

Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Doctorado en Ciencias Aplicadas

Doctoranda
Lic. Gabriela V. DÍAZ

Producción de xilanasas a partir de *aspergillus* nativos de Misiones (Argentina) y su potencial aplicación en la hidrólisis de residuos agroindustriales

Tesis de Doctorado presentada para obtener el título de
“Doctor en Ciencias Aplicadas”

Directora
Dra. María Isabel FONSECA

Co-Directora
Dra. Laura Lidia VILLALBA

Posadas, 2019



Esta obra está licenciada bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



Universidad Nacional de Misiones
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y
Naturales



**PRODUCCIÓN DE XILANASAS A PARTIR DE *ASPERGILLUS*
NATIVOS DE MISIONES (ARGENTINA) Y SU POTENCIAL
APLICACIÓN EN LA HIDRÓLISIS DE RESIDUOS
AGROINDUSTRIALES**

Por Lic. Gabriela V. DÍAZ

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la
Universidad Nacional de Misiones para optar al grado académico de

DOCTOR EN CIENCIAS APLICADAS

Posadas, República Argentina

2019

Directora

Dra. María Isabel FONSECA

Co-directora

Dra. Laura Lidia VILLALBA

TRIBUNAL EXAMINADOR

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA (Disposición N°)

**PRODUCCIÓN DE XILANASAS A PARTIR DE *ASPERGILLUS* NATIVOS DE
MISIONES (ARGENTINA) Y SU POTENCIAL APLICACIÓN EN LA
HIDRÓLISIS DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES**

Gabriela V. Díaz

Lugar de desarrollo del trabajo de tesis

Laboratorio de Biotecnología Molecular, Instituto de Biotecnología

Misiones

“María Ebe Reca” (InBioMis), Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y
Naturales, Universidad Nacional de Misiones

COMISIÓN DE SUPERVISIÓN (Resolución Consejo Directivo N° 058-16/228-16)

Dra. Marina Inés QUIROGA - Universidad Nacional de Misiones

Dr. Mauro GRABIELE - Universidad Nacional de Misiones

Dr. Mario Carlos Nazareno SAPARRAT - Universidad Nacional de la Plata

CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS APLICADAS

Proyecto de Carrera N° 10933/11

Con reconocimiento de la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación

Universitaria (CONEAU) N° 344/11.

*Esta tesis está dedicada a Alejandro,
Sin él, esta tesis no estaría aún terminada..*

AGRADECIMIENTOS

A Pedro y Laura, por su confianza, por admitirme en su grupo de trabajo hace tantos años atrás y permitirme realizar mi trabajo de grado y este trabajo de posgrado. Muchas gracias por esta y por todas las oportunidades brindadas y por la generosidad que los caracterizan para que todos podamos crecer! Laura gracias por co-dirigir esta tesis ayudándome con tus correcciones y guiando este trabajo.

A María, por aceptar dirigirme y acompañarme durante estos cinco años, brindándome tus consejos, tu experiencia laboral y tus conocimientos. Gracias por tu tiempo, dedicación y humildad, siempre.

A las personas más importantes de mi vida, Alejandro, Milagros y Olivia. Gracias por su inmenso amor siempre incondicional, gracias por su paciencia y aguantarme las horas de trabajo afuera y dentro de casa. Los amo más que nada en este mundo!

A mi primera familia, Liliana, tía Pascuala, Juampy y Rubén, por su amor, por estar siempre no sólo para mí sino para mi familia y creer en mis sueños y alentarme a cumplirlos. Los quiero muchísimo.

A mis amigas de toda la vida, Laura, Betiana y Celeste, por toda la vida compartida. Las amo chicas! A mis queridas amigas que me regaló la carrera, Cin, Juli, Caroline, Nati, Checho. Gracias por estar siempre chicas! Las adoro!!

A todos los chicos del INBIOMIS, especialmente a Martín por haberme formado en mis principios en el laboratorio, muchas gracias! A Silvanita, por tu amistad y por haberme ayudado con tantas etapas de este trabajo tan generosamente, muchas gracias Sil! A Romi y Lucre, por compartir sus experiencias conmigo desinteresadamente y ayudarme en mi trabajo diario, por compartir en el laboratorio día a día. Gracias chicas, vamos por más! A Clari, por haber sido una excelente tesista y excelente persona, me encantó trabajar con vos! A Ana, Adri, Kari, por compartir en el laboratorio con la mejor onda siempre. A Marcelita, por brindarme tus conocimientos siempre que los necesito. A Juan, por haberme dedicado tu tiempo en mis consultas durante este trabajo. A Loli por ayudar con sus

conocimientos en una parte de esta tesis. A todos los chicos del instituto, gracias por todo, charlas, acompañamiento, mates!

A Gustavo Kramer, al Dr. Feliccia y a Silvana Maidana por su ayuda desinteresada en el desarrollo de la última parte de este trabajo. Sin su ayuda, esta parte hubiese quedado inconclusa, muchas gracias!

A mi Comisión de Seguimiento del Doctorado de Ciencias Aplicadas, a los Dres. Mauro Grabiele, Mario Saparrat y Marina Quiroga. Muchas gracias por su tiempo dedicado desde el primer seminario, por brindarme sus conocimientos para mejorar siempre y encaminar este trabajo y por sus consejos tan útiles. Fue un verdadero placer contar con su acompañamiento desde el inicio.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: grados centígrados

aas: aminoácidos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNr: ADN ribosómico

ANOVA: del inglés, *ANalysis Of VAriance*; análisis de la varianza,

ARA: arabinosa

Arg: Arginina

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

Asp: Ácido Aspártico

BGL: β -glucosidasa

BLAST: del inglés, *Basic Local Alignment Search Tool*; Herramienta de alineamiento local básico

Bt: β -tubulina

BXL: β -xilosidasa

CAZY: del inglés, *Carbohydrate Active EnZymes*; enzimas activas sobre carbohidratos,

CBHI: celobiohidrolasa I

CBHII: celobiohidrolasa II

CBS: del holandés, *Centraalbureau voor Schimmelcultures*; Instituto de Biodiversidad Fúngica Westerdijk

CEQUIBIEM: Centro de Estudios QUímicos y BIológicos de Espectrometría de Masa

CAM: calmodulina

CDH: celobiosa deshidrogenasas

CMC: carboximetilcelulosa

CREA: del inglés, *Creatine Sucrose Agar*; medio agar creatina sacarosa

CYA: del inglés, *Czapek Yeast Extract Agar*; medio Czapek extracto de levadura

CYAS: del inglés, *Czapek Yeast Extract NaCl*; medio Czapek extracto de levadura con sal

DNS: del inglés *3,5-DiNitroSalicylic acid*; ácido 3,5-dinitrosalicílico

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfatos

DTT: ditioneitol

EG: endo-1,4- β -glucanasa

EX: endo-1,4- β -xilanasa

FPasa: actividad sobre papel de filtro

FPU: unidades papel filtro

Glu: Ácido Glutámico

Glu: glucosa

HCD: del inglés, *High Collision Dissociation*; disociación de alta colisión

His: Histidina

HPLC: del inglés, *High Performance Liquid Chromatography*; Cromatografía líquida de alta eficiencia

InBioMis: Instituto de Biotecnología Misiones

ITS: del inglés, *Internal Transcribed Spacer*; región espaciadora transcrita interna

IUPAC: del inglés, *International Union of Pure and Applied Chemistry*; Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

KNAW del holandés, *Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen*; Real Academia de Artes y Ciencias de los Países Bajos

Lac: lacasas

LBM: Laboratorio de Biotecnología Molecular

LiP: lignina peroxidasa

LPMO: del inglés, *Lytic Polysaccharide Monooxygenases*; monooxigenasas líticas de polisacáridos

LSD: del inglés, *Least Significant Difference*; diferencia mínima significativa,

Lys: del inglés, *Lysine*; lisina

MEA: del inglés, *Malt Extract, Agar*; agar extracto de malta

MnP: manganeso peroxidasa

ML: del inglés, *Maximum Likelihood*; máxima verosimilitud

MS: del inglés, *Mass Spectrometry*; espectrometría de masas

NCBI: del inglés, *National Center for Biotechnology Information*; Centro Nacional para Información Biotecnológica

ND: No determinado

ND-PAGE: del inglés, *Non Denaturing PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*; electroforesis no desnaturalizante

- NJ:** del inglés, *Neighbor Joining*; vecino más cercano
- Pb:** pares de bases
- PCR:** del inglés, *Polymerase Chain Reaction*; reacción en cadena de la polimerasa
- PDA:** del inglés, *Potato Dextrose Agar*; agar papa dextrosa
- PE:** pectinesterasas
- Pfam:** del inglés, *Protein FAMILies*; Familia de proteínas
- PG:** poligalacturonasas
- PL:** pectato liasas
- PM/MM:** Marcador de peso molecular
- PNPC:** P-nitrofenil- β -celobiosido
- PNPG:** P-nitrofenil- β -D-glucopiranosido
- PNPX:** P-nitrofenil- β -D-xilopiranosido
- RSM:** del inglés, *Response Surface Methodology*; metodología de superficie respuesta,
- SDS-PAGE:** del inglés, *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*; electroforesis desnaturalizante con sulfato dodecílico de sodio
- sp:** especie
- TBE:** Tris-Borato-EDTA (Ácido etilendiaminotetracético)
- TCA:** del inglés, *Trichloroacetic acid*; ácido tricloroacético,
- Tef:** del inglés, *transcriptional elongation factor*; factor de elongación de transcripción
- Tm:** del inglés, *Temperature melting*; Temperatura de hibridación
- U.V:** Ultra Violeta
- U:** Unidad de actividad enzimática
- UNaM:** Universidad Nacional de Misiones
- UNIPROT:** del inglés, *UNiversal PROTein Resource*; Base de Datos de proteínas

LISTA DE TABLAS y FIGURAS

Lista de Tablas	Página
Tabla 1. Hongos del género <i>Aspergillus</i> utilizados en este estudio.	34
Tabla 2. Cebadores utilizados en la amplificación de diferentes regiones para la identificación de hongo seleccionado.	40
Tabla 3. Metodología para la observación de los caracteres macro y microscópicos.	42
Tabla 4. Factores evaluados en el experimento de cribado de fuentes de nitrógeno.	43
Tabla 5. Fuentes de nitrógeno evaluadas en ambos DCC y sus valores codificados y reales.	44
Tabla 6. Composición del bagazo de caña de azúcar utilizado en el <i>screening</i> de la actividad xilanólítica de los aislamientos de <i>Aspergillus</i> .	62
Tabla 7. <i>Screening</i> cuantitativo de las actividades EX, BXL y proteolíticas de los aislamientos de <i>Aspergillus</i> .	67
Tabla 8. Composición de los residuos lignocelulósicos; bagazo de caña de azúcar (BCA), bagazo de mandioca (BM), aserrín de eucaliptus (AE), aserrín de pino (AP).	71
Tabla 9. Estudio costo/beneficio de los medios de bagazo de mandioca con y sin agitación.	73
Tabla 10. Marcadores moleculares utilizados para la identificación del aislamiento LBM 134 y números de acceso del NCBI correspondientes.	74
Tabla 11. Características macro morfológicas registradas de <i>Aspergillus</i> sp. LBM 134 incubado en diferentes medios de cultivo a los 7 días de incubación.	79
Tabla 12. Características micro morfológicas registradas de <i>Aspergillus</i> sp. LBM 134 incubado en medio CYA a 25 °C a los 7 días de incubación.	79
Tabla 13. Matriz experimental de los diseños factoriales fraccionados para siete fuentes de nitrógeno con los valores codificados y (valores experimentales) para los medios con bagazo de caña de azúcar y de mandioca y actividad EX (U/mL ⁻¹) de <i>A. niger</i> LBM 134.	81
Tabla 14. Análisis de la varianza para la actividad EX de <i>A. niger</i> LBM 134 de los diseños factoriales fraccionadas del bagazo de caña de azúcar.	82

Tabla 15. Análisis de la varianza para la actividad EX de <i>A. niger</i> LBM 134 de los diseños factoriales fraccionadas del bagazo de mandioca.	82
Tabla 16. Matriz experimental del DCC para el medio con bagazo de caña de azúcar y las actividades EX de <i>A. niger</i> LBM 134 para cada corrida experimental.	84
Tabla 17. Análisis de la varianza para la actividad EX de <i>A. niger</i> LBM 134 en el DCC con bagazo de caña de azúcar.	85
Tabla 18. Validación del modelo para la actividad EX de <i>A. niger</i> LBM 134 crecido en medio de bagazo de caña de azúcar.	86
Tabla 19. Matriz experimental del DCC para el medio con bagazo de mandioca y las actividades EX de <i>A. niger</i> LBM 134 para cada corrida experimental.	87
Tabla 20. Análisis de la varianza para la actividad EX de <i>A. niger</i> LBM 134 en el DCC con mandioca.	88
Tabla 21. Validación del modelo para la actividad EX de <i>A. niger</i> LBM 134 crecido en medio de bagazo de mandioca.	89
Tabla 22. Bagazos vs. xilano comercial, estudio costo/beneficio.	91
Tabla 23. Proteínas identificadas en los secretomas de <i>A. niger</i> LBM 134 crecido en medios optimizados con bagazos de caña de azúcar y de mandioca y en sus sobrenadantes controles. Las proteínas se ordenan según su abundancia relativa en el secretoma.	99
Tabla 24. Azúcares liberados (mgmL^{-1}) en los ensayos de hidrólisis del bagazo de caña de azúcar pretratado utilizando el sobrenadante optimizado de <i>A. niger</i> LBM 134 crecido en bagazo de caña de azúcar.	120
Tabla 25. Azúcares liberados (mgmL^{-1}) en los ensayos de hidrólisis del bagazo de mandioca pretratado utilizando el sobrenadante optimizado de <i>A. niger</i> LBM 134 crecido en bagazo de mandioca.	121

Lista de Figuras

Página

Figura 1. Residuos lignocelulósicos de la región noreste argentino, particularmente de Misiones. a) Distribución de las plantaciones forestales en Argentina (tomado de Uasuf & Hilbert, 2012). b) Distribución de las plantaciones forestales de la provincia de Misiones (tomado de Uasuf & Hilbert, 2012). c) Cosecha de caña de azúcar en la provincia de Misiones. d) Plantaciones de mandioca en Misiones e) Cosecha de mandioca en Misiones.	6
Figura 2. Principales componentes y estructura de la biomasa lignocelulosa. (Tomado de Isikgor & Becer, 2015 con modificaciones).	7

- Figura 3. Esquema de la producción global de bioetanol de segunda generación (2G) a partir de residuos lignocelulósicos.** (Tomado de Gurdo, 2016). **11**
- Figura 4. Enzimas del complejo xilanolítico.** EX, endo-1,4- β -xilanasas; ER, extremo reductor; ENR; extremo no reductor (Tomado de Gupta *et al.*, 2016 con modificaciones). **18**
- Figura 5. Estructura típica del conidióforo de especies de *Aspergillus*.** **a)** Conidióforos; **b)** cabezas conidiales. (Tomado de Abarca, 2000 con modificaciones). **c)** Colonia de *Aspergillus*, **d)** cabeza conidial observada al microscopio y **e)** al microscopio electrónico de barrido (Autoría propia). **23**
- Figura 6. Selva Paranaense y Yungas.** **a)** Mapa de distribución de la Selva Paranaense (NEA argentino) y de las Yungas (NOA argentino) (Tomado de Fundación ProYungas, 2019). **b)** y **c)** Fotos de la Selva Paranaense (Tomado de Phillip Capper, 2011 y de la Unidad de Manejo del Sistema de Evaluación Forestal -UMSEF- del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sustentable -MAyDS-, 2019, respectivamente). **d)** y **e)** Fotos de las Yungas (Tomado de Fiona Brown, ProYungas, 2019 y de Juan Pablo Moro, ProYungas, 2019). **25**
- Figura 7. Localidades de recolección.** **a)** Mapa de Misiones. **b)** Mapa físico-político de Misiones, los *pinos* representan la zona de recolección de los aislamientos: *pine* rojo, Posadas; *pine* amarillo, Santo Pipó; *pine* violeta, Leandro N. Alem; *pine* naranja, Aristóbulo del Valle. **33**
- Figura 8. Aislamiento de hongos *Aspergillus* de Misiones.** Características macroscópicas (derecha) y microscópicas (izquierda) de los hongos del género *Aspergillus* aislados en suelo, hojas, madera y frutas en descomposición en Misiones. Los aislados crecieron en placas de PDA por 7 días. Las cabezas conidiales, característica de este género, se indican con una flecha. **60**
- Figura 9. Actividad EX de los aislamientos de *Aspergillus* durante 20 días de incubación.** Cada barra representa el total de la actividad EX de un aislamiento (LBM) y los diferentes colores corresponden la actividad EX proporcional a cada día de incubación determinada en los sobrenadantes de los aislamientos. **62**
- Figura 10. Mejor actividad EX de cada aislamiento de *Aspergillus*.** Actividad EX determinada en los sobrenadantes de los 25 aislamientos de *Aspergillus* evaluados y de *T. atroviride* LBM 117 utilizado como control positivo. Los días arriba de las barras significan los días de mayor actividad EX. **63**
- Figura 11. Mejor actividad BXL de cada aislamiento de *Aspergillus*.** Actividad BXL determinada en los sobrenadantes de los 25 aislamientos de *Aspergillus* evaluados y de *T. atroviride* LBM 117 utilizado como control positivo el día 12 de incubación. **64**
- Figura 12. Actividad proteolítica presente en los sobrenadantes de los aislamientos de *Aspergillus* y de *T. atroviride* LBM 117 (control positivo).** **a)** Actividad caseína-proteasa determinada en ensayos de placa de leche descremada 1 % (p/v) el día de mayor actividad EX y BXL y **b)** actividad **65**

gelatina-proteasa en ensayos de placa de gelatina 1 % (p/v) en *buffer* acetato de sodio 0,05 M pH 4,8. Se utilizó el sobrenadante que presentó mayor actividad EX de cada aislamiento fúngico.

- Figura 13. PCA de las actividades enzimáticas de los aislamientos de *Aspergillus* y del control positivo.** a) Gráfico de las variables según los 2 primeros componentes principales, CP 1 y CP 2 para la actividad EX de los días que mostraron significancia estadística; del día 10 (EX día 10); del día 12 (EX día 12); del día 14 (EX día 14); del día 16 (EX día 16) y del día 20 (EX día 20); para la actividad BXL del mejor día de producción y para las actividades proteolíticas sobre gelatina y sobre caseína. b) Gráfico de posicionamiento de los aislamientos según los 2 primeros componentes principales, CP 1 y CP 2. Los aislamientos posicionados cerca de las variables presentan mayor influencia de estas. **68**
- Figura 14. Análisis de conglomerados de los aislamientos de *Aspergillus* y del control positivo.** La clasificación de los aislamientos se basó en sus actividades enzimáticas y se formaron 6 grupos con diferentes características. **69**
- Figura 15. Efecto de residuos agroindustriales y actividad EX.** Efecto de los bagazos de caña, mandioca, aserrines de pino y eucalipto (10 gL⁻¹) sobre la actividad EX de los aislamientos LBM 055 y LBM 134. **71**
- Figura 16. Efecto de bagazos y agitación sobre la EX de los aislamientos LBM 055 y 134.** Efecto de la agitación y de diferentes concentraciones de a) bagazo de caña de azúcar y b) de bagazo de mandioca sobre la actividad EX de los aislamientos. **72**
- Figura 17. Árbol de las secuencias concatenadas de ITS, Bt y CMD obtenido por el método NJ.** El alineamiento múltiple se realizó entre las secuencias de *Aspergillus* sp. LBM 134 (señalado con la flecha roja) y secuencias obtenidas de *GenBank* (NCBI) reportadas por Varga *et al.* (2011). El recuadro rojo muestra el *cluster* donde se ubica el aislamiento junto con el valor de *Bootstrap* correspondiente. **75**
- Figura 18. Árbol de las secuencias concatenadas de ITS, Bt y CMD obtenido por el método ML.** El alineamiento múltiple se realizó entre las secuencias de *Aspergillus* sp. LBM 134 (señalado con la flecha roja) y secuencias obtenidas de *GenBank* (NCBI) reportadas por Varga *et al.* (2011). El recuadro rojo muestra el *cluster* donde se ubica el aislamiento junto con el valor de *Bootstrap* correspondiente. **76**
- Figura 19. Macro-morfología y producción de ácido en medio CREA de *Aspergillus* sp. LBM 134.** El hongo se desarrolló durante 7 días en medio MEA a 25 °C a) anverso y b) reverso; CYA a 25 °C c) anverso y d) reverso; CYA a 30 °C e) anverso y f) reverso; CYA a 37 °C g) anverso y h) reverso; CYAS 25 °C i) anverso y j) reverso. Producción de ácido en medio CREA, k) placa con inóculo y l) placa sin inóculo. **78**
- Figura 20. Prueba de Ehrlich para la producción de ácido ciclopiazónico de *Aspergillus* sp. LBM 134.** Se utilizó el método del papel de filtro Whatman número 1. a) Micelio desarrollado en medio CYA de donde se extrajeron los **78**

tacos. **b)** El papel de filtro no exhibió anillos de color lo que evidenció la ausencia de reacción del aislamiento con el reactivo.

Figura 21. Micro-morfología de *Aspergillus* sp. LBM 134. **a)** Conidióforo a 10X, **b)** estípite y **c)** vesícula a 40X, **d)** y **e)** conidios a 1000X, **f)** y **g)** esclerocios vistos con lupa. **80**

Figura 22. Gráficos de Pareto para la actividad EX de *A. niger* LBM 134. El largo de las barras es proporcional al efecto estandarizado de la fuente de nitrógeno sobre la actividad EX del hongo. Estas fueron las variables estadísticamente significativas a un nivel de confianza del 95 %. EL, extracto de levadura; TB, tripteína bacteriológica; P, peptona; U, urea. **83**

Figura 23. Gráficos de superficie de respuesta para la actividad EX de *A. niger* LBM 134 crecido en medio con bagazo de caña de azúcar. Los gráficos muestran los efectos interactivos de **a)** extracto de levadura (EL) y tripteína bacteriológica (TB) cuando la concentración de peptona (P) se mantuvo fija en su nivel medio; **b)** los efectos de TB y P cuando la concentración de EL se mantuvo fija en su nivel medio; **c)** los efectos de EL y P cuando la concentración de TB se mantuvo fija en su nivel medio. **86**

Figura 24. Gráfico de superficie de respuesta para la actividad EX de *A. niger* LBM 134 crecido en medio con bagazo de mandioca. El gráfico muestra los efectos interactivos entre las dos variables optimizadas, peptona (P) y urea (U). **88**

Figura 25. Optimización de la concentración de inóculo y de las variables físicas para la actividad EX de *A. niger* LBM 134 en medios con bagazos de caña de azúcar y de mandioca. Efecto del pH, tamaño de partícula del sustrato, concentración de esporas, luz y temperatura sobre el hongo creciendo en medio optimizado con **a-d)** bagazo de caña de azúcar y **e-h)** con bagazo de mandioca. **90**

Figura 26. Temperatura óptima de la actividad EX de *A. niger* LBM 134, **a)** en sobrenadantes optimizado con bagazo de caña de azúcar y **b)** en sobrenadantes optimizado con bagazo de mandioca. **93**

Figura 27. pH óptimo de la actividad EX de *A. niger* LBM 134, **a)** en sobrenadantes optimizado con bagazo de caña de azúcar y **b)** en sobrenadantes con bagazo de mandioca. **94**

Figura 28. Termoestabilidad de la actividad EX de *A. niger* LBM 134. Estabilidad enzimática en el tiempo cuando se incubó a 4, 30, 40 y 50 °C los sobrenadantes optimizados de **a)** bagazo de caña de azúcar y **b)** bagazo de mandioca. El 100 % correspondió a 110 UmL⁻¹ en el caso del bagazo de caña y 158 UmL⁻¹ en el caso de del bagazo de mandioca. **94**

Figura 29. Estabilidad en pH de la actividad EX de *A. niger* LBM 134. Estabilidad enzimática en el tiempo cuando se incubó a pH 5, 6 y 7C los sobrenadantes optimizados de **a)** bagazo de caña de azúcar y **b)** bagazo de mandioca. El 100 % correspondió a 110 UmL⁻¹ en el caso del bagazo de caña y 158 UmL⁻¹ en el caso de del bagazo de mandioca. **95**

- Figura 30. Detección de EXs de *A. niger* LBM 134 en sobrenadantes optimizados y sus controles.** ND-PAGE en condiciones nativas utilizando tinción con Rojo Congo. Carril 1, carril 2 y carril 3, sobrenadantes provenientes del hongo crecido en medio optimizado con bagazo de mandioca; carril 4 y carril 5, sobrenadantes provenientes del hongo crecido en medio control de la optimización con bagazo de mandioca; carril 6 y carril 7, sobrenadantes del hongo crecido en medio control de la optimización con bagazo de caña de azúcar; carril 8, carril 9 y carril 10, sobrenadante del hongo crecido en medio optimizado con bagazo de caña de azúcar. Se sembraron 20 µg de proteínas/pocillo para cada condición evaluada. **96**
- Figura 31. Detección de proteínas totales de *A. niger* LBM 134 en sobrenadantes optimizados y sus controles.** SDS-PAGE utilizando tinción de nitrato de plata. Carril 1, carril 2 y carril 3, proteínas totales presentes en sobrenadantes del hongo crecido en medio optimizado con bagazo de mandioca por triplicado; carril 4, proteínas totales en el sobrenadante del hongo crecido en medio control de la optimización con bagazo de mandioca; carril 5, proteínas totales en el sobrenadante del hongo crecido en medio control de la optimización con bagazo de caña de azúcar; carril 6, carril 7 y carril 8, proteínas en sobrenadantes del hongo crecido en medio optimizado con bagazo de caña de azúcar. Se sembraron 20 µg de proteínas/pocillo de los sobrenadantes optimizados y 10 µg de proteínas/pocillo de los sobrenadantes controles. Carril 9, marcador de peso molecular en kDa (Kaleidoscope, BioRad). **98**
- Figura 32. Diagrama de Venn de los cuatro secretomas de *A. niger* LBM 134 crecido en los diferentes medios de cultivo.** Distribución de las 166 proteínas identificadas en los cuatro secretomas del hongo crecido en los diferentes medios: BCA, medio optimizado con bagazo de caña de azúcar; Control BCA, medio control del medio con bagazo de caña de azúcar; BM, medio optimizado con bagazo de mandioca; Control BM, medio control del medio con bagazo de mandioca. **106**
- Figura 33. Dispersión de las proteínas identificadas en los cuatro secretomas según su masa molecular (MM) y punto isoeléctrico (pI).** Las estrellas rojas corresponden a todas las proteínas presentes en los cuatro sobrenadantes, los provenientes de los medios optimizados con bagazo de caña de azúcar y bagazo de mandioca y los provenientes de los medios controles. **107**
- Figura 34. Cantidad de proteínas diferentes según su acción biológica identificadas en los cuatro secretomas de *A. niger* LBM 134.** Diferentes proteínas identificadas con actividad enzimática sobre los carbohidratos (CAZy), lípidos (lipasas), proteínas (proteolíticas) y lignina (ligninolíticas) del hongo crecido en los diferentes medios **a)** en medio optimizado con bagazo de caña de azúcar; **b)** en medio optimizado con bagazo de mandioca; **c)** control del medio con bagazo de caña de azúcar; **d)** medio control del medio con bagazo de mandioca. **108**
- Figura 35. Cantidad de proteínas diferentes según su modo de acción enzimático, identificadas en los secretomas de *A. niger* LBM 134 crecido en** **109**

los medios optimizados. a) crecido en medio optimizado con bagazo de caña de azúcar y b) crecido en medio optimizado con bagazo de mandioca.

Figura 36. Enzimas encargadas de la degradación de los componentes carbonados de la pared celular vegetal presentes en los secretomas de *A. niger* LBM 134 crecido en los medios optimizados. 111
Diferencia en número de las enzimas presentes en el secretoma del hongo crecido en los medios optimizados con a) bagazo de caña de azúcar y con b) bagazo de mandioca. Diferencia en abundancia relativa de las enzimas identificadas en los secretomas del hongo crecido en los medios optimizados con c) bagazo de caña de azúcar y con d) bagazo de mandioca.

Figura 37. Cantidad y proporción relativa de CAZy identificadas en los secretomas de *A. niger* LBM 134 crecido en los medios optimizados. 114
a) Distribución del número de enzimas GHs, CEs y PLs en cada familia GH detectadas en ambos secretomas del hongo crecido en los medios optimizados. b) Proporción relativa de las enzimas GHs de cada familia GH, de las enzimas CEs de cada familia CE y de las enzimas PLs de cada familia PL en ambos secretomas del hongo crecido en los medios optimizados. BCA, bagazo de caña de azúcar; BM, bagazo de mandioca.

Figura 38. Actividades enzimáticas de *A. niger* LBM 134 en los sobrenadantes optimizados con bagazo de caña de azúcar (BCA) y con bagazo de mandioca (BM). 115
El potencial hidrolítico de los sobrenadantes del hongo se evaluó en diferentes sustratos: EX, actividad endoxilanasas; BXL, actividad β -xilosidasa; FPasa, actividad papel de filtro; EG, actividad endoglucanasa; CBH, actividad celobiohidrolasa; BGL, actividad β -glucosidasa; PGasa, actividad poligalacturonasa. Los valores de las actividades enzimáticas se expresan en U mL^{-1} .

Figura 39. Estabilidad en temperatura y pH de las actividades enzimáticas en sobrenadantes optimizados con bagazo de caña de azúcar. 118
a) Estabilidad en temperatura de las actividades β -xilosidasa, FPasa y β -glucosidasa en el tiempo. b) Estabilidad en pH de las actividades β -xilosidasa, FPasa y β -glucosidasa en el tiempo. El 100 % de las actividades enzimáticas correspondieron 0,8; 0,351 y 0,29 U mL^{-1} para β -xilosidasa, FPasa y β -glucosidasa, respectivamente.

Figura 40. Estabilidad en temperatura y pH de las actividades enzimáticas en sobrenadantes optimizados con bagazo de mandioca. 118
a) Estabilidad en temperatura de las actividades β -xilosidasa, FPasa y β -glucosidasa en el tiempo. b) Estabilidad en pH de las actividades β -xilosidasa, FPasa y β -glucosidasa en el tiempo. El 100 % de las actividades enzimáticas correspondieron 0,8; 0,351 y 0,29 U mL^{-1} para β -xilosidasa, FPasa y β -glucosidasa, respectivamente.

Figura 41. Microfotografías de los bagazos de caña de azúcar y de mandioca utilizados en la aplicación de los sobrenadantes optimizados de *A. niger* LBM 134 crecidos en los mismos residuos. 123
a) Estructura particular del bagazo de caña de azúcar; b) estructura particular del bagazo de mandioca; c) bagazo de caña de azúcar tratado con solución alcalina de Na(OH) 0,85 % (p/v); d) bagazo de mandioca tratado con solución alcalina de Na(OH) 0,85 % (p/v); e)

bagazo de caña de azúcar luego de ser pretratado e hidrolizado con el sobrenadante de *A. niger* LBM 134 crecido en medio con bagazo de caña de azúcar; **f)** bagazo de mandioca luego de ser pretratado e hidrolizado con el sobrenadante de *A. niger* LBM 134 crecido en medio con bagazo mandioca; **g)** bagazo de caña de azúcar luego de ser pretratado e hidrolizado con enzimas comerciales; **h)** bagazo de mandioca luego de ser pretratado e hidrolizado con enzimas comerciales.

A grayscale scanning electron micrograph (SEM) showing a dense cluster of spherical spores, likely from the genus Aspergillus. The spores are arranged in a somewhat irregular, rounded mass. The background is out of focus, showing some faint structural elements.

**Producción de xilanasas a
partir de *Aspergillus* nativos
de Misiones (Argentina) y
su potencial aplicación en la
hidrólisis de residuos
agroindustriales**

Gabriela Verónica Díaz

Tesis doctoral

Año 2019

RESUMEN

Las industrias agroforestales en el mundo generan residuos lignocelulósicos que pueden ocasionar grandes problemas de polución. Estos residuos pueden aprovecharse como bajo el concepto de biorrefinería empleándose como materia prima de biocombustibles de segunda generación y como fuentes de carbono para el crecimiento de microorganismos y producción de cócteles enzimáticos. En esta tesis doctoral, se utilizaron residuos lignocelulósicos provenientes de las industrias agro-forestales locales de la provincia de Misiones (Argentina) para producir enzimas xilanasas a partir de hongos del género *Aspergillus* y también para llevar a cabo ensayos de hidrólisis enzimática para futura producción de bioetanol de segunda generación.

En primera instancia, se aislaron hongos del género *Aspergillus* de Misiones y se evaluaron en función de su capacidad xilanolítica y proteolítica encontrándose dos aislamientos promisorios con actividad xilanasa alta y actividad proteasa baja, LBM 055 y LBM 134. Posteriormente, se evaluó el efecto del bagazo de caña de azúcar, bagazo de mandioca, aserrín de pino y aserrín de eucalipto sobre la actividad endoxilanasas de ambos aislamientos seleccionados, eligiéndose el aislamiento LBM 134 por presentar mayores niveles de endoxilanasas cuando el hongo creció con bagazos. Este aislamiento se identificó de manera contundente como *Aspergillus niger* mediante un enfoque polifásico.

A. niger LBM 134 alcanzó niveles de endoxilanasas máximos de 110 U_{mL}⁻¹ y 160 U_{mL}⁻¹ cuando creció en medio con bagazo de caña de azúcar y mandioca, respectivamente, luego de optimizar las fuentes de nitrógeno en ambos medios de cultivo y las variables físicas de inoculación e incubación. Asimismo, la producción de endoxilanasas en estos medios resultó ser 20 veces más económica que producir la misma utilizando medio de cultivo con xilano comercial.

Los cócteles enzimáticos optimizados de *A. niger* LBM 134 se caracterizaron mediante análisis secretómico y se confirmó la capacidad de bioconversión del hongo ya que ambos secretomas presentaron una expresión diferencial de las enzimas encargadas de degradar los componentes carbonados de la pared celular vegetal. El secretoma del hongo crecido en medio optimizado con bagazo de caña de azúcar mostró un incremento de la cantidad de xilanasas mientras que, en el secretoma del hongo crecido en bagazo de mandioca se observó celulasas, amilasas y pectinasas en mayor cantidad. Por otra parte, los cócteles enzimáticos optimizados de *A. niger* LBM 134 se aplicaron en la hidrólisis de bagazo de caña de azúcar y de mandioca, obteniéndose niveles de azúcares fermentable superiores a los obtenidos con enzimas comerciales. Esto concluye que los niveles de actividad xilanasa y celulasa fueron suficientes para hidrolizar enzimáticamente los bagazos de caña de azúcar y de mandioca.

ABSTRACT

Agroforestry industries in the world generate lignocellulosic residues that can cause huge pollution problems. These residues can be exploited under the biorefinery concept as raw material for second generation biofuels and as carbon sources for microorganism's growth and enzyme production. In this PhD thesis, lignocellulosic residues from local agroforestry industries from Misiones (Argentina) were used to produce xylanase enzymes from *Aspergillus* fungi to carry out the enzymatic hydrolysis for future production of second-generation bioethanol.

Firstly, *Aspergillus* fungi were isolated from Misiones and were evaluated based on their xylanolytic and proteolytic capacity, being LBM 055 and LBM 134 the most promising isolates with high xylanase activity and low protease activity. Then, the effect of sugarcane bagasse, cassava bagasse, pine sawdust and eucalyptus sawdust on endoxylanase activity of both chosen isolates was evaluated. The isolate LBM 134 was selected due to the higher levels of endoxylanases when it grew with the bagasses and was identified as *Aspergillus niger* through a polyphasic approach.

After the optimization of nitrogen sources and physical variables, *A. niger* LBM 134 reached the highest levels of endoxylanases, 110 U mL⁻¹ and 160 U mL⁻¹, when it grew in media with sugarcane and cassava bagasse, respectively. These endoxylanase levels were 20 times cheaper than reaching the same enzyme levels with culture medium using commercial xylan.

Optimized enzyme cocktails from *A. niger* LBM 134 were characterized by a secretomic analysis and the bioconversion capacity of the fungus was confirmed since both secretomes showed a differential expression of enzymes involved in the degradation of carbonated components of vegetal cell walls. The secretome of the fungus grown on sugarcane bagasse showed an enhancement of xylanase enzymes while, in the secretome of the fungus grown on cassava bagasse, higher levels of cellulases, amylases and pectinases were observed. On the other hand, the optimized enzyme cocktails from *A. niger* LBM 134 were applied on the hydrolysis of sugarcane and cassava bagasses obtaining higher levels of fermentable sugars than the obtained with commercial enzymes. These results conclude that xylanase and cellulase activities were good enough to enzymatically hydrolyze the sugarcane and cassava bagasses.

ÍNDICE

Contenido

1. INTRODUCCIÓN	2
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1 Residuos lignocelulósicos	5
2.2 Bioconversión de polisacáridos a bioetanol	9
2.2.1 Problemáticas de la producción de bioetanol 2G	11
2.3 Hongos lignocelulolíticos	12
2.3.1 Enzimas encargadas de la degradación de la biomasa lignocelulósica	13
2.4 Xilanasas	17
2.4.1 Regulación transcripcional de las xilanasas	20
2.5 El género <i>Aspergillus</i> como potente productor de xilanasas	21
2.5.1 Importancia de la búsqueda de nuevos aislamientos de <i>Aspergillus</i> en la selva subtropical de Misiones	24
2.6 Dos perspectivas promisorias para la producción de bioetanol 2G a partir de residuos lignocelulósicos	25
2.6.1 Aumento de la producción de xilanasas mediante la optimización del medio de cultivo	26
2.6.2 Aumento de la eficiencia de la hidrólisis enzimática	27
3. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo general	30
3.2 Objetivos específicos	30
4. MATERIALES Y MÉTODOS	32
4.1 Aislamiento de hongos <i>Aspergillus</i> en Misiones y la evaluación de su capacidad xilanolítica y proteolítica	32
4.1.1 Aislamiento de hongos del género <i>Aspergillus</i> en Misiones.....	32
4.1.2 Organismos utilizados.....	33
4.1.3 Preparación del sustrato	34
4.1.4 Condiciones de cultivo para la evaluación cuantitativa xilanolítica y proteolítica	35
4.1.5 Determinación de la actividad xilanolítica	35
4.1.6 Determinación de la actividad proteolítica.....	36
4.1.7 Análisis estadísticos	36
4.2 Efecto de los residuos lignocelulósicos sobre la actividad EX de los aislamientos más promisorios	37
4.2.1 Preparación de los materiales lignocelulósicos.....	37
4.3.2 Condiciones de cultivo	37

- 4.2.3 Efecto de concentraciones de residuos lignocelulósicos sobre la actividad EX 38
- 4.2.4 Análisis estadísticos 38
- 4.2.5 Estudio costo/beneficio 38
- 4.3 Identificación polifásica del aislamiento seleccionado 39
 - 4.3.1 Extracción de ADN 39
 - 4.3.2 Obtención de las secuencias de interés 39
 - 4.3.3 Electroforesis en geles de agarosa 40
 - 4.3.4 Árboles de secuencias concatenadas 41
 - 4.3.5 Identificación polifásica 41
- 4.4 Evaluación del efecto de las variables nutricionales y físicas sobre la actividad EX del aislamiento seleccionado 42
 - 4.4.1 Cribado de fuentes de nitrógeno sobre la actividad EX del aislamiento elegido 42
 - 4.4.2 Optimización de las fuentes de nitrógeno para la actividad EX del hongo seleccionado 43
 - 4.4.3 Validación de los modelos estadísticos 45
 - 4.4.4 Evaluación del efecto de la concentración de inóculo y variables físicas sobre la actividad EX del hongo seleccionado 45
 - 4.4.5 Análisis estadísticos 46
 - 4.4.6 Estudio costo/beneficio: bagazos vs. xilano comercial 46
- 4.5 Caracterización de las enzimas con actividad EX presentes en los sobrenadantes optimizados 47
 - 4.5.1 Temperatura óptima 47
 - 4.5.2 pH óptimo 47
 - 4.5.3 Termoestabilidad 47
 - 4.5.4 Estabilidad en pH 48
 - 4.5.5 Análisis estadísticos 48
 - 4.5.6 Detección de proteínas con actividad EX en ND-PAGE 48
- 4.6 Caracterización de los sobrenadantes optimizados y controles 48
 - 4.6.1 Separación de las proteínas totales por SDS-PAGE 49
 - 4.6.2 Preparación de las muestras para análisis secretómico 50
 - 4.6.3 Espectrometría de masas 50
 - 4.6.4 Análisis de los datos 51
 - 4.6.5 Análisis funcional de los secretomas optimizados 52
- 4.7 Aplicación de los sobrenadantes optimizados en la hidrólisis de residuos agroindustriales 54
 - 4.7.1 Biomasa utilizada 54
 - 4.7.2 Determinación de la termoestabilidad de las actividades enzimáticas intervinientes en la hidrólisis 55

4.7.3 Ensayos de hidrólisis sobre residuos de caña de azúcar y de mandioca55

4.7.4 Rendimiento de la hidrólisis.....57

4.7.5 Estructura microscópica de los bagazos hidrolizados58

5. RESULTADOS60

5.1 Aislamiento de hongos *Aspergillus* en Misiones y su evaluación xilanolítica y proteolítica ..60

5.1.1 Aislamiento de hongos *Aspergillus* de Misiones60

5.1.2 Actividad xilanolítica de los aislamientos de *Aspergillus*61

5.1.3 Actividad proteolítica de los aislamientos de *Aspergillus*.....64

5.1.4 Selección de los aislamientos más promisorios mediante análisis multivariado66

5.2 Efecto de residuos lignocelulósicos sobre la actividad EX de los aislamientos más promisorios70

5.3 Identificación polifásica del aislamiento LBM 13474

5.3.1 Árboles de secuencias concatenadas74

5.3.2 Identificación polifásica76

5.4 Efecto de las fuentes de nitrógeno y físicas sobre la actividad EX de *A. niger* LBM 134.....80

5.4.1 Evaluación de las fuentes de nitrógeno para la actividad EX de *A. niger* LBM 134....80

5.4.2 Optimización de las fuentes de nitrógeno para la actividad EX de *A. niger* LBM 134 83

5.4.3 Optimización de la concentración del inóculo y de las variables físicas para la actividad EX de *A. niger* LBM 134.....89

5.4.4 Estudio costo/beneficio: bagazos vs. xilano comercial.....91

5.5 Caracterización de las enzimas con actividad EX presentes en los sobrenadantes optimizados.....92

5.5.1 Temperatura óptima de la actividad EX de las proteínas en los sobrenadantes optimizados92

5.5.2 pH óptimo de la actividad EX de las proteínas en los sobrenadantes optimizados ...93

5.5.3 Termoestabilidad de la actividad EX de las proteínas en los sobrenadantes optimizados94

5.5.4 pH estabilidad de la actividad EX de las proteínas en los sobrenadantes optimizados95

5.5.5 Proteínas con actividad EX de los sobrenadantes optimizados detectadas con ND-PAGE.....96

5.6 Caracterización de los sobrenadantes optimizados y sus controles97

5.6.1 Proteínas totales de los sobrenadantes optimizados detectadas con SDS-PAGE y tinción con plata.....97

5.6.2 Secreción de enzimas de *A. niger* LBM 134 crecido en bagazo de caña de azúcar y en bagazo de mandioca.....98

5.6.3 Análisis funcional de los secretomas de los sobrenadantes optimizados de *A. niger* LBM 134.....115

5.7 Aplicación de los sobrenadantes optimizados en la hidrólisis de bagazos de caña de azúcar y de mandioca..... 117

 5.7.1 Determinación de la termoestabilidad de las actividades enzimáticas intervinientes en la hidrólisis 117

 5.7.2 Pretratamiento alcalino de los bagazos de caña de azúcar y de mandioca 119

 5.7.3 Ensayos de hidrólisis de los bagazos de caña de azúcar y de mandioca 119

 5.7.4 Microscopía de electrónica de barrido 121

6. DISCUSIÓN..... 125

 6.1 Aislamiento de hongos *Aspergillus* en Misiones y evaluación de su capacidad xilanólítica 125

 6.2 Efecto de residuos lignocelulósicos sobre la actividad EX de los aislamientos más promisorios 129

 6.3 Identificación polifásica del aislamiento *Aspergillus* sp. LBM 134 131

 6.4 Efecto de fuentes de nitrógeno y variables físicas sobre la actividad EX de *A. niger* LBM 134 134

 6.5 Caracterización de las enzimas con actividad EX en los sobrenadantes optimizados 137

 6.6 Caracterización de los cócteles enzimáticos de los sobrenadantes optimizados..... 139

 6.7. Hidrólisis de los bagazos de caña de azúcar y de mandioca aplicando los sobrenadantes optimizados de *A. niger* LBM 134..... 147

7. CONCLUSIONES 152

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 155

A..... 155

D..... 158

I..... 162

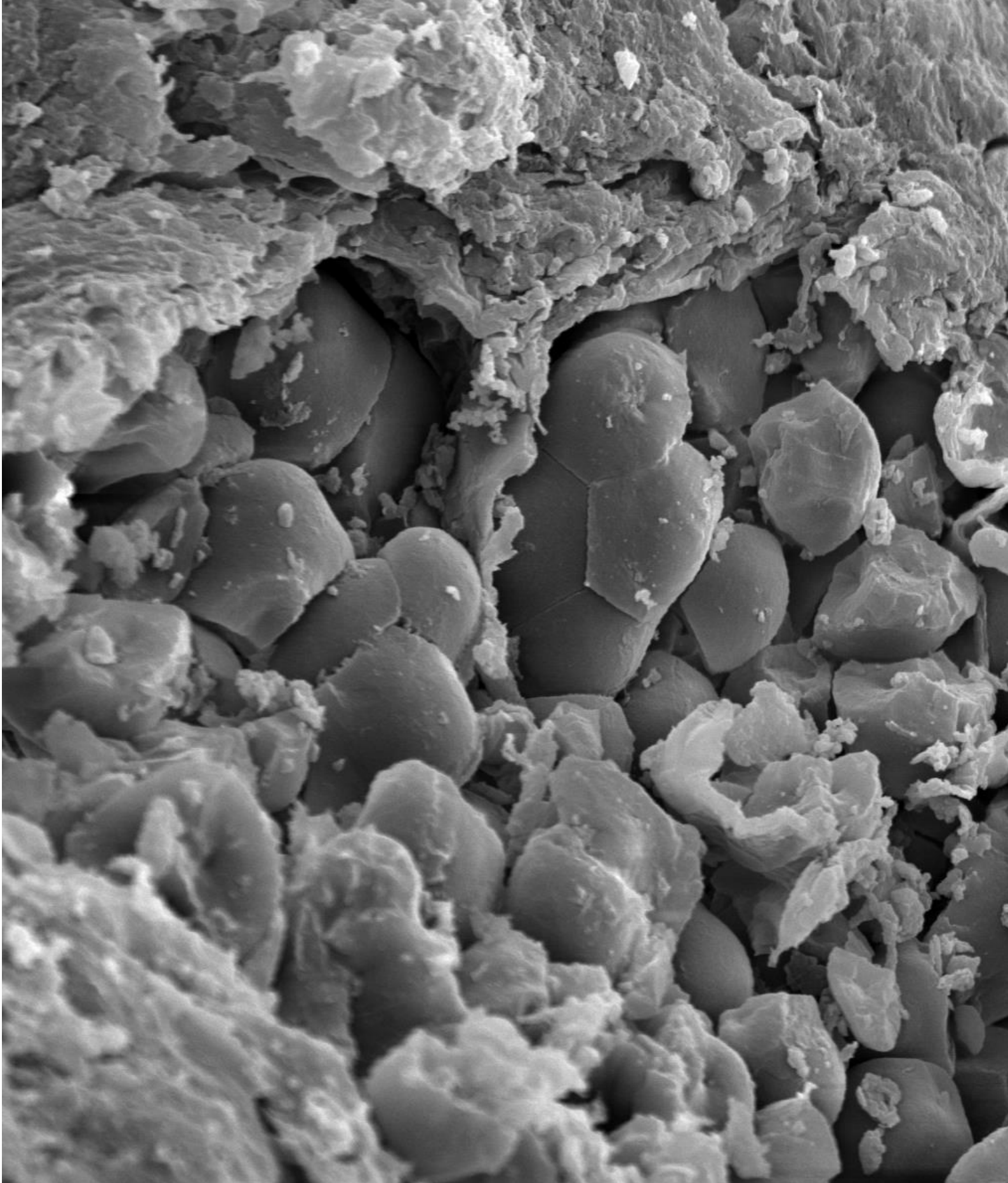
J..... 162

K..... 162

P..... 166

S..... 168

9. ANEXOS 173



INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

En cualquier región donde la economía se basa principalmente en la industria agroforestal, como ocurre en el noreste argentino, particularmente en Misiones, existe una abundante generación de residuos lignocelulósicos (Uasuf & Hilbert, 2012; Díaz *et al.*, 2019). En Misiones se generan en grandes cantidades, bagazos de caña de azúcar y de mandioca como así también aserrín de pino y de eucaliptus, los cuales tienen poco o ningún uso y se queman debido a la falta de espacio para almacenarlos, generando mayor contaminación de aire y deterioro del ambiente (Barchuk *et al.*, 2016).

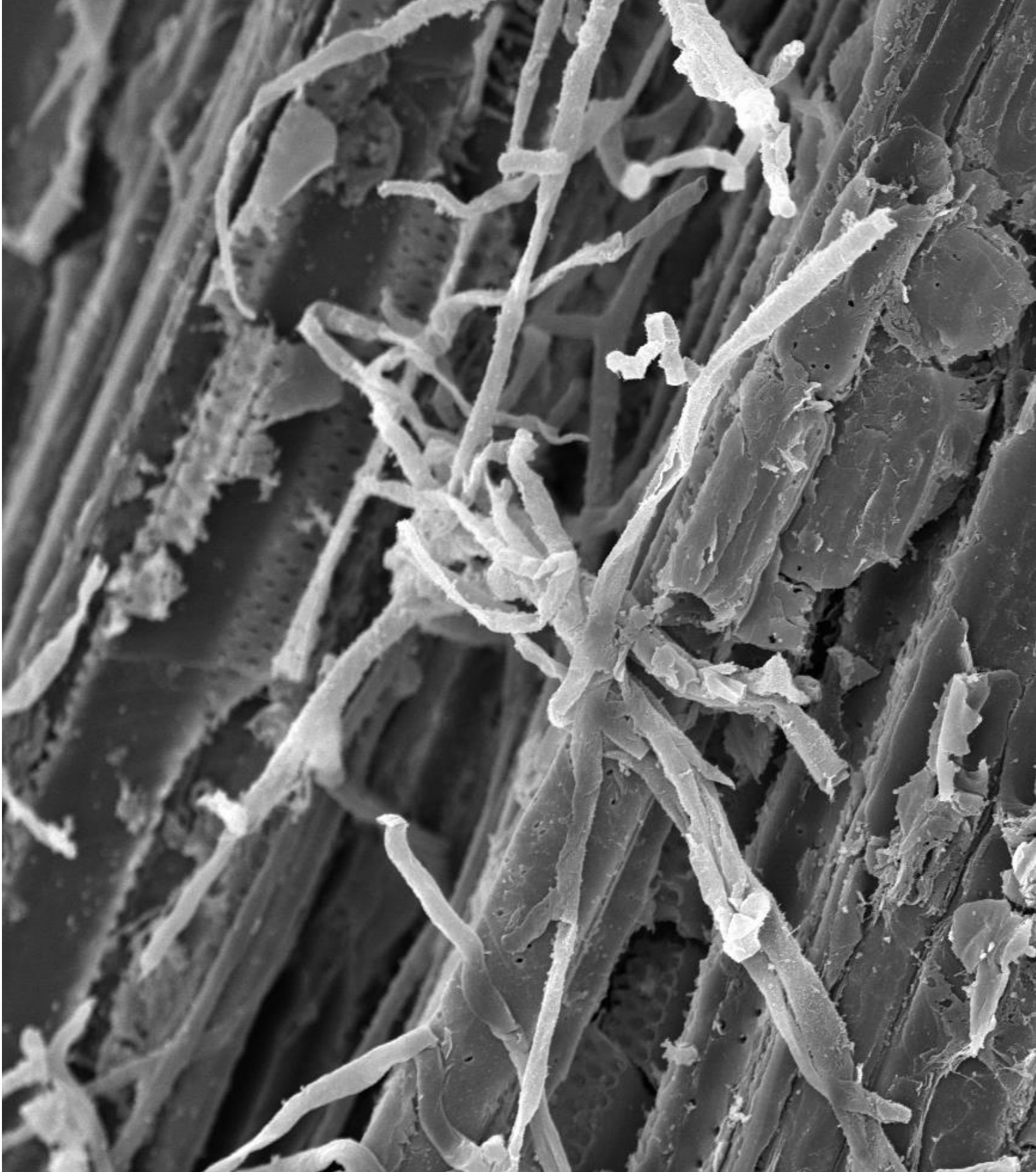
Los residuos lignocelulósicos pueden utilizarse para generar productos de valor agregado mediante aplicaciones biotecnológicas y tienen la característica común de contener alto contenido de azúcares polisacáridos, aproximadamente 75 % de su peso, (Van Dyk & Pletschke, 2012). Esta característica promovió en los últimos años investigaciones focalizadas en el uso de residuos lignocelulósicos para la producción de bioetanol de segunda generación (2G) como una de las estrategias más sobresalientes en el ámbito de las energías renovables (Bhattacharya *et al.*, 2015) para minimizar la necesidad de otras fuentes de energía y promover su utilización respetuosa con el medio ambiente (Nanda *et al.*, 2014).

Sin embargo, el bioetanol 2G presenta dos cuellos de botella principales para llevar a escala industrial su producción. El primero consiste en el pretratamiento de la biomasa lignocelulósica y el segundo en el costo de las enzimas hidrolíticas involucradas en la etapa de hidrólisis de los polisacáridos para generar los azúcares monosacáridos fermentables (Brijwani *et al.*, 2010). En este sentido, las enzimas xilanasas actúan en ambas etapas, en el pretratamiento y en la hidrólisis de los polisacáridos. Las xilanasas hidrolizan el xilano, el componente principal de la hemicelulosa que se encuentra entre la lignina y la celulosa. Por tanto, la acción enzimática de las xilanasas hidroliza el polisacárido de la hemicelulosa y por otro lado ayuda a que la remoción de la lignina sea más fácil.

Es por ello que las investigaciones sobre biocombustibles en los últimos tiempos se focalizan en optimizar el proceso de pretratamiento y reducir los costos de las enzimas hidrolíticas para emplearse en la hidrólisis enzimática de los residuos lignocelulósicos.

Una estrategia es emplear estos residuos como sustratos económicos para producir los cócteles de enzimas hidrolíticas, otorgándole mayor valor agregado a los residuos de las agroindustrias (Díaz *et al.*, 2019).

Sin embargo, aún falta mucho por comprender acerca de los sistemas hidrolíticos que degradan la lignocelulosa ya que es un proceso muy complejo en especial los de origen fúngico; la secreción de estas enzimas es muy dependiente del organismo en cuestión y de las condiciones ambientales (nutricionales y físicas) donde se encuentre (Martinez-Anaya *et al.*, 2008; Schneider *et al.*, 2016). La exploración de nuevos hábitats para encontrar aislamientos fúngicos capaces de degradar la lignocelulosa, el análisis de sus genomas, la minería de datos y el análisis proteómico de secretomas microbianos podrían abrir las puertas hacia nuevas enzimas y sacar a la luz interacciones y sinergias enzimáticas aún desconocidas (Bhattacharya *et al.*, 2015). Mejorar la actividad hidrolítica de hongos para optimizar la eficiencia de la hidrólisis enzimática se ha convertido en una prioridad en muchos estudios recientes (Kumar *et al.*, 2016). El ritmo actual de las investigaciones involucradas en estos ámbitos científicos generará más conocimiento en un futuro próximo que ayudará al progreso hacia una economía más verde y sostenible basada en carbohidratos (Singhania *et al.*, 2016).



MARCO TEÓRICO

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Residuos lignocelulósicos

La lignocelulosa es el componente mayoritario de la biomasa y es la fuente orgánica renovable más abundante de la tierra. La lignocelulosa se compone de celulosa, hemicelulosa y de lignina. En el mundo se producen grandes cantidades de lignocelulosa como residuos o basura a partir de las industrias agrícolas y forestales (Sánchez, 2009; Anwar *et al.*, 2014). El noreste argentino y Misiones más específicamente no son la excepción; en estas regiones continuamente se generan este tipo de residuos debido a que su economía se basa principalmente en la industria agroforestal (**Figura 1**) (Uasuf & Hilbert, 2012; Díaz *et al.*, 2019). En muchos lugares, los residuos lignocelulósicos no tienen uso alguno y se depositan deteriorando el ambiente o se queman por falta de espacio a cielo abierto contaminando el aire (Barchuk *et al.*, 2016; Díaz *et al.*, 2019). Como alternativa, estos residuos se pueden utilizar en aplicaciones biotecnológicas otorgándole valor agregado a dichos residuos.

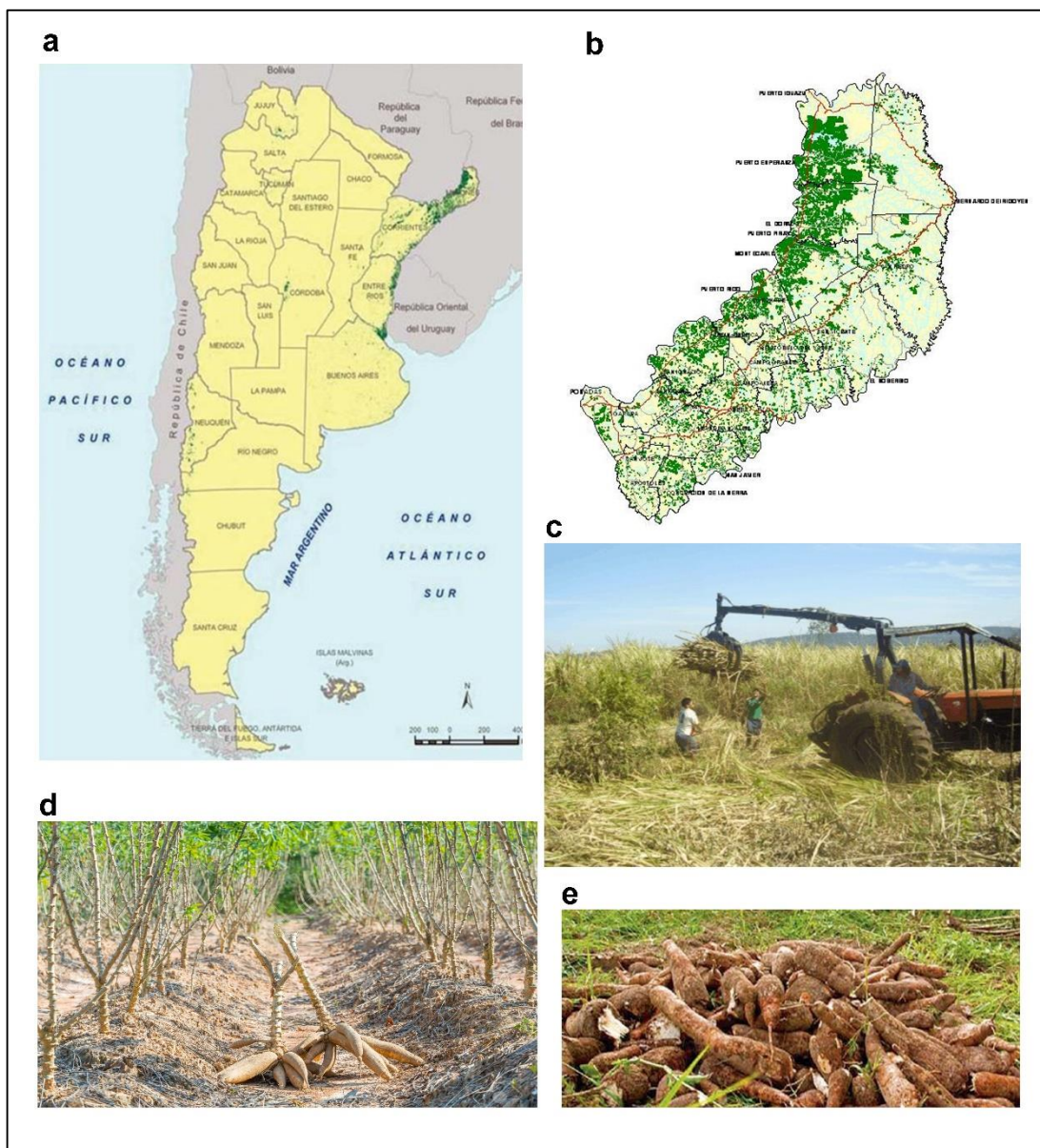


Figura 1. Residuos lignocelulósicos de la región noreste argentino, particularmente de Misiones. a) En verde se indica la distribución de las plantaciones forestales en Argentina (tomado de Uasuf & Hilbert, 2012). **b)** En verde se indica la distribución de las plantaciones forestales de la provincia de Misiones (tomado de Uasuf & Hilbert, 2012). **c)** Cosecha de caña de azúcar en la provincia de Misiones. **d)** Plantaciones de mandioca en Misiones **e)** Cosecha de mandioca en Misiones.

Los residuos lignocelulósicos comparten la característica común de poseer 75 % de polisacáridos (Van Dyk & Pletschke, 2012). La biomasa lignocelulósica se compone principalmente de celulosa (30 – 60 %), hemicelulosa (20 – 40 %) y lignina (10 – 25 %) (Isikgor & Becer, 2015) (**Figura 2**). La abundancia de estos polímeros varía de acuerdo a la fuente de biomasa, pero en general, constituyen aproximadamente el 90 % de la

materia seca en materiales lignocelulósicos, mientras que el resto se compone de cenizas y extractivos (Kumar *et al.*, 2016).

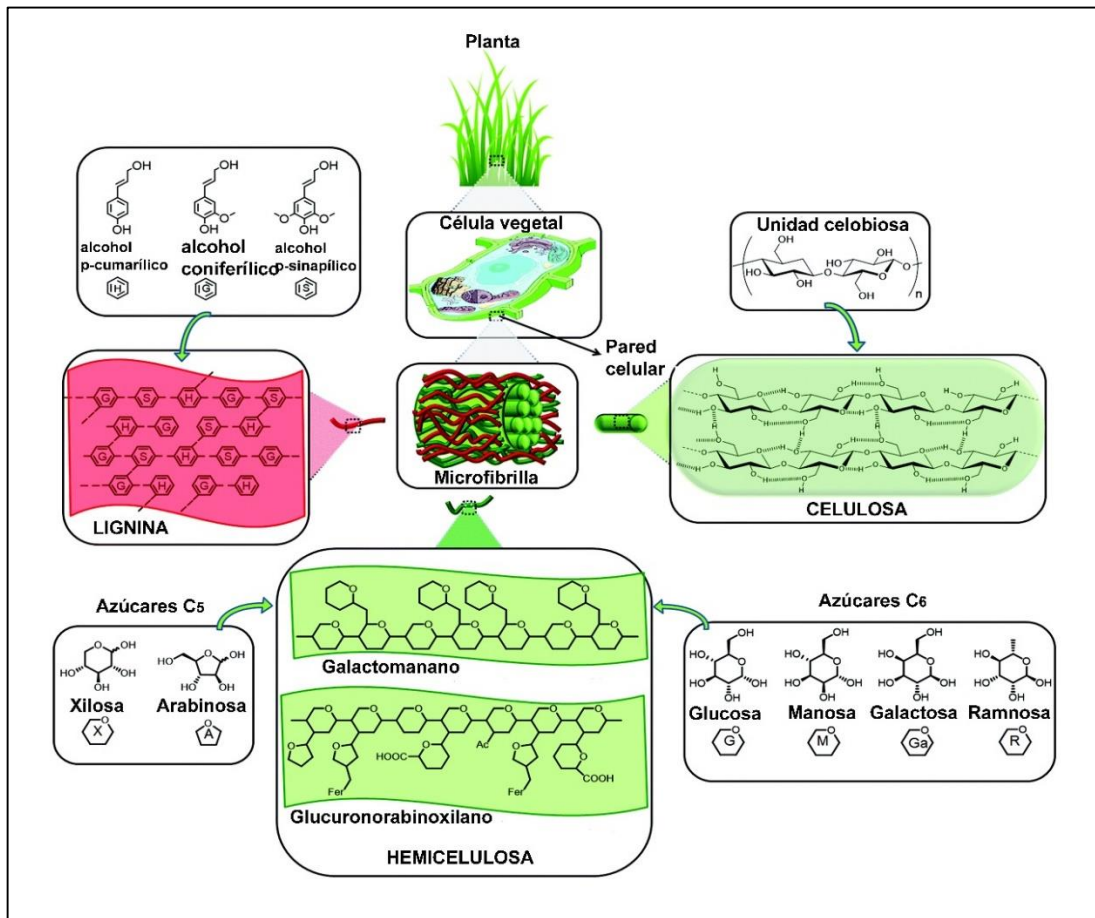


Figura 2. Principales componentes y estructura de la biomasa lignocelulosa. (Tomado de Isikgor & Becer, 2015 con modificaciones).

