



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

**CARACTERIZACIÓN DE CÓCTELES ENZIMÁTICOS PROVENIENTES DE  
FERMENTACIÓN SUMERGIDA DE CONSORCIOS ARTIFICIALES DE  
HONGOS FILAMENTOSOS.**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

FRANCISCA ANNAY CÓRDOVA OPAZO

PROFESORA GUÍA:  
MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:  
CATALINA LANDETA SALGADO  
MARÍA ORIANA SALAZAR AGUIRRE

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por:  
Centro de Biotecnología y Bioingeniería, CEBIB.  
Fondo FB0001

SANTIAGO DE CHILE  
2024

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR  
AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN  
BIOTECNOLOGÍA  
POR: FRANCISCA ANNAY CÓRDOVA OPAZO  
FECHA: 2024  
PROF. GUÍA: MARÍA ELENA LIENQUEO

## **CARACTERIZACIÓN DE CÓCTELES ENZIMÁTICOS PROVENIENTES DE FERMENTACIÓN SUMERGIDA DE CONSORCIOS ARTIFICIALES DE HONGOS FILAMENTOSOS.**

Los hongos filamentosos poseen la capacidad de producir enzimas que les permiten, entre varias cosas, degradar compuestos para sus procesos metabólicos. Las enzimas son proteínas que aceleran reacciones químicas. Su capacidad para operar como catalizadores las convierte en componentes fundamentales de numerosos procesos biológicos y aplicaciones industriales. La producción de enzimas se puede potenciar mediante la utilización de co-cultivos.

Este estudio se enfoca en caracterizar la actividad enzimática de endocelulasa y xilanasa en dos consorcios artificiales de hongos filamentosos. Esta caracterización es importante para encontrar el punto óptimo de actividad enzimática y maximizar la producción, especialmente porque estas enzimas pueden degradar dos polisacáridos muy comunes en la naturaleza.

El diseño experimental se realizó utilizando dos tipos de consorcios que incluyen dos hongos capaces de producir celulasa y xilanasa. Estos consorcios se denominaron 1 y 2. Los experimentos se llevaron a cabo a pH 4,5 y 6, evaluando la actividad en diferentes momentos durante el crecimiento de los consorcios 1 y 2.

Los resultados muestran un aumento en la producción de endocelulasa con el tiempo. No se encontraron diferencias significativas entre los consorcios a pH 4,5 y 6, ni entre ambos consorcios a pH 4,5. Sin embargo, hubo una diferencia significativa entre los consorcios 1 y 2 a pH 6, siendo el consorcio 2 el que mostró una mayor actividad enzimática. La actividad enzimática máxima fue de 0.5488 U/g en el consorcio 2 a pH 6 después de 96 horas de fermentación.

En cuanto a los ensayos de xilanasa, no se observaron diferencias significativas entre el consorcio 1 a pH 4,5 y 6, excepto a las 96 horas. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas al comparar el consorcio 2 en ambos pHs, con una mayor actividad a pH 6 en general. Además, al contrastar ambos consorcios a pH 4,5, solo se registraron diferencias significativas en la hora 0, con una mayor actividad en el consorcio 2. Similarmente, al comparar los consorcios a pH 6, se observó una actividad enzimática superior en el consorcio 2. La actividad máxima alcanzada fue de 9.7885 U/g en el consorcio 2 a pH 6 tras 24 horas de fermentación.

Se recomienda realizar ensayos adicionales a diferentes valores de pH (3 a 8) y temperaturas (30°C a 70°C) para comprender mejor las características de las enzimas estudiadas y optimizar su producción en aplicaciones biotecnológicas.

# Agradecimientos

Primero que todo, quiero agradecer a mi familia. A mi mamá y a mi papá que me recordaron en cada paso que era capaz, que escucharon mis quejas y me dieron palabras de aliento. A mis hermanos que con sus tonteras me sacaron incontables risas en los momentos en los que más lo necesitaba o las múltiples veces en que me ayudaron cuando estaba muy estresada.

En segundo lugar, me gustaría agradecer tanto a los amigos y a las amigas que tenía antes de ingresar a la universidad y a las que hice durante mi estadía en la universidad. Durante mi paso por plan común, el departamento y finalmente el CEBIB he tenido la dicha de conocer gente increíble que considero amigos y amigas que espero me sigan acompañando una vez termine esta etapa de mi vida. Todos y todas han aportado en mi vida en la universidad, ya sea estudiando en grupo para los distintos ramos, como compartiendo cosas de la vida cotidiana.

Agradezco a mis chicas del colegio porque si bien no nos vemos ni hablamos como antes siempre han sido un lugar seguro donde refugiarme cuando la universidad era demasiado. A mis amigos de plan común porque si bien tomamos caminos separados, siempre tratamos de mantenernos en la vida del otro. A mi gente del departamento les agradezco las múltiples enseñanzas que me han dado desde el 2019, sin lugar a duda no sería la persona que soy hoy en día sin ustedes. A las amigas que hice en mi tiempo en el CEBIB les agradezco que hicieran el tiempo en el laboratorio mucho más ameno y que toda la ayuda que me han dado desde el 2022 tanto para adaptarme al laboratorio, como para utilizar los equipos y entender protocolos, este trabajo no sería lo mismo sin ustedes y definitivamente hubiera sido un camino mucho más duro. A Nicolás, que si bien nos conocimos en plan común empezamos a realmente conocernos el año pasado, gracias por escuchar los mil audios que te mande divagando sobre las cosas del laboratorio, gracias por mandarme comida cuando estoy triste, gracias por todo lo que has hecho por mí y por la alegría que me has dado desde que comenzamos realmente a conocernos y obvio por todo el apañe en este proceso.

Finalmente, agradezco mucho a la profesora María Elena Lienqueo por darme la oportunidad de trabajar con ella tanto en la memoria como en las dos unidades de investigación que tome con ella. Gracias por su apoyo, paciencia y sus múltiples consejos y correcciones, no me cabe duda de que este proceso pudo haber sido mucho más estresante sin su ayuda. También quiero agradecer a Catalina Landeta por hacerme sentir bienvenida en el CEBIB, por acompañarme y aconsejarme desde el día que nos conocimos. Agradezco también al equipo que conforma el CeBiB por su colaboración tanto con recursos como con conocimientos, fueron de vital importancia para mi trabajo.

# Tabla de Contenido

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Motivación . . . . .	1
1.2. Antecedentes generales . . . . .	2
1.2.1. Enzimas . . . . .	2
1.2.1.1. Tipos de enzimas . . . . .	2
1.2.1.2. Efecto pH y temperatura. . . . .	3
1.2.1.3. Aplicaciones generales . . . . .	3
1.2.1.4. Celulasa . . . . .	4
1.2.1.4.1 Aplicaciones . . . . .	4
1.2.1.4.2 Tipos de celulasa . . . . .	4
1.2.1.4.3 Actividad enzimática conocidas . . . . .	5
1.2.1.5. Xilanasa . . . . .	5
1.2.1.5.1 Aplicaciones . . . . .	5
1.2.1.5.2 Degradación Hemicelulosa . . . . .	6
1.2.1.5.3 Actividad enzimática conocidas . . . . .	7
1.2.2. Hongos filamentosos . . . . .	7
1.2.3. Uso de algas marinas como sustrato . . . . .	8
1.2.3.1. Características de las algas . . . . .	9
1.2.3.2. Aplicaciones y usos . . . . .	9
1.2.3.3. Productos de la fermentación de algas . . . . .	9
<b>2. Objetivos</b>	<b>10</b>
2.1. Objetivos . . . . .	10
<b>3. Estado del arte</b>	<b>11</b>
3.1. Vía de obtención de enzimas . . . . .	11
3.2. <i>Durvillaea spp</i> . . . . .	12
3.2.1. Composición . . . . .	12
3.2.2. Aplicaciones del alga . . . . .	13
3.3. Fermentación sumergida con consorcios de hongos filamentosos. . . . .	13
<b>4. Materiales y Metodología</b>	<b>15</b>
4.1. Materiales y equipos . . . . .	15
4.1.1. Separación, liofilización y almacenamiento de las muestras . . . . .	15
4.1.2. Kit CellG5 . . . . .	16
4.1.3. Ensayo Endocelulasa . . . . .	16
4.1.4. Reactivo DNS . . . . .	16
4.1.5. Medición de absorbancia . . . . .	16

4.1.6.	Elaboración curva de calibración . . . . .	16
4.1.7.	Ensayo de xilanasa . . . . .	17
4.1.8.	Análisis de resultados . . . . .	17
4.2.	Metodología . . . . .	17
4.2.1.	Obtención de muestras . . . . .	17
4.2.2.	Medición de actividad endocelulasa . . . . .	17
4.2.3.	Preparación de curva de calibración del kit . . . . .	17
4.2.4.	Medición de actividad xilanasa . . . . .	18
4.2.5.	Preparación de curva de calibración para azúcares reductores . . . . .	18
<b>5.</b>	<b>Resultados y discusión</b>	<b>19</b>
5.1.	Análisis actividad enzimática endocelulasa . . . . .	19
5.1.1.	Curva de calibración del kit K-CellG5 . . . . .	19
5.1.2.	Cuantificación de la actividad endocelulasa . . . . .	20
5.1.2.1.	Ensayo de la actividad de endocelulasa a pH 4,5 . . . . .	20
5.1.2.2.	Ensayo de la actividad de endocelulasa a pH 6 . . . . .	21
5.1.2.3.	Ensayo de la actividad de endocelulasa del Consorcio 1 . . . . .	23
5.1.2.4.	Ensayo de la actividad de endocelulasa del Consorcio 2 . . . . .	24
5.2.	Análisis de actividad enzimática xilanasa . . . . .	25
5.2.1.	Curva de calibración del método DNS con xilosa a distintos pHs . . . . .	25
5.2.2.	Análisis de Azúcares reductores basales en el medio . . . . .	26
5.2.3.	Análisis de azúcares reductores en las muestras liofilizadas . . . . .	26
5.2.3.1.	Comparación azúcares reductores del consorcio 1 y 2 a un mismo pH . . . . .	26
5.2.4.	Comparación azúcares reductores en ensayos a pH 4,5 y 6 para los consorcio 1 y 2. . . . .	29
5.2.5.	Cuantificación de la actividad xilanasa . . . . .	31
5.2.5.1.	Ensayo de la actividad de xilanasa a pH 4,5 . . . . .	31
5.2.5.2.	Ensayo de la actividad de xilanasa pH 6 . . . . .	32
5.2.5.3.	Ensayo de la actividad de xilanasa del consorcio 1 . . . . .	34
5.2.5.4.	Ensayo de la actividad de xilanasa del consorcio 2 . . . . .	35
<b>6.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>36</b>
	<b>Bibliografía</b>	<b>37</b>
	<b>Anexos</b>	<b>42</b>
A.	Tablas experimentales . . . . .	42
A.1.	Absorbancias curva de calibración kit . . . . .	42
A.2.	Absorbancias medición celulasas . . . . .	42
A.3.	Absorbancias curva de calibración xilosa . . . . .	44
A.4.	Concentración de azucares reductores en las muestras. . . . .	44
A.5.	Absorbancias ensayos de xilanasas . . . . .	46
B.	Resultados análisis estadístico . . . . .	48
B.1.	ANOVA Endocelulasa . . . . .	48
B.1.1.	ANOVA actividad endocelulasa pH 4,5 . . . . .	48
B.1.2.	ANOVA actividad endocelulasa pH 6 . . . . .	48
B.1.3.	ANOVA actividad endocelulasa consorcio 1 . . . . .	48

B.1.4.	ANOVA actividad endocelulasa consorcio 2 . . . . .	49
B.2.	ANOVA concentración azúcares reductores . . . . .	49
B.2.1.	ANOVA concentración azúcares reductores pH 4,5 . . . . .	49
B.2.2.	ANOVA concentración azúcares libres pH 6 . . . . .	49
B.2.3.	ANOVA concentración azúcares libres consorcio 1 . . . . .	50
B.2.4.	ANOVA concentración azúcares libres consorcio 2 . . . . .	50
B.3.	ANOVA Xilanasa . . . . .	50
B.3.1.	ANOVA actividad xilanasa pH 4,5 . . . . .	50
B.3.2.	ANOVA actividad xilanasa pH 6 . . . . .	51
B.3.3.	ANOVA actividad xilanasa consorcio 1 . . . . .	51
B.3.4.	ANOVA actividad xilanasa consorcio 2 . . . . .	51
C.	Resultados Buffer Fosfato 100 mM pH 6 . . . . .	52
C.1.	Tablas de datos experimentales . . . . .	52
C.2.	Gráfico . . . . .	53
D.	Cálculos realizados . . . . .	54
D.1.	Cálculo de $\epsilon_{mM}$ . . . . .	54
D.2.	Cálculo de actividad enzimática endocelulasa . . . . .	54
D.3.	Cálculo de concentración de azúcares reductores . . . . .	55
D.4.	Cálculo de actividad enzimática xilanasa . . . . .	55
E.	Comparación curva estándar actividad enzimática xilanasa de buffers con aditivos. . . . .	55
E.0.1.	Buffer Acetato de sodio, 100 mM, pH 4,5 . . . . .	56
E.0.2.	Buffer Fosfato de sodio, 100 mM, pH 6 . . . . .	56
E.1.	Absorbancias curvas calibración actividad enzimática xilanasa . . . . .	57
E.1.1.	Comparación de buffers con y sin aditivos . . . . .	57

# Índice de Tablas

A.1.	Absorbancias medidas a 400 nm de muestras por triplicado con actividad enzimática conocida. . . . .	42
A.2.	Valores de absorbancia obtenidos al medir a 400 nm los ensayos de actividad de endocelulasa a las muestras del consorcio 1, pH 4,5. . . . .	42
A.3.	Valores de absorbancia obtenidos al medir a 400 nm los ensayos de actividad de endocelulasa a las muestras del consorcio 1, pH 6. . . . .	43
A.4.	Valores de absorbancia obtenidos al medir a 400 nm los ensayos de actividad de endocelulasa a las muestras del consorcio 2, pH 4,5. . . . .	43
A.5.	Valores de absorbancia obtenidos al medir a 400 nm los ensayos de actividad de endocelulasa a las muestras del consorcio 2, pH 6. . . . .	43
A.6.	Valores de absorbancia obtenidos al medir a 550 nm concentraciones conocidas de xilosa diluida en buffer Acetato de sodio 100 mM pH 4,5 con 1mg/ml de BSA y 0,02 % de azida sódica. . . . .	44
A.7.	Valores de absorbancia obtenidos al medir a 550 nm concentraciones conocidas de xilosa diluida en buffer Fosfato de sodio 100 mM pH 6 con 0,02 % de azida sódica. . . . .	44
A.8.	Valores de absorbancia obtenidos al medir a 550 nm las muestras de la fermentación del consorcio 1 diluidas a pH 4,5 . . . . .	44
A.9.	Valores de absorbancia obtenidos al medir a 550 nm las muestras de la fermentación del consorcio 1 diluidas a pH 6 . . . . .	45
A.10.	Valores de absorbancia obtenidos al medir a 550 nm las muestras de la fermentación del consorcio 2 diluidas a pH 4,5 . . . . .	45
A.11.	Valores de absorbancia obtenidos al medir a 550 nm las muestras de la fermentación del consorcio 2 diluidas a pH 4,5 y pH 6 . . . . .	45
A.12.	Valores de absorbancia obtenidos al medir a 550 nanómetros las muestras obtenidas de la fermentación del consorcio 1 diluidas a pH 4,5, la concentración de azúcares reductores medidas y la actividad enzimática. . . . .	46
A.13.	Valores de absorbancia obtenidos al medir a 550 nanómetros las muestras obtenidas de la fermentación del consorcio 2 diluidas a pH 4,5, la concentración de azúcares reductores medidas y la actividad enzimática . . . . .	46
A.14.	Valores de absorbancia obtenidos al medir a 550 nanómetros las muestras obtenidas de la fermentación del consorcio 1 diluidas a pH 6, la concentración de azúcares reductores medidas y la actividad enzimática . . . . .	47
A.15.	Valores de absorbancia obtenidos al medir a 550 nanómetros las muestras obtenidas de la fermentación del consorcio 2 diluidas a pH 6, la concentración de azúcares reductores medidas y la actividad enzimática. . . . .	47
B.1.	Test de múltiples comparaciones de Šídák realizado a la comparación de actividad enzimática de celulasa pH 4,5. . . . .	48

B.2.	Test de múltiples comparaciones de Šídák realizado a la comparación de actividad enzimática de celulasa pH 6. . . . .	48
B.3.	Test de múltiples comparaciones de Šídák realizado a la comparación de actividad enzimática de celulasa consorcio 1. . . . .	48
B.4.	Test de múltiples comparaciones de Šídák realizado a la comparación de actividad enzimática de celulasa consorcio 2. . . . .	49
B.5.	Test de múltiples comparaciones de Šídák realizado a la comparación de azúcares libres a pH 4,5. . . . .	49
B.6.	Test de múltiples comparaciones de Šídák realizado a la comparación de azúcares libres a pH 6. . . . .	49
B.7.	Test de múltiples comparaciones de Šídák realizado a la comparación de azúcares libres consorcio 1. . . . .	50
B.8.	Test de múltiples comparaciones de Šídák realizado a la comparación de azúcares libres consorcio 2. . . . .	50
B.9.	Test de múltiples comparaciones de Šídák realizado a la comparación de actividad enzimática de xilanasa a pH 4,5. . . . .	50
B.10.	Test de múltiples comparaciones de Šídák realizado a la comparación de actividad enzimática de xilanasa a pH 6. . . . .	51
B.11.	Test de múltiples comparaciones de Šídák realizado a la comparación de actividad enzimática de xilanasa consorcio 1. . . . .	51
B.12.	Test de múltiples comparaciones de Šídák realizado a la comparación de actividad enzimática de xilanasa consorcio 2 . . . . .	51
C.1.	Tabla de datos de la xilanasa producida por consorcio 1 usando el buffer Fosfato de sodio 100 mM pH 6 . . . . .	52
C.2.	Tabla de datos de la xilanasa producida por consorcio 2 usando el buffer Fosfato de sodio 100 mM pH 6 . . . . .	53
E.1.	Valores de absorbancia obtenidos a 550 nm para realizar una curva de Actividad enzimática vs absorbancia diluida en buffer acetato de sodio 100 mM pH 4,5 con 1 mg/ml de BSA y 0,02 % azida sódica. . . . .	57
E.2.	Valores de absorbancia obtenidos a 550 nm para realizar una curva de Actividad enzimática vs absorbancia diluida en buffer acetato de sodio 100 mM pH 4,5. . . . .	57
E.3.	Valores de absorbancia obtenidos a 550 nm para realizar una curva de Actividad enzimática vs absorbancia diluida en buffer fosfato de sodio 100 mM pH 6 con 0,02 % de azida de sodio. . . . .	57
E.4.	Valores de absorbancia obtenidos a 550 nm para realizar una curva de Actividad enzimática vs absorbancia diluida en buffer fosfato de sodio 100 mM pH 6. . . . .	58

# Índice de Ilustraciones

1.1.	Celulosa degradada por enzimas celulasas [24]. . . . .	5
1.2.	Tres estructuras típicas de hemicelulosa [37]. . . . .	6
1.3.	Enzimas involucradas en la degradación de xilano [38]. . . . .	7
3.1.	Curva típica de crecimiento de microorganismos, la zona destacada es donde se espera haber muestreado [66]. . . . .	14
4.1.	Diagrama del trabajo realizado. . . . .	15
5.1.	Curva de calibración del kit CellG5. . . . .	19
5.2.	Comparación actividad enzimática de endocelulasa U/g de muestra liofilizada en los distintos momentos de la fermentación de los consorcios 1 y 2 en un ensayo a pH 4,5 a 40°C. . . . .	21
5.3.	ANOVA para la búsqueda de diferencias significativas, ns significa que no hay una diferencia significativa de actividad enzimática de endocelulasa entre los consorcios 1 y 2 en un ensayo a pH 4,5. . . . .	21
5.4.	Comparación actividad enzimática de endocelulasa U/g de muestra liofilizada en los distintos momentos de la fermentación de los consorcios 1 y 2 en un ensayo a pH 6 a 40°C. . . . .	22
5.5.	ANOVA para la búsqueda de diferencias significativas. Una mayor diferencia se representa con mayor cantidad de * y la ausencia de * significa que no hay una diferencia significativa de actividad enzimática de endocelulasa entre los consorcios 1 y 2 en un ensayo a pH 6. . . . .	22
5.6.	Comparación actividad enzimática de endocelulasa U/g de muestra liofilizada en los distintos momentos de la fermentación del consorcio 1 en ensayos a pH 4,5 y 6 a 40°C. . . . .	23
5.7.	ANOVA para la búsqueda de diferencias significativas, ns significa que no hay una diferencia significativa de actividad endocelulasa en ensayos a pH 4,5 y 6 para el consorcio 1. . . . .	23
5.8.	Comparación actividad enzimática de endocelulasa U/g de muestra liofilizada en los distintos momentos de la fermentación del consorcio 2 en ensayos a pH 4,5 y 6 a 40°C. . . . .	24
5.9.	ANOVA para la búsqueda de diferencias significativas, ns significa que no hay una diferencia significativa de actividad endocelulasa en ensayos a pH 4,5 y 6 para el consorcio 2. . . . .	24
5.10.	Curva de calibración de xilosa diluida a pH 4,5 (Buffer Acetato de sodio 100 mM con 1 mg/ml de BSA y 0,02 % de azida sódica). . . . .	25
5.11.	Curva de calibración de xilosa diluida a pH 6 (Buffer Fosfato de sodio 100 mM con 0,02 % de azida de sodio). . . . .	25

