_2PO_4 que se esterilizaron por filtración con poro de $0,5\mu m$.

Tabla B.6: Composición medio (3) para cultivo de *T. versicolor*.

Compuesto	Concentración [g/L]
Glucosa	10
Extracto de levadura	15
KH_2PO_4	2
$(NH_4)_2SO_4$	0,9
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5
KCl	0,5
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,1
Clorhidrato de Tiamina	0,5

B.1.4. Medio A

Este medio fue adaptado del artículo de Suwannarangsee (2012)[1] adicionando 1% de biomasa lignocelulósica. Cada compuesto fue preparado por separado y autoclavado previamente a preparar la mezcla, excepto la solución de KH_2PO_4 y solución de trazas que se esterilizaron por filtración con poro de $0,5 \mu m$.

Medio Base

Tabla B.7: Composición medio (A) para cultivo de *T. versicolor*.

Compuesto	Concentración [g/L]
Úrea	0,3
$(NH_4)_2SO_4$	1,4
KH_2PO_4	2
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,4
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,3
Triptona	0,75
Extracto de levadura	0,25

Solución Trazas

Tabla B.8: Composición de solución trazas de medio A.

Compuesto	Concentración [mg/L]
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	2
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1,4
$MnSO_4 \cdot H_2O$	1,2

B.1.5. Medio B

Medio extraído del artículo de Highley (1973)[48] adicionando 1% de biomasa lignocelulósica. Cada compuesto fue preparado por separado y autoclavado previamente a preparar la mezcla, excepto la solución de KH_2PO_4 y solución de trazas que se esterilizaron por filtración con poro de $0,5 \mu m$.

Medio Base

Tabla B.9: Composición medio (B) para cultivo de *T. versicolor*.

Compuesto	Concentración [g/L]
NH_4NO_3	2
KH_2PO_4	2
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,1

Solución Trazas

Tabla B.10: Composición de solución trazas de medio B.

Compuesto	Concentración [mg/L]
H_3BO_4	0,57
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,31
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,036
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,039
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,015
Clorhidrato de Tiamina	1

B.1.6. Medio L1

El medio fue adaptado del trabajo de Kirk *et al.* (1990)[42]. El medio base además contiene 1 % de glucosa, 1 % de biomasa lignocelulósica y 10 mM 2,2-dimetil succinato (pH 4,2). Se agregaron 10 ml de solución trazas. Cada compuesto fue preparado por separado y autoclavado previamente a preparar la mezcla, excepto la solución de KH_2PO_4 y solución de trazas que se esterilizaron por filtración con poro de $0,5 \mu m$.

Medio Base

Tabla B.11: Composición medio (L1) para cultivo de *T. versicolor*.

Compuesto	Concentración [g/L]
KH_2PO_4	2
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,1
Tartrato de diamonio	0,2

Solución Trazas (Stock 100x)

Se preparó 1,5 g de ácido nitrilotriacético en 800 ml de agua destilada. Luego se ajusta el pH a 6,5 con KOH. Luego se agregan los compuestos de la tabla B.12, y se completa con 200 ml de agua.

Tabla B.12: Composición de solución trazas de medio L1.

Compuesto	Cantidad para 1 L
$NaCl$	1 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 g
$CoSO_4$	0,1 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 g
$AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	10 mg
H_3BO_4	10 mg
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	10 mg
Clorhidrato de Tiamina	1 mg

B.2. Protocolos

B.2.1. Electroforesis SDS Page

Se utilizó gel de Acrilamida 12,5 % mediante la siguiente preparación (para 1 gel):

Tabla B.13: Composición de gel de Acrilamida 12,5 % para electroforesis.

Compuesto	Gel Resolución	Gel Concentrador
Acrilamida-Bisacrilamida (29:1)	1,58 ml	0,167 ml
Agua destilada	1,27 ml	0,575 ml
TEMED	2 μL	1,25 μL
PSA 10 %	20 μL	7,5 μL
Buffer + 0,4 %SDS	1,5M Tris HCl (pH 8,8)	0,5M Tris HCl (pH 6,8)

B.2.2. Tinción con plata

Primero es necesario lavar el gel toda la noche con agua, si es que estuviera teñido con azul Coomasie.

Incubar el gel 30 minutos con DTT (0,005 mg/ml) con agitación suave a temperatura ambiente. Luego, quitar el reactivo sin enjuagar, y añadir solución de $AgNO_3$ (1 mg/ml) en oscuridad. Cubrir con papel metálico el recipiente con el gel para que no reciba luz y mantener con la solución 30 minutos, siempre en movimiento.

Para el revelado, se debe cambiar el gel a un pocillo limpio y agregar en una solución fresca de Na_2CO_3 (36 mg/ml) con 0,06 % de formaldehído (37 %).

Verificar la aparición de bandas luego de 2 a 10 minutos y detener la reacción agregando ácido cítrico en cuanto el gel esté con la tinción deseada. Se agregan 3 g de ácido cítrico para 125 ml de solución.

Finalmente lavar el gel en agua 2 veces.

Apéndice C

Anexo de Resultados

C.1. Figuras del cultivo de *T.versicolor*

C.1.1. Experimento con distintos medios de cultivo

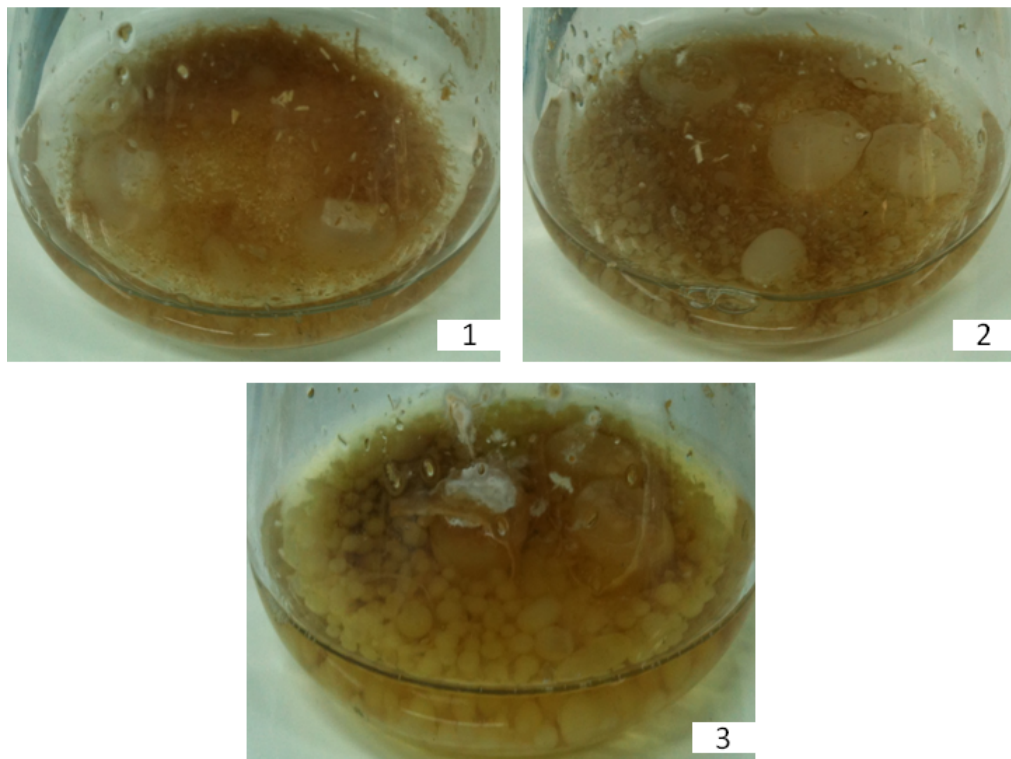


Figura C.1: Fotografías de *T. versicolor* crecido en distintos medios al décimo día de cultivo. Los medios de cultivo se indican como 1, 2, 3.