La celulosa es un homopolisacárido compuesto por cadenas lineales de unidades de D-glucosa unidas por enlaces β -1,4 glucosídicos, siendo la celobiosa (molécula de dos unidades de glucosa) la unidad que se repite (Baldrian & Valášková, 2008; Nanda *et al.*, 2014; Polizeli *et al.*, 2016). Los extremos del polímero son asimétricos, los que contienen el carbono anomérico (C1) libre de la molécula de glucosa pueden reducir a un número de oxidantes y se conocen como extremos reductores, mientras que el C4 con un radical hidroxilo libre es el extremo no reductor (Martínez-Anaya *et al.*, 2008). Las cadenas de celulosa están unidas mediante puentes de hidrógeno formando las microfibrillas, las cuales a su vez se unen para formar las fibras de celulosa. Esta estructura se mantiene gracias a un elevado número de puentes de hidrógeno y de interacciones de Van Der

Waals, que proporcionan en conjunto una unión muy fuerte, haciendo a la fibra de celulosa insoluble y muy resistente al ataque químico (Dashtban *et al.*, 2009). Además de contener regiones cristalinas (ordenadas) resistentes a la degradación, la celulosa también incluye regiones amorfas (desordenadas), más fáciles de degradar (Hendriks & Zeeman, 2009; Guerriero *et al.*, 2016; Coniglio *et al.*, 2017).

La hemicelulosa, con un peso molecular más bajo que la celulosa, es un heteropolisacárido formado por pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (glucosa, galactosa, manosa) y azúcares ácidos enlazados entre sí por enlaces β -1,4 glucosídicos y a veces β -1,3 glucosídicos. La hemicelulosa contiene cadenas laterales cortas constituidas por diferentes azúcares. En la naturaleza, la composición de la hemicelulosa puede variar dependiendo de la naturaleza de la planta (Sánchez, 2009; Sajith *et al.*, 2016); sin embargo, el xilano es el mayor componente estructural de la hemicelulosa y es el segundo polisacárido renovable más abundante en la naturaleza (Menon & Datta, 2017). Se trata de un polisacárido complejo que se encuentra en la interfase entre la lignina y la celulosa e interactúa con todos los componentes de la pared celular vegetal manteniendo así, la cohesión entre las fibras y la integridad de la pared celular (Collins, 2005; Kumar *et al.*, 2016).

El xilano constituye entre el 15 y 30 % de la madera proveniente de angiospermas, 7 a 10% de madera de gimnospermas y menos del 30% en plantas anuales. Típicamente se encuentra en la pared secundaria de las plantas, pero también puede hallarse en las paredes primarias, especialmente en monocotiledóneas (Collins *et al.*, 2005; Subramaniyan & Prema, 2002). Desde el punto de vista estructural, el xilano es un polímero lineal compuesto por subunidades de D-xilosa unidas por enlaces β -1,4 glicosídicos (Kulkarni *et al.*, 1999). Al igual que otros polisacáridos vegetales, el xilano presenta un elevado grado de sustituciones con grupos ácidos *O*-acetilos, α -L arabinofuranosilos, 4-*O*-metilglucurónicos y ácidos α -1,2-glucurónicos. El grado de sustitución del xilano depende de la fuente de origen (Kulkarni *et al.*, 1999; Subramaniyan & Prema, 2002; de Lemos Esteves *et al.*, 2004).

La lignina, el componente más recalcitrante del material lignocelulósico, es un heteropolímero amorfo, insoluble y ópticamente inactivo que consiste en unidades de fenil-propano que se organizan en una gran estructura de red tridimensional.

Generalmente contiene tres alcoholes aromáticos (alcohol coniferílico, alcohol sinapílico y alcohol p-cumarílico) (Perez *et al.*, 2002) aunque su proporción depende de la fuente de origen. La lignina está presente en las paredes celulares formando junto con la hemicelulosa una matriz amorfa en la cual las fibras de celulosa están embebidas y su papel principal es dar soporte estructural a la planta, impermeabilidad y resistencia al ataque microbiano y al estrés oxidativo (Hendriks & Zeeman, 2009; Shahzadi *et al.*, 2014).

2.2 Bioconversión de polisacáridos a bioetanol

Debido a la importancia de obtención de nuevas energías y a la necesidad de proteger el ambiente, preservar los recursos tanto renovables como no renovables y maximizar el potencial del uso de subproductos (residuos) agroindustriales, muchos países han iniciado investigaciones con el fin de encontrar fuentes de energía alternativas más amigables con el ambiente que puedan complementar a los combustibles fósiles. Argentina ha impulsado el uso de biocombustibles a través de la regulación impositiva a su producción, al desarrollo de tecnología para este fin y a través de legislaciones que regulan el paulatino incremento de las mezclas con los combustibles tradicionales. Los biocombustibles son todos aquellos combustibles derivados de la biomasa vegetal y se los clasifica en función del tipo de materia orgánica de la cual provienen (Ramos *et al.*, 2016). Los biocombustibles de primera generación se producen a partir de aceites o azúcares comestibles provenientes de plantas como maíz, caña de azúcar, girasol o soja. Si la planta de origen tiene alto contenido de azúcares, se los convierte en alcoholes por fermentación, por ejemplo, la producción de bioetanol a partir de caña de azúcar. Por otra parte, si la planta de origen es rica en grasas o aceites, se lleva a cabo una transesterificación donde se combinan estos aceites con un alcohol y se generan ésteres grasos, como el biodiésel (Ramos *et al.*, 2016). Centrando el enfoque en el bioetanol, este ha emergido como buen candidato ya que satisface de manera eficiente las inquietudes detalladas previamente. El bioetanol es una energía renovable (Jeuland *et al.*, 2004) que puede reducir las emisiones de gas que provocan el efecto invernadero ya que es un componente libre de compuestos aromáticos, benceno y azufre (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006; Ramos *et al.*, 2016). Sin embargo, la obtención de bioetanol de

primera generación utiliza como materia prima cultivos con fines alimenticios lo que presenta cierta controversia. Por una parte, el costo de su elaboración es relativamente alto, lo cual hace difícil la competencia con los combustibles fósiles y, por otra parte, su producción podría requerir el empleo de las tierras destinadas a cultivos agrícolas.

Por ello, una estrategia alternativa muy interesante son los biocombustibles de segunda generación, los cuales se obtienen con materias primas no aprovechables para alimentación humana, como residuos agrícolas y forestales, eliminando el conflicto con las tierras destinadas a cultivo alimenticio (Sun & Cheng, 2002; Ramos *et al.*, 2016). Esto convierte a los biocombustibles de segunda generación en una fuente de energía económicamente eficiente, sustentable y renovable (Himmel *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2019). Respecto al aprovechamiento de la biomasa de residuos lignocelulósicos, el combustible líquido que más se ha desarrollado en estos últimos años como posible sustituto de la gasolina es el bioetanol 2G. La producción de este último requiere de la bioconversión del material lignocelulósico, es decir, la conversión de los polisacáridos (celulosa y hemicelulosa) a sus azúcares monoméricos (Hernández-Melchor *et al.*, 2019). La producción convencional de este tipo de bioetanol conlleva cuatro pasos de procesamiento: un pretratamiento inicial del material lignocelulósico para su delignificación, una posterior hidrólisis de las celulosa y hemicelulosa a azúcares fácilmente metabolizables para su fermentación y finalmente, la separación-purificación de los productos (Dashtban *et al.*, 2009) (**Figura 3**).

Durante el pretratamiento, la delignificación se lleva a cabo la despolimerización y solubilización de la hemicelulosa exponiendo las fibras de celulosa para hacerlas más accesibles a las enzimas celulasas (Alvira *et al.*, 2010). El pretratamiento permite un mejor proceso de hidrólisis y de fermentación; existen diferentes alternativas de esta etapa pudiendo ser mecánicos, térmicos, físico-químicos, químicos, biológicos o una combinación de más de uno de ellos (Modig *et al.*, 2008; Alvira *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2017).

La siguiente etapa al pretratamiento es la hidrólisis de la celulosa y hemicelulosa para obtener sus azúcares monoméricos constituyentes. Al igual que la etapa anterior, la hidrólisis puede llevar a cabo mediante diferentes procesos siendo los más utilizados los ácidos y los enzimáticos. En cualquier caso, se obtiene un hidrolizado compuesto

principalmente por monosacáridos solubles que luego serán fermentados a alcohol (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006).

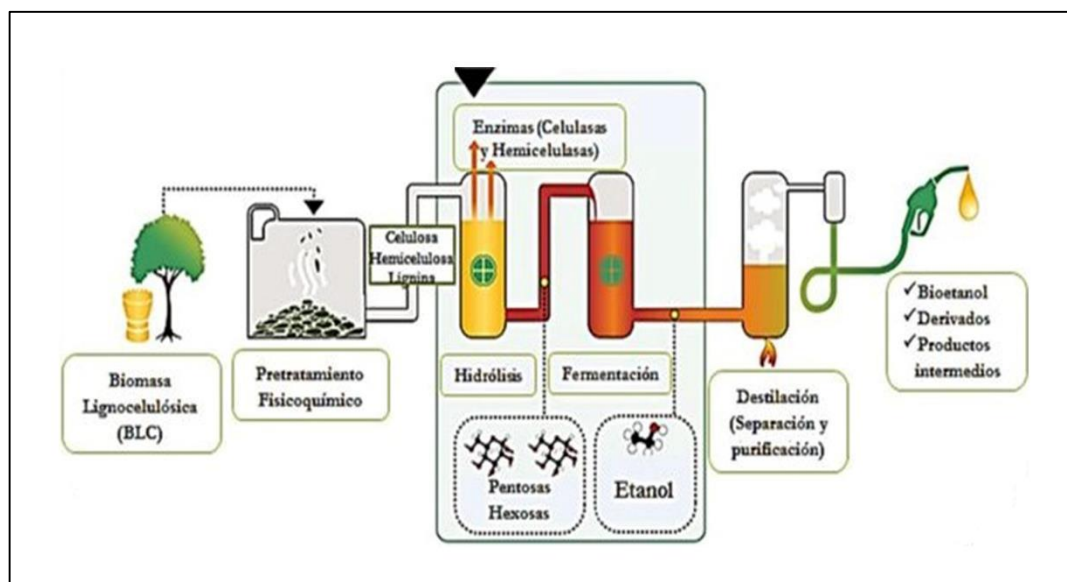


Figura 3. Esquema de la producción global de bioetanol de segunda generación (2G) a partir de residuos lignocelulósicos. (Tomado de Gurdo, 2016).

La fermentación alcohólica es un proceso biológico que algunos microorganismos llevan a cabo en ausencia de aire; procesan los azúcares y de esta reacción generan como productos moléculas de etanol, dióxido de carbono y ATP que son consumidas por los microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico (Sánchez-Riaño *et al.*, 2010; Barchuk, 2017; Russel *et al.*, 2019). Los microorganismos más estudiados para utilizarse en esta etapa han sido las levaduras debido a las ventajas que las mismas ofrecen; son de bajo costo de producción, de fácil adquisición y crecimiento (Gil *et al.*, 2006; Karimi *et al.*, 2006; Barchuk, 2017).

2.2.1 Problemáticas de la producción de bioetanol 2G

Llevar a escala industrial la producción de bioetanol 2G presenta dos cuellos de botella principales, por un lado, involucra la etapa de pretratamiento y, por otro lado, el costo de las enzimas necesarias para la hidrólisis. Respecto al pretratamiento, este debe

ser lo suficientemente fuerte como para remover la lignina y lo adecuadamente específico para no degradar los polisacáridos ya que son importantes para la etapa siguiente, la hidrólisis. A su vez, el pretratamiento resulta una etapa clave en el proceso global ya que su eficiencia condicionará el rendimiento de azúcares fermentables obtenidos en la hidrólisis (Sarkar *et al.*, 2012; Kubicek & Kubicek, 2016; Menon & Datta, 2017).

En relación a las enzimas que llevan a cabo la hidrólisis de la celulosa y la hemicelulosa, se utilizan comúnmente enzimas comerciales. En Argentina, estas son muy costosas ya que no existen actualmente industrias nacionales que las produzcan; por tanto, estas deben importarse. Por otra parte, los sustratos convencionales utilizados para la producción de estas enzimas son de alta pureza y de igual manera deben importarse aumentando así el costo de la producción enzimática. Para dar solución a estos inconvenientes, durante décadas se ha investigado la producción de enzimas y en los últimos años se ha enfatizado en el uso de residuos lignocelulósicos como sustratos económicos para el crecimiento de organismos con el fin de maximizar la secreción de enzimas involucradas en la hidrólisis (Juturu & Wu, 2012; Burlacu *et al.*, 2016a). Por otra parte, numerosas investigaciones se han enfocado en el estudio de organismos aislados de ambientes naturales y cultivados en el laboratorio, empleando diferentes metodologías para la producción enzimática con un rendimiento óptimo (Bertrandt *et al.*, 2017).

2.3 Hongos lignocelulolíticos

Los hongos son organismos ubicuos en la naturaleza y los principales descomponedores de la biomasa lignocelulósica gracias a su gran superficie de contacto con el ambiente externo y capacidad de producir enzimas extracelulares (Hatakka *et al.*, 1989; Arias-Carbajal *et al.*, 2005; Štursová *et al.*, 2012). Según el tipo de enzimas que produzcan, los hongos degradan diferentes componentes de la lignocelulosa utilizándolos como fuentes de energía y según el tipo de pudrición que causan sobre la madera se clasifican en hongos de pudrición blanca, parda y blanda (Soliman *et al.*, 2013; Manavalan *et al.*, 2015; Andlar *et al.*, 2018).

Los hongos de pudrición blanca son los únicos organismos capaces de degradar la lignina y los carbohidratos de la madera debido a que poseen un consorcio de enzimas lignocelulolíticas. Su nombre se debe a que dejan un residuo blanquecino que queda luego de la degradación completa de la lignina (Karaman *et al.*, 2012). Los hongos de pudrición parda degradan la celulosa y la hemicelulosa dejando la lignina más o menos intacta en forma de estructuras marrones en la superficie de la madera, a menudo agrietadas y en forma de ladrillos apilados. Este tipo de hongos degradan los polisacáridos mediante radicales libres OH altamente reactivos. Los hongos de pudrición blanda pertenecen al *phylum* Ascomycota y descomponen la celulosa y la hemicelulosa con efecto escaso o nulo sobre la lignina; producen cadenas típicas de cavidades en la pared celular vegetal (Karaman *et al.*, 2012; Andlar *et al.*, 2018).

Los ascomicetos de pudrición blanda por lo general son aislados de reservas forestales y naturales; producen altos niveles de expresión y secreción enzimática que actúan cooperativamente y aseguran la despolimerización completa de la celulosa y hemicelulosa. Para llevar a cabo exitosamente la bioconversión de la celulosa y hemicelulosa, los hongos de pudrición blanda producen y secretan enzimas celulasas y hemicelulasas, respectivamente. Se ha aprovechado estas enzimas en muchas aplicaciones biotecnológicas siendo la hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos en la producción de bioetanol 2G, una de las más estudiadas (Gupta *et al.*, 2016; Menon & Datta, 2017).

2.3.1 Enzimas encargadas de la degradación de la biomasa lignocelulósica

Los hongos lignocelulolíticos pueden descomponer la biomasa lignocelulósica gracias a la amplia variedad de enzimas que producen y secretan. Asimismo, los sistemas enzimáticos extracelulares involucran dos tipos de enzimas; las hidrolíticas responsables de la degradación de los polisacáridos y las oxidativas encargadas de degradar la lignina y anillos fenólicos abiertos (Andlar *et al.*, 2018).

Oxidativas encargadas de la degradación de la lignina

La degradación de la lignina es un proceso oxidativo atribuido principalmente al metabolismo secundario. Para ello, los hongos secretan un grupo de enzimas

ligninolíticas que catalizan la oxidación; entre las principales se encuentran las **lacasas** (**Lac**, EC 1.10.3.2), **lignino peroxidasas** (**LiP**, EC 1.11.1.14), **manganeso peroxidasas** (**MnP**, EC 1.11.1.13) y las **peroxidasas versátiles** (**VP**) (Andlar *et al.*, 2018).

Las Lac son enzimas multicobre azules, con múltiples sitios de unión al cobre capaces de oxidar compuestos fenólicos; su dominio de unión al cobre está altamente conservado (Baldrian, 2006; Andlar *et al.*, 2018). La acción catalítica de las Lac consiste en la oxidación de p-difenoles en presencia de oxígeno, pudiendo degradar una amplia variedad de sustratos (Mayer & Harel 1979; Dean & Eriksson, 1994). Las Lac se pueden dividir en dos grandes grupos en función de su fuente de origen, de plantas superiores y de hongos (Mayer & Staples, 2002). La mayoría de las Lac de origen fúngico son del tipo secretoras, se producen en las células y luego son secretadas, pudiendo ser constitutivas o inducibles (Mougin *et al.*, 2003; Fonseca, 2012).

Las LiP son glicoproteínas monoméricas que contienen un grupo hemo como grupo prostético con un peso molecular de 38 a 43 kDa (Tien & Kirk, 1983; Messner, 1998). Estas enzimas catalizan la oxidación de compuestos aromáticos fenólicos y no fenólicos generando radicales libres en una reacción en cadena, llamada “combustión enzimática” en la cual la lignina se despolimeriza y los anillos aromáticos se abren dando lugar a la formación de productos aromáticos y alifáticos (Glen *et al.*, 1983; Fonseca, 2012).

Las MnP poseen pesos moleculares entre 38 a 62,5 kDa y presenta varias isoformas con diferentes puntos isoeléctricos, usualmente ácidos (pH 3-4) (Hofrichter, 2002). Las MnP oxidan compuestos fenólicos generando radicales fenoxidos por la acción del peróxido de hidrógeno que actúa como oxidante (Field *et al.*, 1992). El mecanismo de acción catalítica de las MnP es similar al de las LiP, aunque en el caso de las MnP involucra la oxidación del Mn (II) a Mn (III) (Archibald, 1992; Machii *et al.*, 2004; Andlar *et al.*, 2018). En todos los casos, las LiP y las MnP requieren peróxido de hidrógeno, que deben ser generados por el hongo a través de enzimas accesorias, como la glucosa oxidasa, a la glioxal oxidasa y a la aril alcohol oxidasa (Fonseca, 2012; Andlar *et al.*, 2018).

Hidrolíticas responsables de la degradación de los polisacáridos vegetales

Los polisacáridos que se encuentran en la biomasa son distintos y difieren su composición según la fuente de origen. Entre los principales polisacáridos podemos citar

a la celulosa, hemicelulosa, almidón y pectina. La hidrólisis completa de estos polisacáridos requiere de la acción de enzimas con diferentes especificidades y modos de acción, celulasas, hemicelulasas, pectinasas, amilasas, respectivamente.

La utilización de la celulosa insoluble como tal requiere de la acción de múltiples enzimas. Los hongos capaces de degradar la celulosa completamente producen un arreglo de enzimas con diferentes especificidades que en conjunto reciben el nombre de celulasas (Andlar *et al.*, 2018). Entre las celulasas principales se encuentran las **endo-1,4- β -glucanasas (EG, EC 3.2.1.4)**, **celobiohidrolasas (CBH)** y **β -glucosidasas (BGL, EC 3.2.1.21)**. Las EG, también llamadas CMCasas por el sustrato artificial carboximetilcelulosa (CMC) usado para medir la actividad enzimática, atacan las regiones amorfas e hidrolizan los enlaces β -1,4-glucosídicos internos en la cadena de celulosa, proporcionando extremos reductores y no reductores de celooligosacáridos. Las CBH avanzan a lo largo de la celulosa e hidrolizan las unidades de celobiosa de los extremos reductores (CBHI, EC 3.2.1.176) y no reductores (CBHII, EC 3.2.1.91); actuando en colaboración para degradar la celulosa cristalina. Las BGL hidrolizan la celobiosa a glucosa y también escinden unidades de glucosa de celooligosacáridos (Behera *et al.*, 2017).

Recientemente se han descubierto enzimas de tipo oxidativas que aumentan la degradación de la celulosa (Andlar *et al.*, 2018). Entre estas enzimas de actividad auxiliar (AA), se encuentran las **monooxigenasas líticas de polisacáridos (LPMO del inglés, *Lytic Polysaccharide Monooxygenases*)** las cuales aumentan la actividad celulolítica porque escinden la celulosa por oxidación de carbono C-1, C-4 y C-6 en hidrólisis lignocelulósica (Wu *et al.*, 2013). Las **celobiosa deshidrogenasas (CDH, EC 1.1.99.18)** son otras clases de AA que aumenta la degradación de la celulosa mediante el acoplamiento de la oxidación de la celobiosa a la actividad de las monooxigenasas (Polizeli *et al.*, 2016).

Enfocándonos en la degradación de la hemicelulosa, se requiere un *pool* importante de enzimas **hemicelulasas** que actúan de manera dinámica y cooperativa tanto en el espacio como en el tiempo provocando cambios en la organización de la pared celular vegetal y degradando los polímeros a sus azúcares constituyentes (Gupta *et al.*, 2016; Andlar *et al.*, 2018). Esta acción sinérgica de es necesaria no sólo por la complejidad de

la hemicelulosa, sino también por la conexión de esta con otros componentes de la pared celular vegetal (Andlar *et al.*, 2018). Según la acción de las hemicelulasas, se distinguen dos tipos de enzimas principales que actúan sobre el xilano, **las endo-1,4- β -xilanasas (EX, EC 3.2.1.8)** y las **β -xilosidasas (BXL, EC 3.2.1.37)** descritas en mayor detalle en la *sección 2.4*.

Otras hemicelulasas que juegan un rol clave son las **β -mananasas (EC 3.2.1.78)** principalmente en la hidrólisis del manano, el mayor componente de la hemicelulosa en las maderas blandas (Andlar *et al.*, 2018). Estas enzimas hidrolizan los enlaces β -1,4 del manano produciendo extremos reductores y no reductores; esta acción hidrolítica se completa con la ocurrencia de las enzimas **β -manosidasas (EC 3.2.1.25)** dando como resultado residuos de manano (Andlar *et al.*, 2018). Si el manano se encuentra unido a residuos de glucosa, entran en juego otras enzimas llamadas β -glucosidasas que degradan los enlaces entre la manosa y glucosa (Moreira & Filho, 2008).

Existen otras hemicelulasas accesorias que actúan sinérgicamente para ayudar a degradar el xilano y el manano. Estas enzimas son las acetilxilano esterasas (EC 3.1.1.72), las feruloil esterasas (EC 3.1.1.73), las p-coumaroil esterasas (EC 3.1.1.B10), α -l-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55), xilano α -1,2-glucuronosidase (EC 3.2.1.131) y las α -glucuronidasas (EC 3.2.1.139).

Otro de los polisacáridos más abundantes en la naturaleza es el almidón, es una principal reserva de carbohidratos. El mismo se compone de la amilosa, un polímero lineal de unidades de glucosa unidas por enlaces α -1,6 y de la amilopectina, cadenas ramificadas de glucosa unidas por enlaces α -1,4 (Kumar & Chakravarty). Las enzimas encargadas de hidrolizar el almidón son conjuntamente llamadas **amilasas** y aquellas provenientes de microorganismos se clasifican en dos grupos según su mecanismo de acción, en **α -amilasas (EC 3.2.1.1)** y **glucoamilasas (EC 3.2.1.3)**. Las α -amilasas son enzimas extracelulares que rompen aleatoriamente los enlaces 1,4- α -glucosídicos entre las unidades de glucosa de la amilosa. Las glucoamilasas hidrolizan de manera sucesiva unidades de glucosa de los extremos no reductores de la amilosa y amilopectina (John, 2017).

La presencia de enzimas **pectinasas** que despolimerizan la pectina y sus sustituyentes de las cadenas laterales aumentan en algunos casos la hidrólisis de la lignocelulosa

(Gupta *et al.*, 2016). La pectina es un heteropolisacárido ácido coloidal con alta diversidad estructural y consiste principalmente en ácidos α -1,4-D-galacturónicos (GalA) (Wang *et al.*, 2018). Las pectinasas representan una mezcla de enzimas que incluyen las **pectato liasas (PL)**, **poligalacturonasas (PG, EC. 3.2.1.15)** y las **pectinesterasas (PE, EC 3.1.1.11)** y posicionado como biocatalizadores eco-amigables en la era biotecnológica actual (Amin *et al.*, 2019). Las PE catalizan los grupos metoxilos de la pectina formando ácido péctico. Las PG y PL causan la degradación de los enlaces del pectato y pectina por diferentes mecanismos acción enzimática (Amin *et al.*, 2019).

2.4 Xilanasas

Se ha descrito anteriormente que, entre las hemicelulasas, las xilanasas han sido foco de investigación debido a que se tratan de las enzimas encargadas de degradar el componente principal de la hemicelulosa, el xilano (Dhiman & Mukherjee, 2018). Las xilanasas son enzimas ubicuas en la naturaleza que, además, de su acción en la hidrólisis de la hemicelulosa, ayuda de manera indirecta a la remoción de la lignina ya que esta última se encuentra ligada a la hemicelulosa. Esta acción enzimática daría solución al problema del pretratamiento de la producción de bioetanol 2G planteado previamente (Juturu & Wu, 2012; Singh *et al.*, 2019).

Con el fin de emplear biocatalizadores eco-amigables, los investigadores han aplicado xilanasas en numerosos procesos industriales (Menon & Datta, 2017; Dhiman & Mukherjee, 2018; Singh *et al.*, 2019). Se trata de un grupo de enzimas con diferentes modos de acción y especificidades (**Figura 4**). Las principales son las EX que escinden los enlaces 1,4- β -glucosídicos del esqueleto principal del xilano generando xilooligosacáridos. Las enzimas α -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55), α -D-glucuronidasas (EC 3.2.1.139), acetilxilano esterasas (EC 3.1.1.72), ácido ferúlico esterasas (EC 3.1.1.73) y ácido *p*-coumárico esterasas (EC 3.1.1.-) degradan los enlaces de los grupos laterales de los xilooligosacáridos dando como resultado moléculas de xilotriosas (moléculas de tres monómeros de xilosa) y de xilobiosas (moléculas de dos monómeros de xilosa). Estos productos últimos son blanco enzimático de las BXL que escinden los enlaces de las xilotriosas y xilobiosas generando los monómeros de xilosa.

En un principio, las xilanasas se clasificaron en función de su masa molecular (MM) y punto isoeléctrico (pI); sin embargo, la complejidad que sobrevino al descubrimiento de muchas secuencias proteicas y génicas, llevó a un cambio de clasificación. Actualmente, las xilanasas se clasifican dentro del sistema CAZy (enzimas activas sobre carbohidratos, del inglés *Carbohydrate-Active EnZymes database*, <http://www.cazy.org>). Según este sistema, las xilanasas se clasifican dentro de las familias glicosil hidrolasas o glicosidasas (GH) 5, 7, 8, 9, 10, 11, 16, 26, 30, 43, 44, 51 y 62 (Collins *et al.*, 2005; Kolenová *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2019) cuyos miembros difieren en sus propiedades físico-químicas, estructura de plegamiento, mecanismo de acción y especificidad de sustrato (Collins *et al.*, 2005; Kolenová *et al.*, 2006). Con respecto a la especificidad de sustrato, los miembros de las familias GH 5, GH 7 y GH 8 poseen además actividad celulasa mientras que, las xilanasas se reportan típicamente dentro de las familias GH 10 y GH 11 (Collins *et al.*, 2005).

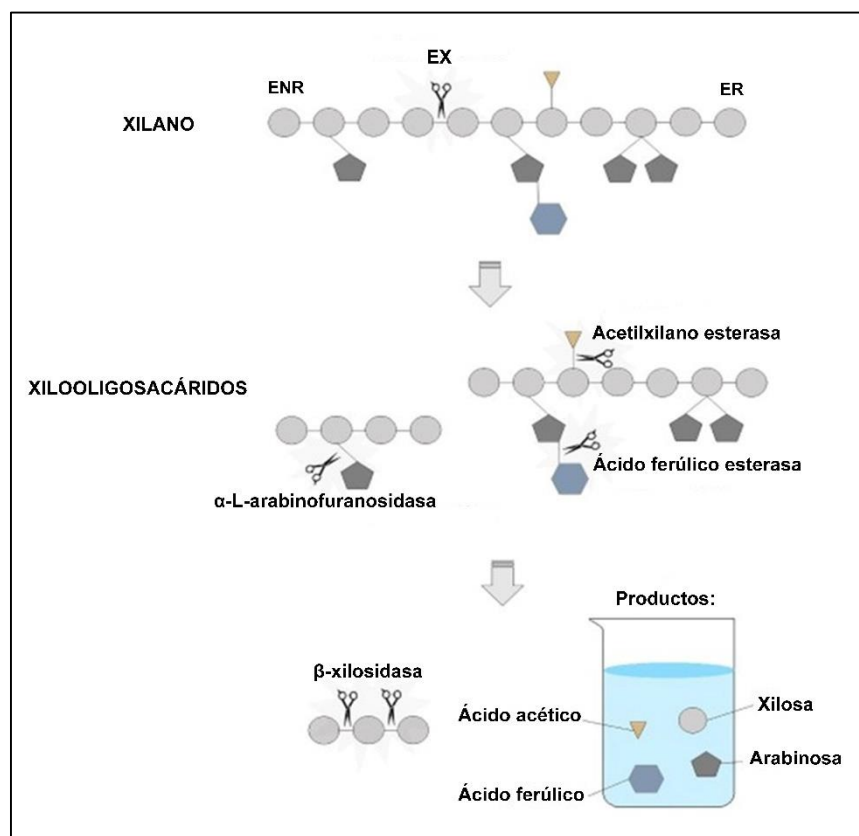


Figura 4. Enzimas del complejo xilanolítico. EX, endo-1,4-β-xilanasasa; ER, extremo reductor; ENR; extremo no reductor (Tomado de Gupta *et al.*, 2016 con modificaciones).

La mayoría de las xilanasas de la familia GH 10 son altamente activas sobre xilooligosacáridos cortos; pudiendo también hidrolizar sustratos celulósicos de bajo peso molecular. Los miembros de esta familia se caracterizan por tener peso molecular alto, punto isoeléctrico bajo y presentar una estructura cerrada formada por láminas α y β y un dominio glicosil-hidrolasa cóncavo con cinco sitios de unión xilopiranosos. Los sitios catalíticos se encuentran cercanos al extremo carboxi-terminal de su estructura (Chen *et al.*, 2009; Collins *et al.*, 2005; Dhiman *et al.*, 2008).

La familia 11 es monoespecífica, constituida únicamente por verdaderas xilanasas, ya que estas son activas exclusivamente sobre sustratos xilanolíticos. Los miembros de esta familia presentan generalmente peso molecular bajo, punto isoeléctrico alto y se caracterizan por tener un dominio glicosil-hidrolasa formado por 2 pliegues de láminas β alrededor del sitio activo. Cada uno de esos pliegues expone 2 o 3 láminas hidrofóbicas que rodean el sitio hidrofílico activo. Presentan una sola hélice α ubicada en la cara hidrofóbica junto a las láminas β (Kulkarni *et al.*, 1999; Subramaniyan & Prema, 2002; Collins *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009).

Dentro del complejo xilanolítico, las EX y BXL, conjuntamente llamadas xilanasas, son las enzimas clave para la hidrólisis completa del xilano (Burlacu *et al.*, 2016a; Menon & Datta, 2017). Inclusive, se considera que las EX pueden llevar a cabo la degradación completa del xilano aún en ausencia de BXL. Las EX son proteínas monoméricas con masas moleculares y puntos isoeléctricos que oscilan en un amplio rango de acuerdo a la familia a la cual pertenecen. Existen EX con masas moleculares entre 8 y 145 kDa y con puntos isoeléctricos entre 3 y 10. El rango de pH óptimo para la actividad catalítica de las EX se encuentra entre 4 y 7, mientras que el rango de temperatura óptima se encuentra entre 40 y 60 °C (Wong *et al.*, 1988; Kulkarni *et al.*, 1999; Cuyvers *et al.*, 2011). La glicosilación en las EX es un proceso común, lo cual otorga mayor estabilidad enzimática a las EX frente a ambientes extremos. Este fenómeno también contribuiría a la multiplicidad de endoxilanasas (Kulkarni *et al.*, 1999).

2.4.1 Regulación transcripcional de las xilanasas

En general, la biosíntesis de xilanasas está sujeta a regulación transcripcional por la fuente de carbono disponible. Los genes son altamente inducidos en presencia de xilano y de sus productos hidrolizados (Khucharoenphaisan *et al.*, 2010); mientras que son reprimidos cuando la glucosa está presente (Kulkarni *et al.*, 1999; Kumar & Naraian, 2019). Sin embargo, el xilano es un polisacárido complejo de peso molecular alto y no puede penetrar la membrana celular (Biely *et al.*, 1980; Dhiman *et al.*, 2008).

El mecanismo propuesto de regulación para la biosíntesis de xilanasas involucra la degradación del xilano por xilanasas constitutivas lo que produce moléculas de xilooligosacáridos y xilobiosas y el pasaje de estas hacia el interior de la célula. Estas moléculas en el interior celular inducen a otros genes de xilanasas; como consecuencia, las xilanasas inducidas degradan nuevamente el xilano a xilooligosacáridos y xilobiosas. Por su parte, las β -xilosidasas constitutivas y/o inducidas convierten las xilobiosas a monómeros de xilosas, la cual es tomada por la célula. La xilosa actúa como un inductor adicional de genes que codifican para xilanasas (Kulkarni *et al.*, 1999).

La inducción de xilanasas es un fenómeno complejo y el nivel de respuesta a un inductor particular varía según el organismo; un inductor que provoca una actividad xilanasas máxima en una especie, puede actuar como inhibidor de la actividad enzimática en otra. Se trata de un proceso especie-específico y concentración dependiente (Biely *et al.*, 1980; Kulkarni *et al.*, 1999; Dhiman *et al.*, 2008; Kumar & Naraian, 2019). Cuando los inductores se encuentran en concentraciones bajas, la inducción es efectiva; mientras que cuando sus niveles son altos, el efecto inductor es menor debido a la represión catabólica mediada por los productos degradados (Biely *et al.*, 1980; Díaz *et al.*, 2016).

Otro fenómeno observado comúnmente en la biosíntesis de xilanasas es la represión catabólica por glucosa, la cual puede deberse a dos mecanismos de control: un control directo y uno indirecto. El control directo sucede a través de la represión de la transcripción génica y el indirecto mediante la represión del activador transcripcional (Mach *et al.*, 1996; Kulkarni *et al.*, 1999).

2.5 El género *Aspergillus* como potente productor de xilanasas

Del reino Fungi, los géneros *Aspergillus* (Gottschalk *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2016), *Trichoderma* (Kaur *et al.*, 2005; Da Cunha *et al.*, 2013) y *Penicillium* (Collins *et al.* 2005; Bajaj *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2019) encabezan la producción de xilanasas ya que poseen sistemas xilanolíticos completos, con todas las enzimas necesarias para la degradación del xilano. Por ello, las xilanasas que se comercializan en Estados Unidos, Canadá, Dinamarca, Irlanda, Alemania, Finlandia y Japón provienen comúnmente de hongos como *Aspergillus niger* y especies de *Trichoderma* (Bajpai, 2004; Polizeli *et al.*, 2005; Harris & Ramalingam, 2010; Singh *et al.*, 2019).

Además de presentarse a los hongos del género *Aspergillus* como potentes productores de enzimas EX y BXL; están muy bien caracterizado (Knob *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2018). Su importancia industrial se debe a que las xilanasas que estos producen son enzimas extracelulares (Singh *et al.*, 2019). *Aspergillus* es un género de hongos filamentosos cosmopolitas, capaces de desarrollarse en una gran variedad de sustratos naturales y bajo un amplio rango de condiciones medioambientales, creciendo desde las regiones frías hasta los trópicos. Se trata de uno de los géneros más estudiados por su relevancia en la investigación básica, la micología médica, de alimentos, así como en los sectores agrícola e industrial (Samson *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2017).

El nombre *Aspergillus* fue introducido en 1729 por el botánico y sacerdote Pier Antonio Micheli, quien observó el parecido de la estructura microscópica del hongo con un *aspergillum* (elemento utilizado en las liturgias católicas para rociar agua) (Micheli, 1729). Casi dos siglos más tarde se publicó la primera monografía importante del género (Thom & Church, 1926) y para entonces *Aspergillus* ya se posicionaba como uno de los grupos de hongos más conocidos y estudiados (Bennett, 2010). Entre los estudios que fueron publicados, el de mayor repercusión indudablemente fue el realizado por Raper & Fennell en 1965 que reconocía 150 especies divididas en 18 grupos. Sin embargo, esta clasificación debía ser adaptada a la nomenclatura que establecía el Código Internacional de Nomenclatura Botánica. De esta forma, las especies descritas se clasificaron en subgéneros y secciones, el esquema de clasificación empleado desde entonces (Raper & Fennell, 1965; Gams *et al.*, 1986). Actualmente, dentro del género

Aspergillus se reconocen oficialmente más de 340 especies distribuidas en 4 subgéneros y 19 secciones (Samson *et al.*, 2014, Houbraken *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2017).

Los hongos del género *Aspergillus* se caracterizan por producir hifas especializadas denominadas conidióforos sobre los que se posicionan las células conidiógenas o fiálides las cuales originan las esporas sexuales o conidios (Abarca, 2000). Los conidióforos poseen tres partes bien diferenciadas: la vesícula (apical), el estípite (sección ubicada debajo la vesícula) y la célula pie (sección final). Sobre la vesícula se posicionan las fiálides, aunque algunas especies pueden presentar, entre estas dos, una tercera célula denominada métula. Esta característica permite distinguir a las especies de *Aspergillus* como uniseriadas y/o biseriadas (**Figura 5**) (Abarca, 2000). Hay estructuras que solo algunas especies presentan: el cleistotecio, estructura esférica/semiesférica que corresponde al estado teleomórfico o de reproducción sexual; células de Hülle, estructuras esféricas de paredes gruesas que se disponen en forma terminal o intercalar en las hifas; y los esclerocios, estructuras de micelio compacto con función de reserva (Raper & Fennell, 1965, Klich & Pitt, 1988; Kozakiewicz, 1989).

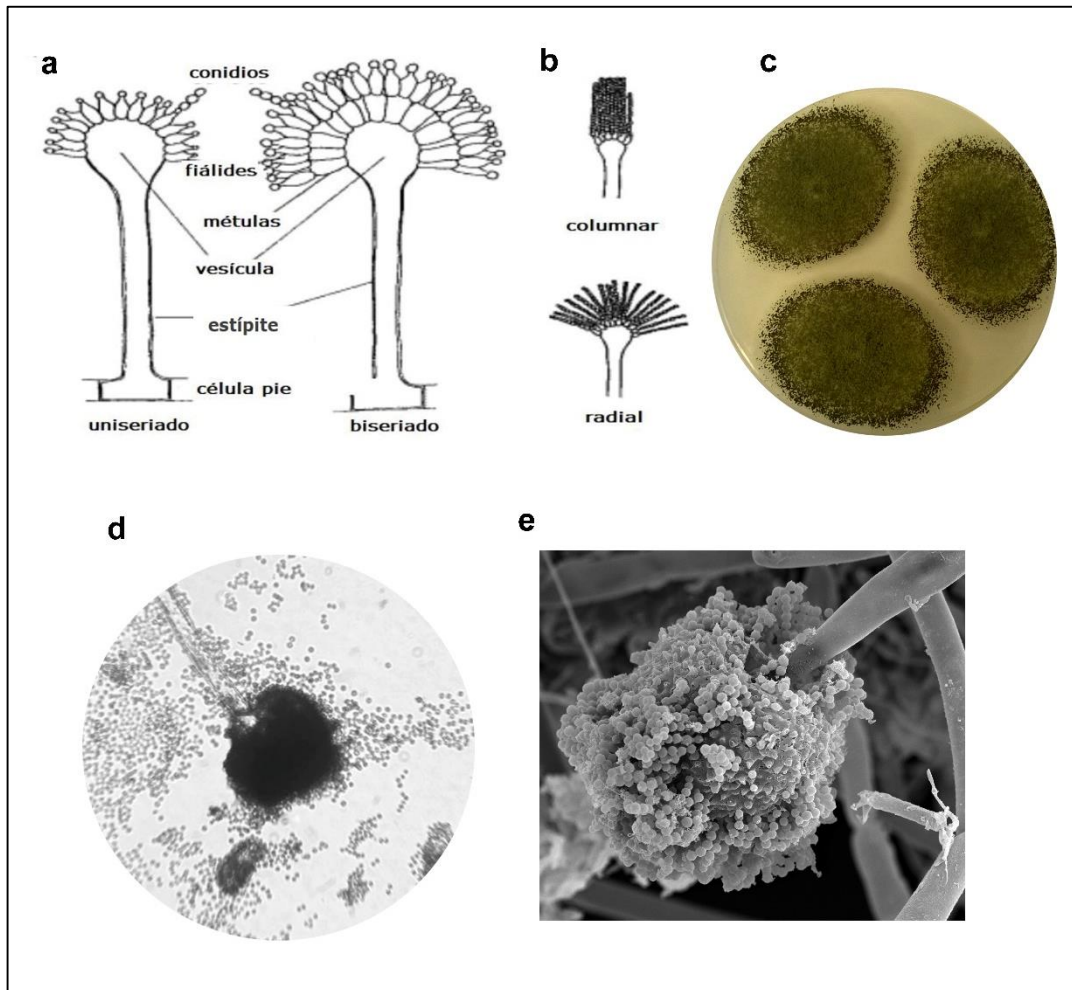


Figura 5. Estructura típica del conidióforo de especies de *Aspergillus*. a) Conidióforos; b) cabezas conidiales. (Tomado de Abarca, 2000 con modificaciones). c) Colonia de *Aspergillus*, d) cabeza conidial observada al microscopio y e) al microscopio electrónico de barrido (Autoría propia).

Las características que poseen las especies de *Aspergillus* permitieron utilizarlos en procesos muy diversos desde tiempos muy remotos y en distintas partes del mundo. Son utilizados en la elaboración de alimentos y bebidas fermentadas, y como productores de enzimas hidrolíticas y ácidos orgánicos para aplicación industrial (Park *et al.*, 2017). La fermentación de alimentos y bebidas es una técnica milenaria que emplea microorganismos y alimentos ricos en carbohidratos. En este aspecto, *A. oryzae*, *A. sojae* y *A. luchuensis* se emplean para producir alimentos tradicionales asiáticos mediante la fermentación de almidón de arroz, soja y miso. *A. flavus* y *A. niger* también se emplean para fermentar mandioca y este fermento es la base de distintos platos tradicionales de África (Bennett, 2010; Park *et al.*, 2017).

Por otro lado, las especies de *Aspergillus* son importantes productores de enzimas y ácidos orgánicos. Las enzimas hidrolíticas demostraron ser una alternativa más económica y respetuosa con el medio ambiente en comparación al del uso de productos químicos en el área industrial (Sohail *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2017). Dentro de las enzimas hidrolíticas, las xilanasas se encargan de descomponer la hemicelulosa de la biomasa y son biocatalizadores focales por su naturaleza compleja y aplicación industrial extendida (Kuhad *et al.*, 2011) siendo la industria del bioetanol, la aplicación más popular que se investiga actualmente (Kuhad *et al.*, 2011; Singhania *et al.*, 2016).

2.5.1 Importancia de la búsqueda de nuevos aislamientos de *Aspergillus* en la selva subtropical de Misiones

Lograr detectar y caracterizar bacterias enzimáticas xilanasas es de gran importancia en biotecnología ya que permite la degradación completa del componente mayoritario de la hemicelulosa para la obtención de bioetanol y se presenta como una estrategia de menor impacto ambiental y mucho más específica en comparación a otros métodos utilizados habitualmente. Por esto, es esencial obtener sistemas xilanolíticos eficaces y una manera de lograrlo es buscando nuevos aislamientos fúngicos en regiones con amplia biodiversidad. La selva subtropical de Misiones es una de los sistemas más biodiversos de la tierra (Brown *et al.*, 2002; Coniglio *et al.*, 2017). Ello la convierte en una zona favorable para realizar dicha búsqueda y encontrar nuevos aislamientos con capacidad xilanolítica (Saparrat *et al.*, 2002; Gil 2007; Levin *et al.*, 2007; Fonseca *et al.*, 2010).

Esta eco-región se encuentra en el noreste de Argentina junto al Bosque Atlántico de Brasil (Rubio, 2014) y tiene un clima subtropical con temperaturas medias de 19-24 °C durante todo el año y lluvias anuales que varían entre 1000 y 2200 mm (Grassi *et al.*, 2016). La selva subtropical tiene una superficie de área de 29.800 km² y junto a las Yungas (selva de montaña del noroeste argentino), representan menos del 2 % de Argentina continental y contienen más del 50 % de la biodiversidad del país (**Figura 6**) (Rubio, 2014).

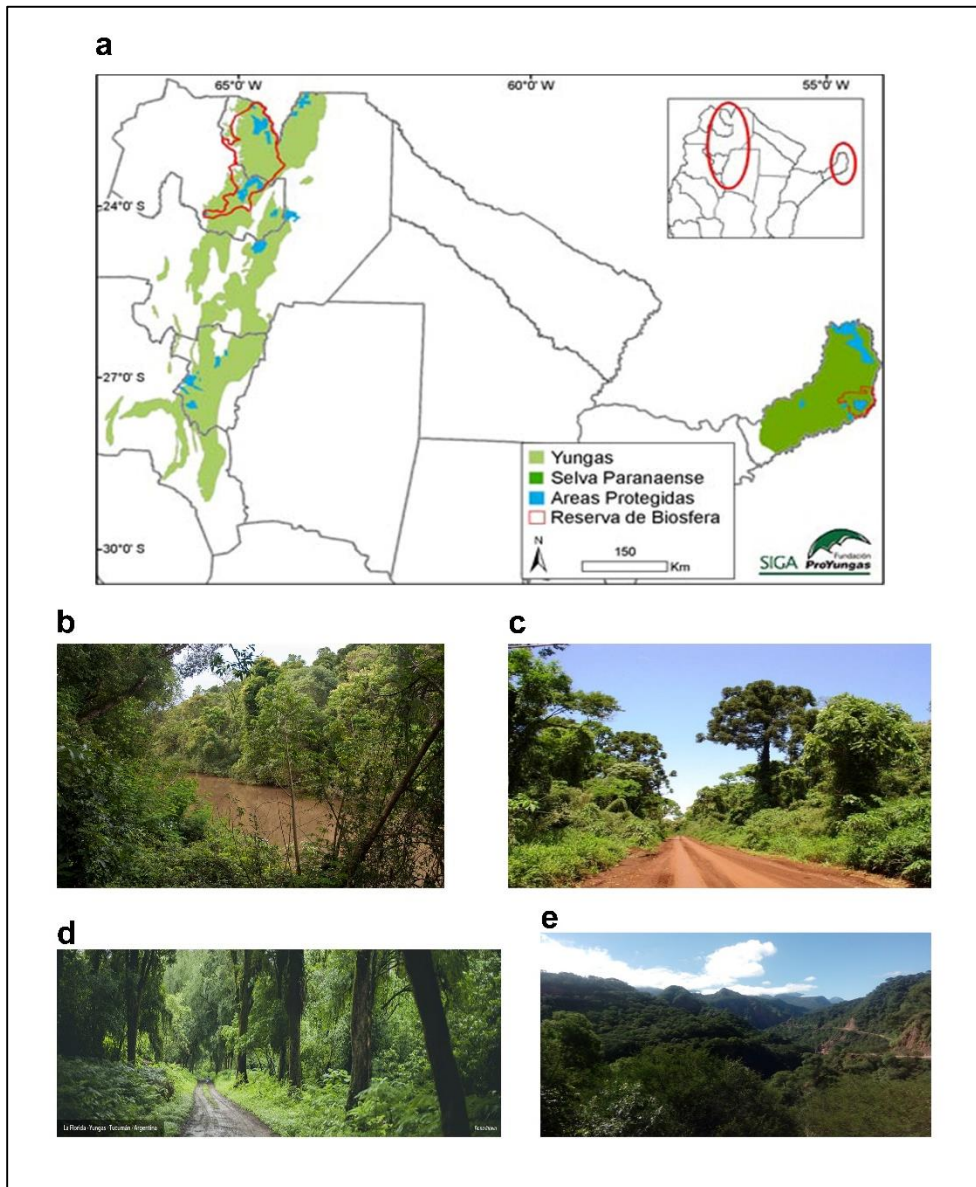


Figura 6. Selva Paranaense y Yungas. a) Mapa de distribución de la Selva Paranaense (NEA argentino) y de las Yungas (NOA argentino) (Tomado de Fundación ProYungas, 2019). b) y c) Fotos de la Selva Paranaense (Tomado de Phillip Capper, 2011 y de la Unidad de Manejo del Sistema de Evaluación Forestal -UMSEF- del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sustentable -MAyDS-, 2019, respectivamente). d) y e) Fotos de las Yungas (Tomado de Fiona Brown, ProYungas, 2019 y de Juan Pablo Moro, ProYungas, 2019).

2.6 Dos perspectivas promisorias para la producción de bioetanol 2G a partir de residuos lignocelulósicos

En este sentido, resulta interesante la aplicación biotecnológica de endoxilasas en el pretratamiento y en la hidrólisis de la producción de bioetanol 2G (Menon & Datta, 2017).

2.6.1 Aumento de la producción de xilanasas mediante la optimización del medio de cultivo

Se han llevado a cabo producciones de xilanasas fúngicas eficientes bajo fermentación líquida lo que permite un mejor control de las condiciones durante la fermentación (Motta *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2017). Muchos parámetros influyen de manera significativa la producción de estas enzimas, componentes del medio de cultivo como fuentes de carbono y nitrógeno; condiciones de incubación como la temperatura, el pH, el modo de agitación, presencia/ausencia de luz (Chipeta *et al.*, 2008; Kalpana & Rajeswari, 2015; Barchuk *et al.*, 2016).

También, los cultivos de hongos filamentosos requieren de la agitación para proveer oxígeno (Chipeta *et al.*, 2008) y de luz para el crecimiento y en algunos casos para la producción de xilanasas (Barchuk *et al.*, 2016). Con respecto a los ingredientes del medio de cultivo, existe gran controversia en la bibliografía sobre los mejores ingredientes y sus concentraciones para optimizar la producción de xilanasas (Kachlishvili *et al.*, 2006; Díaz *et al.*, 2015).

Por estas razones, en las investigaciones de optimización de procesos de producción de xilanasas se estudian diferentes parámetros del proceso para mejorar la productividad y la eficiencia de la producción de estas enzimas (Barchuk *et al.*, 2016 Díaz *et al.*, 2019). Además, las xilanasas son enzimas inducibles y el suministro del inductor apropiado es el aspecto más problemático y costoso en la producción industrial de las mismas. El xilano comercial es el sustrato por excelencia de las xilanasas, pero es muy costoso.

Las herramientas estadísticas tales como la metodología de superficie de respuesta (RSM, del inglés *Response Surface Methodology*) desarrolladas por Box y Wilson en 1951 son un grupo de técnicas matemáticas y estadísticas para mejorar y optimizar bioprocesos. Los diseños de RSM estiman la interacción entre la respuesta y los factores permitiendo establecer las condiciones óptimas de los componentes del medio de cultivo, niveles de enzimas hidrolíticas como celulasas y xilanasas (Gómez & Batista, 2006; Fang *et al.*, 2010; Díaz *et al.*, 2015; Rodríguez *et al.*, 2018).

Asimismo, por esta vía de optimización se evalúa críticamente los efectos interactivos normalmente desatendidos en la estrategia de optimización de un factor a la vez (OFAT, del inglés *One Factor At a Time*). Además, reduce significativamente el número de experimentos necesarios para la normalización de un proceso biotecnológico con una notable reproducibilidad. Por tanto, los diseños RSM estadísticos mejoran la eficiencia de los procesos de fermentación antes de llevarlos a escala industrial lo que promueve el uso de diversos organismos como factorías biológicas no solo de enzimas sino también de otros bio-productos potenciales (Sajith *et al.*, 2016).

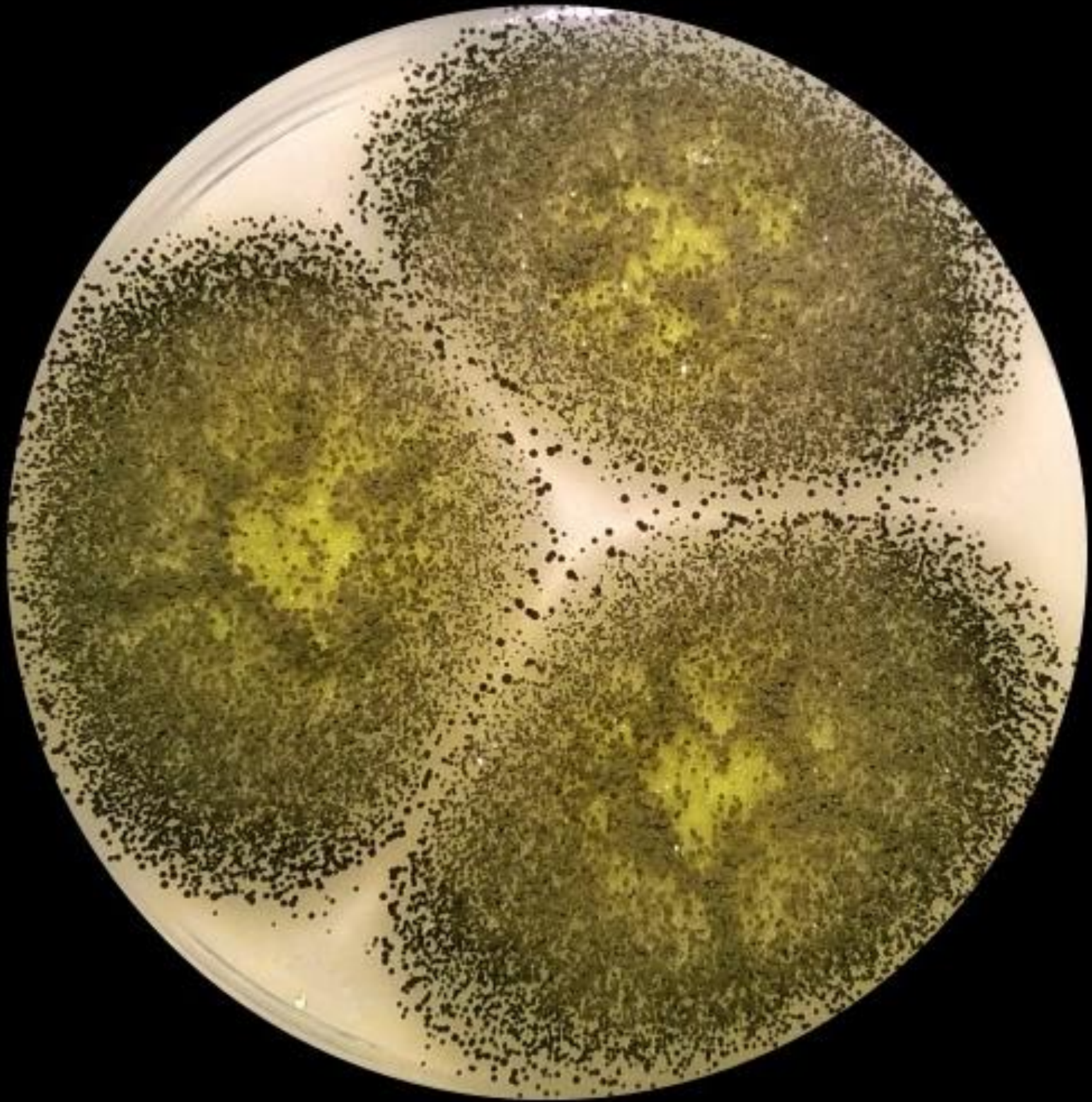
2.6.2 Aumento de la eficiencia de la hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática es una aplicación biotecnológica que tiene como objetivo aplicar cócteles enzimáticos en la bioconversión de polisacáridos sus monómeros fermentables de un sustrato. La eficiencia con la que actúan las enzimas puede medirse de muchas maneras diferentes como azúcares monoméricos, porcentaje bioconversión de carbohidratos en el sustrato original y el método elegido dependerá de los objetivos del estudio (Banerjee *et al.*, 2010).

Uno de los principales métodos utilizados para determinar la formación de azúcares reductores es el ensayo del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS, del inglés *3,5-dinitrosalicylic acid*). Este método mide los azúcares reductores liberados por acción de las enzimas involucradas; sin embargo, este método no puede usarse como reflejo preciso del rendimiento de hidrólisis ya que no mide la producción de azúcares monoméricos, indispensable a la hora de evaluar la producción de bioetanol (Park *et al.*, 2010). El rendimiento de hidrólisis debería medirse en base a los azúcares monoméricos liberados durante la degradación enzimática, generalmente mediante análisis por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*). Una vez que se han cuantificado los azúcares, se puede calcular el porcentaje de rendimiento con respecto a la composición original de carbohidratos. Generalmente se evalúa la eficiencia de la hidrólisis en términos de rendimiento de glucosa, xilosa y arabinosa (Banerjee *et al.*, 2010).

Para llevar a cabo el rendimiento de la hidrólisis es necesaria la caracterización del sustrato, es decir, su composición y porcentaje de los componentes en el sustrato. El análisis de carbohidratos del sustrato debe realizarse también luego del pretratamiento,

para determinar correctamente el rendimiento ya que durante el pretratamiento los polisacáridos de la biomasa pueden degradarse (Kumar & Wyman, 2009). Por otro lado, en la bibliografía se recomienda un rendimiento 8 % (p/p) de azúcares para que la producción de bioetanol sea económicamente factible; este porcentaje de azúcares resultaría en una concentración de etanol del 4 % (p/p). Para lograr este resultado se requiere de una carga teórica inicial del sustrato por encima del 20 % (p/v), dependiendo del sustrato. Sin embargo, los niveles reales de carga del sustrato pueden variar dependiendo de la composición de hidratos de carbono y lignina del sustrato (Kristensen *et al.*, 2009).



OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

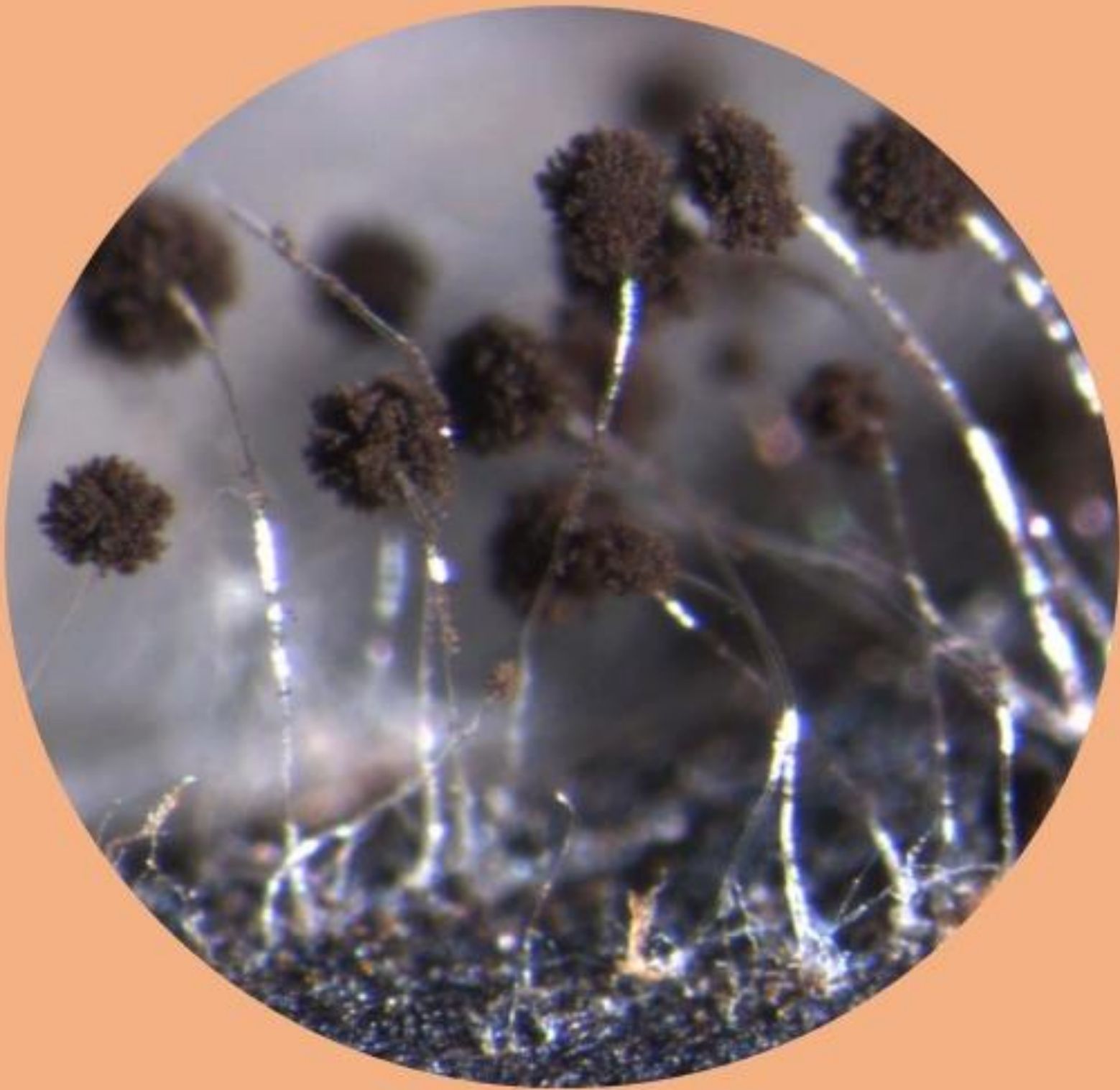
3.1 Objetivo general

El objetivo general de esta tesis fue estudiar la producción de xilanasas provenientes de aislamientos del género *Aspergillus* nativos de la provincia de Misiones, su caracterización y aplicación en la hidrólisis de residuos agroindustriales.

3.2 Objetivos específicos

De acuerdo con el objetivo general planteado, se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Aislar hongos nativos de la provincia de Misiones pertenecientes al género *Aspergillus* y evaluar su capacidad xilanolítica y proteolítica para seleccionar los más promisorios.
2. Evaluar el efecto de residuos lignocelulósicos sobre la actividad EX de los aislamientos más promisorios.
3. Identificar polifásicamente el aislamiento seleccionado.
4. Analizar la influencia de variables nutricionales y físicas sobre la actividad EX.
5. Caracterizar las proteínas con actividad EX en los sobrenadantes optimizados.
6. Identificar las proteínas secretadas en los sobrenadantes optimizadas.
7. Hidrolizar residuos agroindustriales con los sobrenadantes optimizados.