5.12.	Comparación de la concentración en mg/ml de azúcares reductores en los distintos momentos de la fermentación de los consorcios 1 y 2 en un ensayo a pH 4,5, medido mediante método DNS. . . . .	27
5.13.	ANOVA para la búsqueda de diferencias significativas. Una mayor diferencia se representa con mayor cantidad de * y ns significa que no hay una diferencia significativa de concentración de azúcares reductores entre los consorcios 1 y 2 en un ensayo a pH 4,5. . . . .	27
5.14.	Comparación de la concentración en mg/ml de azúcares reductores en los distintos momentos de la fermentación de los consorcios 1 y 2 en un ensayo a pH 6, medido mediante método DNS. . . . .	28
5.15.	ANOVA para la búsqueda de diferencias significativas, ns significa que no hay una diferencia significativa de concentración de azúcares reductores entre los consorcios 1 y 2 en un ensayo a pH 6. . . . .	28
5.16.	Comparación de la concentración en mg/ml de azúcares reductores en los distintos momentos de la fermentación del consorcio 1 en ensayos a pH 4,5 y 6, medido mediante método DNS. . . . .	29
5.17.	ANOVA para la búsqueda de diferencias significativas, ns significa que no hay una diferencia significativa de concentración de azúcares reductores del consorcio 1 en ensayos a pH 4,5 y 6. . . . .	30
5.18.	Comparación de la concentración en mg/ml de azúcares reductores en los distintos momentos de la fermentación del consorcio 2 en ensayos a pH 4,5 y 6, medido mediante método DNS. . . . .	30
5.19.	ANOVA para la búsqueda de diferencias significativas, ns significa que no hay una diferencia significativa de concentración de azúcares reductores en el consorcio 2 en ensayos a pH 4,5 y 6. . . . .	31
5.20.	Comparación actividad enzimática de xilanasa U/g de muestra liofilizada en los distintos momentos de la fermentación de los consorcios 1 y 2 en un ensayo a pH 4,5 a 50°C. . . . .	32
5.21.	ANOVA para la búsqueda de diferencias significativas. Una mayor diferencia se representa con mayor cantidad de * y ns significa que no hay diferencia significativa de actividad enzimática de xilanasa entre los consorcios 1 y 2 en un ensayo a pH 4,5. . . . .	32
5.22.	Comparación actividad enzimática de xilanasa U/g de muestra liofilizada en los distintos momentos de la fermentación de los consorcios 1 y 2 en un ensayo a pH 6 a 50°C. . . . .	33
5.23.	ANOVA para la búsqueda de diferencias significativas. Una mayor cantidad de * representa una mayor diferencia significativa de actividad enzimática de xilanasa entre los consorcios 1 y 2 en un ensayo a pH 6 . . . . .	33
5.24.	Comparación actividad enzimática de xilanasa U/g de muestra liofilizada en los distintos momentos de la fermentación del consorcio 1 en ensayos a pH 4,5 y 6 a 50°C. . . . .	34
5.25.	ANOVA para la búsqueda de diferencias significativas. Una mayor diferencia se representa con mayor cantidad de * y ns significa que no hay una diferencia significativa de actividad xilanasa en ensayos a pH 4,5 y 6 para el consorcio 1. . . . .	34
5.26.	Comparación actividad enzimática de xilanasa U/g de muestra liofilizada en los distintos momentos de la fermentación del consorcio 2 en ensayos a pH 4,5 y 6 a 50°C. . . . .	35

5.27.	ANOVA a búsqueda de diferencias significativas. Una mayor diferencia se representa con mayor cantidad de * y la ausencia de * significa que no hay una diferencia significativa de actividad enzimática de xilanasas en ensayos a pH 4,5 y 6 para el consorcio 2. . . . .	35
C.1.	Xilanasas a pH 6 de ambos consorcios utilizando el buffer fosfato de sodio 100 mM pH 6 . . . . .	53
E.1.	Comparación actividad enzimática vs Absorbancia buffer acetato de sodio 100 mM pH 4,5 con y sin BSA y azida sódica. . . . .	56
E.2.	Comparación actividad enzimática vs Absorbancia buffer fosfato de sodio 100 mM pH 6 con y sin azida sódica. . . . .	56

# Capítulo 1

## Introducción

### 1.1. Motivación

Los diversos progresos en ciencia y tecnología han permitido que la humanidad eleve su calidad de vida y aumenten la expectativa de esta, generando un significativo aumento en la población mundial. Según la ONU, esta población es tres veces mayor que a mediados del siglo XX, y se estima que seguirá aumentando en los próximos 30 años, alcanzando los 10 mil millones de habitantes [1].

Este aumento en la población mundial ha llevado a una mayor demanda de alimentos y productos de consumo, impulsando la necesidad de encontrar estrategias innovadoras que permitan resolver los desafíos globales. Las enzimas se han utilizado durante siglos en la producción de alimentos, por ejemplo, para la fabricación de queso, cerveza y levadura, además, desempeñan una función tecnológica para una amplia gama de materias primas durante la transformación de productos alimenticios o ingredientes alimentarios. Es bajo este contexto que la búsqueda de una mayor producción enzimática surge como una respuesta a estos desafíos [2].

Las enzimas ayudan a descomponer nutrientes en compuestos más simples, por ejemplo, convierten el almidón en azúcares sencillos. Además, se pueden utilizar en la fabricación de alimentos debido a que participan en procesos de maduración y conservación de alimentos. El hecho de que las enzimas se encuentren de forma natural y se puedan manipular mediante cambios de temperatura y pH las convierte en alternativas sostenibles en el procesamiento de los alimentos [3].

Asimismo, las enzimas son relevantes en la producción de biocombustibles como el biodiésel, el biohidrógeno, el bioetanol y el biogás, ya sea para el pretratamiento de la materia prima o para el proceso de síntesis. El modo de acción de estas enzimas determina tanto la eficiencia como la viabilidad del proceso y del producto [4].

Según un informe de Mordor Intelligence, se espera que el mercado de enzimas industriales crezca a una tasa compuesta anual del 6% para 2027 [5].

## 1.2. Antecedentes generales

### 1.2.1. Enzimas

Las enzimas son proteínas específicas que actúan como un catalizador biológico, acelerando la velocidad de una reacción química específica, ya que disminuye la energía de activación que requiere la reacción química [6] [7].

Las enzimas poseen las siguientes características principales: su alta especificidad, su eficiencia en los procesos en los que actúan, su capacidad para no destruirse durante la reacción, permitiendo su utilización en varias ocasiones, y la posibilidad de regular la actividad enzimática para adaptarse a lo que se necesita.

Este último punto es de suma importancia, ya que es esencial para garantizar que las reacciones ocurran en el momento y lugar adecuados. La regulación puede ser tanto positiva como negativa y suele estar influenciada por factores internos y externos. Algunas de las formas de regulación se presentan a continuación [8]:

- Regulación por inhibición competitiva: ocurre cuando el inhibidor se une al sitio activo de una enzima donde normalmente se uniría el sustrato, evitando así que el sustrato real se una a la enzima, reduciendo así su actividad.
- Regulación por inhibición no competitiva: ocurre cuando el inhibidor se une a un sitio distinto al sitio activo de la enzima, pero da como resultado una capacidad disminuida del sustrato para unirse al sitio activo. Esto altera la conformación de la enzima, disminuyendo su actividad enzimática.
- Cofactores y coenzimas: muchas enzimas no funcionan de manera óptima, o incluso no funcionan en absoluto, a menos que estén unidas a otras moléculas auxiliares no proteicas conocidas como cofactores.

#### 1.2.1.1. Tipos de enzimas

Los organismos vivos pueden producir miles de enzimas diferentes y cada una de ellas cumple una función específica en el metabolismo del organismo. Las enzimas se clasifican en varios grupos según su función y el tipo de reacción que catalizan, consiguiendo la siguiente clasificación [9]:

- Hidrolasas: catalizan la ruptura de enlaces químicos mediante la adición de agua. Ejemplos incluyen proteasas, fosfatasa, celulasas y xilanasas.
- Oxidorreductasas: catalizan reacciones de oxidación y reducción, transfiriendo electrones de un sustrato a otro. Ejemplos incluyen deshidrogenasas, peroxidasas y oxidasas.
- Transferasas: transfieren grupos funcionales de un sustrato a otro. Ejemplos incluyen fosfotransferasas y quinasas.
- Liasas: catalizan la ruptura y la formación de enlaces dobles. Ejemplos incluyen aldolasas y sintasas.
- Isomerasas: catalizan la conversión de una molécula en su isómero estructural. Ejemplos incluyen las mutasas.

- Ligasas: catalizan la unión de dos moléculas con la formación de un enlace covalente. Ejemplos incluyen carboxilasas y sintetasas.

Las enzimas de interés para este trabajo corresponden a celulasa y xilanasa, ambas entran en la categoría de hidrolasas, catalizan la ruptura de los enlaces glucosídicos de carbohidratos complejos obteniendo unidades más simples como glucosa y xilosa.

#### **1.2.1.2. Efecto pH y temperatura.**

Cada enzima tiene una temperatura óptima de operación, el punto en que su velocidad de reacción es mayor. Por debajo y por encima de esa temperatura la velocidad de la reacción enzimática es menor, pudiendo ser la mitad solo al aumentar o disminuir 10°C de su temperatura óptima. Sobre la temperatura óptima la enzima comienza a desnaturalizarse disminuyendo su velocidad de reacción [10].

Con el pH ocurre algo similar, la actividad enzimática también viene regulada por el pH de la solución enzimática. Para cada enzima el pH óptimo o el rango de pH es distinto y al variar se altera la conformación de la enzima haciendo que la función de la enzima se vea alterada [10]. Es importante mencionar que para cada pH hay una determinada temperatura óptima y viceversa.

#### **1.2.1.3. Aplicaciones generales**

Las enzimas, debido a su vasto espectro y versatilidad, encuentran aplicaciones significativas en diversos sectores industriales. Su papel esencial se manifiesta de manera destacada en industrias como la alimentaria, agrícola, cosmética y farmacéutica, donde desempeñan un papel crítico en la dirección y catalización de reacciones. Estas biomoléculas aceleran la obtención precisa de productos finales valiosos, contribuyendo de manera crucial a procesos como la elaboración de queso, la fabricación de cerveza, la panificación, la extracción de jugo de frutas y el curtido de cuero [11].

Además, el rol de las enzimas está en constante evolución, y su aplicación en procesos industriales está experimentando un notable aumento. Se están utilizando cada vez más en la elaboración de biocombustibles y biopolímeros, destacando su contribución no solo a la eficiencia de procesos existentes, sino también a la innovación en sectores emergentes de la industria [11].

La celulasa se encuentra dentro de las enzimas con mayor valor en el mercado. Según el estudio de investigación de mercado mundial de celulasa (2020), el mercado está valorado en 1.680 millones de dólares estadounidenses en 2020 y se prevé que alcance los 2.450 millones de dólares estadounidenses a finales de 2026 [12].

Por otro lado, según Future Market Insights, se previó que el mercado mundial de xilanasa registre una tasa de crecimiento anual compuesto del 5,4 % de 2023 a 2033. Según el análisis, se previó que la demanda del mercado de xilanasa esté valorada en 19.500 millones de dólares estadounidenses para finales de 2023 y que eventualmente alcanzará los 33 mil millones de dólares a la tasa de crecimiento antes mencionada para 2033 [13].

#### 1.2.1.4. Celulasa

Las celulasas son enzimas pertenecientes al grupo de las hidrolasas que degradan enlaces glucosídicos, también conocidas como glucanasas, y son responsables de la degradación de celulosa [14]. El pH óptimo para la actividad de esta enzima puede variar dependiendo del tipo de celulasa y la fuente de la enzima. Por ejemplo, la celulasa proveniente de *Trichoderma reesei* posee su pH óptimo alrededor de 4,8 [15]. Por otro lado, la celulasa proveniente de *Trichoderma viride* posee su pH óptimo alrededor de 6,5 [16]. Es importante averiguar el rango de pH óptimo de la enzima a estudiar.

##### 1.2.1.4.1. Aplicaciones

La celulasa desempeña un papel importante en el ciclo global del carbono al degradar la celulosa insoluble en azúcares solubles. Su función principal es descomponer la celulosa en unidades más pequeñas llamadas celobiosa y glucosa, que son azúcares simples que pueden ser utilizados como fuente de energía. La celulasa tiene una gran relevancia en la industria hoy en día, ya que la celulosa es el polisacárido más abundante en la naturaleza y, por lo tanto, se puede utilizar en diversas industrias, como [17]:

- Industria papelera: contribuye en el descortezado facilitando la eliminación de la corteza y la degradación del material lignocelulósico, además de ayudar en la eliminación de tinta durante el reprocesamiento del papel, facilitando su reutilización [18] [19].
- Industria alimentaria: contribuye en el mantenimiento del sabor, la durabilidad, el color, el olor, la esencia, el sabor, la textura y la calidad general de los alimentos procesados. También se utiliza en el procesamiento de jugos de frutas y vino para mejorar la extracción y clarificación de los jugos [18] [20].
- Industria textil: se utiliza para modificar las fibras distendidas y aumentar el acabado de hilos y tejidos. También disminuye la rugosidad y aumenta la suavidad, el brillo y la luminosidad de los tejidos [21].
- Industria de detergentes y limpieza: previene la formación de pelusas y bolitas en las prendas de lana, además de proteger los tejidos de la pérdida de color. Modifica las fibrillas de celulosa, eliminando la suciedad y las manchas de las interfibrillas junto con otros componentes de los detergentes [21].
- Industria de biocombustibles: participa en la hidrólisis enzimática de polímeros celulósicos para liberar azúcares fermentables para producir biocombustibles [22].

##### 1.2.1.4.2. Tipos de celulasa

Las celulasas se pueden clasificar en 3 grupos principales y en conjunto actúan para degradar la celulosa como se ve en la Figura 1.1.

Los 3 grupos corresponden a [23]:

- Endo-1,4 $\beta$ -D-glucanasa (endocelulasa): actúa en los sitios internos de los oligosacáridos que se encuentran en la carboximetilcelulosa.
- Exo-1,4- $\beta$ -D-glucanasa (exocelulasa): hidroliza los extremos no reductores de la celulosa cristalina y forma celobiosa o glucosa como productos finales principales.
- $\beta$ -glucosidasa (celobiasa): actúa sobre los extremos no reductores de la celobiosa.

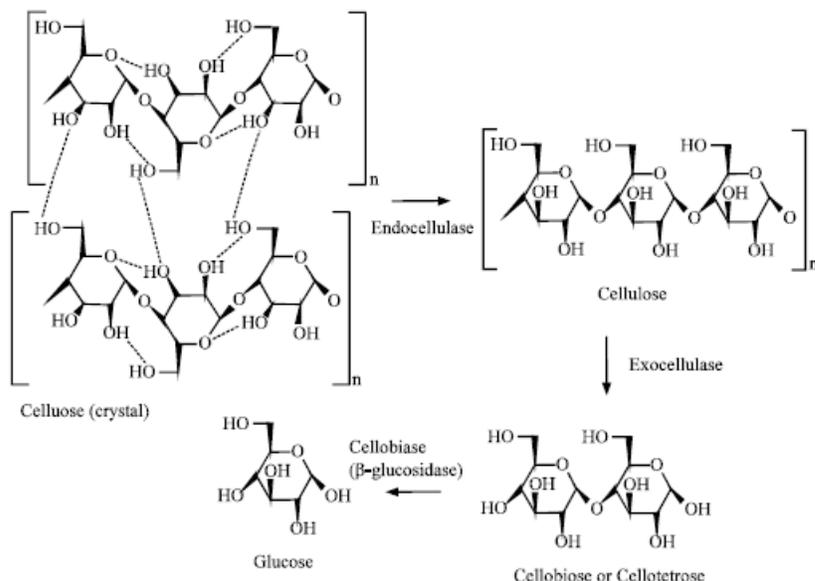


Figura 1.1: Celulosa degradada por enzimas celulasas [24].

#### 1.2.1.4.3. Actividad enzimática conocidas

Existen varios microorganismos productores de celulasas, algunos de los más destacados hiperproductores corresponden:

- *Trichoderma reesei*: este hongo filamentoso es uno de los principales productores de celulasas, incluyendo endocelulasas. Se han desarrollado cepas de *Trichoderma reesei* que son altamente eficientes en la producción de estas enzimas. *Trichoderma reesei* RUT C-30 usando una mezcla de celulosa y hemicelulosa comercial como fuente de carbono produce una actividad de 0,62 U/ml, usando celulosa obtiene 0,57 U/ml y paja de arroz tiene 0,51 U/ml [25].
- *Aspergillus niger*: este hongo filamentoso es otro microorganismo comúnmente utilizado en la producción industrial de enzimas, incluidas las celulasas. Se han desarrollado cepas de *Aspergillus niger* para aumentar la producción de celulasas y otras enzimas relevantes para aplicaciones industriales. *Aspergillus niger* KK2 usando paja de arroz como fuente de carbono produce una actividad de 130 U/g, usando desechos residuales generados en la industria del cultivo de hongos como fuente de carbono posee una actividad enzimática de 18,82 U/ml [26].

#### 1.2.1.5. Xilanasas

Por otro lado, la xilanasas, también es parte de las glucanasas y es el componente principal de un consorcio enzimático que actúa en la naturaleza despolimerizando las moléculas de xilano. El xilano es el principal carbohidrato que se encuentra en la fracción hemicelulósica de los tejidos vegetales y representa un tercio de todo el carbono orgánico renovable disponible en la Tierra [27]. Su pH óptimo varía dependiendo de su fuente de origen, pero dentro de los productores fúngicos pueden llegar a ser entre 4-5 para *Trichoderma Reesei* [28], 6 para *Trichoderma longibrachiatum* [29].

##### 1.2.1.5.1. Aplicaciones

La xilanasas se utiliza en varias industrias, por ejemplo:

- Industria del papel: la eliminación de una porción del xilano aumenta la eficacia de los químicos blanqueadores posteriores disminuyendo la cantidad necesaria de químicos blanqueadores para blanquear la pulpa y colabora, al igual que la celulosa, en el destintado del papel [30] [31].
- Industria alimentaria: se utilizan en el sector de la panificación para mejorar la estabilidad de la masa y la estructura de la miga, lo que da como resultado una miga más suave, más uniforme y el volumen del pan es mayor [32]. Además, de que se pueden utilizar para generar prebióticos [33].
- Industria textil: se utiliza para el tratamiento de fibras naturales como el algodón y el lino. Ayuda a eliminar los residuos de xilano y suaviza las fibras, mejorando la suavidad y la apariencia de las telas [34].
- Industria agrícola: se utilizan junto con glucanasas, pectinasas, celulasas, proteasas, amilasas, fitasas, galactosidasas y lipasas. Estas enzimas descomponen los arabinoxilanos en los ingredientes del alimento, reduciendo la viscosidad de la materia prima y mejorando la digestión de los nutrientes [34].
- Industria del biocombustible: se utiliza para convertir el xilano presente en la pared celular vegetal de la biomasa en monómeros simples de xilosa. Estos monómeros, junto con los de glucosa, producen un alto rendimiento de combustibles vegetales [35].

#### 1.2.1.5.2. Degradación Hemicelulosa

La hemicelulosa es un heteropolímero con cadenas laterales y está compuesta por pentosas (xilanos), unidades alternas de manosa y glucosa o unidades de galactosa. La cantidad de monómeros de azúcar puede cambiar drásticamente según las diferentes fuentes de materia prima [36]. Debido a lo irregulares que son, existen ejemplos típicos, los cuales se pueden apreciar en la Figura 1.2.

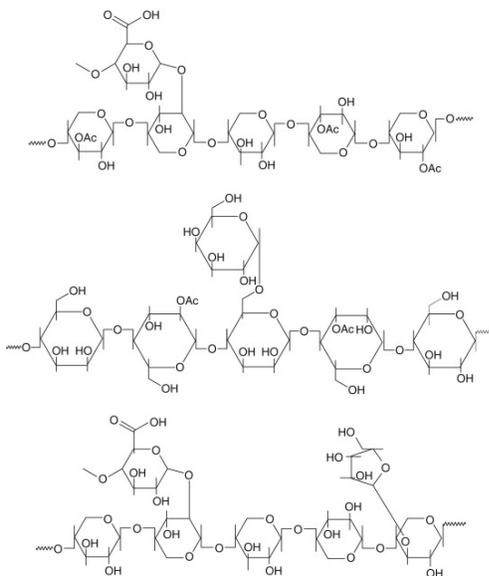


Figura 1.2: Tres estructuras típicas de hemicelulosa [37].

Dentro de la hemicelulosa podemos encontrar los pentanos de xilano, los cuales requieren

del trabajo colectivo de varias enzimas para poder ser degradado, como se aprecia en la Figura 1.3

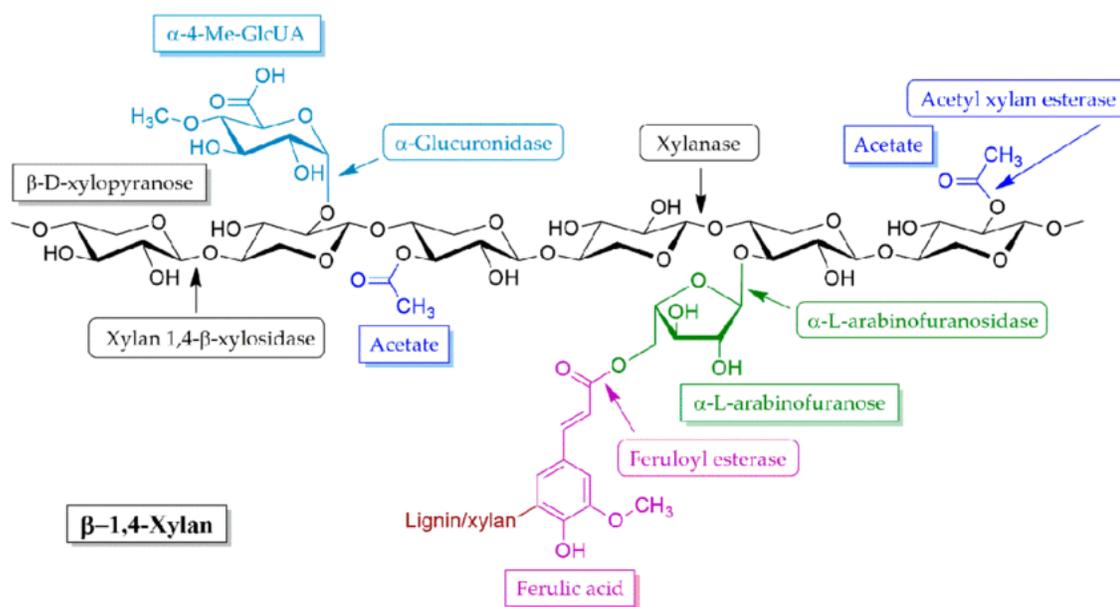


Figura 1.3: Enzimas involucradas en la degradación de xilano [38].