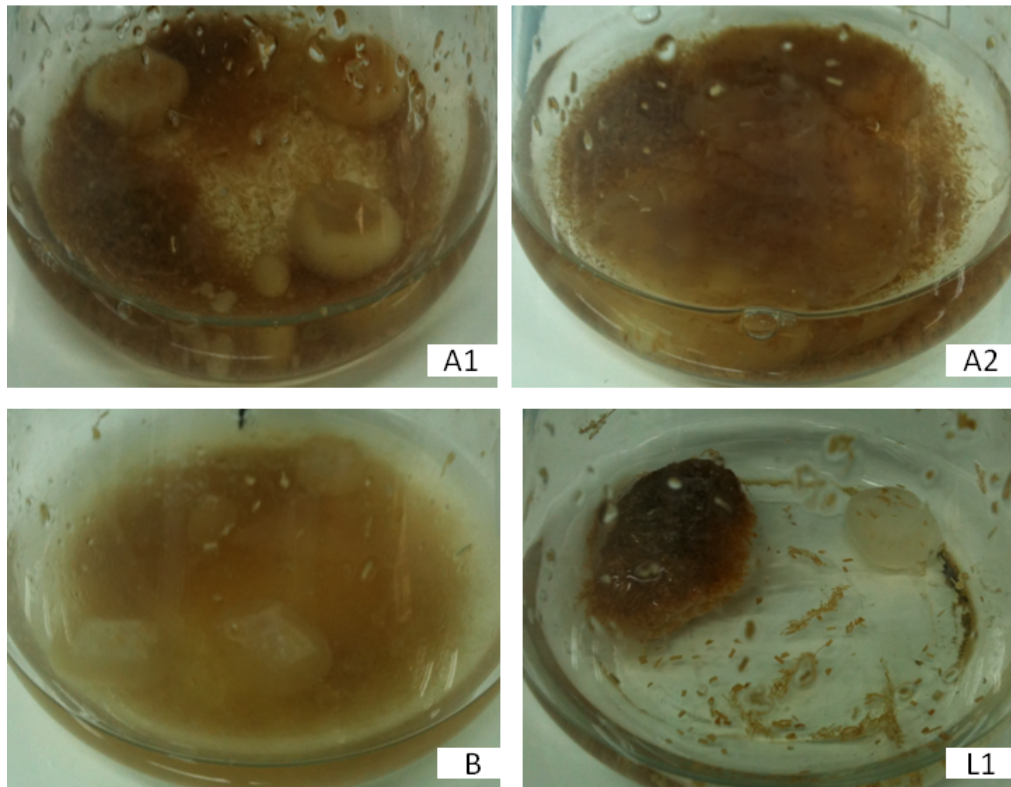


Figura C.2: Fotografías de *T. versicolor* crecido en distintos medios al décimo día de cultivo. Los medios de cultivo se indican como A1, A2, B y L1. Las figuras A1 y A2 tienen el mismo medio A, la primera está inoculada con hongo en agar PDA, y la segunda con inóculo líquido.

C.1.2. Cultivo definitivo

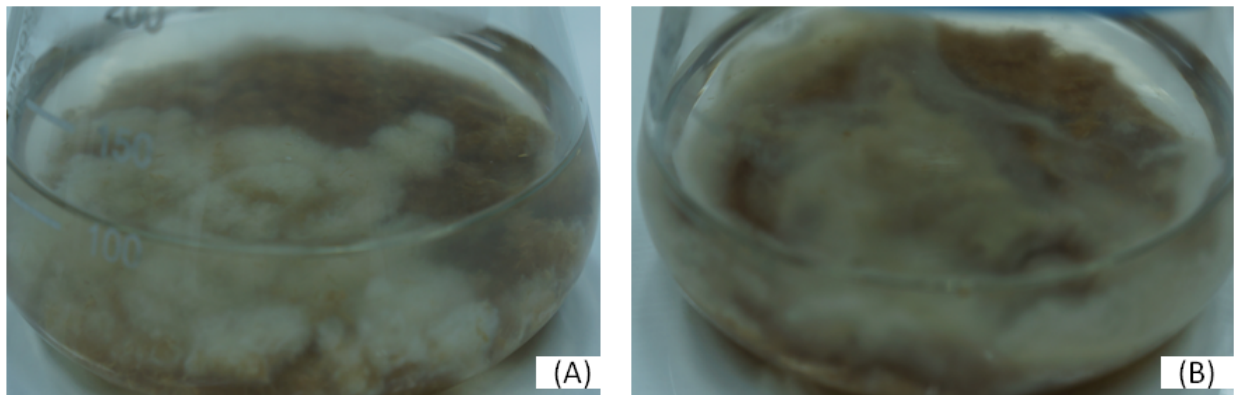


Figura C.3: Fotografías del cultivo definitivo de *T. versicolor* crecido en medio A, en el décimo día de incubación. (A) Matraz N°1 (que tuvo la menor actividad enzimática), y (B) Matraz N°4 (con la mayor actividad al día 11).

C.2. Tablas de resultados

C.2.1. Actividad en distintos medios de cultivo

Las tablas C.1 y C.2 se muestran los resultados de actividad endoglucanasa medida por el ensayo de azúcares reductores (DNS) con el sustrato CMC, en los distintos medios de cultivo probados en *T. versicolor*.

Tabla C.1: Tabla de resultados de actividad enzimática con CMC en distintos medios de cultivo con 1% p/v de paja de trigo, e inoculados con *T. versicolor* en agar PDA.

Día de cultivo	Actividad [$\mu\text{mol/ml}$]	Actividad [IU/ml]	% Error de medición	Actividad [$\mu\text{mol/ml}$]	Actividad [IU/ml]	% Error de medición
	Medio 1			Medio 2		
0	0,153	0,005	7,5	0,199	0,007	1
1	0,205	0,007	12,5	0,124	0,004	1
3	0,901	0,030	23,9	0,000	0,000	8
4	2,330	0,078	10,2	0,000	0,000	5,3
5	1,404	0,047	12,2	0,000	0,000	14,4
6	1,667	0,056	2,9	0,216	0,007	15,1
7	3,099	0,103	20,4	0,231	0,008	3,4
10	2,725	0,091	13,8	4,037	0,135	2,9
	Medio 3			Medio A1		
0	0,000	0,000	1,2	0,122	0,004	7,1
1	0,000	0,000	2,6	0,231	0,008	7,1
3	0,041	0,001	0,7	0,089	0,003	8,9
4	0,163	0,005	0,3	0,499	0,017	3,5
5	0,022	0,001	19,8	0,580	0,019	2,2
6	0,000	0,000	7,1	0,844	0,028	9,2
7	0,294	0,010	19,7	1,836	0,061	14,3
10	6,767	0,226	2,1	6,338	0,211	7,5
	Medio B			Medio L1		
0	0,048	0,002	5	0,1580	0,0053	0,4
1	0,119	0,004	14	0,1110	0,0037	0,4
3	0,195	0,007	8,5	0,0200	0,0007	6,8
4	0,175	0,006	9,1	0,0310	0,0010	3,1
5	0,145	0,005	8,6	0,2410	0,0080	0,7
6	0,128	0,004	12,4	0,0000	0,0000	4,1
7	0,205	0,007	6,1	0,0000	0,0000	1,3
10	1,653	0,055	28,8	0,0000	0,0000	0,7

Tabla C.2: Tabla de resultados de actividad enzimática con CMC en medio de cultivo A (A2) con 1% p/v de paja de trigo, e inoculado con *T. versicolor* en medio líquido (pre inóculo).

Día de cultivo	Medio A2		
	Actividad [$\mu\text{mol/ml}$]	Actividad [IU/ml]	% Error de medición
0	0,186	0,0062	11,4
1	0,253	0,0084	2,4
3	1,241	0,0414	3,7
4	2,641	0,088	16
5	4,812	0,1604	18,8
6	6,517	0,2172	7,5
7	6,937	0,2312	4,4
10	7,595	0,2532	2,5

C.2.2. Actividad en cultivo definitivo

Tabla C.3: Tabla de resultados de actividad enzimática con CMC del cultivo definitivo en medio A con 1% p/v de paja de trigo, e inoculados con *T. versicolor* en medio líquido.

Día de cultivo	Actividad [$\mu\text{mol/ml}$]	Actividad [IU/ml]	% Error de medición	Actividad [$\mu\text{mol/ml}$]	Actividad [IU/ml]	% Error de medición
	Matraz 1			Matraz 2		
3	1,896	0,063	3,3	3,077	0,103	22,8
4	1,249	0,042	4,1	1,674	0,056	3,6
5	1,917	0,064	7,2	3,149	0,105	21,1
6	1,982	0,066	4	4,93	0,164	0,2
7	2,866	0,096	4,4	8,141	0,271	1
8	3,776	0,126	0,3	11,587	0,386	0,7
10	4,991	0,166	0,6	17,656	0,589	1,2
11	7,109	0,237	1,7	11,965	0,399	1
	Matraz 3			Matraz 4		
3	2,079	0,069	0,6	4,131	0,138	5,4
4	0,997	0,033	5,5	3,244	0,108	13,1
5	1,865	0,062	1,6	5,083	0,169	5,2
6	2,151	0,072	0,7	7,7	0,257	1,3
7	4,098	0,137	1,6	12,047	0,402	0,2
8	6,926	0,231	1,5	12,972	0,432	0,8
10	8,929	0,298	0,8	10,66	0,355	1,4
11	9,543	0,318	1,4	27,681	0,923	1,3
	Matraz 5			Matraz 6		
3	2,244	0,075	0,7	3,372	0,112	2
4	0,977	0,033	2,1	2,051	0,068	5,9
5	2,498	0,083	9,4	4,01	0,134	2,9
6	4,084	0,136	2,7	6,193	0,206	1,8
7	5,846	0,195	4,3	7,903	0,263	0,6
8	9,135	0,305	1,8	8,283	0,276	3,7
10	10,283	0,343	4	14,345	0,478	4,2
11	18,194	0,606	1,5	18,563	0,619	0,2

C.2.3. Bradford de fracciones cromatográficas

La tabla siguiente muestra las concentraciones proteicas en [mg/ml] de las fracciones cromatográficas (N°16 a 52) y el extracto proteico (EP), medidas por el método de Bradford. Solo algunas fracciones arrojaron valores positivos al calcular ΔAbs (ver ecuación en Apéndice E.3), el resto fueron negativos, indicando una concentración de proteínas bajo el umbral medible por este método (equivalentes a 0[mg/ml]). Ver curva de calibración en Apéndice D.3.