MATERIALES Y MÉTODOS

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Aislamiento de hongos *Aspergillus* en Misiones y la evaluación de su capacidad xilanolítica y proteolítica

4.1.1 Aislamiento de hongos del género *Aspergillus* en Misiones

Con el fin de aumentar la colección de cepas pertenecientes al género *Aspergillus* depositadas en el Laboratorio de Biotecnología Molecular (LBM) del Instituto de Biotecnología Misiones (InBioMis) “María Ebe Reca”, Universidad Nacional de Misiones (UNaM) se realizó aislamientos fúngicos a partir de diversos sustratos de la provincia de Misiones (Argentina).

Para el aislamiento fúngico, se tomaron muestras de suelo, madera, frutas y hojas en pudrición en zonas naturales de diferentes localidades de Misiones desde junio a agosto del 2015 (**Figura 7**). Estas muestras se trasladaron hasta el laboratorio en recipientes estériles tales como placas de Petri, frascos de vidrio y sobres de papel. Los hongos de los materiales podridos se aislaron mediante la técnica de siembra directa en placas de Petri de 15 cm de diámetro conteniendo medio agar papa azucarado 39 gL⁻¹ (PDA, del inglés *Potato Dextrose Agar*) con cloranfenicol 0,5 % (p/v) para inhibir el crecimiento bacteriano (Benbow & Sugar, 1999). Los hongos de suelo se aislaron mediante el método de diseminación en superficie (Mueller *et al.*, 2004). Para ello se preparó diluciones seriadas de las muestras y se sembraron sobre placas de Petri de 15 cm de diámetro con medio PDA 39 gL⁻¹ utilizando espátulas de Drigalsky para asegurar la homogenización de la siembra. Las placas se incubaron a 28 ± 2 °C de manera estática durante 72 h, monitoreándose diariamente.

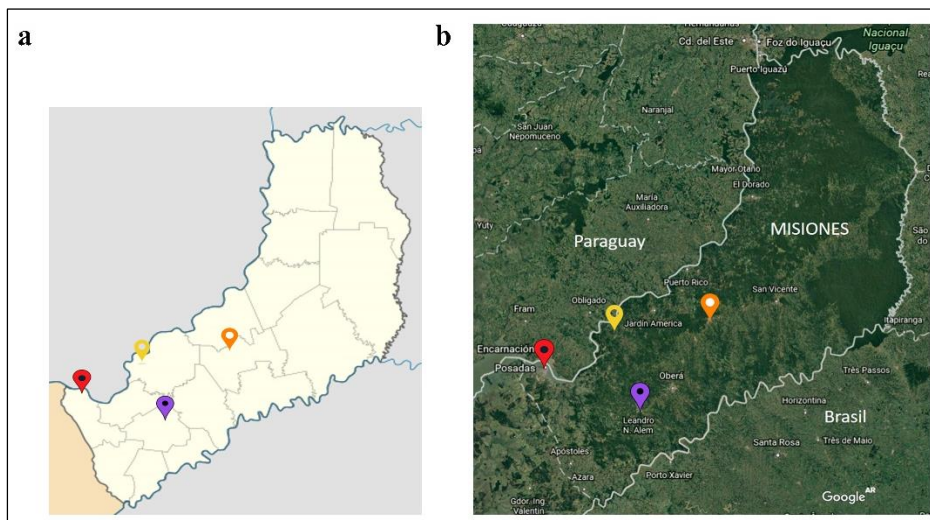


Figura 7. Localidades de recolección. a) Mapa de Misiones. **b)** Mapa físico-político de Misiones, los *pine* representan la zona de recolección de los aislamientos: *pine* rojo, Posadas; *pine* amarillo, Santo Pipó; *pine* violeta, Leandro N. Alem; *pine* naranja, Aristóbulo del Valle.

Se seleccionaron aquellos aislados pertenecientes al género *Aspergillus* basándose en sus características macroscópicas y estructuras microscópicas utilizando las claves de Pitt & Hock (1997) y Carrillo (2003). Los mismos se depositaron en el cepario del Laboratorio de Biotecnología Molecular (LBM) del Instituto de Biotecnología Misiones (InBioMis) “María Ebe Reca”, Universidad Nacional de Misiones (UNaM) junto con los aislamientos de la colección existente de este género fúngico (**Tabla 1**).

4.1.2 Organismos utilizados

En este trabajo se utilizaron los aislamientos obtenidos como se describió anteriormente y trece aislamientos de *Aspergillus* del cepario del InBioMis. Estos últimos fueron LBM 041, LBM 043, LBM 046, LBM 048, LBM 051, LBM 053, LBM 054, LBM 055, LBM 056, LBM 057, LBM 058, LBM 059 y LBM 063 aislados y caracterizados por Zini (2013). Todos los aislamientos se mantuvieron mediante siembras periódicas en placas de Petri de 6 cm de diámetro conteniendo medio PDA 39 gL⁻¹ y en tubos de 1,5 mL y de 15 mL conteniendo PDA 39 gL⁻¹ o agua estéril. Se incubaron a 28 ± 2 °C de manera estática el hasta desarrollar micelio y se conservaron a 4 °C y a temperatura ambiente.

En este trabajo se utilizó como control positivo externo de actividad xilanolítica al hongo *Trichoderma atroviride* LBM 117 perteneciente al cepario del InBioMis debido a su gran producción de xilanasas (Barchuk *et al.*, 2016).

Tabla 1. Hongos del género *Aspergillus* utilizados en este estudio.

Aislamiento	Material del cual se aisló	Localidad de Misiones	Coordenadas	Referencias
LBM 041	papaya	Posadas	27°26'04" S/55°23'14" O	Zini, 2013
LBM 043	maracuyá	Posadas	27°26'04" S/55°23'14" O	Zini, 2013
LBM 046	guayaba	Posadas	27°26'04" S/55°23'14" O	Zini, 2013
LBM 048	naranja	Posadas	27°26'04" S/55°23'14" O	Zini, 2013
LBM 051	maracuyá	Posadas	27°26'04" S/55°23'14" O	Zini, 2013
LBM 053	naranja	Posadas	27°26'04" S/55°23'14" O	Zini, 2013
LBM 054	limón	Posadas	27°26'04" S/55°23'14" O	Zini, 2013
LBM 055	hojas de té	Posadas	27°26'04" S/55°23'14" O	Zini, 2013
LBM 056	hojas de yerba mate	Posadas	27°26'04" S/55°23'14" O	Zini, 2013
LBM 057	hojas de té	Posadas	27°26'04" S/55°23'14" O	Zini, 2013
LBM 058	hojas de yerba mate	Posadas	27°26'04" S/55°23'14" O	Zini, 2013
LBM 059	palta	Garupá	27°27'28" S/55°51'25" O	Zini, 2013
LBM 063	hojas de té	Posadas	27°26'04" S/55°23'14" O	Zini, 2013
LBM 126	hojas de yerba mate	Santo Pipó	27°13'70" S/55°41'07" O	Esta tesis
LBM 127	hojas de yerba mate	Santo Pipó	27°13'70" S/55°41'07" O	Esta tesis
LBM 128	hojas de yerba mate	Santo Pipó	27°13'70" S/55°41'07" O	Esta tesis
LBM 129	madera en descomposición	Alem	27°24'39" S/55°54'7" O	Esta tesis
LBM 130	madera en descomposición	Posadas	27°43'62" S/55°88'77" O	Esta tesis
LBM 131	madera en descomposición	Posadas	27°43'62" S/55°88'77" O	Esta tesis
LBM 132	fruta en descomposición	Posadas	27°43'62" S/55°88'77" O	Esta tesis
LBM 133	fruta en descomposición	Posadas	27°43'62" S/55°88'77" O	Esta tesis
LBM 134	madera en descomposición	Aristóbulo del Valle	27°09'05" S/54°86'77" O	Esta tesis
LBM 135	madera en descomposición	Aristóbulo del Valle	27°09'05" S/54°86'77" O	Esta tesis
LBM 136	suelo	Posadas	27°43'62" S/55°88'77" O	Esta tesis
LBM 210	suelo	Posadas	27°43'62" S/55°88'77" O	Esta tesis

4.1.3 Preparación del sustrato

La evaluación de la capacidad de producir xilanasas por parte de los aislamientos se realizó en medio líquido utilizando un sustrato natural, bagazo de caña de azúcar, recolectado por Barchuk *et al.* (2016) de la azucarera "Alto Uruguay" de la localidad de San Javier, Misiones. El material se secó a 60 ± 2 °C durante toda la noche y luego se

molió hasta obtener un material de 40 mesh y se caracterizó según procedimientos estandarizados propuestos por el Laboratorio Nacional de Energía Renovable (NREL, del inglés *National Renewable Energy Laboratory*) (Tabla 6).

4.1.4 Condiciones de cultivo para la evaluación cuantitativa xilanólica y proteolítica

Los hongos se reactivaron en medio sólido PDA 39 gL^{-1} e incubaron a $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 días. A partir de estos cultivos se obtuvo una suspensión de esporas a una concentración de 10^7 esporas mL^{-1} de cada aislamiento. Esta suspensión se realizó raspando suavemente la superficie de las placas y suspendiendo las esporas en solución acuosa de Tween 80 0,1 % (v/v) hasta llegar a la concentración deseada. Se tomó 1 mL de esta suspensión de esporas y se inoculó en frascos Erlenmeyer de 100 mL conteniendo 25 mL de medio líquido Czapek (NaNO_3 2 gL^{-1} ; KH_2PO_4 1 gL^{-1} ; KCl $0,5 \text{ gL}^{-1}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0,5 \text{ gL}^{-1}$; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0,01 \text{ gL}^{-1}$) suplementado con bagazo de caña de azúcar 10 gL^{-1} y peptona de carne 3 gL^{-1} pH 4,8. Los mismos crecieron a 100 rpm a $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 días, tomándose alícuotas de 1 mL de sobrenadante cada 48 h en condiciones de esterilidad para determinar las actividades xilanólicas y proteolíticas

4.1.5 Determinación de la actividad xilanólica

La actividad EX se determinó como la liberación de azúcares reductores mediante la técnica del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). La determinación enzimática se realizó según Bailey *et al.* (1992) utilizando como sustrato xilano de madera de haya (Sigma-Aldrich, USA). La mezcla de reacción conteniendo 100 μL de xilano 1 % (p/v) en solución tampón acetato de sodio 0,05 M pH 4,8 y 100 μL del sobrenadante se incubó a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 5 min. Luego, se agregó 600 μL de DNS a la mezcla de reacción, se hirvió durante 5 min y se agregó 4 mL de agua destilada. La absorbancia se midió a 540 nm. La actividad EX se expresó como unidades internacionales (U) definidas como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de xilosa por min a $50 \text{ }^\circ\text{C}$.

La actividad BXL se determinó según Ghose & Bisaria (1987) utilizando como sustrato 4-nitrofenil- β -xilopiranosido (PNPX, Sigma-Aldrich, USA). La mezcla de reacción conteniendo 900 μL del sustrato 1 % (p/v) en solución tampón acetato de sodio 0,5 M

pH 4,8 y 100 μ L del sobrenadante se incubó a 50 °C durante 30 min. Luego se adicionó 0,5 mL de Na₂CO₃ 1 M para detener la reacción y la cantidad de p-nitrofenol liberado se midió a 400 nm. La actividad BXL se expresó como unidades internacionales (U) definidas como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de p-nitrofenol por min a 50 °C.

4.1.6 Determinación de la actividad proteolítica

Se ensayó actividad caseína y gelatina-proteasas de los sobrenadantes de mayor actividad EX y BXL de cada aislamiento. La actividad caseína-proteasa se ensayó en placas de leche descremada 1 % (p/v) y agar 1 % (p/v) a pH neutro. La actividad gelatina-proteasa se determinó sobre placas de gelatina sin sabor 1 % (p/v) y agar 1 % (p/v) a pH 4,8. (Smith & Goodner, 1958; Vermelho *et al.*, 1996).

En las placas se cortaron tacos de 5 mm de diámetro y se llenaron con 15 μ L de los sobrenadantes a estudiar. Se incubaron a 37 \pm 2 °C durante 10 h. Los halos de degradación se observaron, midieron con calibre electrónico y se fotografiaron con cámara digital Canon Power Shot G10. Las placas de gelatina se tiñeron con 1 mL de reactivo Bradford (BioRad) para visualizar mejor los halos de degradación.

4.1.7 Análisis estadísticos

Todos los experimentos y las determinaciones enzimáticas se llevaron a cabo por duplicado y sus resultados se evaluaron con el análisis de la varianza (ANOVA) y con el test de significancia estadística utilizando para ambos los programas Statgraphics Centurion XVI.I y GraphPad 5ta versión.

El análisis de componentes principales (PCA, del inglés *Principal Component Analysis*) se realizó con el programa InfoStat versión 2017 para identificar la participación de las enzimas xilanolíticas y proteolíticas y su correlación con la biodegradación del bagazo de caña de azúcar llevada a cabo por los distintos aislamientos de *Aspergillus*. El análisis de conglomerados se llevó a cabo para clasificar los aislamientos en función de sus actividades xilanolítica y proteolítica; el mismo también se realizó con el programa

InfoStat versión 2017. De estos análisis multivariados se eligió los dos aislamientos más promisorios que presentaron mayor actividad xilanolítica y baja actividad proteolítica.

4.2 Efecto de los residuos lignocelulósicos sobre la actividad EX de los aislamientos más promisorios

El efecto de cuatro residuos lignocelulósicos se evaluó sobre la actividad EX de dos aislamientos seleccionados en la etapa previa. Estos residuos fueron: bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), bagazo de mandioca (*Manihot esculenta*), aserrín de eucaliptus (*Eucalyptus globulus*) y aserrín de pino (*Pinus taeda*).

4.2.1 Preparación de los materiales lignocelulósicos

El bagazo de caña de azúcar se preparó de la misma manera que se describió previamente (sección 4.1.3).

La Cooperativa San Alberto localizada en Puerto Rico, Misiones donó el bagazo de mandioca. Este se secó a 110 ± 2 °C durante 12 h y se molió hasta obtener un material de 40 mesh.

Los aserrines de eucaliptus y pino se recolectaron en el aserradero Valerio Oliva de la localidad de Garupá, Misiones (Rodríguez *et al.*, 2015). Ambos se secaron durante 12 h a 60 °C y se molieron hasta obtener un material de 40 mesh.

La composición de los bagazos de caña de azúcar y de mandioca y el aserrín de eucaliptus se caracterizaron según procedimientos estandarizados propuestos por el NREL. El bagazo de pino se caracterizó en estudios previos, publicados por el grupo de trabajo (**Tabla 8**) (Rodríguez *et al.*, 2017).

4.3.2 Condiciones de cultivo

Los microorganismos elegidos se reactivaron en placas de medio PDA 39 gL^{-1} a 28 ± 2 °C y se realizó una suspensión de esporas de cada uno a una concentración de 10^7 esporas mL^{-1} como se describió previamente (sección 4.1.4). Un mL de cada suspensión

se inoculó en frascos Erlenmeyer de 100 mL conteniendo 25 mL de medio líquido mínimo Czapek suplementado con uno de los residuos lignocelulósicos; bagazo de caña de azúcar, de mandioca, aserrín de eucalipto o aserrín de pino a una concentración de 10 gL^{-1} . Los frascos Erlenmeyer se esterilizaron a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min para prevenir cualquier contaminación por otros microorganismos que puedan antagonizar o inhibir con el crecimiento de los aislamientos de *Aspergillus* seleccionados. Se incubaron a $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ a 100 rpm y se tomaron muestras de un mL de cada ensayo en condiciones de esterilidad cada 48 h para monitorear una fermentación axénica y determinar la actividad EX hasta que la actividad decayó.

4.2.3 Efecto de concentraciones de residuos lignocelulósicos sobre la actividad EX

Con el fin de conocer la concentración óptima de los residuos lignocelulósicos seleccionados previamente que permitan mejorar la actividad EX de los aislamientos elegidos, se estudiaron diferentes concentraciones de estos. Para ello, se realizaron suspensiones de esporas de ambos aislamientos (sección 4.1.4) e inocularon en frascos Erlenmeyer de 100 mL conteniendo 25 mL de medio mínimo Czapek suplementado con 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 gL^{-1} de cada uno de los residuos lignocelulósicos seleccionados. Se incubaron a $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ a 100 rpm y se tomaron muestras de un mL de cada ensayo en condiciones de esterilidad cada 48 h para monitorear una fermentación axénica y determinar la actividad EX hasta que la actividad decayó.

4.2.4 Análisis estadísticos

Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado y se evaluaron con el análisis de la varianza (ANOVA) y con el test de significancia estadística utilizando para ambos los programas Statgraphics Centurion XVI.I y GraphPad 5^{ta} versión.

4.2.5 Estudio costo/beneficio

Para decidir el mejor medio de cultivo en términos de costos y producción enzimática, se llevó a cabo un estudio de costo/beneficio en el cual se compararon los

medios de cultivo que soportaron mayores niveles de EX con y sin agitación. En esta etapa se eligió el aislamiento que presentó mayor actividad EX para continuar con los estudios siguientes.

4.3 Identificación polifásica del aislamiento seleccionado

4.3.1 Extracción de ADN

El aislamiento seleccionado se reactivó en placa con medio sólido PDA 30 gL⁻¹ y se incubó a 28 ± 2 °C durante 5 días. Luego, se cortaron asépticamente tacos cubiertos de micelio joven y se colocaron en medio líquido conteniendo extracto de levadura 15 gL⁻¹ y sacarosa 30 gL⁻¹ (YES, del inglés *Yeast Extract Sucrose*) y se incubaron durante 2 días a 28 ± 2 °C. A partir del micelio crecido se extrajo el material genómico siguiendo el protocolo propuesto por Fonseca *et al.* (2015). Se cuantificó el ADN en base a los niveles de absorbancia a 260 nm, considerando que 1 unidad de absorbancia equivale a una concentración de 50 µg de DNA µL⁻¹. Por otro lado, la calidad y la pureza del DNA se comparó mediante la relación A₂₆₀/A₂₈₀. La integridad del ADN genómico se evaluó por medio de electroforesis en gel de agarosa como se describe en la sección 4.3.3. El ADN genómico extraído se conservó en freezer a -20 °C.

4.3.2 Obtención de las secuencias de interés

Se amplificaron cinco regiones del ADN de interés mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*). La reacción de PCR estándar fue de 20 µL de volumen final conteniendo solución tampón de PCR (5 mM KCl y 10 mM Tris-HCl pH 8,4), dNTPs 200 µM, MgCl₂ 2,5 mM, cebadores sentido y antisentido 10 pmol por reacción de cada uno, Taq polimerasa 0,5 U y ADN genómico 50 ng. Las secuencias amplificadas fueron las regiones espaciadoras transcritos internos del ADN ribosómico (ITS, del inglés *Internal Transcribed Spacer*), región que codifica para la subunidad ribosomal mayor 28S (LSU, del inglés *Large SubUnit*), regiones de los genes β-tubulina (Bt), calmodulina (CMD) y factor de elongación de la transcripción 1α (Tef, del inglés *Translation elongation factor 1α*). Los cebadores universales que se utilizaron para

amplificar estas regiones génicas se seleccionaron a partir de una búsqueda bibliográfica adecuada al género de estudio (**Tabla 2**).

Tabla 2. Cebadores utilizados en la amplificación de diferentes regiones para la identificación de hongo seleccionado.

Región amplificada	Cebadores	Secuencias (5'-3')	Referencia
ADNr ITS1-5,8-ITS2	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> , 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
Dominio D1/D2 del ADNr 28S	NL1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	Kurtzman & Robnett, 1997
	NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	
Bt, exones 3,4,5, región parcial del 6	Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	Glass & Donaldson, 1995
	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	
CMD, exones 2,3,4, región parcial del 5	CMD5	CCGAGTACAAGGARGCCTTC	Hong <i>et al.</i> , 2005
	CMD6	CCGATRGAGGTCATRACGTGG	
Tef, intrón 1 y exones 1 y 2	Alfie1	TCGTCATCGGCCACGTCGACTC	Yergeau <i>et al.</i> , 2005 Samuels & Ismaiel, 2009
	Tef1R	GCCATCCTGGAGATACCAGC	

Los ciclados de PCR consistieron en una etapa inicial de 4 min a 94 °C, seguida por 30 ciclos de 94 °C, 50/55 °C por 40 s y 72 °C por 40 s y una etapa final de 10 min a 72 °C. Los cebadores ITS y D1/D2, con una T_m de 52 °C; los demás cebadores con una T_m de 55 °C. Los amplicones se corroboraron mediante electroforesis de geles de agarosa 2 % (p/v) como se describe en la sección 4.3.3. Se utilizó como referencia el marcador de peso molecular *qLadder 1000 pb Precision* (Productos Bio-Lógicos, S.A.).

4.3.3 Electroforesis en geles de agarosa

Los geles de agarosa se prepararon en *buffer* Tris base- ácido bórico - ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (*buffer* TBE) 0,5 X. Los geles de agarosa 1 % (p/v) se utilizaron para chequeo de ADN genómico mientras que los geles de agarosa 2 % (p/v) se usaron para chequeo de amplicones. La electroforesis se realizó a 100 V por 30 min usando como *buffer* de corrida TBE 0,5 X. Los geles se tiñeron con Gel Red (Biotium, 10000 X) siguiendo las instrucciones del fabricante, se visualizaron bajo luz ultravioleta (UV) y se fotografiaron con cámara digital Canon Power Shot G10.

4.3.4 Árboles de secuencias concatenadas

Las amplicones obtenidos se enviaron a secuenciar al servicio de secuenciación automática de *Macrogen Inc.* (Corea). Una vez recibidas las secuencias, se realizaron análisis bioinformáticos. En primer lugar, las secuencias se editaron con el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0.5* para obtener las secuencias consenso.

Los árboles filogenéticos se construyeron con las secuencias ITS, Bt y CMD concatenadas. Las secuencias de ITS, Bt y CAM utilizadas en la construcción de los árboles se extrajeron del banco de datos de genes (*GenBank*) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI del inglés, *National Center for Biotechnology Information*). Estas secuencias pertenecen a las cepas tipo de especies de la sección *Nigri* del género *Aspergillus* perteneciente a la colección CBS-KNAW referenciadas en el trabajo de Varga *et al.* (2011) (**Anexo 1**).

El alineamiento múltiple y empalme de las secuencias de los marcadores se realizó utilizando la herramienta *ClustalW* del paquete bioinformático *MEGA 7.0*. Los árboles se construyeron por los métodos estadísticos del vecino más cercano (NJ, del inglés *Neighbor Joining*) usando el modelo de sustitución Kimura-dos parámetros y de máxima parsimonia (MP, del inglés *Maximum Parsimony*). En ambos casos, se utilizó el test de *Bootstrap* con 1000 replicaciones mediante la herramienta *Phylogeny* del programa *MEGA 7.0*. Para el enraizamiento de los árboles, como grupo externo se utilizó a *A. flavus* CBS 100927 (Varga *et al.*, 2011).

4.3.5 Identificación polifásica

La identificación polifásica se llevó a cabo mediante la herramienta *Polyphasic Identification*, disponible *online* en el sitio <http://www.westerdijkinstituut.nl/>. Para ello, se utilizó las secuencias de los marcadores moleculares, ITS, D1/D2, Bt, Tef1 α y CMD (sección 4.4.2), el registro de caracteres morfológicos macroscópicos y microscópicos en diferentes medios de cultivo a distintas temperaturas de incubación, así como también la producción de ácido-base y ácido ciclopiazónico (**Tabla 3**).

Tabla 3. Metodología para la observación de los caracteres macro y microscópicos.

Medios de cultivo	Temperatura de incubación (°C)	Evaluación de características	
		Macroscópicas	Microscópicas ^b
Agar Creatina Sacarosa (CREA, del inglés <i>Creatine Sucrose Agar</i>) (Frisvad, 1985)	25	Producción de ácido-base.	
Agar Extracto de Levadura Czapek (CYA, del inglés <i>Czapek Yeast Agar</i>) (Pitt, 1979)	25, 30 y 37	Diámetro de la colonia; color anverso y reverso de la placa; producción de ácido ciclopiazónico ^a .	Largo y ancho del estípite; forma y tamaño del conidióforo y de la vesícula; tamaño y forma de conidios; presencia y ausencia de esclerocio o cleistotecio, forma y tamaño de ascosporas
Agar Extracto de Levadura con NaCl 5 % (p/v) (CYAS, del inglés <i>Czapek Yeast Agar with Sault</i>) (Pitt, 1979)	25	Diámetro de la colonia; color anverso y reverso de la placa.	
Agar Extracto de Malta (MEA, del inglés <i>Malt Extract Agar</i>) (Raper & Thom, 1949)	25	Diámetro de la colonia; color anverso y reverso.	

^a La producción de ácido ciclopiazónico se realizó mediante la prueba de Ehrlich (Lund, 1995) con mediante el método de papel de filtro Whatman número 1.

^b Las características microscópicas se observaron en microscopio óptico con micrómetro 100 X a partir de preparados de micelio joven teñido con azul de lactofenol. Se fotografiaron digital Canon Power Shot G10; las mediciones se realizaron con el programa *ImageJ*.

4.4 Evaluación del efecto de las variables nutricionales y físicas sobre la actividad EX del aislamiento seleccionado

4.4.1 Cribado de fuentes de nitrógeno sobre la actividad EX del aislamiento elegido

El efecto de siete fuentes de nitrógeno se evaluó sobre la actividad EX del aislamiento elegido mediante un diseño factorial fraccionado 1/16 de 19 corridas experimentales y tres puntos centrales. Se llevaron a cabo dos diseños de este tipo, uno para el medio previamente optimizado con bagazo de caña de azúcar y otro con bagazo de mandioca (sección 4.2.3). Las fuentes de nitrógeno fueron, extracto de levadura, sulfato de amonio, mandioca, nitrato de sodio, peptona de carne, tripteína bacteriológica y urea. Cada factor se evaluó a dos niveles, superior (+1) e inferior (-1) con sus correspondientes niveles centrales (0) (**Tabla 4**). Ambos diseños constaron con una matriz experimental de 19 corridas, cada una con diferentes combinaciones de concentraciones de las fuentes de nitrógeno. Estas combinaciones se ensayaron en medio líquido Czapek

suplementado con la mejor concentración de bagazo de caña de azúcar o de bagazo de mandioca. Los frascos Erlenmeyer de 100 mL conteniendo 25 mL del medio se esterilizaron a 121 °C por 20 min y se inocularon con 1 mL de suspensión 10^7 esporas mL^{-1} del hongo seleccionado (sección 4.1.4). Se incubó a 28 ± 2 °C y se tomó muestras cada 48 h en condiciones de esterilidad hasta que la actividad EX decayó. Los experimentos que contenían bagazo de caña de azúcar se llevaron a cabo a 100 rpm y aquellos con bagazo de mandioca, sin agitación.

Tabla 4. Factores evaluados en el experimento de cribado de fuentes de nitrógeno.

Fuente de nitrógeno	Concentración de los niveles (gL^{-1})		
	-1	0	+1
Extracto de levadura	1	5,5	10
Mandioca	1	3	5
Nitrato de sodio	0,5	1	1,5
Peptona de carne	1	3	5
Sulfato de amonio	1	3	5
Tripteína bacteriológica	0,5	1	1,5
Urea	1	3	5

El efecto de cada componente nutricional sobre la actividad EX se calculó según la siguiente ecuación:

$$E_i = \sum R_{i+} - \sum R_{i-} / N \quad (1)$$

donde, E_i es el efecto de la fuente de nitrógeno i bajo las condiciones de estudio; R_{i+} y R_{i-} son las respuestas de la variable dependiente, actividad EX, en las cuales las fuentes de nitrógeno se encontraban en su valor máximo, +1, y mínimo, -1; y N es el total de corridas experimentales.

4.4.2 Optimización de las fuentes de nitrógeno para la actividad EX del hongo seleccionado

Con el fin de aumentar la actividad EX del aislamiento elegido, se llevó a cabo la optimización de las fuentes de nitrógeno utilizando una metodología de superficie de respuesta. Para ello, se emplearon dos diseños compuestos centrales (DCC) ortogonales,

uno para el medio optimizado previamente con bagazo de caña de azúcar y el otro para el medio optimizado con bagazo de mandioca (sección 4.3.3). Ambos diseños constaron de cinco niveles ($-\alpha$, -1 , 0 , $+1$ y $+\alpha$) y cuatro réplicas en sus puntos centrales. En el caso del medio suplementado con bagazo de caña de azúcar, las fuentes de nitrógeno ensayadas en este DCC fueron extracto de levadura, peptona de carne y tripteína bacteriológica. En el caso del medio optimizado con bagazo de mandioca, las fuentes de nitrógeno ensayadas fueron la peptona de carne y urea. Las concentraciones evaluadas se detallan en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Fuentes de nitrógeno evaluadas en ambos DCC y sus valores codificados y reales.

Valores codificados	Bagazo de caña de azúcar					Bagazo de mandioca				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68	-1,41	0	-1	+1	+1,41
Extracto de levadura	0,32	1	2	3	3,67	-	-	-	-	-
Tripteína bacteriológica	0,08	0,25	0,5	0,75	0,9	-	-	-	-	-
Peptona de carne	0,32	1	2	3	3,67	0,385	1	2,5	4	4,615
Urea						0,385	1	2,5	4	4,615

La matriz experimental del DCC para el medio optimizado con bagazo de caña de azúcar constó de 18 corridas mientras que, para el medio con bagazo de mandioca, de 12 corridas experimentales. Estas combinaciones de fuentes de nitrógeno se ensayaron en medio líquido Czapek suplementado con la mejor concentración de bagazo de caña de azúcar o de bagazo de mandioca. Frascos Erlenmeyer de 100 mL conteniendo 25 mL del medio se esterilizaron a 121 °C por 20 min y se inocularon con 1 mL de suspensión 10^7 esporas mL^{-1} del hongo seleccionado (sección 4.2.2). Se incubó a 28 ± 2 °C y se tomó muestras cada 48 h en condiciones de esterilidad hasta que la actividad EX decayó. Los experimentos que contenían bagazo de caña de azúcar se llevaron a cabo a 100 rpm y aquellos con bagazo de mandioca, sin agitación.

El comportamiento de ambos sistemas se explicó con la siguiente ecuación:

$$y = a_0 + \sum a_i x_i + \sum a_{ii} x_i^2 + \sum a_{ij} x_i x_j \quad (2)$$

donde, y representa la actividad EX, a_0 es el coeficiente del intercepto, a_i es el coeficiente del efecto lineal, a_{ii} es el coeficiente del efecto cuadrático y a_{ij} es el

coeficiente de la interacción, x_i y x_j denotan los niveles codificados de las variables $x_i x_j$ en los experimentos.

La variable X_i se codificó como x_i según la siguiente ecuación:

$$x_i = (X_i - X_0) / \Delta X_i \quad (3)$$

donde, x_i es el valor adimensional codificado de la variable X_i , X_0 es el valor de X_i en su punto central, y ΔX_i es el salto de cambio de la variable desde su nivel +1 ó -1 a su nivel central.

4.4.3 Validación de los modelos estadísticos

Para validar la optimización de ambos diseños, se llevaron a cabo seis corridas experimentales bajo las condiciones óptimas predichas por el modelo. Los valores predichos por el modelo se decodificaron mediante la ecuación (3).

Los ensayos se esterilizaron a 121 °C por 20 min y se incubaron bajo las mismas condiciones que los DCC. Se determinó la actividad EX y se corroboró con la actividad EX óptima predicha por el modelo.

4.4.4 Evaluación del efecto de la concentración de inóculo y variables físicas sobre la actividad EX del hongo seleccionado

Con el fin de aumentar aún más la actividad EX del hongo seleccionado, se optimizó la concentración del inóculo y las variables físicas con el método OFAT. Las concentraciones de inóculo evaluadas fueron 10^6 y 10^7 esporas mL^{-1} . Las variables físicas que se evaluaron fueron: tamaño de sustrato (40 mesh, menor a 40 mesh y 120 mesh); temperatura (25, 28 y 30 °C); pH (3,5; 4,5; 4,8; 5,5 y 6,5); condiciones de luz (con y sin luz); modo de agitación (100 rpm y sin agitación).

Estos factores se evaluaron en ambos sistemas optimizados, con bagazo de caña de azúcar y con mandioca, en frascos Erlenmeyer de 100 mL conteniendo 25 mL del medio correspondiente. Los frascos se esterilizaron a 121 °C por 20 min, se incubaron a 28 ± 2 °C y se tomaron alícuotas de un mL cada 48 h en condiciones de esterilidad hasta que la actividad EX decayó. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado.

4.4.5 Análisis estadísticos

Las matrices experimentales de los diseños factoriales fraccionados y de los DCC se realizaron con el programa Statgraphics Centurion versión XVI.I al igual que los ANOVA de sus resultados experimentales y los gráficos de Pareto y de superficie de respuesta. Asimismo, los resultados de la evaluación de las variables físicas se analizaron con el programa Statgraphics Centurion versión XVI.I y graficaron con el programa GraphPad 5^{ta} versión.

4.4.6 Estudio costo/beneficio: bagazos vs. xilano comercial.

Con el objetivo de comparar la producción de enzimas con actividad EX a partir del hongo elegido crecido en residuos y en xilano comercial, se realizaron experimentos inoculando 1 mL de suspensión de esporas del hongo en frascos Erlenmeyer de 100 mL conteniendo 25 mL de medio líquido mínimo Czapek suplementado con peptona 3 gL⁻¹ y xilano de madera de haya (Sigma-Aldrich, USA) 10 gL⁻¹. Se incubó a 28 ± 2 °C con luz a 100 rpm y se tomó muestras de 1 mL cada 48 hasta que la actividad EX decayó.

Para exponer la ventaja económica de producir enzimas con actividad EX utilizando como sustrato bagazos, se realizó un estudio costo/beneficio en el cual se comparó el costo de producir dichas enzimas con bagazo de caña de azúcar, con bagazo de mandioca y con xilano comercial.

A su vez, las enzimas con actividad EX presentes en ambos sobrenadantes optimizados se caracterizaron bioquímicamente (apartado 4.5) al igual que se identificaron las proteínas presentes en estos mediante el análisis de sus secretomas (apartado 4.6). Asimismo, estos sobrenadantes se aplicaron en la hidrólisis de residuos agroindustriales (apartado 4.7).

4.5 Caracterización de las enzimas con actividad EX presentes en los sobrenadantes optimizados

La actividad EX de todos los ensayos llevados a cabo en este apartado se determinó utilizando el protocolo descrito en la sección 4.1.6, con las modificaciones correspondientes. Asimismo, los ensayos se realizaron por duplicado para cada medio optimizado, con bagazo de caña de azúcar y con bagazo de mandioca.

4.5.1 Temperatura óptima

El efecto de la temperatura sobre la actividad EX se evaluó incubando la mezcla de reacción a pH 4,8 a diferentes temperaturas; 4, 10, 20, 30, 40, 45, 50, 60, 70 y 80 °C. Las demás condiciones se mantuvieron constantes. Luego se continuó con la determinación de la actividad enzimática y la misma se expresó en U mL^{-1} .

4.5.2 pH óptimo

El efecto del pH sobre la actividad EX en ambos sobrenadantes optimizados se determinó incubando la mezcla de reacción a 50 °C variando el pH desde 3 a 10. Los *buffers* utilizados fueron los siguientes: *buffer* citrato de sodio para pH 3, *buffer* acetato de sodio para pH 4, 4,8 y 5 y *buffer* fosfato de sodio para pH 6, 7 y 8. Luego se continuó con la determinación de la actividad enzimática y la misma se expresó en U mL^{-1} .

4.5.3 Termoestabilidad

Para evaluar la termoestabilidad enzimática en el tiempo, se incubó ambos sobrenadantes a 4, 30, 40 y 50 °C, pH 4,8. Los sobrenadantes se retiraron a distintos intervalos; 6, 12, 24, 48, 72, 96 h y se midió la actividad EX residual de ellos. La actividad residual se expresó en porcentaje tomando la actividad enzimática al tiempo cero como el 100 %.

4.5.4 Estabilidad en pH

Para determinar la estabilidad enzimática en función del pH, ambos sobrenadantes se incubaron a diferentes pHs; 3, 4,8 y 7 a una temperatura constante de 50 °C durante diferentes intervalos; 6, 12, 24, 48, 72, 96 h. Luego, se realizó la medición de la actividad EX. La actividad residual se expresó en porcentaje tomando la actividad enzimática al tiempo cero como el 100 %.

4.5.5 Análisis estadísticos

El método empleado para discriminar entre las medias fue el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD, *Least Significant Difference*) de Fisher. Para ello se utilizó el programa GraphPad 5^{ta} versión, al igual que para la realización de los gráficos.

4.5.6 Detección de proteínas con actividad EX en ND-PAGE

La presencia de isoenzimas con actividad EX se detectó mediante un análisis de perfil electroforético en geles de poliacrilamida no desnaturizantes (ND-PAGE, del inglés *Non Denaturing Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Se realizó electroforesis no desnaturizante en geles de poliacrilamida al 6 % (p/v) conteniendo xilano de madera de haya 1 % (p/v) (Sigma-Aldrich, USA) (Royer & Nakas, 1989). Se sembraron 10, 20 y 40 µg de proteínas totales por carril. La corrida electroforética se realizó a 100 V por 120 min en *buffer* Tris-Glicina 1,5 M, pH 8,3. Los geles se fijaron en una solución acuosa conteniendo 40 % (v/v) de metanol, 10 % (v/v) de ácido acético durante toda la noche. Luego, se incubaron en *buffer* acetato de sodio 0,05 M pH 4,8 a 50 °C, 80 rpm durante 45 min y se tiñeron con solución acuosa de Rojo Congo 0,1 % (p/v) a 45 °C, 80 rpm durante 15 min. Posteriormente se lavaron primero con agua corriente y luego con solución NaCl 1 M en agitación constante hasta detectar las bandas con actividad EX.

4.6 Caracterización de los sobrenadantes optimizados y controles

Con el fin de analizar la diferencia de la secreción proteica del hongo seleccionado al crecer con los residuos lignocelulósicos seleccionados, se llevaron a cabo medios

controles los cuales contuvieron medio mínimo Czapek y las fuentes de nitrógeno optimizadas sin contener los sustratos lignocelulósicos. Frascos Erlenmeyer de 100 mL conteniendo 25 mL de medio control se inocularon como se describe en la sección 4.1.4. Las condiciones de incubación también fueron las optimizadas para cada residuo lignocelulósico.

Los sobrenadantes optimizados con los residuos lignocelulósicos y sus respectivos controles se caracterizaron mediante geles SDS-PAGE con tinción de plata (sección 4.6.1). Se determinaron las principales actividades enzimáticas relacionadas con la hidrólisis de la holocelulosa debido a que los residuos lignocelulósicos son sustratos muy complejos (sección 4.6.2). Asimismo, se analizaron e identificaron las proteínas presentes en los sobrenadantes optimizados y en sus controles por espectrometría de masas (sección 4.6.3).

4.6.1 Separación de las proteínas totales por SDS-PAGE

Para evaluar el perfil de proteínas secretadas se realizaron geles de poliacrilamida desnaturizantes al 12 % (p/v) (Laemmli, 1970). El SDS se agregó al gel como a los *buffers* de carga y de corrida. Con el fin de desnaturizar las proteínas y romper los puentes disulfuro, se incubó 20 μ L del extracto enzimático con el *buffer* de carga y 2- β -mercaptoetanol a 100 °C por 5 min y luego se sembró en el gel de poliacrilamida. La electroforesis en geles de poliacrilamida se llevó a cabo a 100 V durante 2 h. Luego, los geles se fijaron en una solución acuosa conteniendo 40 % (v/v) de metanol, 10 % (v/v) de ácido acético durante toda la noche. Posteriormente, se lavaron con solución acuosa de etanol 50 % (v/v) 3 veces durante 5, 10 y 15 min, con solución de tiosulfato 2 % (v/v) y finalmente con agua destilada. Los geles se incubaron con solución reveladora AgNO_3 0,2 % (p/v) en agitación hasta que se detectaron las bandas y la reacción se detuvo inmediatamente incubando con solución acuosa de ácido acético 15 % (p/v). Para determinar la masa molecular de las bandas se utilizó el marcador de peso molecular Phage Ruler pre-stained protein ladder (Thermo Scientific).

4.6.2 Preparación de las muestras para análisis secretómico

Los sobrenadantes optimizados libres de micelio se filtraron al vacío y centrifugaron a 10.000 rpm, 4 °C durante 15 min; luego, se clarificaron con filtros de 0,22 µm (Chromafil® xtra) y concentraron con dispositivos Amicon de 3 kDa. Se determinó la concentración de proteínas totales mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Se midió en espectrofotómetro a una absorbancia de 595 nm y la concentración de proteínas se expresó en mgmL⁻¹ en relación con una curva estándar de diluciones seriadas de albúmina. De cada muestra se utilizó un volumen de sobrenadante que presentara 40 µg de proteínas como máximo para continuar con el protocolo de reducción y precipitación con acetona.

Primeramente, las muestras se trataron con dithiothreitol (DTT) 10 mM a 56 ± 2 °C durante 45 min con el fin de reducir los puentes disulfuro de las proteínas y para evitar que se vuelvan a formar, se llevó a cabo una alquilación con iodoacetamida a una concentración final de 20 mM a 25 °C en oscuridad durante 45 min. Luego las muestras se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA, del inglés *Trichloroacetic acid*) 100 % (v/v) igual a la quinta parte del extracto proteico obtenido para cada muestra, incubándose a -20 °C durante 2 h. Las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm, 4 °C durante 10 min y se recuperaron los *pellets*. Estos se lavaron con acetona fría, -4 °C y se centrifugó a 10.000 rpm, 4 °C durante 10 min, repitiendo el lavado tres veces.

Los precipitados proteicos obtenidos se enviaron a analizar al Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa (CEQUIBIEM) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEyN) de la Universidad Nacional de Buenos Aires (UBA), donde se agregó tampón bicarbonato de amonio 0,05 M pH 8 a las muestras y se las digirió con tripsina durante toda la noche. Posteriormente, las muestras se liofilizaron por Speed Vac y se re-suspendieron con 10 µL de ácido fórmico 0,1 % (v/v).

4.6.3 Espectrometría de masas

Las muestras se analizaron por nano-HPLC acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap lo que permitió, en primer lugar, una separación de los péptidos obtenidos por digestión trípica y su posterior identificación.

En primer lugar, las muestras se ionizaron por electrospray EASY-SPRAY (Thermo Scientific) con un voltaje de spray de 3,5 kV. Con el fin de separar estos completos proteicos con un alto grado de resolución se utilizó un cromatógrafo EASY-nLC 1000 (Thermo Scientific) con una columna de fase reversa EASY-Spray Accucore (P/N ES801) (Thermo Scientific) a 35 °C y una pre-columna Acclaim PepMap (P/N 164946) (Thermo Scientific). Se utilizó un gradiente con dos soluciones; solución A, agua con ácido fórmico 0,1 % y solución B, acetonitrilo con ácido fórmico 0,1 %.

Se utilizó un espectrómetro Q-Exactive (Thermo Scientific) con una celda de disociación inducida por colisión (HCD, del inglés *High Collision Dissociation*) y un analizador Orbitrap, lo que permitió la identificación de los péptidos mientras se separaban por cromatografía. De esta manera, se obtuvieron un espectro de masas completo (Full MS, del inglés *Mass Spectrum*) y un espectro de masas masas (MSMS). Se utilizó un método que realizó la mayor cantidad de ciclos de medición por unidad de tiempo, por cada ciclo se obtuvo un Full MS y luego un MSMS de los 12 picos de mejor señal ruido en ese ciclo, con un rango de exclusión dinámico para disminuir el número de veces que un mismo péptido es fragmentado a lo largo de su elución del cromatograma.

4.6.4 Análisis de los datos

La identificación y cuantificación de las proteínas se realizó con el programa *Proteome Discoverer* (Thermo Scientific) versión 1.4. utilizando la base de datos correspondiente al estudio y las características vinculadas con la forma en que se trataron las muestras. De esta forma, el programa desarrolló un informe donde indicó que proteínas fueron identificadas y los péptidos que utilizó para esta identificación. Los criterios de búsqueda utilizados fueron los siguientes:

- Base de datos (origen): *Aspergillus niger*.
- Enzima: tripsina.
- Miscalculation: 2.
- Tolerancia de masa para precursor: 10 ppm.

- Tolerancia de masa para fragmento: 0,05 Da.
- Modificaciones Dinámicas: Oxidación (M)
- Modificaciones estáticas: Carbamidometilación (C)
- Nivel de confianza de los péptidos: alto.

Luego, se verificó que las proteínas identificadas por el servicio de espectrometría de masas correspondieran a proteínas de secreción utilizando la base de datos NCBI para conocer la secuencia proteica y luego estudiar la presencia de péptidos señal mediante el programa *on line* SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Aquellas proteínas que no se presentaron secuencia péptido señal, se las analizó con el programa *on line* SecretomeP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) para distinguir entre proteínas intracelulares y proteínas secretadas por vía alterna.

También se utilizaron las bases de datos y programas *on-line*, Uniprot (the UNiversal PROTein Resource, <http://www.uniprot.org>), Pfam (Protein FAMilies, <http://pfam.xfam.org/>).

En el caso de las proteínas hipotéticas, sus funciones se predijeron mediante Blastp en la base de datos de NCBI con proteínas no redundantes. La dispersión de las proteínas identificadas se graficó respecto a sus masas moleculares y puntos isoeléctricos y también se graficaron según su frecuencia relativa.

4.6.5 Análisis funcional de los secretomas optimizados

Teniendo en cuenta los datos secretómicos y la aplicación que se pretende (hidrólisis enzimática). Además de la actividad EX ya determinada (*secciones 4.6.1 y 4.6.3*), se determinó la actividad sobre papel de filtro (FPasa), CMCasa, celobiohidrolasa (CBH), β -glucosidasa (BGL), BXL y amilasa.

4.6.5.1 Determinación de la actividad FPasa

La actividad FPasa se determinó en ambos sobrenadantes mediante la cuantificación de azúcares reductores utilizando el método del DNS (Miller, 1959). Se siguió el protocolo propuesto por Ghose & Bisaria (1987) utilizando como sustrato 0,01 g de papel de filtro Whatman No 1 en 200 μ L de tampón acetato de sodio 0,05 M, pH 4,8. La

mezcla de reacción consistiendo en el sustrato y 100 μL de sobrenadante se incubó a 50 °C por 60 min. La absorbancia se midió en espectrofotómetro a 540 nm. La actividad FPasa se definió como unidades papel de filtro (FPU, del inglés *Filter Paper Units*), como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de glucosa por min.

4.6.5.2 Determinación de la actividad CMCasa

La actividad CMCasa se cuantificó a partir de la determinación de azúcares reductores mediante el método del DNS (Miller, 1959) utilizando como sustrato, CMC (Sigma-Aldrich, USA) 2 % (p/v) en *buffer* acetato de sodio 0,05 M pH 4,8 siguiendo el protocolo propuesto por Ghose & Bisaria (1987). La mezcla de reacción conteniendo 100 μL del sustrato y 100 μL del sobrenadante, se incubó a 50 °C por 30 min. Luego, se agregó 600 μL de DNS a la mezcla de reacción, se hirvió por 5 min y se adicionó 4 mL de agua destilada. La absorbancia se midió a 540 nm. Una unidad de actividad CMCasa (U) se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de glucosa por min.

4.6.5.3 Determinación de la actividad BGL

La actividad BGL se determinó en ambos sobrenadantes según Alfonsel *et al.* (1986) utilizando como sustrato *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido 1 mM (PNPG, Sigma-Aldrich, USA) en solución tampón acetato de sodio 0,05 M, pH 4,8. La mezcla de reacción, conteniendo 900 μL de sustrato y 100 μL del sobrenadante, se incubó a 50 °C, 150 rpm por 15 min. La reacción se detuvo con 500 μL de Na_2CO_3 1 M y se midió a 400 nm la cantidad de *p*-nitrofenol liberada. Una U de actividad BGL se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de *p*-nitrofenol por min.

4.6.5.4 Determinación de la actividad CBH

La actividad CBH en ambos sobrenadantes se determinó según Wu *et al.* (2006), con modificaciones utilizando como sustrato *p*-nitrofenil- β -celobiósido 500 μM (PNPC, Sigma-Aldrich, USA) en solución tampón acetato de sodio 0,05 M pH 4,8. La mezcla de reacción conteniendo 800 μL de sustrato y 200 μL del sobrenadante, se incubó a 50 °C por 30 min. La reacción se detuvo adicionando 1 mL de Na_2CO_3 20 % (p/v). Luego, se midió la cantidad de *p*-nitrofenol liberada por espectrofotómetro a 405 nm. Una U de actividad CBH se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de *p*-nitrofenol por min.

4.6.5.5 Determinación de la actividad BXL

La actividad BXL se determinó en ambos sobrenadantes según lo descrito en la sección 4.2.3, de acuerdo a Ghose & Bisaria (1987).

4.6.5.6 Determinación de la actividad amilasa

La actividad amilasa se cuantificó a partir de la determinación de azúcares reductores mediante el método del DNS (Miller, 1959) utilizando como sustrato almidón soluble (Sigma-Aldrich, USA) 2 % (p/v) en *buffer* acetato de sodio 0,05 M pH 4,8. La mezcla de reacción conteniendo 100 μ L del sustrato y 100 μ l del sobrenadante, se incubó a 50 °C, 200 rpm por 30 min. Luego, se agregó 600 μ L de DNS a la mezcla de reacción, se hirvió por 5 min y se adicionó 4 mL de agua destilada. La absorbancia se midió a 540 nm. Una unidad de actividad amilasa (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de amilosa por min.

4.6.5.7 Determinación de la actividad pectinasa

La actividad poligalacturonosa (PG) se determinó utilizando ácido poligalacturónico como sustrato, midiendo los grupos reductores liberados mediante el método del DNS (Miller 1959). Una unidad de PG se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de ácido galacturónico por minuto bajo las condiciones ensayadas.

Los ensayos de las actividades enzimáticas se llevaron a cabo por duplicado y se analizaron y graficaron con el programa GraphPad 5^{ta} versión.

4.7 Aplicación de los sobrenadantes optimizados en la hidrólisis de residuos agroindustriales

4.7.1 Biomasa utilizada

Ambos sobrenadantes optimizados en este trabajo se aplicaron en la hidrólisis de bagazo de caña de azúcar y de mandioca molidos hasta obtener partículas de 40 mesh. La composición de ambos residuos se caracterizó NREL y ya se describió previamente (**Tabla 8**).

4.7.2 Determinación de la termoestabilidad de las actividades enzimáticas intervinientes en la hidrólisis

La temperatura a la cual se lleva a cabo la hidrólisis enzimática es muy importante de manera tal que las enzimas actúen de manera óptima, así como también lo es la termoestabilidad de las enzimas durante el período de la aplicación para que el proceso sea lo más eficiente posible. Por esta razón se determinó la termoestabilidad de las enzimas con mayor influencia en el proceso de hidrólisis, de la actividad EX (ya especificada en la *sección 4.5.3*) FPasa, BGL y BXL. Para ello, se determinaron incubando ambos sobrenadantes a 30 °C, pH 4,8. Los sobrenadantes se retiraron a distintos intervalos; 6, 12, 24, 48, 72, 96 h y se determinó la actividad residual de cada enzima. La actividad residual se expresó en porcentaje tomando la actividad enzimática al tiempo cero como el 100 %.

Los ensayos de termoestabilidad enzimática se llevaron a cabo por duplicado y se analizaron y graficaron con el programa GraphPad 5^{ta} versión.

4.7.3 Ensayos de hidrólisis sobre residuos de caña de azúcar y de mandioca

Con el fin de remover la lignina sin hidrolizar la holocelulosa se trató químicamente a los residuos con una solución alcalina previa a la hidrólisis enzimática. Para ello, 10 g de cada residuo con 200 mL de solución de NaOH 0,85 %, logrando una consistencia del 5 % (p/v), se expusieron a 121 °C por 30 min. Luego, los materiales se filtraron y lavaron con agua corriente hasta neutralizar el pH. Se dejaron en recipientes cubiertos con *buffer* acetato de sodio 0,5 M pH 4,8 durante toda la noche a 80 rpm. Se los secó en estufa a 45 °C por 24 h y estos residuos pretratados se usaron para llevar a cabo los siguientes ensayos:

Hidrólisis enzimática con sobrenadantes

Se ensayó el sobrenadante optimizado con bagazo de azúcar en la hidrólisis del mismo residuo y de bagazo de mandioca. Asimismo, el sobrenadante optimizado con bagazo de mandioca se ensayó en la hidrólisis del mismo bagazo y de bagazo de caña de azúcar. Previa a la hidrólisis, los sobrenadantes se clarificaron con filtros de 0,22 µm (Chromafil® xtra) y concentraron con dispositivos Amicon de 3 kDa.

Para ello, en frascos Erlenmeyer de 100 mL se colocó 1 g de residuo y el sobrenadante a razón de una carga enzimática de EX, 300 Ug⁻¹ de biomasa, FPU 10 Ug⁻¹ de biomasa y BGL 20 Ug⁻¹ de biomasa. La consistencia (peso seco/volumen) del material fue del 5 % (p/v) en buffer acetato de sodio 0,05 M pH 4,8. Las condiciones de hidrólisis fueron 30 °C, 200 rpm durante 24 h.

Control 1: hidrólisis enzimática con enzimas comerciales

En frascos Erlenmeyer de 100 mL se colocó 1 g de residuo y una carga enzimática de EX, 300 Ug⁻¹ de la enzima comercial Xylanase (Sigma-Aldrich, USA) FPU 10 Ug⁻¹ de la enzima comercial Celluclast (Sigma-Aldrich, USA) y BGL 20 Ug⁻¹ de la enzima comercial Viscozyme (Sigma-Aldrich, USA). La consistencia (peso seco/volumen) del material fue del 5 % (p/v) en buffer acetato de sodio 0,05 M pH 4,8. Las condiciones de hidrólisis fueron 30 °C, 200 rpm durante 24 h.

Control 2: bagazos pretratados con *buffer* acetato de sodio 50 mM pH 4,8

En frascos Erlenmeyer de 100 mL se colocó 1 g de residuo y 20 mL de *buffer* acetato de sodio 0,05 M pH 4,8 para obtener una consistencia del 5 % (p/v). Se sometieron a las mismas condiciones que los ensayos de hidrólisis, 30 °C, 200 rpm durante 24 h.

Control 3: sobrenadantes sin material pretratado

Los sobrenadantes sin material pretratado se sometieron a iguales condiciones de los ensayos de hidrólisis, 30 °C, 200 rpm durante 24 h.

Todos los ensayos, reacciones de hidrólisis y controles, luego de las 24 h de incubación se filtraron al vacío y se centrifugaron a 8000 rpm durante 20 min. Los sobrenadantes resultantes se utilizaron para determinar el rendimiento de la hidrólisis (sección 4.7.4) mediante el método del ácido DNS y se análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*). Los residuos hidrolizados, así como los pertenecientes a los controles, se observaron por microscopía electrónica de barrido (sección 4.7.5).

4.7.4 Rendimiento de la hidrólisis

Los productos principales que se busca en la conversión de la biomasa son los azúcares monoméricos. En este trabajo se determinaron mediante el ensayo del ácido DNS propuesto Miller (1959). Se colocó 100 μL del sobrenadante resultante de cada ensayo de hidrólisis y 600 μL del reactivo DNS. Se llevó a incubar a 100 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 min. Luego, se añadió 4 mL de agua destilada y se midió en espectrofotómetro a 540 nm. La cantidad de azúcares reductores se utilizó para calcular el porcentaje de sacarificación el cual es un indicador de la conversión de la hidrólisis (Salcedo *et al.*, 2011).

$$\% \text{ sacarificación} = \frac{\text{azúcares reductores} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) * 0,9 * 100}{[\text{concentración sustrato}] \frac{\text{mg}}{\text{mL}}} \quad (4)$$

Con el objetivo de conocer los azúcares monoméricos presentes en los productos hidrolizados y en los controles, estos se analizaron por HPLC. El estudio se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos Agilent 1100 con detector RI y una columna analítica Aminex HPX-87 con precolumna (BioRad) a 80 $^{\circ}\text{C}$ por 40 min. La fase móvil consistió en agua 100 % a un flujo de 0,5 mLmin^{-1} . La concentración de los azúcares gL^{-1} se calculó usando curvas estándar de compuestos puros glucosa, celobiosa, xilosa, arabinosa y ácido acético (Sigma-Aldrich, USA).

Luego, se calculó el rendimiento porcentual de azúcares monoméricos con respecto a la composición original de carbohidratos. La siguiente ecuación se utilizó para calcular el rendimiento de la hidrólisis:

$$\% \text{ hidrólisis} = \frac{\text{glucosa celobiosa xilosa} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) * 100}{\text{polisacáridos en el sustrato} * FC} \quad (5)$$

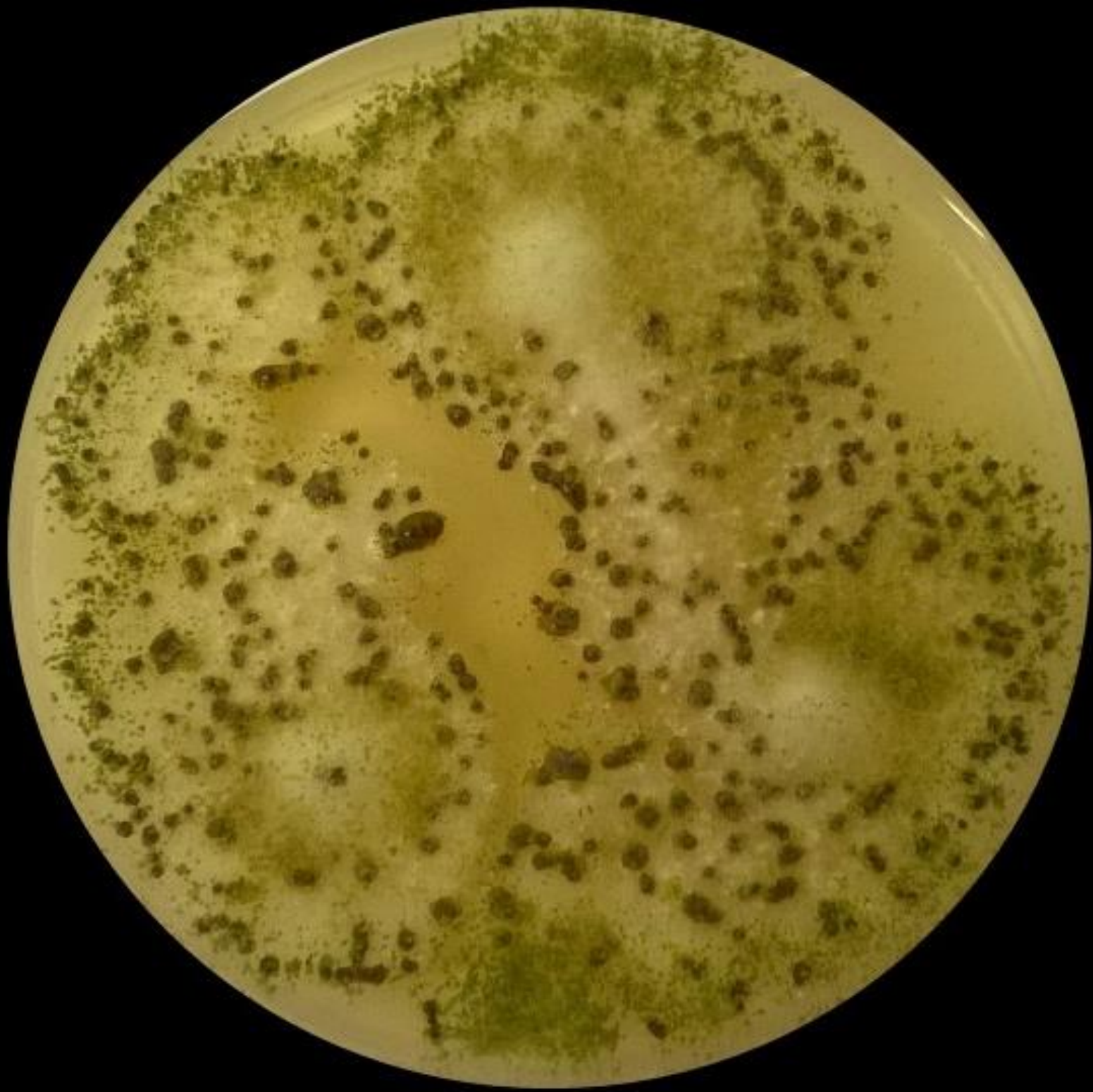
donde, FC corresponde al factor de conversión: 1,11 para glucosa; 1,05 para celobiosa y 1,13 para xilosa.

4.7.5 Estructura microscópica de los bagazos hidrolizados

Los bagazos se observaron en microscopio electrónico de barrido para evaluar los cambios producidos en su estructura microscópica en cada etapa de la aplicación,

- al principio, es decir, el material virgen,
- luego del pretratamiento alcalino y
- después de la hidrólisis enzimática con los sobrenadantes optimizados, con las enzimas comerciales (control positivo) y con el buffer solamente (control negativo).

Primeramente, las muestras de los bagazos en cada etapa se fijaron Formaldehído: Alcohol: Ácido (FAA, 10:50:5). Luego, las muestras se deshidrataron en soluciones de acetona de concentración creciente, y se secaron por el método de punto crítico (CPD, del inglés *Critical Point Drying*) con CO₂. Posteriormente, las muestras se metalizaron con oro y las superficies se observaron con un microscopio electrónico de barrido (JEOL 5800LV).



RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Aislamiento de hongos *Aspergillus* en Misiones y su evaluación xilanólítica y proteolítica

5.1.1 Aislamiento de hongos *Aspergillus* de Misiones

En esta primera parte del trabajo, se focalizó en la búsqueda de hongos pertenecientes al género *Aspergillus* a partir de materiales en pudrición en zonas naturales de Misiones. Una vez obtenidos los aislamientos y llevados al laboratorio, se seleccionó aquellos que pertenecían al género *Aspergillus* con base en sus características macro y microscópicas (**Figura 8**). Los aislamientos LBM 126, LBM 128, LBM 131 y LBM 135 presentaron una esporulación gris verdosa tenue mientras que, los aislamientos LBM 129, LBM 136 y LBM 210, una esporulación verdosa más oscura. Los aislamientos LBM 127, LBM 130 y LBM 134 mostraron una esporulación negra; y los aislamientos LBM 132 y LBM 133 una esporulación verde amarillenta clara. Todos estos hongos presentaron una cabeza conidial característica de este género fúngico.