### 1.2.1.5.3. Actividad enzimática conocidas

Existen varios productores de xilanasa, algunos de los más destacados hiperproductores corresponden:

- *Trichoderma reesei*: este hongo filamentoso es uno de los principales productores de xilanasa en la industria. Se utiliza ampliamente en la producción de enzimas debido a su alta capacidad de secreción de proteínas. *Trichoderma reesei* QM 9414 cultivado en bagazo de caña de azúcar obtuvo una actividad enzimática máxima de 6,4 U/ml [39].
- *Aspergillus niger*: otro hongo filamentoso que se destaca por su capacidad para producir grandes cantidades de xilanasa. *Aspergillus niger* es utilizado en la industria para la producción de diversas enzimas y metabolitos. *Aspergillus niger* en salvado de trigo obtuvo una actividad máxima de 49 U/ml [39].

## 1.2.2. Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos son un tipo de hongos que se caracterizan por tener estructuras alargadas y ramificadas llamadas hifas. Estas forman una masa visible llamada micelio. Los hongos filamentosos se conocen comúnmente como mohos y pueden tener diferentes colores, formas y tamaños. Algunos ejemplos de hongos filamentosos son *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Curvularia* [40] [41].

Estos hongos tienen un gran potencial biotecnológico, ya que pueden producir sustancias útiles para la agricultura, la industria, la medicina y el medio ambiente. Por ejemplo, algunos hongos filamentosos pueden actuar como control biológico de plagas y enfermedades de las plantas, otros pueden producir enzimas, antibióticos, pigmentos, vitaminas y otros compuestos de interés. También pueden ser utilizados para la biorremediación de suelos y aguas

contaminadas por metales pesados o compuestos orgánicos [40].

Los hongos filamentosos son la fuente preferida de enzimas industriales debido a su excelente capacidad de producción de proteínas extracelulares [42]. Ellos secretan una amplia variedad y gran cantidad de enzimas que les permiten degradar los desechos orgánicos presentes en la naturaleza a pequeñas moléculas que serán absorbidas y utilizadas como fuente de energía y carbono [43]. Producen carbohidrasas que son enzimas capaces de degradar carbohidratos complejos presentes en hábitats terrestres, carbohidratos como celulosa y hemicelulosa.

La producción de enzimas a partir de estos hongos es sostenible en el tiempo, ya que se pueden utilizar residuos agrícolas, forestales y algas como sustratos de cultivo. La fermentación sumergida de los hongos filamentosos tiene la ventaja de que su producto fermentado puede usarse como un cóctel enzimático para otras industrias.

Para poder producir enzimas de manera sustentable, se utilizan sustratos o fuentes de carbono complejas. De tal manera, es necesario optimizar los microorganismos para que puedan generar estas enzimas de manera que sea comercialmente viable. Se puede modificar genéticamente los microorganismos, pero esto genera una carga metabólica para los monocultivos. Por esta razón, una estrategia viable es la utilización de co-cultivos, estos son diferentes especies de hongos filamentosos que colaboran o interactúan en un entorno particular. Debido a que son distintos hongos, pueden descomponer una amplia variedad de sustratos, aumentando su eficiencia tanto en la descomposición de materia orgánica como en la producción de enzimas, ya que potencian la expresión de varias enzimas [44].

### **1.2.3. Uso de algas marinas como sustrato**

Las algas son organismos fotosintéticos que se encuentran en una variedad de hábitats acuáticos. Algunas especies son unicelulares, como las diatomeas; otras son coloniales, como las algas del orden Volvocales; y otras son pluricelulares, como las algas pardas [45].

En cuanto a su tamaño las podemos dividir en dos grupos: las microalgas, que corresponde a las algas microscópicas y las macroalgas que son todas aquellas que podemos diferenciar a simple vista, sin la necesidad de utilizar un microscopio [46].

Las macroalgas se pueden clasificar en 3 grandes grupos, las algas verdes, las algas pardas y las algas rojas. Todas poseen clorofila y sus colores se deben a la presencia de otros pigmentos [46].

Se ha estimado que existen cerca de 2000 especies de algas pardas, 7000 especies de algas rojas y 8000 especies de algas verdes. La mayoría de las especies de algas pardas y rojas se pueden encontrar en ambientes marinos, en el caso de las algas verdes, la mayoría vive en ambientes de agua dulce (ríos, lagos, etc.) mientras que sólo cerca de 1800 son de ambientes marinos [46].

En Chile se han descrito cerca de 800 especies de macroalgas estando 450 a lo largo de Chile continental, siendo la que más se consume en la mesa la *Durvillaea*, mejor conocida como cochayuyo. [46].

### 1.2.3.1. Características de las algas

Las algas presentan algunas características comunes:

- Son organismos eucariotas y sus células presentan, generalmente, cloroplastos y una pared celular de celulosa y glicoproteínas como las de las plantas.
- Son autótrofas y obtienen su alimento a través del proceso de fotosíntesis. Sin embargo, algunas algas son mixótrofas, es decir, combinan la nutrición autótrofa con la heterótrofa.
- Viven en ambientes acuáticos de agua dulce o salada, siempre en regiones que reciban la luz solar necesaria para que se lleve a cabo la fotosíntesis. Algunas especies establecen una relación simbiótica con hongos y forman líquenes, que pueden encontrarse en todos los ecosistemas terrestres [45].

### 1.2.3.2. Aplicaciones y usos

Las distintas algas poseen amplias aplicaciones en distintas industrias, por ejemplo [47]:

- Alimentación humana: existen alrededor de 200 especies de algas utilizadas para el consumo humano, por ejemplo, el Nori, el Kombu, el Wakame y el Cochayuyo (*Duvallea antarctica*).
- Fertilizantes: las algas han sido utilizadas desde hace siglos como abono y estabilizante del suelo en pueblos costeros.
- Industria cosmética y química: se pueden utilizar productos provenientes de las algas para la fabricación de productos cosméticos y químicos.
- Biocombustibles: algunas especies de algas se utilizan para la producción de biocombustibles. Además, su capacidad para absorber contaminantes orgánicos desde el agua del mar [48].

### 1.2.3.3. Productos de la fermentación de algas

Las algas son fuentes de carbono interesante en procesos de fermentación entre muchas cosas, debido a su crecimiento rápido. Además de los múltiples productos que se obtienen de fermentación de algas, por ejemplo:

- Biomasa: algunas especies de algas tienen tasas de crecimiento extremadamente rápidas en comparación con las plantas terrestres, lo que les permite producir grandes cantidades de biomasa en un corto período de tiempo [49].
- Biocombustibles: pueden ser utilizadas como fuentes de carbono en procesos de fermentación para la producción de biocombustibles, por ejemplo, en la producción de biogás [50].
- Alimentos: se puede utilizar para la elaboración de alimentos como por ejemplo la micoproteína [51].
- Pigmentos: las algas contienen una amplia gama de pigmentos naturales, clorofila, carotenos, xantofilas, antocianinas y las ficobilinas [52] que se pueden extraer mediante fermentación y utilizarse como colorantes en alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos [53].

# Capítulo 2

## Objetivos

### 2.1. Objetivos

El objetivo general de este trabajo se presenta a continuación:

- Caracterizar la actividad de las enzimas con capacidad de degradar celulosa y xilano presentes en los cócteles enzimáticos obtenidas a través de fermentación sumergida de consorcios artificiales de hongos filamentosos y algas pardas como única fuente de carbono.

Con el fin de alcanzar este objetivo, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar la actividad enzimática de endocelulasas y xilanasas a pH 4,5 y 6.
- Evaluar y comparar la actividad enzimática de endocelulasas y xilanasas del crecimiento del consorcio 1 y consorcio 2 cada 24 horas considerando etapa lag y exponencial.

# Capítulo 3

## Estado del arte

### 3.1. Vía de obtención de enzimas

Todas las enzimas pueden ser producidas tanto por animales, plantas o microorganismos como las bacterias, hongos y levaduras.

En cuanto a las enzimas de origen animal, se han obtenido pocas, por ejemplo, lipasa pancreática y tripsina, debido principalmente a la disponibilidad limitada de material adecuado y a la posibilidad de reemplazarlas por enzimas similares derivadas de microorganismos. Las aplicaciones industriales de las enzimas requieren que éstas sean producidas a gran escala y bajo costo, provocando que se prefieran las enzimas de origen microbiano por sobre las enzimas de origen vegetal y animal [54].

Por otro lado, las enzimas vegetales son sustancias que ayudan al cuerpo a digerir adecuadamente los alimentos y absorber los nutrientes. Hay cuatro grupos de enzimas vegetales, y cada uno de ellos es responsable de descomponer un determinado tipo de nutriente. La proteasa es responsable de descomponer las proteínas, la amilasa descompone el azúcar, la lipasa actúa sobre las grasas y la celulasa ayuda a descomponer los carbohidratos [55].

Tanto las enzimas de origen animal como vegetal se obtienen mediante la extracción de tejidos u órganos. Se debe triturar o moler la fuente de donde se desea obtener los enzimas, ya sea de origen vegetal o animal. Luego se debe homogeneizar con algún disolvente o una solución buffer.

Finalmente, las enzimas a partir de microorganismos pueden ser intracelulares o extracelulares. En el caso de las intracelulares es necesario utilizar un método de ruptura celular como sonicación o utilizar un detergente no iónico, después se solubiliza en caso de que se vaya a purificar. Las extracelulares, en cambio son secretadas al medio de cultivo y posteriormente son recolectadas [56].

Luego de recolectar las enzimas, dependiendo de la aplicación es posible purificarlas, esto se hace mediante técnicas de precipitación y cromatografía para separar y purificar las enzimas de los extractos crudos obtenidos. Es posible combinar técnicas con el fin de obtener enzimas con la máxima actividad y pureza posible [57].

Hablando específicamente de celulasa y xilanasas. Ambas se pueden obtener de varios microorganismos, siendo los más reconocidos las bacterias de especies de bacillus [57] [58] y los hongos filamentosos como *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* y *Penicillium funiculosum* [59].

## 3.2. *Durvillaea spp*

*Durvillaea spp* también conocida como cochayuyo es un alga parda comestible rica en yodo que habita en la costa de los mares subantárticos, en Chile, Nueva Zelanda y el océano Atlántico Sur [60].

Se trata de un alga de gran tamaño que puede llegar a alcanzar los 15 metros de longitud. Sus filoides ("hojas"), también llamadas como toda la planta, son de color pardo verdoso cuando están en el mar y pardo rojizo después de secarse, tienen consistencia carnosa y su interior es una estructura de panal que les da gran resistencia para soportar el embate del oleaje. Su tallo es circular y no tiene espacios llenos de aire, su color es verde claro y mide alrededor de un metro de largo hasta el nacimiento del primer filoide. El disco basal o rizoide es una estructura muy fuerte que se adhiere a las rocas en la zona de la rompiente, ya que debe ser capaz de resistir el golpe continuo de las olas sin desprenderse del sustrato [60].

### 3.2.1. Composición

La composición química de las algas puede ser bastante variable y depende de una serie de factores, incluyendo la especie de alga, su hábitat y las condiciones ambientales en las que crece. Sin embargo, se puede hacer un estimado aproximado de los principales macronutrientes que se encuentran en las algas pardas. Estos macronutrientes incluyen la fibra dietética, las cenizas y las proteínas [61].

La fibra dietética es uno de los componentes más destacados de las algas pardas, representando aproximadamente el 56.9 % del peso seco. Esta fibra dietética está compuesta tanto por fibras solubles como por fibras insolubles. Las fibras solubles incluyen los alginatos. Las fibras insolubles, por otro lado, están compuestas principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina [61] [62].

Además de la fibra dietética, las algas pardas también contienen una cantidad significativa de cenizas, que representan alrededor del 20.9 % del peso seco. Las cenizas son los minerales y otros componentes inorgánicos que quedan después de la combustión de la materia orgánica. Estos minerales pueden incluir calcio, magnesio, potasio y otros elementos importantes para la salud [61].

Finalmente, las algas pardas también contienen proteínas, aunque en menor proporción en comparación con la fibra dietética y las cenizas. Las proteínas representan aproximadamente el 8.3 % del peso seco de las algas pardas. Las proteínas son componentes esenciales para el crecimiento y reparación de tejidos en el cuerpo humano, y pueden proporcionar una fuente adicional de nutrientes en la dieta [61].

### 3.2.2. Aplicaciones del alga

Esta conocida alga posee múltiples aplicaciones, por ejemplo:

- Alimentación humana: es ampliamente consumida como alimento en las regiones costeras de Chile y otros países sudamericanos. Es una fuente rica en nutrientes, incluyendo proteínas, fibra, vitaminas y minerales, lo que la convierte en un componente importante de la dieta local [63].
- Cosmética: Los extractos de *Durvillaea spp* se utilizan en la industria cosmética para la producción de productos para el cuidado de la piel y el cabello. Se cree que los compuestos bioactivos presentes en el alga, como los polisacáridos y los antioxidantes, tienen propiedades hidratantes, rejuvenecedoras y regenerativas para la piel y el cabello [64].

### 3.3. Fermentación sumergida con consorcios de hongos filamentosos.

La fermentación sumergida de la cual se extraen las muestras a analizar comienza con la inoculación aséptica de un medio de cultivo estéril que contiene el alga parda *Durvillaea spp.* como fuente de carbono. A lo largo de este trabajo se trabaja con el sobrenadante de la fermentación [65].

Durante la fermentación el consorcio de hongos filamentosos utilizado pasa por un proceso de crecimiento que se puede describir pasando por las siguientes 4 etapas:

1. Etapa de adaptación: los hongos se encuentran en un ambiente nuevo y deben adaptarse a las condiciones específicas.
2. Etapa de crecimiento Exponencial: el micelio se extiende rápidamente. Las hifas crecen y se ramifican, formando una estructura más compleja. El crecimiento es exponencial, ya que cada hifa puede generar nuevas hifas.
3. Etapa de crecimiento Estacionario: a medida que el micelio se expande y se establece, el crecimiento se vuelve más lento. El hongo alcanza un equilibrio entre la ganancia y la pérdida de biomasa.

Estas 4 etapas se pueden apreciar gráficamente en la Figura 3.1.

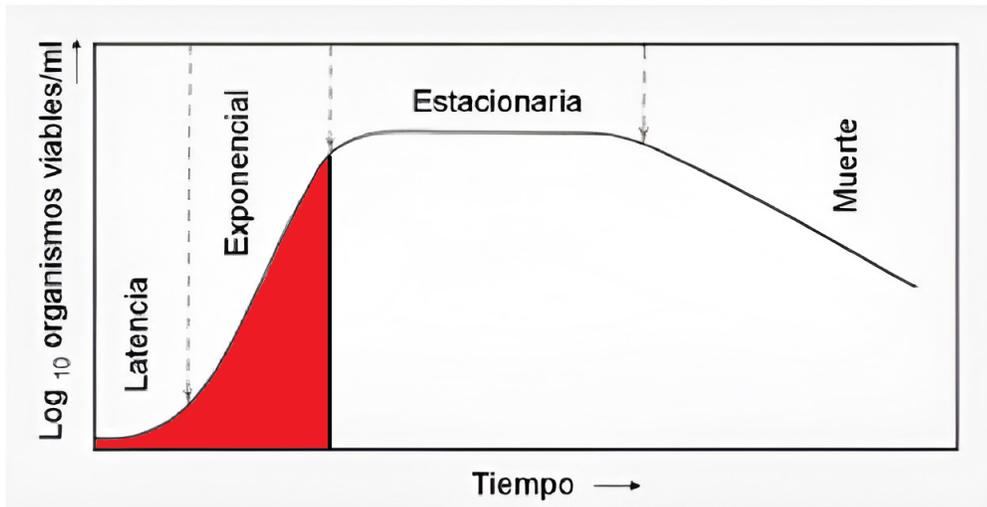


Figura 3.1: Curva típica de crecimiento de microorganismos, la zona destacada es donde se espera haber muestreado [66].

# Capítulo 4

## Materiales y Metodología

En la Figura 4.1 se puede apreciar los pasos seguidos durante este trabajo.

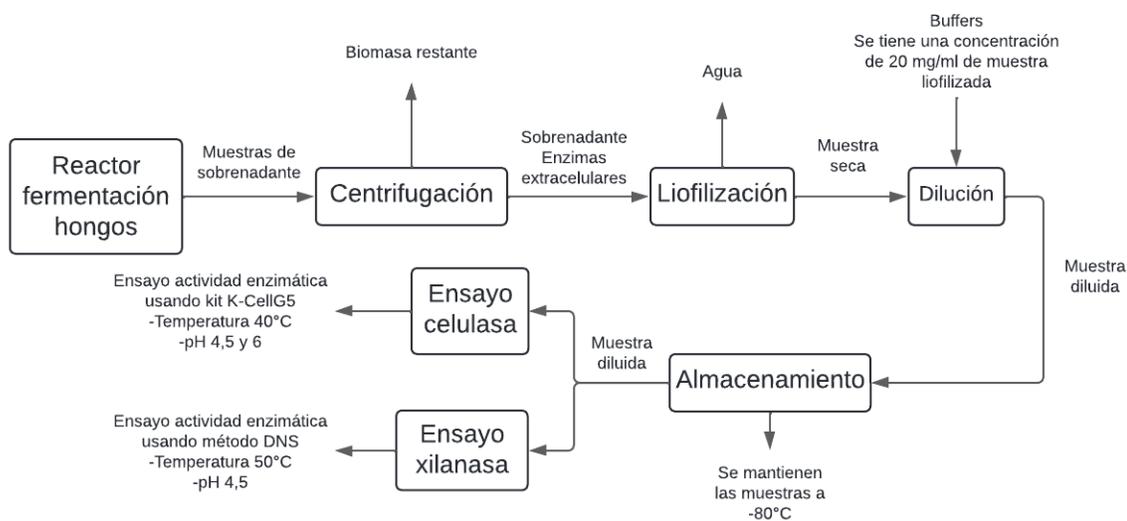


Figura 4.1: Diagrama del trabajo realizado.

### 4.1. Materiales y equipos

#### 4.1.1. Separación, liofilización y almacenamiento de las muestras

Una vez obtenidas todas las muestras, se utilizó una centrifuga a 10 mil rpm por 15 minutos. Luego, se procedió a separar el sobrenadante de la biomasa, para posteriormente emplear un liofilizador modelo MFD-1850M de la marca Mundolab, fabricado en China, para realizar la liofilización de las muestras de sobrenadante obtenidas de las fermentaciones. Para almacenar las muestras diluidas en los buffers se utilizó un congelador de marca Haier a temperatura  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 4.1.2. Kit CellG5

Para la realización de la medición de actividad endocelulasa se utilizó el kit K-cellG5 4V de MEGAZIME. Este kit contiene 3 tipos de viales:

1. 4 viales de 4,6-O-(3-Ketobutilideno)-4-nitrofenil- $\beta$ -D-cellopentaosido (*BPNPG5*) en un 10 % de DMSO/H<sub>2</sub>O (3 ml), además de azida sódica (0,02 % en peso).
2. Un vial con  $\beta$ -glucosidasa termoestable (0,50 ml, 600 U/ml) en una solución de sulfato de amonio al 50 % en peso, además de azida sódica (0,02 % en peso).
3. Solución estándar de celulasas de *Trichoderma* (5 ml, 3 U/ml) en glicerol acuoso al 50 %, más azida sódica (0,02 % en peso).

El reactivo CellG5 se prepara mezclando 100  $\mu$ l del vial 2 con una de las botellas del vial 1.

### 4.1.3. Ensayo Endocelulasa

Para llevar a cabo el ensayo, además de los componentes proporcionados en el kit, se requirió un buffer de acetato de sodio, 100 mM, pH 4,5, con 1 mg/ml de BSA y 0,02 % de azida sódica, así como un buffer de fosfato de sodio, 100 mM, pH 6, con 0,02 % de azida de sodio, junto a un reactivo de parada. También se utilizaron tubos de vidrio de 13 ml, un baño seco modelo HB120-S de la empresa DLAB a 40°C, junto con un termoagitador modelo PCMT de la marca Grant-bio, distribuido por MundoLAB. Las condiciones de medición de absorbancia se describen en la sección correspondiente.

### 4.1.4. Reactivo DNS

Para cuantificar azúcares reductores mediante el método DNS, fue necesario emplear un reactivo que se prepara combinando 3,53 gramos de DNS, 6,6 gramos de NaOH, 472 ml de agua destilada. Posteriormente, se adicionan 102 gramos de tartrato de sodio potasio, 2,53 ml de fenol previamente fundido y 2,77 gramos de metabisulfito de sodio. De este reactivo se utilizó 100  $\mu$ l por muestra.

### 4.1.5. Medición de absorbancia

Se empleó el espectrofotómetro SPECTROstar Omega de BMGLabtech, proveniente de Alemania, para llevar a cabo la medición de absorbancia a una longitud de onda determinada dependiendo del ensayo a realizar. Cada muestra se distribuyó en triplicado en placas de 96 pocillos de Thermo Scientific y se procesó utilizando el software Omegacontrol V. 5,5 R4. Los resultados obtenidos fueron visualizados mediante el software Omega MARS V 3,32 R5 y posteriormente se almacenaron en hojas de cálculo de Excel para su análisis. En el caso de los ensayos de endocelulasa, se utilizó el equipo con una longitud de onda de 400 nm, mientras que para la aplicación del método DNS se empleó la longitud de onda de 550 nm.