Tabla C.4: Concentración de proteínas en fracciones de la cromatografía por filtración en gel (Columna Sephacryl S-100), medidas por el método de Bradford.

N° muestra	OD 465 nm	OD 595 nm	$\Delta(A595/A465)$	Conc. Proteínas [mg/ml]
EP	0,196	0,7585	3,366	0,932
16	0,505	0,211	-0,086	0,000
17	0,393	0,19	-0,020	0,000
18	0,424	0,201	-0,030	0,000
19	0,405	0,205	0,002	0,001
20	0,603	0,246	-0,096	0,000
21	0,465	0,216	-0,039	0,000
22	0,356	0,216	0,103	0,028
23	0,405	0,244	0,099	0,027
24	0,353	0,242	0,182	0,050
25	0,363	0,239	0,154	0,043
26	0,411	0,249	0,102	0,028
27	0,428	0,243	0,064	0,018
28	0,441	0,244	0,049	0,014
29	0,364	0,206	0,062	0,017
30	0,374	0,193	0,012	0,003
31	0,375	0,191	0,005	0,001
32	0,393	0,183	-0,038	0,000
33	0,569	0,205	-0,144	0,000
34	0,376	0,169	-0,054	0,000
35	0,364	0,175	-0,023	0,000
36	0,423	0,172	-0,097	0,000
38	0,386	0,171	-0,061	0,000
39	0,437	0,176	-0,101	0,000
40	0,379	0,164	-0,071	0,000
41	0,38	0,164	-0,072	0,000
42	0,471	0,181	-0,120	0,000
43	0,43	0,178	-0,090	0,000
44	0,384	0,164	-0,077	0,000
45	0,375	0,168	-0,056	0,000
46	0,429	0,168	-0,112	0,000
47	0,416	0,161	-0,117	0,000
48	0,437	0,172	-0,110	0,000
49	0,378	0,156	-0,091	0,000
50	0,418	0,166	-0,107	0,000
51	0,543	0,185	-0,163	0,000
52	0,534	0,188	-0,152	0,000

C.2.4. Ensayos de actividad enzimáticos

Los ensayos de actividad de celulasas y xilanasas, se midieron mediante la detección de azúcares reductores con DNS, en las respectivas reacciones con los sustratos enzimáticos (CMC, Avicel y Xilano). Las Tablas C.5, C.6 y C.7, muestran los resultados de absorbancias promedio medido a 550 nm de las muestras en duplicado, la desviación estándar del promedio, las medidas de actividad en $[\mu\text{mol}/\text{ml}]$ y $[\text{IU}/\text{ml}]$, y el correspondiente error de actividad (en $[\text{IU}/\text{ml}]$) de acuerdo al error porcentual de la medición. Las curvas de calibración de DNS se muestran en el Apéndice D.2, y en la memoria de cálculo (Apéndice E) se muestran las ecuaciones utilizadas para la conversión de unidades.

Los ensayos de actividad de ligninasas (MnP y Lac), se realizaron mediante la oxidación de DMP, obteniendo una cinética de absorbancia (medida a 468 nm) en un tiempo de reacción de 20 minutos. De la curva cinética se trazó una línea de tendencia, cuya pendiente ($\Delta\text{Abs}/\Delta t$) se muestra en los resultados. Además, en las Tablas C.8 y C.9 se muestran los coeficientes de correlación lineal (R^2), la actividad (en $[\text{U}/\text{ml}]$), y el error proporcional de la actividad con respecto al error porcentual de la correlación. En la memoria de cálculo (Apéndice E) se muestran las ecuaciones utilizadas para la conversión de unidades.

Las mediciones de actividad específicas se realizaron a las fracciones cromatográficas (N° 15 a 52) y al extracto proteico (EP) del hongo *T. versicolor*. Todos los ensayos se realizaron en duplicado, y solo en el de Lacasas no se midió actividad del extracto proteico.

Endoglucanasas con CMC

Tabla C.5: Tabla de resultados de ensayo de actividad endoglucanasa con CMC, en fracciones cromatográficas y extracto proteico (EP) del hongo *T. versicolor*.

N° Muestra	OD 550 nm) (promedio)	Desviación estándar	% Error de medición	Actividad [μ mol/ml]	Actividad [IU/ml]	Error ajustado
EP	93,625	0,039	0,0	292,311	9,74	0,004
15	0,138	0,001	0,5	0,000	0,00	0,000
16	0,174	0,037	21,6	0,092	0,00	0,001
17	0,149	0,017	11,4	0,016	0,00	0,000
18	0,162	0,023	14,4	0,055	0,00	0,000
19	0,198	0,042	21,4	0,169	0,01	0,001
20	0,795	0,001	0,2	2,036	0,07	0,000
21	1,140	0,045	4,0	3,114	0,10	0,004
22	2,603	0,111	4,3	7,688	0,26	0,011
23	6,388	0,248	3,9	19,523	0,65	0,025
24	7,393	0,073	1,0	22,666	0,76	0,007
25	9,063	0,175	1,9	27,888	0,93	0,018
26	8,863	0,063	0,7	27,262	0,91	0,006
27	7,323	0,050	0,7	22,447	0,75	0,005
28	9,295	0,106	1,1	28,615	0,95	0,011
29	7,173	0,107	1,5	21,978	0,73	0,011
30	7,508	0,118	1,6	23,025	0,77	0,012
31	4,955	0,089	1,8	15,044	0,50	0,009
32	1,706	0,146	8,6	4,883	0,16	0,014
33	1,599	0,148	9,2	4,548	0,15	0,014
34	1,542	0,202	13,1	4,371	0,146	0,019
35	1,342	0,034	2,5	3,746	0,125	0,003
36	1,018	0,151	14,8	2,731	0,091	0,013
37	0,715	0,076	10,7	1,785	0,060	0,006
38	0,642	0,008	1,2	1,556	0,052	0,001
39	0,325	0,057	17,7	0,564	0,019	0,003
40	0,250	0,040	16,2	0,330	0,011	0,002
41	0,188	0,032	17,0	0,136	0,005	0,001
42	0,237	0,001	0,3	0,289	0,010	0,000
43	0,199	0,033	16,7	0,170	0,006	0,001
44	0,196	0,091	46,2	0,163	0,005	0,003
45	0,172	0,003	1,6	0,088	0,003	0,000
46	0,206	0,048	23,3	0,194	0,006	0,002
47	0,173	0,035	20,4	0,091	0,003	0,001
48	0,197	0,017	8,6	0,166	0,006	0,000
49	0,193	0,033	17,3	0,152	0,005	0,001
50	0,172	0,011	6,6	0,088	0,003	0,000
51	0,221	0,083	37,5	0,239	0,008	0,003
52	0,180	0,039	21,7	0,111	0,004	0,001

Exoglucanasas con Avicel

Tabla C.6: Tabla de resultados de ensayo de actividad exoglucanasa con Avicel, en fracciones cromatográficas y extracto proteico (EP) del hongo *T. versicolor*.