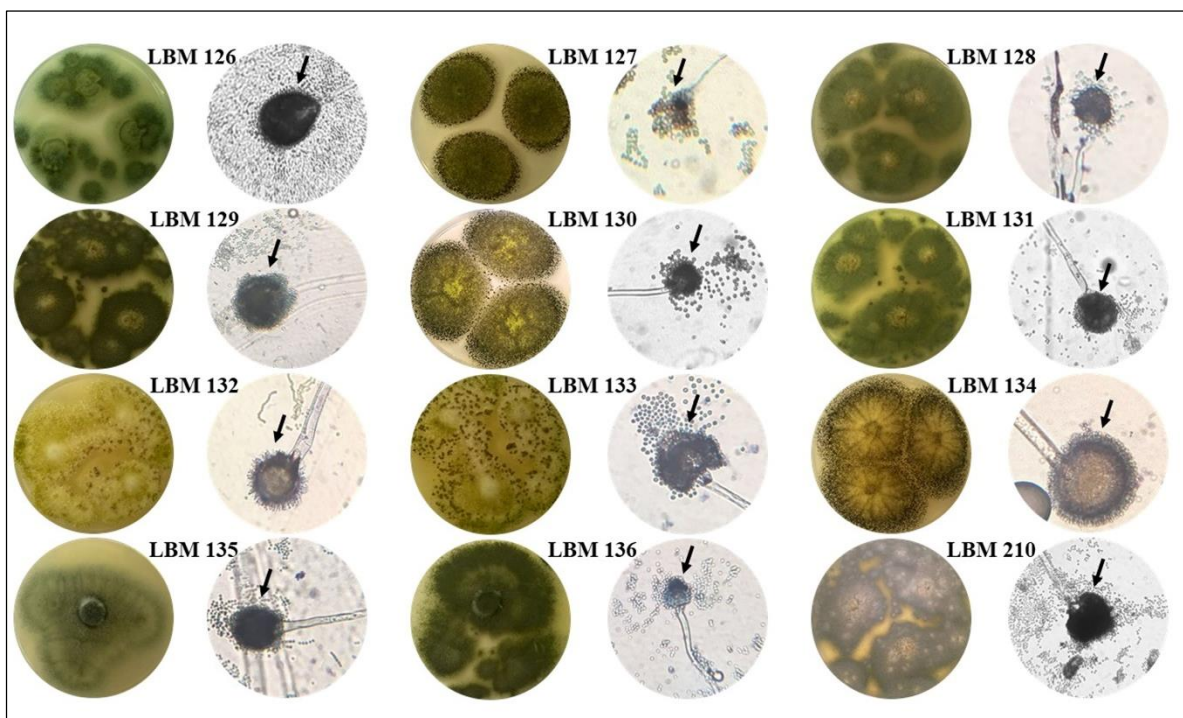


Figura 8. Aislamiento de hongos *Aspergillus* de Misiones. Características macroscópicas (derecha) y microscópicas (izquierda) de los hongos del género *Aspergillus* aislados en suelo, hojas, madera y frutas en descomposición en Misiones. Los aislados crecieron en placas de PDA por 7 días. Las cabezas conidiales, característica de este género, se indican con una flecha.

Para seleccionar los aislamientos fúngicos más promisorios se evaluó las actividades EX, BXL y proteolítica. La evaluación se realizó utilizando como fuente de carbono, bagazo de caña de azúcar en lugar del xilano comercial utilizado en la mayoría de los estudios de *screening* de cepas xilanolíticas. Para estar seguros de que esta técnica era eficiente, se utilizó como control positivo externo el hongo *T. atroviride* LBM 117, conocido por su alta producción de EX.

5.1.2 Actividad xilanolítica de los aislamientos de *Aspergillus*

La capacidad de producir EX y BXL de los 25 aislamientos de *Aspergillus* se evaluó en medio líquido con peptona y bagazo de caña no pretratado caracterizado en este trabajo (**Tabla 6**), el cual soportó eficazmente la producción de xilanasas. La actividad EX de todos los aislamientos se evaluó durante 20 días para conocer el perfil de actividad enzimática y el día de mayor actividad enzimática. De este análisis exploratorio se observó que la mayoría de los hongos mostraron un perfil similar de la producción de EX durante los 20 días (**Figura 9**). Los hongos produjeron bajos niveles de EX los primeros 4 días de incubación, con excepción los aislamientos LBM 056 y LBM 130. La actividad EX de casi todos los aislamientos aumentó a partir del día 6 u 8 de incubación, alcanzando niveles máximos de la actividad enzimática entre los días 10 y 16. El aislamiento LBM 041 mostró la mayor actividad EX el día 10; LBM 057, LBM 058, LBM 063, LBM 126, LBM 128, LBM 129, LBM 130, LBM 131, LBM 132, LBM 133, LBM 134, LBM 135, LBM 136 y LBM 210 mostraron la mayor actividad EX el día 12 de incubación; LBM 043, LBM 048, LBM 051, LBM 054 y LBM 059, el día 14 de incubación. Los aislamientos LBM 046, LBM 127 y *T. atroviride* LBM 117 produjeron la mayor actividad EX el día 16 de incubación. Luego del día 16, la actividad EX de casi todos los aislamientos decayó dramáticamente. Únicamente los aislamientos LBM 053 y LBM 056 mostraron su mayor actividad EX el día 20 de incubación.

Tabla 6. Composición del bagazo de caña de azúcar utilizado en el *screening* de la actividad xilanólica de los aislamientos de *Aspergillus*.

Componentes	Composición (%)
Glucosa	42,95 ± 0,77
Xilosa	13,32 ± 4,35
Arabinosa	2,17 ± 0,20
Ácido acético	7,41 ± 4,01
Lignina soluble	20,64 ± 6,55
Lignina insoluble	11,37 ± 3,33
Cenizas	2,3 ± 0,4

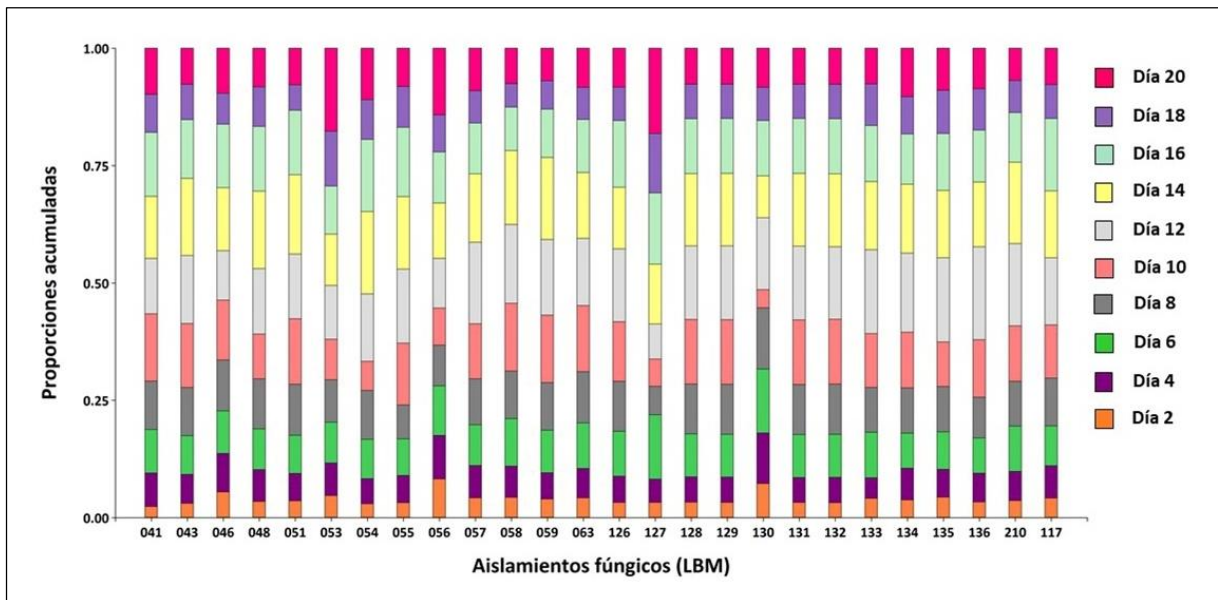


Figura 9. Actividad EX de los aislamientos de *Aspergillus* durante 20 días de incubación. Cada barra representa el total de la actividad EX de un aislamiento (LBM) y los diferentes colores corresponden la actividad EX proporcional a cada día de incubación determinada en los sobrenadantes de los aislamientos.

La evaluación de la actividad EX de los aislamientos fúngicos se completó con un ANOVA (**Anexo 2**) y un análisis LSD (**Anexo 3**) para conocer el día de mayor actividad EX para cada hongo. De esto se desprende que el 60 % de los aislamientos alcanzaron su mayor actividad EX el día 12 de incubación ($p < 0,05$); 20 %, el día 14 ($p < 0,05$); 8 % el día 20 y 4 % los días 10 y 16 ($p < 0,05$) (**Tabla 7**). Por otra parte, el 68 % de los aislamientos presentaron actividad EX mayor a 20 UmL^{-1} y los aislamientos LBM 043, LBM 055, LBM 131, LBM 132, LBM 133 y LBM 134 alcanzaron una actividad EX de casi 30 UmL^{-1} , siendo

mayor que la actividad EX reportada para *T. atroviride* LBM 117, el hongo utilizado como control positivo utilizado por producir EXs (Figura 10).

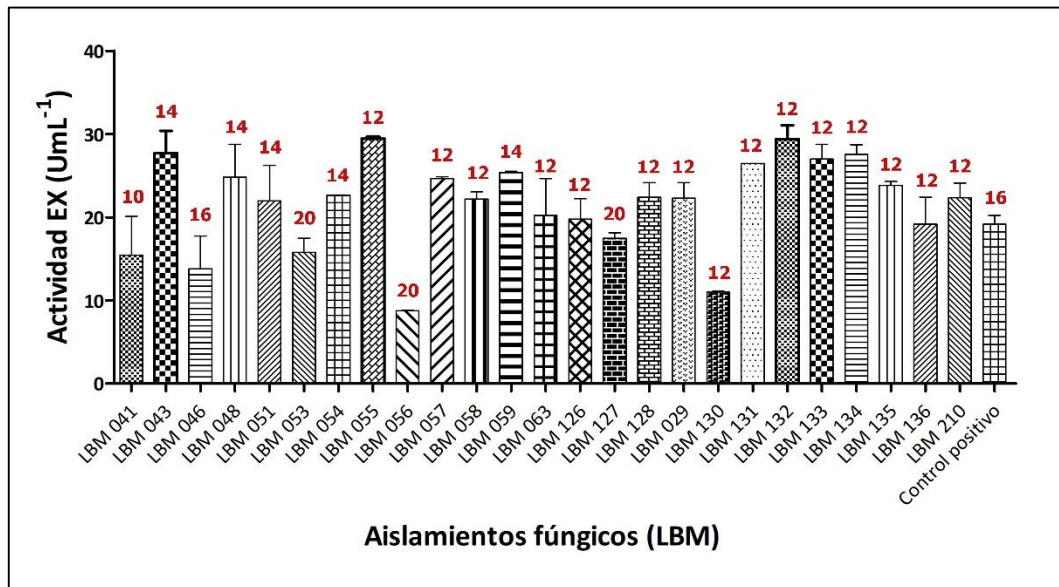


Figura 10. Mejor actividad EX de cada aislamiento de *Aspergillus*. Actividad EX determinada en los sobrenadantes de los 25 aislamientos de *Aspergillus* evaluados y de *T. atroviride* LBM 117 utilizado como control positivo. Los números en rojo arriba de las barras significan los días de mayor actividad EX.

La actividad BXL también se determinó en todos los aislamientos fúngicos el día de mayor actividad EX y 2 días posteriores; la diferencia entre ambas mediciones no fue estadísticamente significativa ($p \geq 0,05$). El 20 % de los aislamientos presentaron valores de actividad BXL mayor a $0,6 \text{ U}_{\text{mL}}^{-1}$, estos aislamientos fueron LBM 046, LBM 053, LBM 055, LBM 134 y LBM 135. Por el contrario, el 36 % de los aislamientos produjeron bajos niveles de actividad BXL, menor a $0,1 \text{ U}_{\text{mL}}^{-1}$, estos fueron LBM 051, LBM 058, LBM 059, LBM 063, LBM 126, LBM 128, LBM 131 y LBM 133. El 44 % de los aislamientos restantes presentaron niveles de actividad BXL entre $0,1$ y $0,4 \text{ U}_{\text{mL}}^{-1}$, los mismos fueron LBM 041, LBM 043, LBM 048, LBM 056, LBM 057, LBM 125, LBM 127, LBM 129, LBM 130, LBM 132, LBM 136, LBM 210 y el control positivo *T. atroviride* LBM 117 (Figura 11).

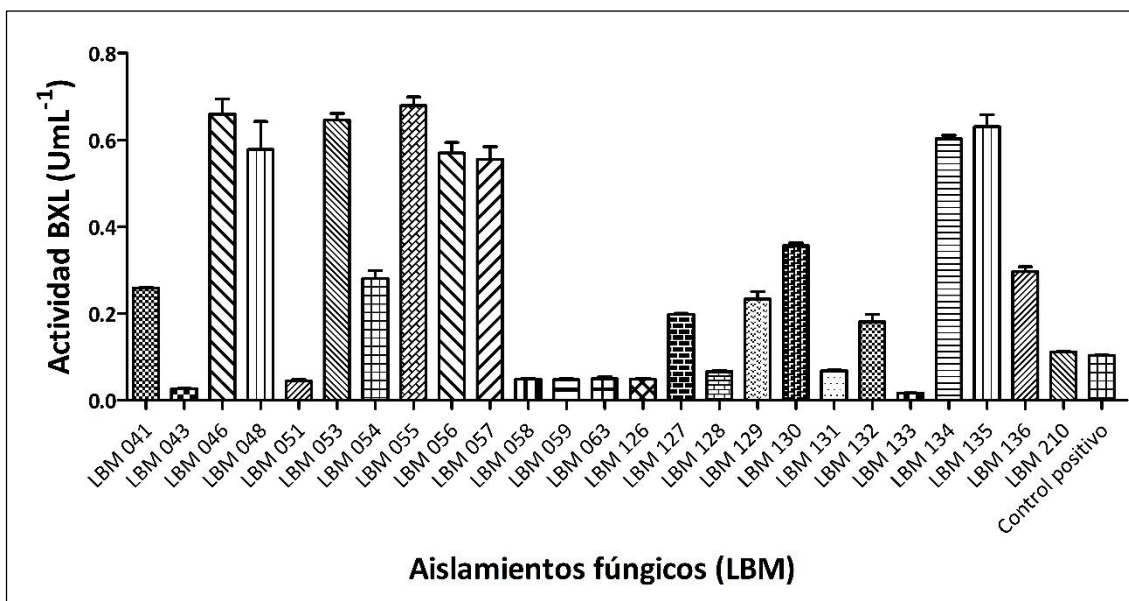


Figura 11. Mejor actividad BXL de cada aislamiento de *Aspergillus*. Actividad BXL determinada en los sobrenadantes de los 25 aislamientos de *Aspergillus* evaluados y de *T. atroviride* LBM 117 utilizado como control positivo el día 12 de incubación.

5.1.3 Actividad proteolítica de los aislamientos de *Aspergillus*

La estabilidad de las actividades EX y BXL pueden resultar afectadas por la coproducción de enzimas proteolíticas. Por ello, se evaluó también la actividad proteolítica sobre caseína y gelatina a pH neutro y ácido, respectivamente. Estos ensayos resultaron en técnicas sencillas, repetibles y rápidas ya que cada placa permitió evaluar la actividad proteolítica de hasta 6 muestras por duplicado (**Figura 12**). Los halos de degradación en placas de caseína fueron claros y bien definidos (**Figura 12 a**). Por el contrario, los halos en placas de gelatina fueron difíciles de detectar y fotografiar, por lo que se utilizó el reactivo Bradford para crear un contraste entre los halos de degradación y las zonas sin degradar (**Figura 12 b**). Debido a que el colorante Coomassie presente en el reactivo Bradford se une a las proteínas no hidrolizadas, las zonas que no sufrieron proteólisis se tiñeron de azul-celeste contrastando con los halos de degradación que permanecieron blancos.

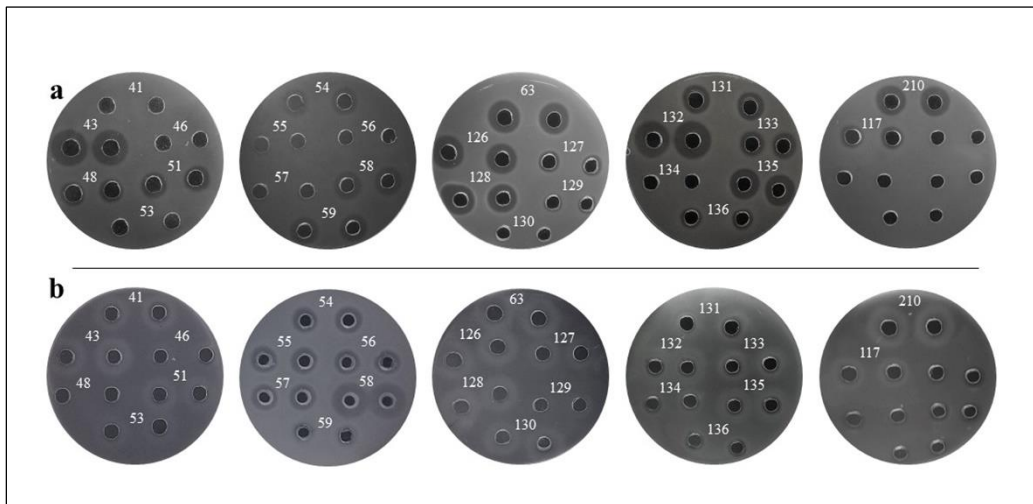


Figura 12. Actividad proteolítica presente en los sobrenadantes de los aislamientos de *Aspergillus* y de *T. atroviride* LBM 117 (control positivo). **a)** Actividad caseína-proteasa determinada en ensayos de placa de leche descremada 1 % (p/v) el día de mayor actividad EX y BXL y **b)** actividad gelatina-proteasa en ensayos de placa de gelatina 1 % (p/v) en *buffer* acetato de sodio 0,05 M pH 4,8. Se utilizó el sobrenadante que presentó mayor actividad EX de cada aislamiento fúngico.

Casi todos los sobrenadantes de los aislamientos fúngicos que presentaron halo de degradación alrededor del pocillo luego de la incubación en placas de caseína, presentaron halo de degradación en placas de gelatina. Sin embargo, los halos de degradación fueron de diferentes tamaños. Los sobrenadantes de los aislamientos LBM 043, LBM 063, LBM 126, LBM 128, LBM 132 y LBM 210 produjeron halos de degradación muy grandes en placas de caseína y de gelatina, exponiendo altos niveles de ambas actividades proteolíticas. Por otro lado, los sobrenadantes pertenecientes a los aislamientos LBM 041, LBM 046, LBM 053, LBM 055, LBM 056, LBM 057, LBM 130, LBM 134 y LBM 136 no produjeron halos de degradación en los ensayos en placa de caseína, indicando nula actividad caseína-proteasa o que la misma fue ínfima y la técnica no fue sensible para detectarla. Los demás aislamientos, LBM 048, LBM 051, LBM 054, LBM 058, LBM 059, LBM 127, LBM 129, LBM 131, LBM 133, LBM 135, LBM 136 y LBM 117 presentaron halos de degradación medianos en placas de caseína. En placas de gelatina, a excepción del aislamiento LBM 048, todos los sobrenadantes produjeron halos de degradación. La mayoría de estos halos fueron grandes indicando niveles altos de actividad gelatina-proteasa; mientras que los halos de los aislamientos LBM 059, LBM 134 y LBM 136 fueron más pequeños.

5.1.4 Selección de los aislamientos más promisorios mediante análisis multivariado

Un resumen de las actividades EX, BXL y proteolíticas se detalla en la **Tabla 7**. Estos resultados confirman que diferentes aislamientos tienen comportamientos únicos. Estos datos se utilizaron para reconocer los aislamientos más promisorios, con mayor actividad xilanolítica y menor actividad proteolítica. Para ello, se llevaron a cabo dos análisis multivariados, un PCA y un análisis de conglomerados.

El PCA se representa en la **Figura 13**; el gráfico de las variables, actividades enzimáticas, (**Figura 13 a**) muestra la estructura de correlación entre ellas y su influencia en el posicionamiento de las observaciones, de los aislamientos, (**Figura 13 b**). Ambos gráficos ayudaron al análisis de correlación entre las observaciones y las variables. El PCA sobre las actividades enzimáticas de los aislamientos expusieron que el primer componente principal (CP1) fue responsable del 45,1 % de la variabilidad total de los resultados; el segundo componente principal explicó el 26,9 % de la variación. En total, ambos componentes principales (CP) sumaron un 72 % de la variación total de los resultados experimentales, indicando que el PCA representó adecuadamente la relación entre los aislamientos y las variables.

El análisis del CP1 muestra que la actividad EX registrada los días 10, 12, 14 y 16 se orientaron del lado derecho del gráfico y presentaron una correlación positiva entre ellas. Esto significa que la actividad EX influyó significativamente en el posicionamiento de los aislamientos fúngicos en esta parte del gráfico; es decir que estos aislamientos tuvieron *scores* más altos, niveles altos de actividad EX. Por otra parte, la actividad EX registrada el día 20, la actividad BXL, gelatina-proteasa y caseína-proteasa no tuvieron influencia significativa sobre los aislamientos según el CP1 ya que estas actividades enzimáticas se posicionaron cercanas al 0 en el eje de las X.

Tabla 7. Screening cuantitativo de las actividades EX, BXL y proteolíticas de los aislamientos de *Aspergillus*.

Aislamientos Fúngicos	Día de determinación enzimática ^a	Actividades enzimáticas			
		EX ^b	BXL ^b	Proteolítica (caseína) ^c	Proteolítica (gelatina) ^c
LBM 041	10	15,46 ± 6,59	0,26 ± 0,003	7,48 ± 0,014	10,13 ± 0,032
LBM 043	14	27,70 ± 3,83	0,03 ± 0,001	12,93 ± 1,199	12,67 ± 0,134
LBM 046	16	13,79 ± 5,54	0,66 ± 0,050	7,48 ± 0,032	8,26 ± 0,173
LBM 048	14	24,81 ± 5,57	0,58 ± 0,091	8,65 ± 0,004	7,93 ± 0,178
LBM 051	14	21,97 ± 6,01	0,04 ± 0,006	10,71 ± 0,226	9,12 ± 0,004
LBM 053	20	15,78 ± 2,41	0,65 ± 0,023	7,53 ± 0,035	10,09 ± 0,032
LBM 054	14	22,64 ± 0,04	0,28 ± 0,026	10,48 ± 0,460	10,40 ± 0,071
LBM 055	12	29,48 ± 0,21	0,68 ± 0,029	7,55 ± 0,00	10,48 ± 0,014
LBM 056	20	8,77 ± 0,06	0,57 ± 0,034	7,85 ± 0,071	11,67 ± 0,113
LBM 057	12	24,63 ± 0,32	0,56 ± 0,041	7,89 ± 0,014	13,67 ± 0,109
LBM 058	12	22,18 ± 1,22	0,05 ± 0,004	10,06 ± 0,124	13,89 ± 0,028
LBM 059	14	25,36 ± 0,25	0,05 ± 0,003	9,56 ± 0,046	8,76 ± 0,152
LBM 063	12	20,20 ± 6,26	0,05 ± 0,007	13,56 ± 0,025	12,74 ± 0,24
LBM 126	12	19,74 ± 3,50	0,05 ± 0,004	13,26 ± 0,007	13,37 ± 0,007
LBM 127	20	17,43 ± 0,98	0,20 ± 0,003	9,93 ± 0,223	9,24 ± 0,014
LBM 128	12	22,37 ± 2,55	0,07 ± 0,004	14,30 ± 0,184	12,96 ± 0,216
LBM 129	12	22,28 ± 2,69	0,23 ± 0,024	8,17 ± 0,021	7,34 ± 0,177
LBM 130	12	10,99 ± 0,11	0,36 ± 0,009	7,48 ± 0,039	11,71 ± 0,262
LBM 131	12	26,43 ± 0,02	0,07 ± 0,004	11,71 ± 0,216	10,17 ± 0,007
LBM 132	12	29,41 ± 2,32	0,18 ± 0,025	17,06 ± 0,081	12,86 ± 0,014
LBM 133	12	26,98 ± 2,50	0,02 ± 0,001	9,16 ± 0,007	11,56 ± 0,304
LBM 134	12	27,52 ± 1,70	0,60 ± 0,009	7,37 ± 0,209	7,37 ± 0,173
LBM 135	12	23,82 ± 0,69	0,63 ± 0,039	10,06 ± 0,085	11,55 ± 0,018
LBM 136	12	19,15 ± 4,61	0,29 ± 0,042	7,34 ± 0,177	11,18 ± 0,647
LBM 210	12	22,32 ± 2,48	0,11 ± 0,003	12,90 ± 0,194	11,68 ± 0,004
LBM 117 ^d	16	19,15 ± 1,52	0,10 ± 0,02	9,82 ± 0,007	11,02 ± 0,127

^a Día de mayor actividad EX para cada aislamiento y para la actividad BXL y ensayos proteolíticos.

^b Promedio de las actividades EX y BXL (U mL⁻¹) en el día de mayor actividad.

^c Promedio de los diámetros de los halos (en mm) de las actividades proteolíticas el día de mayor actividad EX.

^d *T. atroviride* LBM 117 utilizado como control positivo.

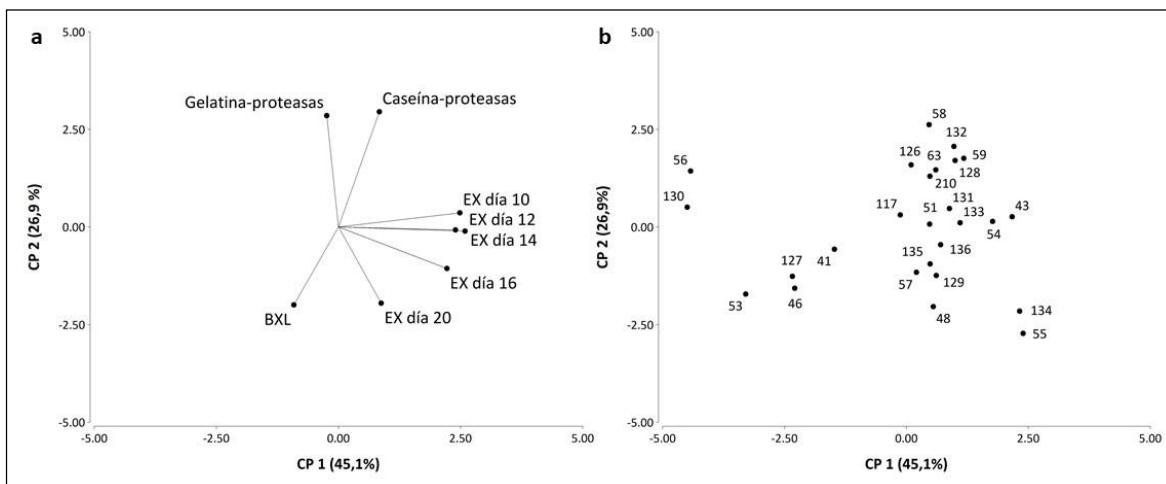


Figura 13. PCA de las actividades enzimáticas de los aislamientos de *Aspergillus* y del control positivo. a) Gráfico de las variables según los 2 primeros componentes principales, CP 1 y CP 2 para la actividad EX de los días que mostraron significancia estadística; del día 10 (EX día 10); del día 12 (EX día 12); del día 14 (EX día 14); del día 16 (EX día 16) y del día 20 (EX día 20); para la actividad BXL del mejor día de producción y para las actividades proteolíticas sobre gelatina y sobre caseína. **b)** Gráfico de posicionamiento de los aislamientos según los 2 primeros componentes principales, CP 1 y CP 2. Los aislamientos posicionados cerca de las variables presentan mayor influencia de estas.

El análisis de las variables basado en el CP2 indicó ambas actividades proteolíticas tuvieron gran influencia positiva y sirvieron para posicionar aquellos aislamientos con mayor actividad proteolítica en esta parte del gráfico. Ambas actividades proteasas se correlacionaron positivamente entre ellas y presentaron una correlación negativa con la actividad EX del día 20 y la actividad BXL. La actividad EX registrada los días 10, 12, 14 y 16 no tuvieron demasiada inferencia sobre el CP2 ya que todas se orientaron sobre el 0 en el eje de las Y. En el gráfico de los aislamientos, LBM 055 y LBM 134 sobresalieron colocándose en cuadrante derecho inferior (peso positivo para el CP1 y negativo para el CP2) por ser los aislamientos con mayores niveles de actividad EX y BXL y con escasa actividad proteolítica. Inversamente, LBM 056 y LBM 130 se posicionaron en el cuadrante izquierdo superior indicando sus bajos niveles de actividad EX y altos niveles de actividad proteolítica. Por otra parte, LBM 041, LBM 046, LBM 053 y LBM 127 se colocaron en el cuadrante izquierdo inferior debido a sus bajos valores de las actividades EX y caseína-proteasa, presentando diferentes comportamientos con relación a las actividades BXL y gelatina-proteasa. Los demás aislamientos se posicionaron

dispersamente en toda la parte derecha del gráfico revelando sus altos niveles de actividad EX y diferentes perfiles de las actividades BXL y proteolíticas.

Con el fin de clasificar todos los aislamientos en función de su capacidad de producción enzimática y formar grupos homogéneos se llevó a cabo un análisis de conglomerados. El conglomerado formado se muestra en la **Figura 14** con una correlación cofenética de 0,779.

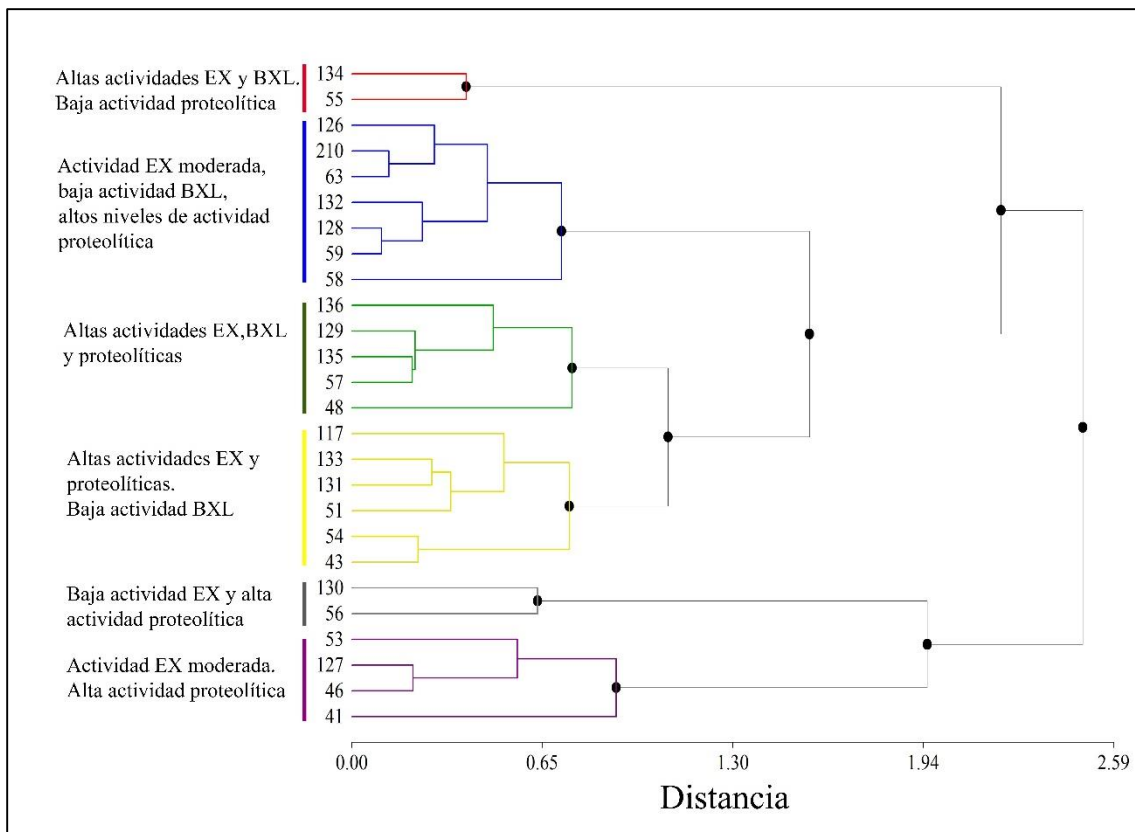


Figura 14. Análisis de conglomerados de los aislamientos de *Aspergillus* y del control positivo. La clasificación de los aislamientos se basó en sus actividades enzimáticas y se formaron 6 grupos con diferentes características.

Se formaron seis grupos en función de sus niveles enzimáticos. El primer grupo presentó las mejores cualidades, altos niveles de actividad EX y BXL y bajos niveles de actividad proteolítica; el mismo se conformó por los aislamientos LBM 055 y LBM 134. Por ello, ambos aislamientos se consideraron como los candidatos promisorios y se utilizaron para continuar con el trabajo de tesis. El segundo grupo comprendió aislamientos que mostraron no sólo alta actividad xilanolítica sino también alta actividad

proteolítica, estos fueron LBM 048, LBM 057, LBM 129, LBM 135 y LBM 136. El tercer grupo formado por LBM 043, LBM 051, LBM 054, LBM 117, LBM 131 y LBM 133 mostraron niveles altos de actividad proteolítica y niveles bajos de actividad BXL. Los aislamientos del cuarto grupo presentaron niveles medios de actividad xilanolítica y niveles muy altos de actividad proteolítica; estos fueron LBM 058, LBM 059, LBM 063, LBM 126, LBM 128, LBM 132 y LBM 210. Los aislamientos LBM 041, LBM 046, LBM 053 y LBM 127 conformaron el quinto grupo y presentaron niveles medios de actividad EX, actividad BXL variable y altos niveles de actividad gelatina-proteasa. El último grupo se formó por LBM 056 y LBM 130, los cuales mostraron baja actividad EX y muy alta actividad gelatina-proteasa. En resumen, los hongos pertenecientes a los tres últimos grupos no se tuvieron en cuenta para estudios posteriores en este trabajo ya que fueron productores pobres de enzimas EX; por otro lado, LBM 055 y LBM 134 fueron los mejores hongos xilanolíticos con baja actividad proteolítica.

5.2 Efecto de residuos lignocelulósicos sobre la actividad EX de los aislamientos más promisorios

Debido a que los aislamientos LBM 055 y LBM 134 fueron los más promisorios, se evaluó el efecto de los bagazos de caña de azúcar, de mandioca y de los aserrines de pino y eucaliptus sobre la actividad EX de dichos aislamientos. La caracterización de los bagazos y de aserrín de eucaliptus se llevó a cabo por el método propuesto por el NREL en esta tesis mientras que, la caracterización del aserrín de pino se llevó a cabo por Rodríguez *et al.* (2017) (**Tabla 8**).

En ambos hongos, se registró la mayor actividad EX ($p < 0,05$) cuando crecieron con los bagazos de caña y de mandioca como sustrato (**Figura 15**). En general, LBM 055 y LBM 134 presentaron perfiles de actividad enzimática similares, mostraron altos niveles de EX cuando crecieron con los bagazos y menores valores con los aserrines. El aislamiento LBM 134 alcanzó los niveles máximos ($p < 0,05$) de actividad EX, $22,57 \pm 0,02 \text{ U mL}^{-1}$ y $32,05 \pm 3,20 \text{ U mL}^{-1}$, el día 12 cuando creció con bagazo de mandioca y el día 8 con bagazo de caña de azúcar, respectivamente. Por su parte, LBM 055 presentó su más alta actividad EX ($p < 0,05$), $9,78 \pm 0,58 \text{ U mL}^{-1}$ y $13,25 \pm 2,82 \text{ U mL}^{-1}$, con bagazo de mandioca y bagazo de caña de azúcar, respectivamente.

Tabla 8. Composición de los residuos lignocelulósicos; bagazo de caña de azúcar (BCA), bagazo de mandioca (BM), aserrín de eucaliptus (AE), aserrín de pino (AP).

Componentes de los residuos	Composición de los residuos (%)			
	BCA	BM	AE	AP
Glucosa	42,95 ± 0,77	72,5 ± 0,59	48,78 ± 1,00	Carbohidratos totales 65,17
Xilosa	13,32 ± 4,35	11,74 ± 1,16	7,85 ± 2,21	
Arabinosa	2,17 ± 0,20	2,62 ± 0,48	-	
Ácido acético	7,41 ± 4,01	2,24 ± 0,02	3,51 ± 0,045	
Lignina soluble	16,64 ± 2,55	6,54	21,67 ± 0,87	23,99 ± 1,28
Lignina insoluble	9,37 ± 1,33	3,79	17,86 ± 1,31	0,46 ± 0,03
Cenizas	2,3 ± 0,4	1,67	2,3 ± 0,63	0,59 ± 0,01

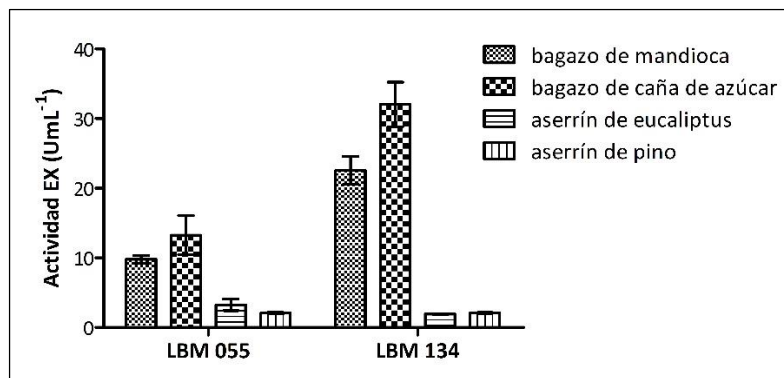


Figura 15. Efecto de residuos agroindustriales y actividad EX. Efecto de los bagazos de caña, mandioca, aserrines de pino y eucaliptus (10 gL⁻¹) sobre la actividad EX de los aislamientos LBM 055 y LBM 134.

Debido a que ambos bagazos soportaron los mayores niveles de actividad EX, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de estos sobre la EX probando además la modalidad de agitación, con y sin agitación (**Figura 16**). Ambos hongos alcanzaron niveles máximos de EX ($p < 0,05$) cuando crecieron con bagazo de mandioca sin agitación (**Figura 16 a**) y con bagazo de caña de azúcar con agitación (**Figura 16 b**).

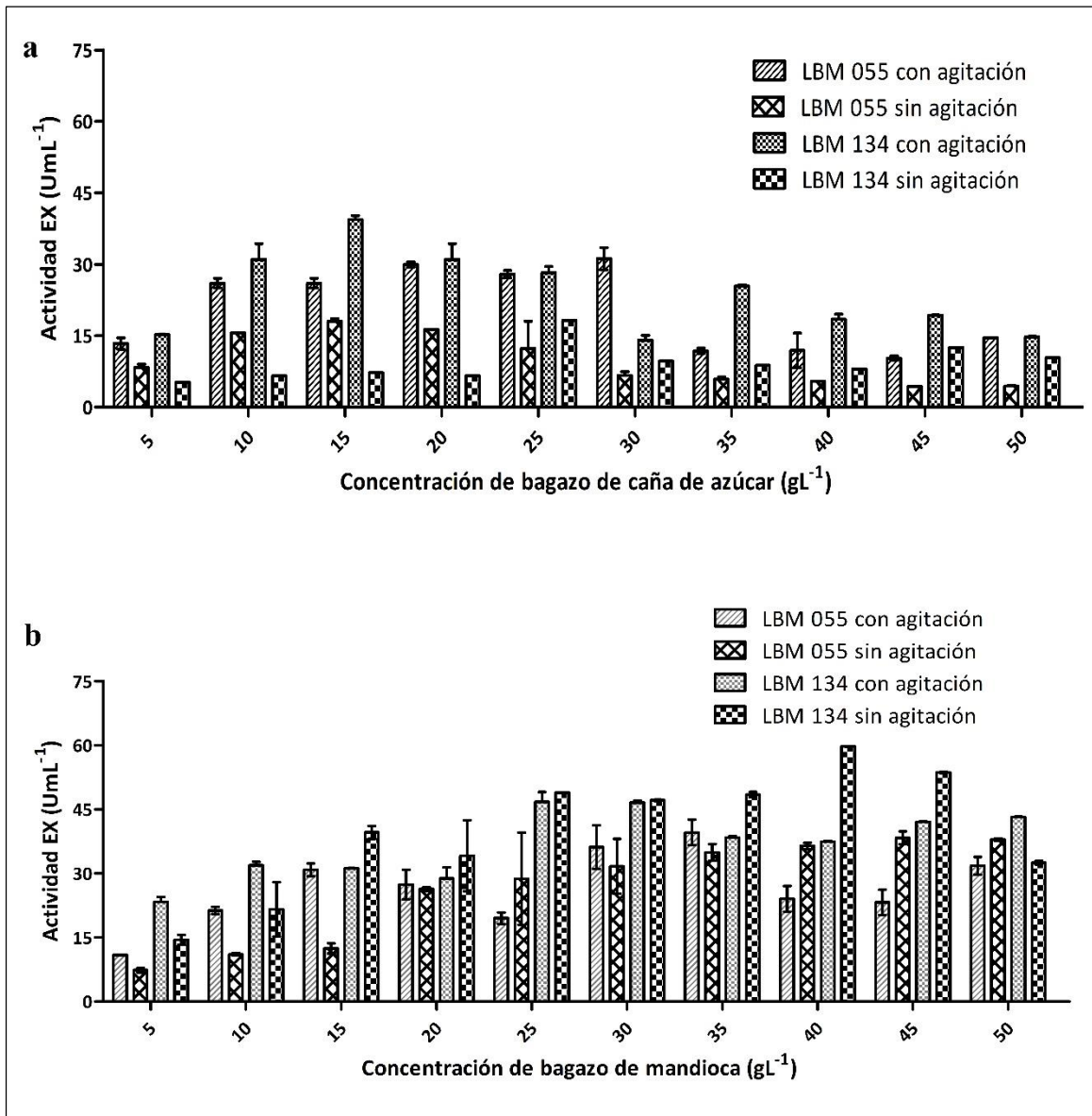


Figura 16. Efecto de bagazos y agitación sobre la EX de los aislamientos LBM 055 y 134. Efecto de la agitación y de diferentes concentraciones de **a)** bagazo de caña de azúcar y **b)** de bagazo de mandioca sobre la actividad EX de los aislamientos.

El aislamiento LBM 055 alcanzó la máxima actividad EX, $38,32 \pm 1,51 \text{ UmL}^{-1}$, cuando creció con bagazo de mandioca 45 gL^{-1} sin agitación el día 12 de incubación ($p < 0,05$) y cuando creció con bagazo de caña de azúcar 30 gL^{-1} con agitación ($p < 0,05$), alcanzando $25,18 \pm 2,34 \text{ UmL}^{-1}$ de actividad EX. Con respecto al aislamiento LBM 134, su actividad EX máxima fue $59,67 \pm 0,08 \text{ UmL}^{-1}$ y se registró cuando creció con bagazo de mandioca 40 gL^{-1} sin agitación el día 12 de incubación ($p < 0,05$) y $48,37 \pm 1,17 \text{ UmL}^{-1}$ cuando creció con bagazo de caña de azúcar 15 gL^{-1} el día 8 ($p < 0,05$).

El aislamiento LBM 134 presentó mayor nivel de actividad EX que LBM 055 ($p < 0,05$) en todas las condiciones que se estudió. Por esta razón, el trabajo se continuó con el aislamiento LBM 134. Los experimentos llevados a cabo de ahora en adelante con bagazo de caña de azúcar se realizaron a 15 gL^{-1} con agitación durante 8 días de incubación. En el caso de los experimentos realizados con bagazo de mandioca, se evaluó mediante un estudio costo/beneficio el costo de producir las enzimas en dos condiciones: 40 gL^{-1} con agitación el día 12 de incubación y 25 sin agitación el día 8 de incubación (**Tabla 9**) ya que, en estas condiciones se alcanzaron las máximas actividades EX para el aislamiento LBM 134.

Tabla 9. Estudio costo/beneficio de los medios de bagazo de mandioca con y sin agitación.

	Medio con bagazo de mandioca y agitación		Medio con bagazo de mandioca sin agitación		
	Costo unitario (USDKg ⁻¹)	(g ^L ⁻¹)	Costo total (USD Kg ⁻¹)	(g ^L ⁻¹)	Costo total (USD Kg ⁻¹)
NaNO ₃	115,350	2	0,23	2	0,23
KH ₂ PO ₄	362,655	1	0,36	1	0,36
KCl	171,715	0,5	0,09	0,5	0,09
MgSO ₄ .7H ₂ O	336,490	0,5	0,17	0,5	0,17
FeSO ₄ .7H ₂ O	218,845	0,01	0,00	0,01	0,00
Peptona	185,130	2,5	0,46	2,5	0,46
Bagazo de mandioca	0,01	25	0,00	40	0,00
Agua	0,07	968,490	0,07	953,490	0,06
Total		1.000	1,38	1.000	1,38
Actividad EX	UL⁻¹	48908		59675	
Días de producción	Days	8		12	
Producción anual	UL ⁻¹	2.231.431		1.815.112	
Costo anual	USD	62,86 U\$D		41,88 U\$D	
Costo de 1000000 U	(USD UL ⁻¹) *1.000.000	2,82 USD		2,31 USD	

USD, del inglés *United States Dollar*.

En este análisis se observó que la producción anual de proteínas con actividad EX utilizando bagazo de mandioca 40 gL^{-1} en condiciones estáticas es más económica, 2,31

USD, que producirlas bajo la otra condición, 2,82 USD. Por tanto, los experimentos de bagazo de mandioca se continuaron 40 gL⁻¹ sin agitación durante 12 días de incubación.

5.3 Identificación polifásica del aislamiento LBM 134

5.3.1 Árboles de secuencias concatenadas

Se obtuvo material genético de calidad comprobado por la observación de bandas nítidas en el gel de agarosa al 1 % (datos no mostrados). La concentración del ADN extraído fue $1269 \pm 0,02$ µg/ml y la relación $Abs_{260}/Abs_{280}=1,76$ de la muestra de ADN denotando la pureza del mismo. Mediante PCR y utilizando los cebadores universales descritos en la Tabla 2 se obtuvieron los amplicones para ITS, D1/D2, Bt, CAM y Tef respectivamente cuyas secuencias consenso se depositaron en el NCBI (**Tabla 10**).

Tabla 10. Marcadores moleculares utilizados para la identificación del aislamiento LBM 134 y números de acceso del NCBI correspondientes.

Marcador molecular	Amplicones (pb)	Número de acceso (NCBI)
ITS	630	MK457457
D1/D2	650	MK463630
Bt	500	MK465342
CAM	550	MK465341
Tef	470	MK465340

pb: pares de bases

En primera instancia, los árboles construidos con las secuencias correspondientes al marcador molecular ITS, no lograron distinguir a *Aspergillus* sp. LBM 134 de *A. lacticoffeatus*, *A. awamori*, *A. foetidus* y *A. niger* (subclado *A. niger*) (datos no mostrados). Sin embargo, al utilizar secuencias concatenadas con dos marcadores adicionales, CAM y Bt, se logró separar a *A. awamori* de este conjunto.

El árbol construido mediante el método de NJ posicionó a *Aspergillus* sp. LBM 134 dentro del clado *A. niger* de la sección *Nigri* junto a *A. niger* CBS 554.65 (AJ223852; AY585536; AJ964872), *A. lacticoffeatus* CBS 101883 (DQ900604; AY819998; EU163270),

A. foetidus CBS 114.49 (EF661187; EF661090; EF661155) y *A. foetidus* CBS 121.28 (FJ491683; FJ491690; FJ491694), con un valor 96 de *Bootstrap* (Figura 17).

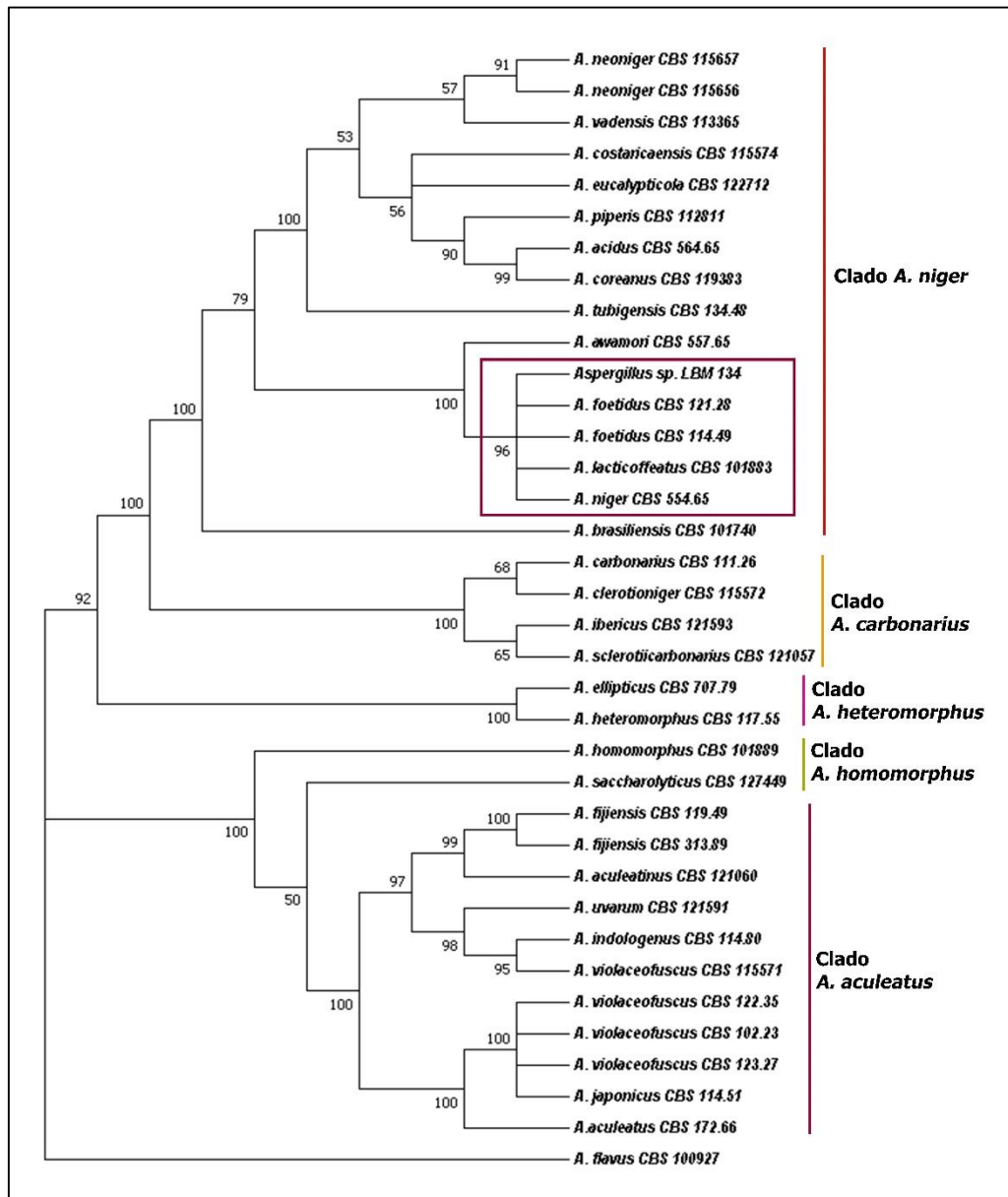


Figura 17. Árbol de las secuencias concatenadas de ITS, Bt y CMD obtenido por el método NJ. El alineamiento múltiple se realizó entre las secuencias de *Aspergillus* sp. LBM 134 (señalado con la flecha roja) y secuencias obtenidas de *GenBank* (NCBI) reportadas por Varga *et al.* (2011). El recuadro rojo muestra el *cluster* donde se ubica el aislamiento junto con el valor de *Bootstrap* correspondiente.

Del mismo modo, el árbol obtenido por el modelo ML agrupó robustamente al aislamiento con *A. niger* CBS 554.65 (AJ223852; AY585536; AJ964872), *A. lacticoffeatus* CBS 101883 (DQ900604; AY819998; EU163270), *A. foetidus* CBS 114.49 (EF661187;

EF661090; EF661155) y *A. foetidus* CBS 121.28 (FJ491683; FJ491690; FJ491694), con un valor 93 de *Bootstrap* (Figura 18).

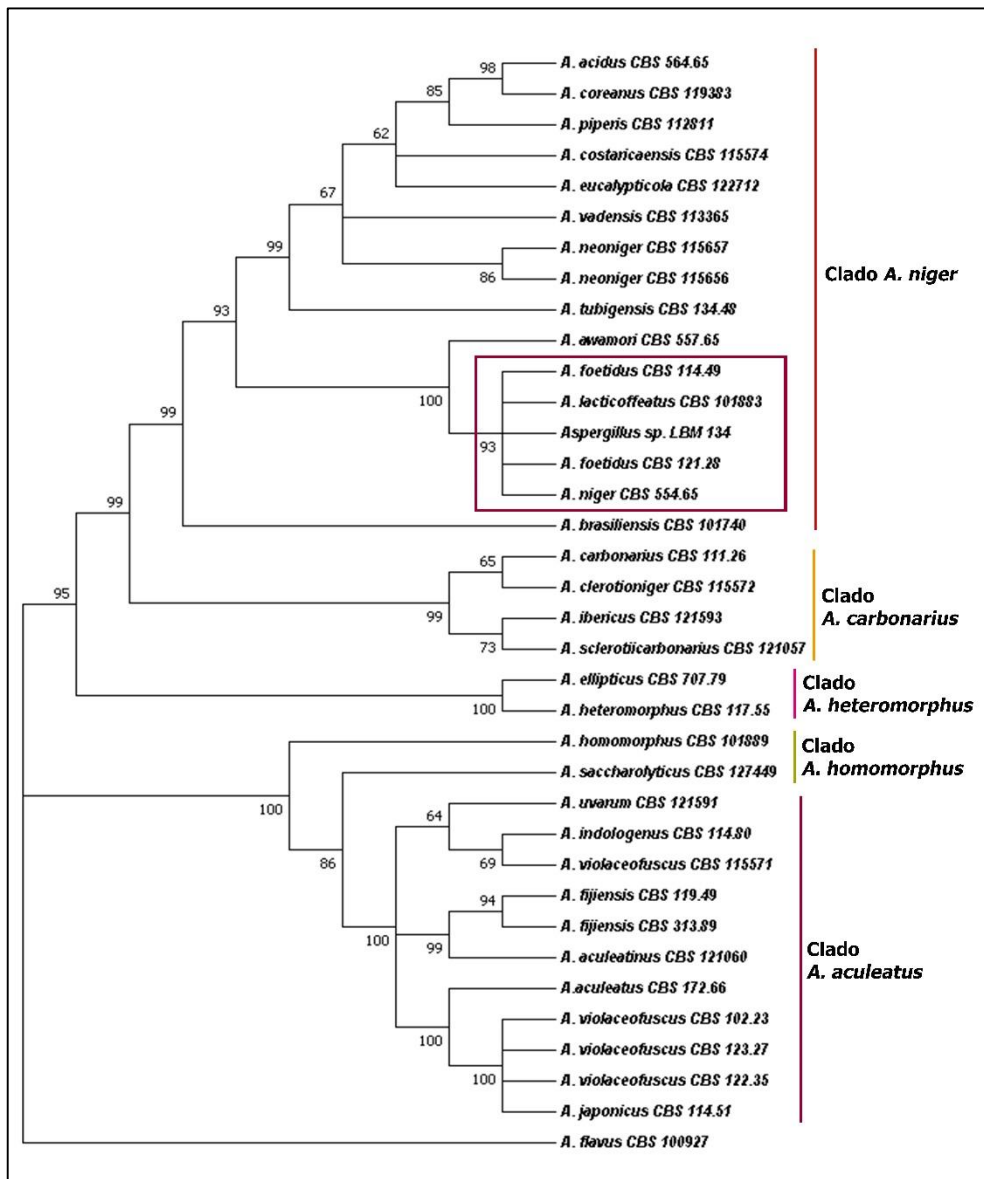


Figura 18. Árbol de las secuencias concatenadas de ITS, Bt y CMD obtenido por el método ML. El alineamiento múltiple se realizó entre las secuencias de *Aspergillus* sp. LBM 134 (señalado con la flecha roja) y secuencias obtenidas de *GenBank* (NCBI) reportadas por Varga *et al.* (2011). El recuadro rojo muestra el *cluster* donde se ubica el aislamiento junto con el valor de *Bootstrap* correspondiente.

5.3.2 Identificación polifásica

El aislamiento LBM 134 se desarrolló en las condiciones que se establecen en la Tabla 2 con el objetivo de registrar las mediciones de crecimiento y las características macro

y microscópicas del aislamiento fúngico en los diferentes medios a distintas temperaturas. También se registró la producción de ácido-base en medio CREA y la producción de ácido ciclopiazónico.

Se pueden apreciar las diferencias macro morfológicas de *Aspergillus* sp. LBM 134 desarrollado en los distintos medios de cultivo y a las distintas temperaturas en la **Figura 19**. La coloración negra, característica de los conidios de los aspergillus negros y el reverso crema se observó cuando el aislamiento LBM 134 creció en medio MEA (**Figura 19 a-b**). Cuando el aislamiento creció en medio CYA, los conidios fueron marrones claros/verdosos a marrones oscuros/negros y el reverso crema a marrón oscuro a medida que la temperatura de incubación aumentó de 25 a 37 °C (**Figura 19 c-h**). Los conidios de color más claro se produjeron en medio CYAS al igual que un anverso crema (**Figura 19 i-j**). El aislamiento no cubrió la placa entera cuando creció en los medios MEA y CYAS; en el medio CYA a las tres temperaturas incubadas, el aislamiento creció cubriendo toda la placa. En la prueba ácido-base analizada mediante el medio CREA, se registró una moderada producción de sustancias ácidas visualizada por el viraje de violeta a amarillo del medio de cultivo (**Figura 19 k-l**).

El reactivo de Ehrlich no reaccionó con el micelio del hongo (**Figura 20**), indicando que el aislamiento LBM 134 no produce ácido ciclopiazónico ni alcaloides relacionados.

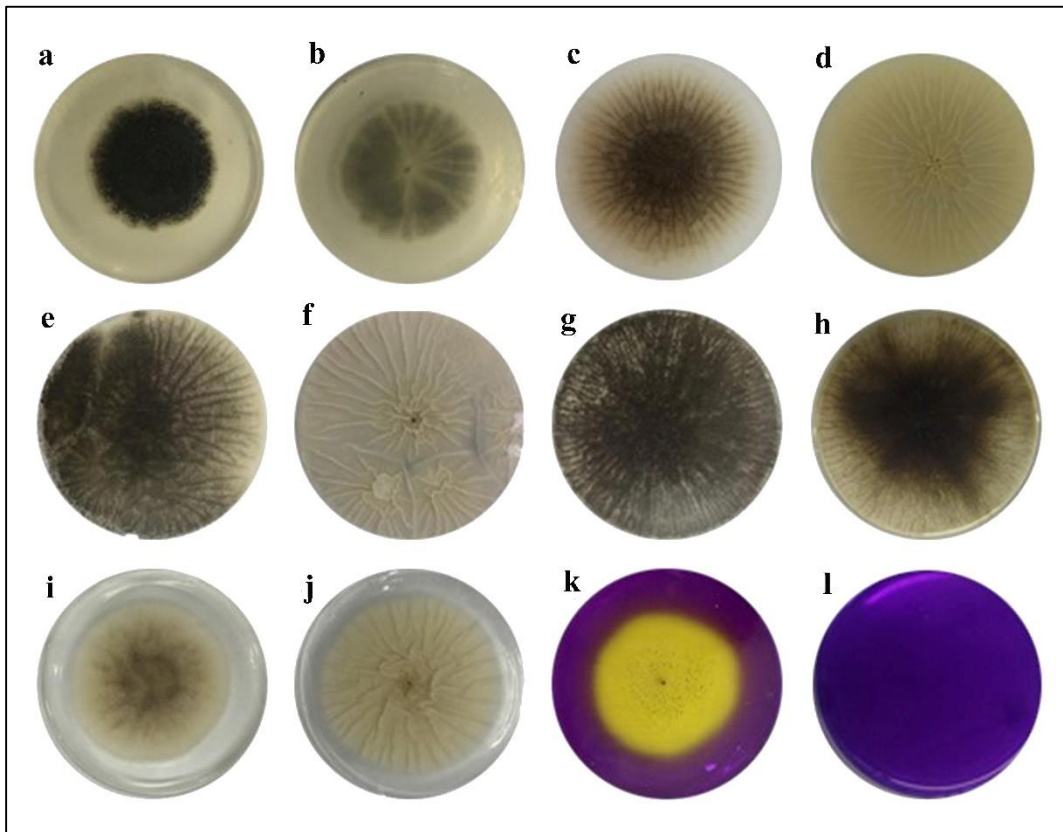


Figura 19. Macro-morfología y producción de ácido en medio CREA de *Aspergillus* sp. LBM 134. El hongo se desarrolló durante 7 días en medio MEA a 25 °C **a)** anverso y **b)** reverso; CYA a 25 °C **c)** anverso y **d)** reverso; CYA a 30 °C **e)** anverso y **f)** reverso; CYA a 37 °C **g)** anverso y **h)** reverso; CYAS 25 °C **i)** anverso y **j)** reverso. Producción de ácido en medio CREA, **k)** placa con inóculo y **l)** placa sin inóculo.

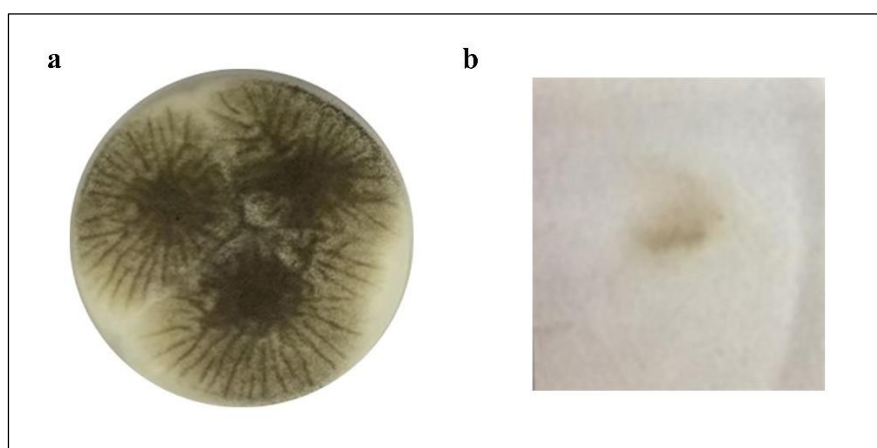


Figura 20. Prueba de Ehrlich para la producción de ácido ciclopiazónico de *Aspergillus* sp. LBM 134. Se utilizó el método del papel de filtro Whatman número 1. **a)** Micelio desarrollado en medio CYA de donde se extrajeron los tacos. **b)** El papel de filtro no exhibió anillos de color lo que evidenció la ausencia de reacción del aislamiento con el reactivo.

Los datos registrados de las dimensiones y características macro-morfológicas que requería la plataforma *online Polyphasic Identification* se presentan de forma resumida en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Características macro morfológicas registradas de *Aspergillus* sp. LBM 134 incubado en diferentes medios de cultivo a los 7 días de incubación.

Medio de cultivo	Temperatura de incubación (°C)	Diámetro de la colonia (mm)	Color de los conidios*	Color del reverso*
MEA	25	Mín: 51 Máx: 53	Negro	Blanco a crema
CYA	25	Mín: 90 Máx: 90	Aceituna	Blanco a crema
	30	Mín: 90 Máx: 90	Gris y beige negro	pardo claro
	37	Mín: 90 Máx: 90	Marrón negro	Marrón negro
CYAS	25	Mín: 60 Máx: 61	Aceituna pardo claro a marrón pálido	Blanco a crema amarillo

*Los colores descritos corresponden a las opciones de la herramienta *online Polyphasic Identification*.

Se midieron y fotografiaron las distintas estructuras micro morfológicas del aislamiento LBM 134 como se muestra en la **Tabla 12** y **Figura 21**, respectivamente. Los estípites se mostraron hialinos, gruesos y largos sin ornamentación (**Figura 21 a-b**), las vesículas tenían una forma casi esférica y contaban con métulas (**Figura 21 c**) y los conidios presentaron ornamentación (**Figura 21 d-e**). También se observó la formación de esclerocios en medio CYA a los 14 días de cultivo (**Figura 21 f-g**).

Tabla 12. Características micro morfológicas registradas de *Aspergillus* sp. LBM 134 incubado en medio CYA a 25 °C a los 7 días de incubación.

Estructura	Largo (µm)	Ancho (µm)	Forma/ornamentación*
Estípite	1000,0 ± 300,0	15,0 ± 5,0	sin ornamentación
Vesícula	39,0 ± 1,0	40,0 ± 1,0	Biseriada. Globosa a subglobosa
Fiálides	-	-	Cilíndricas
Conidios	3,0 ± 5,0	2,6 ± 0,5	Globosos/subglobosos a elipsoidales. Paredes gruesas finamente equinuladas
Esclerocios	-	-	Color blanco a cremoso

*Las opciones de forma/ornamentación corresponden a las opciones de la herramienta *Polyphasic identification*.