### 4.1.6. Elaboración curva de calibración

Para elaborar la curva de calibración de xilosa se utilizó xilosa de marca Merck y CAS 58-86-6. Para realizar el ensayo DNS se utilizaron tubos eppendorf de 1,5 ml y un termoagitador modelo PCMT de la marca Grant-bio para alcanzar los 95°C necesarios.

### **4.1.7. Ensayo de xilanasas**

Para el análisis de xilanasas mediante el método DNS, se empleó xilano de marca Sigma y CAS 9014-63-5 al 1 %, disuelto en los mismos buffers descritos previamente para el ensayo de endocelulasa. También se utilizó el reactivo DNS mencionado anteriormente. La reacción se llevó a cabo en el termociclador “Gene Explorer” de Bioer, con una incubación a 50°C durante 10 minutos. Finalmente, para alcanzar la temperatura requerida de 95°C, se empleó un termoagitador modelo PCMT de la marca Grant-bio, distribuido por MundoLAB, junto con los equipos y software necesarios para medir la absorbancia.

### **4.1.8. Análisis de resultados**

Para analizar los resultados, gestionar las tablas de datos, calcular la actividad enzimática y crear gráficos se utilizó el software *Excel*. Para el análisis estadístico ANOVA y los gráficos resultantes de dicho análisis, se empleó el software *Graphpad Prism 8*.

## **4.2. Metodología**

### **4.2.1. Obtención de muestras**

Cada 24 horas, se extrajeron entre 20 y 25 ml de sobrenadante de la fermentación de hongos filamentosos. Las muestras fueron centrifugadas para completar la separación entre el sobrenadante y la biomasa, y posteriormente, el sobrenadante obtenido fue liofilizado. A continuación, se diluyeron 200 mg de cada muestra en 10 ml de los buffers especificados para el ensayo de endocelulasa. Finalmente, estas muestras diluidas se dividieron en alícuotas de 1 ml en tubos Eppendorf y se almacenaron a -80°C.

### **4.2.2. Medición de actividad endocelulasa**

Existen numerosos métodos disponibles para medir actividad enzimática de endocelulasa, incluyendo aquellos basados en el aumento de los niveles de azúcar reductor en la hidrólisis de CM-celulosa.

En el procedimiento descrito por el Kit CellG5 utilizado [67], se dispensan alícuotas de 0,05 ml de la solución de sustrato CellG5 directamente en el fondo de tubos de vidrio de 13 ml. Luego, se realiza una preincubación de los tubos a 40°C durante aproximadamente 3 minutos en el baño seco. Simultáneamente, las muestras se preincuban a 40°C durante 3 minutos en el termoagitador modelo PCMT.

Posteriormente, se agrega 0,05 ml de las muestras al fondo de cada tubo que contiene la solución CellG5, se agita utilizando un agitador de vortex y se preincuban los tubos a 40°C durante exactamente 10 minutos. Al final de este período, se añaden 1,5 ml de reactivo de parada, se agita el contenido del tubo y se procede a medir la absorbancia de las soluciones de reacción y el blanco del reactivo a 400 nm en comparación con agua destilada.

### **4.2.3. Preparación de curva de calibración del kit**

Para elaborar la curva de calibración, se empleó la celulasa estándar presente en el kit como stock madre, diluida en el buffer de acetato de sodio mencionado anteriormente en una

proporción de 1:20, con una actividad enzimática de 0,15 U/ml. El stock madre se utiliza como un punto de la curva, junto con una muestra blanco que consiste en el mismo buffer. Los otros dos puntos corresponden a diluciones de 2:3 y 1:3 con el mismo buffer. Todas las muestras detalladas siguen el procedimiento de medición de endocelulasa previamente descrito.

Después de agregar el reactivo de parada, se dispensan 0,1 ml de las muestras por triplicado en una placa de 96 pocillos y se mide la absorbancia a una longitud de onda de 400 nanómetros.

#### **4.2.4. Medición de actividad xilanasa**

Para medir la actividad enzimática de xilanasa se utilizó el método DNS, el cual es una técnica colorimétrica que emplea un procedimiento que se basa en una reacción redox que ocurre entre el ácido 3,5-dinitrosalisílico y los azúcares reductores presentes en la muestra, seguido de la determinación espectro fotométrica a 550nm de los azucars reductores [68].

Este método se basa principalmente en la reducción del DNS (de color amarillo) por la glucosa u otro azúcar reductor al ácido 3-amino-5- nitrosalicílico (de color rojo ladrillo), cuya presencia puede detectarse por lectura de la Absorbancia en la zona de 540-600 nm [68].

En el procedimiento, se inicia agregando 20  $\mu$ l de muestra a 80  $\mu$ l de xilano al 1 %, utilizando una placa con 96 pocillos. Posteriormente, se incuba la mezcla durante 10 minutos a 50°C. Luego, se añaden 100  $\mu$ l del reactivo de DNS y se incuba a 95°C durante 5 minutos, seguido de un enfriamiento en hielo durante 5 minutos.

Para medir la absorbancia se toma una alícuota de 100  $\mu$ l de la muestra tratada y se mide la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm. Este proceso permite evaluar la actividad enzimática y cuantificar los azúcares liberados durante la reacción.

#### **4.2.5. Preparación de curva de calibración para azúcares reductores**

Para elaborar la curva de calibración, se preparó un stock madre de 0,1 g de xilosa, que se diluyó inicialmente en 10 ml del buffer de interés. Luego, se realizó otra dilución de 1:10, obteniendo finalmente un stock madre con una concentración de 1 mg/ml. Se incluyó un blanco que correspondió al buffer utilizado, y los demás puntos se generaron mediante una dilución seriada, obteniendo así los puntos de 0,5 mg/ml y 0,25 mg/ml.

El procedimiento seguido con las muestras corresponde al denominado “Medición xilanasa”. Los resultados fueron registrados en una hoja de Excel y posteriormente se graficaron en una curva. Se considera que una curva con un  $R^2$  mayor a 0,99 es adecuada debido a su proximidad a un comportamiento lineal.

# Capítulo 5

## Resultados y discusión

### 5.1. Análisis actividad enzimática endocelulasa

#### 5.1.1. Curva de calibración del kit K-CellG5

Con el fin de estimar con precisión la actividad enzimática de endocelulasa presente en las muestras, fue necesario construir una curva de calibración utilizando el estándar del kit. Esto se debió a que en el protocolo del kit se emplean los 1,6 ml de reacción para medir la absorbancia, a diferencia de los 100  $\mu$ l utilizados en el protocolo seguido para obtener los datos. Este ajuste implicó la necesidad de utilizar un factor diferente para la medición precisa de la actividad enzimática.

Debido a la limitación en la cantidad de ensayos permitidos por el kit y a varios ensayos que no tuvieron éxito por diversas razones mientras se adquiría destreza en el manejo adecuado del kit, se seleccionaron únicamente 4 puntos. Se realizó un triplicado técnico para cada punto y un triplicado en la medición. A cada punto se le restó el valor del blanco, con el objetivo de obtener un gráfico de actividad enzimática versus el delta de absorbancia, simplificando así los cálculos subsiguientes.

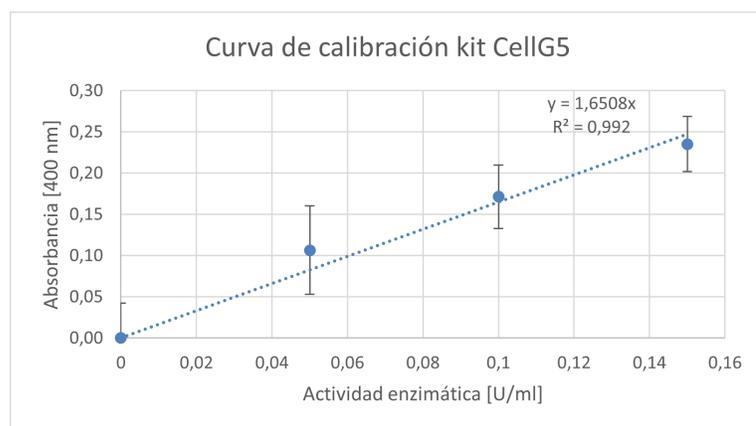


Figura 5.1: Curva de calibración del kit CellG5.

En el Anexo A.1 se presenta la tabla completa de las absorbancias medidas utilizadas para la elaboración de la curva de calibración que se muestra en la Figura 5.1, junto a el

tratamiento de datos que se seguido para obtener la curva.

Se obtuvo un valor de  $R^2$  superior a 0,99, lo cual indica que el ajuste lineal de la curva fue adecuado.

Se tiene por el kit la siguiente ecuación mediante la cual calcular la actividad enzimática:

$$\frac{U}{ml} = \frac{\Delta A_{400}}{\text{Tiempo}} \cdot \frac{\text{Volumen total}}{\text{Alícuota analizada}} \cdot \frac{1}{\epsilon_{mM}} \cdot \frac{\text{Volumen de extracción}}{\text{volumen de muestra}} \cdot \text{Dilución} \quad (5.1)$$

El valor  $\epsilon_{mM}$  corresponde al coeficiente de absorción el cual, según el kit, debería valer 18,1. No obstante, en el mismo kit se presenta la opción de hacer el ensayo de forma automatizada, en cuyo caso el valor  $\epsilon_{mM}$  cambiaría a 12,456, esta variación es debido al cambio en los volumen de medición o el equipo de medición. Debido a la relevancia de ese factor se decidió utilizar un estándar de actividad conocida con el cual obtener el valor  $\epsilon_{mM}$  para cada ensayo.

Como ejemplo, reemplazando en dicha ecuación los parámetros utilizados para la realización de la Figura 5.1, junto con el ajuste lineal de la misma, se puede obtener que  $\epsilon_{mM} = 5,143$ . Los cálculos detallados se encuentran en el Anexo D.1.

### 5.1.2. Cuantificación de la actividad endocelulasa

En las mediciones del ensayo presente en esta y la próxima sección, se añadieron 200  $\mu$ l por triplicado a la placa de 96 pocillos, modificando el factor  $\epsilon_{nM}$  previamente calculado, siendo aproximadamente el doble de este. Para mejorar la confiabilidad en el cálculo de la actividad enzimática de las muestras, se optó por realizar una curva de dos puntos utilizando el blanco y el punto de actividad enzimática a 0,15 U/ml para cada conjunto de muestras. Luego, considerando que cada muestra liofilizada esta diluida en una concentración de 0,02 g/ml, se puede obtener la actividad enzimática en U/g de muestra liofilizada. Los datos obtenidos se encuentran en el Anexo A.2, los resultados del análisis ANOVA en el Anexo B.1 y el procedimiento seguido en el Anexo D.2.

#### 5.1.2.1. Ensayo de la actividad de endocelulasa a pH 4,5

De la Figura 5.2 se observa que, durante la fermentación de ambos consorcios, la actividad enzimática aumenta a medida que transcurre el tiempo, partiendo con una actividad enzimática de endocelulasa de alrededor de 0,25 U/g y alcanzando a poco más de 0,4 U/g con la muestra obtenida a las 96 horas de fermentación. Solo se observa una posible diferencia significativa a las horas 24 y 96.

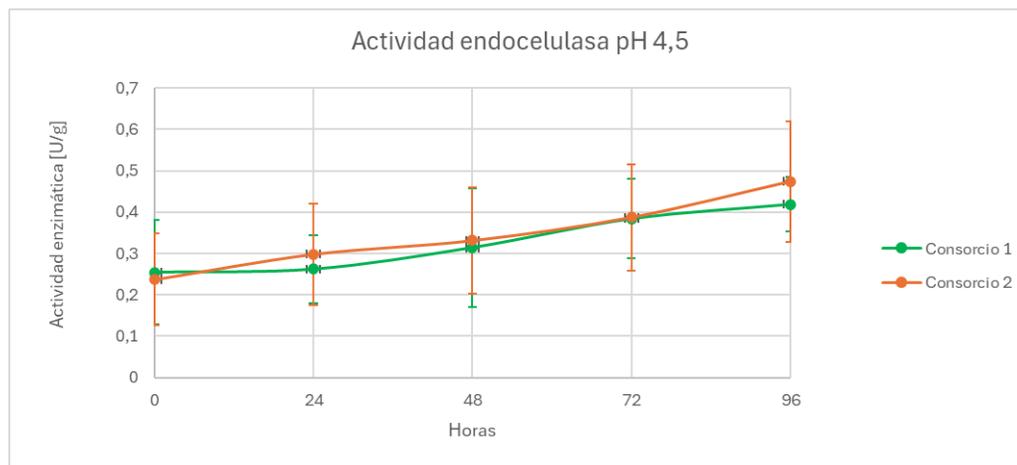


Figura 5.2: Comparación actividad enzimática de endocelulasa U/g de muestra liofilizada en los distintos momentos de la fermentación de los consorcios 1 y 2 en un ensayo a pH 4,5 a 40°C.

Se realizó un estudio estadístico con intención de descubrir si existen diferencias significativas al comparar la actividad enzimática de endocelulasa de ambos consorcios a pH 4,5 y del cual se obtiene la Figura 5.3. De la figura se puede obtener que no poseen diferencias significativas de actividad enzimática de endocelulasa según el test de Sídák.

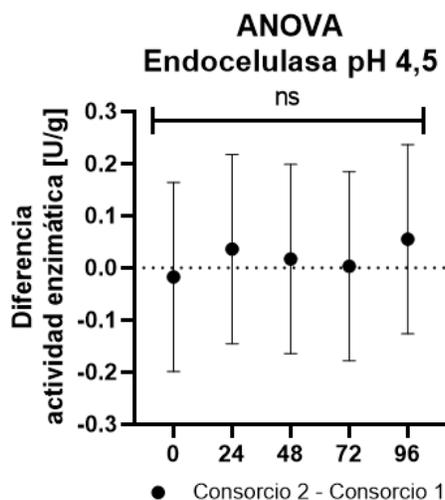


Figura 5.3: ANOVA para la búsqueda de diferencias significativas, ns significa que no hay una diferencia significativa de actividad enzimática de endocelulasa entre los consorcios 1 y 2 en un ensayo a pH 4,5.

#### 5.1.2.2. Ensayo de la actividad de endocelulasa a pH 6

De la Figura 5.4 se desprende que la actividad enzimática de ambos consorcios aumenta constantemente, partiendo con una actividad enzimática de endocelulasa de alrededor de 0,15 U/g de muestra liofilizada hasta llegar a ser poco más de 0,5 U/g de muestra liofilizada.

Además, se observa en la misma figura, un aumento abrupto a las 24 horas para el consorcio 2, este aumento abrupto podría indicar que el consorcio no requiere un gran tiempo

para adaptarse al medio, quedando la incógnita de por qué a las 48 horas parece establecerse o disminuir para luego volver a aumentar. También, se observa que el consorcio 2 exhibe una mayor actividad que el consorcio 1 y muestra un aumento mucho más pronunciado en las primeras 24 horas en comparación con el consorcio 1. Esto último requiere de un análisis estadístico para confirmar que la diferencia sea significativa.

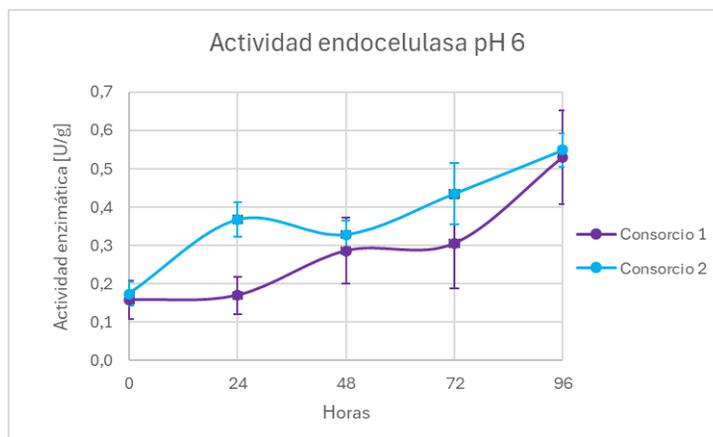


Figura 5.4: Comparación actividad enzimática de endocelulasa U/g de muestra liofilizada en los distintos momentos de la fermentación de los consorcios 1 y 2 en un ensayo a pH 6 a 40°C.

Del estudio estadístico ANOVA realizado para estos resultados y de la Figura 5.5 donde se grafica la diferencia de actividad enzimática entre los consorcios se aprecia que en las muestras obtenidas a las horas 24 y 72 existe una diferencia significativa entre ambos consorcios, siendo la actividad mayor en el consorcio 2.

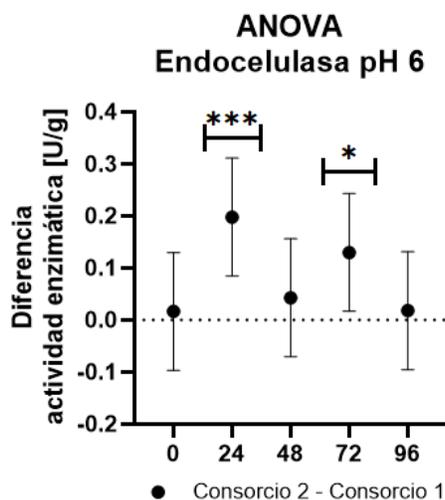


Figura 5.5: ANOVA para la búsqueda de diferencias significativas. Una mayor diferencia se representa con mayor cantidad de \* y la ausencia de \* significa que no hay una diferencia significativa de actividad enzimática de endocelulasa entre los consorcios 1 y 2 en un ensayo a pH 6.

### 5.1.2.3. Ensayo de la actividad de endocelulasa del Consorcio 1

En la Figura 5.6 se observa que en el caso del consorcio 1 el comportamiento a ambos pH aumenta constante. Además, es apreciable el abrupto aumento a las 48 y 96 horas a pH 6. Además, pareciera que el consorcio 1 presenta mayor actividad a pH 4,5, con la excepción de la hora 96 donde a pH 6 hay una mayor actividad, es por eso que es necesario realizar un análisis estadístico de forma de confirmar una diferencia significativa.

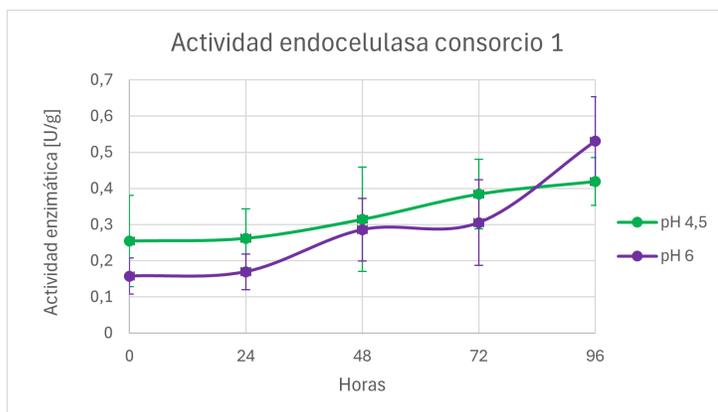


Figura 5.6: Comparación actividad enzimática de endocelulasa U/g de muestra liofilizada en los distintos momentos de la fermentación del consorcio 1 en ensayos a pH 4,5 y 6 a 40°C.

En la Figura 5.7 se puede apreciar que realmente no hay una diferencia significativa en ninguno de los puntos. Debido a esto, es posible suponer que el pH óptimo para la actividad enzimática de endocelulasa del consorcio 1 podría encontrarse en un pH entre los estudiados.

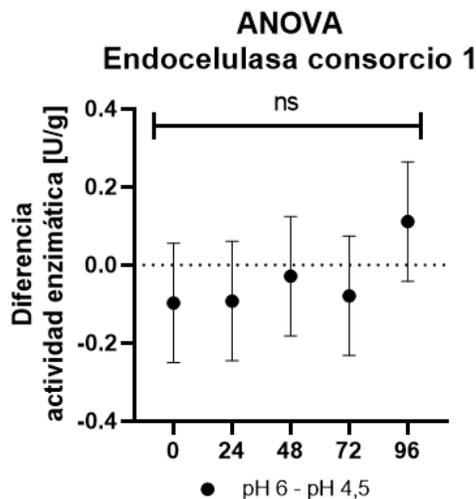


Figura 5.7: ANOVA para la búsqueda de diferencias significativas, ns significa que no hay una diferencia significativa de actividad endocelulasa en ensayos a pH 4,5 y 6 para el consorcio 1.

#### 5.1.2.4. Ensayo de la actividad de endocelulasa del Consorcio 2

En la Figura 5.8, se puede observar que, a excepción del punto de partida, la actividad enzimática del consorcio 2 pareciera ser mayor a pH 6, esto se confirmara o no gracias a un análisis estadístico. El comportamiento a ambos pH después de las 48 horas es similar, ya que aumenta con el tiempo, pero tiene una pendiente mayor a pH 6. La imagen destaca el punto de las 24 horas a pH 6, ya que rompe el comportamiento de aumento que podría parecer lineal. Esto solo aumenta la incógnita de por qué ese punto parece sobresalir del resto.

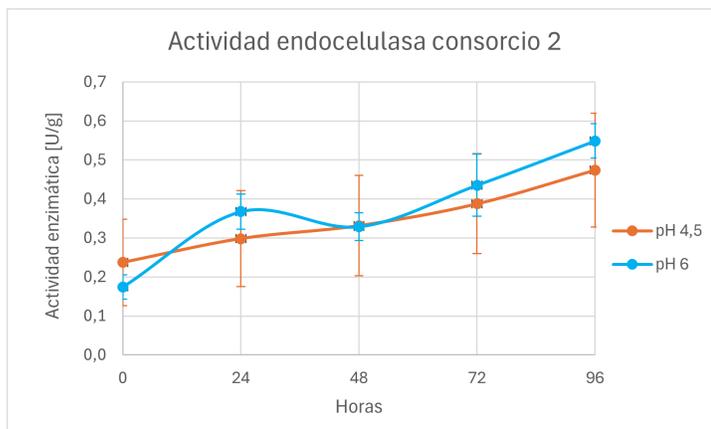


Figura 5.8: Comparación actividad enzimática de endocelulasa U/g de muestra liofilizada en los distintos momentos de la fermentación del consorcio 2 en ensayos a pH 4,5 y 6 a 40°C.