N° Muestra	OD 550 nm) (promedio)	Desviación estándar	% Error de medición	Actividad [$\mu\text{mol/ml}$]	Actividad [IU/ml]	Error ajustado
EP	7,8	0,001	0	24,043	$2,2 \cdot 10^{-2}$	$4,0 \cdot 10^{-6}$
15	0,083	0,006	6,8	-0,088	0	0
16	0,136	0	0	0,078	$7,2 \cdot 10^{-5}$	0
17	0,22	0,027	12,2	0,341	$3,2 \cdot 10^{-4}$	$3,9 \cdot 10^{-6}$
18	0,205	0,02	9,7	0,294	$2,7 \cdot 10^{-4}$	$2,6 \cdot 10^{-5}$
19	0,158	0,019	12,1	0,145	$1,3 \cdot 10^{-4}$	$1,6 \cdot 10^{-5}$
20	0,145	0,037	25,4	0,106	$9,8 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$
21	0,171	0,035	20,3	0,186	$1,7 \cdot 10^{-4}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$
22	0,176	0,004	2,4	0,203	$1,9 \cdot 10^{-4}$	$4,5 \cdot 10^{-6}$
23	0,193	0,008	4,0	0,255	$2,4 \cdot 10^{-4}$	$9,5 \cdot 10^{-6}$
24	0,241	0,022	9,1	0,405	$3,7 \cdot 10^{-4}$	$3,4 \cdot 10^{-5}$
25	0,197	0,057	29,1	0,267	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$7,2 \cdot 10^{-5}$
26	0,152	0,016	10,7	0,127	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-5}$
27	0,161	0,016	10,1	0,155	$1,4 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$
28	0,196	0,049	25,3	0,266	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$6,2 \cdot 10^{-5}$
29	0,174	0,037	21,6	0,195	$1,8 \cdot 10^{-4}$	$3,9 \cdot 10^{-5}$
30	0,181	0,083	45,8	0,217	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$9,2 \cdot 10^{-5}$
31	0,156	0,034	21,8	0,141	$1,3 \cdot 10^{-4}$	$2,8 \cdot 10^{-5}$
32	0,121	0,016	13,5	0,03	$2,8 \cdot 10^{-5}$	$3,7 \cdot 10^{-6}$
33	0,118	0,028	24	0,022	$2,0 \cdot 10^{-5}$	$4,9 \cdot 10^{-6}$
34	0,124	0,026	21,2	0,039	$3,6 \cdot 10^{-5}$	$7,7 \cdot 10^{-6}$
35	0,123	0,046	37,5	0,036	$3,3 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-5}$
36	0,135	0,007	5,2	0,075	$6,9 \cdot 10^{-5}$	$3,6 \cdot 10^{-6}$
37	0,106	0,021	19,4	-0,017	0	0
38	0,123	0,055	44,8	0,038	$3,5 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^{-5}$
39	0,144	0	0	0,103	$9,6 \cdot 10^{-5}$	0
40	0,223	0,008	3,5	0,349	$3,2 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-5}$
41	0,19	0,049	25,7	0,245	$2,3 \cdot 10^{-4}$	$5,9 \cdot 10^{-5}$
42	0,2	0,016	7,8	0,278	$2,6 \cdot 10^{-4}$	$2,0 \cdot 10^{-5}$
43	0,163	0,031	19,1	0,163	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$2,9 \cdot 10^{-5}$
45	0,116	0,006	5,5	0,014	$1,3 \cdot 10^{-5}$	$7,2 \cdot 10^{-7}$
46	0,122	0,01	8,1	0,034	$3,2 \cdot 10^{-5}$	$2,6 \cdot 10^{-6}$
47	0,187	0,037	20,1	0,236	$2,2 \cdot 10^{-4}$	$4,4 \cdot 10^{-5}$
48	0,167	0,02	11,9	0,175	$1,6 \cdot 10^{-4}$	$1,9 \cdot 10^{-5}$
49	0,189	0,013	7,1	0,242	$2,2 \cdot 10^{-4}$	$1,6 \cdot 10^{-5}$
50	0,092	0,005	5,4	-0,061	0	0
51	0,12	0,005	4,1	0,027	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$1,0 \cdot 10^{-6}$
52	0,14	0,048	34,3	0,091	$8,4 \cdot 10^{-5}$	$2,9 \cdot 10^{-5}$

Xilanasas con Xilano

Tabla C.7: Tabla de resultados de ensayo de actividad xilanasas con Xilano, en fracciones cromatográficas y extracto proteico (EP) del hongo *T. versicolor*.

N° Muestra	OD 550 nm) (promedio)	Desviación estándar	% Error de medición	Actividad [μ mol/ml]	Actividad [IU/ml]	Error ajustado
EP	27,825	0,009	0	86,606	2,887	0,001
15	0,101	0,001	0,7	-0,088	0	0
16	0,116	0,01	8,5	-0,039	0	0
17	0,116	0,021	17,8	-0,041	0	0
18	0,134	0,008	6,3	0,017	0,001	0
19	0,165	0,021	12,5	0,113	0,004	0
20	0,5	0,003	0,6	1,162	0,039	0
21	0,485	0,013	2,6	1,115	0,037	0,001
22	0,798	0,05	6,3	2,092	0,07	0,004
23	1,653	0,115	7	4,765	0,159	0,011
24	1,86	0,001	0,1	5,414	0,18	0
25	3,57	0,082	2,3	10,761	0,359	0,008
26	3,638	0,006	0,2	10,972	0,366	0,001
27	3,855	0,016	0,4	11,653	0,388	0,002
28	4,443	0,032	0,7	13,49	0,45	0,003
29	3,538	0,103	2,9	10,66	0,355	0,01
30	2,36	0,038	1,6	6,978	0,233	0,004
31	1,34	0,011	0,8	3,788	0,126	0,001
32	1,254	0,115	9,1	3,519	0,117	0,011
33	0,817	0,078	9,6	2,151	0,072	0,007
34	0,68	0,2	29,4	1,723	0,057	0,017
35	0,485	0,155	32	1,113	0,037	0,012
36	0,345	0,078	22,5	0,677	0,023	0,005
37	0,238	0,004	1,8	0,342	0,011	0
38	0,177	0,003	1,6	0,152	0,005	0
39	0,18	0,037	20,4	0,161	0,005	0,001
40	0,177	0,061	34,4	0,152	0,005	0,002
41	0,139	0,018	12,8	0,031	0,001	0
42	0,143	0,022	15,4	0,044	0,001	0
43	0,145	0,008	5,4	0,05	0,002	0
44	0,1	0,004	4,2	-0,089	0	0
45	0,123	0,002	1,7	-0,019	0	0
46	0,131	0,012	9,2	0,006	0	0
47	0,153	0,022	14,4	0,075	0,003	0
48	0,164	0,023	14,3	0,109	0,004	0,001
49	0,174	0,02	11,4	0,142	0,005	0,001
50	0,129	0,033	25,2	0,002	0	0
51	0,124	0,033	26,2	-0,014	0	0
52	0,115	0,025	22,1	-0,042	0	0

Lacasas con DMP

Tabla C.8: Tabla de resultados de ensayo de actividad lacasa con DMP, en fracciones cromatográficas del hongo *T. versicolor*.

Nº muestra	Pendiente ($\Delta\text{Abs}/\text{Deltat}$)	Correlación R^2	% Error de correlación	Actividad [U/ml]	Error ajustado
15	0,006	0,862	13,8	0,12	0,017
16	0,007	0,906	9,4	0,13	0,012
17	0,005	0,908	9,2	0,11	0,010
18	0,003	0,380	62,0	0,06	0,037
19	0,005	0,549	45,1	0,11	0,049
20	0,011	0,880	12,0	0,22	0,026
21	0,012	0,939	6,1	0,24	0,015
22	0,010	0,929	7,1	0,20	0,014
23	0,018	0,854	14,6	0,36	0,052
24	0,011	0,834	16,6	0,21	0,036
25	0,009	0,905	9,5	0,19	0,018
26	0,012	0,626	37,4	0,24	0,090
27	0,009	0,915	8,5	0,19	0,016
28	0,013	0,987	1,3	0,27	0,004
29	0,014	0,926	7,4	0,27	0,020
30	0,007	0,900	10,0	0,14	0,014
31	0,007	0,928	7,2	0,13	0,010
32	0,007	0,966	3,4	0,14	0,005
33	0,004	0,933	6,7	0,08	0,006
34	0,004	0,707	29,3	0,08	0,023
35	0,004	0,545	45,5	0,09	0,040
36	0,005	0,742	25,8	0,09	0,023
37	0,003	0,724	27,6	0,06	0,017
38	0,002	0,453	54,7	0,04	0,022
39	0,002	0,781	21,9	0,03	0,007
40	0,002	0,784	21,6	0,04	0,009
41	0,007	0,767	23,3	0,15	0,034
42	0,007	0,699	30,1	0,15	0,044
43	0,003	0,832	16,8	0,06	0,010
44	0,003	0,871	12,9	0,06	0,008
45	0,004	0,852	14,8	0,07	0,011
46	0,007	0,712	28,8	0,13	0,037
47	0,010	0,953	4,7	0,20	0,010
48	0,009	0,845	15,5	0,18	0,028
49	0,006	0,843	15,7	0,11	0,018
50	0,004	0,755	24,5	0,09	0,022

Manganeso Peroxidasas con DMP

Tabla C.9: Tabla de resultados de ensayo de actividad Manganeso peroxidasa con DMP, en fracciones cromatográficas y extracto proteico (EP) del hongo *T. versicolor*.