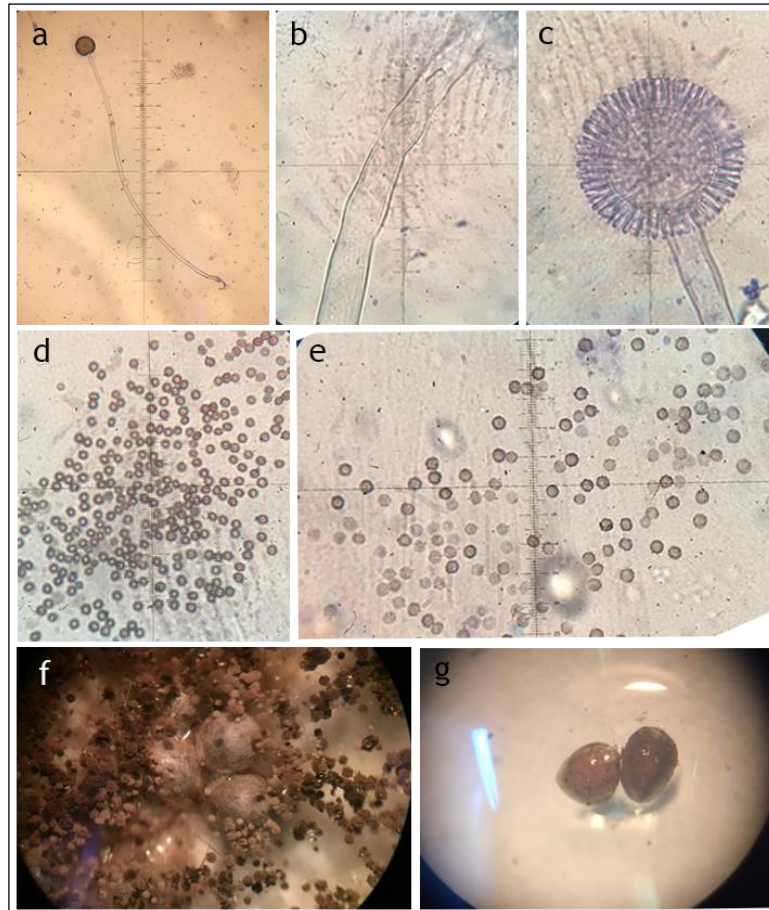


Figura 21. Micro-morfología de *Aspergillus* sp. LBM 134. a) Conidióforo a 10X, b) estípite y c) vesícula a 40X, d-e) conidios a 1000X, f-g) esclerocios vistos con lupa.

Mediante el análisis de la macro y micro morfología y de la producción de ácidos de *Aspergillus* sp. LBM 134 y sumado a la información de las secuencias de marcadores moleculares, se logró la identificación polifásica del aislamiento LBM 134 como *A. phoenicis*. La denominación *A. phoenicis* es antigua y corresponde a *A. niger* (como se lo llamará de ahora en adelante) (Abarca, 2004; Houckejr *et al.*, 2014).

5.4 Efecto de las fuentes de nitrógeno y físicas sobre la actividad EX de *A. niger* LBM 134

5.4.1 Evaluación de las fuentes de nitrógeno para la actividad EX de *A. niger* LBM 134

Se estudió el efecto de siete fuentes de nitrógeno sobre la actividad EX de *A. niger* LBM 134 mediante diseños factoriales fraccionados en ambos medios optimizados con bagazo de caña de azúcar y de mandioca. Se registraron los niveles máximos de actividad EX los días 8 y 10 de incubación con bagazo de caña de azúcar y de mandioca,

respectivamente. Asimismo, se observó una amplia variación en los niveles de actividad EX en las 19 corridas experimentales de ambos diseños factoriales, desde 23,19 a 50,53 U_{mL}⁻¹ en el caso del bagazo de caña de azúcar y desde 5 a 75 U_{mL}⁻¹ en el caso de bagazo de mandioca (**Tabla 13**). Esta variación refleja la importancia de evaluar el efecto de factores nutricionales durante el desarrollo fúngico que conlleva a consecuencias sobre los niveles de actividad enzimática.

Tabla 13. Matriz experimental de los diseños factoriales fraccionados para siete fuentes de nitrógeno con los valores codificados y (valores experimentales) para los medios con bagazo de caña de azúcar y de mandioca y actividad EX (U_{mL}⁻¹) de *A. niger* LBM 134.

Exp	P	EL	T	SA	NS	U	M	Actividad EX (U _{mL} ⁻¹)	
								Caña	Mandioca
1	-1(1)	-1 (1)	-1 (0,5)	-1 (1)	-1 (1)	-1(1)	-1 (1)	45,40 ± 2,62	13,06 ± 1,10
2	1 (5)	-1 (1)	-1 (0,5)	-1 (1)	1 (10)	-1 (1)	1 (5)	45,21 ± 0,88	18,00 ± 1,38
3	-1 (1)	1 (10)	-1 (0,5)	-1 (1)	1 (10)	1 (5)	-1 (1)	50,53 ± 1,81	40,46 ± 1,11
4	1 (5)	1 (10)	-1 (0,5)	-1 (1)	-1 (1)	1 (5)	1 (5)	29,46 ± 2,69	11,33 ± 2,25
5	-1 (1)	-1 (1)	1 (1,5)	-1 (1)	1 (10)	1 (5)	1 (5)	29,19 ± 0,30	25,40 ± 0,08
6	1 (5)	-1 (1)	1 (1,5)	-1 (1)	-1 (1)	1 (5)	-1 (1)	25,37 ± 4,60	64,41 ± 6,83
7	-1 (1)	1 (10)	1 (1,5)	-1 (1)	-1 (1)	-1 (1)	1 (5)	25,09 ± 0,11	55,52 ± 7,40
8	1 (5)	1 (10)	1 (1,5)	-1 (1)	1 (10)	-1 (1)	-1 (1)	23,18 ± 5,44	46,14 ± 1,62
9	-1 (1)	-1 (1)	-1 (0,5)	1 (5)	-1 (1)	1 (5)	1 (5)	33,01 ± 1,23	4,91 ± 1,49
10	1 (5)	-1 (1)	-1 (0,5)	1 (5)	1 (10)	1 (5)	-1 (1)	33,10 ± 3,08	74,78 ± 1,70
11	-1 (1)	1 (10)	-1 (0,5)	1 (5)	1 (10)	-1 (1)	1 (5)	35,74 ± 1,20	71,57 ± 1,88
12	1 (5)	1 (10)	-1 (0,5)	1 (5)	-1 (1)	-1 (1)	-1 (1)	31,38 ± 5,47	66,39 ± 1,17
13	-1 (1)	-1 (1)	1 (1,5)	1 (5)	1 (10)	-1 (1)	-1 (1)	30,28 ± 2,36	70,58 ± 3,33
14	1 (5)	-1 (1)	1 (1,5)	1 (5)	-1 (1)	-1 (1)	1 (5)	23,36 ± 3,86	36,76 ± 4,92
15	-1 (1)	1 (10)	1 (1,5)	1 (5)	-1 (1)	1 (5)	-1 (1)	28,10 ± 3,44	50,09 ± 0,68
16	1 (5)	1 (10)	1 (1,5)	1 (5)	-1 (10)	1 (5)	1 (5)	22,36 ± 2,14	38,00 ± 3,12
17	0 (3)	0 (5,5)	0 (1)	0 (3)	0 (5,5)	0 (3)	0 (3)	29,19 ± 1,34	50,83 ± 2,37
18	0 (3)	0 (5,5)	0 (1)	0 (3)	0 (5,5)	0 (3)	0 (3)	29,17 ± 1,20	60,71 ± 0,80
19	0 (3)	0 (5,5)	0 (1)	0 (3)	0 (5,5)	0 (3)	0 (3)	30,28 ± 1,43	54,29 ± 5,28

P, peptona; EL, extracto de levadura; T, tripteína; SA, sulfato de amonio; NS, nitrato de sodio; U, urea; M, mandioca.

El análisis de múltiple regresión de ambos modelos arrojó valores R^2 muy buenos de 0,97 y 0,95 para el caso de bagazo de caña de azúcar y de bagazo de mandioca, respectivamente. Además, el valor P de la prueba de la falta de ajuste (LOF del inglés, *lack of fit*) en el ANOVA fue mayor a 0,05 para ambos modelos indicando la que los modelos fueron adecuados para los datos observados con un nivel de confianza del 95 %. El análisis de la varianza para ambos modelos se detalla en las **Tabla 14** y **15**.

Tabla 14. Análisis de la varianza para la actividad EX de *A. niger* LBM 134 de los diseños factoriales fraccionadas del bagazo de caña de azúcar.

Fuente	SC	GL	CM	Valor F	Valor P
Tripteína	131,79	1	131,79	8,61	0,0149
Extracto de levadura	562,876	1	562,876	36,79	0,0001
Peptona	90,7256	1	90,7256	5,93	0,0351
-Falta de ajuste	189,467	5	37,8934	2,48	0,1042
Error puro	152,981	10	15,2981		
Total (corr.)	1127,84	18			

SC, suma de cuadrados; GL, grados de libertad; CM, cuadrado medio. Valores p menores a 0,05 (con un nivel de confianza mayor a 95 %) indican que los términos del modelo son estadísticamente significativos.

Tabla 15. Análisis de la varianza para la actividad EX de *A. niger* LBM 134 de los diseños factoriales fraccionadas del bagazo de mandioca.

Fuente	SC	GL	CM	Valor F	Valor P
Peptona	9,99155E8	1	9,99155E8	3,10	0,1000
Urea	2,02603E9	1	2,02603E9	6,29	0,0251
Falta de ajuste	7,22989E8	2	3,61495E8	1,12	0,3530
Error puro	4,5079E9	14	3,21993E8		
Total (corr.)	8,25608E9	18			

SC, suma de cuadrados; GL, grados de libertad; CM, cuadrado medio. Valores p menores a 0,05 (con un nivel de confianza mayor a 95 %) indican que los términos del modelo son estadísticamente significativos.

Las fuentes de nitrógeno que fueron significativas sobre la actividad EX de *A. niger* LBM 134 en ambos medios de cultivo se muestran en los gráficos de Pareto (**Figura 22**). En el caso del bagazo de caña de azúcar, las fuentes de nitrógeno tripteína, extracto de levadura y peptona tuvieron efectos significativos ($p \leq 0.05$) sobre la actividad EX, todas

en su nivel inferior (-1); estos fueron 0,5, 1 y 1, respectivamente (**Figura 22 a**). Por otra parte, la peptona y urea fueron las variables que presentaron efectos significativos sobre la actividad EX ($p \leq 0.05$) ambas en sus niveles superiores (+1) en el caso del medio optimizado con bagazo de mandioca (**Figura 22 b**).

Excluyendo las variables no significativas, la ecuación del modelo para la actividad EX (y) en el medio con bagazo de caña de azúcar es la siguiente:

$$y = 3797,06 - 530,812 * \text{tripteína} - 824,381 * \text{extracto de levadura} - 469,368 * \text{peptona} \tag{6}$$

La ecuación del modelo para la actividad EX (y) en el medio con bagazo de mandioca, excluyendo las variables no significativas, es la siguiente:

$$y = 47502,1 + 7902,35 * \text{peptona} + 11252,9 * \text{urea} \tag{7}$$

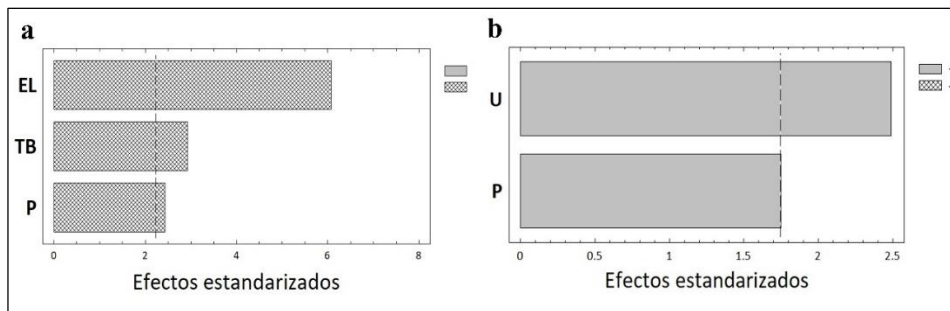


Figura 22. Gráficos de Pareto para la actividad EX de *A. niger* LBM 134. El largo de las barras es proporcional al efecto estandarizado de la fuente de nitrógeno sobre la actividad EX de *A. niger* LBM 134. Estas fueron las variables estadísticamente significativas a un nivel de confianza del 95 %. EL, extracto de levadura; TB, tripteína bacteriológica; P, peptona; U, urea.

5.4.2 Optimización de las fuentes de nitrógeno para la actividad EX de *A. niger* LBM 134

Los valores de la actividad EX de las corridas experimentales de la matriz experimental para el DCC del medio con bagazo de caña de azúcar mostraron gran variación (**Tabla 16**). Las expresiones cuadráticas para todas las fuentes de nitrógeno

fueron estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$) respecto a la actividad EX indicando que las concentraciones óptimas de estas fueron cercanas a los puntos centrales evaluados (Tabla 17).

El valor R^2 del modelo fue 0,91 para el diseño del bagazo de caña de azúcar, lo que significa que el 91 % de la variabilidad de la actividad EX puede explicarse por el modelo. A partir de los gráficos 3D de superficie de respuesta se observó que la actividad EX aumentó cuando la concentración de extracto de levadura fue máxima y las de tripteína y peptona fueron cercanas a sus respectivos puntos centrales (Figura 23).

Tabla 16. Matriz experimental del DCC para el medio con bagazo de caña de azúcar y las actividades EX de *A. niger* LBM 134 para cada corrida experimental.

Experimento	Extracto de levadura	Tripteína bacteriológica	Peptona	Actividad EX (U/mL ⁻¹)
1	-1	-1	-1	17,46 ± 1,06
2	1	-1	-1	42,52 ± 1,09
3	-1	1	-1	46,99 ± 0,18
4	1	1	-1	43,46 ± 5,49
5	-1	-1	1	42,99 ± 5,69
6	1	-1	1	0
7	-1	1	1	44,76 ± 0,89
8	1	1	1	0
9	-1,68	0	0	47,81 ± 1,30
10	1,68	0	0	0
11	0	-1,68	0	45 ± 3,55
12	0	1,68	0	35,93 ± 5,57
13	0	0	-1,68	0
14	0	0	1,68	0
15	0	0	0	52,99 ± 4,26
16	0	0	0	60,64 ± 0,91
17	0	0	0	60,64 ± 3,17
18	0	0	0	58,87 ± 2,12

Tabla 17. Análisis de la varianza para la actividad EX de *A. niger* LBM 134 en el DCC con bagazo de caña de azúcar.

Fuente	SC	GL	CM	Valor F	Valor p
Tripteína	131,79	1	131,79	8,61	0,0149
Extracto de levadura	562,876	1	562,876	36,79	0,0001
Peptona	90,7256	1	90,7256	5,93	0,0351
Falta de ajuste	189,467	5	37,8934	2,48	0,1042
Error puro	152,981	10	15,2981		
Total (corr.)	1127,84	18			

SC, suma de cuadrados; GL, grados de libertad; CM, cuadrado medio. Valores p menores a 0,05 (con un nivel de confianza mayor a 95 %) indican que los términos del modelo son estadísticamente significativos.

La ecuación del modelo ajustado para la actividad EX (y) en este medio sin tener en cuenta los factores no significativos fue la siguiente:

$$y = 57,91 - 9,22 * \text{extracto de levadura} - 10,48 * \text{extracto de levadura}^2 - 6,37 * \text{extracto de levadura} * \text{tripteína} - 11,08 * \text{extracto de levadura} * \text{peptona} - 4,62 * \text{tripteína}^2 - 6,17 * \text{tripteína} * \text{peptona} - 13,54 * \text{peptona}^2 \quad (8)$$

Las condiciones óptimas predichas por el modelo se decodificaron utilizando la ecuación (3). La actividad EX óptima predicha por el modelo fue 60,84 UmL⁻¹ y los valores decodificados de las concentraciones óptimas de las fuentes de nitrógeno fueron (gL⁻¹): extracto de levadura 2, tripteína 0,5 y peptona 2. En la **Tabla 18** se detallan los valores codificados y reales de las concentraciones óptimas, así como la actividad EX estimada y real de la validación del modelo.

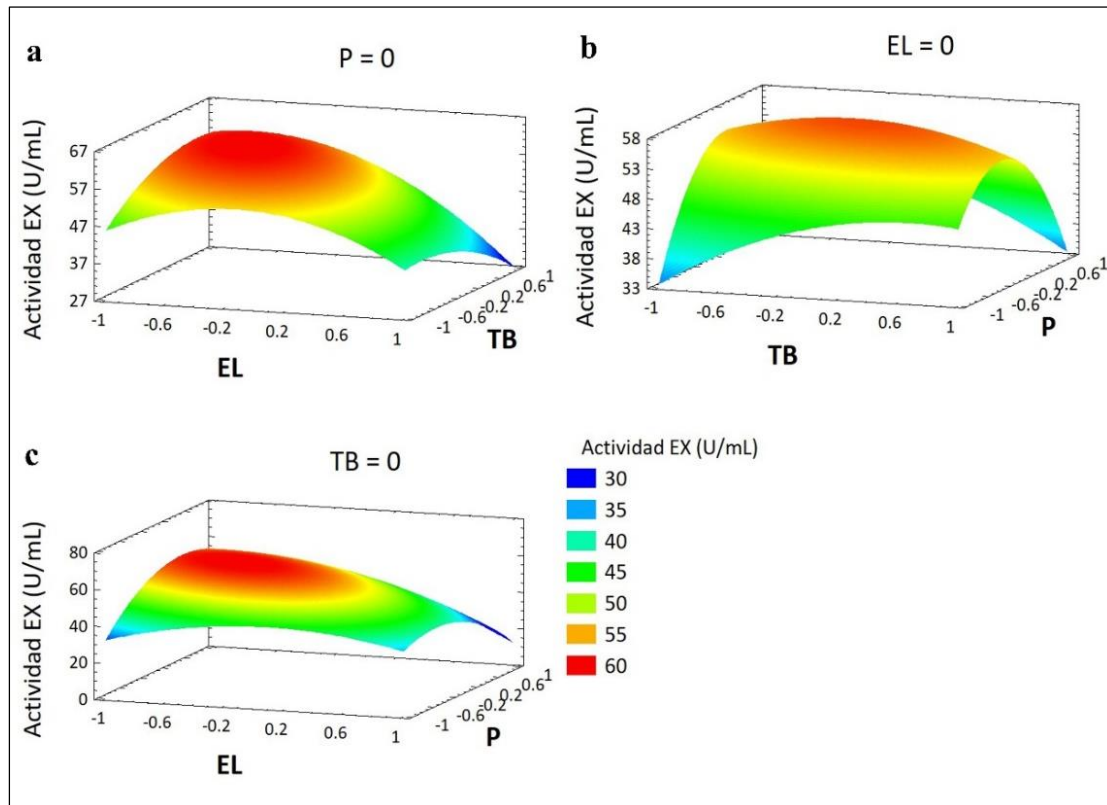


Figura 23. Gráficos de superficie de respuesta para la actividad EX de *A. niger* LBM 134 crecido en medio con bagazo de caña de azúcar. Los gráficos muestran los efectos interactivos de a) extracto de levadura (EL) y tripteína bacteriológica (TB) cuando la concentración de peptona (P) se mantuvo fija en su nivel medio; b) los efectos de TB y P cuando la concentración de EL se mantuvo fija en su nivel medio; c) los efectos de EL y P cuando la concentración de TB se mantuvo fija en su nivel medio.

Tabla 18. Validación del modelo para la actividad EX de *A. niger* LBM 134 crecido en medio de bagazo de caña de azúcar.

Fuentes de nitrógeno	Valores óptimos codificados	Valores óptimos reales (g ^L ⁻¹)	Actividad EX (UmL ⁻¹)	
			Valor predicho	Valor real
Peptona	0,19	2		
Extracto de levadura	- 0,63	2	60,84	63,91 ± 1,92
Tripteína bacteriológica	0,31	0,5		

^aCV_{Predicho vs Real} = 3,01 %

^aCV: coeficiente de variación

Para validar el modelo, se realizaron seis corridas experimentales bajo estas condiciones y se alcanzó una actividad enzimática de $63,91 \pm 1,92 \text{ U mL}^{-1}$, habiendo concordancia entre el valor predicho y el valor experimental de la actividad EX.

En la optimización del medio con bagazo de mandioca, los valores de la matriz experimental del DCC también mostraron valores muy amplios (**Tabla 19**) y las expresiones cuadráticas para ambas fuentes de nitrógeno evaluadas, urea y peptona, fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (**Tabla 20**) con un R^2 de 0,90. Los gráficos de superficie de respuesta mostraron que el nivel más alto de actividad EX se alcanzó con las concentraciones medias de ambas fuentes de nitrógeno (**Figura 24**).

Tabla 19. Matriz experimental del DCC para el medio con bagazo de mandioca y las actividades EX de *A. niger* LBM 134 para cada corrida experimental.

Experimento	Urea	Peptona	Actividad EX (U mL^{-1})
1	-1	-1	$56,04 \pm 1,10$
2	1	-1	0
3	-1	1	$63,08 \pm 0,86$
4	1	1	0
5	-1,41	0	$74,48 \pm 1,54$
6	1,41	0	0
7	0	-1,41	0
8	0	1,41	$124,78 \pm 4,95$
9	0	0	$157,98 \pm 1,64$
10	0	0	$142,22 \pm 0,48$
11	0	0	$157,94 \pm 1,84$
12	0	0	$151,95 \pm 2,64$

Tabla 20. Análisis de la varianza para la actividad EX de *A. niger* LBM 134 en el DCC con mandioca.

Fuente	SC	GL	CM	Valor F	Valor p
Peptona	9,99155E8	1	9,99155E8	3,10	0,1000
Urea	2,02603E9	1	2,02603E9	6,29	0,0251
Falta de ajuste	7,22989E8	2	3,61495E8	1,12	0,3530
Error puro	4,5079E9	14	3,21993E8		
Total (corr.)	8,25608E9	18			

SC, suma de cuadrados; GL, grados de libertad; CM, cuadrado medio. Valores p menores a 0,05 (con un nivel de confianza mayor a 95 %) indican que los términos del modelo son estadísticamente significativos.

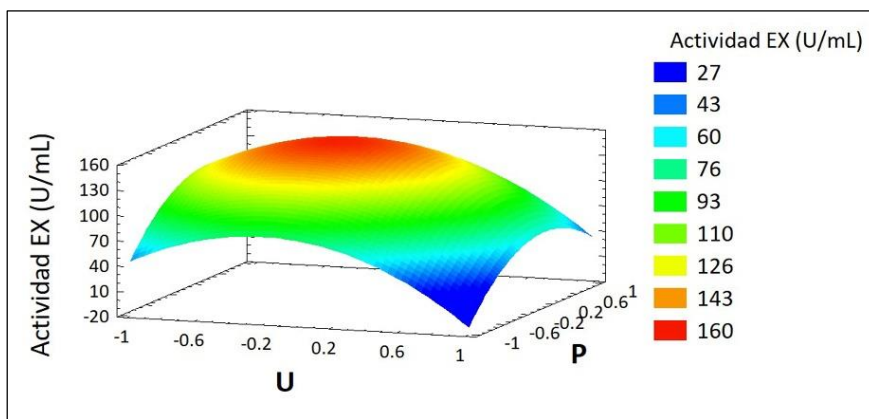


Figura 24. Gráfico de superficie de respuesta para la actividad EX de *A. niger* LBM 134 crecido en medio con bagazo de mandioca. El gráfico muestra los efectos interactivos entre las dos variables optimizadas, peptona (P) y urea (U).

La ecuación para el modelo ajustado para este medio sin tener en cuenta los factores no significativos fue la siguiente:

$$y = 152,78 - 28,06 * \text{urea} + 22,94 * \text{peptona} - 62,75 * \text{urea}^2 - 50,18 * \text{peptona}^2 \quad (9)$$

En este caso, la validación del modelo predijo un valor de actividad EX óptimo de 158,48 UmL⁻¹ si el hongo crecía bajo las siguientes concentraciones: 2,19 gL⁻¹ de urea y 2,84 gL⁻¹ de peptona (**Tabla 21**).

Tabla 21. Validación del modelo para la actividad EX de *A. niger* LBM 134 crecido en medio de bagazo de mandioca.

Fuentes de nitrógeno	Valores óptimos codificados	Valores óptimos reales (g ^L ⁻¹)	Actividad EX (UmL ⁻¹)	
			Valor predicho	Valor real
Peptona	- 0,22	2,84	158,48	160,58 ± 1,15
Urea	0,23	2,19		

^aCV Predicho vs Real = 1,15 %

^aCV: coeficiente de variación

El modelo se validó ensayando 6 experimentos bajo las condiciones predichas y el valor de actividad EX fue de 160,58 ± 1,15 UmL⁻¹, correspondiéndose con el valor predicho por el modelo.

5.4.3 Optimización de la concentración del inóculo y de las variables físicas para la actividad EX de *A. niger* LBM 134

La concentración del inóculo y las variables físicas evaluadas mostraron tener efectos significativos sobre la actividad EX ($p < 0,05$) de *A. niger* LBM 134 cuando creció en medio optimizado con bagazo de caña de azúcar (**Figura 25 a-d**). La máxima actividad EX fue de 110 UmL⁻¹ cuando se inoculó una suspensión de 10⁶ esporas mL⁻¹ del hongo y se inoculó a 25 °C, pH 4,5 con luz y agitación (100 rpm).

Por el contrario, cuando se evaluaron los efectos de la concentración de inóculo y de las variables físicas sobre la actividad EX del hongo crecido en bagazo de mandioca, se observó que las condiciones óptimas fueron aquellas con las que se venía trabajando ya que la actividad enzimática permaneció cercana a la obtenida en el DCC anterior. Estas condiciones fueron: suspensión de 10⁷ esporas mL⁻¹, a 28 °C, pH 5,5, ausencia de luz y de agitación (**Figura 25 e-h**).

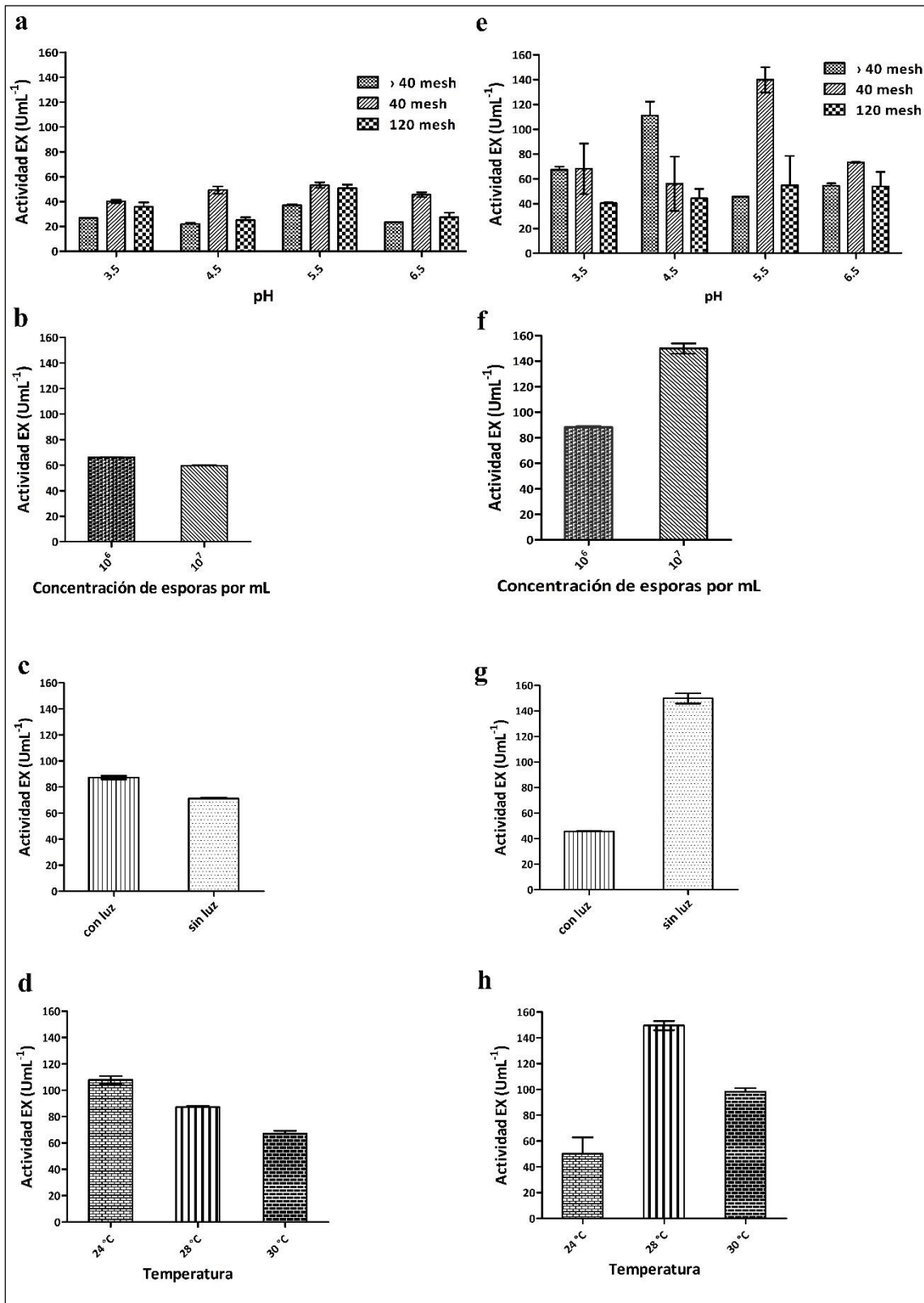


Figura 25. Optimización de la concentración de inóculo y de las variables físicas para la actividad EX de *A. niger* LBM 134 en medios con bagazos de caña de azúcar y de mandioca. Efecto del pH, tamaño de partícula del sustrato, concentración de esporas, luz y temperatura sobre el hongo creciendo en medio optimizado con a-d) bagazo de caña de azúcar y e-h) con bagazo de mandioca.

5.4.4 Estudio costo/beneficio: bagazos vs. xilano comercial

Se comparó los costos de producción de enzimas con actividad EX de *A. niger* LBM 134 crecido con los bagazos de caña de azúcar y de mandioca y con xilano comercial mediante un estudio costo/beneficio (Tabla 22).

Tabla 22. Bagazos vs. xilano comercial, estudio costo/beneficio.

Componentes del medio	Costo unidad (USDKg ⁻¹)	Medios optimizados				Medio con xilano comercial	
		Caña de azúcar		Mandioca		Costo total (gL ⁻¹)	Costo total (USDKg ⁻¹)
		Costo total (gL ⁻¹)	Costo total (USDKg ⁻¹)	Costo total (gL ⁻¹)	Costo total (USDKg ⁻¹)		
NaNO ₃	115,350	2	0,236	2	0,236	2	0,236
KH ₂ PO ₄	362,655	1	0,372	1	0,372	1	0,372
KCl	171,715	0,5	0,088	0,5	0,088	0,5	0,088
MgSO ₄ .7H ₂ O	336,490	0,5	0,172	0,5	0,172	0,5	0,172
FeSO ₄ .7H ₂ O	218,845	0,01	0,002	0,01	0,002	0,01	0,002
Peptona	185,130	2	0,474	2,19	0,426	2,5	0,472
Tripteína	2,500	0,5	0,001	-	-	-	-
Urea	420,930	-	-	2,84	1,257	-	-
Extracto de levadura	331,580	2	0,679	-	-	2	0,676
Bagazo de caña	0,010	15	0,000	-	-	-	-
Bagazo de mandioca	0,012	-	-	40	0,000	-	-
Xilano de beechwood	4,100	-	-	-	-	10	40,765
Agua	0,067	976,5	0,067	950,9	0,067	981,5	0,067
Total		1.000	2.093	1.000	2,645	1.000	42,845
Actividad EX	UL ⁻¹	110.000		160.580		106.700	
Producción	Días	8		12		12	
Producción anual	UL ⁻¹	5.018.750		4.884.308		3.245.458	
Costo anual	USD	95,49		80,44		1.303,19	
Costo de 1.000.000 U	(USD UL ⁻¹) *1.000.000	1,90 U\$D		1,65 U\$D		40,15 U\$D	

USD, del inglés *United States Dollar*.

Ambos medios optimizados con bagazos fueron más eficientes que aquel suplementado con el xilano comercial; además, los medios con bagazos fueron mucho más económicos y soportaron valores de actividad EX mayores que el del medio sintético. En el caso del medio con bagazo de caña de azúcar, la actividad EX máxima fue 110 U mL^{-1} ; en el caso del medio con bagazo de mandioca fue $160,58 \text{ U mL}^{-1}$, contra $106,70 \text{ U mL}^{-1}$, actividad EX máxima alcanzada con el medio sintético. Además, producir enzimas con actividad EX a partir de *A. niger* LBM 134 incubado con bagazos es 20 veces más económico que hacerlo crecer en medio con xilano comercial. Se calculó la producción anual de las enzimas con actividad EX en los tres medios evaluados con una producción de aproximadamente $5.000.000 \text{ UL}^{-1}$ en los medios de cultivo optimizados con bagazos mientras que, en el medio con xilano comercial la producción enzimática alcanzaría solamente a $3.200.000 \text{ UL}^{-1}$ con un costo 20 veces mayor que el de la producción con los bagazos.

5.5 Caracterización de las enzimas con actividad EX presentes en los sobrenadantes optimizados

La temperatura y el pH son dos factores principales que afectan la actividad enzimática y deben estudiarse para luego aplicar eficientemente las enzimas en cualquier proceso biotecnológico. Por tanto, se estudió el efecto de la temperatura y del pH sobre la actividad EX en los sobrenadantes optimizados de *A. niger* LBM 134 (sección 5.4.3) y sus efectos en el tiempo, termoestabilidad y pH estabilidad.

5.5.1 Temperatura óptima de la actividad EX de las proteínas en los sobrenadantes optimizados

La actividad EX máxima ($p < 0,05$) se registró al incubar ambos sobrenadantes, de bagazo de caña de azúcar y de mandioca, a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (**Figura 26**). La actividad EX máxima en el sobrenadante de bagazo de caña de azúcar alcanzó un valor promedio de $108 \pm 7,58 \text{ U mL}^{-1}$ mientras que, el valor promedio máximo de actividad EX en los sobrenadantes de bagazo de mandioca fue $176 \pm 1,79 \text{ U mL}^{-1}$.

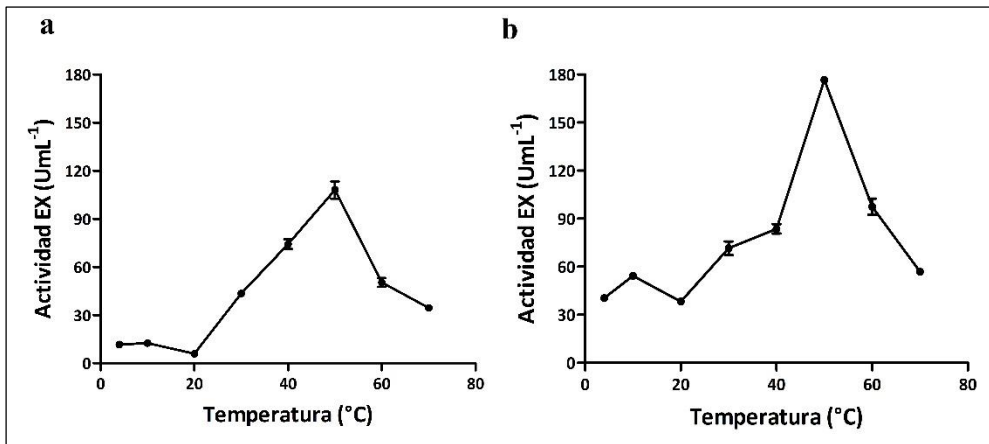


Figura 26. Temperatura óptima de la actividad EX de *A. niger* LBM 134, a) en sobrenadantes optimizado con bagazo de caña de azúcar y b) en sobrenadantes optimizado con bagazo de mandioca.

5.5.2 pH óptimo de la actividad EX de las proteínas en los sobrenadantes optimizados

La máxima actividad EX ($p < 0,05$) se encontró al incubar ambos sobrenadantes optimizados a pH 4,8 y 5; entre estos pH no hubo diferencia estadística (Figura 27). En el medio con bagazo de caña de azúcar, la actividad EX a pH 5 alcanzó un valor promedio de $119,5 \pm 5,79$ U/mL⁻¹. En el medio de cultivo con bagazo de mandioca, la actividad EX a pH 5 fue de $177,96 \pm 1,32$ U/mL⁻¹.

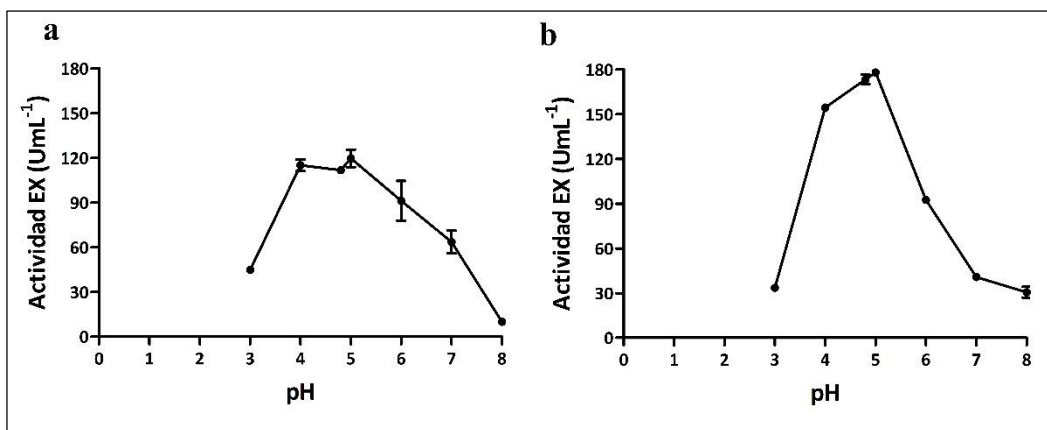


Figura 27. pH óptimo de la actividad EX de *A. niger* LBM 134, a) en sobrenadantes optimizado con bagazo de caña de azúcar y b) en sobrenadantes con bagazo de mandioca.

5.5.3 Termoestabilidad de la actividad EX de las proteínas en los sobrenadantes optimizados

La actividad residual se definió como el porcentaje de actividad EX medida luego de un período de tiempo con respecto a la actividad EX medida en el tiempo inicial (0). Esta medida en tiempo 0 se tomó como el 100 % de la actividad EX. En el caso del sobrenadante optimizado con bagazo de caña de azúcar, la actividad EX correspondiente al 100 % fue $110 \pm 4,43 \text{ U mL}^{-1}$ y en el caso del sobrenadante optimizado con bagazo de mandioca, el 100 % correspondió a $158 \pm 0,32 \text{ U mL}^{-1}$. El efecto de la temperatura sobre la actividad EX en el tiempo se evaluó incubando los sobrenadantes a 4, 30, 40 y 50 °C durante diferentes períodos hasta 96 h (**Figura 28**).

En las **Figuras 28 a y 28 b** se muestran las curvas de termoestabilidad de las enzimas con actividad EX en el sobrenadante de bagazo de caña de azúcar y de bagazo de mandioca, respectivamente. Se observó que a 4 y 30 °C la actividad EX se mantuvo arriba del 50 % durante todo el tiempo evaluado en ambos sobrenadantes. A 40 °C la actividad EX se mantuvo arriba del 50 % durante 12 h en el sobrenadante de bagazo de caña de azúcar y por 48 h en el sobrenadante de bagazo de mandioca. A 50 °C, la actividad EX decayó por debajo del 50 % antes de las 12 h en ambos sobrenadantes.

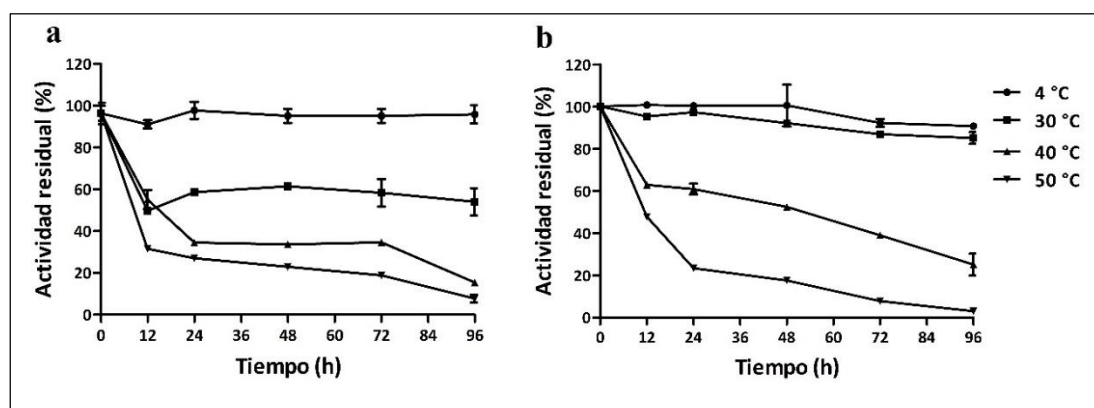


Figura 28. Termoestabilidad de la actividad EX de *A. niger* LBM 134. Estabilidad enzimática en el tiempo cuando se incubó a 4, 30, 40 y 50 °C los sobrenadantes optimizados de **a)** bagazo de caña de azúcar y **b)** bagazo de mandioca. El 100 % correspondió a 110 U mL^{-1} en el caso del bagazo de caña y 158 U mL^{-1} en el caso de del bagazo de mandioca.

5.5.4 pH estabilidad de la actividad EX de las proteínas en los sobrenadantes optimizados

De la misma manera que para la termoestabilidad, la actividad residual se definió como el porcentaje de actividad EX medida luego de un período de tiempo con respecto a la actividad EX medida en el tiempo inicial (0) correspondiendo al 100 % de la actividad EX. En el caso del sobrenadante optimizado con bagazo de caña de azúcar, el 100 % correspondió a $110 \pm 4,43 \text{ U mL}^{-1}$ y en el caso del sobrenadante optimizado con bagazo de mandioca, a $158 \pm 0,32 \text{ U mL}^{-1}$. El efecto del pH sobre la actividad EX en el tiempo se evaluó incubando los sobrenadantes a pH 5, 6 y 7 durante diferentes períodos hasta 96 h (Figura 29).

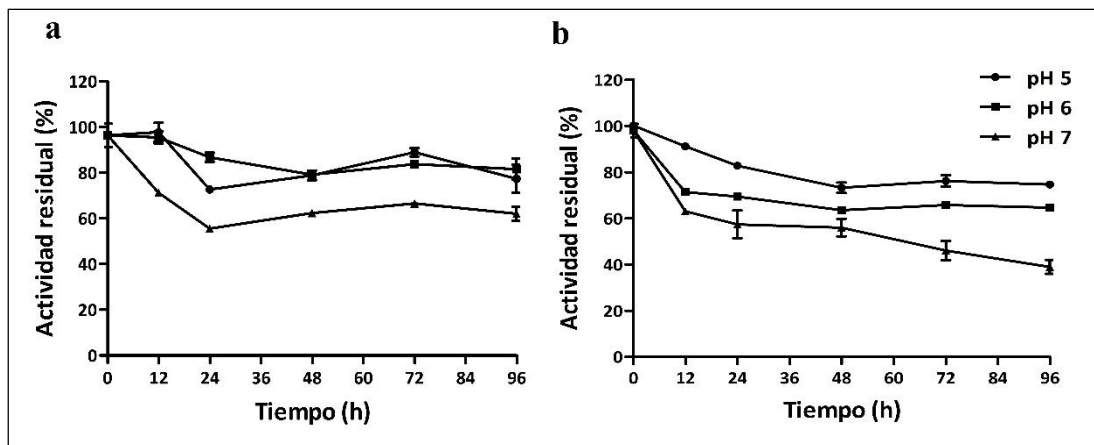


Figura 29. Estabilidad en pH de la actividad EX de *A. niger* LBM 134. Estabilidad enzimática en el tiempo cuando se incubó a pH 5, 6 y 7C los sobrenadantes optimizados de **a)** bagazo de caña de azúcar y **b)** bagazo de mandioca. El 100 % correspondió a 110 U mL^{-1} en el caso del bagazo de caña y 158 U mL^{-1} en el caso de del bagazo de mandioca.

En las Figuras 29 a y 29 b se muestran las curvas de estabilidad en el pH de las enzimas con actividad EX en el sobrenadante de bagazo de caña de azúcar y de bagazo de mandioca, respectivamente. Se observó que la actividad EX se mantuvo arriba del 50 % a todos los pH evaluados en todos los períodos en ambos sobrenadantes. La estabilidad en pH fue mayor a pH 5 manteniéndose la actividad EX por encima del 80 % luego de las 96 h en ambos sobrenadantes.

5.5.5 Proteínas con actividad EX de los sobrenadantes optimizados detectadas con ND-PAGE

Los perfiles isoenzimáticos de las enzimas con actividad EX en los sobrenadantes optimizados de *A. niger* LBM 134 y sus controles se evaluaron en geles no desnaturalizantes utilizando xilano de *beechwood* como sustrato (**Figura 30**). En los sobrenadantes del hongo crecido en medio con bagazo de caña de azúcar se detectaron tres isoenzimas (carriles 1, 2 y 3) mientras que, en los sobrenadantes del hongo crecido en sus medios controles no se observó isoenzima alguna (carriles 4 y 5). En los sobrenadantes del hongo crecido en bagazo de mandioca se detectaron isoenzimas con movilidad electroforética similar a las que se encontró en los sobrenadantes del hongo crecido en bagazo de caña de azúcar (carriles 8, 9 y 10). Además, se observó la presencia de otras isoenzimas con movilidad electroforética menor. Similarmente, en sus controles no se observaron isoenzimas con actividad EX (carriles 6 y 7).

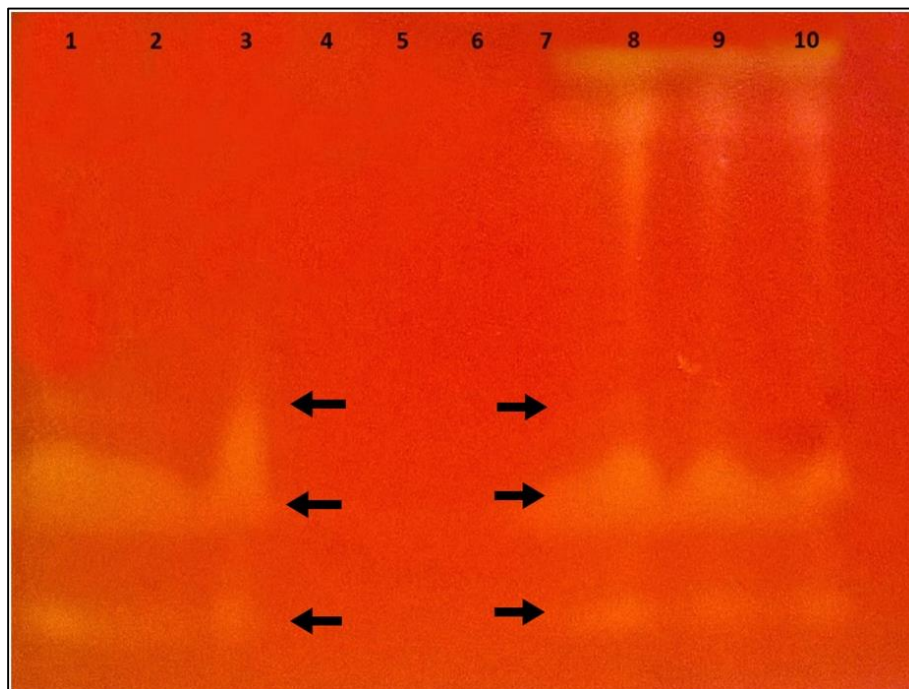


Figura 30. Detección de EXs de *A. niger* LBM 134 en sobrenadantes optimizados y sus controles. ND-PAGE en condiciones nativas utilizando tinción con Rojo Congo. Carril 1, carril 2 y carril 3, sobrenadantes provenientes del hongo crecido en medio optimizado con bagazo de caña de azúcar; carril 4 y carril 5, sobrenadantes provenientes del hongo crecido en medio control de la optimización con bagazo de caña de azúcar; carril 6 y carril 7, sobrenadantes del hongo crecido en medio control de la optimización con bagazo de mandioca; carril 8, carril 9 y carril 10, sobrenadante del hongo crecido en medio optimizado con bagazo de mandioca. Se sembraron 20 μ g de proteínas/pocillo para cada condición evaluada.

5.6 Caracterización de los sobrenadantes optimizados y sus controles

5.6.1 Proteínas totales de los sobrenadantes optimizados detectadas con SDS-PAGE y tinción con plata

El análisis del gel del total de proteínas secretadas por *A. niger* LBM 134 crecido en diferentes medios de cultivo (medios optimizados con bagazo de caña de azúcar y con bagazo de mandioca y en medios control de ambos medios optimizados) mostró un rango amplio de proteínas con diferentes masas moleculares (**Figura 31**). Se pudo visualizar diferencias en los niveles de proteínas, aparecieron en mayor cantidad en los sobrenadantes provenientes de los medios optimizados que en los sobrenadantes de los medios controles lo que también se evidenció con los datos proteómicos (sección 5.6.2). Algunas de las proteínas se correlacionaron con enzimas celulasas y hemicelulasas encontradas presentando masas moleculares entre un rango de 20 a 75 kDa. Además, se identificó otras proteínas de masas moleculares entre 100 y 150 kDa en sobrenadantes de medios optimizados.

El análisis del perfil electroforético de los sobrenadantes de *A. niger* LBM 134 crecido en los medios controles reveló la presencia de una proteína de aproximadamente 50 kDa en ambos sobrenadantes. Esto expone una secreción diferencial de proteínas respecto a la fuente de carbono utilizada en el medio de cultivo.

Con respecto a las enzimas xilanasas, en ambos sobrenadantes optimizados se pudieron observar dos bandas correspondiendo a proteínas de aproximadamente 20 y 25 kDa. En los análisis del secretoma de ambos sobrenadantes optimizados se encontraron dos xilanasas de estos pesos moleculares, una EX de 25 kDa y una BXL de 20 kDa.

En ambos sobrenadantes se observó una banda algo más pequeña que 37 kDa y en los análisis de ambos secretomas se encontró una EX de 35,5 kDa. En los sobrenadantes de mandioca también se observó una banda de aproximadamente 45 kDa correspondiendo a una enzima endo-1,3- β -glucosidasa de 46,3 kDa encontrada en el secretoma de este sobrenadante.

Se observaron dos bandas menores a 75 kDa en ambos sobrenadantes. Una glucoamilasa de 68,3 kDa se encontró en los secretomas de ambos sobrenadantes,

aunque en mayor cantidad en el sobrenadante de bagazo de mandioca, correspondiendo con una tinción más intensa en el gel de plata. En los sobrenadantes de bagazo de mandioca se observaron varias proteínas con pesos moleculares entre 100 y 150 kDa mientras que, en los sobrenadantes de bagazo de caña de azúcar se observaron menos bandas y menos intensas.

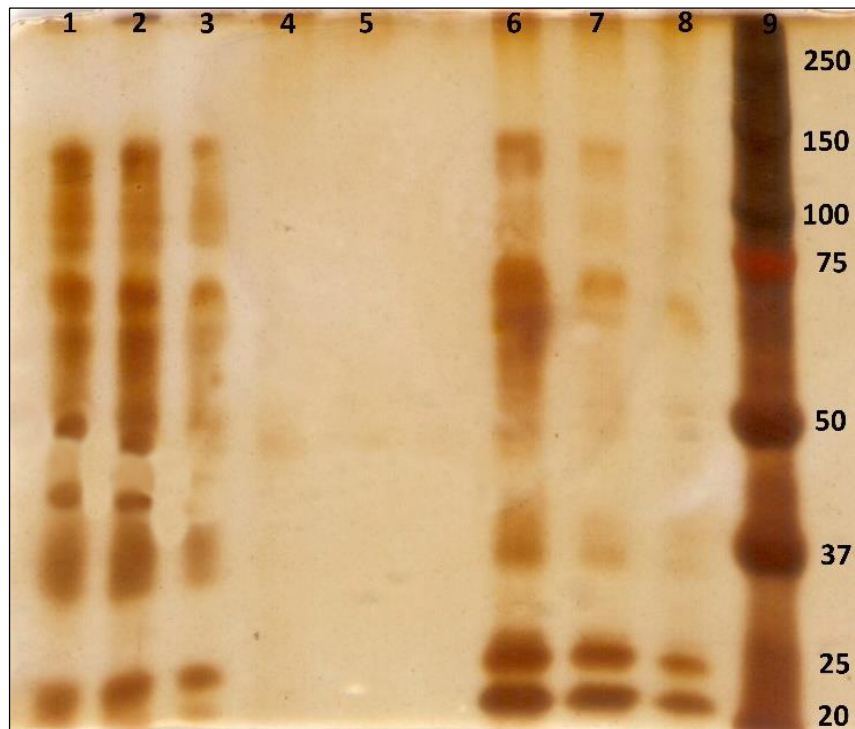


Figura 31. Detección de proteínas totales de *A. niger* LBM 134 en sobrenadantes optimizados y sus controles. SDS-PAGE utilizando tinción de nitrato de plata. Carril 1, carril 2 y carril 3, proteínas totales presentes en sobrenadantes del hongo crecido en medio optimizado con bagazo de mandioca por triplicado; carril 4, proteínas totales en el sobrenadante del hongo crecido en medio control de la optimización con bagazo de mandioca; carril 5, proteínas totales en el sobrenadante del hongo crecido en medio control de la optimización con bagazo de caña de azúcar; carril 6, carril 7 y carril 8, proteínas en sobrenadantes del hongo crecido en medio optimizado con bagazo de caña de azúcar. Se sembraron 20 μg de proteínas/pocillo de los sobrenadantes optimizados y 10 μg de proteínas/pocillo de los sobrenadantes controles. Carril 9, marcador de peso molecular en kDa (Kaleidoscope, BioRad).

5.6.2 Secreción de enzimas de *A. niger* LBM 134 crecido en bagazo de caña de azúcar y en bagazo de mandioca

Se analizó el secretoma de los sobrenadantes optimizados con bagazo de caña de azúcar y bagazo de mandioca y sus respectivos controles mediante espectrometría de

masas. Se identificaron 166 proteínas en total. El mayor número de proteínas diferentes (130) se identificó en el secretoma de *A. niger* LBM 134 crecido en el medio optimizado con bagazo de caña de azúcar, seguido por el secretoma del hongo crecido en el medio optimizado con bagazo de mandioca, un total de 113 proteínas diferentes. En los secretomas del hongo crecido en los medios controles, el número de proteínas identificadas fue menor, 41 proteínas en el sobrenadante control del bagazo de caña de azúcar y 6 proteínas en el sobrenadante control del bagazo de mandioca (**Tabla 23**). Se identificaron 3 proteínas intracelulares en cada secretoma del hongo crecido en los medios optimizados, las cuales no se tuvieron en cuenta para los próximos análisis.

Se identificaron 6 enzimas xilanasas, 2 EX, 3 BXL y una α -xilosidasa. Ambas EX se identificaron en los secretomas de *A. niger* LBM 134 crecido en los medios optimizados con los bagazos (de caña de azúcar y de mandioca). Con respecto a las BXL, 2 enzimas se identificaron en ambos secretomas del hongo crecido en los medios optimizados, la otra BXL se identificó además en el secretoma del hongo crecido en medio control de bagazo de caña de azúcar. La α -xilosidasa se identificó solamente en el secretoma del hongo crecido en medio optimizado con bagazo de caña de azúcar.

Ambas EX identificadas son de peso molecular pequeño, una de 24 y la otra de 35,5 kDa, mientras que las demás xilanasas encontradas son de peso molecular mayor, entre 71 a 88 kDa. Los pI de todas las xilanasas fueron ácidos, en el rango entre 4.89 a 6.65.

Tabla 23. Proteínas identificadas en los secretomas de *A. niger* LBM 134 crecido en medios optimizados con bagazos de caña de azúcar y de mandioca y en sus sobrenadantes controles. Las proteínas se ordenan según su abundancia relativa en el secretoma.

Nombre de la proteína	ID ¹ de la proteína	MM ² (KDa)	pI ³	Sobrenadantes optimizados		Sobrenadantes controles	
				BCA ⁴	BM ⁵	BCA ⁴	BM ⁵
Glucoamilasa A	A2QHE1	68,3	4,45	X	X	X	
Endoxilanasas C	A2QFV7	35,5	6,65	X	X		
Endoglucanasa A	A2R322	25,9	4,64	X	X		
β -glucosidasa A	A2RAL4	93,2	4,78	X	X	X	
α -L-arabinofuranosidasa	A2QFV9	35,8	4,86	X	X		
β-xylosidasa D	A2QA27	87,2	4,89	X	X		

Tabla 23. (continua)

Nombre de la proteína	ID ¹ de la proteína	MM ² (KDa)	pI ³	Sobrenadantes optimizados		Sobrenadantes controles	
				BCA ⁴	BM ⁵	BCA ⁴	BM ⁵
Celobiohidrolasa B	A2QAI7	56,2	4,3	X	X		
α-galactosidase B	A2QEJ9	48,8	5,08	X	X		
β-glucosidasa M	A5ABF5	82,1	4,74	X	X		
α-glucosidasa U	A2QJF7	108,8	5,35	X	X		
α-glucuronidasa A	A2R3X3	93,7	5,38	X			
α-L-arabinofuranosidasa B	A2R511	52,5	4,44	X			
α-amilasa ácida	A2QW02	55,2	4,46	X	X		
Feruloil-esterasa A	A2QSY5	30,5	4,55	X			
β-galactosidasa A	A2QAN3	109,6	5,21	X	X	X	
endo-1,3-β-glucosidasa C	A2QH21	46,3	4,49	X	X	X	
Manosidasa 1B	A2QAS2	55,9	5,05	X	X	X	
endoglucanasa B	A2QPC3	36,5	4,55	X	X		
β-hexosaminidasa	A2QTI6	67,7	4,89	X	X	X	
α-galactosidasa A	A2QL72	59,2	5,03	X	X	X	
β-manosidasa A	A2QWU9	104	5,29	X	X		
α-xilosidasa A	A2QTU5	82,5	5,66	X	X	X	
β-galactosidasa C	A2QL84	108,6	4,84	X	X		
α-fucosidase A	A2R797	86,5	4,91	X	X	X	
Carboxilester hidrolasa	A2QZ72	58,3	4,79		X		
β-galactosidasa D	A2R2S6	71,2	4,83	X	X		
Glucan-1,3-β-glucosidasa A	A2RAR6	45,5	5,19	X			
Exoinsulina extracelular E	A2R0E0	59,1	5,43	X	X	X	
β-manosidasa A	A2QKT4	41,2	4,61	X	X		
Carboxilester hidrolasa	A2R1N7	61,2	5,2	X	X		
Endogalactanasa A	A2RB93	38,7	4,07		X		
Galacturonasa B pgxB	A2QHG0	48,4	4,86		X		
Péptido hidrolasa	A2QG29	59,3	4,89	X			
Ramnogalacturonasa A	A2QYE5	46,9	4,23		X		
β-glucuronidasa	A2QEQ6	58,8	5,47	X	X		

Tabla 23. (continua)

Nombre de la proteína	ID ¹ de la proteína	MM ² (KDa)	pI ³	Sobrenadantes optimizados		Sobrenadantes controles	
				BCA ⁴	BM ⁵	BCA ⁴	BM ⁵
Aspergillopepsina I	A2R3L3	41,3	4,67	X	X		
Xiloglucano-endoglucanasa A	A2Q877	25,5	3,88		X		
Feruloil esterasa B	A2R0Z6	57,2	5,2	X			
Ramnogalacturonasa A	A2QTH8	27,7	4,21		X		
α -galactosidasa C	A2QSZ8	65,3	5,25	X		X	
α -L-arabinofuranosidasa A	A2Q7E0	67,9	4,3	X	X		
Endoxilogalacturonasa A	A2QK83	42,1	4,51		X		
Catalasa R	A2Q7T0	80,4	5,83	X	X	X	
Celobiohidrolasa I	A2QPG2	48,2	4,32	X	X		
Carboxilpeptidasa D	A2QP32	59,5	4,72	X	X		
Carboxilester hidrolasa D	A2QE77	61,6	5,08	X	X		
Celobiohidrolasa II	A2QQ99	42,1	4,31	X	X		
β -galactosidasa B	A2QA64	111,7	5	X	X		
Celobiohidrolasa II	A2QYR9	48,1	4,53	X	X		
Endoxilanasas B	A2Q7I0	24	5,45	X	X		
Pectinasa A	A2R3I1	39,8	4,34		X		
Serina carboxil-peptidasa	A2R906	61,3	4,63	X	X		
Endoproteasa	A2QR21	58,7	4,58	X	X	X	
Pectinesterasa A	A2QK82	34,6	4,39		X		
endo-1,5- α -arabinosidasa C	A5AAG2	34	4,87	X	X	X	
Exopoligalacturonasa X	A2R060	47,3	4,82		X		
Sulfhidril oxidasa	A2QUK3	43,5	5,73	X	X	X	
Carboxilpeptidasa	A2QCT2	58,1	4,91	X			
Galacturanosidasa C	A2RAY7	45,9	5,2	X	X		
β -fructofuranosidasa	A2QSK6	63,6	5,06	X			
Fosfatasa ácida B	A2QSK3	52,5	4,75	X	X		
Endopoligalacturonasa E	A2QBB6	39,6	4,15		X		
Endo-1,5- α -arabinosidasa A	A2QT85	34,5	4,22		X		
Exopoligalacturonasa C	A2QEW2	47,8	5,2		X		

Table 23. (continua)

Nombre de la proteína	ID ¹ de la proteína	MM ² (KDa)	pI ³	Sobrenadantes optimizados		Sobrenadantes controles	
				BCA ⁴	BM ⁵	BCA ⁴	BM ⁵
1,3-β-glucosiltransferasa	A2QUZ1	48,4	4,93	X			
Peptidasa S28	A2QR36	62,1	4,45		X		
Fosfatasa ácida	A2QSK3	52,5	4,75	X	X		
Carboxilester hidrolasa B	A2QN56	55,1	4,84	X			
Asparaginpeptidasa	A2QGH4	60,9	4,51	X			
Carboxilester hidrolasa	A2R2I5	64,1	4,97	X	X		
Endoxilanasas 5	A2R4D1	22,6	4,48	X	X		
Fosfatasa púrpura ácida A	A2R1M4	67,2	5,83		X		
Carboxilpeptidasa	A2R2W1	53	4,63		X		
Endopoligalacturonasa C	A2QL39	40,5	4,23		X		
Galacturonidasa A	A2QBB4	47,7	5,24		X		
Oxidasa amina	A2R1U6	58,7	4,91		X		
Pectinesterasa	A2QHB7	35,6	4,42		X		
Ramnogalacturonasa B	A5ABH4	78,4	5,11		X		
Carboxilester hidrolasa	A2QVF5	57,2	4,37	X			
Endoxilanasas	A2R5J7	27,9	4,86	X			
Feruloil esterasa C	A2QYU7	28,6	5,02	X	X	X	
Dipeptidil-peptidasa 5	A2QZF1	79,2	4,42	X	X		
Carboxilester hidrolasa	A2QHE2	61,1	4,61	X	X		
Identificadas por homología:							
Isoamil alcohol oxidasa	A2QW39	61,3	4,82	X	X		
Proteína de la pared flía A	A2QT52	21,3	4,35		X		
Proteína de la pared flía B	A2QP93	54,5	6,13	X	X	X	
Catalasa	A2Q7Q4	80,2	5,3	X		X	X
Endo-β-1,3-glucanasa	A2Q852	104,8	5,52	X		X	
Exo-β-1,3-glucosidasa	A2QAR3	98,7	4,7	X	X	X	X
Peptidasa	A2R2Z3	65,7	5,68	X			
Endoglucanasa A	A2QAI8	43,4	4,26	X	X		
Glucosidasa	A2RAY6	123,1	6,27	X	X		

Tabla 23. (continua)

Nombre de la proteína	ID ¹ de la proteína	MM ² (KDa)	pI ³	Sobrenadantes optimizados		Sobrenadantes controles	
				BCA ⁴	BM ⁵	BCA ⁴	BM ⁵
Serincarboxipeptidasa 28	A2QZS1	62,9	5,07	X	X	X	X
Lipasa	A2QPC2	35,1	4,82	X			
Glicosilhidrolasa	A5AAX1	66,9	4,91	X		X	
Glicosilhidrolasa	A2QWR0	29,6	6,39	X			
Inductora de necrosis	A2QE11	32,6	5,72	X			
Dioxigenasa	A2QA93	39,9	4,75	X	X		
Oxidasa multicobre	A2RAC6	72,4	6,07	X			
Glicosilhidrolasa	A2QAC9	39,9	4,25	X	X		
Carboxilpeptidasa S	A2QF94	63,6	5,07	X		X	
Lipasa	A2QT10	31,9	4,4	X			
Oxidasa	A2QBL4	61,5	5,01	X			
Fosfoesterasa	A5ABC8	51,6	5,0	X			
α -amilasa	A2QJF8	57,9	5,33	X			
Lipoproteína	A5AAE0	70,5	5,43	X			
No caracterizada	A2QF50	100,6	5,2	X	X	X	
α -glucosidasa	A2QAC1	96,9	5,17	X	X	X	X
Proteína de pared celular	A2R2V6	28,33	4,55		X		
Esteroido monooxigenasa	A2R2Q9	50,4	4,34	X	X		
β-xilosidasa	A2R967	88	5,19	X	X		
Glicosilhidrolasa	A2R1U3	81,9	4,81		X		
Pectinesterasa	A2QEW9	43,1	5,35		X		
Aldosa epimerasa	A2QE24	44,1	4,79		X		
Glicosilhidrolasa	A2QJY8	58,9	5,26	X	X	X	
Fosfolipasa	A2R7J0	53,9	5,07	X	X		
Quitinasa clase 5	A5AA94	45,3	5,11	X	X	X	X
Glicosilhidrolasa	A2Q7T9	78,6	5,6	X			
Glicosilhidrolasa 1	A2QVN9	64	4,89	X	X		
Isomerasa Y <i>bhE</i>	A2QBC2	41,6	5,73	X		X	
Fitasa	A2QYN8	53,8	4,86	X	X	X	

Tabla 23. (continua)

Nombre de la proteína	ID ¹ de la proteína	MM ² (KDa)	pI ³	Sobrenadantes optimizados		Sobrenadantes controles	
				BCA ⁴	BM ⁵	BCA ⁴	BM ⁵
Xiloglucano celobiohidrolasa	A2Q7T5	90,9	4,58	X	X		
No caracterizada	A2QH12	62,9	4,73	X	X	X	
Glicosilhidrolasa 92	A2QS54	86,2	5,03	X			
No caracterizada	A2QF95	75,5	4,51	X	X	X	
Glicosilhidrolasa	A2R7B1	86	4,72	X	X	X	
Proteasa ácida	A2Q7E3	42,7	4,74		X		
Celulasa	A2QFW8	47,2	4,56	X	X		
α-ramnosidasa	A2Q947	70,3	5,35	X	X		
Prot anclaje a la pared GPI	A2QHW0	41	4,51	X	X		
No caracterizada	A2Q7C7	54,8	5,31		X		
Fosfolipasa	A2QBE3	49,7	5,33	X	X		
Lipasa GDSL, esterasa	A2QK49	30,1	4,81		X		
Endoglucanasa	A2R8E0	45,2	4,54	X	X		
Isoamil alcohol oxidasa	A2QHB3	61,3	5,31	X	X	X	
Glicosilhidrolasa 43	A2QSH9	47,6	4,36		X		
Oxigenasa dependiente	A2QFR3	54,7	5,22	X	X	X	
β-xilosidasa	A2QQB3	71	5,52	X			
No caracterizada	A2QEK4	86,2	4,79	X			
No caracterizada	A2R6M6	54,8	5,31		X		
α-1,2-manosidasa	A2QQM7	87,7	5,06	X	X		
Oxidasa multicobre	A2QB28	65,3	4,93	X		X	
Manosidasa	A2R3G8	75,2	4,91	X	X		
Dehidrogenasa	A2QMJ7	59,7	5,83	X		X	
Oxidasa FAD	A2QL34	69,2	5,06	X			
Glucan-endo-1,6-glucosidasa	A2QFR7	51,8	4,35	X			
Quitinasa	A2QF78	43,1	7,02	X		X	
Lipasa	A2R2I5	64,1	4,97	X	X		
Fosfatasa	A2QFZ2	65	4,53	X			
β-glucosidasa	A2R5M1	89,5	5,27	X			

Tabla 23. (continua)

Nombre de la proteína	ID ¹ de la proteína	MM ² (KDa)	pI ³	Sobrenadantes optimizados		Sobrenadantes controles	
				BCA ⁴	BM ⁵	BCA ⁴	BM ⁵
No caracterizada	A2QAP2	27,1	5,15	X			
α-α-trehalasa	A2Q7Q3	116,1	5,05	X			
β-glucosidasa	A2QWQ9	50,7	5	X			
α-fucosidasa	A2R1R0	59,5	5,26	X			
endo-β-1,3-glucosidasa	A2QQS9	32,1	4,78	X			X
Amino hidrolasa	A5ABB5	38,1	6,6	X			
No caracterizada	A2QV46	22,7	4,53	X			
α-β-hidrolasa	A2QL23	41,7	5,35	X		X	
Peptidase subtilisina	A2QL74	64,5	5	X	X		
Lipasa	A2RAD3	41,9	5,12			X	
β-glucosidasa	A2R2S3	83,5	5,21			X	
Proteasa	A2RBC2	43,5	4,98			X	
Lipasa	A2QTI9	64,9	6,07			X	

¹ID, número de identidad de la proteína

²MM, masa molecular

³pI, punto isoeléctrico

⁴BCA, Bagazo de caña de azúcar

⁵BM, bagazo de mandioca

En el secretoma del hongo crecido en el medio optimizado con bagazo de caña de azúcar se identificaron 37 proteínas exclusivas (22,8 %) en este secretoma; 79 proteínas (48,8 %) compartió con el secretoma optimizado con bagazo de mandioca; 37 proteínas (22.9 %) compartió con el secretoma control del medio con bagazo de caña de azúcar (**Figura 32**). Del total de proteínas identificadas, 31 (19,1 %) fueron exclusivas del secretoma optimizado con bagazo de mandioca, compartiendo cinco proteínas con su medio control (3,1 %) y 27 proteínas (16,7 %) con el medio control del bagazo de caña de azúcar.