Del análisis ANOVA realizado y de la Figura 5.9 se obtiene que realmente no hay una diferencia significativa entre ambos pH. Esto deja suponer que el pH óptimo de esta enzima se encuentra en el intervalo entre los pHs estudiados.

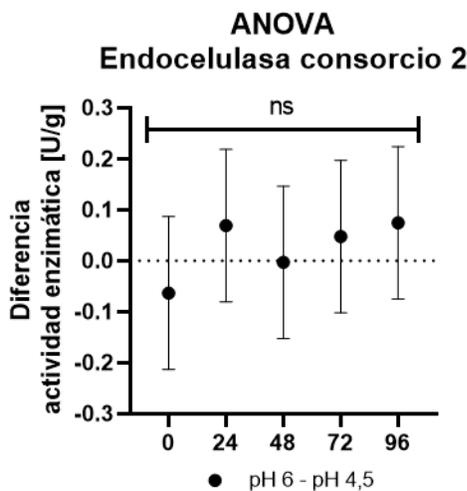


Figura 5.9: ANOVA para la búsqueda de diferencias significativas, ns significa que no hay una diferencia significativa de actividad endocelulasa en ensayos a pH 4,5 y 6 para el consorcio 2.

## 5.2. Análisis de actividad enzimática xilanasa

### 5.2.1. Curva de calibración del método DNS con xilosa a distintos pHs

Para estimar la actividad enzimática de enzimas como xilanasa utilizando el método DNS es fundamental conocer la cantidad de azúcares reductores libres presentes después de la reacción entre el sustrato y la enzima. Por esta razón, es necesario llevar a cabo una curva de calibración que demuestre la relación entre la concentración de estos azúcares y la absorbancia medida. Se ha decidido realizar las curvas con los dos buffers utilizados durante los ensayos, con el objetivo de que la estimación sea lo más precisa posible. Se llevó a cabo un triplicado de cada punto de la curva en la placa de medición de absorbancia.

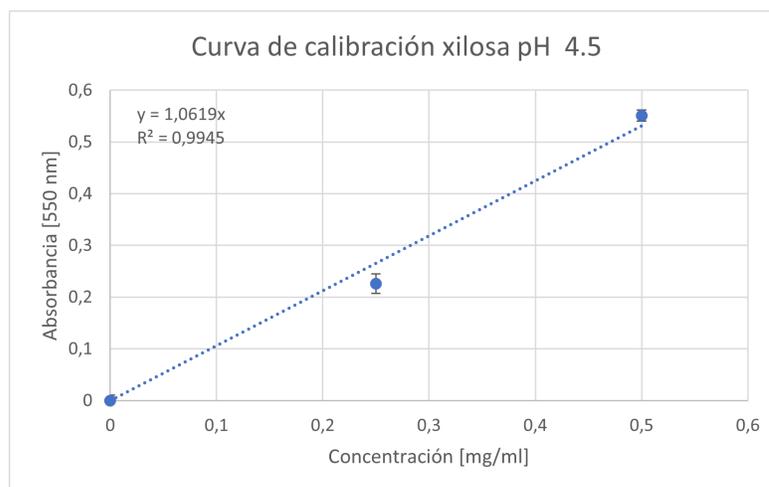


Figura 5.10: Curva de calibración de xilosa diluida a pH 4,5 (Buffer Acetato de sodio 100 mM con 1 mg/ml de BSA y 0,02 % de azida sódica).

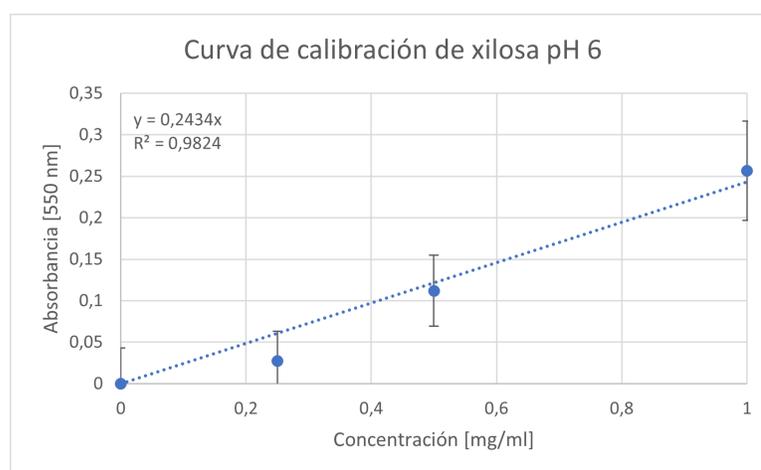


Figura 5.11: Curva de calibración de xilosa diluida a pH 6 (Buffer Fosfato de sodio 100 mM con 0,02 % de azida de sodio).

Ambos gráficos presentan un  $R^2$  superior a 0,98 teniendo un ajuste lineal apropiado. Se

observa que la curva presente en la figure 5.10 se ajusta más al comportamiento lineal que la curva de la Figura 5.11. Además, se ve que a pH 6 los valores poseen una mayor desviación estándar.

Se observa que la pendiente en la Figura 5.10 es más de cuatro veces mayor que la pendiente en la Figura 5.11. Esto indica una mayor sensibilidad del método utilizado con el buffer Acetato en comparación con el Fosfato. Esta mayor pendiente permite detectar variaciones más sutiles, lo que facilita diferenciar concentraciones cercanas con mayor precisión. Sin embargo, una pendiente muy alta podría provocar problemas de saturación, siendo necesario diluir las muestras hasta alcanzar el rango correcto de medición.

### **5.2.2. Análisis de Azúcares reductores basales en el medio**

Se llevó a cabo un ensayo DNS para estimar la concentración de azúcares reductores libres en las muestras de sobrenadante obtenidas de las dos fermentaciones. Este procedimiento se realizó siguiendo el protocolo descrito en la sección de Metodología, con la diferencia de que en lugar de agregar xilano al 1 %, se añadió la misma cantidad del buffer correspondiente. Cada muestra se dispuso por triplicado en la placa de 96 pocillos. La tabla completa de las absorbancias se encuentra en el Anexo A.4, los resultados del análisis ANOVA en Anexo B.2 y un ejemplo del tratamiento de datos en Anexo D.3.

Es relevante señalar que las muestras tienen una concentración total de 20 mg de muestra liofilizada por ml.

### **5.2.3. Análisis de azúcares reductores en las muestras liofilizadas**

Ya que las muestras fueron tomadas durante el crecimiento de un consorcio de hongos filamentosos utilizando alga *Durvillaea spp.* como única fuente de carbono es posible que en las muestras obtenidas haya azúcares reductores libres como resultado del proceso de fermentación llevado a cabo por los hongos al degradar el alga.

Debido a que el método DNS se utiliza para cuantificar la cantidad de azúcares reductores en la muestra, es importante tener en cuenta la cantidad de azúcares reductores presentes debido a la fermentación. Esto permite excluir estos azúcares basales al calcular la actividad enzimática específica de la xilanasas.

#### **5.2.3.1. Comparación azúcares reductores del consorcio 1 y 2 a un mismo pH**

Esta sección compara la concentración de azúcares reductores en distintos momentos de la fermentación de los consorcios 1 y 2 a un mismo pH. Se comparan ambos consorcios a pH 4,5 y luego a pH 6.

De la Figura 5.12 se nota que el comportamiento a través de los días pareciera no tener diferencias significativas salvo a las 96 horas. Además, se aprecia que a las 48 horas la cantidad de azúcares liberados medidos del consorcio 1 llega a aproximadamente 1,15 mg/ml siendo más de 10 veces los aproximadamente 0,08 mg/ml del comienzo. Por otro lado, para el consorcio 2, a las 48 horas la cantidad de azúcares reductores medidos llegaron a ser aproximadamente 0,95 mg/ml siendo más de 6 veces los aproximadamente 0,16 mg/ml iniciales.

Esto podría indicar una mayor actividad enzimática de parte del consorcio 1 o que el consorcio 2 consume los azúcares liberados con mayor rapidez.

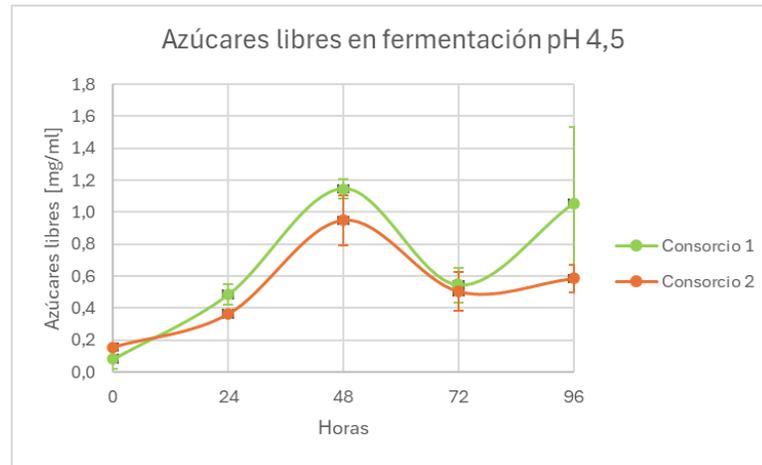


Figura 5.12: Comparación de la concentración en mg/ml de azúcares reductores en los distintos momentos de la fermentación de los consorcios 1 y 2 en un ensayo a pH 4,5, medido mediante método DNS.

De las Figura 5.13 se observa que el único punto donde existe una diferencia significativa a la hora de comparar los consorcios a pH 4,5 es a la hora 96 donde hay una mayor concentración de azucares libres en el consorcio 1.

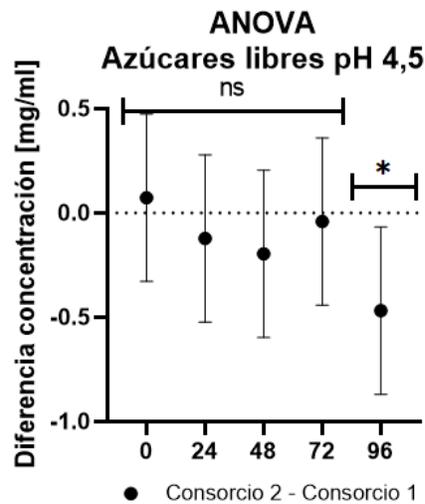


Figura 5.13: ANOVA para la búsqueda de diferencias significativas. Una mayor diferencia se representa con mayor cantidad de \* y ns significa que no hay una diferencia significativa de concentración de azúcares reductores entre los consorcios 1 y 2 en un ensayo a pH 4,5.

De la Figura 5.14 se observa un aumento a las 48 horas al igual que a pH 4,5. Esta vez, el consorcio 1 llega a aproximadamente 0,96 mg/ml de azúcares reductores después de comenzar

con aproximadamente 0,43 mg/ml siendo el doble de lo inicial. Por otro lado, el consorcio 2 llegó a aproximadamente 0,76 mg/ml después de comenzar con 0,27 mg/ml.

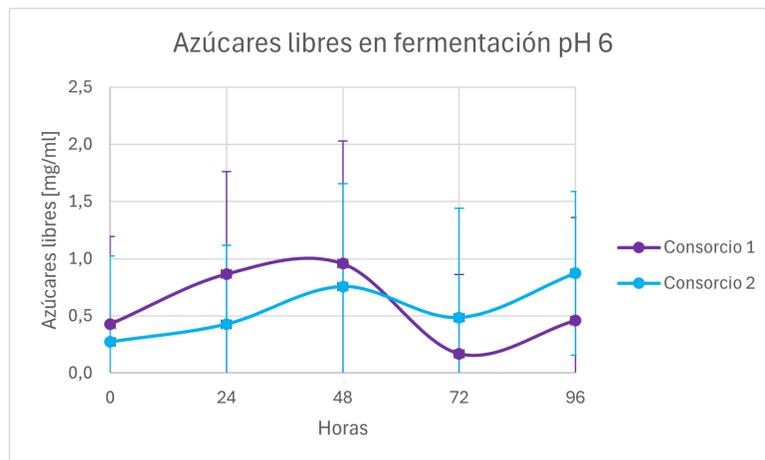


Figura 5.14: Comparación de la concentración en mg/ml de azúcares reductores en los distintos momentos de la fermentación de los consorcios 1 y 2 en un ensayo a pH 6, medido mediante método DNS.

se realizó un análisis ANOVA de forma de confirmar que no haya alguna diferencia significativa, de la Figura 5.15 se puede concluir que no existe una diferencia significativa de concentración de azúcares reductores entre los consorcios a pH 6.

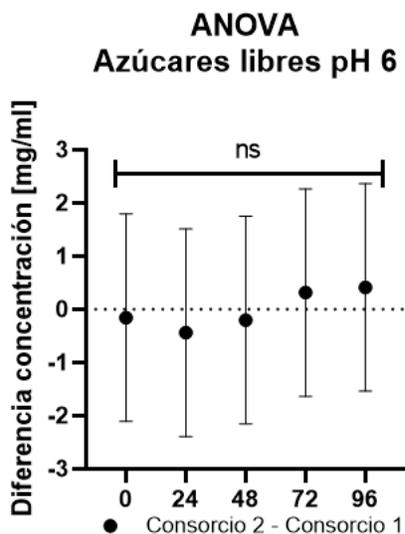


Figura 5.15: ANOVA para la búsqueda de diferencias significativas, ns significa que no hay una diferencia significativa de concentración de azúcares reductores entre los consorcios 1 y 2 en un ensayo a pH 6.

Para ambos consorcios y a ambos pHs que la concentración sea baja a la hora 0 tiene sentido, ya que la fermentación tiene el alga como única fuente de carbono, por lo que no hay azúcares extras liberados en el medio, por lo que el incremento en los dos días siguiente puede deberse a que los hongos filamentosos están en proceso de degradar el alga llegando

al punto de mayor concentración de azúcares reductores medidos a las 48 horas, luego de eso comienza una bajada que puede deberse a la utilización de estos azúcares liberados para los procesos metabólicos de los hongos. El aumento en las 96 horas en ambas figuras podría ser porque los hongos se adaptaron al nuevo sustrato y que algunos liberen productos que otros consumen o que los hongos se saturaron y no son capaces de utilizar en su totalidad los azúcares liberados.

#### 5.2.4. Comparación azúcares reductores en ensayos a pH 4,5 y 6 para los consorcio 1 y 2.

Esta sección compara los azúcares reductores medidos en diferentes momentos de la fermentación de los consorcios en ensayos realizados a pH 4,5 y 6. Se compara el consorcio 1 en ambos pH y luego el consorcio 2 en ambos pH. En la Figura 5.16 se ve que pareciera no haber diferencias significativas de concentración de azúcares reductores libres en ensayos a distinto pH para el consorcio 1. El gráfico se puede dividir en dos, en las primeras 48 horas a pH 6 hay una mayor concentración de azúcares libres y en las 48 horas finales hay un aumento de los azúcares libres medidos a pH 4,5. Es necesario un análisis estadístico para conocer si existe alguna diferencia significativa entre pHs.

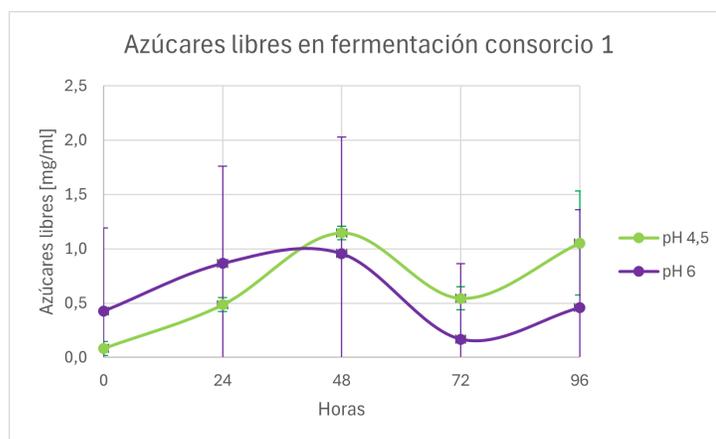


Figura 5.16: Comparación de la concentración en mg/ml de azúcares reductores en los distintos momentos de la fermentación del consorcio 1 en ensayos a pH 4,5 y 6, medido mediante método DNS.

En la Figura 5.17 se aprecia que no hay diferencias significativas de la concentración de azúcares reductores del consorcio 1 para ensayos a pH 4,5 y 6.

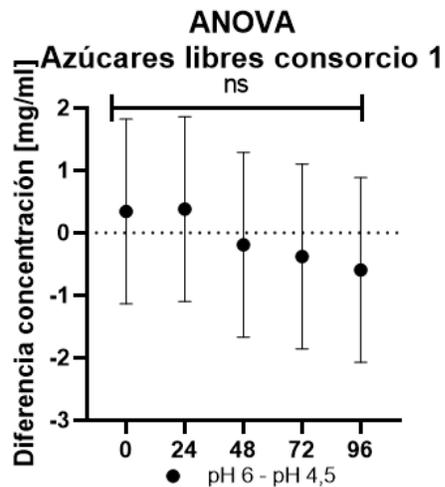


Figura 5.17: ANOVA para la búsqueda de diferencias significativas, ns significa que no hay una diferencia significativa de concentración de azúcares reductores del consorcio 1 en ensayos a pH 4,5 y 6.

Por otro lado, en la Figura 5.18 nuevamente se ve que el comportamiento es similar a ambos pHs, también se observa que la desviación estándar de los datos a pH 6 es mucho mayor a la de los datos a pH 4,5. Pareciera que podría haber una diferencia significativa en los puntos 0, 48 y 96 horas, por lo que es necesario un análisis estadístico para confirmar.

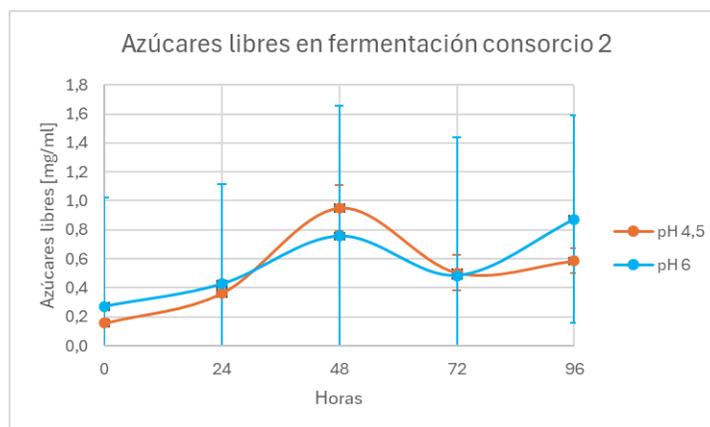


Figura 5.18: Comparación de la concentración en mg/ml de azúcares reductores en los distintos momentos de la fermentación del consorcio 2 en ensayos a pH 4,5 y 6, medido mediante método DNS.

En la Figura 5.19 se aprecia que no hay diferencias significativas de la concentración de azúcares reductores del consorcio 2 para ensayos a pH 4,5 y 6.

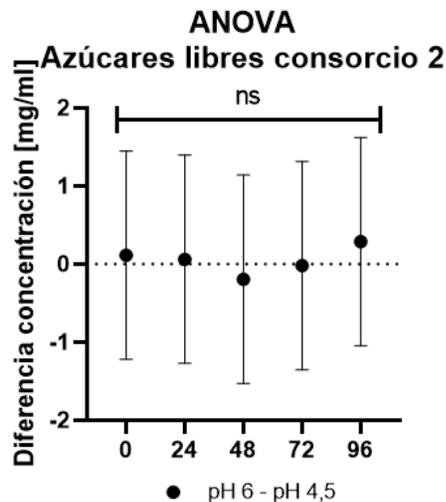


Figura 5.19: ANOVA para la búsqueda de diferencias significativas, ns significa que no hay una diferencia significativa de concentración de azúcares reductores en el consorcio 2 en ensayos a pH 4,5 y 6.

Para ambos consorcios se obtiene que la concentración de azúcares reductores no posee una diferencia significativa a distintos pHs.

## 5.2.5. Cuantificación de la actividad xilanasa

Después de la realización de los ensayos utilizando el buffer fosfato de sodio 100 mM pH 6 con 0,02% azida sódica se observó que los resultados poseían un comportamiento extraño, por lo que se repitieron los ensayos, esta vez utilizando un buffer Acetato de sodio 50mM pH 6, los resultados presentados a continuación fueron los obtenidos con este nuevo buffer.

Los resultados con el buffer fosfato de sodio 100 mM pH 6 con 0,02% de azida sódica se encuentran en el Anexo C junto a los valores de absorbancia obtenidos con el procesamiento de los mismos datos. Las tablas con los datos utilizados en esta sección se encuentran en el Anexo A.5, los resultados del análisis ANOVA en Anexo B.3 y un ejemplo del procedimiento seguido está en Anexo D.4

### 5.2.5.1. Ensayo de la actividad de xilanasa a pH 4,5

En la Figura 5.20 podemos ver que el consorcio 1 posee un comportamiento casi estático, se aprecia un aumento a las 24 horas que luego se estabiliza hasta las 72 horas y luego decae llegando a dar un valor negativo que puede explicarse mediante la gran desviación estándar que presentan las muestras. Por otro lado, el consorcio 2 pareciera tener una gran actividad enzimática desde el comienzo la cual fuera del comportamiento esperado disminuye llegando al punto de menor actividad a las 72 horas, para luego volver a aumentar. Causa interés los altos valores de desviaciones estándar que tienen ambos consorcios, esto implica que los datos no son muy fiables.