Nº muestra	Pendiente ($\Delta\text{Abs}/\text{Deltat}$)	Correlación R^2	% Error de correlación	Actividad [U/ml]	Error ajustado
EP	0,966	0,996	0,4	19,31	0,077
14	0,003	0,942	5,8	0,07	0,004
15	0,003	0,853	14,7	0,06	0,008
16	0,004	0,933	6,7	0,08	0,005
17	0,004	0,920	8,0	0,07	0,006
18	0,004	0,676	32,4	0,08	0,026
19	0,010	0,981	1,9	0,20	0,004
20	0,022	0,995	0,5	0,45	0,002
21	0,033	0,993	0,7	0,67	0,005
22	0,042	0,993	0,7	0,85	0,006
23	0,050	0,990	1,0	0,99	0,010
24	0,050	0,990	1,0	0,99	0,010
25	0,056	0,993	0,7	1,11	0,008
26	0,039	0,993	0,7	0,79	0,006
27	0,030	0,992	0,8	0,60	0,005
28	0,013	0,973	2,7	0,27	0,007
29	0,019	0,996	0,4	0,38	0,002
30	0,011	0,967	3,3	0,21	0,007
31	0,016	0,995	0,5	0,31	0,002
32	0,006	0,973	2,7	0,12	0,003
33	0,007	0,973	2,7	0,14	0,004
34	0,005	0,931	6,9	0,09	0,006
35	0,005	0,905	9,5	0,11	0,010
36	0,004	0,931	6,9	0,07	0,005
37	0,005	0,958	4,2	0,10	0,004
38	0,005	0,948	5,2	0,10	0,005
39	0,005	0,876	12,4	0,09	0,011
40	0,003	0,697	30,3	0,05	0,016
41	0,004	0,924	7,6	0,08	0,006
42	0,003	0,883	11,7	0,07	0,008
43	0,004	0,857	14,3	0,08	0,011
44	0,004	0,980	2,0	0,08	0,002
45	0,002	0,596	40,4	0,04	0,016
46	0,005	0,831	16,9	0,09	0,016
47	0,004	0,886	11,4	0,08	0,009
48	0,005	0,895	10,5	0,09	0,010
49	0,004	0,722	27,8	0,09	0,024
50	0,004	0,963	3,7	0,08	0,003

C.2.5. Ensayo de hidrólisis de paja de trigo

En las Tablas C.10, C.11 y C.12 se presentan los resultados de concentración de azúcares reductores (AR), glucosa y xilosa, medidos en el ensayo de hidrólisis de paja de trigo. Además, se muestran los errores porcentuales de las mediciones de absorbancia respectivos.

En este ensayo se realizaron 3 tipos de reacciones:

R1: Corresponde a la reacción 1, donde la hidrólisis de paja de trigo contiene las enzimas de las fracciones cromatográficas provenientes del hongo *T. versicolor*.

R2: Es la reacción 2, donde la hidrólisis de paja de trigo contiene solo las enzimas de Celluclast.

R3: Es la reacción 3, donde la hidrólisis de paja de trigo contiene las enzimas de las fracciones cromatográficas y Celluclast.

Según esta notación (R1, R2, R3) se muestran los resultados de azúcares en las tablas siguientes. La medición R3 corresponde al promedio de mediciones realizadas para la hidrólisis con Celluclast y sin fracciones cromatográficas.

Medición de azúcares reductores

Tabla C.10: Tabla de resultados de azúcares reductores (medido por ensayo DNS) en hidrólisis de paja de trigo, realizado por fracciones cromatográficas y Celluclast.

N° Muestra	Hidrólisis R1		Hidrólisis R2		Hidrólisis R3	
	AR [mg/ml]	error % medición	AR [mg/ml]	error % medición	AR [mg/ml]	error % medición
15	0,065	2,1	0,504	4,7	0,382	23,8
16	0,064	1,7			0,464	8,7
17	0,074	4,5			0,419	4,1
18	0,072	4,1			0,417	3,1
19	0,072	7			0,414	9,4
20	0,111	5,5			0,458	14,7
21	0,081	0			0,446	4,8
22	0,08	27,7			0,493	8,2
23	0,102	26,1			0,57	2,4
24	0,103	31,9			0,521	2,9
25	0,125	39,1			0,552	5,4
26	0,133	16			0,521	0,1
27	0,091	14,3			0,428	22,3
28	0,141	20,9			0,531	3,1
29	0,167	37,8			0,516	10,3
30	0,143	13,9			0,545	1
31	0,104	8,8			0,521	0,6
32	0,079	4			0,522	4,8
33	0,066	8,1			0,409	7,4
34	0,09	9,1			0,443	7,9
35	0,085	28,2			0,461	4,1
36	0,162	27			0,478	6,8
37	0,095	39,7			0,451	15,2
38	0,098	31,3			0,481	12,2
39	0,067	19,9			0,414	3,3
40	0,07	5,8			0,418	3,1
41	0,094	21,1			0,467	8,7
42	0,091	17,3			0,414	1,3
43	0,088	28,5			0,443	4,4
44	0,067	9,3			0,483	5,5
45	0,074	8,6			0,448	5,9
46	0,107	5,9			0,517	0,1
47	0,16	4,5			0,491	16,7
48	0,124	6,8			0,522	15
49	0,099	34,7			0,514	8,1
50	0,076	14,5			0,505	5,1

Medición de glucosa

Tabla C.11: Tabla de resultados de glucosa (medido por kit Gluc-Pap, Randox) en hidrólisis de paja de trigo, realizado por fracciones cromatográficas y Celluclast.

N° Muestra	Hidrólisis R1		Hidrólisis R2		Hidrólisis R3	
	AR [mg/ml]	error % medición	AR [mg/ml]	error % medición	AR [mg/ml]	error % medición
15	0,000	2,2	0,135	8,0	0,119	5,3
16	0,004	1,5			0,133	0,6
17	0,000	5,2			0,138	1,0
18	0,009	6,4			0,132	4,2
19	0,023	5,8			0,143	0,8
20	0,013	1,0			0,153	2,6
21	0,002	0,0			0,130	1,0
22	0,005	0,0			0,129	2,5
23	0,009	3,5			0,139	3,0
24	0,018	3,0			0,138	3,4
25	0,033	8,9			0,151	2,1
26	0,030	11,3			0,146	3,1
27	0,025	5,1			0,124	8,3
28	0,015	0,7			0,144	0,2
29	0,020	0,7			0,137	0,4
30	0,018	0,3			0,143	4,3
31	0,018	3,4			0,145	3,1
32	0,016	6,8			0,148	1,0
33	0,007	1,1			0,140	1,6
34	0,009	2,1			0,131	1,2
35	0,006	1,8			0,135	2,4
36	0,012	6,9			0,138	0,8
37	0,008	4,6			0,136	2,0
38	0,001	1,9			0,137	5,8
39	0,001	0,4			0,137	0,6
40	0,007	4,3			0,120	3,2
41	0,001	0,7			0,133	6,4
42	0,002	1,1			0,124	1,0
43	0,009	7,8			0,137	6,8
44	0,002	2,6			0,138	4,6
45	0,001	2,6			0,135	2,2
46	0,002	1,1			0,131	1,2
47	0,007	6,1			0,131	1,4
48	0,006	2,2			0,127	2,7
49	0,006	1,4			0,132	0,6
50	0,011	8,7			0,133	3,8

Medición de xilosa

Tabla C.12: Tabla de resultados de azúcares reductores (medido por kit D-xylose, Megazyme) en hidrólisis de paja de trigo, realizado por fracciones cromatográficas y Celluclast.

N° Muestra	Hidrólisis R1		Hidrólisis R2		Hidrólisis R3	
	AR [mg/ml]	error % medición	AR [mg/ml]	error % medición	AR [mg/ml]	error % medición
20	0,000	2,0	0,048	4,0	0,016	4,9
23	0,004	7,3			0,030	2,5
25	0,007	5,6			0,052	2,8
27	0,037	6,8			0,070	8,2
41	0,024	7,0			0,033	3,4
47	0,000	14,5			0,014	2,0

C.2.6. Rendimiento hidrolítico

Conversión de xilano y rendimiento enzimático

Tabla C.13: Tabla de resultados de la conversión de xilano a xilosa por algunas fracciones cromatográficas del hongo *T. versicolor* y por Celluclast, en la hidrólisis de paja de trigo.

Muestra	Xilosa [mg]	Conversión %	Etanol potencial [mg/ml]
23	0,004	0,43	0,0026
25	0,007	0,72	0,0043
27	0,037	3,74	0,0224
41	0,024	2,44	0,0147
Suma fracc.	0,073	7,33	0,0440
Celluclast	0,048	4,79	0,0287

Tabla C.14: Tabla de resultados del rendimiento enzimático de algunas fracciones cromatográficas, la suma de éstas y Celluclast en la producción de xilosa y etanol potencial a partir de xilosa (Considerando 100 % de conversión).