Respecto a los medios controles, se identificaron cuatro proteínas exclusivas en el secretoma control del medio con bagazo de caña de azúcar correspondiendo al 2,5 %

mientras que, en el secretoma control del medio con bagazo de mandioca no se identificaron proteínas exclusivas. Las 6 proteínas identificadas en total en este último secretoma (3,7 %) también se identificaron en el sobrenadante optimizado con bagazo de caña de azúcar.

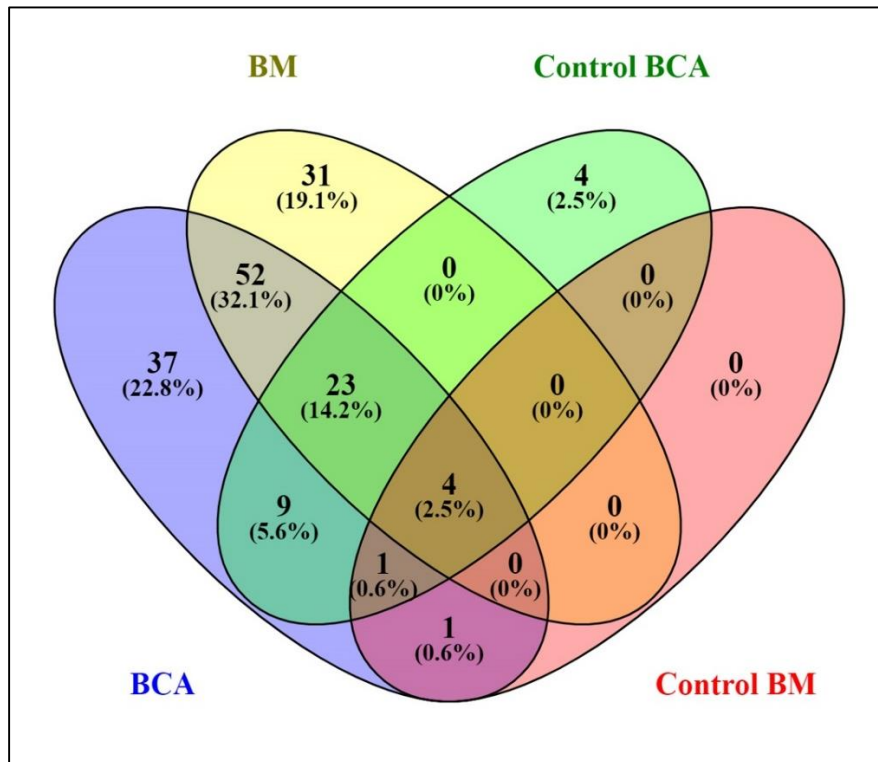


Figura 32. Diagrama de Venn de los cuatro secretomas de *A. niger* LBM 134 crecido en los diferentes medios de cultivo. Distribución de las 166 proteínas identificadas en los cuatro secretomas del hongo crecido en los diferentes medios: BCA, medio optimizado con bagazo de caña de azúcar; Control BCA, medio control del medio con bagazo de caña de azúcar; BM, medio optimizado con bagazo de mandioca; Control BM, medio control del medio con bagazo de mandioca.

El set entero de proteínas encontradas en los cuatro secretomas tienen masas moleculares entre 21,3 y 116,1 kDa con puntos isoeléctricos entre 4,07 y 7,02 (**Figura 33**). El pH es muy importante tanto en la producción enzimática como en el proceso de bioconversión de materiales lignocelulósicos. El pH óptimo de actividad enzimática para la mayoría de las enzimas hidrolíticas es ácido, cercano a 5. La distribución de los puntos observados mostró que en los cuatro sobrenadantes la mayoría de las proteínas identificadas presentaron puntos isoeléctricos cercanos a 4 y 5. No se detectó proteínas secretadas con puntos isoeléctricos superiores a 7. Por otro lado, las masas moleculares

de la mayoría de las proteínas identificadas en los cuatro secretomas se concentró entre los 25 kDa y 70 kDa.

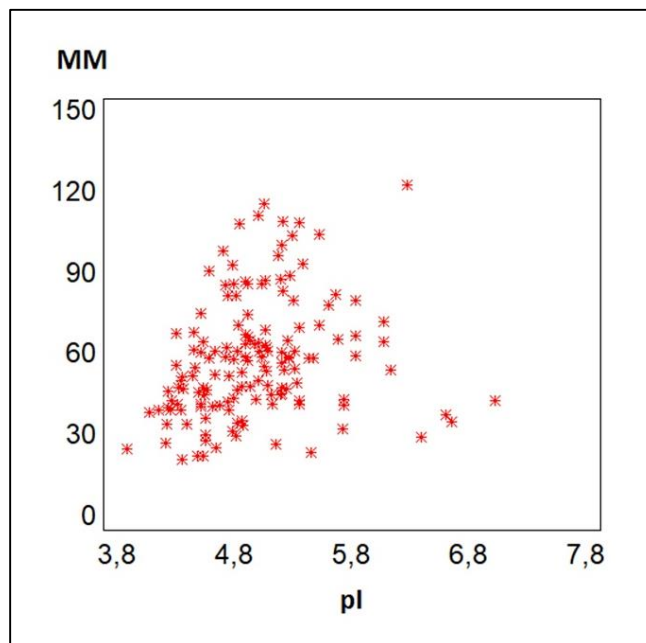


Figura 33. Dispersión de las proteínas identificadas en los cuatro secretomas según su masa molecular (MM) y punto isoeléctrico (pI). Las estrellas rojas corresponden a todas las proteínas presentes en los cuatro sobrenadantes, los provenientes de los medios optimizados con bagazo de caña de azúcar y bagazo de mandioca y los provenientes de los medios controles.

En los cuatro secretomas, se analizó la frecuencia relativa de las proteínas identificadas según su acción biológica, es decir, sobre qué actúan (**Figura 34**). La mayoría de las proteínas, en los cuatro secretomas, fueron enzimas con acción sobre los carbohidratos (CAZy), siendo el 64 % y el 68 % del total de las proteínas identificadas en los secretomas del hongo crecido en bagazo de caña de azúcar y de mandioca, respectivamente; en los secretomas controles de los medios con bagazo de caña de azúcar y de mandioca representaron el 54 y 50 %, respectivamente.

También se identificaron enzimas que actúan o potencialmente actúan sobre la lignina, (metales oxidasas y oxidorreductasas), llamadas conjuntamente ligninolíticas, en los cuatro secretomas, siendo mayor la frecuencia en los sobrenadantes controles de los medios con bagazo de caña de azúcar y de mandioca, 20 y 17 %, respectivamente.

Enzimas proteolíticas y peptidasas se encontraron en todos los secretomas estudiados, sin embargo, su frecuencia fue mayor en el secretoma control del medio de bagazo de mandioca representando el tercio del secretoma (33 %). También enzimas que actúan en el metabolismo y transporte de los lípidos, las lipasas, se identificaron en ambos secretomas del hongo crecido en los medios optimizados y en el secretoma control del bagazo de caña de azúcar. No se identificó lipasas en el secretoma control del medio de bagazo de mandioca.

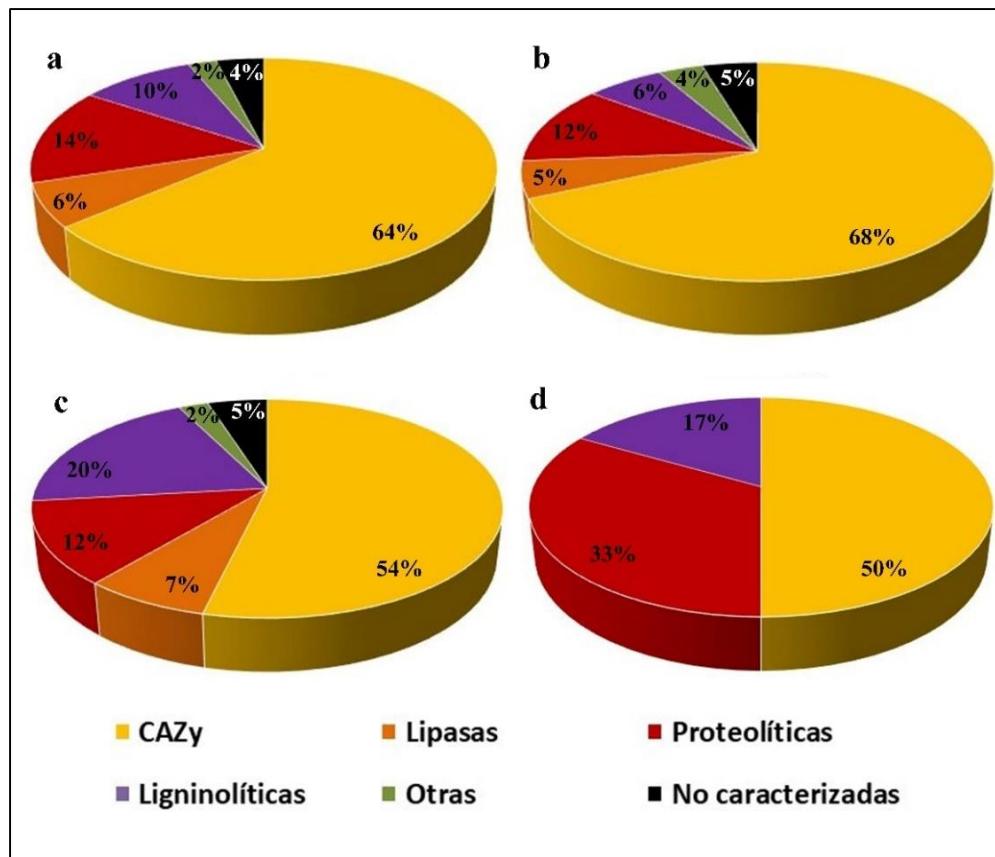


Figura 34. Cantidad de proteínas diferentes según su acción biológica identificadas en los cuatro secretomas de *A. niger* LBM 134. Diferentes proteínas identificadas con actividad enzimática sobre los carbohidratos (CAZy), lípidos (lipasas), proteínas (proteolíticas) y lignina (ligninolíticas) del hongo crecido en los diferentes medios **a)** en medio optimizado con bagazo de caña de azúcar; **b)** en medio optimizado con bagazo de mandioca; **c)** control del medio con bagazo de caña de azúcar; **d)** medio control del medio con bagazo de mandioca.

En esta parte del trabajo se enfocó en el análisis de los secretomas de *A. niger* LBM 134 crecido en ambos medios optimizados, con bagazo de caña de azúcar y con bagazo de mandioca ya que el interés estuvo puesto sobre las enzimas involucradas en la

degradación de ambos residuos agroindustriales. En primera instancia, se evaluó la diferencia de las proteínas diferentes identificadas en ambos secretomas de los sobrenadantes optimizados en función del tipo de ataque enzimático (**Figura 35**). En ambos secretomas, la frecuencia relativa de las diferentes proteínas fue similar. La mayoría de las enzimas identificadas fueron hidrolasas, representando el 79 % de las proteínas totales en el secretoma del hongo crecido en el medio optimizado con bagazo de caña de azúcar y el 80 % de las proteínas totales en el secretoma del hongo crecido en el medio optimizado con bagazo de mandioca. También se encontraron enzimas del tipo oxidorreductasas, 10 y 7 % en los secretomas del hongo crecido en medio optimizado con bagazo de caña de azúcar y con bagazo de mandioca, respectivamente. En el secretoma del hongo crecido en medio optimizado con bagazo de caña de azúcar, se identificaron enzimas isomerasas (1 %) y transferasas (1 %). En el secretoma del hongo crecido en medio optimizado con bagazo de mandioca, se encontraron enzimas del tipo liasas (2 %) e isomerasas (1 %).

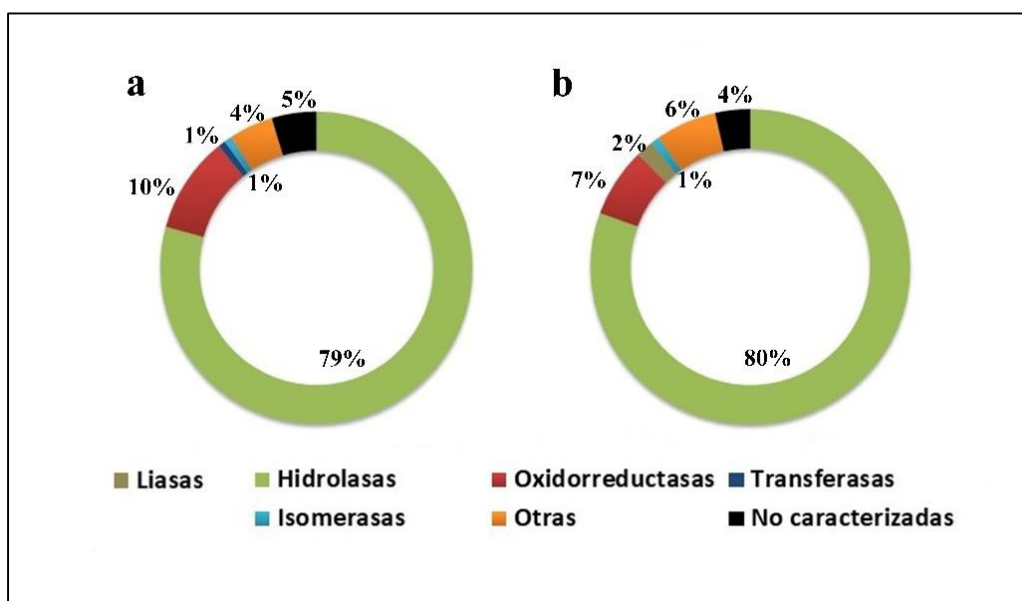


Figura 35. Cantidad de proteínas diferentes según su modo de acción enzimático, identificadas en los secretomas de *A. niger* LBM 134 crecido en los medios optimizados. a) crecido en medio optimizado con bagazo de caña de azúcar y b) crecido en medio optimizado con bagazo de mandioca.

Además de identificar las proteínas en los secretomas optimizados de *A. niger* LBM 134, se analizó la abundancia de las proteínas en estos secretomas en función de sus

valores emPAI (cociente entre el número de péptidos identificados para una proteína y el total de péptidos esperados *in silico*) (**Figura 36**). A cada proteína se les asigna por definición la suma de los PSMs (función de la abundancia) de los péptidos con los cuales se la identificó. Si bien este parámetro es función de la abundancia, también depende del largo de la proteína: cuanto más chica, menos péptidos aparecerán y a la inversa, cuanto más larga, más péptidos. El valor emPAI soluciona el problema del largo de la proteína; es un factor de corrección que se refiere a la abundancia relativa de proteínas en un secretoma, es decir, dentro de cada condición de cultivo en este caso. Con este valor, se pudo sacar conclusiones sobre el enriquecimiento diferencial de ciertas enzimas por sobre otras en cada secretoma optimizado. En la **Figura 36 a-b** se muestran los secretomas optimizados en función de diferencia en número de proteínas; en la **Figura 36 c-d**, se muestra la diferencia en abundancia de las enzimas identificadas.

Particularmente, el análisis de abundancia de las xilanasas mostró que la EX, A2QFV7, fue 240 veces mayor en el secretoma de *A. niger* LBM 134 crecido en bagazo de caña de azúcar en comparación al secretoma del hongo crecido en bagazo de mandioca. La otra EX, A2Q7I0, mostró una abundancia mayor de más de dos veces en el secretoma del hongo crecido con bagazo de caña de azúcar. Respecto a las BXL, la enzima A2QQB3 se encontró solamente en el secretoma del hongo crecido en bagazo de caña de azúcar mientras que, la abundancia de las demás BXL fueron mayores en este secretoma.

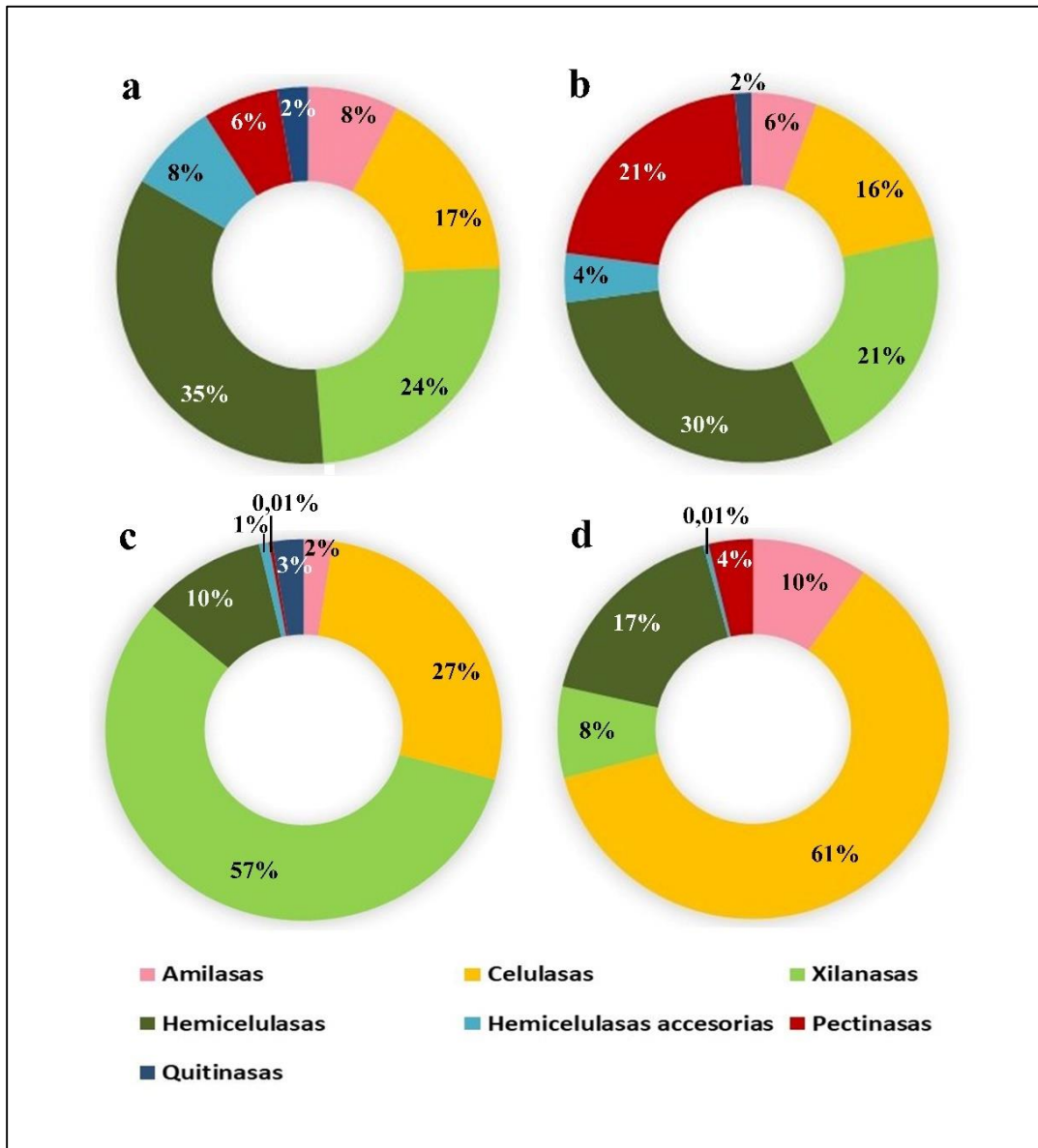


Figura 36. Enzimas encargadas de la degradación de los componentes carbonados de la pared celular vegetal presentes en los secretomas de *A. niger* LBM 134 crecido en los medios optimizados. Diferencia en número de las enzimas presentes en el secretoma del hongo crecido en los medios optimizados con **a)** bagazo de caña de azúcar y con **b)** bagazo de mandioca. Diferencia en abundancia relativa de las enzimas identificadas en los secretomas del hongo crecido en los medios optimizados con **c)** bagazo de caña de azúcar y con **d)** bagazo de mandioca.

Debido a que se identificó un alto número de enzimas involucradas en la degradación de los componentes carbonados de la biomasa, se analizó su distribución y clasificación en función del sistema CAZy. Las enzimas encontradas en los secretomas de *A. niger* LBM 134 crecido en los bagazos se agruparon en 39 familias GH, 4 familias estererasas de

carbohidratos (CE, del inglés *Carbohydrate esterases*) y 2 familias de liasas de polisacáridos (PL, del inglés *Polysaccharide hydrolases*) según la base de datos de las enzimas con actividad sobre los carbohidratos, CAZy, (www.cazy.org) (**Figura 37**), lo que sobresaltó la diversidad enzimática del hongo. Se observó una diferencia significativa en el número de proteínas de dos familias GH (**Figura 37 a**). Se identificaron 7 enzimas representantes de la familia GH 3 donde se encuentran xilanasas (β -xilosidasas), celulasas (β -glucosidasas) y hemicelulasas en el secretoma del hongo crecido con bagazo de caña de azúcar mientras que, en el secretoma del hongo crecido con bagazo de mandioca se identificaron 4 enzimas representantes de esta familia. Asimismo, en la familia GH 28 cuyas enzimas representantes son las pectinasas, se observó una marcada diferencia; en el secretoma del hongo crecido con bagazo de caña de azúcar se identificaron 3 enzimas y en el secretoma del hongo crecido con bagazo de mandioca se identificaron 9 enzimas.

Por otra parte, algunas GHs se identificaron exclusivamente en el secretoma del hongo crecido en bagazo de caña de azúcar, estas fueron enzimas pertenecientes a las familias GH 18 (quitinasas), GH 29 (α -fucosidasas), GH 36 (α -galactosidasas), GH 67 (α -glucuronidasa), GH 72 (α -glucanosil transferasa), GH 76 (hemicelulasas) y GH 81 (endo- α -1,3-glucanasa).

Con respecto a las enzimas de las familias CE, las xilanasas representantes de la familia CE 1, feruloil esterases, y las enzimas de la familia CE 4 se identificaron exclusivamente en el secretoma del hongo crecido en el medio con bagazo de caña de azúcar. La familia CE 5 cuyas enzimas representantes fueron xilanasas y las familias CE 8 y CE 13 cuyas representantes fueron pectinasas estuvieron presentes en ambos secretomas.

Las enzimas pectinasas representantes de las familias PL 1 y PL 4 se identificaron en los secretomas del hongo crecido en bagazo de mandioca y de caña de azúcar, respectivamente.

La diferencia de las proteínas identificadas en algunas familias CAZy se hace más evidente cuando se analiza su abundancia en cada secretoma optimizado (**Figura 37 b**). Casi todas las familias mostraron diferencia en abundancia; la abundancia de la familia GH 1 (β -glucosidasa) fue 2,33 mayor en el secretoma del hongo crecido en bagazo de

caña de azúcar mientras que, la enzima de la familia GH 2 fue 2,21 mayor en el secretoma del hongo crecido en bagazo de mandioca.

La abundancia de las celulasas y hemicelulasas de la familia GH 5 fue significativamente diferente en ambos secretomas optimizados. En el secretoma del hongo crecido con bagazo de mandioca la proporción relativa de estas enzimas fue 4,17 veces mayor, a pesar de que se identificaron menos enzimas (en número) respecto al otro secretoma optimizado. Otra gran diferencia manifiesta se dio en la familia GH 10, cuyas enzimas representantes son las EX; su abundancia en el secretoma del hongo crecido con bagazo de caña de azúcar fue 240 veces mayor que en el secretoma del hongo crecido en medio con bagazo de mandioca, aun cuando en cada secretoma se identificó una enzima de la familia GH 10.

La abundancia de las amilasas de las familias GH 13 y GH 15 fue mayor en el secretoma del hongo crecido en bagazo de mandioca, siendo respectivamente 11,61 y 5,24 veces mayor en este secretoma aun cuando en la familia GH 13 se identificaron más amilasas en el secretoma del hongo crecido en bagazo de caña de azúcar. El secretoma del hongo crecido en bagazo de mandioca mostró mayor proporción de enzimas en diferentes familias GH que en el secretoma del hongo crecido en bagazo de caña de azúcar. La familia GH 16 (hemicelulasas) presentó una proporción 5,5 veces mayor que su proporción en el secretoma del hongo crecido en bagazo de caña de azúcar; la familia GH 27 (β -galactosidasas), casi 2 veces mayor; la familia GH 28 (pectinasas), casi 8 veces mayor; la familia GH 53 (endo-galactanasa), 44,67 veces mayor; la familia GH 55 (exo- β -1,3-glucosidasa), 2,4 veces mayor y la familia GH 65 (hemicelulasas), 2 veces mayor.

Las enzimas que presentaron mayor proporción en el secretoma del hongo crecido en bagazo de caña de azúcar fueron la familia GH 79 (β -glucuronidasa), 2 veces mayor, la α -L-arabinofuranosidasa (GH 62) y las manosidasas (GH 92) siendo casi 4 veces mayores respecto al otro secretoma optimizado.

Además de las diferencias encontradas en número de enzimas CE y PL, las más significativas se dan en las familias CE 5 y CE 13. La abundancia de las xilanasas de la familia CE 5 fue más de 8 veces mayor en el secretoma del hongo crecido en bagazo de caña de azúcar, mientras que, las pectinasas de la familia CE 13 fue casi 22 veces mayor en el secretoma del hongo crecido en bagazo de mandioca.

de cada familia CE y de las enzimas PLs de cada familia PL en ambos secretomas del hongo crecido en los medios optimizados. BCA, bagazo de caña de azúcar; BM, bagazo de mandioca.

5.6.3 Análisis funcional de los secretomas de los sobrenadantes optimizados de *A. niger* LBM 134

Para validar los datos secretómicos y describir el repertorio enzimático involucrado en la degradación de los polisacáridos de los residuos agro-industriales por parte de *A. niger* LBM 134, se evaluó la *performance* hidrolítica del hongo en los sobrenadantes conteniendo bagazo de caña de azúcar y de mandioca. Esta evaluación se llevó a cabo utilizando ocho sustratos para determinar las actividades celulasas, xilanasas y amilasas (Figura 38).

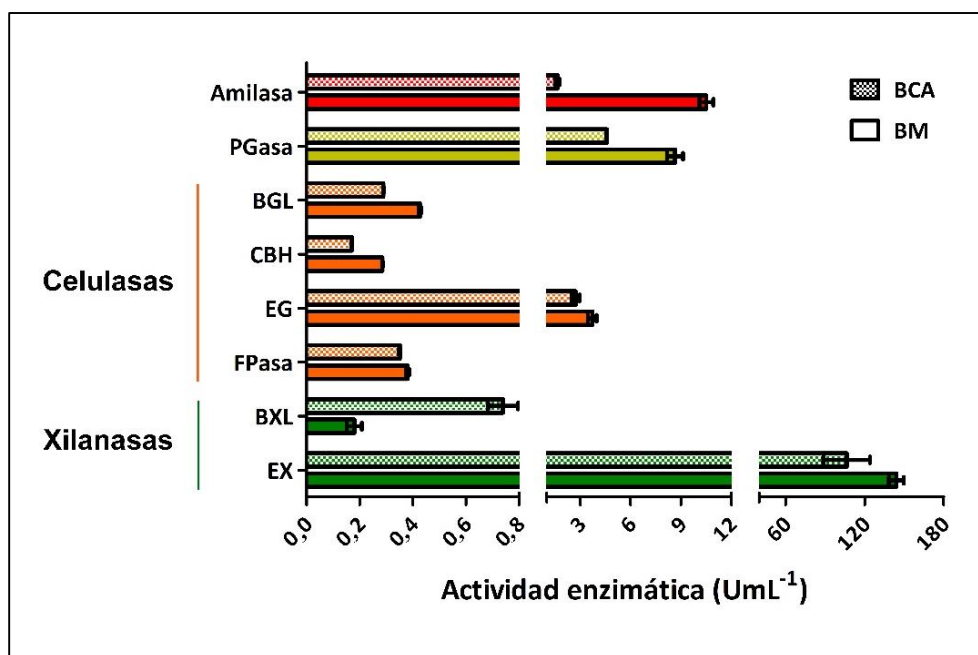


Figura 38. Actividades enzimáticas de *A. niger* LBM 134 en los sobrenadantes optimizados con bagazo de caña de azúcar (BCA) y con bagazo de mandioca (BM). El potencial hidrolítico de los sobrenadantes del hongo se evaluó en diferentes sustratos: EX, actividad endoxilanasas; BXL, actividad β-xilosidasas; FPasa, actividad papel de filtro; EG, actividad endoglucanasas; CBH, actividad celobiohidrolasas; BGL, actividad β-glucosidasas; PGasa, actividad poligalacturonasa. Los valores de las actividades enzimáticas se expresan en U mL⁻¹.

La actividad EX (determinada con el sustrato xilano de *beechwood*) en el sobrenadante del hongo crecido con bagazo de mandioca fue mayor, $144 \pm 5,65 \text{ U mL}^{-1}$ que, en el sobrenadante de bagazo de caña de azúcar, $106 \pm 14,67 \text{ U mL}^{-1}$. La actividad BXL (determinada con el sustrato pNPX) fue cuatro veces mayor en el sobrenadante optimizado con bagazo de caña de azúcar, $0,74 \pm 0,05 \text{ U mL}^{-1}$, en comparación con el otro sobrenadante optimizado con bagazo de mandioca, $0,18 \pm 0,03 \text{ U mL}^{-1}$. Estos hallazgos coinciden con los datos secretómicos donde se observó que la proporción de xilanasas en el secretoma del hongo crecido con bagazo de caña de azúcar fue mayor.

Los niveles de actividades celulasas (actividad FPasa, determinada con papel de filtro; EG determinada con el sustrato CMC; BGL, con el sustrato pNPG y CBH, con el sustrato pNPC) fueron mayores en los sobrenadantes provenientes del hongo crecido con bagazo de mandioca coincidiendo con los datos secretómicos. Los valores de actividad FPasa, EG, BGL y CBH para este sobrenadante fueron $0,381 \pm 0,00 \text{ U mL}^{-1}$; $0,372 \pm 0,25 \text{ U mL}^{-1}$; $0,28 \pm 0,00 \text{ U mL}^{-1}$ y $0,43 \pm 0,00 \text{ U mL}^{-1}$; respectivamente versus los valores obtenidos para el sobrenadante del hongo crecido en bagazo de caña de azúcar, $0,35 \pm 0,00 \pm 0,25 \text{ U mL}^{-1}$; $2,72 \pm 0,23 \text{ U mL}^{-1}$; $0,17 \pm 0,00 \text{ U mL}^{-1}$ y $0,29 \pm 0,00 \text{ U mL}^{-1}$.

Las actividades pectinasa y amilasa (determinadas con los sustratos ácido poligalacturónico y almidón, respectivamente) fueron mayores en el sobrenadante del hongo crecido con bagazo de mandioca. Los valores de actividad pectinasa y amilasa alcanzados en este sobrenadante fueron $8,64 \pm 0,47 \text{ U mL}^{-1}$ y $10,51 \pm 0,40 \text{ U mL}^{-1}$, respectivamente; mientras que, en el sobrenadante del hongo crecido con bagazo de caña de azúcar fueron $4,58 \pm 0,00 \text{ U mL}^{-1}$ y $1,64 \pm 0,11 \text{ U mL}^{-1}$, respectivamente. Estos datos también coincidieron con los análisis secretómicos que indicaron mayor cantidad de estas enzimas en el secretoma del hongo crecido en el medio optimizado con bagazo de mandioca.

5.7 Aplicación de los sobrenadantes optimizados en la hidrólisis de bagazos de caña de azúcar y de mandioca

5.7.1 Determinación de la termoestabilidad de las actividades enzimáticas intervinientes en la hidrólisis

En la sección 5.6.3 se pudo determinar que los niveles de actividad EX, BXL, FPasa y BGL fueron suficientes para llevar a cabo los ensayos de hidrólisis sobre los bagazos de caña de azúcar y de mandioca pretratados.

Para establecer que las condiciones óptimas de temperatura y pH de la actividad EX (*secciones 5.5.1 y 5.5.2*) fueran las óptimas para las demás actividades enzimáticas intervinientes en la hidrólisis de los residuos, se evaluó la termoestabilidad y la estabilidad en el pH de las actividades BXL, FPasa y BGL de los sobrenadantes optimizados con bagazo de caña de azúcar (**Figura 39**) y con bagazo de mandioca (**Figura 40**).

En el caso de los sobrenadantes optimizados con bagazo de caña de azúcar, el efecto de la temperatura (30 °C) en el tiempo sobre las actividades FPasa, BXL y BGL mostró que las tres actividades fueron estables, superando el 50 % de actividad residual (**Figura 39 a**). Por otra parte, el efecto del pH (5) sobre las actividades enzimáticas demostró que las actividades FPasa y BGL fueron más estables, presentando más del 50 % de su actividad residual luego de las 24 h (**Figura 39 b**).

Respecto a los sobrenadantes optimizados con bagazo de mandioca, las tres actividades FPasa, BXL y BGL mostraron estabilidad en el tiempo superando el 50 % de actividad residual hasta las 24 h cuando se incubaron a 30 °C, siendo las actividades FPasa y BXL más estables (**Figura 40 a**). En el caso del efecto del pH (5) sobre las actividades enzimáticas, las tres actividades fueron estables, presentando más del 50 % de su actividad residual luego de las 24 h (**Figura 40 b**).

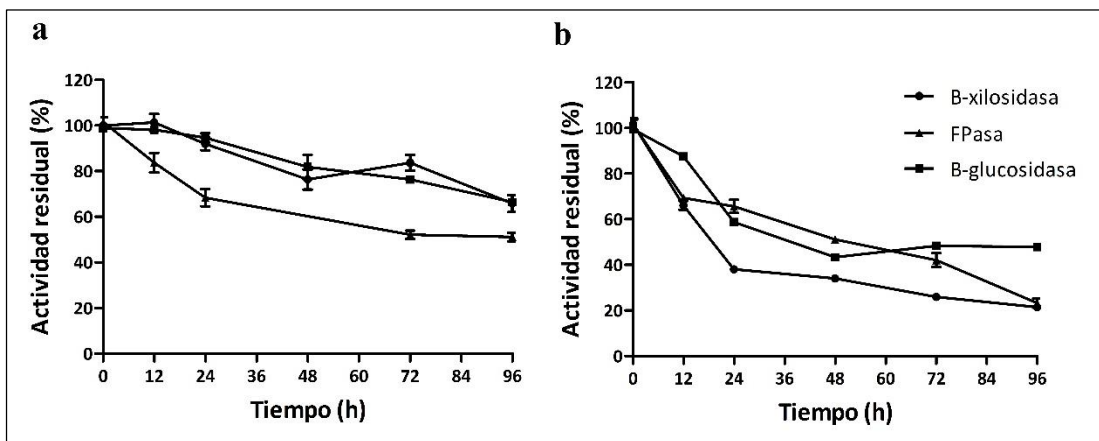


Figura 39. Estabilidad en temperatura y pH de las actividades enzimáticas en sobrenadantes optimizados con bagazo de caña de azúcar. a) Estabilidad en temperatura de las actividades β -xilosidasa, FPasa y β -glucosidasa en el tiempo. **b)** Estabilidad en pH de las actividades β -xilosidasa, FPasa y β -glucosidasa en el tiempo. El 100 % de las actividades enzimáticas correspondieron 0,8; 0,351 y 0,29 UmL^{-1} para β -xilosidasa, FPasa y β -glucosidasa, respectivamente.

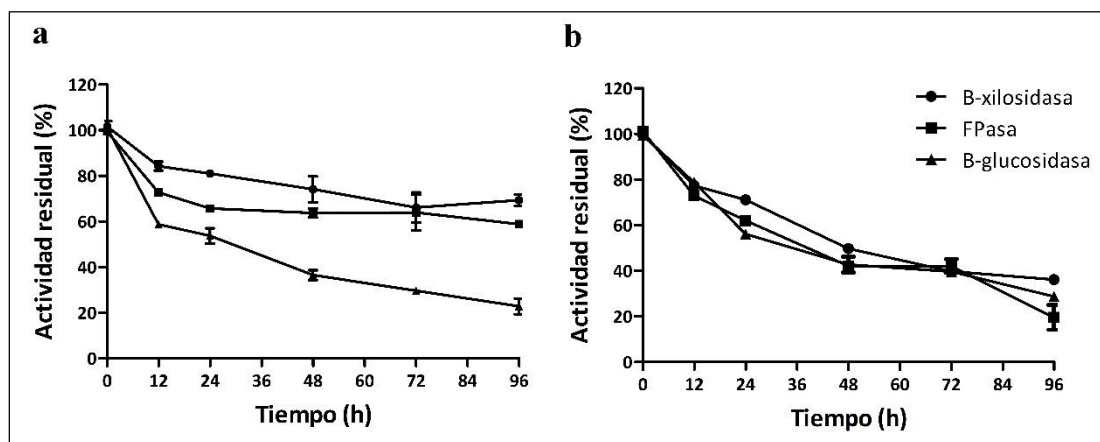


Figura 40. Estabilidad en temperatura y pH de las actividades enzimáticas en sobrenadantes optimizados con bagazo de mandioca. a) Estabilidad en temperatura de las actividades β -xilosidasa, FPasa y β -glucosidasa en el tiempo. **b)** Estabilidad en pH de las actividades β -xilosidasa, FPasa y β -glucosidasa en el tiempo. El 100 % de las actividades enzimáticas correspondieron 0,8; 0,351 y 0,29 UmL^{-1} para β -xilosidasa, FPasa y β -glucosidasa, respectivamente.

Teniendo en cuenta los resultados de la determinación de la estabilidad en la temperatura y en el pH de las enzimas (BXL, FPasa y BGL), se decidió llevar a cabo la hidrólisis de los residuos durante 24 h con ambos sobrenadantes. Esto es debido a que

luego de este periodo algunas actividades enzimáticas cayeron por debajo del 50 % de actividad residual.

5.7.2 Pretratamiento alcalino de los bagazos de caña de azúcar y de mandioca

Debido a que una hidrólisis eficiente de materiales lignocelulósicos requiere de un pretratamiento para liberar total o parcialmente la lignina, ambos bagazos se trataron con una solución alcalina de Na(OH) 0,85% (p/v) a 121 °C durante 30 min (Castrillo, 2015). No se detectaron azúcares reductores en los sobrenadantes resultantes de los pretratamientos de ningún residuo, lo que significó que no hubo pérdida de azúcares. Esto es importante para el paso posterior del proceso, la hidrólisis a azúcares fermentables.

5.7.3 Ensayos de hidrólisis de los bagazos de caña de azúcar y de mandioca

La hidrólisis de los bagazos de caña de azúcar y de mandioca se llevó a cabo utilizando los sobrenadantes optimizados de *A. niger* LBM 134 crecido en medio con bagazo de caña de azúcar y de mandioca, respectivamente (bagazo + respectivo sobrenadante). Asimismo, se realizaron ensayos de hidrolisis con enzimas comerciales (bagazo + enzimas comerciales) y dos controles (control bagazo y control sobrenadante). El control bagazo consistió en bagazo pretratado con la solución alcalina + *buffer*, mientras que, el control sobrenadante fue el sobrenadante optimizado de *A. niger* LBM 134.

Todos las reacciones, hidrólisis y controles, se realizaron a 30 °C y pH 5 y los azúcares resultantes se determinaron luego de las 24 h. Estos fueron azúcares reductores, cuantificados mediante la técnica del DNS (en mgmL⁻¹) y azúcares liberados identificados y cuantificados por HPLC en (en mgmL⁻¹) determinados ambos en cada residuo hidrolizado, bagazo de caña de azúcar (**Tabla 24**) y bagazo de mandioca (**Tabla 25**).

Tabla 24. Azúcares liberados (mgmL^{-1}) en los ensayos de hidrólisis del bagazo de caña de azúcar pretratado utilizando el sobrenadante optimizado de *A. niger* LBM 134 crecido en bagazo de caña de azúcar.

ENSAYOS	Azúcares reductores	Celobiosa	Glucosa	Xilosa	Arabinosa	Ácido acético
BCA + sobrenadante	22,09 ± 1,26	2,48 ± 0,53	5,18 ± 1,14	4,46 ± 1,06	0,55 ± 1,13	2,56 ± 0,48
BCA + enzimas comerciales	17,41 ± 0,13	2,45 ± 0,01	4,34 ± 0,03	3,62 ± 0,09	0,07 ± 0,01	2,14 ± 0,02
Control BCA (+ buffer)	0	0,01 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	-	3,17 ± 0,07
Control sobrenadante	0	1,00 ± 0,00	0,63 ± 0,00	-	-	-

BCA: bagazo de caña de azúcar

Respecto a la hidrólisis del bagazo de caña de azúcar con el sobrenadante optimizado de *A. niger* LBM 134 crecido en el mismo residuo, los valores obtenidos de azúcares reductores se calculó los porcentajes de sacarificación luego de restar los valores correspondientes a los controles. Los porcentajes de sacarificación del bagazo de caña de azúcar hidrolizado con el sobrenadante optimizado y con las enzimas comerciales fueron 59 y 47 %, respectivamente. Los azúcares individuales cuantificados por HPLC resultado de la hidrólisis del bagazo de caña de azúcar con el sobrenadante optimizado de *A. niger* LBM 134 fueron: conversión a glucosa (26,32 %), a celobiosa (16,51 %) y a xilosa (51,7 %). Con respecto a la hidrólisis realizada con las enzimas comerciales, los porcentajes de conversión por HPLC a glucosa, celobiosa y xilosa fueron 27,33, 16,31 y 42 %, respectivamente.

Tabla 25. Azúcares liberados (mg mL^{-1}) en los ensayos de hidrólisis del bagazo de mandioca pretratado utilizando el sobrenadante optimizado de *A. niger* LBM 134 crecido en bagazo de mandioca.

ENSAYOS	Azúcares reductores	Celobiosa	Glucosa	Xilosa	Arabinosa	Ácido acético
BM + sobrenadante	22,81 ± 1,63	1,00 ± 0,27	5,12 ± 0,89	0,65 ± 0,06	0,11 ± 0,02	2,98 ± 0,17
BM + enzimas comerciales	14,73 ± 2,01	0,61 ± 0,02	2,33 ± 0,14	-	0,03 ± 0,00	2,37 ± 0,01
Control BM (+ buffer)	0	1,10 ± 0,09	0,33 ± 0,31	0,21 ± 0,19	0,04 ± 0,00	3,22 ± 0,28
Control sobrenadante	0	0,99 ± 0,00	0,38 ± 0,00	-	-	-

BM: bagazo de mandioca

Por otra parte, la hidrólisis del bagazo de mandioca con el sobrenadante optimizado de *A. niger* LBM 134 crecido en el mismo residuo, los valores obtenidos de azúcares reductores se calculó los porcentajes de sacarificación luego de restar los valores correspondientes a los controles. Los porcentajes de sacarificación del bagazo de mandioca hidrolizado con el sobrenadante optimizado y con las enzimas comerciales fueron 61 y 40 %, respectivamente. Los azúcares individuales cuantificados por HPLC resultado de la hidrólisis del bagazo de mandioca con el sobrenadante optimizado de *A. niger* LBM 134 fueron: a glucosa (19 %), a celobiosa (3,94 %) y a xilosa (10,4 %). Con respecto a la hidrólisis realizada con las enzimas comerciales, los porcentajes de conversión por HPLC a glucosa y celobiosa fueron 8,69 y 2,4 %, respectivamente.

5.7.4 Microscopía de electrónica de barrido

Se evaluaron los cambios en la estructura de los bagazos de caña de azúcar y de mandioca mediante microfotografías tomadas con microscopio electrónico de barrido (**Figura 41**). Para ello se fotografiaron las estructuras de ambos bagazos antes del pretratamiento observándose las estructuras típicas de ambos bagazos (**Figuras 41 a y 41 b**). Asimismo, se tomaron microfotografías de ambos residuos luego del tratamiento alcalino con Na(OH) donde se distinguieron alteraciones del parénquima y de los vasos

conductores en el bagazo de caña de azúcar señalizadas con flechas roja y blanca, respectivamente (**Figura 41 c**). En el bagazo de mandioca se distinguieron alteraciones en los gránulos de almidón (**Figuras 41 d**). Finalmente, se fotografiaron ambos bagazos luego de los ensayos de hidrólisis con los sobrenadantes optimizados respectivos de *A. niger* LBM 134. En la microfotografía del bagazo de caña de azúcar se observó a las fibras de celulosa laxas y desorganizadas indicando un incremento de la exposición de dichas fibras (**Figura 41 e**) mientras que, en el caso del bagazo de mandioca se observó una estructura desorganizada sin la presencia de gránulos de almidón característicos de este residuo. (**Figura 41 f**). Este hallazgo indicaría la liberación de azúcares reductores explicando los valores obtenidos en la determinación por el método del DNS y por la cuantificación con HPLC. Además, se tomaron microfotografías de los bagazos pretratados hidrolizados con las enzimas comerciales (**Figuras 41 g-h**).

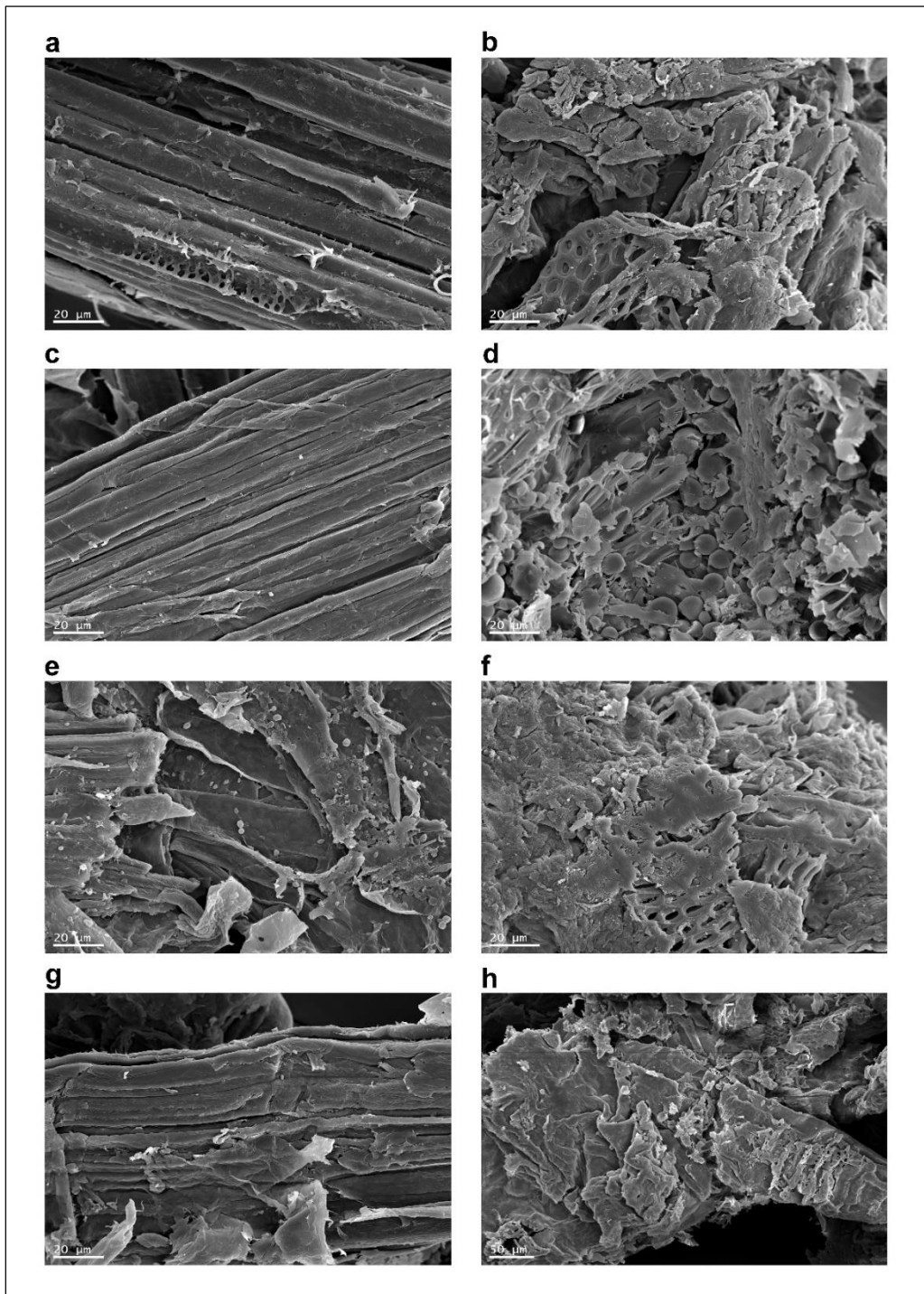


Figura 41. Microfotografías de los bagazos de caña de azúcar y de mandioca utilizados en la aplicación de los sobrenadantes optimizados de *A. niger* LBM 134 crecidos en los mismos residuos. a) Estructura particular del bagazo de caña de azúcar sin tratar; **b)** estructura particular del bagazo de mandioca sin tratar; **c)** bagazo de caña de azúcar tratado con solución alcalina de Na(OH) 0,85 % (p/v); **d)** bagazo de mandioca tratado con solución alcalina de Na(OH) 0,85 % (p/v); **e)** bagazo de caña de azúcar luego de ser pretratado e hidrolizado con el sobrenadante de *A. niger* LBM 134 crecido en medio con bagazo de caña de azúcar; **f)** bagazo de mandioca luego de ser pretratado e hidrolizado con el sobrenadante de *A. niger* LBM 134 crecido en medio con bagazo mandioca; **g)** bagazo de caña de azúcar luego de ser pretratado e hidrolizado con enzimas comerciales; **h)** bagazo de mandioca luego de ser pretratado e hidrolizado con enzimas comerciales.



DISCUSIÓN



6. DISCUSIÓN

6.1 Aislamiento de hongos *Aspergillus* en Misiones y evaluación de su capacidad xilanolítica

La selva subtropical del noreste argentino se caracteriza por su asombroso biodiversidad y dentro de este ambiente se puede aislar una gran cantidad de organismos (Fonseca *et al.*, 2010; Coniglio *et al.*, 2017). Este trabajo se focalizó en la búsqueda de hongos del género *Aspergillus* ya que las especies de este género son conocidas por ser buenas productoras de enzimas hidrolíticas, entre ellas xilanasas (Cuyvers *et al.*, 2011; Goswami & Pathak, 2013). Además, es muy común que diferentes aislamientos de una misma especie puedan tener diferentes comportamientos, por ello se hace necesario investigar nuevos aislamientos fúngicos con el fin de encontrar enzimas novedosas y explotarlas biotecnológicamente (Fonseca *et al.*, 2016; Chylenski *et al.*, 2017). Esta es una de las estrategias que se han aplicado para dar solución a la demanda de enzimas de alta *performance* con características específicas para procesos industriales (Bertrand *et al.*, 2017).

Teniendo en cuenta que los hongos del género *Aspergillus* tienen un comportamiento cosmopolita, se aisló microorganismos de materiales en pudrición y de suelo en diferentes lugares naturales de Misiones, Argentina. Posteriormente, basándose en sus características macro y microscópicas se seleccionaron aquellos aislamientos del género *Aspergillus*.

En este trabajo se evaluó la capacidad xilanolítica de los hongos *Aspergillus* aislados. Teniendo en cuenta que dentro del complejo xilanolítico que involucra muchas enzimas con diferentes especificidades, las EX y BXL juegan un papel fundamental en la despolimerización del xilano en monómeros de xilosa (Burlacu *et al.*, 2016a; Menon & Datta, 2017) se estudió la actividad EX y BXL en los 25 aislamientos de *Aspergillus*.

El uso de residuos agroindustriales como fuente de carbono e inductor de enzimas hidrolíticas como las EX y BXL es una opción muy interesante para reducir los costos de producción enzimática, ventaja que siempre se busca en un proceso industrial (Silva *et al.*, 2014; Florencio *et al.*, 2016). El uso de bagazo de caña de azúcar fue atractivo ya que se reportó como buen sustrato para la producción de enzimas xilanasas (Sales *et al.*,

2011; Goswami & Pathak, 2013; Barchuk *et al.*, 2016) por lo que se utilizó como única fuente de carbono en este *screening*, reemplazando el xilano comercial que se utiliza casi siempre en los estudios de *screening* para evaluar la capacidad xilanolítica de diferentes microorganismos. En concordancia con la bibliografía, en este trabajo se encontró que el bagazo de caña de azúcar soportó eficientemente el crecimiento de los hongos evaluados y la producción de proteínas con actividad EX y BXL.

Todos los aislamientos presentaron diferentes valores de actividad EX, aunque sus perfiles de actividad enzimática fueron similares. La mayoría de los aislamientos fúngicos mostró baja actividad EX los primeros cuatro días de incubación, aumentando entre los días seis y alcanzando el pico enzimático máximo entre los días diez y dieciséis; luego mostraron una caída abrupta en su actividad EX debido quizás a la presencia de proteínas proteolíticas en el medio de cultivo. Esto constituye un problema serio para el mantenimiento de la estabilidad de cualquier enzima, en este caso, para las EX (Oliveira *et al.*, 2006). Algunos aislamientos de *Aspergillus* alcanzaron niveles altos de actividad EX, incluso mayores a la actividad que presentó el control positivo externo utilizado en este trabajo, *T. atroviride* LBM, un gran productor xilanolítico (Barchuk *et al.*, 2016).

Además de la actividad EX, en este trabajo se determinó la actividad BXL. Los sustratos de las enzimas BXLs son los xilooligómeros y moléculas de xilobiosa, ambos resultados de la hidrólisis del xilano (Shallom & Shoham, 2003). Por ello, es necesario la acción previa de las EX para hidrolizar el xilano del bagazo de caña de azúcar y obtener así los sustratos de las BXL. Contrariamente a las EXs, las cuales siempre son secretadas al medio externo, las BXLs pueden ser extracelulares o estar unidas a la célula dependiendo del microorganismo y del medio de cultivo (Knob *et al.*, 2010). Los hongos filamentosos producen BXL las cuales permanecen asociadas al micelio durante estadios tempranos de crecimiento y se pueden liberar más tarde al medio de cultivo ya sea por secreción verdadera o como resultado de una lisis celular (Knob *et al.*, 2010). Por esta razón, se determinó la actividad BXL en dos instancias, el día de mayor actividad EX y dos días posteriores sin distinguir diferencias significativas. Al igual que sucedió con la actividad EX, los valores de la actividad BXL variaron entre los aislamientos, de *Aspergillus* y no hubo relación con los valores de actividad EX; es decir, que aislamientos que mostraron valores muy altos de actividad EX no siempre mostraron valores altos de

actividad BXL. Estos resultados exponen la importancia de un estudio de *screening* antes de elegir aquellos aislamientos promisorios para utilizarse en cualquier aplicación biotecnológica.

Durante el *screening* también se decidió determinar la actividad proteolítica debido a que las actividades enzimáticas pueden verse afectadas por la coproducción de enzimas proteolíticas que tengan como blanco de acción las enzimas de interés, en nuestro caso, las xilanasas (Oliveira *et al.*, 2006). Este estudio abarcó el análisis de la actividad caseína-proteasa a pH neutro y gelatina-proteasa a pH ácido en placas de caseína de leche descremada y gelatina, respectivamente. La zona de hidrólisis producida en las placas de leche descremada puede relacionarse con la cantidad de caseína-proteasas producidas por el hongo (Vijayaraghavan & Vincent, 2013). La técnica de placas en gelatina se realizó para contemplar aquellas proteasas que actúan a pH ácido cercano a 5, debido a que la actividad EX y BXL es óptima en un rango de pH entre 4 y 6 (Beg *et al.*, 2001; Burlacu *et al.*, 2016a).

Las zonas de proteólisis se detectaron en ambas técnicas, tanto en los ensayos con caseína como en los ensayos con gelatina. En el primer caso, los halos se detectaron más fácilmente porque fueron nítidos y bien definidos. En el caso de la actividad gelatina-proteasa, los halos resultaron difusos y complicados de fotografiar. Vijayaraghavan & Vincent (2013) utilizaron el reactivo Bromocresol Green (BCG) en su trabajo de *screening* de proteasas para visualizar aquellos halos de hidrólisis angostos. Por lo que en este trabajo se consideró utilizar el reactivo Bradford en el ensayo de placas de gelatina con el objetivo de visualizar mejor las zonas difusas de los halos. El colorante Coomassie presente en el reactivo Bradford se une a las moléculas de proteínas sin hidrolizar (Bradford, 1976) coloreando esta área de un azul-celeste. En contraste, el colorante no pudo unirse a las proteínas degradadas correspondientes a los halos de degradación quedando como zonas blancas distintivas. Esta metodología para la detección de enzimas gelatina-proteasas empleando el colorante Coomassie se reporta por primera vez en este trabajo y demostró ser una técnica útil para mejorar la técnica de detección de enzimas extracelulares proteolíticas.

Los sobrenadantes de todos los aislamientos presentaron actividad proteolítica en los ensayos de caseína y gelatina mostrando diferentes halos de degradación, indicando

que distintos aislamientos tienen comportamiento único lo que resalta nuevamente la necesidad de buscar y evaluar nuevos hongos para encontrar enzimas novedosas. También se observó que los sobrenadantes incubados a pH ácido presentaron mayor actividad proteolítica que cuando se incubaron a pH neutro. Pel *et al.* (2007) reportaron que en el hongo *A. niger* CBS 513.88 las enzimas proteasas son activas a pH bajos.