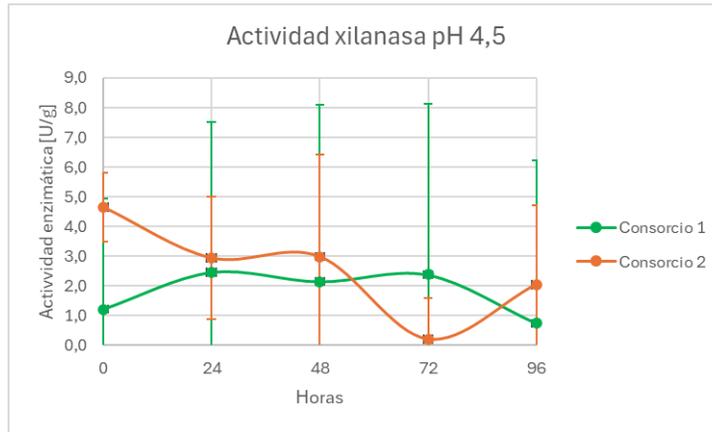


Figura 5.20: Comparación actividad enzimática de xilanasa U/g de muestra liofilizada en los distintos momentos de la fermentación de los consorcios 1 y 2 en un ensayo a pH 4,5 a 50°C.

De todas formas, se realizó un análisis estadístico para comparar ambos consorcios y encontrar las diferencias significativas. En la Figura 5.21 se ve graficado que no se encuentra una diferencia significativa, no obstante, es importante mencionar que debido a que la variación de los datos este análisis es tan grande es posible asumir que el análisis podría estar erróneo.

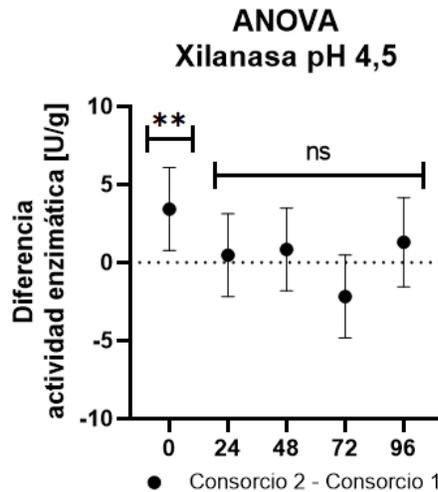


Figura 5.21: ANOVA para la búsqueda de diferencias significativas. Una mayor diferencia se representa con mayor cantidad de \* y ns significa que no hay diferencia significativa de actividad enzimática de xilanasa entre los consorcios 1 y 2 en un ensayo a pH 4,5.

### 5.2.5.2. Ensayo de la actividad de xilanasa pH 6

De la Figura 5.22 podemos obtener que el comportamiento a lo largo del tiempo para ambos consorcios es bastante similar salvo que la actividad es mucho mayor para el consorcio 2, llegando a su peak de actividad a las 24 horas con aproximadamente 9,7 U/g a diferencia del consorcio 1 que posee su peak a las 96 horas con aproximadamente 6,3 U/g. En ambos casos se ve un aumento a las 24 horas para luego disminuir hasta las 72 horas para volver a aumentar a las 96. Llama la atención que la muestra inicial del consorcio 2 se encuentra

siendo un valor negativo, esto se puede explicar con la desviación de los datos.

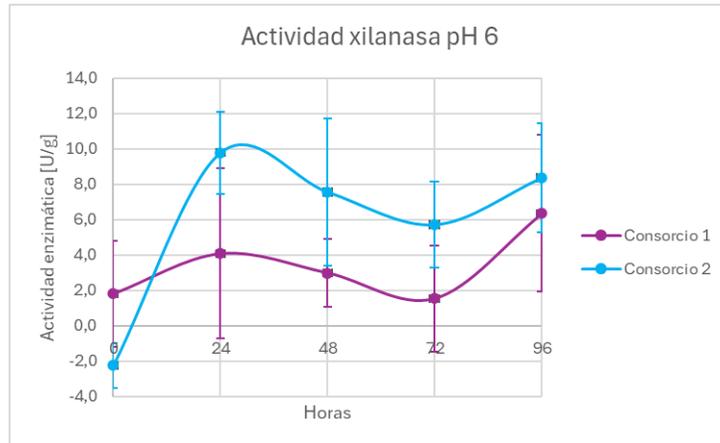


Figura 5.22: Comparación actividad enzimática de xilanasa U/g de muestra liofilizada en los distintos momentos de la fermentación de los consorcios 1 y 2 en un ensayo a pH 6 a 50°C.

Debido a la gran diferencia que se aprecia entre ambos consorcios, es necesario realizar un análisis estadístico para confirmar la diferencia. En la Figura 5.15 se aprecia que efectivamente existe una diferencia significativa entre los consorcios, existiendo mayor actividad en el consorcio 2, siendo mayor la diferencia entre las 24 y 72 horas. Salvo a la hora 0 donde existe una diferencia significativa en la que el consorcio 1 posee mayor actividad xilanasa.

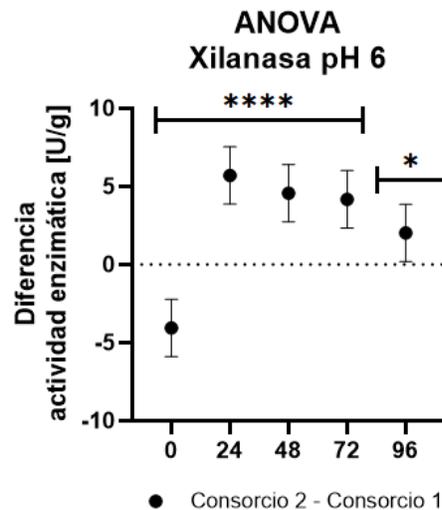


Figura 5.23: ANOVA para la búsqueda de diferencias significativas. Una mayor cantidad de \* representa una mayor diferencia significativa de actividad enzimática de xilanasa entre los consorcios 1 y 2 en un ensayo a pH 6

### 5.2.5.3. Ensayo de la actividad de xilanasa del consorcio 1

Es importante también analizar cómo cambia la actividad enzimática de un consorcio dependiendo de su pH, en el caso del consorcio 1 y de la Figura 5.24 pareciera que el pH no afecta la actividad enzimática del consorcio.

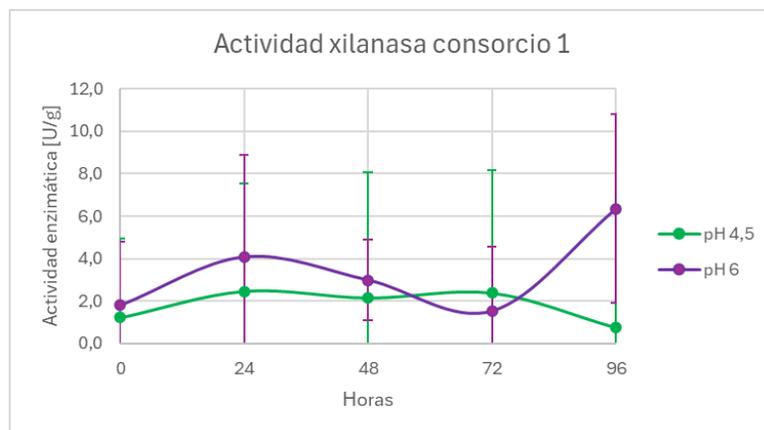


Figura 5.24: Comparación actividad enzimática de xilanasa U/g de muestra liofilizada en los distintos momentos de la fermentación del consorcio 1 en ensayos a pH 4,5 y 6 a 50°C.

Para confirmar la existencia de diferencias significativas se realiza el análisis ANOVA y obteniendo la Figura 5.17 donde se obtiene que la única diferencia significativa es en la hora 96 donde a pH 6 hay una mayor actividad enzimática.

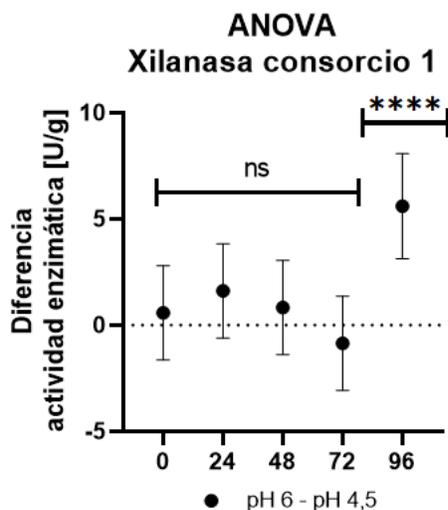


Figura 5.25: ANOVA para la búsqueda de diferencias significativas. Una mayor diferencia se representa con mayor cantidad de \* y ns significa que no hay una diferencia significativa de actividad xilanasa en ensayos a pH 4,5 y 6 para el consorcio 1.

#### 5.2.5.4. Ensayo de la actividad de xilanasa del consorcio 2

Comparando el consorcio 2 a distintos pH se observa que este posee mayor actividad enzimática a pH 6 que a pH 4,5 y que sin considerar el punto 0, a ambos pH posee un comportamiento similar, aumentando en las primeras 24 horas, para luego disminuir hasta las 72 horas y luego volver a aumentar.

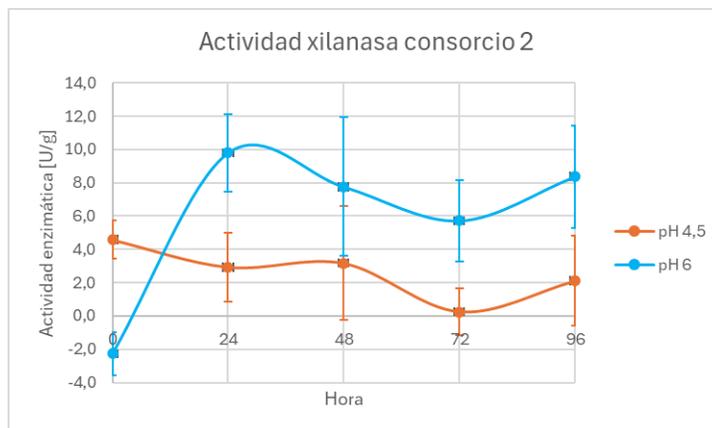


Figura 5.26: Comparación actividad enzimática de xilanasa U/g de muestra liofilizada en los distintos momentos de la fermentación del consorcio 2 en ensayos a pH 4,5 y 6 a 50°C.

Para confirmar las diferencias significativas vistas en la Figura anterior, se realizó un análisis estadístico y se observa la diferencia entre ambos pH, teniendo la Figura 5.23 donde se puede interpretar que salvo la hora 0 existe una diferencia significativa entre ambos pHs, siendo la actividad enzimática superior a pH 6. En caso de la hora 0 también hay una diferencia significativa de actividad enzimática de xilanasa, pero esta vez se registra mayor actividad en el ensayo a pH 4,5.

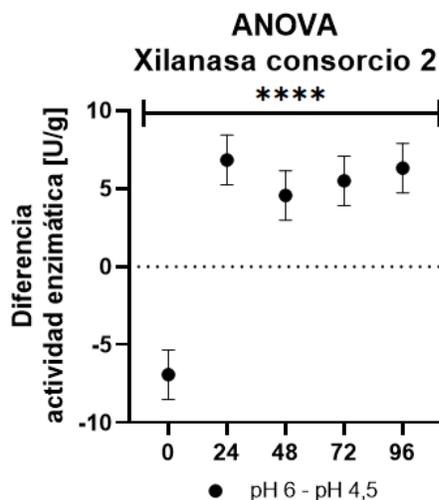


Figura 5.27: ANOVA a búsqueda de diferencias significativas. Una mayor diferencia se representa con mayor cantidad de \* y la ausencia de \* significa que no hay una diferencia significativa de actividad enzimática de xilanasa en ensayos a pH 4,5 y 6 para el consorcio 2.

# Capítulo 6

## Conclusiones

En conclusión, este estudio logró alcanzar los objetivos específicos establecidos, centrándose en la evaluación de la actividad enzimática de la endocelulasa y la xilanasa a diferentes pHs y momentos del crecimiento de consorcios de hongos filamentosos. Además, se cumplió el objetivo general de caracterizar parcialmente cócteles enzimáticos obtenidos de fermentación sumergida de estos consorcios.

Al examinar la producción de endocelulasa, se observó que para ambos consorcios el pH del ensayo no afectó la actividad enzimática medida de los consorcios, por lo que se sugiere realizar un ensayo a un pH intermedio de forma de encontrar el pH óptimo de la enzima producida por cada consorcio. Por otro lado, es importante destacar que a pH 6, el consorcio 2 mostró una actividad enzimática significativamente mayor que la obtenida por el consorcio 1 a las 24 y 72 horas.

En cuanto a la producción de xilanasa, se observó que para el consorcio 1 se obtuvo en general que no hay diferencia significativa de actividad enzimática xilanasa entre los pHs. Por otro lado, el consorcio 2 muestra diferencias significativas y una mayor actividad enzimática a pH 6 salvo a las 0 horas donde a pH 4,5 hay mayor actividad. Esto indica que este consorcio puede tener un pH óptimo de actividad enzimática de xilanasa más cercano a 6. Además, se aprecia que a pH 4,5 ambos consorcios en general no poseen diferencias significativas de actividad xilanasa y que a pH 6 en general el consorcio 2 posee mayor actividad que el consorcio 1. Estos resultados resaltan la importancia de considerar la realización de más ensayos a distintos pH para determinar el pH óptimo de las enzimas.

El análisis de azúcares reductores libres durante la fermentación de los consorcios reveló un patrón consistente en la liberación de azúcares reductores a lo largo del tiempo. Se observó un aumento en la concentración de azúcares libres en el sobrenadante del cultivo a medida que los hongos degradaban la fuente de carbono disponible (24 horas), seguido de una disminución a medida que los azúcares eran utilizados en las rutas metabólicas de los hongos (hasta las 72 horas).

Se sugiere utilizar kits específicos para medir la actividad enzimática de la xilanasa. Asimismo, se sugiere explorar una gama más amplia de condiciones de pH y realizar ensayos a distintas temperaturas para conocer mejor las condiciones óptimas de operación de las enzimas estudiadas.

# Bibliografía

- [1] United Nations. Población | Naciones Unidas. <https://www.un.org/es/global-issues/population>
- [2] Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. (2023, 12 mayo). Enzimas alimentarias. <https://www.efsa.europa.eu/es/topics/topic/food-enzymes>
- [3] nutricion@capsa.es. (2022, 12 mayo). La presencia de las enzimas en los alimentos y su importancia | Nutrición y salud. Nutrición y salud. <https://www.centrallecheraasturiana.es/nutricionysalud/actualidad/la-presencia-de-las-enzimas-en-nuestra-alimentacion/>
- [4] Singh, R., Langyan, S., Rohtagi, B., Darjee, S., Khandelwal, A., Shrivastava, M., Kothari, R., Mohan, H., Raina, S., Kaur, J., & Singh, A. (2022). Production of bio-fuels options by contribution of effective and suitable enzymes: technological developments and challenges. *Materials Science for Energy Technologies*, 5, 294-310. <https://doi.org/10.1016/j.mset.2022.05.001>
- [5] Mercado de Enzimas Industriales Insights. <https://www.mordorintelligence.com/es/industry-reports/industrial-enzymes-market>
- [6] Enzima | NHGRI. (n.d.). Genome.gov. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Enzima>
- [7] Lewis, T. (2023, April 24). Biochemistry, proteins enzymes. StatPearls - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554481/>
- [8] Copeland, R. (2004). *Enzymes* (2nd ed.). Wiley. <https://www.perlego.com/book/2759634/enzymes-a-practical-introduction-to-structure-mechanism-and-data-analysis-pdf>
- [9] Abyntek. (2023, March 6). Enzimas para investigación: Clases y Aplicaciones - ABYNT-TEK. Abyntek Biopharma. <https://www.abyntek.com/enzimas-para-investigacion/>
- [10] Teresa, E. I. M. (2011, 15 julio). Aplicaciones enzimáticas en procesos de conservación y restauración de obras de arte. consolidación de celulosa. <https://addi.ehu.es/handle/10810/14292>
- [11] Officer, L. M. M. S. C. S. (2021, 2 noviembre). Industrial uses of enzymes. <https://www.sepmag.eu/blog/industrial-uses-of-enzymes#:~:text=Enzymes%20are%20used%20in%20the,tanning%20leather%2C%20and%20much%20more.>
- [12] Ranjan, R., Rai, R., Bhatt, S., & Dhar, P. (2023). Technological road map of Cellulase: A comprehensive outlook to structural, computational, and industrial applications. *Biochemical Engineering Journal*, 198, 109020. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2023.109020>
- [13] Xylanase market. (2023, 2 de diciembre). <https://www.futuremarketinsights.com/reports/xylanase-market>

- [14] Marín Alvarado, R. (2007). Caracterización y Expresión Recombinante de una Celulasa de Origen Antártico. Disponible en <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/104733>
- [15] Colina, Alejandro, Ferrer, Alexis, & Urribarrí, Lauris. (2009). Producción de celulasas por *Trichoderma reesei* Rut C-30 en diferentes substratos celulósicos. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, 32(2), 152-159. Recuperado en 28 de febrero de 2024, de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0254-07702009000200008&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0254-07702009000200008&lng=es&tlng=es).
- [16] Agricultural Microbiology, Dept. of Agric. Botany, Fac. of Agric., Kafrelsheikh Univ.,. (2008). Biodegradation of wastepaper by *trichoderma viride* and using bioprocessed materials in biocontrol of damping - off of pea caused by *pythium debaryanum*. Recuperado 28 de febrero de 2024, de [https://www.researchgate.net/publication/267024992\\_Biodegradation\\_of\\_wastepaper\\_by\\_Trichoderma\\_viride\\_and\\_using\\_bioprocessed\\_materials\\_in\\_biocontrol\\_of\\_damping\\_-\\_off\\_of\\_pea\\_caused\\_by\\_Pythium\\_debaryanu\\_m#pf9](https://www.researchgate.net/publication/267024992_Biodegradation_of_wastepaper_by_Trichoderma_viride_and_using_bioprocessed_materials_in_biocontrol_of_damping_-_off_of_pea_caused_by_Pythium_debaryanu_m#pf9)
- [17] Wilson, D. B. (2009). Cellulases. In Elsevier eBooks (pp. 252–258). <https://doi.org/10.1016/b978-012373944-5.00138-3>
- [18] Basak, P., Adhikary, T., Das, P., Shee, M., Dutta, T., Biswas, S., Paul, S., & Manna, S. (2021a). Cellulases in paper and pulp, brewing and food industries: Principles associated with its diverse applications. In Elsevier eBooks (pp. 275–293). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821882-2.00003-x>
- [19] Uçak, İ., & Afreen, M. (2022). Enzymes. In Elsevier eBooks (pp. 537–571). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-85052-0.00006-4>
- [20] Uzuner, S., & Çekmecelioğlu, D. (2019). Enzymes in the beverage industry. In Elsevier eBooks (pp. 29–43). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813280-7.00003-7>
- [21] Al-Ghanayem, A. A., Joseph, B., Alhussaini, M. S., & Ramteke, P. W. (2022). Current applications and future trends of extremozymes in detergent industries. In Elsevier eBooks (pp. 223–230). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822945-3.00020-8>
- [22] Bajpai, P. (2023). Cellulases for biofuels production. In Elsevier eBooks (pp. 139–177). <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-99496-5.00007-8>
- [23] Ejaz, U., Sohail, M., & Ghanemi, A. Cellulases: From Bioactivity to a Variety of Industrial Applications. *Biomimetics*. <https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044>
- [24] Wikipedia contributors. (s. f.). File:Types of Cellulase2.png - Wikipedia. [https://en.wikipedia.org/wiki/File:Types\\_of\\_Cellulase2.png](https://en.wikipedia.org/wiki/File:Types_of_Cellulase2.png)
- [25] Colina, Alejandro, Ferrer, Alexis, & Urribarrí, Lauris. (2009). Producción de celulasas por *Trichoderma reesei* Rut C-30 en diferentes substratos celulósicos. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, 32(2), 152-159. Recuperado en 28 de febrero de 2024, de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0254-07702009000200008&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0254-07702009000200008&lng=es&tlng=es).
- [26] Ma, X., Gao, M., Li, Y., Wang, Q., & Sun, X. (2022). Production of cellulase by *Aspergillus niger* through fermentation of spent mushroom substance: Glucose inhibition and elimination approaches. *Process Biochemistry*, 122, 26-35. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.09.029>
- [27] Prade, R. A. (1996). Xylanases: from Biology to BioTechnology. *Biotechnology & Genetic*