Muestra	Proteína total [mg]	Rendimiento [mg xilosa/mg prot.]	Rendimiento [mg etanol/mg prot.]
23	0,027	0,16	0,09
25	0,043	0,17	0,10
27	0,018	2,11	1,27
Suma fracc.	0,088	0,83	0,50
Celluclast	0,050	0,96	0,57

Conversión de celulosa y rendimiento enzimático

Tabla C.15: Tabla de resultados de la conversión de celulosa a glucosa por las fracciones cromatográficas del hongo *T. versicolor* y por Celluclast, en la hidrólisis de paja de trigo.

Muestra	Glucosa [mg]	Conversión %	Etanol potencial [mg/ml]
15	0,0003	0,02	0,0002
16	0,0036	0,21	0,0018
17	0,0000	0,00	0,0000
18	0,0086	0,49	0,0043
19	0,0234	1,34	0,0117
20	0,0131	0,75	0,0066
21	0,0020	0,11	0,0010
22	0,0053	0,30	0,0026
23	0,0086	0,49	0,0043
24	0,0180	1,03	0,0090
25	0,0329	1,88	0,0164
26	0,0300	1,71	0,0150
27	0,0251	1,43	0,0125
28	0,0152	0,87	0,0076
29	0,0201	1,15	0,0101
30	0,0180	1,03	0,0090
31	0,0176	1,01	0,0088
32	0,0160	0,91	0,0080
33	0,0065	0,37	0,0033
34	0,0086	0,49	0,0043
35	0,0057	0,32	0,0028
36	0,0119	0,68	0,0059
37	0,0082	0,47	0,0041
38	0,0007	0,04	0,0004
39	0,0007	0,04	0,0004
40	0,0069	0,40	0,0035
41	0,0012	0,07	0,0006
42	0,0024	0,14	0,0012
43	0,0086	0,49	0,0043
44	0,0024	0,14	0,0012
45	0,0007	0,04	0,0004
46	0,0024	0,14	0,0012
47	0,0065	0,37	0,0033
48	0,0061	0,35	0,0030
49	0,0061	0,35	0,0030
50	0,0106	0,61	0,0053
Suma fracc.	0,3540	20,23	0,1770
Celluclast	0,1348	7,70	0,0674

Tabla C.16: Tabla de resultados del rendimiento de las fracciones cromatográficas, la suma de éstas y Celluclast, en la producción de glucosa y etanol potencial a partir de glucosa (Considerando 100 % de conversión).

Muestra	Proteína total [mg]	Rendimiento [mg glucosa/mg prot.]	Rendimiento [mg etanol/mg prot.]
22	0,028	0,19	0,09
23	0,027	0,31	0,16
24	0,050	0,36	0,18
25	0,043	0,77	0,38
26	0,028	1,06	0,53
27	0,018	1,42	0,71
28	0,014	1,11	0,55
29	0,017	1,17	0,59
Suma fracc.	0,226	1,57	0,78
Celluclast	0,050	2,70	1,35

C.3. Gráficos adicionales de la hidrólisis de paja de trigo

C.3.1. Sinergismo enzimático

El gráfico mostrado a continuación comprueba que no existe sinergia en los experimentos de hidrólisis realizados. La suma real de las fracciones con celluclast (R3), es inferior a la suma teórica de R1 más R2, es decir, la actividades de los componentes por separado.

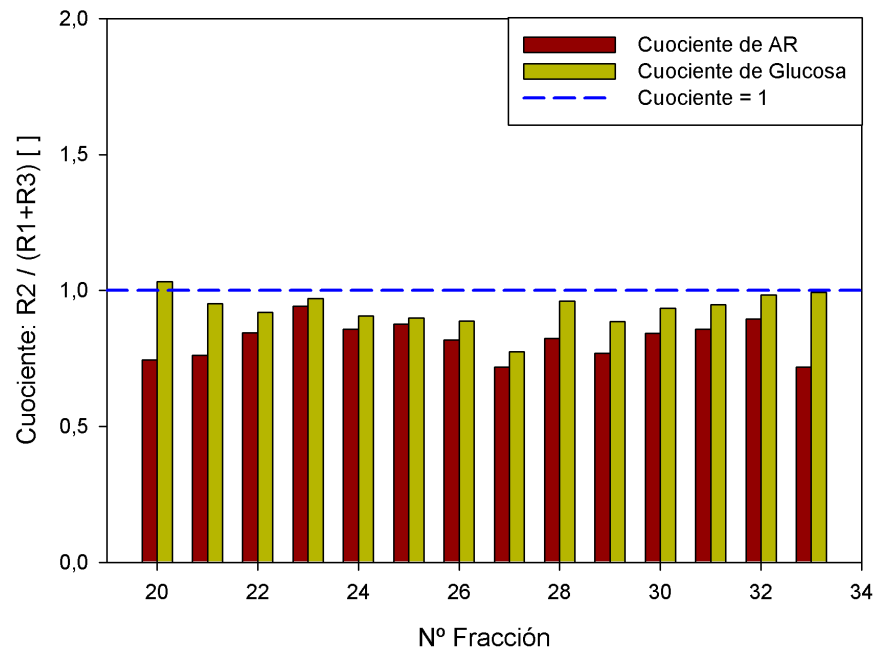


Figura C.4: Cuociente entre la reacción R3 (suma real de fracción cromatográfica más Celluclast) versus la suma teórica de las reacciones R1 (solo con fracciones) y R2 (solo con Celluclast).

C.3.2. Conversión de lignocelulosa a celulosa y xilosa

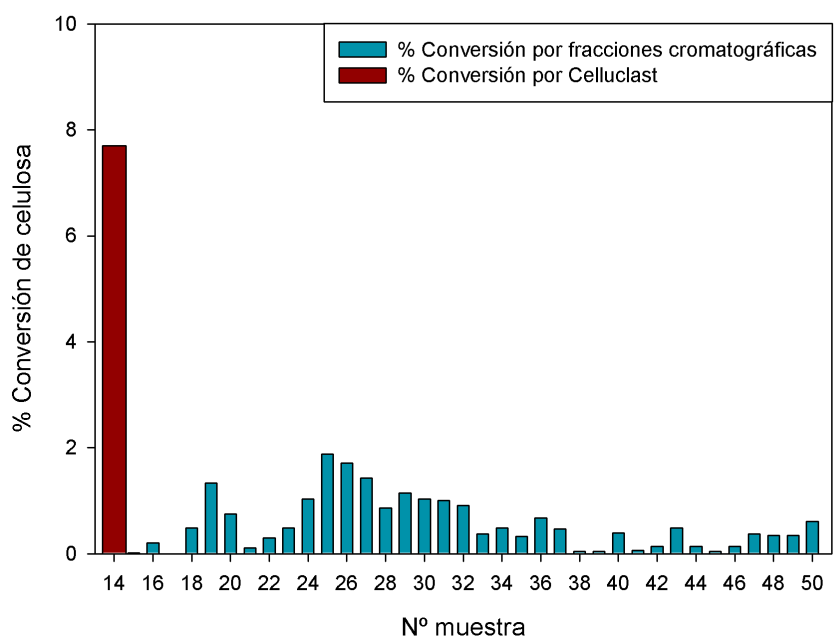


Figura C.5: Conversión de celulosa a glucosa en hidrólisis de paja de trigo por fracciones cromatográficas (muestras N°15 a 50) de *T. versicolor*, y por Celluclast (muestra N°14).

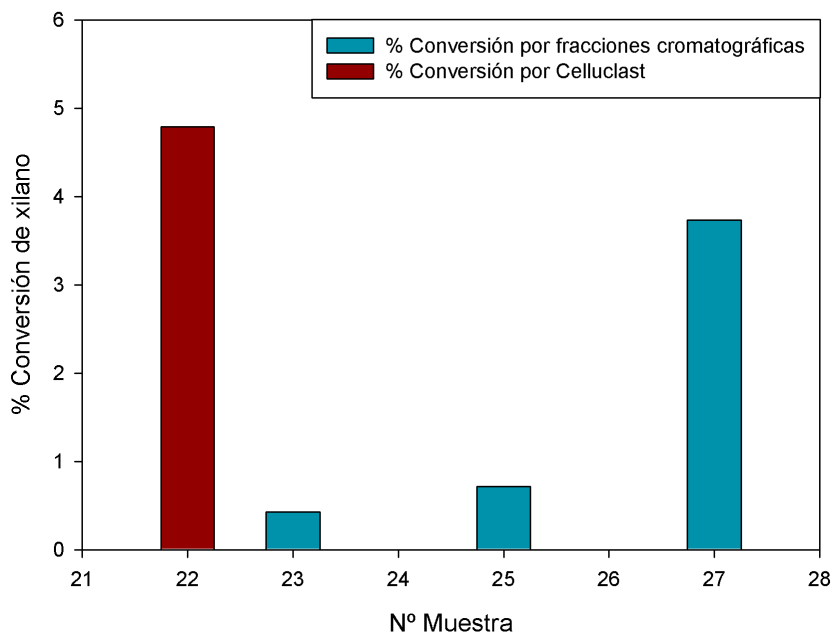


Figura C.6: Conversión de xilano a xilosa en hidrólisis de paja de trigo por fracciones cromatográficas (muestras N°23, 25 y 27) de *T. versicolor*, y por Celluclast (muestra N°22).