Con el fin de encontrar los aislamientos más promisorios; es decir, aquellos con mayor actividad EX y BXL y menor actividad proteolítica, estas actividades enzimáticas se evaluaron mediante dos análisis multivariados, un PCA y un análisis de conglomerados.

El PCA cuenta con dos gráficos que ayudan a la mejor interpretación de los resultados; por un lado, un mapa de las observaciones (aislamientos) y cómo estas se sitúan una respecto a otra en función de las variables; por otro lado, el gráfico de las variables muestra su influencia sobre las observaciones y su correlación (Nilsson *et al.*, 2016; Bohacz, 2017). Los CP1 y CP2 explicaron el 72 % de la variabilidad total de los resultados lo indicó que los CP representaron adecuadamente la relación entre los aislamientos y las variables (Balzarini *et al.*, 2015). De este análisis se logró identificar aquellos aislamientos con niveles similares de las actividades enzimáticas y diferenciarlos de otros con niveles diferentes. Asimismo, se identificó que la actividad EX registrada los días 10, 12 y 14, la actividad BXL y las actividades proteolíticas fueron las variables con mayor influencia sobre el posicionamiento de los aislamientos. Se distinguieron grupos de aislamientos bien diferenciados de otros, sin embargo, para discernir mejor todos los grupos formados se llevó a cabo un análisis de conglomerados, también llamado análisis de conglomerados. Los aislamientos se clasificaron en seis grupos homogéneos según sus niveles de actividades enzimáticas. Los aislamientos LBM 055 y LBM 134 formaron un grupo debido a sus niveles altos de actividad xilanolítica y niveles bajos de actividad proteolítica; por lo que estos dos son candidatos prometedores para llevar a cabo una hidrólisis eficiente del xilano presente en el bagazo de caña de azúcar.

En este análisis se formó otro grupo de aislamientos con actividades xilanolítica y proteolítica altas, dificultado su aplicación en la hidrólisis del bagazo. Sin embargo, estos pueden utilizarse con la adición de inhibidores proteolíticos para preservar las enzimas

xilanolíticas, aunque el costo de la producción enzimática aumentaría. Los aislamientos de los grupos restantes no son muy promisorios para la aplicación que se pretende en el presente trabajo ya que su actividad xilanolítica es menor y muchos presentan altos niveles de actividad proteolítica.

A pesar de que hay varios estudios sobre *screening* de microorganismos con capacidad xilanolítica (Burlacu *et al.*, 2016b; da Silva Menezes *et al.*, 2017; Dhiman & Mukherjee, 2017), este trabajo demuestra lo importante de una investigación exploratoria multivariada para discriminar satisfactoriamente hongos productores de enzimas xilanasas con nula o casi nula actividad proteolítica. Este *screening* sirvió para encontrar los aislamientos LBM 055 y LBM 134 como los mejores respecto a la actividad EX con actividad proteolítica casi nula.

6.2 Efecto de residuos lignocelulósicos sobre la actividad EX de los aislamientos más promisorios

En cualquier región donde la economía se basa en la industria agro-forestal, hay una enorme coproducción de residuos lignocelulósicos. En general, estos residuos contienen alrededor de 75 % de azúcares polisacáridos (Van Dyk & Pletschke, 2012) y pueden utilizarse para generar productos de valor agregado como enzimas. Este trabajo se enfocó en la producción de EX de los dos aislamientos más promisorios resultantes del *screening*, *Aspergillus* sp. LBM 055 y LBM 134, utilizando cuatro residuos lignocelulósicos producidos en grandes cantidades en el noreste argentino: bagazo de caña de azúcar, bagazo de mandioca, aserrín de pino y aserrín de eucaliptus (Uasuf & Hilbert, 2012). Pocos estudios reportaron la optimización de la actividad EX utilizando residuos lignocelulósicos. Este trabajo estudia por primera vez el efecto del bagazo de mandioca sobre la actividad EX en hongos *Aspergillus* bajo fermentación sumergida ya que esta metodología es el método más utilizado para producir enzimas comerciales (MacCabe *et al.*, 2002).

El crecimiento de hongos y su producción enzimática difiere según la disponibilidad de azúcares en el medio de cultivo. La expresión de enzimas xilanasas y celulasas es una respuesta dinámica al tipo y concentración de los azúcares disponibles y raramente se

expresa constitutivamente (Kumar & Naraian, 2019). Por este motivo es de suma importancia estudiar diferentes fuentes de carbono involucradas para inducir la producción de estas enzimas. Se han encontrado diversos inductores y represores de factores de transcripción producidos durante la degradación de la biomasa lignocelulósica que tienen efecto sobre las xilanasas y celulasas en hongos (Alazi & Ram, 2018).

Si bien los azúcares simples como la glucosa sirven para que el hongo produzca biomasa, su expresión de xilanasas y celulasas se reprime si en el medio de cultivo se encuentran este tipo de azúcares (Kumar & Naraian, 2019). Por otra parte, la expresión de estas enzimas se induce cuando en el medio de cultivo se encuentran presentes los azúcares complejos. En el caso de las xilanasas, el xilano es el sustrato natural que induce su expresión (Amore *et al.*, 2013; Kumar & Naraian, 2019). El xilano difiere en cantidad y composición según la fuente de origen del xilano. Las maderas duras como el aserrín de eucaliptus tienen más contenido de xilano y composición de grupos acetilos que las maderas suaves como el aserrín de pino las cuales contienen más contenido de mananos y lignina. Los residuos agroindustriales como los bagazos de caña de azúcar y mandioca contienen mayor contenido de xilano que las maderas duras (Beg *et al.*, 2001; Van Dik & Pletschke, 2012). Además de conocer la cantidad de xilano, también importa conocer el tipo de xilano que se encuentran en los sustratos lignocelulósicos que se utilizan como fuentes de carbono. Los xilanos también difieren en base a la naturaleza de sus sustituyentes. La complejidad de los xilanos crece desde xilanos lineales a altamente sustituidos; los arabinoxilanos son los xilanos con menor cantidad de sustituyentes facilitando su hidrólisis (Motta *et al.*, 2013; Burlacu *et al.*, 2016a). Cerca 30 % de la composición del bagazo de caña de azúcar es arabinoxilano (Van Dik & Pletschke, 2012), el xilano más fácil de hidrolizar, esto explicaría que los aislamientos LBM 055 y LBM 134 hayan producido mayor cantidad de enzimas EX cuando este bagazo fue el residuo utilizado como fuente de carbono. Los productos de la degradación del xilano, xilo-oligosacáridos y xilosas) ingresan a la célula y activan la transcripción de genes de xilanasas de expresión regulada (Khucharoenphaisan *et al.*, 2010).

Además, el bagazo de caña de mandioca es muy rico en almidón (Pandey *et al.*, 2000) como lo demostró el análisis de caracterización de este trabajo, por lo que los

microorganismos pueden atacar fácilmente este bagazo sin ningún tratamiento previo. Esto explica que los aislamientos LBM 055 y LBM 134 haya degradado este residuo con mayor facilidad aumentando su biomasa (datos no mostrados) e inducido la producción de celulasas y xilanasas (Schneider *et al.*, 2016).

Entre los aserrines de eucaliptus y pino, los aislamientos LBM 055 y LBM 134 presentaron mayor actividad EX cuando crecieron con el aserrín de eucaliptus debido a que la composición de xilano en el eucaliptus es mayor que en el pino (Barbosa *et al.*, 2018). Además, la presencia de grupos acetilo en el eucaliptus lo hace más soluble en agua y más accesible para las enzimas EX.

Otra razón que justifica la diferencia de producción de enzimas EX registrada en los aislamientos LBM 055 y LBM 134 cuando crecieron en los distintos residuos es el índice de recalcitrancia de los residuos lignocelulósicos. El índice de recalcitrancia refleja el grado de dificultad de degradar un sustrato; índices altos indican mayor dificultad de degradación (Wei *et al.*, 2009; Van Dik & Pletschke, 2012). Las maderas suaves tienen un índice de recalcitrancia de 0,87; las maderas duras, de 0,56; los residuos agroindustriales, de 0,25 a 0,45 (Wei *et al.*, 2009). Estos índices también explicarían que los bagazos de caña de azúcar y mandioca fueran los residuos que mejor soportaron la actividad EX en los aislamientos LBM 055 y LBM 134.

6.3 Identificación polifásica del aislamiento *Aspergillus* sp. LBM 134

Identificar especies de *Aspergillus* de la sección *Nigri* no es una tarea fácil por el gran parecido fenotípico que existe entre ellos, lo que demanda emplear distintas herramientas para identificarlos correctamente. En este trabajo se intentó identificar el aislamiento *Aspergillus* sp. LBM 134 utilizando primeramente métodos moleculares y bioinformáticos mediante la construcción de árboles. Tras la imposibilidad de realizar una identificación a nivel de especie mediante estos métodos básicos, se realizó una identificación polifásica la cual identificó al aislamiento LBM 134 como *A. niger*.

Dentro de la sección *Nigri*, *A. niger* se ubica en el clado *A. niger* junto con *A. welwitschiae* (*A. awamori sensu* Perrone), *A. lacticoffeatus* y *A. foetidus* (subclado *A.*

niger) y *A. tubingensis*, *A. piperis*, *A. vadensis*, *A. costaricaensis*, *A. acidus* y *A. neoniger* (subclado *A. tubigenensis*) (Varga *et al.*, 2011; Samson *et al.*, 2014).

Los árboles construidos mediante los métodos NJ y ML agruparon las especies tipo CBS en los clados *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. heteromorphus*, *A. homomorphus* y *A. aculeatus* reflejando la filogenia para el grupo descrito por autores de referencia como Varga *et al.* (2011) y Samson *et al.* (2014). En los árboles obtenidos se corroboró el agrupamiento de las especies pertenecientes al subclado *A. niger* dentro del cual se ubicó el aislamiento LBM 134, verificando que este pertenece al subclado *A. niger*. También, cabe destacar que emplear cepas tipo de la colección de renombre mundial CBS, asegura que los árboles se hayan construido con secuencias verificadas (Fungaro *et al.*, 2017).

Por otro lado, utilizar la secuencia de ADN ribosómico ITS, aceptado como código de barras de los hongos, no permite realizar una identificación a nivel de especie entre especies emparentadas muy cercanas, por lo que se recomienda emplear un segundo marcador molecular. Según Samson *et al.* (2014), utilizar Bt, CAM, Tef o RPB2 es esencial para lograr una identificación adecuada a nivel de especie. Los marcadores RPB2 y Tef no son muy fáciles de amplificar y sus secuencias no están descritas para todos los *Aspergillus* en las bases de datos. Bt es más fácil de amplificar y casi todas las especies de la sección *Nigri* pueden ser identificados mediante este marcador, sin poder discriminar entre las secuencias de Bt de *A. niger* y *A. lacticoffeatus*. Además, existe el riesgo de amplificar genes parálogos (Koonin, 2005) de BT debido a la variación de intrones del gen (Peterson, 2008; Hubka & Kolarik, 2012; Samson *et al.*, 2014). Lo mismo ocurre con CAM, sin embargo, la facilidad de amplificación que posee y la capacidad que tiene de distinguir entre todas las especies de *Aspergillus*, propició posicionar a CAM como segundo marcador temporal de *Aspergillus* (Samson *et al.*, 2014).

Los árboles construidos con las secuencias concatenadas de ITS, CAM y Bt permitieron separar a *A. welwitschiae* del grupo conformado por *A. lacticoffeatus*, *A. foetidus*, *A. niger* y *Aspergillus* sp. LBM 134, descartando que el aislamiento LBM 134 se tratase de *A. welwitschiae*. *A. welwitschiae* se consideró durante mucho tiempo sinónimo de *A. niger*, sin embargo, actualmente se acepta que ambas son especies crípticas (Perrone *et al.*, 2011) en proceso de especiación y que para diferenciarlas es

necesario utilizar más de un marcador (Samson *et al.*, 2014, von Hertwig *et al.*, 2018). Por otro lado, al igual que *A. awamori* y *A. welwitschiae*, la denominación *A. foetidus* está en desuso y el nombre correcto que debe emplearse es *A. niger* (Samson *et al.*, 2004; Varga *et al.*, 2011).

La especie *A. lacticoffeatus*, descrita por primera vez en 2004 por Frisvad y Samson, se presenta en la lista de especies aceptadas del género *Aspergillus* presentada en 2014 por Samson *et al.* Sin embargo, estudios taxonómicos como el de Varga *et al.* (2011), de Vries *et al.* (2017) y Vesth *et al.* (2018) y el de crecimiento y perfiles hidrolíticos de Meijer *et al.* (2011) consideran a *A. lacticoffeatus* sinónimo de *A. niger*. A su vez, un trabajo realizado con cepas de *A. lacticoffeatus* aisladas de granos de café en Venezuela e Indonesia (Frisvad & Samson, 2004) sugiere que probablemente se trate de una cepa mutante de *A. niger*.

No hay duda de la utilidad que ofrecen las técnicas moleculares en la investigación científica básica y aplicada. No obstante, la controversia en cuanto a la taxonomía de *Aspergillus* y géneros cercanos (como *Penicillium*), llevó a que se recomendara emplear criterios diferentes que sumen a una identificación más precisa e inequívoca (Samson *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2011). La información que ofrece el análisis de marcadores moleculares debe combinarse con perfiles de extrolitos, caracteres macro y micro morfológicos y fisiológicos a lo que se denomina una identificación polifásica (Samson *et al.*, 2014).

La macro-morfología del aislamiento LBM 134 se evaluó en los medios MEA y CYA como es recomendado por la Comisión Internacional de *Penicillium* y *Aspergillus*. En estos medios, el aislamiento LBM 134 se desarrolló produciendo conidios negros y marrón oscuro que coincide con los de *A. niger* (Abarca, 2000), y contrasta con los conidios marrón claro que produce *A. lacticoffeatus* (Samson *et al.*, 2004; Cabañes & Bragulat, 2018), el color del reverso de las placas es color crema en las dos especies lo que coincide con el color que presentó el aislamiento. La comparación del color de los conidios permite afirmar que el aislamiento en estudio se trata de *A. niger* y no de *A. lacticoffeatus*. Por otro lado, la producción de ácidos evaluado en medio CREA fue positiva y coincide con lo reportado para las dos especies (*A. niger* y *A. lacticoffeatus*)

por lo que no aporta relevancia en la identificación. Lo mismo ocurre con el resultado negativo de la prueba del reactivo de Ehrlich para detectar ácido ciclopiazónico.

En cuanto a la micro-morfología, *A. niger* presenta conidióforos hialinos con estípites más largos que los conidióforos naranjas de *A. lacticoffeatus*; la ornamentación de los conidios observados en el aislamiento LBM 134 es menos suave que los producidos por *A. lacticoffeatus* (Frisvad & Samson, 2004). Nuevamente, las mediciones y observaciones de la micro-morfología obtenidas para el aislamiento LBM 134 se asemejan a los de *A. niger*, lo que confirma que el aislamiento LBM 134 pertenece a la especie *A. niger*. Una característica muy interesante que se observó en el aislamiento LBM 134 es la formación de esclerocios. Los esclerocios son estructuras consideradas necesarias en hongos con capacidad de reproducirse sexualmente y no hay trabajos que reporten que *A. lacticoffeatus* produce este tipo de estructuras. En cambio, la formación de esclerocios en *A. niger* se cita en cultivos de CYA donde se adicionan partes de plantas como trozos de frutas o arroz para inducir su formación (Frisvad *et al.*, 2014).

Emplear *software online* para identificar especies permite verificar los resultados obtenidos en el laboratorio al mismo tiempo que quita subjetividad a la hora de poner peso a los criterios empleados en la identificación. El servicio *Polyphasic Identification* del Instituto de Biodiversidad Fúngica Westerdijk permitió corroborar que LBM 134 se trata de un aislamiento perteneciente a la especie *A. niger*. No obstante, la especie arrojada por el software fue *A. phoenisis*, denominación rechazada sobre la especie conservada *A. niger* (Frisvad *et al.*, 1990; Kozakiewicz *et al.*, 1992). Este hecho recalca la importancia de un análisis crítico sobre las herramientas bioinformáticas que se encuentran a disposición.

6.4 Efecto de fuentes de nitrógeno y variables físicas sobre la actividad EX de *A. niger* LBM 134

La producción exitosa de enzimas hidrolíticas en general en hongos filamentosos requiere del estudio de la optimización de varios factores como fuentes de carbono, de nitrógeno, concentración de inóculo y variables físicas (Kappor *et al.*, 2008; Izarra *et al.*, 2010). Por ello, en este trabajo se analizó cuán significativo fue la influencia de factores

nutricionales como fuentes de nitrógeno y variables de incubación sobre la actividad EX de *A. niger* LBM 134.

Las fuentes de nitrógeno que fueron significativas sobre la actividad EX de *A. niger* LBM 134 fueron la peptona, extracto de levadura y tripteína bacteriológica en el caso del medio con bagazo de caña de azúcar. En el caso del medio con bagazo de mandioca, las fuentes de nitrógenos significativas sobre la actividad EX fueron la urea y la peptona.

Se ha reportado que la peptona es una de las mejores fuentes de nitrógeno para la producción de xilanasas (Kappor *et al.*, 2008). Además, la peptona y el extracto de levadura proveen al hongo de aminoácidos y vitaminas que este utiliza para crecer e inducir enzimas extracelulares como las EXs. Conjuntamente, estas fuentes de nitrógeno liberan grupos NH_4^+ los cuales estimulan el crecimiento fúngico y el incremento del rendimiento enzimático ya que estos grupos NH_4^+ tienden a inhibir proteasas (Subramaniyan *et al.*, 2001). La concentración de estas fuentes de nitrógeno es también importante porque la peptona y el extracto de levadura a concentraciones altas pueden actuar como inductores de proteasas; en el caso de la peptona, en concentraciones mayores a 20 gL^{-1} y en el caso del extracto de levadura en concentraciones mayores a 5 gL^{-1} (Subramaniyan *et al.*, 2001; Gomaa *et al.*, 2013; Abdelwahed *et al.*, 2014)

La actividad EX de *A. niger* LBM 134 aumentó mediante la optimización de las fuentes de nitrógeno correspondientes en ambos medios de cultivo. En el medio con bagazo de caña de azúcar, la optimización de las concentraciones de peptona, extracto de levadura y tripteína bacteriológica aumentó la actividad EX de $48,37 \text{ UmL}^{-1}$ a $63,91 \text{ UmL}^{-1}$. En el medio de bagazo de mandioca, la optimización de las concentraciones de peptona y urea aumentó la actividad EX aumentó más del doble, de $59,67 \text{ UmL}^{-1}$ a $160,58 \text{ UmL}^{-1}$.

Además, la actividad EX de *A. niger* LBM 134 en medio con bagazo de caña de azúcar aumentó el doble mediante la optimización de la concentración del inóculo y de las variables físicas, de $63,91 \text{ UmL}^{-1}$ a 110 UmL^{-1} . El tamaño óptimo de bagazo de caña de azúcar fue 40 mesh y el pH óptimo de incubación fue 4,5 y 5,5; alcanzar en el medio un pH 4,5 se requiere de la adición de un *buffer*. Por eso, se eligió el pH 5,5 para continuar con los siguientes experimentos ya que no requiere de la adición de ningún *buffer*. El pH es una variable física que tiene importancia significativa sobre la producción enzimática y la bioconversión microbiana (Pardo & Forchiassin, 1999; Adav *et al.*, 2010).

Trabajos anteriores han reportado una influencia significativa de la concentración del inóculo inicial sobre la morfología y la producción de xilanasas en hongos del género *Aspergillus* (Izarra *et al.*, 2010). En el medio con bagazo de caña de azúcar, las concentraciones de esporas 10^6mL^{-1} y 10^7mL^{-1} influenciaron significativamente sobre la actividad EX de *A. niger* LBM 134, por lo que se eligió 10^6mL^{-1} por ser la menor concentración de esporas. La temperatura óptima de incubación fue $24\text{ }^\circ\text{C}$ en presencia de luz, correspondiéndose a la temperatura a la cual se aisló *A. niger* LBM 134.

Contrariamente a lo sucedido con *A. niger* LBM 134 crecido en medio con bagazo de caña de azúcar, en el medio con bagazo de mandioca, la concentración de inóculo y las variables físicas óptimas fueron las mismas de los experimentos anteriores. El tamaño de partícula de bagazo de mandioca fue 40 mesh, el pH óptimo de incubación fue 5,5 y la concentración óptima de esporas fue 10^7mL^{-1} . La temperatura óptima de incubación fue $28\text{ }^\circ\text{C}$ en ausencia de luz. Si bien se encontraron diferencias respecto a las condiciones físicas de inoculación e incubación del hongo *A. niger* LBM 134 en los dos medios optimizados, las condiciones óptimas estuvieron cercanas a la bibliografía (Sheth *et al.*, 2018). La temperatura y el pH de incubación para una mayor producción de xilanasas se encuentran en un rango entre 25 y $30\text{ }^\circ\text{C}$ y pH 3 a 6 (Bhardwaj *et al.*, 2017). La concentración de inóculo óptima también se encuentra dentro del rango reportado como óptimo para la producción de enzimas hidrolíticas como xilanasas y celulasas (Izarra *et al.*, 2010).

En este trabajo se evitó comparar los niveles de actividad EX entre diferentes cepas de especies del género *Aspergillus* y otros hongos debido a la diferencia de las condiciones de incubación, componentes del medio de cultivo y residuos utilizados en los distintos trabajos que se pueden encontrar en la bibliografía. También, la diferencia de las condiciones de ensayo de la actividad EX de los trabajos encontrados dificulta una comparación directa entre los valores de actividad EX reportados en estos con los que se reporta en el presente trabajo.

A partir del estudio de costo/beneficio se puede afirmar que producir EXs a partir de *A. niger* LBM 134 incubado con los bagazos es 20 veces más económico que producir estas enzimas con xilano comercial. Además de formular dos medios de cultivo eficientes y baratos para la producción de proteínas con actividad EX, se añadió valor

agregado a estos dos bagazos, de caña de azúcar y de mandioca, generados por las industrias del noreste argentino.

6.5 Caracterización de las enzimas con actividad EX en los sobrenadantes optimizados

Para obtener el rendimiento máximo de la actividad catalítica de las EX, es necesario optimizar algunos parámetros que influyen significativamente sobre esta como ser la temperatura y el pH (Dhiman *et al.*, 2008).

Toda enzima tiene una temperatura óptima de actuación, por debajo o por encima de esta temperatura, la enzima ralentiza su velocidad de reacción enzimática. El aumento en la velocidad de reacción se produce porque con temperaturas más altas, existen más moléculas de sustrato con suficiente energía para reaccionar; la disminución de la velocidad de la reacción es debida a la desnaturalización de la enzima (Lehninger *et al.*, 2006). La mayoría de las proteínas globulares se desnaturalizan por encima de los 60 a 70 °C, similar al comportamiento mostrado por las EX en ambos sobrenadantes optimizados, donde la actividad fue óptima a 50 °C y por encima de esta temperatura, la actividad EX decayó dramáticamente.

La actividad enzimática también se regula por el pH del medio donde se encuentren las enzimas. El pH óptimo o intervalo de pH de cada enzima es diferente y a variar, la conformación de la enzima también lo hace, produciéndose cambios en el estado de ionización de grupos del sitio activo y puede llegar a ser no funcional (Lehninger *et al.*, 2006).

La actividad enzimática de las EX en ambos sobrenadantes mostró una curva de actuación de “tipo pico”. Esto significa que las EX necesitan un control riguroso del pH del medio donde se encuentran ya que el 100 % de su actividad se encuentra en un pequeño intervalo de pH, 4,8 a 5 (Lehninger *et al.*, 2006).

El comportamiento de la EX en ambos sobrenadantes optimizados de *A. niger* LBM 134 fue de tipo mesófilo, la actividad óptima resultó ocurrió a una temperatura media, 50 °C, y a pH cercano al neutro. Los hallazgos obtenidos en este trabajo están en concordancia con lo encontrado en varios trabajos de la bibliografía donde se reporta que la catálisis óptima de EX fúngicas ocurre entre los 40 y 60 °C y en un rango de pH

entre 4 y 7 (Wong *et al.*, 1988; Kulkarni *et al.*, 1999; Cuyvers *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2015; Cayetano-Cruz *et al.*, 2016; Barchuk, 2017; Dhiman & Mukherjee, 2018).

Braun & Rodrigues (1993) observaron que en el hongo *Erwinia chrysanthemi*, la actividad EX fue óptima a 55 °C y pH 5,5. Fernández-Espinar *et al.* (1994) observaron que la actividad EX en el hongo *A. nidulans* presentó su catálisis óptima a pH 6,0. En *T. longibrachiatum*, la actividad EX fue máxima entre 45 y 50 °C dentro de un rango de pH entre 5 y 6 (Royer & Nakas, 1989; Chen *et al.*, 1997). Souza-Querido *et al.* (2006) observaron en el ascomiceto *Penicillium expansum* su actividad EX máxima a 40°C y pH 5,5. Abirami *et al.* (2011) encontraron la actividad EX óptima en *Neurospora crassa* a 37 °C y pH 5,5. Díaz *et al.* (2015) hallaron que la actividad EX del basidiomicete *Irpex lacteus* BAFC 1168 fue óptima a 43 °C y pH 5,6. Barchuk (2017) reportó que la actividad EX de *T. atroviride* LBM 117 fue óptima dentro de un rango entre 40 y 60 °C y a pH 4.

El pH y la temperatura afectan en gran medida a la estabilidad enzimática, por lo que su estudio es muy importante para lograr una aplicación eficiente, en este caso, en la hidrólisis de residuos agroindustriales locales. Por este motivo es que en este trabajo se evaluó el efecto de la temperatura y del pH sobre la estabilidad de la actividad EX de *A. niger* LBM 134 a lo largo del tiempo. En ambos sobrenadantes optimizados, la actividad EX fue estable, manteniéndose por encima del 50 % de la actividad residual luego de las 24 h a las temperaturas más suaves, 4 y 30 °C y a pH cercanos a la neutralidad, pH 5, 6 y 7. Sin embargo, a temperaturas más altas, 40 y 50 °C, la actividad EX luego de las 24 h caía por debajo del 50 % de la actividad residual. Se debe tener en cuenta que la estabilidad enzimática de las EX se evaluó en el extracto enzimático sin purificar. Por tanto, el decaimiento de la estabilidad enzimática podría no deberse únicamente al efecto de la temperatura sobre las EX, sino por la actuación de otros factores presentes en los sobrenadantes. Estos factores llamados inhibidores pueden disminuir o incluso anular la velocidad de reacción de la actividad enzimática. Un ejemplo son enzimas con actividad proteolítica llamadas comúnmente proteasas, las cuales metabolizarían las xilanasas, afectando la estabilidad enzimática de las mismas (Kulkarni *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2006). A pesar de haber elegido en un principio al aislamiento con la menor actividad proteolítica, las proteasas pueden afectar significativamente la estabilidad enzimática de las enzimas dianas. Este hecho reitera la importancia de haber

realizado un *screening* integral donde se evaluó no solamente la actividad enzimática deseada sino también los factores que pudieran inhibirla como la presencia de proteasas.

En la literatura se han descrito varios métodos para describir la detección de actividad EX en geles (Kluepfel *et al.*, 1992; Barchuk *et al.*, 2016). En este trabajo se detectó la actividad EX de varias isoenzimas presentes en los sobrenadantes optimizados de *A. niger* LBM 134 a través de la aparición de bandas claras contra el rojo brillante luego de teñir geles de poliacrilamida con el colorante rojo Congo. Esta técnica dio indicios de diferentes perfiles de actividad EX entre ambos sobrenadantes optimizados y entre estos y los sobrenadantes de los medios controles donde no se pudo distinguir presencia alguna de isoenzima con actividad EX.

En ambos sobrenadantes pertenecientes al hongo crecido con los bagazos se pudo detectar la presencia de tres isoenzimas con actividad EX. Estos perfiles de actividad EX sugieren que cultivar a *A. niger* LBM 134 en los bagazos de caña de azúcar y de mandioca sin ningún tratamiento previo produce un coctel enzimático que aumenta la habilidad de la degradación de la hemicelulosa, particularmente del xilano.

Además, en los perfiles de actividad EX de los sobrenadantes que provenían de medio conteniendo bagazo de mandioca se observó la presencia de isoenzimas con menor movilidad electroforética. Estas bandas podrían corresponder a isoenzimas con actividad EX, aunque en los análisis secretómicos no se detectó enzimas con actividad EX de masa molecular semejante a lo observado en los geles de plata. Asimismo, estas bandas podrían corresponder a isoenzimas con actividad EX de movilidad electroforética mayor, pero con eventos de glicosilación. Estos fenómenos de glicosilación son recurrentes en las EX y pueden modificar notablemente su peso molecular aparente y, por lo tanto, su localización en los geles de poliacrilamida (Mura Escorche, 2016).

6.6 Caracterización de los cócteles enzimáticos de los sobrenadantes optimizados

Se sabe que la composición del secretoma de cualquier hongo filamentoso varía según las características biológicas del organismo y cambia continuamente en respuesta a las condiciones ambientales como por ejemplo crecer en diferentes biomásas

lignocelulósicas (Lopes *et al.*, 2018). Por otra parte, la biomasa lignocelulósica es la mayor fuente de polisacáridos por lo que su degradación enzimática en azúcares fermentables ha sido foco de estudio desde hace varios años debido a su potencial uso como una energía alternativa. Para llevar a cabo la bioconversión a azúcares fermentables de manera eficaz, es necesaria una batería enzimática muy amplia. Los hongos del género *Aspergillus* son reconocidos por producir una gran variedad de enzimas extracelulares como las xilanasas, celulasas, pectinasas, amilasas, proteasas, entre otras relacionadas a la degradación de la biomasa (Tsang *et al.*, 2009; Adav *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2011; Saykhedkar *et al.*, 2012; Borin *et al.*, 2015; Schneider *et al.*, 2016).

Sabiendo que el hongo con el que se trabajó en esta tesis pertenece a la especie *A. niger*, en esta etapa del trabajo se focalizó en caracterizar las enzimas involucradas en la biodegradación de los componentes de la biomasa lignocelulósica, particularmente de los residuos utilizados en la optimización de los medios de cultivo, bagazos de caña de azúcar y de mandioca además de caracterizar las EX producidas por *A. niger* en los sobrenadantes optimizados.

El análisis en geles de proteínas totales secretadas mostró diferencias en la cantidad de proteínas, presentando mayor cantidad los sobrenadantes optimizados en un amplio rango de masas moleculares. En ambos sobrenadantes optimizados se observaron bandas correspondientes a las xilanasas identificadas en los respectivos secretomas, una BXL de 20 kDa y dos EX de 25 y 35,5 kDa. También se observó una banda que correspondería a una glucoamilasa de 68,3 kDa, aunque en mayor cantidad en el sobrenadante de bagazo de mandioca demostrada con una tinción más intensa en el gel de plata. En los sobrenadantes de mandioca también se observó una banda correspondiente a endo-1,3- β -glucosidasa de 46,3 kDa encontrada en el respectivo secretoma.

Si bien no se distinguieron nítidamente más proteínas en el gel, cuando se analizó las proteínas secretadas en los secretomas del hongo crecido en los medios optimizados y sus respectivos controles, el número de enzimas identificadas fue muy alto, demostrando la especificidad y utilidad de esta técnica. La especie *A. niger* secreta proteínas en grandes cantidades mediante transporte de proteínas vía retículo

endoplasmático, aparato de Golgi y vesículas hacia membrana celular (Adav *et al.*, 2010). En los últimos 10 años se han reportado varios estudios de secretomas de *A. niger* en medios sintéticos siendo necesario aún estudios secretómicos de este hongo y otros crecidos solo con residuos lignocelulósicos como única fuente de carbono para conocer e identificar las enzimas involucradas en la bioconversión de este tipo de sustratos (Adav *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2016). Este trabajo describe los secretomas de *A. niger* LBM 134 crecido en dos residuos lignocelulósicos como únicas fuentes de carbono, bagazos de caña de azúcar y bagazo de mandioca, este último reportado por primera vez en la bibliografía.

Se identificaron en total 166 proteínas diferentes en los secretomas de *A. niger* LBM 134, tres de las cuales fueron intracelulares debido quizás a una lisis celular durante la división celular o muerte celular al procesamiento de la muestra (Kersten & Kirk, 1987; Adav *et al.*, 2010). Las masas moleculares de la mayoría de las proteínas identificadas en los cuatro secretomas se concentró entre los 25 kDa y 70 kDa y los puntos isoeléctricos, entre 4 y 5, coincidiendo con las masas moleculares y puntos isoeléctricos de las enzimas hidrolíticas (Adav *et al.*, 2010).

Las enzimas que degradan la biomasa se clasifican en familias como las GH, CE y PL (Lombard *et al.*, 2014) que conjuntamente se llaman CAZy. Se tratan de enzimas que actúan sobre carbohidratos, sobre los enlaces glicosídicos entre dos o más carbohidratos y entre un carbohidrato y un motivo no carbohidrato (www.cazy.org). Los hongos filamentosos secretan grandes cantidades de CAZy solo en presencia de polisacáridos vegetales sobre los que actúan específicamente (Adav *et al.*, 2010). La mayoría de las proteínas identificadas en los secretomas de *A. niger* LBM 134 crecido en los medios optimizados con bagazo de caña de azúcar y de mandioca fueron enzimas CAZy, sugiriendo que los genes relacionados a la bioconversión se transcribieron durante el cultivo del hongo. Estas enzimas fueron diferentes respecto al tipo y cantidad relativa en los secretomas optimizados con los residuos agro-industriales lo que indica que la expresión de las proteínas puede variar ampliamente según las fuentes de carbono que se encuentren en el medio de cultivo (Allen & Roche, 1989; Schneider *et al.*, 2016).

Las enzimas CAZy secretadas por el hongo *A. niger* LBM 134 son importantes en relación a las estrategias de bioconversión a bioetanol, identificándose celulasas,

xilanasas, hemicelulasas, amilasas, pectinasas, entre otras. Las mismas fueron representantes de 39 familias GH, 4 familias CE y 2 familias PL reflejando la diversidad enzimática del hongo estudiado. Esta diversidad se manifestó también según el residuo utilizado ya que se encontraron enzimas y cantidades diferentes en cada secretoma analizado.

La caracterización de los secretomas de *A. niger* LBM 134 reveló que el bagazo de caña de azúcar indujo más número y cantidad de proteínas con actividad xilanolítica y mayor número de enzimas hemicelulolíticas mientras que, el bagazo de mandioca indujo más cantidad de proteínas con actividad celulasa, amilasa y pectinasa. La mayor cantidad de xilanasas en el secretoma del hongo crecido en bagazo de caña de azúcar se explica por la composición de este sustrato complejo llevado a cabo en este estudio. El bagazo de caña de azúcar contiene 10 % más de xilano y hemicelulosa que el bagazo de mandioca. Además, la parte más hidrosoluble y accesible de la pared celular del bagazo de caña de azúcar es el xilano, arabinoxilano en este caso (Borin *et al.*, 2015). Por tanto, el hongo secreta enzimas xilanasas apenas entra en contacto con este sustrato.

Asimismo, la mayor cantidad de celulasas y amilasas en el secretoma del hongo crecido en bagazo de mandioca se explica con el 30 % de polímeros de glucosas mayor respecto al bagazo de caña de azúcar.

La actividad **celulasa**, EG, BGL y CBH, presentó niveles altos en ambos sobrenadantes optimizados coincidiendo con los datos secretómicos; particularmente, en los sobrenadantes del medio optimizado con bagazo de mandioca donde los niveles de celulasas son mayores, similar a los datos del secretoma del hongo crecido en este medio optimizado.

Este perfil de actividad enzimática sugiere que cultivar a *A. niger* LBM 134 en bagazo de mandioca sin ningún tratamiento previo produce un coctel enzimático rico en celulasas; lo que aumenta la habilidad de degradación de la celulosa. Asimismo, la identificación de BGL pertenecientes a las familias GH 1, GH 3 y GH 5 en proporciones altas es una característica destacada del coctel enzimático producido por *A. niger* LBM 134 ya que muchos cocteles enzimáticos comerciales, inclusive los del hongo *T. reesei*, se suplementan necesariamente con enzimas BGL exógenas para la hidrólisis de sustratos complejos (Singhania *et al.*, 2013).

Una gran parte de este trabajo se enfocó en la optimización de **xilanasas** a partir de *A. niger* LBM 134, en esta parte del estudio se confirmó dicha optimización ya que se identificó grandes cantidades de xilanasas, EX y BXL, tanto a partir de los datos secretómicos como de sus actividades enzimáticas determinadas en los sobrenadantes optimizados con bagazo de caña de azúcar y de mandioca. Particularmente, en el secretoma del hongo crecido en bagazo de caña de azúcar se identificó en mayor cantidad una EX que actúa sobre la cadena principal del xilano perteneciente a la familia GH 10 y BXLs de la familia GH 3; datos que se corroboraron con los altos niveles de actividad EX y BXL y que demostraron la excelente *performance* xilanólítica de *A. niger* LBM 134.

La alta heterogeneidad del xilano demanda enzimas accesorias para su completa hidrólisis, estas son las α -L-arabinofuranosidasas, β -glucuronidasas, acetil esterasas y feruloil esterasas (Knob *et al.*, 2010; Gong *et al.*, 2013; Kumar & Naraian, 2019). Todas estas enzimas se encontraron en el secretoma del hongo crecido en bagazo de caña de azúcar en altas proporciones: α -L-arabinofuranosidasa de la familia GH 62, feruloil esterasas de la familia CE 1, esterasas de la familia CE 5 y β -glucuronidasas de la familia GH 79. La completa degradación del arabinoxilano (característico del bagazo de caña de azúcar) requiere de la presencia de α -L-arabinofuranosidasas, enzimas que se identificaron en altas cantidades en el secretoma de *A. niger* LBM 134 crecido en este bagazo. El rol clave de estas enzimas se da en la hidrólisis de los enlaces covalentes entre la arabinosa y la xilosa (Andlar *et al.*, 2018).

El análisis de este secretoma concuerda con lo hallado en la bibliografía donde se reporta a *A. niger* como productor de feruloil esterasas (EC 3.1.1.73) que pertenecen a las hidrolasas éster carboxílicos y son capaces de hidrolizar uniones ferúlicas en las paredes celulares de las plantas, facilitando el acceso de las enzimas que degradan encargadas de degradar el esqueleto principal carbonado (Adav *et al.*, 2010).

Otras xilanasas identificadas en los secretomas fueron enzimas con actividad α -L-arabinofuranosidasa y β -xilosidasa pertenecientes a la familia GH 43, al contar con dominios catalíticos diferentes se las categorizan como enzimas multifuncionales (Borin *et al.*, 2015). Estas enzimas además de degradar eficientemente al xilano, componente

principal de la hemicelulosa, ayudan a disminuir la recalcitrancia de la biomasa del material lignocelulósico (Schneider *et al.*, 2016).

Si bien en ambos secretomas se identificó xilanasas, en el proveniente de bagazo de caña de azúcar, las proporciones fueron mucho mayores, la EX de la familia GH 10 se encontró en una cantidad 250 veces mayor que en el secretoma del bagazo de mandioca. Sin embargo, este dato en particular no se confirma del todo con la validación del secretoma. Esto se puede deber a que los mecanismos de regulación de la transcripción de las xilanasas son diversos según el tipo de estímulos. Así, esta regulación puede ocurrir a nivel transcripcional, de estabilidad del mensajero o de la proteína, por lo que se puede obtener niveles altos de actividad EX en condiciones no inductoras y niveles bajos de actividad EX bajo condiciones inductoras (Alazi & Ram, 2018).

La hemicelulosa es un heteropolímero muy complejo compuesto por monómeros de glucosa, xilosa, manosa, galactosa, ramnosa, arabinosa y azúcares ácidos, encontrándose en la biomasa en un porcentaje de alrededor del 25-35 % (Adav *et al.*, 2010). La hemicelulosa actúa como una barrera física, al igual que la lignina, protegiendo la celulosa de la hidrólisis enzimática; sin embargo, esta barrera se puede romper a través de la acción sinérgica de cocteles enzimáticos ricos en enzimas **hemicelulasas** (Prior & Day, 2008; Marx *et al.*, 2013). En los secretomas de *A. niger* LBM 134 crecido en medios optimizados se observó una sobreexpresión significativa de enzimas hemicelulasas pertenecientes a las familias GH 3, GH 29 (α -fucosidasas), GH 36 (α -galactosidasas), GH 55 (exo- β -1,3-glucosidasa), GH 27 (β -galactosidasas), GH 53 (endo-galactanasa), GH 67 (α -glucuronidasa) GH 76 (hemicelulasas) y GH 81 (endo- α -1,3-glucanasa) y GH 92 (manosidasas). Estos resultados exponen la capacidad degradativa de *A. niger* LBM 134 sobre la hemicelulosa.

Al actuar, las hemicelulasas de *A. niger* LBM 134 no sólo degradan la hemicelulosa, sino también facilitan el acceso a la pectina y a la celulosa debido a que la hemicelulosa se encuentra en las paredes celulares vegetales protegiendo y formando puentes con la pectina y la celulosa. La pectina es un heteropolímero complejo de homogalacturonanos, xilogalacturonanos y ramnogalacturonanos; constituye la lámina media de la pared celular primaria de las plantas y es el tercer polisacárido principal de

las paredes celulares vegetales, constituyendo entre el 30 y 35 % de estas (Adav *et al.*, 2010), constituyendo una fuente de carbono importante para hongos y bacterias. En la bibliografía se reporta al hongo *A. niger* como un excelente productor de **pectinasas** (Tsang *et al.*, 2009) y en los secretomas provenientes del hongo *A. niger* LBM 134 se identificaron enzimas que depolimerizan la pectina, aunque en mucho mayor proporción en el secretoma del hongo crecido en bagazo de mandioca. Entre las pectinasas identificadas se encontraron ramno-galacturonasas, galacturonosidasas y endo- y exo-poligalacturonasas clasificadas dentro de la familia GH 28. La maquinaria pectinolítica de *A. niger* LBM 134 se completó con la identificación de las siguientes enzimas: ramnogalacturonil hidrolasa de la familia PL 1 y PL 4, ramnogalacturonil hidrolasa de la familia GH 78 que hidrolizan el esqueleto de la pectina (Adav *et al.*, 2010), pectin-esterasas de la familia CE 8 y CE 13. Esta sobreexpresión de pectinasas se confirmó con la actividad pectinasa superior en los sobrenadantes del medio con bagazo de mandioca, indicando que el bagazo de mandioca contiene alto contenido de pectina la cual puede luego convertirse en azúcares solubles y finalmente fermentarse a etanol.

Otras enzimas que se encontraron en altas proporciones en los secretomas del hongo crecido en los medios optimizados fueron las **amilasas**. Estas enzimas hidrolizan polisacáridos como el almidón rompiendo sus enlaces internos α -1,4-glucosídicos. La mandioca es muy rica en almidón (Avwioroko *et al.*, 2018) lo que explica que las amilasas se encontraran en mayor cantidad en el secretoma de *A. niger* LBM 134 crecido en bagazo de mandioca, particularmente las amilasas de la familia GH 13. Además, el alto porcentaje de glucanos que se caracterizó en el bagazo de mandioca en este trabajo (sección 5.7.1) explica la elevada cantidad de enzimas celulasas y amilasas identificadas en el secretoma del hongo crecido en este residuo (bagazo de mandioca).

Otras amilasas encontradas en mayor proporción en el secretoma del hongo crecido en bagazo de mandioca fueron las glucoamilasas de la familia GH 15, las cuales degradan de manera sucesiva los residuos de α -glucosa terminales y las α -glucosidasas de la familia GH 31.

La lignina es otro componente importante de la biomasa cuya biodegradación es un proceso oxidativo llevado a cabo principalmente por enzimas oxidasas y peroxidasas (**oxidorreductasas**) las cuales generan radicales libres reactivos y no específicos

(Lancefield *et al.*, 2018). Aunque es poco común encontrar enzimas involucradas en la degradación de la lignina en ascomicetes (Schneider *et al.*, 2016), en los secretomas de *A. niger* LBM 134 crecido en los bagazos se identificó la presencia de isoamil alcohol oxidasas (Ferreira *et al.*, 2009), metal oxidasas, superóxido dismutasas (Barr & Aust, 1994), dinucleótido adenina-flavina oxidorreductasas (FAD, del inglés *flavin adenine dinucleotide*) y oxidasas multicobre. Asimismo, se detectó la presencia de la enzima sulfhidril oxidasa la cual pertenece a la familia de las oxidorreductasas y tiene el potencial de generar peróxido de hidrógeno (Nivala *et al.*, 2017). También se detectaron catalasas, peroxidasas y lacasas, sugiriendo que *A. niger* LBM 134 es capaz de degradar la lignina, una característica evolutiva del hongo (Schneider *et al.*, 2016). La mayor cantidad de estas enzimas se encontró en los secretomas controles de los medios con bagazo de caña de azúcar y de mandioca. Esta manifestación es otro indicio de que los medios con bagazo de caña de azúcar y de mandioca se optimizaron eficazmente para la producción de enzimas hidrolíticas, particularmente, xilanasas.

Enzimas que actúan en el metabolismo y transporte de los lípidos, las **lipasas**, se identificaron en bajas cantidades en ambos secretomas del hongo crecido en los medios optimizados y en el secretoma control del bagazo de caña de azúcar. A diferencia del bagazo de caña de azúcar, en la bibliografía se reporta que el bagazo de mandioca contiene lípidos en bajas proporciones (Pandey *et al.*, 2000; Ayetigbo *et al.*, 2018) y una alta producción de lipasas en hongos del género *Aspergillus*. Sin embargo, en los trabajos de producción de lipasas por especies de *Aspergillus*, se describen otros sustratos y/o residuos empleados para la producción enzimática como aceite de cocina residual, aceite de oliva, aceite y granos de soja, suero de queso, leche, maíz, glicerol crudo entre otros (Jain & Naik, 2018; Regner *et al.*, 2019).

Proteasas y peptidasas se encontraron en los cuatro secretomas estudiados de *A. niger* LBM 134. El genoma de *A. niger* codifica para 198 proteínas involucradas en la degradación proteolítica incluyendo 9 aspartil endoproteasas, 10 serina carboxipeptidasas y 9 peptidasas di- y tri-peptidil-amino (Pel *et al.*, 2007). De estas, las aminopeptidasas como la serina carboxi-peptidasa, aspergilopepsina, tripeptidyl-peptidasa, endopeptidasa aspártica, aminopeptidasa C y serina proteasa autofágica fueron identificadas, aunque su frecuencia fue mayor en el secretoma control del medio

de bagazo de mandioca representando el tercio de este secretoma. Las proteasas afectan la estabilidad enzimática de todas las proteínas (Oliveira *et al.*, 2006). Por tanto, la frecuencia menor de proteasas en los medios optimizados fue un factor importante resultante de la optimización.

Los análisis proteómicos han contribuido a entender el papel de las enzimas en la degradación lignocelulósica y dilucidar el set completo de enzimas necesarias y sus interacciones para que la biodegradación sea un proceso eficiente. La extraordinaria cantidad de enzimas xilanasas, hemicelulasas, celulasas, amilasas y pectinasas secretadas por el hongo *A. niger* LBM 134 (conjunto los niveles de estas actividades enzimáticas indicando la verosimilitud de los datos obtenidos por análisis secretómicos) manifiestan el gran potencial que tiene este hongo para bioconvertir completamente los polisacáridos de residuos lignocelulósicos en azúcares fermentables para la posterior obtención de bioetanol 2G.

En la producción de bioetanol, el costo de las enzimas es uno de los inconvenientes más grandes para llevar este proceso a escalas industriales; el costo de los sustratos para la producción enzimática puede repercutir significativamente sobre este valor. De este modo, la información que se desprende de este trabajo es relevante: producir altos niveles de enzimas hidrolíticas utilizando sustratos de bajo costo como los bagazos provenientes de las agroindustrias locales lo que otorga además valor agregado a estos residuos.

6.7. Hidrólisis de los bagazos de caña de azúcar y de mandioca aplicando los sobrenadantes optimizados de *A. niger* LBM 134

En esta tesis se ensayó la hidrólisis de dos residuos provenientes de la agroindustria de Misiones, bagazo de caña de azúcar y bagazo de mandioca, pretratados con solución alcalina suave utilizando los cócteles enzimáticos de los sobrenadantes optimizados de *A. niger* LBM 134. El éxito de este tipo de pretratamiento sobre la cantidad de celulosa y hemicelulosa disponible en el bagazo de caña ya se probó por el grupo de trabajo (Castrillo 2015; Rodríguez *et al.*, 2017). En la mandioca también ocurre lo mismo con

este tipo de tratamiento, resultando en un incremento de 38,4 % a 56,5 % en celulosa, de 7,2% a 12,6% en hemicelulosa (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2014).

La hidrólisis efectiva de la holocelulosa sucede cuando las enzimas acceden a esta fracción lo que demanda un tratamiento previo del material para remover toda la lignina o parte de esta. Diferentes pretratamientos se han investigado desde hace varios años; desde físicos, químicos, una combinación de ambos y algunos más sofisticados, dependiendo del material lignocelulósico a hidrolizar (Chylenski *et al.*, 2017). El pretratamiento utilizado en esta tesis se eligió en base a trabajos previos llevados a cabo por el grupo de investigación del INBIOMIS (Castrillo, 2015; Rodríguez *et al.*, 2017).

Respecto a la hidrólisis, los sobrenadantes se aplicaron sobre los residuos pretratados directamente ya que hay claros indicios de que existen proteínas con función aún desconocida que pueden contribuir a la hidrólisis de la holocelulosa. Por este motivo, en los últimos años, las investigaciones se han focalizado en la optimización de cócteles enzimáticos, en lugar de utilizar enzimas individuales que poseen una actividad hidrolítica limitada en comparación con el efecto sinérgico de los cócteles (Van Dik & Pletschke, 2012; Kallioinen *et al.*, 2014; Chylenski *et al.*, 2017; Coniglio, 2017; Lopes *et al.*, 2018). Además, utilizar sobrenadantes sin purificar significa una reducción en los costos de la aplicación biotecnológica (Coniglio, 2017) lo que implica que el proceso global de producción de bioetanol sea más rentable. Este cóctel enzimático debe contar con enzimas que posean diferentes especificidades y modos de acción sobre los diferentes componentes de la holocelulosa con el fin de llevar a cabo su degradación con éxito.

En primera instancia, en el presente trabajo se conocían los niveles de actividad EX, BXL, FPasa, EG, BGL, CBH, amilasa y pectinasa de ambos sobrenadantes optimizados provenientes de *A. niger* LBM 134. Las unidades determinadas de cada actividad enzimática fueron suficientes para iniciar los ensayos de hidrólisis de los residuos agroindustriales pretratados. De igual manera, se determinó la estabilidad enzimática de las EX, BXL, FPasa y BGL en función de las condiciones de temperatura y pH a utilizarse durante la hidrólisis ya que estas enzimas son las más influyentes en la hidrólisis (Lopes *et al.*, 2018). Se verificó que estas actividades enzimáticas sean estables a 30 °C y pH 5 para iniciar los ensayos de hidrólisis bajo estas condiciones durante 24 h. Cabe resaltar

que los ensayos de hidrólisis se llevaron a cabo sin la adición de ningún antibiótico con el fin de no sumar costo al bioproceso.

De los ensayos de hidrólisis con los sobrenadantes optimizados, se obtuvieron valores de porcentaje de sacarificación del 59 y 61 % para los bagazos de caña de azúcar y de mandioca, respectivamente; en contraposición con los porcentajes 47 y 40 % obtenidos para ambos bagazos hidrolizados con enzimas comerciales. A su vez, se logró cuantificar los azúcares monoméricos resultantes de la hidrólisis de ambos residuos con los sobrenadantes de *A. niger* LBM 134. La suma de los porcentajes de conversión a glucosa (26,32 %) y xilosa (51,7 %) fue ligeramente mayor al porcentaje de sacarificación de la biomasa para el bagazo de caña de azúcar. En el caso del bagazo de mandioca, la suma de porcentajes de conversión a glucosa (19 %) y xilosa (10,4 %) fue menor al porcentaje de sacarificación de la biomasa.

Los porcentajes de conversión en azúcares fermentables confirmaron buena actividad hidrolítica de los cócteles enzimáticos de *A. niger* LBM 134 sobre la celulosa y hemicelulosa, liberando celobiosa, glucosa, xilosa y arabinosa que luego pueden fermentarse. Los porcentajes de conversión indicaron títulos suficientes de las enzimas encargadas de degradar a estos azúcares monoméricos. Particularmente, en el caso del bagazo de caña de azúcar, se observó un porcentaje alto de conversión a xilosa, indicando niveles de actividad EX y BXL suficientes para realizar dicha conversión.

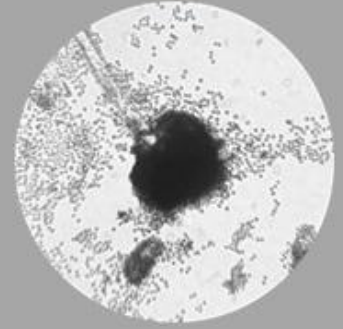
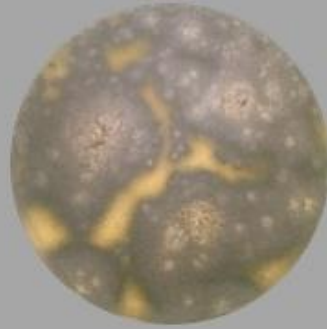
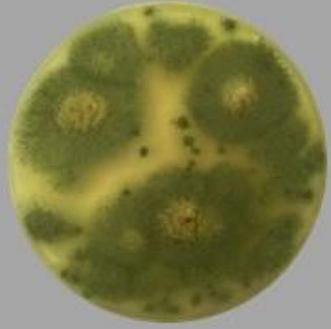
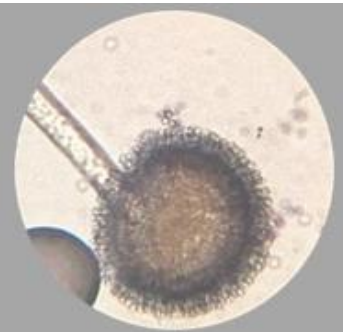
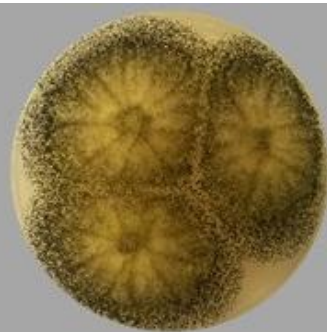
Con respecto a la conversión de glucosa, varios estudios describen una producción limitada de BGLs para la mayoría de los hongos filamentosos, incluyendo *T. reesei*, en los cuales deben utilizar BGLs comerciales para subsanar tal deficiencia (Singhania *et al.*, 2016; Lopes *et al.*, 2018). En el presente estudio, el porcentaje de conversión de glucosa pudo comprobar que los cócteles optimizados de *A. niger* LBM 134 cuentan con suficiente actividad BGL para llevar a cabo la degradación celulósica a glucosa.

En lo que concierne a los ensayos de hidrólisis llevados a cabo con enzimas comerciales, se observó una mejor actuación hidrolítica de las enzimas comerciales sobre el bagazo de caña de azúcar en comparación con la hidrólisis del bagazo de mandioca. Ello podría deberse a la falta de enzimas amilasas en los cócteles comerciales para degradar el almidón del bagazo de mandioca. En contraposición, los sobrenadantes de *A. niger* LBM 134 crecido en bagazo de mandioca hidrolizaron en mayor medida este

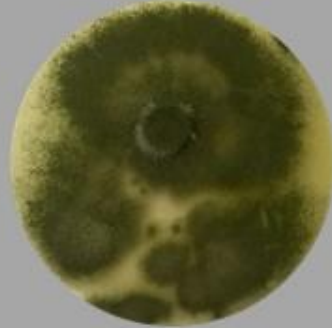
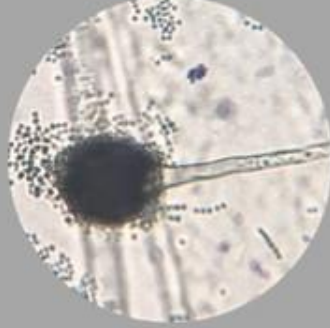
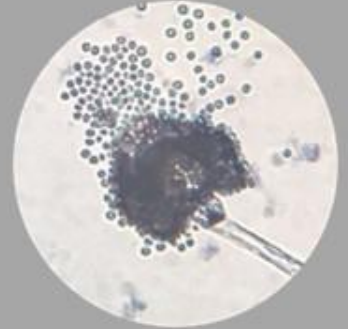
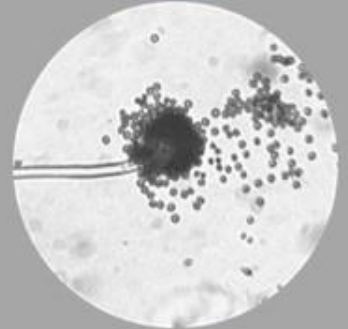
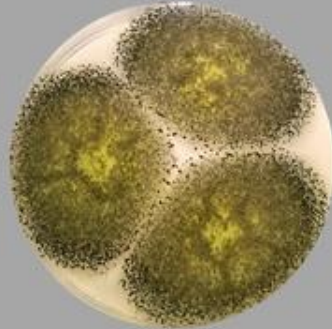
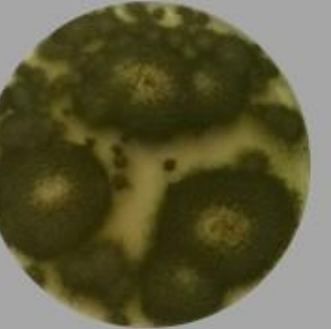
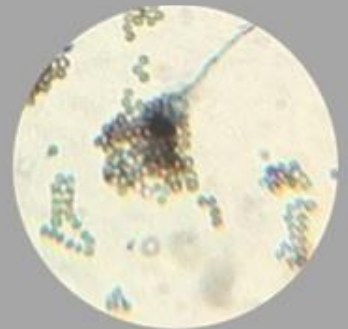
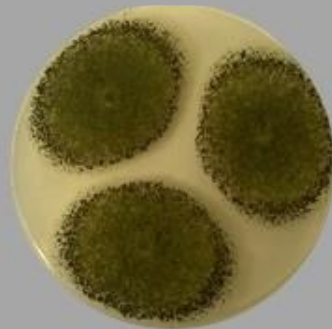
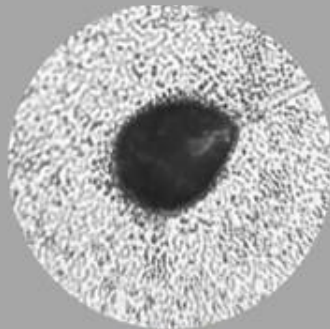
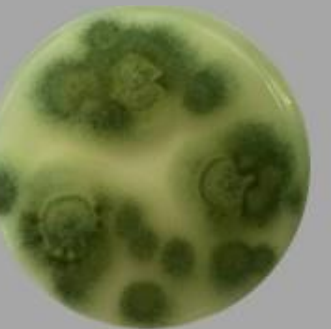
bagazo. Esto demuestra que los cócteles enzimáticos de *A. niger* LBM 134 son óptimos para la hidrólisis del bagazo de mandioca.

Con respecto al hidrolizado de bagazo de mandioca, Pandey et al. (2000) propuso que es un buen sustrato para producir bio-productos con valor agregado como enzimas microbianas hidrolíticas especialmente fúngicas, y que este es un campo que todavía no está muy explorado y aún menos explotado. Además, el bagazo de mandioca posee la ventaja de poder hidrolizarse sin ningún tratamiento previo debido a que no contiene alto contenido de lignina en comparación a otros residuos agroindustriales como el bagazo de caña de azúcar, por ejemplo (Bayitse *et al.*, 2015).

Los altos porcentajes de sacarificación y de hidrólisis del bagazo de caña de azúcar con los cócteles enzimáticos de *A. niger* LBM 134, al igual que la mejor actuación de estos sobre el bagazo de mandioca demuestran lo óptimo de producir dichos cócteles utilizando los residuos que luego serán hidrolizados. Este tipo de producción y optimización enzimática teniendo en cuenta el residuo a hidrolizar fue crucial para lograr una bioconversión eficiente, ya que cada sustrato tiene características particulares que demandan enzimas diferentes para su completa degradación (Lopes *et al.*, 2018). La conversión de los residuos utilizando los cócteles enzimáticos de *A. niger* LBM 134 a azúcares monoméricos permitirá continuar con la etapa de fermentación de estos últimos a bioetanol 2G.



CONCLUSIONES



7. CONCLUSIONES

El cepario del Instituto de Biotecnología Misiones se enriqueció con 12 nuevos aislamientos de hongos pertenecientes al género *Aspergillus* de zonas naturales de Misiones. La capacidad xilanolítica y proteolítica de 25 aislamientos de *Aspergillus* se estudió mediante ensayos sencillos, eficientes y económicos utilizándose bagazo de caña de azúcar como medio de bajo costo para aprovecharlo como fuente de carbono y sustrato inductor de las enzimas EX y BXL.

Se encontró que la metodología empleada para la detección de enzimas gelatina-proteasas utilizando el colorante Coomassie, demostró ser una técnica útil para mejorar la detección de enzimas proteolíticas fúngicas extracelulares y se reportó por primera vez en este trabajo.

Las pruebas realizadas en medio suplementado con bagazo de caña de azúcar mostraron que los aislamientos LBM 055 y LBM 134 fueron los más promisorios con los niveles más altos de actividad EX y BXL con actividad proteolítica casi nula, por lo que se seleccionaron para continuar con el estudio utilizando cuatro sustratos lignocelulósicos.

Ambos aislamientos seleccionados presentaron mayor actividad EX cuando crecieron con bagazo de caña de azúcar y de mandioca; siendo LBM 134 el aislamiento seleccionado para continuar los estudios por presentar los mayores niveles de EX. El mismo produjo $59,67 \pm 0,08 \text{ UmL}^{-1}$ de EX cuando creció con 15 gL^{-1} bagazo de caña de azúcar y agitación; cuando creció con 40 gL^{-1} de bagazo de mandioca sin agitación produjo $48,37 \pm 1,17 \text{ UmL}^{-1}$.

La identificación polifásica permitió identificar el aislamiento LBM 134 como *A. niger* de manera contundente, superando las limitaciones presentadas cuando se utilizó únicamente herramientas de biología molecular y bioinformática.

La actividad EX de *A. niger* LBM 134 dependió en gran medida de las fuentes de nitrógeno presentes en el medio de cultivo y sus concentraciones, así como de las condiciones de incubación.

En el medio con bagazo de caña de azúcar (40 mesh), inoculado con 10^6 esporas mL^{-1} del hongo, se logró el nivel máximo de EX, 110 UmL^{-1} , cuando se suplementó con 2 gL^{-1}

¹ peptona, 2 gL⁻¹ extracto de levadura y 0,5 gL⁻¹ tripteína bacteriológica y se incubó a pH 4,5, 24 °C, 100 rpm en presencia de luz.

En medio con bagazo de mandioca (40 mesh), inoculado con 10⁷ esporas mL⁻¹, el nivel de EX fue máximo, 158,48 U mL⁻¹, cuando se suplementó con 2,19 gL⁻¹ urea y 2,84 gL⁻¹ peptona, incubado a pH 5,5, 28 °C en condiciones estáticas sin luz.

La producción de enzimas EXs en ambos medios de cultivo con bagazo de caña de azúcar y de mandioca fue 20 veces más económica que la producción de estas enzimas en medio con xilano comercial.

Se identificaron 166 proteínas en los secretomas estudiados del hongo *A. niger* LBM 134, siendo mayor la cantidad en los secretomas optimizados con los bagazos; más del 50 % de las proteínas son del sistema CAZy. Se identificaron BGL pertenecientes a las familias GH 1, GH 3 y GH 5 en proporciones altas lo cual es una característica deseada en muchos los cócteles enzimáticos inclusive en los comerciales ya que estos se suplementan necesariamente con enzimas BGL exógenas para la hidrólisis de sustratos complejos.