- Engineering Reviews, 13(1), 101–132. <https://doi.org/10.1080/02648725.1996.10647925>
- [28] Kogo, T., Yoshida, Y., Koganei, K., Matsumoto, H., Watanabe, T., Ogihara, J., & Kasumi, T. (2017). Production of rice straw hydrolysis enzymes by the fungi *Trichoderma reesei* and *Humicola insolens* using rice straw as a carbon source. *Bioresource Technology*, 233, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.075>
- [29] endo-1,4- $\beta$ -Xylanase M3 (*Trichoderma longibrachiatum*). (s. f.). Megazyme. <https://www.megazyme.com/endo-1-4-beta-xylanase-m3-trichoderma-longibrachiatum>
- [30] Tolan, J. S., & Popovici, C. (2002). Mill usage and mechanistic studies of xylanase to enhance bleaching. In *Progress in Biotechnology* (pp. 263–270). [https://doi.org/10.1016/s0921-0423\(02\)80029-6](https://doi.org/10.1016/s0921-0423(02)80029-6)
- [31] Bajpai, P. (2009). Xylanases. In *Elsevier eBooks* (pp. 600–612). <https://doi.org/10.1016/b978-012373944-5.00165-6>
- [32] Bajpai, P. (2023b). Industrial applications of thermophilic/hyperthermophilic enzymes. In *Elsevier eBooks* (pp. 105–284). <https://doi.org/10.1016/b978-0-443-19197-8.00016-5>
- [33] Bajpai, P. (2023). Industrial applications of thermophilic/hyperthermophilic enzymes. In *Elsevier eBooks* (pp. 105–284). <https://doi.org/10.1016/b978-0-443-19197-8.00016-5>
- [34] De Lourdes Teixeira De Moraes Polizeli, M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., & Amorim, D. S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(5), 577–591. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1904-7>
- [35] Chaudhary, R., Kuthiala, T., Singh, G., Rarotra, S., Kaur, A., Arya, S. K., & Kumar, P. (2021). Current status of xylanase for biofuel production: a review on classification and characterization. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13(10), 8773–8791. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01948-2>
- [36] Brunner, G. (2014). Processing of Biomass with Hydrothermal and Supercritical Water. In *Supercritical fluid science and technology* (pp. 395–509). <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-59413-6.00008-x>
- [37] Gandini, A., & Belgacem, M. N. (2013). The State of the Art of Polymers from Renewable Resources. In *Elsevier eBooks* (pp. 71–85). <https://doi.org/10.1016/b978-1-4557-2834-3.00004-5>
- [38] Cultivation of Mushrooms and Their Lignocellulolytic Enzyme Production Through the Utilization of Agro-Industrial Waste - Scientific Figura en ResearchGate. Disponible en: [https://www.researchgate.net/figure/Enzymes-involved-in-xylan-degradation\\_fig5\\_342285847](https://www.researchgate.net/figure/Enzymes-involved-in-xylan-degradation_fig5_342285847). Recuperado en 28 de febrero de 2024
- [39] Colina, A., Sulbarán-De-Ferrer, B., Aiello, C., & Ferrer, A. (2003). Xylanase Production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 on Rice Straw. *Applied Biochemistry And Biotechnology*, 108(1-3), 715–724. <https://doi.org/10.1385/abab:108:1-3:715>
- [40] Suárez-Contreras, L. (n.d.). Identificación molecular de hongos filamentosos y su potencial biotecnológico. *www.scielo.org.co*. <https://doi.org/10.18684/bsaa.v20.n1.2022.1914>
- [41] ifeder. (2022). Hongos filamentosos. *Lifeder*. <https://www.lifeder.com/hongos-filamentosos-estructuras-ciclo-vida-nutricion/>
- [42] He, J., Kieselbach, T., & Jönsson, L. J. (2011). Enzyme production by filamentous fungi:

- analysis of the secretome of *Trichoderma reesei* grown on unconventional carbon source. *Microbial Cell Factories*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-68>
- [43] Wösten, H. a. B. (2019). Filamentous fungi for the production of enzymes, chemicals and materials. *Current Opinion in Biotechnology*, 59, 65–70. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.010>
- [44] Intasit, R., Cheirsilp, B., Suyotha, W., & Boonsawang, P. (2021). Synergistic production of highly active enzymatic cocktails from lignocellulosic palm wastes by sequential solid state-submerged fermentation and co-cultivation of different filamentous fungi. *Biochemical Engineering Journal*, 173, 108086. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108086>
- [45] Solano, J. N. (2023, 31 enero). ¿Qué son las algas? - Características e importancia. *Enciclopedia de Biología*. <https://enciclopediaebiologia.com/algas/>
- [46] ¿Qué son y cómo se clasifican las algas? (s. f.). Museo de Historia Natural de Concepción. <https://www.mhnconcepcion.gob.cl/noticias/que-son-y-como-se-clasifican-las-algas>
- [47] Luis, M. V. J. (2014, 30 septiembre). Usos y aplicaciones de las algas. *Naturaleza y Turismo*. <https://www.asturnatura.com/temarios/biologia/algas/usos-propiedades-algas>
- [48] Las algas y su importancia social, ecológica y económica. (s. f.). Museo de Historia Natural de Concepción. <https://www.mhnconcepcion.gob.cl/noticias/las-algas-y-su-importancia-social-ecologica-y-economica>
- [49] Las algas, sorprendentes organismos | Academia de Ciencias de Morelos, A.C. (s. f.). <https://acmor.org/publicaciones/las-algas-sorprendentes-organismos>
- [50] Escobedo, M. J., & Calderón, A. C. (2021). Microalgal biomass with high potential for the biofuels production. *Scientia Agropecuaria*, 12(2), 265-282. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.030>
- [51] Landeta-Salgado, C., Cicatiello, P., & Lienqueo, M. E. (2021). Mycoprotein and hydrophobin like protein produced from marine fungi *Paradendryphiella salina* in submerged fermentation with green seaweed *Ulva* spp. *Algal Research*, 56, 102314. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102314>
- [52] Noelia. (2015, 1 febrero). Los colores de las plantas y las algas | Bionesia: Las islas de la vida. <https://www3.gobiernodecanarias.org/medusa/ecoblog/ncarroq/2015/02/01/los-colores-de-las-plantas-y-las-algas/>
- [53] Sun, H., Wang, Y., He, Y., Liu, B., Mou, H., Chen, F., & Yang, S. (2023). Microalgae-Derived Pigments for the Food Industry. *Marine Drugs*, 21(2), 82. <https://doi.org/10.3390/md21020082>
- [54] <https://www.virtualpro.co>. (s. f.). Biblioteca Virtual Pro - Repositorio Digital de Información. <https://www.virtualpro.co/biblioteca/produccion-y-aplicacion-de-enzimas-industriales>
- [55] ¿Qué son las enzimas vegetales? - spiegato. (2021, 31 mayo). Spiegato. <https://spiegato.com/es/que-son-las-enzimas-vegetales>
- [56] BIOTECNOLOGÍA ENZIMÁTICA y BIOTRANSFORMACIONES DE INTERÉS INDUSTRIAL | Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación. <https://www.ucm.es/otri/complutransfer-biotecnologia-enzimatica-y-biotransformaciones-de-interes-i>

## Industrial

- [57] Marcela, R. C. S. (2023, 13 marzo). Revisión sistemática de la literatura sobre la producción bacteriana de celulasas para degradar material lignocelulósico. <https://noesis.unis.edu.co/handle/20.500.14071/12608>
- [58] Steiner W., J., Mella C., M., Polanco, R., Ortega A., X. y Eyzaguirre, J. (1996). Aislamiento de bacterias termofílicas productoras de xilanasas. Disponible en <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/121524>
- [59] Emilene, R. R. (2015, 4 noviembre). AISLAMIENTO y SELECCIÓN DE HONGOS o BACTERIAS PRODUCTORES DE CELULASAS y HEMICELULASAS a PARTIR DE RESIDUOS LIGNOCELULOSICOS PARA LA OBTENCIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES. <http://repositorios.orizaba.tecnm.mx:8080/xmlui/handle/123456789/284>
- [60] Cochayuyo (*Durvillaea antarctica*). (n.d.). iNaturalist Ecuador. <https://ecuador.inaturalist.org/taxa/197107-Durvillaea-antarctica>
- [61] César Burgos-Díaz, Mauricio Opazo-Navarrete, José Luis Palacios, Lidia Verdugo, Fresia Anguita-Barrales, Mariela Bustamante, Food-grade bioactive ingredient obtained from the *Durvillaea incurvata* brown seaweed: Antibacterial activity and antioxidant activity, *Algal Research*, Volume 68, 2022, 102880, ISSN 2211-9264, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102880>.
- [62] Wang, J., Zhang, J., Wang, S., Liu, W., Jing, W., Yu, H. (2023). Isolation and Extraction of Monomers from Insoluble Dietary Fiber. *Foods* (Basel, Switzerland), 12(13), 2473. <https://doi.org/10.3390/foods12132473>
- [63] Ortiz Viedma, J. (2011). Composición nutricional y funcional de algas pardas chilenas : *Macrocystis pyrifra* y *Durvillaea antarctica*. Disponible en <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/121459>
- [64] Algotharm. (2018, 16 mayo). *Durvillaea Antarctica* - Algotharm. <https://www.algotharm.com/en/seaweed/durvillaea-antarctica-en/>
- [65] Landeta, C., “comunicación personal,” 14 de junio de 2023
- [66] APLICACIÓN DE LA VOLTAMETRÍA EN EL ANÁLISIS DEL CRECIMIENTO MICROBIOLÓGICO - Scientific Figura en ResearchGate. Disponible en: [https://www.researchgate.net/figure/Curva-tipica-de-crecimiento-de-una-poblacion-de-microorganismos\\_fig4\\_228716655](https://www.researchgate.net/figure/Curva-tipica-de-crecimiento-de-una-poblacion-de-microorganismos_fig4_228716655). Recuperado el 8 de febrero, 2024.
- [67] Cellulase assay Kit (CellG5 method). Megazyme. <https://www.megazyme.com/cellulose-assay-kit-cellg5-method>
- [68] María, D. C. Y. (2020, 15 febrero). Determinación del contenido de azúcares, proteínas y nitrógeno presentes en medios de cultivos modificados para el crecimiento in vitro del hongo *Colletotrichum* SP fitopatógeno del ñame (*Dioscorea alata*) en Montería-Córdoba. Repositorio institucional Unicordoba. <https://repositorio.unicordoba.edu.co/handle/unicordoba/3172>

# Anexos

## Anexo A. Tablas experimentales

### A.1. Absorbancias curva de calibración kit

Tabla A.1: Absorbancias medidas a 400 nm de muestras por triplicado con actividad enzimática conocida.

mg/ml	0	0,05	0,1	0,15
1	0,061	0,136	0,191	0,305
	0,057	0,138	0,23	0,302
	0,054	0,141	0,24	0,291
2	0,057	0,156	0,266	0,297
	0,049	0,157	0,264	0,311
	0,063	0,16	0,268	0,32
3	0,115	0,245	0,243	0,287
	0,138	0,246	0,228	0,318
	0,053	0,228	0,26	0,334

### A.2. Absorbancias medición celulasas

Tabla A.2: Valores de absorbancia obtenidos al medir a 400 nm los ensayos de actividad de endocelulasa a las muestras del consorcio 1, pH 4,5.

<b>Consorcio 1 pH 4,5</b>					
<b>Duplicado</b>	<b>0</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>
1	0,074	0,083	0,073	0,09	0,098
	0,079	0,078	0,081	0,1	0,093
	0,074	0,087	0,085	0,083	0,094
2	0,09	0,081	0,096	0,091	0,09
	0,086	0,089	0,098	0,093	0,094
	0,092	0,08	0,086	0,09	0,092
<b>Promedio - blanco</b>	<b>0,017</b>	<b>0,0175</b>	<b>0,021</b>	<b>0,0257</b>	<b>0,028</b>
<b>U/ml</b>	<b>0,2544</b>	<b>0,2619</b>	<b>0,3143</b>	<b>0,3841</b>	<b>0,419</b>

Tabla A.3: Valores de absorbancia obtenidos al medir a 400 nm los ensayos de actividad de endocelulasa a las muestras del consorcio 1, pH 6.

<b>Consortio 1 pH 6</b>					
<b>Duplicado</b>	<b>0</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>
1	0,073	0,075	0,087	0,081	0,108
	0,076	0,076	0,089	0,101	0,099
	0,076	0,075	0,086	0,083	0,1
2	0,073	0,074	0,078	0,082	0,091
	0,075	0,078	0,076	0,081	0,112
	0,076	0,076	0,086	0,082	0,093
<b>Promedio - blanco</b>	<b>0,0108</b>	<b>0,0117</b>	<b>0,0197</b>	<b>0,0210</b>	<b>0,0365</b>
<b>U/g</b>	<b>0,1575</b>	<b>0,1696</b>	<b>0,2859</b>	<b>0,3052</b>	<b>0,5305</b>

Tabla A.4: Valores de absorbancia obtenidos al medir a 400 nm los ensayos de actividad de endocelulasa a las muestras del consorcio 2, pH 4,5.

<b>Consortio 2 pH 4,5</b>					
<b>Duplicado</b>	<b>0</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>
1	0,081	0,087	0,081	0,103	0,1
	0,081	0,087	0,086	0,087	0,093
	0,079	0,093	0,091	0,092	0,097
2	0,09	0,079	0,095	0,088	0,091
	0,082	0,091	0,095	0,094	0,112
	0,082	0,082	0,084	0,09	0,095
<b>Promedio - blanco</b>	<b>0,0155</b>	<b>0,0195</b>	<b>0,0217</b>	<b>0,0253</b>	<b>0,031</b>
<b>U/g</b>	<b>0,2371</b>	<b>0,2983</b>	<b>0,3314</b>	<b>0,3875</b>	<b>0,4741</b>

Tabla A.5: Valores de absorbancia obtenidos al medir a 400 nm los ensayos de actividad de endocelulasa a las muestras del consorcio 2, pH 6.

<b>Consortio 2 pH 6</b>					
<b>Duplicado</b>	<b>0</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>
1	0,068	0,077	0,078	0,08	0,092
	0,071	0,081	0,079	0,085	0,095
	0,064	0,079	0,079	0,085	0,095
2	0,068	0,081	0,075	0,084	0,092
	0,068	0,086	0,083	0,097	0,099
	0,069	0,084	0,078	0,085	0,09
<b>Promedio - blanco</b>	<b>0,012</b>	<b>0,0253</b>	<b>0,0227</b>	<b>0,03</b>	<b>0,0378</b>
<b>U/ml</b>	<b>0,1741</b>	<b>0,3675</b>	<b>0,3288</b>	<b>0,4352</b>	<b>0,5488</b>

### A.3. Absorbancias curva de calibración xilosa

Tabla A.6: Valores de absorbancia obtenidos al medir a 550 nm concentraciones conocidas de xilosa diluida en buffer Acetato de sodio 100 mM pH 4,5 con 1mg/ml de BSA y 0,02 % de azida sódica.

pH 4,5				
mg/ml	0	0,25	0,5	1
	0,071	0,283	0,639	1,143
	0,089	0,318	0,63	1,106
	0,079	0,316	0,622	1,13
<b>Promedio</b>	<b>0,0797</b>	<b>0,3057</b>	<b>0,6303</b>	<b>1,1263</b>

A la hora de hacer la curva de calibración no se consideró el punto 1 porque la absorbancia sale del rango de linealidad.

Tabla A.7: Valores de absorbancia obtenidos al medir a 550 nm concentraciones conocidas de xilosa diluida en buffer Fosfato de sodio 100 mM pH 6 con 0,02 % de azida sódica.

pH 6				
mg/ml	0	0,25	0,5	1
	0,052	0,119	0,218	0,375
	0,113	0,075	0,188	0,351
	0,053	0,106	0,148	0,262
<b>Promedio</b>	<b>0,0727</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1847</b>	<b>0,3293</b>

### A.4. Concentración de azúcares reductores en las muestras.

Tabla A.8: Valores de absorbancia obtenidos al medir a 550 nm las muestras de la fermentación del consorcio 1 diluidas a pH 4,5

Consortio 1 pH 4,5					
Horas	0	24	48	72	96
Absorbancias	0,091	0,179	0,323	0,173	0,225
	0,112	0,172	0,335	0,191	0,438
	0,089	0,197	0,311	0,222	0,247
<b>Promedio</b>	<b>0,0973</b>	<b>0,1827</b>	<b>0,323</b>	<b>0,1953</b>	<b>0,3033</b>
<b>Concentración[mg/ml]</b>	<b>0,0832</b>	<b>0,4850</b>	<b>1,1457</b>	<b>0,5446</b>	<b>1,0531</b>

Tabla A.9: Valores de absorbancia obtenidos al medir a 550 nm las muestras de la fermentación del consorcio 1 diluidas a pH 6

<b>Consorcio 1 pH 6</b>					
<b>Horas</b>	<b>0</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>
<b>Absorbancias</b>	0,145	0,144	0,14	0,113	0,153
	0,115	0,112	0,203	0,106	0,134
	0,108	0,18	0,107	0,109	0,086
<b>Promedio</b>	<b>0,1227</b>	<b>0,1453</b>	<b>0,15</b>	<b>0,1093</b>	<b>0,1243</b>
<b>Concentración[mg/ml]</b>	<b>0,4265</b>	<b>0,8660</b>	<b>0,9564</b>	<b>0,1680</b>	<b>0,4588</b>

Tabla A.10: Valores de absorbancia obtenidos al medir a 550 nm las muestras de la fermentación del consorcio 2 diluidas a pH 4,5

<b>Consorcio 2 pH 4,5</b>					
<b>Horas</b>	<b>0</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>
<b>Absorbancias</b>	0,085	0,118	0,217	0,122	0,156
	0,076	0,12	0,224	0,179	0,154
	0,074	0,125	0,285	0,149	0,19
<b>Promedio</b>	<b>0,0783</b>	<b>0,121</b>	<b>0,242</b>	<b>0,15</b>	<b>0,1667</b>
<b>Concentración[mg/ml]</b>	<b>0,1567</b>	<b>0,3635</b>	<b>0,9501</b>	<b>0,5041</b>	<b>0,5849</b>

Tabla A.11: Valores de absorbancia obtenidos al medir a 550 nm las muestras de la fermentación del consorcio 2 diluidas a pH 4,5 y pH 6

<b>Consorcio 2 pH 6</b>					
<b>Horas</b>	<b>0</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>
<b>Absorbancias</b>	0,131	0,122	0,179	0,171	0,158
	0,117	0,124	0,117	0,101	0,142
	0,096	0,122	0,123	0,105	0,137
<b>Promedio</b>	<b>0,1147</b>	<b>0,1227</b>	<b>0,1397</b>	<b>0,1257</b>	<b>0,1457</b>
<b>Concentración[mg/ml]</b>	<b>0,2714</b>	<b>0,4265</b>	<b>0,7561</b>	<b>0,4847</b>	<b>0,8724</b>

## A.5. Absorbancias ensayos de xilanasas

Tabla A.12: Valores de absorbancia obtenidos al medir a 550 nanómetros las muestras obtenidas de la fermentación del consorcio 1 diluidas a pH 4,5, la concentración de azúcares reductores medidas y la actividad enzimática.

<b>Consortio 1 pH 4,5</b>					
<b>Horas</b>	<b>0</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>
<b>Absorbancia</b>	0,397	0,414	0,596	0,588	-
	0,388	0,49	0,858	0,346	0,679
	0,417	0,673	0,514	0,673	0,504
<b>Promedio</b>	<b>0,4007</b>	<b>0,5257</b>	<b>0,6560</b>	<b>0,5357</b>	<b>0,5919</b>
Promedio - blanco	0,0567	0,1817	0,3120	0,1917	0,2475
Concentración total [mg/ml]	0,0534	0,1711	0,2938	0,1805	0,2331
<b>Concentración real[mg/ml]</b>	<b>0,0367</b>	<b>0,0741</b>	<b>0,0647</b>	<b>0,0716</b>	<b>0,0224</b>
Concentración [umol/ml]	0,2446	0,4933	0,4306	0,4766	0,1495
<b>Actividad enzimática [U/g]</b>	<b>1,2229</b>	<b>2,4667</b>	<b>2,1531</b>	<b>2,3831</b>	<b>0,7473</b>

Tabla A.13: Valores de absorbancia obtenidos al medir a 550 nanómetros las muestras obtenidas de la fermentación del consorcio 2 diluidas a pH 4,5, la concentración de azúcares reductores medidas y la actividad enzimática

<b>Consortio 2 pH 4,5</b>					
<b>Horas</b>	<b>0</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>
<b>Absorbancia</b>	0,656	0,603	0,774	0,544	0,605
	0,619	0,607	0,755	0,596	0,781
	0,703	0,735	0,802	0,63	0,616
<b>Promedio</b>	<b>0,6593</b>	<b>0,6483</b>	<b>0,777</b>	<b>0,59</b>	<b>0,6673</b>
Promedio - blanco	0,1853	0,1743	0,303	0,116	0,1933
Concentración total [mg/ml]	0,1711	0,1610	0,2798	0,1071	0,1785
<b>Concentración real[mg/ml]</b>	<b>0,1376</b>	<b>0,0880</b>	<b>0,0951</b>	<b>0,0074</b>	<b>0,0634</b>
Concentración [umol/ml]	0,9163	0,5863	0,6334	0,0492	0,4223
<b>Actividad enzimática [U/g]</b>	<b>4,5814</b>	<b>2,9313</b>	<b>3,1670</b>	<b>0,2460</b>	<b>2,1114</b>

Tabla A.14: Valores de absorbancia obtenidos al medir a 550 nanómetros las muestras obtenidas de la fermentación del consorcio 1 diluidas a pH 6, la concentración de azúcares reductores medidas y la actividad enzimática

<b>Consortio 1 pH 6</b>					
Triplicado	0	24	48	72	96
Absorbancia	0,297	0,728	0,728	0,649	0,861
	0,52	0,368	0,793	0,386	0,478
	0,414	0,801	0,818	0,483	0,821
<b>Promedio</b>	<b>0,4103</b>	<b>0,6323</b>	<b>0,7797</b>	<b>0,5060</b>	<b>0,7200</b>
Promedio-blanco	0,1433	0,3653	0,5127	0,2390	0,4530
Concentración total [mg/ml]	0,1041	0,2653	0,3724	0,1736	0,3290
Concentración real [mg/ml]	0,0540	0,1225	0,0896	0,0460	0,1908
Concentración [umol/ml]	0,3596	0,8159	0,5966	0,3064	1,2706
<b>Actividad enzimática [U/g]</b>	<b>1,7979</b>	<b>4,0795</b>	<b>2,9830</b>	<b>1,5318</b>	<b>6,3530</b>

Tabla A.15: Valores de absorbancia obtenidos al medir a 550 nanómetros las muestras obtenidas de la fermentación del consorcio 2 diluidas a pH 6, la concentración de azúcares reductores medidas y la actividad enzimática.

<b>Consortio 2 pH 6</b>					
Triplicado	0	24	48	72	96
Absorbancia	0,52	0,809	0,614	0,733	0,729
	0,503	0,872	0,745	0,653	0,98
	0,529	0,979	0,593	0,843	0,846
<b>Promedio</b>	<b>0,5173</b>	<b>0,8867</b>	<b>0,6507</b>	<b>0,7430</b>	<b>0,8517</b>
Promedio-blanco	0,1938	0,5632	0,2777	0,4195	0,5282
Concentración total [mg/ml]	0,1517	0,4407	0,4220 <sup>a</sup>	0,3282	0,4133
Concentración real [mg/ml]	-0,0678	0,2939	0,2328	0,1716	0,2514
Concentración [umol/ml]	-0,4516	1,9577	1,5503	1,1430	1,6746
<b>Actividad enzimática [U/g]</b>	<b>-2,258</b>	<b>9,7885</b>	<b>7,7515</b>	<b>5,7150</b>	<b>8,3728</b>

<sup>a</sup> Los valores de absorbancia de la muestra pasaban el límite de la linealidad así que se diluyeron para obtener los valores de la tabla.