Apéndice D

Curvas de calibración

D.1. Cromatografía

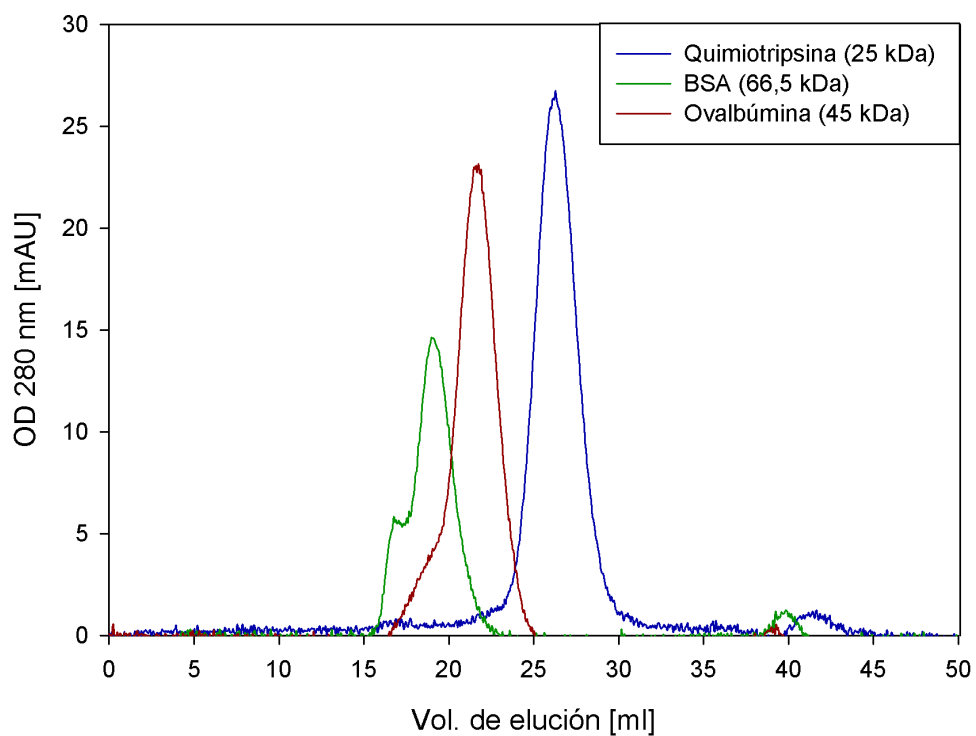


Figura D.1: Curvas de calibración de la Cromatografía de filtración en gel, columna Sephacryl S-100. Se muestran los perfiles cromatográficos de las proteínas puras: Quimiotripsina, BSA y Ovalbúmina.

D.2. DNS

En las curvas de calibración del ensayo DNS presentadas a continuación, se encuentra la relación lineal entre Absorbancia a 540 nm y concentración de BSA. En la figura D.2 se presenta la curva de calibración en $[mg/ml]$, y en la figura D.3 en $[\mu mol/ml]$.

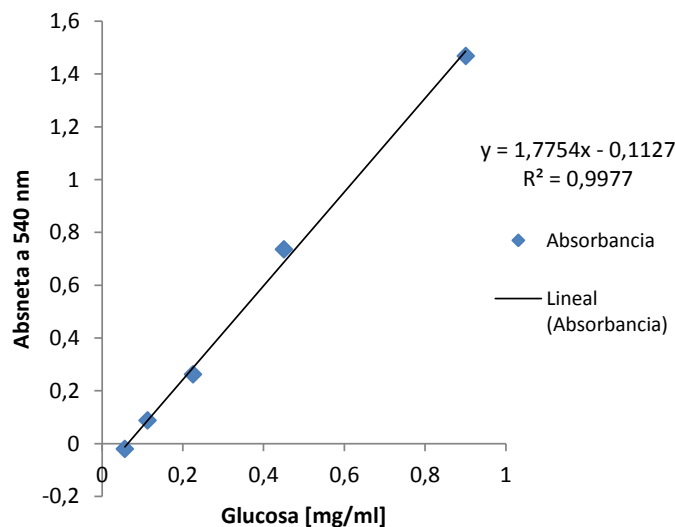


Figura D.2: Curva de calibración del ensayo DNS. Los datos corresponden a distintas concentraciones de Glucosa (en $[mg/ml]$). Error de la correlación lineal: 0,3 %

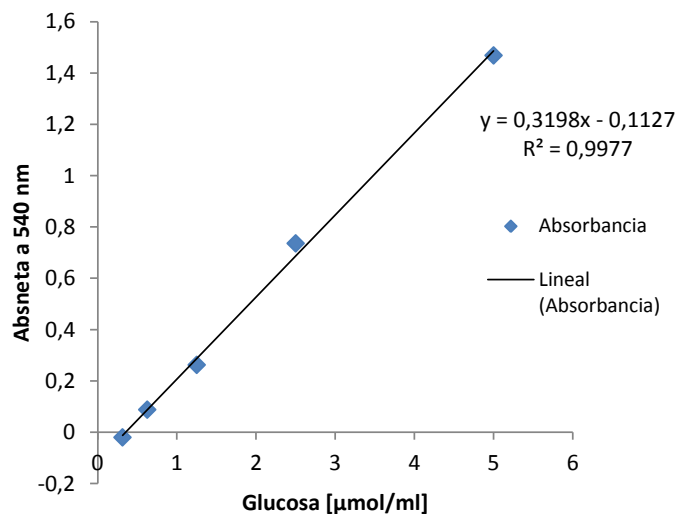


Figura D.3: Curva de calibración del ensayo DNS. Los datos corresponden a distintas concentraciones de Glucosa (en $[\mu mol/ml]$). Error de la correlación lineal: 0,3 %

D.3. Bradford

El siguiente gráfico se utilizó para la conversión de absorbancias del ensayo Bradford a concentraciones (en [mg/ml]). Los valores del eje Y, se calculan como:

$$\Delta Abs = \frac{(Muestra)_{OD595nm}}{(Muestra)_{OD465nm}} - \frac{(Blanco)_{OD595nm}}{(Blanco)_{OD465nm}}$$

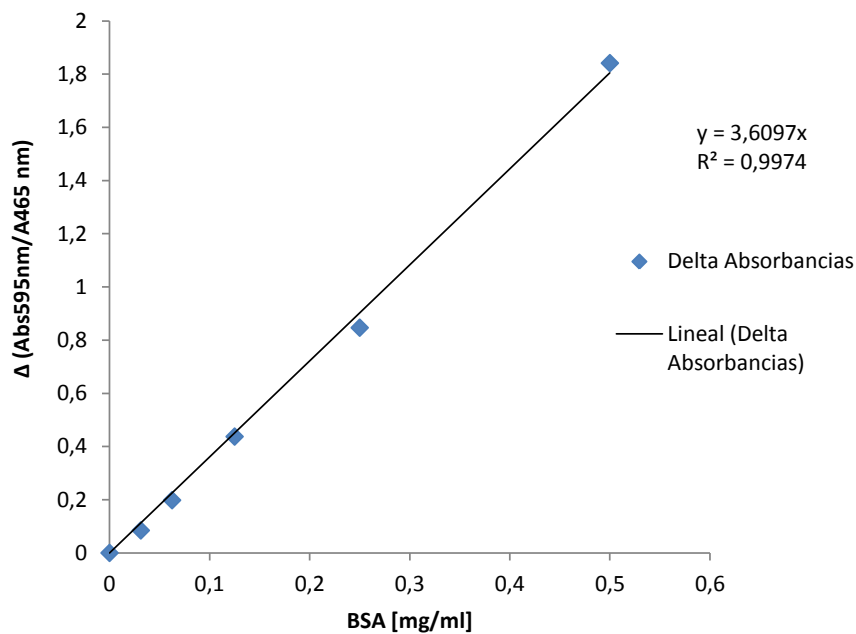


Figura D.4: Curva de calibración del ensayo Bradford. Los datos corresponden a distintas concentraciones de la proteína BSA. Error de la correlación lineal: 0,3 %

D.4. Ladder electroforesis

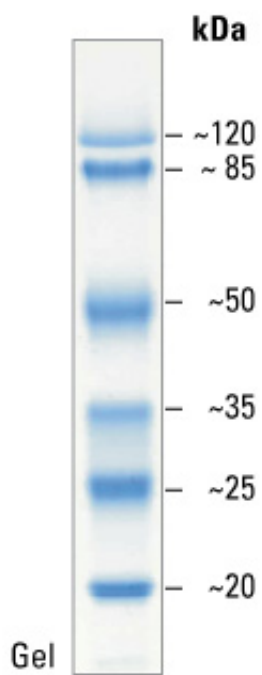


Figura D.5: Marcador de peso molecular (ladder) para electroforesis SDS Page, gel al 12 %, rango de tamaño desde 20 a 120 kDa, marca ThermoScientific [50].