Los secretomas de *A. niger* LBM 134 presentaron una expresión diferencial de las enzimas implicadas en degradar los componentes carbonados de la pared celular vegetal. El medio optimizado con bagazo de caña de azúcar incrementó la cantidad de xilanasas secretadas; mientras que, el medio optimizado con bagazo de mandioca produjo celulasas, amilasas y pectinasas en mayor abundancia. Estos hallazgos junto con la validación de las actividades del cóctel enzimático confirman la capacidad de bioconversión de *A. niger* LBM 134 sobre los residuos agroindustriales estudiados.

Se logró de manera eficiente la bioconversión de los bagazos de caña de azúcar y de mandioca mediante la aplicación de cócteles enzimáticos de *A. niger* LBM 134 optimizados con los respectivos residuos, alcanzándose porcentajes adecuados de sacarificación y de hidrólisis.

A stack of books is shown on the right side of the image, with their spines facing left. The books are of various thicknesses and are stacked in a slightly irregular manner. The background is a solid, light blue color. The text 'REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS' is written in a white, hand-drawn, sans-serif font across the lower half of the image, overlapping the books and the background.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.

Abarca ML (2000). Taxonomy and identification of the species involved in nosocomial aspergillosis. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17(3), S79-S84.

Abdelwahed NAI, Danial EN, El-Naggar N, Mohamed AA (2014). Optimization of alkaline protease production by *Streptomyces ambofaciens* in free and immobilized form. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 10, 1–13.

Abirami V, Meenakshi S, Kanthymathy K, Bharathidasan R, Mahalingam R, Panneerselvam A (2011). Partial purification and characterization of an extracellular xylanase from *Penicillium janthinellum* and *Neurospora crassa*. *Journal of Natural Products and Plant Resources*, 1(4), 117-125

Adav SS, Li AA, Manavalan A, Punt P, Sze SK (2010). Quantitative iTRAQ secretome analysis of *Aspergillus niger* reveals novel hydrolytic enzymes. *Journal of proteome research*, 9(8), 3932-3940.

Alazi E, Ram AF (2018). Modulating Transcriptional Regulation of Plant Biomass Degrading Enzyme Networks for Rational Design of Industrial Fungal Strains. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 6.

Alfonse J, Negro A, Saez A, Martin M (1986). Actividad enzimática del complejo celulolítico producido por *Trichoderma reesei*. Publ. / Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas.

Allen AL, Roche CD (1989). Effects of strain and fermentation conditions on production of cellulase by *Trichoderma reesei*. *Biotechnology and Bioengineering*, 33(5), 650–656.

Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro MJ (2010). Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource technology*, 101(13), 4851-4861.

Amin F, Bhatti HN, Bilal M (2019). Recent advances in the production strategies of microbial pectinases—A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 1017-1026.

Amore A, Giacobbe S, Faraco V (2013). Regulation of cellulase and hemicellulase gene expression in fungi. *Current genomics*, 14(4), 230-249.

Andlar M, Rezić T, Marđetko N, Kracher D, Ludwig R, Šantek B (2018). Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation. *Engineering in Life Sciences*, 18(11), 768-778.

Anwar Z, Gulfranz M, Irshad M (2014). Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: a brief review. *Journal of radiation research and applied sciences*, 7(2), 163-173.

Archibald FS (1992). A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye Azure B. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3110-3116.

Arias-Carbajal GMO, Bueno García G, Betancourt Rodríguez D, Álvarez I, González AL (2005). Biotransformación de Residuos Lignocelulósicos con Hongos *Pleurotus*. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 36.

Awwioroko OJ, Anigboro AA, Unachukwu NN, Tonukari NJ (2018). Isolation, identification and in silico analysis of alpha-amylase gene of *Aspergillus niger* strain CSA35 obtained from cassava undergoing spoilage. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 14, 35-42.

Ayetigbo O, Latif S, Abass A, Müller J (2018). Comparing Characteristics of Root, Flour and Starch of Biofortified Yellow-Flesh and White-Flesh Cassava Variants, and Sustainability Considerations: A Review. *Sustainability*, 10(9), 3089.

B.

Bailey MJ, Biely P, Poutanen K (1992). Interlaboratory testing methods for assays of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, 23, 257-270.

Bajaj BK, Sharma M, Sharma S (2011). Alkalistable endo- β -1, 4-xylanase production from a newly isolated alkalitolerant *Penicillium* sp. SS1 using agroresidues. *3 Biotech*, 1(2), 83-90.

Bajpai P, Mishra S, Prakash M, Kumar S, Bajpai P, Singh S (2004). Biochemical pulping of wheat straw. *Tappi Journal*, 3(8), 3-6.

Baldrian P (2006). Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 215-42.

Baldrian P, Valášková V. 2008. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 32: 501–521.

Balzarini M, Bruno C, Córdoba M, Teich I (2015). Herramientas en el Análisis Estadístico Multivariado. Escuela Virtual Internacional (CAVILA). Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina. ISBN 978-987-591-648-7.

Banerjee G, Car S, Scott-Craig JS, Borrusch MS, Walton JD (2010). Rapid optimization of enzyme mixtures for deconstruction of diverse pretreatment/biomass feedstock combinations. *Biotechnology for Biofuels*, 3(1), 22.

Barbosa BM, Lino AG, de Faria BDFH, de Aguiar AR, Gomes FJB, da Silva JC, Colodette JL (2018). Addition of corn fiber xylan to eucalyptus and pinus pulp and its effect on pulp bleachability and strength. *Nordic Pulp & Paper Research Journal*, 33(3), 414-419.

Barchuk ML, Díaz GV, Coll PAF, Velazquez JE, Fonseca MI, Villalba LL, Zapata PD (2016). Selection of *Trichoderma* strain to enhanced cellulase-poor xylanase production using sugarcane bagasse as sole carbon source under light. *International Journal of Recent Biotechnology*, 4(2), 25-34.

Barchuk ML (2017). Caracterización bioquímica y genética de endoxilanasas secretadas por *Trichoderma* sp. nativos de Misiones para su utilización en el proceso de pretratamiento. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Misiones. Argentina.

Barr DP, Aust SD (1994). Effect of superoxide and superoxide dismutase on lignin peroxidase-catalyzed veratryl alcohol oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 311(2), 378–382.

Bayitse R, Hou X, Bjerre AB, Saalia FK (2015). Optimisation of enzymatic hydrolysis of cassava peel to produce fermentable sugars. *AMB express*, 5(1), 60.

Beg Q, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(3-4), 326-338.

- Behera BC, Sethi BK, Mishra RR, Dutta SK, Thatoi HN (2017). Microbial cellulases–Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 197-210.
- Benbow JM, Sugar D (1999). Fruit surface colonization and biological control of postharvest diseases of pear by preharvest yeast applications. *Plant Disease*, 83(9), 839-844.
- Bennett JW (2010). An overview of the genus *Aspergillus*. *Aspergillus: molecular biology and genomics*, 1-17.
- Bertrand B, Martínez-Morales F, and Trejo-Hernández MR (2017). Upgrading Laccase Production and Biochemical Properties: Strategies and Challenges. *Biotechnology Progress*, 33(4), 1015-1034.
- Bhardwaj N, Chanda K, Kumar B, Prasad HK, Sharma GD, Verma P (2017). Statistical optimization of nutritional and physical parameters for xylanase production from newly isolated *Aspergillus oryzae* LC1 and its application in the hydrolysis of lignocellulosic agro residues. *BioResources*, 12(4), 8519-8538.
- Bhattacharya AS, Bhattacharya A, Pletschke, BI (2015). Synergism of fungal and bacterial cellulases and hemicellulases: a novel perspective for enhanced bio-ethanol production. *Biotechnology letters*, 37(6), 1117-1129.
- Bohacz J (2017). Lignocellulose-degrading enzymes, free-radical transformations during composting of lignocellulosic waste and biothermal phases in small-scale reactors. *Science of the Total Environment*, 580, 744-754.
- Borin GP, Sanchez CC, de Souza AP, de Santana ES, de Souza AT, Leme AFP, ..., de Castro Oliveira JV (2015). Comparative secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during growth on sugarcane biomass. *PLoS One*, 10(6), e0129275.
- Box GEP, Wilson KB (1951). On the experimental attainment of optimum conditions. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 13, 1-45.
- Bradford M (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Braun E, Rodrigues C (1993). Purification and properties of an endoxylanase from corn stalk rot strain *Erwinia chrysanthemi*. Physiology and Biochemistry. *Phytopathology*, 83(3), 332-338.
- Brijwani K, Oberoi HS, Vadlani PV (2010). Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochemistry*, 45(1), 120-128.
- Brown AD, Grau A, Lomáscolo T, Gasparri NI (2002). Una estrategia de conservación para las selvas subtropicales de montaña (yungas) de Argentina. *Ecotrópicos*, 15, 147–159.
- Burlacu A, Cornea CP, Israel-Roming F (2016a). Microbial xylanase: a review. *Scientific Bulletin Series F Biotechnologies*, 20, 335-342.
- Burlacu A, Cornea CP, Israel-Roming F (2016b). Screening for Xylanase producing microorganisms. *Research Journal of Agricultural Science*, 48(2), 8-15.

C.

Cabañes FJ, Bragulat MR (2018). Black aspergilli and ochratoxin A-producing species in foods. *Current Opinion in Food Science*, 23, 1-10.

Carbohydrate Active Enzymes Database, (<http://www.cazy.org>) [Consulta: 18 de mayo de 2019].

Carrillo L (2003). *Aspergillus*: Morfología. Identificación. Cultivos. Ambiente. Micotoxinas: aflatoxinas, ocratoxina A, esterigmatocistina, ácido ciclopiazónico, neurotoxinas, otras toxinas. *Los hongos de alimentos y forrajes*, 4, 44-61.

Castrillo ML (2015). Caracterización de celulasas secretadas por aislamientos de *Trichoderma*, nativos de la provincia de Misiones (Argentina) aplicables en la etapa de sacarificación. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Misiones. Argentina.

Cayetano-Cruz M, de los Santos AIP, García-Huante Y, Santiago Hernández A, Pavón-Orozco P, López VEL, Hidalgo-Lara ME (2016). High level expression of a recombinant xylanase by *Pichia pastoris* cultured in a bioreactor with methanol as the sole carbon source: Purification and biochemical characterization of the enzyme. *Biochemical Engineering Journal*, 112, 161-169.

Chen C, Chen J, Lin T (1997). Purification and characterization of a xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* form xylooligosaccharide production. *Enzyme and Microbial Technology*, 21, 91-96.

Chen L, Zhang M, Zhang D, Chen X, Sun C, Zhou B, Zhang Y (2009). Purification and enzymatic characterization of two b-endoxylanases from *Trichoderma* sp. K9301 and their actions in xylooligosaccharide production. *Bioresource Technology*, 100, 5230-5236.

Chipeta ZA, Du Preez JC, Christopher L. 2008. Effect of cultivation pH and agitation rate on growth and xylanase production by *Aspergillus oryzae* in spent sulphite liquor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35, 587-594.

Chylenski P, Forsberg Z, Ståhlberg J, Várnai A, Lersch M, Bengtsson O, ... Eijsink VG (2017). Development of minimal enzyme cocktails for hydrolysis of sulfite-pulped lignocellulosic biomass. *Journal of biotechnology*, 246, 16-23.

Collins T, Gerday C, Feller G (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS microbiology reviews*, 29(1), 3-23.

Coniglio RO (2017). Aspectos bioquímicos y moleculares de celobiohidrolasas fúngicas con potencial aplicación en el proceso de sacarificación. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Misiones. Argentina.

Coniglio RO, Fonseca MI, Villalba LL, Zapata PD (2017). Screening of new secretory cellulases from different supernatants of white rot fungi from Misiones, Argentina. *Mycology*, 8(1), 1-10.

Cuyvers S, Dornez E, Moers K, Pollet A, Delcour JA, Courtin CM (2011). Evaluation of the xylan breakdown potential of eight mesophilic endoxylanases. *Enzyme and Microbial Technology*, 49, 305-311.

D.

da Cunha MNC, dos Santos Nascimento JC, Souza-Motta MC, Albertini AVP, Lima CA, Marques DDAV, Porto ALF (2013). Production of enzymes by filamentous fungus using sugarcane and sugarcane bagasse as substrate. *Revista Brasileira de Biociências*, 11(2).

da Silva Menezes B, Misturini Rossi D, Záchia Ayub MM (2017). Screening of filamentous fungi to produce xylanase and xylooligosaccharides in submerged and solid-state cultivations on rice

husk, soybean hull, and spent malt as substrates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 58.

Dashtban M, Schraft H, Qin W (2009). Fungal bioconversion of lignocellulosic residues: opportunities & perspectives. *International Journal of Biological Sciences*, 5(6), 578-595.

Dean JFD, Eriksson KE (1994). Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. *Holzforschung*, 48, 21-38.

de Lemos Esteves F, Ruelle V, Lamotte-Brasseur J, Quinting B, Frère JM (2004). Acidophilic adaptation of family 11 endo- β -1, 4-xylanases: Modeling and mutational analysis. *Protein science*, 13(5), 1209-1218.

de Vries RP, Riley R, Wiebenga A, Aguilar-Osorio G, Amillis S, Uchima CA, ..., Battaglia E (2017). Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. *Genome biology*, 18(1), p. 28.

Dhiman S, Sharma J, Battan B (2008). Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: a review. *BioResources*, 3(4), 1377-1402.

Dhiman S, Mukherjee G (2017). Screening, characterization & optimization of xylanase production from *Pseudomonas* spp. xpb-16 in submerged fermentation. *World Journal of Pharmaceutical research*, 6(8), 1684-1698.

Dhiman S, Mukherjee G (2018). Recent Advances and Industrial Applications of Microbial Xylanases: A Review. In *Fungi and their Role in Sustainable Development: Current Perspectives* (pp. 329-348). Springer, Singapore.

Díaz GV, Giorgio EM, Fonseca MI, Villalba LL y Zapata PD (2015). Statistical optimization of medium components of xylanase production by *Irpex lacteus* BAFC 1168 strain F under liquid fermentation. *Journal of Advances in Biotechnology*, 5(1), 559-569.

Díaz GV, Coniglio RO, Velazquez JE, Zapata PD, Villalba LL, Fonseca MI (2019). Adding value to lignocellulosic wastes via their use for endoxylanase production by *Aspergillus* fungi. *Mycologia*, 111(2), 195-205.

F.

Fang TJ, Liao BC, Lee SC (2010). Enhanced production of xylanase by *Aspergillus carneus* M34 in solid-state fermentation with agricultural waste using statistical approach. *New biotechnology*, 27(1), 25-32.

Fernandez-Espinar M, Pinaga F, De Graaff L, Visser J, Ramón D, Vallés S (1994). Purification, characterization and regulation of the synthesis of an *Aspergillus nidulans* acidic xylanase. *Applied microbiology and biotechnology*, 42(4), 555-562.

Ferreira P, Hernandez-Ortega A, Herguedas B, Martínez ÁT, Medina M (2009). Aryl-alcohol oxidase involved in lignin degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 284(37), 24840-24847.

Field JA, Jong ED, Costa GF, Bont JAM (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2219-2228.

Florencio C, Cunha FM, Badino AC, Farinas CS, Ximenes E, Ladisch MR (2016). Secretome analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* cultivated by submerged and sequential

fermentation processes: enzyme production for sugarcane bagasse hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 90, 53-60.

Fonseca MI, Shimizu E, Zapata PD, Villalba LL (2010) Copper inducing effect on laccase production of white rot fungi native from Misiones (Argentina). *Enzyme and Microbial Technology*, 46(6), 534-539.

Fonseca MI (2012). Utilización de hongos de pudrición blanca de la provincia de Misiones en procesos de biopulpa: Aspectos bioquímicos y moleculares de sistemas ligninolíticos involucrados y prospección biotecnológica. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.

Fonseca MI, Fariña JI, Sadañoski MA, D'Errico R, Villalba LL, Zapata PD (2015). Decolorization of Kraft liquor effluents and biochemical characterization of laccases from *Phlebia brevispora* BAFC 633. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104, 443-451.

Fonseca MI, Tejerina MR, Sawostjanik-Afanasiuk SS, Giorgio EM, Barchuk ML, Zapata PD and Villalba LL (2016). Preliminary studies of new strains of *Trametes* sp. from Argentina for laccase production ability. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), 287-297.

Frisvad JC (1985). Creatine sucrose agar, a differential medium for mycotoxin producing terverticillate *Penicillium* species. *Letters in Applied Microbiology*, 1(6), 109-113.

Frisvad JC, Hawksworth DL, Kozakiewicz Z, Pitt JI, Samson RA, Stolk AC (1990). Proposals to conserve important species names in *Aspergillus* and *Penicillium*. *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification*, 83-89.

Frisvad JC, Samson RA (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium* A guide to identification of food and air-borne *terverticillate Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, 49, 1-174.

Frisvad JC, Petersen LM, Lyhne EK, Larsen TO (2014). Formation of sclerotia and production of indoloterpenes by *Aspergillus niger* and other species in section *Nigri*. *PLoS One*, 9(4), e94857.

Fungaro MHP, Ferranti LS, Massi FP, Silva JJ, Sartori D, Taniwaki MH, ..., Iamanaka BT (2017). *Aspergillus labruscus* sp. nov., a new species of *Aspergillus* section *Nigri* discovered in Brazil. *Scientific Reports*, 7(1), 6203.

G.

Gams W, Christensen M, Onions AH, Pitt JI, Samson RA (1986). Infrageneric taxa of *Aspergillus*. *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*, 55-62.

Ghose TK, Bisaria VS (1987). Measurement of hemicellulase activities: part I Xylanases. *Pure Applied Chemistry*, 59(12), 1739-1751.

Gil G (2007). Misiones: Características físicas y vegetación. En: Massoia, Chebez, Bosso. Los mamíferos silvestres de la provincia de Misiones, Argentina. Editorial L.O.L.A. Literature of Latin America.

Gil JFM, De Perez VIM, Colorado AAR. (2006). Producción de etanol a partir de la cáscara de banana y de almidón de yuca. *Dyna*, 73(150), 21-27.

Glass NL, Donaldson G (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied Environmental Microbiology*, 61, 1323-1330.

Glenn JK, Morgan MA, Mayfield MB, Kuwahara M, Gold MH (1983). An extracellular H₂O₂ requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 114, 1077-1083.

Gomaa EZ (2013). Optimization and characterization of alkaline protease and carboxymethyl-cellulase produced by *Bacillus pumillus* grown on *Ficus nitida* wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 529-537.

Gómez G, Batista C (2006). Optimización de medios de cultivos para microorganismos, una valiosa estrategia para la producción de biopreparados de interés agrícola. *Cultivos tropicales*, 27(3), 17-24.

Gong X, Gruniniger RJ, Forster RJ, Teather RM, McAllister TA (2013). Biochemical analysis of a highly specific, pH stable xylanase gene identified from a bovine rumen-derived metagenomic library. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(6), 2423-2431.

Goswami GK, Pathak RR (2013). Microbial xylanases and their biomedical applications: a review. *International Journal of Basic Clinical Pharmacology*, 2(3), 237-246.

Gottschalk LMF, Oliveira RA, da Silva Bon EP (2010). Cellulases, xylanases, β -glucosidase and ferulic acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act synergistically in the hydrolysis of sugarcane bagasse. *Biochemical Engineering Journal*, 51(1-2), 72-78.

Grassi EM, Romano GM, Schenone NF (2016). Macrohongos presentes en un área de manejo regenerativo de bosque de Mata Atlántica (Misiones, Argentina). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 51(2), 223-233.

Guerriero G, Hausman JF, Strauss J, Ertan H, Siddiqui KS (2016). Lignocellulosic biomass: Biosynthesis, degradation, and industrial utilization. *Engineering in Life Sciences*, 16(1), 1-16.

Gupta VK, Kubicek CP, Berrin JG, Wilson DW, Couturier M, Berlin A, Filho EXF, Ezeji T (2016). Fungal enzymes for bio-products from sustainable and waste biomass. *Trends in biochemical sciences*, 41(7), 633-645.

Gueldo N (2016). Mejoramiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* Y138 por ingeniería evolutiva para la producción de bioetanol de segunda generación. Tesis de grado. Universidad Nacional General de San Martín. Argentina.

H.

Hahn-Hägerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund G, Lidén G, Zacchi G (2006). Bio-ethanol-the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, 24(12), 549-556.

Harris AD, Ramalingam, C (2010). Xylanases and its application in food industry: a review. *Journal of Experimental Sciences*.

Hatakka A, Lundell T, Mohammadi O, Tervila-Wilo A (1989). Activities of lignin-degrading enzymes of the white-rot fungus *Phlebia radiata*: lignin model compound studies. In Proc. 4th International Conference on biotechnology in the pulp and paper industry: 108-109. Raleigh, North Carolina.

Hendriks ATWM, Zeeman G (2009). Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 100(1), 10-18.

Hernández-Melchor DJ, Ferrera-Cerrato R, Alarcón A (2019). *Trichoderma*: importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 35(1), 98-112.

Himmel ME, Ding SY, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW, Foust TD (2007). Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 315(5813), 804-807.

Hofrichter M (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 454-466.

Hong SB, Go SJ, Shin HD, Frisvad JC, Samson RA (2005). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia*, 97(6), 1316-1329.

Houbraken J, de Vries RP, Samson RA (2014). Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Advances in Applied Microbiology*, 86, 199-249.

Hubka V, Kolarik M (2012). β -tubulin paralogue tubC is frequently misidentified as the benA gene in *Aspergillus* section *Nigri* taxonomy: Primer specificity testing and taxonomic consequences. *Persoonia*, 29, 1–10.

I.

Isikgor FH, Becer CR (2015). Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry*, 6(25), 4497-4559.

Izarra ML, Santayana ML, Villena GK, Gutiérrez-Correa M (2010). Influencia de la concentración de inóculo en la producción de celulasa y xilanas por *Aspergillus niger*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12, 139–150.

J.

Jain R, Naik SN (2018). Adding value to the oil cake as a waste from oil processing industry: Production of lipase in solid state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 15, 181-184.

Jeuland N, Montage X, Gautrot X (2004). Potentiality of ethanol as a fuel for dedicated engine. *Oil & Gas Science and Technology*, 59(6), 559-570.

John J (2017). Amylases-bioprocess and potential applications: a review. *International Journal of Bioinformatics and Biological Sciences*, 5(2), 41-50.

Juturu V, Wu JC (2012). Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. *Biotechnology advances*, 30(6), 1219-1227.

K.

Kachlishvili E, Penninckx MJ, Tsiklauri N, Elisashvili V (2006). Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 391–397.

- Kallioinen A, Puranen T, Siika-aho, M (2014). Mixtures of thermostable enzymes show high performance in biomass saccharification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(5), 1038-1056.
- Kalpana VN, Rajeswari VD (2015). Production of xylanase from various lignocellulosic waste materials by *Streptomyces* sp. and its potential role in deinking of newsprint. *Asian Journal of Biochemistry*, 10(5), 222-229.
- Kapoor M, Nair LM, Kuhad RC (2008). Cost-effective xylanase production from free and immobilized *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in saccharification of *Prosopis juliflora*. *Biochemical Engineering Journal*, 38, 88–97.
- Karaman M, Novakovic M, Matavuly M (2012). Fundamental fungal strategies in restoration of natural environment. En Paz Silva A, Sol M Ed., *Fungi: Types, environmental impact and role in disease*. Nova Science Publishers Inc. pp. 167-214.
- Karimi K, Emtiazi G, Taherzadeh MJ. (2006). Production of ethanol and mycelial biomass from rice straw hemicellulose hydrolyzate by *Mucor indicus*. *Process Biochemistry*, 41(3), 653-658.
- Kaur J, Munshi GD, Singh RS, Koch E (2005). Effect of carbon source on production of lytic enzymes by the sclerotial parasites *Trichoderma atroviride* and *Coniothyrium minitans*. *Journal of Phytopathology*, 153(5), 274-279.
- Kersten PJ, Kirk TK (1987). Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology*, 169, 2195–2201.
- Klich MA, Pitt JI (1988). A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. *North Ryde, CSIRO Division of Food Processing*.
- Kluepfel D, Daigneault N, Morosoli R, Shareck F (1992). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36, 626-631.
- Knob A, Terrasan CRF, Carmona, EC (2010). β -Xylosidases from filamentous fungi: an overview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(3), 389-407.
- Kolenová K, Vránská M, Biely P (2006). Mode of action of endo- β -1,4-xylanases of families 10 and 11 on acidic xylooligosaccharides. *Journal of Biotechnology*, 121, 338-345.
- Koonin EV (2005). Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. *Annual Review of Genetics*, 39, 309-338.
- Kozakiewicz Z (1989). *Aspergillus species on stored products*, (No. 161).
- Kozakiewicz Z, Frisvad JC, Hawksworth DL, Pitt JI, Samson RA, Stolk AC (1992). Proposals for nomina specifica conservanda and rejicienda in *Aspergillus* and *Penicillium* (Fungi). *Taxon*, 41, 109–113.
- Kristensen JB, Felby C, Jorgensen H (2009). Determining yields in high solids enzymatic hydrolysis of biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 156(1-3), 127-132.
- Kubicek CP, Kubicek EM (2016). Enzymatic deconstruction of plant biomass by fungal enzymes. *Current opinion in chemical biology*, 35, 51-57.
- Kuhad RC, Gupta R, Singh A (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme research*, 2011.
- Kulkarni N, Shendye A, Rao M (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS microbiology reviews*, 23(4), 411-456.

Kumar A, Gautam A, Dutt D (2016). Biotechnological transformation of lignocellulosic biomass in to industrial products: an overview. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 7(03), 149-168.

Kumar A, Naraian R (2019). Differential Expression of the Microbial β -1, 4-Xylanase, and β -1, 4-Endoglucanase Genes. En *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* pp. 95-111. Elsevier.

Kumar D, Kumar SS, Kumar J, Kumar O, Mishra SV, Malyan S, Kumar R (2017). Xylanases and their industrial applications: a review. *Biochemical and Cellular Archives*, 17, 353–360.

Kumar R, Wyman CE (2009). Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnology Progress*, 25(2), 302-314.

Kumar S, Chakravarty S (2018). Amylases. En *Enzymes in Human and Animal Nutrition* (pp. 163-180). Academic Press.

Kurtzman CP, Robnett CJ (1997). Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5'end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(5), 1216-1223.

L.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.

Lancefield CS, Weckhuysen BM, Bruijninx PCA (2018). Catalytic conversion of lignin-derived aromatic compounds into chemicals. En *Lignin Valorization: Emerging Approaches*, pp. 159-198.

Lee SH, Lim V, Lee CK (2018). Newly isolate highly potential xylanase producer strain from various environmental sources. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 669-676.

Lehninger A, Nelson D, Cox M (2006). Principios de Bioquímica 4ª Edición, Ed. Omega, Barcelona, pp. 211-212.

Levin L, Villalba L, Da Re V, Forchiassin F, Papinutti L (2007). Comparative studies of loblolly pine biodegradation and enzyme production by Argentinean white rot fungi focused on biopulping processes. *Process Biochemistry*, 42(6), 995-1002.

Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B (2013). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D490-D495.

Lopes AM, Ferreira Filho EX, Moreira LRS (2018). An update on enzymatic cocktails for lignocellulose breakdown. *Journal of Applied Microbiology*, 125(3), 632-645.

Lund F (1995). Differentiating *Penicillium* species by detection of indole metabolites using a filter paper method. *Letters in Applied Microbiology*, 20, 228-231.

M.

MacCabe AP, Orejas M, Tamayo EN, Villanueva A, Ramón D (2002). Improving extracellular production of food-use enzymes from *Aspergillus nidulans*. *Journal of Biotechnology*, 96, 43–54.

- Machii Y, Hirai H, Nishida T (2004). Lignin peroxidase is involved in the biobleaching of manganese less oxygen-delignified hardwood kraft pulp by white-rot fungi in the solid fermentation system. *FEMS Microbiology Letters*, 233, 283-287.
- Manavalan T, Manavalan A, Heese K (2015). Characterization of lignocellulolytic enzymes from white-rot fungi. *Current Microbiology*, 70(4), 485-498.
- Martínez-Anaya C, Balcázar-López E, Dantán-González E, Folch-Mallol JL (2008). Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50(3), 119-131.
- Marx IJ, Van Wyk N, Smit S, Jacobson D, Viljoen-Bloom M, Volschenk H (2013). Comparative secretome analysis of *Trichoderma asperellum* S4F8 and *Trichoderma reesei* Rut C30 during solid-state fermentation on sugarcane bagasse. *Biotechnology for biofuels*, 6(1), 172.
- Mayer AM, Harel E (1979). Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*, 33, 765–767.
- Meijer M, Houbraken JAMP, Dalhuijsen S, Samson RA, de Vries RP (2011). Growth and hydrolase profiles can be used as characteristics to distinguish *Aspergillus niger* and other black aspergilli. *Studies in Mycology*, 69, 19–30.
- Menon G, Datta S (2017). Xylanases: From Paper to Fuel. In *Microbial Applications Vol. 1* (pp. 153-164). Springer, Cham.
- Messner K, Koller K, Wall M, Akhtar M, Scott G (1998). Fungal treatment of wood chips for chemical pulping. En Young R and Akhtar M *Environmentally Friendly Techniques for the Pulp and Paper Industry*, John Wiley & Sons, New York, pp. 385-419.
- Micheli PA (1729). *Nova plantarvm genera ivxta Tovrnefortii methodvm disposita*. Florence.
- Miller G (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Modig T, Almeida JM, Gorwa-Grauslund MF, Lidén G. (2008). Variability of the response of *Saccharomyces cerevisiae* strains to lignocelluloses hydrolysate. *Biotechnology and Bioengineering*, 100, 423-429.
- Moreira LR, Filho EX (2008). An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79, 165–178.
- Motta FL, Andrade CCP, Santana MHA (2013). A review of xylanase production by the fermentation of xylan: classification, characterization and applications. En: Chandel AK, da Silva SS, eds. *Sustainable degradation of lignocellulosic biomass—techniques, Applications and Commercialization*. Rijeca, Croacia: Intech. pp. 251–275
- Mougin C, Jolival C, Briozzo P, Madzak C (2003). Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. *Environmental Chemistry Letters*, 1, 145-148.
- Mueller G, Bills S, Foster M (2004). *Biodiversity of Fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press. Londres.
- Muñoz DM, Matta AJP, Guarín MFC (2014). Aprovechamiento de residuos agroindustriales como biocombustible y biorefinería. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 12(2), 10-19.
- Mura Escorche GK (2016). Papel de las xilanasas extracelulares de *Botrytis cinerea* en la virulencia. Tesis de grado. Universidad de la Laguna. España.

N.

Nanda S, Dalai AK, Kozinski JA (2014). Butanol and ethanol production from lignocellulosic feedstock: biomass pretreatment and bioconversion. *Energy Science & Engineering*, 2(3), 138-148.

National Renewable Energy Laboratory (NREL), <https://www.nrel.gov/> [Consulta: junio-setiembre de 2017].

Nilsson M, Andreas L, Lagerkvist A (2016). Effect of accelerated carbonation and zero valent iron on metal leaching from bottom ash. *Waste Management*, 51, 97-104.

Nivala O, Faccio G, Arvas M, Permi P, Buchert J, Kruus K, Mattinen ML (2017). Characterization of sulfhydryl oxidase from *Aspergillus tubingensis*. *BMC Biochemistry*, 18(1), 15.

O.

Oliveira LA, Porto AL Tambourgi EB (2006). Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. *Bioresource Technology*, 97(6), 862-867.

P.

Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Soccol VT, Vandenberghe LP, Mohan R (2000). Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Bioresource technology*, 74(1), 81-87.

Pardo AG, Forchiassin F (1999). Influence of temperature and pH on cellulase activity and stability in *Nectria catalinensis*. *Revista Argentina de Microbiología*, 31(1), 31-35.

Park S, Baker JO, Himmel ME, Parilla PA, Johnson DK (2010). Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels*, 3(1), 10.

Park HS, Jun SC, Han KH, Hong SB, Yu JH (2017). Diversity, application, and synthetic biology of industrially important *Aspergillus* fungi. *Advances in Applied Microbiology*, 100, 161-202.

Pel HJ, De Winde JH, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G, Schaap PJ, Turner G, ..., Stam H (2007). Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology*, 25(2), 221-231.

Pérez J, Muñoz-Dorado J, de la Rubia T, Martínez J (2002). Biodegradation and biotreatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5(2), 53-63.

Perrone G, Stea G, Epifani F, Varga J, Frisvad JC, Samson RA (2011). *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. *Fungal biology*, 115(11), 1138-1150.

Peterson S (2008). Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia*, 100(2), 205-226.

Pfam, Protein FAMILies, <http://pfam.xfam.org/> [Consulta: marzo - mayo de 2019].

Pitt JI (1979). The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London, UK.

Pitt JI, Hocking AD (1997). *Fungi and Food Spoilage*. 2º ed. Blackie Academic & Professional, Londres.

Polyphasic Identification, herramienta *online*, en el Instituto de Biodiversidad Fúngica Westerdijk, <http://www.westerdijkinstitute.nl/Aspergillus/Biolomicsid.aspx> [Consulta: marzo - mayo de 2018].

Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(5), 577-591.

Polizeli MLTM, Vici AC, Scarcella ASA, Cereia M, Pereira MG (2016). Enzyme System from *Aspergillus* in Current Industrial Uses and Future Applications in the Production of Second-Generation Ethanol. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, 127-140.

Prior BA, Day DF (2008). Hydrolysis of ammonia-pretreated sugar cane bagasse with cellulase, β -glucosidase, and hemicellulase preparations. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 146, 151-164.

ProYungas Fundación, <http://proyungas.org.ar/> [Consulta: 08 de mayo de 2019].

R.

Ramos FD, Díaz MS, Villar MA (2016). Biocombustibles. En Asociación Civil Ciencia Hoy. Ciencia Hoy, Argentina, 147 pp. 69-73.

Raper KB, Fennell DI (1965). The genus *Aspergillus*. En *The genus Aspergillus*. Williams and Wilkins, Baltimore, 736-737.

Raper KB, Thom C (1949). *A manual of the Penicillia*. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.

Regner EL, Salvatierra HN, Baigorí MD, Pera LM (2019). Biomass-bound biocatalysts for biodiesel production: Tuning a lipolytic activity from *Aspergillus niger* MYA 135 by submerged fermentation using agro-industrial raw materials and waste products. *Biomass and Bioenergy*, 120, 59-67.

Rodríguez MD, Barchuk ML, Fonseca MI, Zapata PD, Villalba L (2015). Effect of wood flour as carbon source on cellulases and xylanases production by white-rot-fungi native from Misiones. *Journal of Advances in Biotechnology*, 5, 526-533.

Rodríguez MD, Castrillo ML, Velázquez JE, Kramer GR, Sedler C, Zapata PD, Villalba LL (2017). Obtención de azúcares fermentables a partir de aserrín de pino pretratado secuencialmente con ácido-base. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(2), 317-324.

Rodríguez MD, Paiva IMA, Castrillo ML, Zapata PD, Villalba LL (2018). KH₂PO₄ improves cellulase production of *Irpex lacteus* and *Pycnoporus sanguineus*. *Journal of King Saud University-Science*.

Royer J, Nakas J (1989). Xylanase production by *Trichoderma longibrachiatum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 11, 405-410.

Rubio GD (2014). Baseline richness of Salticidae (Araneae) from Misiones, Argentina. *Peckhamia*, 118(1), 1-21.

Russell E, Kaplan J, Joiner D, Helmy H, Reeves S (2019). Yeast fermentation rates according to ethanol production: looking at similar respiration rates of monosaccharides. *Journal of Undergraduate Biology Laboratory Investigations*, 2(1).

S.

Sajith S, Priji P, Sreedevi S, Benjamin S (2016). An overview on fungal cellulases with an industrial perspective. *Journal of Nutrition and Food Science*, 6(1), 1-13.

Salcedo Mendoza JG, Flórez Pardo LM, López Galán JE (2011). Evaluación de enzimas para la hidrólisis de residuos (hojas y cogollos) de la cosecha caña de azúcar. *Dyna*, 78(169), 182-190.

Sales MR, de Moura RB, da Silva MF, de Macedo GR y Porto ALF (2011). Cellulase and xylanase production by *Aspergillus* species. *Annals of Microbiology*, 61(4), 917-924.

Samson RA, Houbraken JA, Kuijpers AF, Frank JM (2004). New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, 50, 45-61.

Samson RA, Noonim P, Meijer M, Houbraken JAMP, Frisvad JC, Varga J (2007). Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Studies in Mycology*, 59, 129-145.

Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, Varga J, Kocsub'e S, Szigeti G, Yaguchi T, Frisvad JC (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78, 141-173.

Samuels GJ, Ismaiel A (2009). *Trichoderma evansii* and *T. lieckfeldtia*: two new *T. hamatum*-like species. *Mycologia*, 101, 142-156.

Sánchez C (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 27(2), 185-194.

Sánchez-Riaño AM, Gutiérrez A, Muñoz J, Rivera C. (2010). Bioethanol production from agroindustrial lignocellulosic byproducts. *Revista Tumbaga*, 5, 61-91.

Saparrat MC, Martínez MJ, Cabello MN, Arambarri AM (2002). Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. *Revista Iberoamericana de Micología*, 19(3), 181-185.

Sarkar N, Aikat K (2012). Alkali pretreatment of rice straw and enhanced cellulase production by a locally isolated fungus *Aspergillus fumigatus* NITDGPKA3. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2(5), 717-726.

Saykhedkar S, Ray A, Ayoubi-Canaan P, Hartson SD, Prade R, Mort AJ (2012). A time course analysis of the extracellular proteome of *Aspergillus nidulans* growing on sorghum stover. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), 52.

Schneider WDH, Gonçalves TA, Uchima CA, Couger MB, Prade R, Squina FM, Pinheiro Dillon AJ, Camassola M (2016). *Penicillium echinulatum* secretome analysis reveals the fungi potential for degradation of lignocellulosic biomass. *Biotechnology for biofuels*, 9(1), 66.

SecretomeP, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/> [Consulta: marzo de 2019].

Shahzadi T, Mehmood S, Irshad M, Anwar Z, Afroz A, Zeeshan N, Sughra K (2014). Advances in lignocellulosic biotechnology: A brief review on lignocellulosic biomass and cellulases. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5(03), 246.

- Shallom D, Shoham Y (2003). Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 219-228.
- Sharma M, Roni R, Asiya N, Harinder SO, Bhupinder SC (2011). Evaluation of glycosyl hydrolases in the secretome of *Aspergillus fumigatus* and saccharification of alkali-treated rice straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163(5), 557–591.
- Sheth DB, Patel PR, Patil RK (2018). Influence of media, temperatures and pH on the growth and sporulation of *Aspergillus niger*. *International Journal of Chemical Studies*, 6(2), 1791-1794.
- SignalP 4.1, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> [Consulta: marzo de 2019].
- Silva DM, Batista LR, Rezende EF, Fungaro MHP, Sartori D, Alves E (2011). Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *nigri* using polyphasic taxonomy. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(2), 761–773.
- Silva CR, Silva MLC, Kamida HM, Goes-Neto A y Koblitz MGB (2014). Lytic enzyme production optimization using low-cost substrates and its application in the clarification of xanthan gum culture broth. *Food Science & Nutrition*, 2(4), 299-307.
- Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6, 174.
- Singh S, Sidhu GK, Kumar V, Dhanjal DS, Datta S, Singh J (2019). Fungal Xylanases: Sources, Types, and Biotechnological Applications. In *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi* (pp. 405-428). Springer, Cham.
- Singhania RR, Patel AK, Sukumaran RK, Larroche C, Pandey A (2013). Role and significance of beta-glucosidases in the hydrolysis of cellulose for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 127, 500-507.
- Singhania RR, Adsul M, Pandey A, Patel AK (2016). Cellulases. En: Pandey A, Negi S, Soccol C. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products*. Elsevier, pp. 73–101.
- Smith Jr HL, Goodner K (1958). Detection of bacterial gelatinases by gelatin-agar plate methods. *Journal of Bacteriology*, 76(6), 662.
- Sohail M, Naseeb S, Sherwani SK, Sultana S, Aftab S, Shahzad S, ... Khan SA (2009). Distribution of hydrolytic enzymes among native fungi: *Aspergillus* the pre-dominant genus of hydrolase producer. *Pakistan Journal of Botany*, 41(5), 2567-2582.
- Soliman SA, El-Zawahry YA, El-Mougith AA (2013). Fungal biodegradation of agroindustrial waste. En Kadla, PJ, ed. *Cellulose-Biomass Conversion*. InTech, pp. 75-100.
- Souza-Querido A, Cavalcante Coelho J, Fernandes de Araújo E, Chaves-Alves V (2006). Partial purification and characterization of xylanase produces by *Penicillium expansum*. Brazilian Archives of Biology and Technology. *An International Journal*, 49(3), 475-480.
- Štursová M, Žifčáková L, Leigh MB, Burgess R, Baldrian P (2012). Cellulose utilization in forest litter and soil: identification of bacterial and fungal decomposers. *FEMS microbiology ecology*, 80(3), 735-746.
- Subramaniyan S, Sandhia GS, Prema P (2001). Control of xylanase production without protease activity in *Bacillus* sp. by selection of nitrogen source. *Biotechnology Letters*, 23, 369–371.
- Subramaniyan S, Prema P (2002). Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Critical reviews in biotechnology*, 22(1), 33-64.

Sun Y, Cheng J (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83(1), 1-11.

T.

Thom C, Church MB (1926). The aspergilli. *The Aspergilli*.

Tien M, Kirk TK (1983). Lignin-Degrading Enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science*, 221, 661-663.

Tsang A, Butler G, Powlowski J, Panisko EA, Baker SE (2009). Analytical and computational approaches to define the *Aspergillus niger* secretome. *Fungal Genetics Biology*, 46(1), S153–S160.

U.

Uasuf A, Hilbert, J (2012). El uso de la biomasa de Origen Forestal con destino a bioenergía en la Argentina. *Ediciones INTA, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)*.

Unidad de Manejo del Sistema de Evaluación Forestal -UMSEF- del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sustentable -MAyDS, <https://www.argentina.gob.ar/ambiente> [Consulta: 08 de mayo de 2019].

UNIPROT, the UNiversal PROTein Resource, <http://www.uniprot.org> [Consulta: marzo - abril de 2019].

V.

Van Dyk JS, Pletschke BI (2012). A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes—factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology advances*, 30(6), 1458-1480.

Varga J, Frisvad JC, Kocsubé S, Brankovics B, Tóth B, Szigeti G, Samson RA (2011). New and revisited species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, 69, 1-17.

Vermelho AB, Meirelles MNL, Lopes A, Petinate SDG, Chaia AA, Branquinha MH (1996). Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91(6), 755-760.

Vesth TC, Nybo JL, Theobald S, Frisvad JC, Larsen TO, Nielsen KF, ..., Gladden JM (2018). Investigation of inter- and intraspecies variation through genome sequencing of *Aspergillus* section *Nigri*. *Nature Genetics*, 50(12), 1688-1695.

Vijayaraghavan P, Vincent SGP (2013). A simple method for the detection of protease activity on agar plates using Bromocresol Green dye. *Journal of Biochemical Technology*, 4(3), 628-630.

von Hertwig AM, Sant'Ana AS, Sartori D, da Silva JJ, Nascimento MS, Iamanaka BT, ..., Taniwaki MH (2018). Real-time PCR-based method for rapid detection of *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae* isolated from coffee. *Journal of microbiological methods*, 148, 87-92.

W.

Wang W, Chen W, Zou M, Lv R, Wang D, Hou F, ..., Ye X (2018). Applications of power ultrasound in oriented modification and degradation of pectin: A review. *Journal of Food Engineering*, 234, 98-107.

Wei H, Xu Q, Taylor II LE, Baker JO, Tucker MP, Ding SY (2009). Natural paradigms of plant cell wall degradation. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 330–338.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. Academic Press, San Diego, 315-322.

Wong K, Tan L, Saddler J (1988). Multiplicity of β -1,4-Xylanase in Microorganisms: Function and Applications. *Microbiological Reviews*, 52(3), 305-317.

Wu B, Zhao Y, Gao PJ (2006). Estimation of cellobiohydrolase I activity by numerical differentiation of dynamic ultraviolet spectroscopy. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 38(6), 372-378.

Wu M, Beckham GT, Larsson AM, Ishida T, Kim S, Payne, CM, ..., Igarashi K (2013). Crystal structure and computational characterization of the lytic polysaccharide monooxygenase GH61D from the Basidiomycota fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biological Chemistry*, 288(18), 12828-12839.

Y.

Yergeau E, Filion M, Vujanovic V, St-Arnaud M (2005). A PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to assess *Fusarium* diversity in asparagus. *Journal of Microbiological Methods*, 60, 143-154.

Z.

Zini PL (2013). Aislamiento e identificación de cepas nativas de *Aspergillus* y *Penicillium* con capacidad de secretar enzimas celulolíticas. Tesis de grado. Universidad Nacional de Misiones. Misiones, Argentina.

ANEXOS



9. ANEXOS

Anexo 1. Lista de especies y números de acceso del *GenBank* utilizados para la construcción de los árboles con las secuencias concatenadas de ITS-Bt-CMD.

Espece	Nombre Tipo	ITS	Bt	CAM
<i>A. acidus</i>	CBS 564.65	AJ280009	AY585533	AY585533
<i>A. aculeatinus</i>	CBS 121060	EU159211	EU159220	EU159241
<i>A. aculeatus</i>	CBS 172.66	AJ279988	AY585540	AJ964877
<i>A. awamori</i>	CBS 557.65	AM087614	AY820001	AJ964874
<i>A. brasiliensis</i>	CBS 101740	AJ280010	AY820006	AM295175
<i>A. carbonarius</i>	CBS 111.26	DQ900605	AY585532	AJ964873
<i>A. coreanus</i>	CBS 119384	FJ491684	FJ491693	FJ4916702
<i>A. costaricaensis</i>	CBS 115574	DQ900602	AY820014	EU163268
<i>A. ellipticus</i>	CBS 707.79	AJ280014	AY585530	AM117809
<i>A. eucalypticola</i>	CBS 122712	EU482439	EU482435	EU482433
<i>A. fijiensis</i>	CBS 119.49	FJ491679	FJ491689	FJ491701
<i>A. fijiensis</i>	CBS 313.89	FJ491680	FJ491688	FJ491695
<i>A. foetidus</i>	CBS 121.28	FJ491683	FJ491690	FJ491694
<i>A. foetidus</i>	CBS 114.49	EF661187	EF661090	EF661155
<i>A. heteromorphus</i>	CBS 117.55	AJ280013	AY585529	AM421461
<i>A. foetidus</i>	CBS 114.49	EF661187	EF661090	EF661155
<i>A. heteromorphus</i>	CBS 117.55	AJ280013	AY585529	AM421461
<i>A. homomorphus</i>	CBS 101889	EF166063	AY820015	AM887865
<i>A. ibericus</i>	CBS 121593	AY656625	AM419748	AJ971805
<i>A. indologenus</i>	CBS 114.80	AJ280005	AY585539	AM419750
<i>A. japonicus</i>	CBS 114.51	AJ279985	AY585542	AJ964875
<i>A. lacticoffeatus</i>	CBS 101883	DQ900604	AY819998	EU163270
<i>A. neoniger</i>	CBS 115657	FJ491681	FJ491692	FJ491699
<i>A. neoniger</i>	CBS 115656	FJ491682	FJ491691	FJ491700
<i>A. niger</i>	CBS 554.65	AJ223852	AY585536	AJ964872
<i>A. piperis</i>	CBS 112811	DQ900603	AY820013	EU163267
<i>A. sclerotii carbonarius</i>	CBS 121057	EU159216	EU159229	EU159235
<i>A. saccharolyticus</i>	CBS 127449	HM853552	HM853553	HM853554
<i>A. sclerotioniger</i>	CBS 115572	DQ900606	AY819996	EU163271
<i>A. tubingensis</i>	CBS 134.48	AJ223853	AY820007	AJ964876

Anexo 1. (continua)

Especie	Nombre Tipo	ITS	Bt	CAM
<i>A. uvarum</i>	CBS 121591	AM745751	AM745751	AM745755
<i>A. vadensis</i>	CBS 113365	AY585549	AY585531	EU163269
<i>A. violaceofuscus</i>	CBS 115571	EU482440	EU482434	EU482432
<i>A. violaceofuscus</i>	CBS 123.27	FJ491678	FJ491685	FJ491698
<i>A. violaceofuscus mut. Grisea</i>	CBS 122.35	FJ491676	FJ491687	FJ491696
<i>A. violaceofuscus</i>	CBS 102.23	FJ491677	FJ491686	FJ491697
<u>Grupo externo</u>				
<i>A. flavus</i>	CBS 100927	KJ175414	AY819992	EF202063

Anexo 2. Análisis de la varianza para la actividad EX de cada aislamiento fúngico.

Fuente	SC	GL	CM	valor F	valor P
LBM 041					
Inter-grupos	4,08899E8	9	4,54332E7	3,95	0,0217
Intra-grupos	1,15092E8	10	1,15092E7		
Total (Corr.)	5,23991E8	19			
LBM 043					
Inter-grupos	8,36335E8	9	9,29261E7	27,18	0,0000
Intra-grupos	3,41866E7	10	3,41866E6		
Total (Corr.)	8,70522E8	19			
LBM 046					
Inter-grupos	1,30502E8	9	1,45002E7	17,22	0,0001
Intra-grupos	8,41883E6	10	841883		
Total (Corr.)	1,3892E8	19			
LBM 048					
Inter-grupos	6,004E8	9	6,67111E7	12,00	0,0003
Intra-grupos	5,56127E7	10	5,56127E6		
Total (Corr.)	6,56012E8	19			
LBM 051					
Inter-grupos	5,9885E8	9	6,65389E7	20,32	0,0000
Intra-grupos	3,27472E7	10	3,27472E6		
Total (Corr.)	6,31598E8	19			
LBM 053					
Inter-grupos	1,70282E8	9	1,89202E7	9,19	0,0009
Intra-grupos	2,058E7	10	2,058E6		
Total (Corr.)	1,90862E8	19			
LBM 054					
Inter-grupos	5,26822E8	9	5,85358E7	19,71	0,0000
Intra-grupos	2,97026E7	10	2,97026E6		
Total (Corr.)	5,56524E8	19			

Anexo 2. (continua)

Fuente	SC	GL	CM	valor F	valor P
LBM 055					
Inter-grupos	1,22233E9	9	1,35815E8	158,76	0,0000
Intra-grupos	8,55487E6	10	855487		
Total (Corr.)	1,23089E9	19			
LBM 056					
Inter-grupos	2,47146E7	9	2,74606E6	4,71	0,0118
Intra-grupos	5,82606E6	10	582606		
Total (Corr.)	3,05406E7	19			
LBM 057					
Inter-grupos	5,42149E8	9	6,02388E7	28,50	0,0000
Intra-grupos	2,11351E7	10	2,11351E6		
Total (Corr.)	5,63284E8	19			
LBM 058					
Inter-grupos	6,07998E8	9	6,75554E7	71,14	0,0000
Intra-grupos	9,49653E6	10	949653		
Total (Corr.)	6,17495E8	19			
LBM 059					
Inter-grupos	7,00114E8	9	7,77904E7	18,35	0,0000
Intra-grupos	4,23812E7	10	4,23812E6		
Total (Corr.)	7,42495E8	19			
LBM 063					
Inter-grupos	3,26772E8	9	3,6308E7	6,03	0,0048
Intra-grupos	6,01847E7	10	6,01847E6		
Total (Corr.)	3,86957E8	19			
LBM 126					

SC, suma de cuadrados; GL, grados de libertad; SC, suma de cuadrados

Anexo 3. Análisis LSD para actividad EX por día de todos los aislamientos fúngicos.

LBM 041			LBM 043			LBM 046			LBM 048		
Día	Media	GH	Día	Media	GH	Día	Media	GH	Día	Media	GH
2	2571,08	X	2	5133,72	X	2	5597,59	X	2	5146,7	X
4	7678,85	XX	4	10364,8	X	18	6740,08	XX	4	10170,1	XX
18	8686,39	XX	18	12695,8	X	4	8373,03	XX	20	12390,2	XX
6	9947,28	XX	20	12968,3	X	6	9266,07	XX	18	12647,1	XX
20	10623,0	XX	6	13937,2	XX	20	9815,25	XXX	6	13085,7	XX
8	11158,2	XX	8	17279,4	XX	12	10738,5	XX	10	14371,6	XX
12	12697,7	X	16	21028,0	XX	8	11070,6	XX	8	15946,1	XX
14	14215,9	X	10	22000,2	X	10	11535,1	X	16	20664,6	XX
16	14708,9	X	12	22919,7	X	14	13696,8	X	12	20846,3	XX
10	15461,5	X	14	27696,0	X	16	13787,7	X	14	24809,0	X

Anexo 3. (continua)

LBM 051			LBM 053			LBM 054			LBM 055		
Día	Media	GH	Día	Media	GH	Día	Media	GH	Día	Media	GH
2	4627,68	X	2	4205,98	X	2	4345,47	X	2	5480,81	X
18	6993,1	XX	4	6180,19	XX	4	7879,97	X	4	9884,67	X
4	7575,05	XX	10	7713,23	XX	10	12258,1	X	8	12326,0	X
20	10146,1	XX	6	7749,56	XX	6	12315,3	XX	6	13402,0	XX
6	10531,2	XX	8	8073,3	XX	18	12481,7	XX	20	13990,1	XX
8	14077,7	XX	16	9143,77	XX	8	14862,2	XXX	18	14885,4	X
10	17621,5	X	14	9786,06	X	20	16121,3	XX	10	22598,0	X
16	17810,1	X	12	10233,7	X	12	16631,8	XX	16	26232,0	X
12	17849,0	X	18	10428,3	X	16	20136,9	XX	14	27512,0	XX
14	21970,6	X	20	15780,7	X	14	22645,7	X	12	29482,4	X

Anexo 3. (continua)

LBM 056			LBM 057			LBM 058			LBM 059		
Día	Media	GH	Día	Media	GH	Día	Media	GH	Día	Media	GH
18	4871,62	X	2	5964,15	X	2	5711,13	X	2	5779,25	X
10	4891,08	X	18	9766,59	X	18	6623,3	X	4	8061,62	X
2	5081,82	XX	4	9800,33	X	4	8807,71	X	18	8812,9	XX
8	5348,46	XX	6	12307,2	XX	20	10019,6	X	20	10019,6	XX
4	5719,56	XX	20	12890,4	XX	16	12217,6	X	6	13150,6	XX
12	6025,98	XX	8	13951,2	XX	6	13361,4	X	8	14671,3	X
14	6285,04	XX	16	15331,7	XX	8	13464,6	X	16	14851,7	X
6	6508,79	XX	10	16616,3	X	10	19094,6	X	10	19820,3	X
16	6690,12	X	14	20754,2	X	14	20867,7	XX	12	20300,6	X
20	8773,97	X	12	24630,6	X	12	22181,5	X	14	25360,4	X

Anexo 3. (continua)

LBM 063			LBM 126			LBM 127			LBM 128		
Día	Media	GH	Día	Media	GH	Día	Media	GH	Día	Media	GH
2	5925,22	X	2	4137,86	X	2	3106,31	X	2	4686,07	X
4	8866,1	XX	4	7107,93	XX	4	4759,38	XX	4	7711,29	XX
18	9620,62	XXX	18	9075,65	XX	10	5543,1	XX	18	10506,2	XX
20	11781,0	XXX	20	10574,3	XXX	8	5805,85	XX	20	10963,6	XXX
6	13629,0	XXXX	6	12177,4	XXX	12	7187,73	X	6	13093,8	XXX
8	13920,6	XXXX	8	13571,6	XXX	18	12102,2	X	8	15226,0	XXX
16	14441,6	XXX	10	15214,1	XXX	14	12218,9	X	16	16207,1	XX
10	15347,2	XXX	14	16772,0	XXX	6	13150,6	X	10	17665,5	X
14	17781,0	XX	16	18082,5	XX	16	14053,2	X	14	22100,4	X
12	20202,7	X	12	19743,4	X	20	17435,1	X	12	22376,1	X

Anexo 3. (continua)

LBM 129			LBM 130			LBM 131			LBM 132		
Día	Media	GH	Día	Media	GH	Día	Media	GH	Día	Media	GH
2	4586,07	X	10	2750,14	X	2	6080,93	X	2	5964,15	X
4	7661,29	XX	18	5095,44	X	4	6485,11	X	4	9800,33	X
18	10406,2	XX	2	5201,84	X	20	11323,6	X	18	10266,6	X
20	10913,6	XXX	20	5961,55	X	18	12114,2	X	20	11890,4	XX
6	12993,8	XXX	14	6389,74	XX	6	13891,4	X	6	12807,2	XX
8	15126,0	XX	4	7730,75	XX	8	14145,8	X	8	13951,2	X
16	16607,1	X	16	8441,8	X	16	16680,3	X	16	15331,7	X
10	17115,5	X	6	8760,75	X	10	17057,5	X	10	21616,3	X
14	22000,4	X	8	8857,87	X	14	25113,8	X	14	28254,2	X
12	22276,1	X	12	10990,2	X	12	26430,9	X	12	29415,6	X

Anexo 3. (continua)

LBM 133			LBM 134			LBM 135			LBM 136		
Día	Media	GH	Día	Media	GH	Día	Media	GH	Día	Media	GH
2	6586,97	X	2	4676,34	X	2	4932,6	X	2	4819,07	X
4	8879,07	X	4	8470,35	XX	4	8470,35	X	4	7522,98	XX
20	12013,2	X	6	10474,4	XX	20	8857,87	X	6	8112,26	XX
6	13539,6	XX	18	12287,1	XXX	18	9318,94	X	20	9488,74	XX
18	13844,1	XX	20	12504,9	XXX	6	13150,6	X	18	9647,8	XX
8	14496,1	XX	8	13592,4	XXXX	8	13458,5	X	8	10176,3	XX
10	15267,8	X	16	15396,6	XXX	10	15110,3	X	16	12297,1	X
16	18225,3	X	10	17005,6	XX	16	15858,6	X	10	13099,1	XX
14	21581,4	X	14	19229,6	X	14	21657,4	X	14	16297,1	XX
12	26982,4	X	12	27522,6	X	12	23819,6	X	12	19156,5	X

Anexo 3. (continua)

LBM 210			LBM 117		
Día	Media	GH	Día	Media	GH
2	4536,07	X	2	5295,91	X
4	7561,29	XX	4	10053,3	X
18	10356,2	XX	18	10496,5	X
20	10863,6	XXX	6	11561,1	X
6	12943,8	XXX	20	11635,1	XX
8	15076,0	XXX	8	14252,8	XX
16	16507,1	XX	10	16447,6	XX
10	18015,5	XX	14	16564,4	XXX
14	21950,4	XX	12	18199,3	XX
12	22321,1	X	16	19146,5	X

GH: grupos homogéneos

Anexo 4. Secuencias consenso de las regiones amplificadas del aislamiento *A. niger* LBM 134.

Región amplificada	Secuencia 5' – 3'
ADNr ITS1-5,8s- ITS2	CTTCCGTAGGGTGACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGTCCTTTGG GCCCAACCTCCCATCCGTGTCTATTGTACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCC GCTTGTGCGCCGCCGGGGGGCGCCTCTGCCCCCGGGCCCGTGCCTCGCC GGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGA ATGCAATCAGTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCGGGCATCGATGA AGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA TCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTG TCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTGCGCCGTCC CCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCCGCTCCGAT CCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTG CCGACGTTTTCCAACCTTCTTCCAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATA CCCGCTGAACTTAAGCATATCTAAAAA
Dominio D1/D2 del ADNr 28S	AAAGGGAGGAAAAGAAACCAACCGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAA GCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCTCCTTCGGAGTCCGCATTGTAAT TTGCAGAGGATGCTTTGGGTGCGGCCCCCGTCTAAGTGCCCTGGAACGGGC CGTCAGAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTGGGCGGGGTGCCGTGCCCGTGTA AAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGT AAATTTTCATCTAAAGCTAAATACTGGCCGAGACCGATAGCGCACAAGTAGA GTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAACAGCACGTGAA ATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCAGCCAGACTCGCCCGCGGGTTTCAGCCG GCATTCGTGCCGGTGTACTTCCCCGTGGGCGGGCCAGCGTCCGTTTGGGCGG CCGGTCAAAGGCCCTGGAATGTAGTGCCCTCCGGGGCACCTTATAGCCAGG GGTGCAATGCGGCCAGCCTGGACCGAGGAACGCGCTTCGGCACGGACGCTG GCATAATGGTTCGTAACGACCCGTCT
Bt, exones 3,4,5 y región parcial del 6	ATGGGCTGCTTCTGGTACGTATACTGCCATTGGATTGGGGATGGAACAT CGTCTTAGGCTATCTCAGCTTGAGTTCAGATGTTGTCCATTAGGTACATGCT ATCGGTCTAAGAACACGTCTAACAATTCAACAGGCAGACCATCTCTGGCGAG CACGGCCTTGACGGCTCCGGTGTGTAAGTGCAACTTTTTACACCTCTCAATTG GTCAACAATGGGCAAAGGGTTGGGTCTTCTGACACGCAGGATAGTTACAATGG CACCTCCGACCTCCAGCTGGAGCGCATGAACGTCTACTTCAACGAGGTGAGAT

	<p>CCATCGGACCTTGGCTTTTTCACGACAATATCATCAATGTCCTAATCACTTCAGC AGGCTAGCGGTAACAAGTATGTTCCCTCGTGCCGTCCTCGTCGACCTCGAGCCCG GTACCATGGACGCCGTCCGTGCCGGTCTTTTCGGCCAGCTCTCCGCCCCGACA ACTTCGTCTTCGGCCAGTCCGGTGCTGGTAACAACCTGGGCCAAGGGTC</p>
CMD, exones 2, 3, 4 y región parcial del 5	<p>CCTTCTCCCTCTTTGTGAGTGCTCCCTGAATGACCCTCCGATCATCCTGATCG ATGAGCTATCTTTACCGGAGCATAATGCTAATGTGTTTTTCGGACTTAATAGG ACAAGGATGGCGATGGTGGGTGGAATTCTATCCCCTTCACATTATACCTGTA GCGCTCGATCCGACTGCGGGATTTTCGACAGCATTTCAGAACGATTTGGAT CATAATACTAATTTAAATCGGTGAATCAGGCCAGATCACCACCAAGGAGCTC GGCACTGTGATGCGCTCCCTTGCCAGAACCCCTCCGAGTCTGAGCTTCAGG ACATGATCAACGAGGTTGACGCTGACAACAACGGAACGATCGACTTCCCCG GTATGTGTTAGATTTACGCCTGTAAGGCGGAAATGCGGGCTGGATTGTGATT GACTTTTGCCGCCAGAATTCCTTACCATGATGGCTCGTAAGATGAAGGACAC CGACTCCGAGGAGGAAATCCGCGAGGCTTTCAAGGTCTTCGACCGCGACAA CAATGGTTTTATCTCCGCCGCGGAGCTGCGCCACG</p>
Tef 1 α , exones 1 y 2	<p>GCAGTCGACTCCGGCAAGTCCACCACCACTGGTCACCTGATCTACAAGTGCG GTGGTATCGACCAGCGTACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTAAGGAGGATTAT ACATCTGAAAGAAGAATATCAAGACATGGTGCTAACAACATCCTACAGGAAG CCGCCGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTTGGGTTCTTGACAAGCTC AAGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTGGAAGTTCCA GACTGGCAAGTATGAGGTCACCGTCATTGGTAAGTACTATCACAGAGTTCTCTC GATCAAATTAACATACTAACGTACATGATAGACGCCCCCGGTCACCGTGACTTC ATCAAGAACATGATCACTGGTACCTCCCAGGCTGACTGCGCTATCCTCATCATT GCCTCCGGTACTGGTGAGTTCGAGGCTGGTATCTCCAAGGATGGC</p>