## Anexo B. Resultados análisis estadístico

### B.1. ANOVA Endocelulasa

#### B.1.1. ANOVA actividad endocelulasa pH 4,5

Tabla B.1: Test de múltiples comparaciones de Šídák realizado a la comparación de actividad enzimática de celulasa pH 4,5.

Test de múltiples comparaciones de Šídák - Endocelulasa pH 4,5		
Consortio 2 - Consortio 1	Diferencia promedio	Valor P ajustado
0	-0,01733	0,9997
24	0,03637	0,9891
48	0,01713	0,9997
72	0,003372	>0,9999
96	0,05513	0,9351

#### B.1.2. ANOVA actividad endocelulasa pH 6

Tabla B.2: Test de múltiples comparaciones de Šídák realizado a la comparación de actividad enzimática de celulasa pH 6.

Test de múltiples comparaciones de Šídák - Endocelulasa pH 6		
Consortio 2 - Consortio 1	Diferencia promedio	Valor P ajustado
0	0,0166	0,9975
24	0,1979	0,0001
48	0,04292	0,8507
72	0,1299	0,0175
96	0,0183	0,9960

#### B.1.3. ANOVA actividad endocelulasa consorcio 1

Tabla B.3: Test de múltiples comparaciones de Šídák realizado a la comparación de actividad enzimática de celulasa consorcio 1.

Test de múltiples comparaciones de Šídák - Endocelulasa consorcio 1		
pH 6 - pH 4,5	Diferencia promedio	Valor P ajustado
0	-0,09694	0,3992
24	-0,0923	0,4523
48	-0,02841	0,9923
72	-0,07887	0,6174
96	0,1115	0,2554

#### B.1.4. ANOVA actividad endocelulasa consorcio 2

Tabla B.4: Test de múltiples comparaciones de Šídák realizado a la comparación de actividad enzimática de celulasa consorcio 2.

Test de múltiples comparaciones de Šídák - Endocelulasa consorcio 2		
pH 6 - pH 4,5	Diferencia promedio	Valor P ajustado
0	-0,06301	0,7871
24	0,06921	0,7159
48	-0,002612	>0,9999
72	0,04768	0,9215
96	0,07463	0,6490

#### B.2. ANOVA concentración azúcares reductores

##### B.2.1. ANOVA concentración azúcares reductores pH 4,5

Tabla B.5: Test de múltiples comparaciones de Šídák realizado a la comparación de azúcares libres a pH 4,5.

Test de múltiples comparaciones de Šídák - Azúcares libres pH 4,5		
Consorcio 2 - Consorcio 1	Diferencia promedio	Valor P ajustado
0	0,07352	0,9908
24	-0,1215	0,9226
48	-0,1956	0,6333
72	-0,0405	0,9995
96	-0,4682	0,0173

##### B.2.2. ANOVA concentración azúcares libres pH 6

Tabla B.6: Test de múltiples comparaciones de Šídák realizado a la comparación de azúcares libres a pH 6.

Test de múltiples comparaciones de Šídák - Azúcares libres pH 6		
Consorcio 2 - Consorcio 1	Diferencia promedio	Valor P ajustado
0	-0,1551	0,9998
24	-0,4395	0,9771
48	-0,2003	0,9994
72	0,3167	0,9948
96	0,4136	0,9825

### B.2.3. ANOVA concentración azúcares libres consorcio 1

Tabla B.7: Test de múltiples comparaciones de Šídák realizado a la comparación de azúcares libres consorcio 1.

Test de múltiples comparaciones de Šídák - Azúcares libres consorcio 1		
pH 6 - pH 4,5	Diferencia promedio	Valor P ajustado
0	0,3433	0,9740
24	0,3810	0,9596
48	-0,1893	0,9983
72	-0,3766	0,9615
96	-0,5943	0,7900

### B.2.4. ANOVA concentración azúcares libres consorcio 2

Tabla B.8: Test de múltiples comparaciones de Šídák realizado a la comparación de azúcares libres consorcio 2.

Test de múltiples comparaciones de Šídák - Azúcares libres consorcio 2		
pH 6 - pH 4,5	Diferencia promedio	Valor P ajustado
0	0,1147	0,9998
24	0,0630	>0,9999
48	-0,1940	0,9969
72	-0,01942	>0,9999
96	0,2875	0,9811

## B.3. ANOVA Xilanasa

### B.3.1. ANOVA actividad xilanasa pH 4,5

Tabla B.9: Test de múltiples comparaciones de Šídák realizado a la comparación de actividad enzimática de xilanasa a pH 4,5.

Test de múltiples comparaciones de Šídák - Xilanasa pH 4,5		
Consorcio 2 - Consorcio 1	Diferencia promedio	Valor P ajustado
0	3,432	0,0046
24	0,4725	0,9944
48	0,8360	0,9322
72	-2,174	0,1631
96	1,302	0,7488

### B.3.2. ANOVA actividad xilanasa pH 6

Tabla B.10: Test de múltiples comparaciones de Šídák realizado a la comparación de actividad enzimática de xilanasa a pH 6.

<b>Test de múltiples comparaciones de Šídák - Xilanasa pH 6</b>		
<b>Consortio 2 - Consortio 1</b>	<b>Diferencia promedio</b>	<b>Valor P ajustado</b>
0	-4,056	<0,0001
24	5,709	<0,0001
48	4,581	<0,0001
72	4,183	<0,0001
96	2,020	0,0235

### B.3.3. ANOVA actividad xilanasa consorcio 1

Tabla B.11: Test de múltiples comparaciones de Šídák realizado a la comparación de actividad enzimática de xilanasa consorcio 1.

<b>Test de múltiples comparaciones de Šídák - Xilanasa consorcio 1</b>		
<b>pH 6 - pH 4,5</b>	<b>Diferencia promedio</b>	<b>Valor P ajustado</b>
0	0,5750	0,9698
24	1,613	0,2697
48	0,8299	0,8693
72	-0,8513	0,8567
96	5,606	<0,0001

### B.3.4. ANOVA actividad xilanasa consorcio 2

Tabla B.12: Test de múltiples comparaciones de Šídák realizado a la comparación de actividad enzimática de xilanasa consorcio 2

<b>Test de múltiples comparaciones de Šídák - Xilanasa consorcio 2</b>		
<b>pH 6 - pH 4,5</b>	<b>Diferencia promedio</b>	<b>Valor P ajustado</b>
0	-6,913	<0,0001
24	6,849	<0,0001
48	4,575	<0,0001
72	5,506	<0,0001
96	6,324	<0,0001

## Anexo C. Resultados Buffer Fosfato 100 mM pH 6

### C.1. Tablas de datos experimentales

Tabla C.1: Tabla de datos de la xilanasa producida por consorcio 1 usando el buffer Fosfato de sodio 100 mM pH 6

<b>Consorcio 1</b>					
<b>Triplicado</b>	<b>0</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>
1	0,506	0,613	0,667	0,647	0,632
2	0,712	0,69	0,695	0,661	0,565
3	0,624	0,618	0,742	0,692	0,708
<b>promedio-blanco</b>	0,008	0,0343	0,0953	0,0607	0,029
<b>Concentración [mg/ml]</b>	<b>0,0299</b>	<b>0,1282</b>	<b>0,3560</b>	<b>0,2265</b>	<b>0,1083</b>
<b>Azucares libres consorcio</b>					
<b>Triplicado</b>	<b>0</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>
1	0,145	0,144	0,14	0,113	0,153
2	0,115	0,112	0,203	0,106	0,134
3	0,108	0,18	0,107	0,109	0,086
<b>promedio-blanco</b>	0,0402	0,0628	0,0675	0,0268	0,04183333
<b>Concentración [mg/ml]</b>	<b>0,1558</b>	<b>0,2437</b>	<b>0,2618</b>	<b>0,1041</b>	<b>0,1623</b>
<b>Concentración real [mg/ml]</b>	<b>-4,1936</b>	<b>-3,8469</b>	<b>3,1354</b>	<b>4,0776</b>	<b>-1,7976</b>
<b>Actividad enzimática [U/g]</b>	<b>11,4746</b>	<b>7,2178</b>	<b>7,7039</b>	<b>4,0812</b>	<b>8,8785</b>

Tabla C.2: Tabla de datos de la xilanasa producida por consorcio 2 usando el buffer Fosfato de sodio 100 mM pH 6

Consortio 2					
Triplicado	0	24	48	72	96
1	0,362	0,332	0,326	0,362	0,456
2	0,528	0,502	0,334	0,323	0,465
3	0,489	0,633	0,368	0,395	0,438
promedio-blanco	0,1157	0,145	-0,001	0,016	0,109
Concentración [mg/ml]	<b>0,4943</b>	<b>0,6197</b>	<b>-0,006</b>	<b>0,0684</b>	<b>0,46581197</b>
Azúcares libres consorcio					
Triplicado	0	24	48	72	96
1	0,131	0,122	0,179	0,171	0,158
2	0,117	0,124	0,117	0,101	0,142
3	0,096	0,122	0,123	0,105	0,137
promedio-blanco	0,03217	0,0402	0,0572	0,0432	0,0632
Concentración [mg/ml]	<b>0,1284</b>	<b>0,1603</b>	<b>0,2281</b>	<b>0,1723</b>	<b>0,2521</b>
Concentración real [mg/ml]	<b>0,3659</b>	<b>0,4594</b>	<b>-0,2338</b>	<b>-0,1039</b>	<b>0,2138</b>
Actividad enzimática [U/g]	<b>12,1859</b>	<b>15,2972</b>	<b>-7,7861</b>	<b>-3,4591</b>	<b>7,1179</b>

## C.2. Gráfico

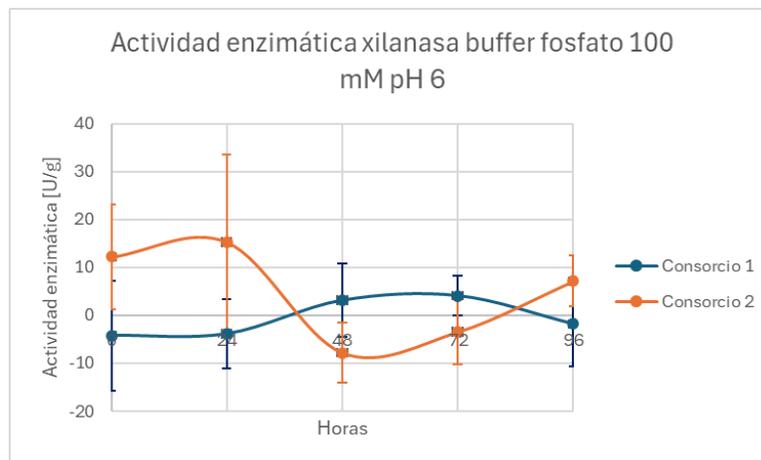


Figura C.1: Xilanasa a pH 6 de ambos consorcios utilizando el buffer fosfato de sodio 100 mM pH 6

## Anexo D. Cálculos realizados

### D.1. Cálculo de $\epsilon_{mM}$

Se tiene por el kit la siguiente ecuación mediante la cual calcular la actividad enzimática:

$$\frac{U}{ml} = \frac{\Delta A_{400}}{\text{Tiempo}} \cdot \frac{\text{Volumen total}}{\text{alícuota analizada}} \cdot \frac{1}{\epsilon_{mM}} \cdot \frac{\text{Volumen de extracción}}{\text{volumen de muestra}} \cdot \text{Dilución} \quad (\text{D.1})$$

Reemplazando en dicha ecuación los parámetros utilizados en el ensayo, se considera que el volumen de extracción y el de muestra es el mismo, ya que a la hora de hacer la curva se consideró la actividad de las muestras ya diluidas, tenemos:

$$\frac{U}{ml} = \frac{\Delta A_{400}}{10} \cdot \frac{1,6}{0,05} \cdot \frac{1}{\epsilon_{mM}} \cdot \frac{1}{1}$$

Quedando:

$$\frac{U}{ml} = \frac{\Delta A_{400}}{\epsilon_{mM}} \cdot 3,2 \quad (\text{D.2})$$

Sabiendo por la Figura 5.1 que según el ajuste lineal se tiene:

$$\Delta A_{400} = 1,6071 \cdot \frac{U}{ml} \quad (\text{D.3})$$

Reemplazando  $\frac{U}{ml}$  en la ecuación D.3 se puede despejar  $\epsilon_{mM}$ :

$$\frac{U}{ml} = 1,6071 \cdot \frac{U}{ml} \cdot \frac{3,2}{\epsilon_{mM}}$$

Despejando  $\epsilon_{mM}$  se tiene:

$$\epsilon_{mM} = 1,6071 \cdot 3,2 = 5,143 \quad (\text{D.4})$$

### D.2. Cálculo de actividad enzimática endocelulasa

A continuación, se presenta la metodología seguida para calcular la actividad enzimática en las muestras de sobrenadante.

Primero, se saca el promedio de las seis absorbancias medidas y a este promedio se le resta el promedio del blanco, de ahí tenemos el valor de "Promedio - blanco". De ahí se reemplaza en la ecuación de la curva estándar que se obtiene con el valor del blanco y el estándar de 0,15 U/ml.

Pero se obtiene la actividad enzimática en [U/ml] de la dilución de muestra liofilizada. Por lo que falta un paso para obtener la actividad por gramo de muestra liofilizada.

$$\begin{aligned} \text{Actividad enzimática [U/g]} &= \frac{\text{Actividad enzimática [U/ml]}}{\text{Concentración muestra}} \\ \text{Actividad enzimática [U/g]} &= \frac{\text{Actividad enzimática [U/ml]}}{0,02} \end{aligned} \quad (\text{D.5})$$

### **D.3. Cálculo de concentración de azúcares reductores**

A continuación, se presenta la metodología seguida para calcular la concentración de azúcares libres. Los pasos a seguir son:

1. Obtener el promedio del triplicado por cada muestra.
2. Al promedio se le resta un valor de blanco.
3. Utilizando la curva de absorbancia v/s concentración de xilosa que se realizó se pasa a concentración.
4. Se multiplica por el factor de dilución que en este caso es 5.

### **D.4. Cálculo de actividad enzimática xilanasa**

A continuación, se presenta la metodología seguida para calcular la actividad enzimática de xilanasa en las muestras de sobrenadante. Los pasos a seguir son:

1. Primero se calcula el promedio del triplicado de absorbancias.
2. Al promedio se le resta el blanco.
3. Utilizando una curva de xilosa se obtiene la concentración de azúcares totales.
4. Se resta la concentración de azúcares libres calculada siguiendo el protocolo en Anexo D.3.

## **Anexo E. Comparación curva estándar actividad enzimática xilanasa de buffers con aditivos.**

Debido a que se añadió a los buffers BSA y azida sódica siguiendo el protocolo del ensayo de celulasa, se decidió hacer una prueba usando xilanasa de *thexxx* para evaluar si dichos aditivos alteraban la medición de actividad a la hora de evaluar actividad xilanasa.

El BSA se utiliza principalmente como agente estabilizante y ayuda a mantener la actividad enzimática al prevenir la adsorción no específica de enzimas a las superficies de los tubos y recipientes, mientras que la azida sódica previene la contaminación bacteriana en las soluciones de enzimas.

Se ha visto que ambos compuestos pueden afectar la medición de actividad enzimática de algunas enzimas, pero no hay registro si afecta la medición de actividad enzimática de xilanasa.

### E.0.1. Buffer Acetato de sodio, 100 mM, pH 4,5

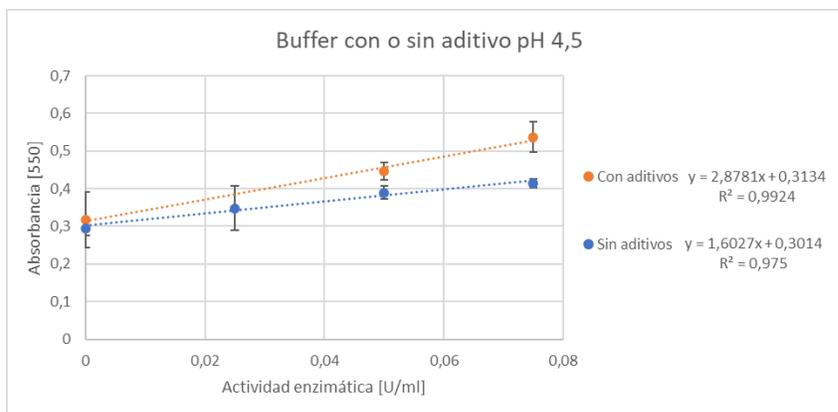


Figura E.1: Comparación actividad enzimática vs Absorbancia buffer acetato de sodio 100 mM pH 4,5 con y sin BSA y azida sódica.

Por la Figura E.1 es posible observar que el buffer con aditivos posee una mayor pendiente que el buffer sin aditivos, esto hace que a la hora de analizar los datos sea más confiable ya que es posible detectar variaciones más sutiles. Además, ambos poseen absorbancias similares en el punto de 0 actividad lo que significa que mantienen el mismo rango de absorbancias.

### E.0.2. Buffer Fosfato de sodio, 100 mM, pH 6

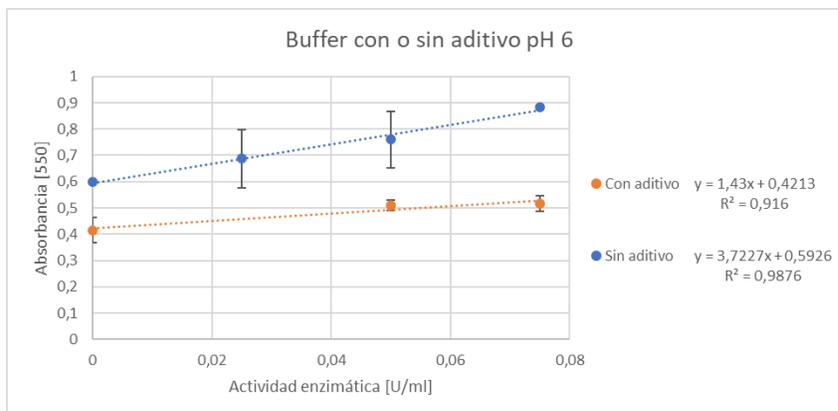


Figura E.2: Comparación actividad enzimática vs Absorbancia buffer fosfato de sodio 100 mM pH 6 con y sin azida sódica.

En la Figura E.2 se aprecia que a diferencia de la Figura E.1 el buffer con aditivo posee una pendiente menor al buffer sin aditivo dejando un precedente de que es posible no notar variaciones tan sutiles como si se usara el buffer sin aditivos. Sin embargo, la absorbancia del punto de actividad 0 es menor que en el buffer sin aditivos disminuyendo el riesgo de necesitar diluir muestras para evitar que las absorbancias salgan del rango de medición.

## E.1. Absorbancias curvas calibración actividad enzimática xilanasas

### E.1.1. Comparación de buffers con y sin aditivos

Tabla E.1: Valores de absorbancia obtenidos a 550 nm para realizar una curva de Actividad enzimática vs absorbancia diluida en buffer acetato de sodio 100 mM pH 4,5 con 1 mg/ml de BSA y 0,02% azida sódica.

<b>Buffer pH 4,5 con aditivo</b>			
<b>mg/ml</b>	<b>0</b>	<b>0,05</b>	<b>0,075</b>
<b>Absorbancias</b>	0,233	0,425	0,565
	0,372	0,472	-
	0,346	0,442	0,508
<b>Promedio</b>	<b>0,317</b>	<b>0,44633333</b>	<b>0,5365</b>

El valor de absorbancia que falta en la concentración 0,075 mg/ml supera el rango de linealidad por lo que no fue considerado.

Tabla E.2: Valores de absorbancia obtenidos a 550 nm para realizar una curva de Actividad enzimática vs absorbancia diluida en buffer acetato de sodio 100 mM pH 4,5.

<b>Buffer pH 4,5 sin aditivo</b>				
<b>mg/ml</b>	<b>0</b>	<b>0,025</b>	<b>0,05</b>	<b>0,075</b>
<b>Absorbancias</b>	0,301	0,366	0,397	0,417
	0,273	0,283	0,401	0,402
	0,309	0,396	0,369	0,424
<b>Promedio</b>	<b>0,305</b>	<b>0,3483</b>	<b>0,389</b>	<b>0,4205</b>

Tabla E.3: Valores de absorbancia obtenidos a 550 nm para realizar una curva de Actividad enzimática vs absorbancia diluida en buffer fosfato de sodio 100 mM pH 6 con 0,02% de azida de sodio.

<b>Buffer pH 6 con aditivo</b>			
<b>mg/ml</b>	<b>0</b>	<b>0,025</b>	<b>0,05</b>
<b>Absorbancias</b>	0,401	0,5	0,554
	0,402	0,48	0,533
	0,398	0,491	0,561
<b>Promedio</b>	<b>0,4003</b>	<b>0,4903</b>	<b>0,5493</b>

Tabla E.4: Valores de absorbancia obtenidos a 550 nm para realizar una curva de Actividad enzimática vs absorbancia diluida en buffer fosfato de sodio 100 mM pH 6.

<b>Buffer pH 6 sin aditivo</b>				
<b>mg/ml</b>	<b>0</b>	<b>0,025</b>	<b>0,05</b>	<b>0,075</b>
<b>Absorbancias</b>	0,598	0,572	0,656	0,888
	0,596	0,792	0,752	0,88
	0,6	0,697	0,871	-
<b>Promedio</b>	<b>0,598</b>	<b>0,687</b>	<b>0,8115</b>	<b>0,884</b>

El valor de absorbancia que falta en la concentración 0,075 mg/ml supera el rango de linealidad por lo que no fue considerado.