Apéndice E

Memoria de Cálculo

E.1. Actividad Enzimática

Ensayos con DNS

Para tener la cantidad de azúcares reductores producidos de los ensayos de actividad con CMC, Avicel y Xilano, se deben transformar los valores de absorbancia a concentración (en [mg/ml]). Para esto, se utilizó una curva de calibración de DNS (ver Apéndice D).

Esta curva de calibración entrega la relación lineal entre concentración en [mg/ml] y absorbancia, o sea:

$y = m \cdot x + n$, donde y es la absorbancia (medida a 550 nm) y x es la concentración de azúcares reductores (en [mg/ml]).

Luego, para tener las concentraciones se tiene que: $x = \frac{y - n}{m}$ (1).

Ahora, si se quiere calcular la actividad, se necesita tener la curva de calibración de absorbancia en función de [$\mu\text{mol/ml}$], y posteriormente se utiliza la misma ecuación (1), pero m y n tendrán valores distintos de acuerdo a la nueva curva de calibración.

Para obtener la actividad enzimática se tiene la definición: $1[IU] = 1[\mu\text{mol/min}]$ de AR convertidos.

Teniendo una concentración de $\alpha[\mu\text{mol/ml}]$, luego:

$\alpha[\mu\text{mol/ml}] = \alpha \cdot t[\mu\text{mol/min} \cdot \text{ml}]$, donde t es el tiempo de reacción en el ensayo de hidrólisis, en este caso: $t = 30$ minutos. La actividad finalmente estará expresada en $[IU/ml] = [\mu\text{mol/min} \cdot \text{ml}]$.

Ensayos con DMP

Primero se graficó la cinética de oxidación de DMP en el tiempo, donde la reacción se realizó en 20 minutos, tomando medidas de absorbancia a 468 nm cada 1 o 2 minutos. A partir de esta cinética se obtuvo una curva de tendencia lineal: $y = mx + n$, con un cierto coeficiente de correlación R^2 . Esta pendiente “ m ” corresponde al cambio de absorbancia en el tiempo.

Luego, para pasar la pendiente a unidades de actividad enzimática, se utilizó la conversión mencionada en el trabajo de Schlosser *et. al* (1997)[38], donde 1 unidad de actividad [U] corresponde al cambio de absorbancia en un periodo de 10 minutos, o equivalentemente:

$$1[U] = 2 \cdot \frac{\Delta OD_{468nm}}{\Delta t}, \text{ donde } \Delta t = 20[\text{min}] \text{ de reacción.}$$

Este valor medido en [U] se dividió por el volumen total en el ensayo, o sea: $[U]/0,1[\text{ml}] = [U/\text{ml}]$, teniendo así la actividad enzimática por unidad de volumen de la muestra.

Ejemplo:

Para el ensayo de MnP en la fracción N°25, se tiene que $m = \Delta Abs/\Delta t = 0,0556$. Luego:

$$\text{Actividad enzimática} = 0,056 \cdot 2 = 0,11[U]$$

$$\text{Por unidad de volumen: } \frac{0,11[U]}{0,1[\text{ml}]} = 1,1[U/\text{ml}]$$

El error porcentual de la correlación se calculó como:

$$\text{error } \% = (1 - R^2) \cdot 100$$

Entonces, el error ajustado a la actividad calculada sería:

$$1,1[U/\text{ml}] \cdot (1 - 0,993) = 7,8 \cdot 10^{-3}[U/\text{ml}]$$

E.2. Recuperación porcentual de proteínas en separación

Se definió la recuperación porcentual de proteínas y actividad, respecto a la etapa anterior del proceso de separación, o sea:

Recuperación posterior a la etapa de extracción y concentración:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Extracto proteico}}{\text{Suma de cultivos}} \cdot 100$$

Recuperación posterior a la separación por cromatografía:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Suma de fracciones}}{\text{Extracto proteico}} \cdot 100$$

Por ejemplo:

Para calcular la recuperación porcentual de actividad (en [mg]) posterior a la cromatografía, se tiene:

EP = 0,93[mg/ml], y se obtuvo 1,4 ml de EP.
Luego, la cantidad total de proteínas es: 0,93[mg/ml] · 1,4[ml] = 1,3[mg].

Suma de fracciones = 0,23[mg], correspondiente a la suma de los valores detectados por el método de Bradford (desde las fracciones 19 a 31).

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{0,23[mg]}{1,3[mg]} \cdot 100 = 18 \%$$

Para calcular la recuperación porcentual de actividad (en [IU/ml]) posterior a la extracción y concentración, se tiene:

Suma de cultivos = 273[IU] en 528 ml, en el día 11. Esto se calculó como la actividad CMCasa (en [IU/ml]) multiplicada por el volumen del cultivo (aproximadamente 88 ml en cada matraz).

EP = 9,74[IU/ml], y se obtuvo 1,4 ml de EP.
Luego, la actividad total es: 9,74[IU/ml] · 1,4[ml] = 13,6[IU].

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{13,6 [IU]}{273[IU]} \cdot 100 = 5 \%$$

E.3. Rendimiento enzimático

La estimación del potencial hidrolítico se tradujo en el cálculo de la conversión del material lignocelulósico (paja de trigo) a azúcares simples, los cuales podrían serían posteriormente fermentados para producir etanol. Además, se definió el rendimiento que tiene tal producción de azúcares o etanol, por cantidad de proteínas utilizadas en la hidrólisis.

La conversión de celulosa y hemicelulosa (xilano) en la hidrólisis de trigo se definió como:

$$\text{Conversión} = \frac{\text{Cantidad de glucosa o xilosa liberada [mg/ml]}}{\text{Cantidad de celulosa o xilano en trigo [mg/ml]}}$$

El etanol que sería potencialmente producido (considerando 100 % de conversión de azúcar a etanol): Etanol potencial = (Cantidad de glucosa o xilosa producida en hidrólisis [mg/ml]) · (FC)

Donde el factor de conversión se consideró en base a las relaciones estequiométricas de moles de reactivo versus moles de producto, en la fermentación de glucosa y xilosa:

1 mol de glucosa \rightarrow 2 mol de etanol, luego: FC = 1/2 = 0,5

6 mol de xilosa \rightarrow 10 mol de etanol, luego: FC = 6/10 = 0,6

Cuyo rendimiento sería:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Cantidad de glucosa o etanol producido [mg/ml]}}{\text{Cantidad de proteína utilizada [mg/ml]}}$$

Ejemplo:

Calculando la conversión y rendimiento de glucosa en la hidrólisis de paja de trigo por la fracción cromatográfica N°27, se tiene:

Cantidad de celulosa hidrolizada en 5 [mg] de paja de trigo y considerando un 35 % de celulosa en tal biomasa, equivañe a: 5[mg] · 0,35 = 1,75[mg] de celulosa en 1 ml de reacción.

La cantidad de glucosa liberada en la hidrólisis de esta fracción: 0,025[mg/ml]

$$\text{Conversión} = \frac{0,025[\text{mg/ml}]}{1,75[\text{mg/ml}]} = 0,0143 = 1,43\%$$

Considerando que esta fracción tiene una concentración proteica de 0,018 [mg/ml], entonces el rendimiento sería:

$$\text{Rendimiento glucosa} = \frac{0,025[\text{mg/ml}]}{0,018[\text{mg/ml}]} = 1,42 \text{ [mg glucosa/mg proteína]}$$

La potencial producción de etanol sería:

$$\text{Etanol potencial} = 0,025[mg/ml] \cdot 0,5 = 0,013[mg/ml] = 1,3\%p/v$$

Cuyo rendimiento proteico se calcula como:

$$\text{Rendimiento etanol} = \frac{0,013[mg/ml]}{0,018[mg/ml]} = 0,72 \text{ [mg etanol/mg proteína]}$$