

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

*Doctoranda*  
**Lic. Mónica Lucrecia Barchuk**

**Caracterización bioquímica y genética de endoxilanasas secretadas por *Trichoderma sp.* nativos de Misiones para su utilización en el proceso de pretratamiento.**

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

*Director*  
**Dr. Pedro Darío ZAPATA**

*Co-Directora*  
**Dra. María Isabel FONSECA**

**Posadas, 2017**



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



## TÍTULO

Caracterización bioquímica y genética de endoxilanasas secretadas por *Trichoderma* sp. nativos de Misiones para su utilización en el proceso de pretratamiento.

**Por Lic. Mónica Lucrecia Barchuk**

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  
**2017**

**Director**

Dr. Pedro Darío ZAPATA

**Co-director**

Dra. María Isabel FONSECA

**TRIBUNAL EXAMINADOR**

Dr. Laura Noemí LEVIN	Universidad Nacional de Buenos Aires
Dr. Graciela Beatriz GAVAZZO	Universidad Nacional de Misiones
Dr. Martha Helena VON SPETCH	Universidad Nacional de Misiones

**DEFENSA ORAL Y PÚBLICA** (Resolución Consejo Directivo N°)

2017

## **TÍTULO TESIS**

Caracterización bioquímica y genética de endoxilanasas secretadas por *Trichoderma* sp. nativos de Misiones para su utilización en el proceso de pretratamiento.

**Mónica Lucrecia Barchuk**

### **Lugar de desarrollo del trabajo de tesis**

Laboratorio de Biotecnología Molecular. Instituto de Biotecnología Misiones "María Ebe Recca". Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales

### **COMISIÓN DE SUPERVISIÓN (Resolución Consejo Directivo N°)**

Dr. María Victoria BUSI  
Universidad Nacional de Rosario

Dr. María Alicia MARTOS  
Universidad Nacional de. Misiones

Dr. Graciela Beatriz GAVAZZO  
Universidad Nacional de. Misiones

*Esta tesis está dedicada a mis hijas*

*Candela y Martina*

*Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que me han brindado apoyo y colaboración a lo largo de la realización de este trabajo:*

*A la Universidad Nacional de Misiones, a la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales por permitirme seguir formándome académicamente.*

*Al doctorado en Ciencias Aplicadas, a su directora, la Dra. Alicia Ares y su equipo por su predisposición y amabilidad.*

*A los integrantes de la comisión de supervisión la Dra. Marina Quiroga, Dra. Alicia Martos, Graciela Gavazzo y la Dra. Victoria Busi por su aporte y su predisposición.*

*A la directora del InBioMis, la Dra. Laura Villalba, por haber confiado en mí y haberme brindado un espacio para trabajar.*

*A mi director, el Dr. Pedro Zapata, por haberme enseñado a trabajar, por sus consejos y acompañamiento durante todo el trabajo.*

*A mi co- directora, la Dra. María Fonseca, por su confianza, por sus sabios consejos, su compromiso y predisposición, por la motivación constante y sobre todo por su gran amistad.*

*A los chicos del laboratorio, en particular a Marce, por la ayuda constante en este trabajo, porque entre trabajo, charlas y mate me has brindado un apoyo genuino, por haberme contenido en muchos momentos, gracias por tu amistad. A Gabi, a Romi y a Kari por haber estado siempre firmes, trabajando a la par, su consejo y su predisposición. A Loli, Dani, Martín, Gus, Gastón, Juan, Laura, Sil, Adri y a todos los integrantes del InBioMis, por haber hecho de este instituto mi segundo hogar.*

*A mi familia, a mis papás, Isabel y Raúl y mis hermanos Flo y Julián por tanto amor y haber hecho de mí la persona que soy, a mis suegros Mari y José y Yamila por su apoyo y motivación y por haber entre todos habernos acompañado a cuidar a la nenas.*

*A mi amor Cristian por su apoyo y tolerancia a mis tantas horas de trabajo y cursos, pero especialmente por haberme dado dos hermosas hijas y formar tan linda familia.*

*Sin ellos, esta tesis no hubiese sido posible, MUCHAS GRACIAS!!*

# 1 ÍNDICE

1	ÍNDICE.....	VI
2	ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
3	ÍNDICE DE TABLAS .....	XV
4	RESUMEN .....	16
5	INTRODUCCIÓN .....	19
5.1	ANTECEDENTES GENERALES .....	19
5.2	BIOCOMBUSTIBLES: BIOETANOL.....	20
5.3	BIOMASA LIGNOCELULÓSICA .....	22
5.3.1	Composición de la biomasa lignocelulósica.....	22
5.3.1.1	Celulosa .....	22
5.3.1.2	Hemicelulosa.....	23
5.3.1.3	Lignina.....	24
5.3.1.4	Extrativos .....	24
5.4	TRANSFORMACIÓN DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA A ETANOL .....	25
5.5	BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR COMO BIOMASA RESIDUAL .....	27
5.6	ORGANISMOS LIGNOCELULOLÍTICOS .....	29
5.6.1	<i>Trichoderma</i> .....	29
5.6.2	Importancia del género <i>Trichoderma</i> .....	30
5.7	COMPLEJO ENZIMÁTICO XILANOLÍTICO.....	32
5.7.1	Clasificación de xilanasas.....	33
5.7.1.1	Endo-1,4- $\beta$ -D-xilanasas.....	35
5.7.2	Inmovilización de enzimas .....	35
5.8	Aplicación de xilanasas para la producción de bioetanol.....	37

<b>6</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
<b>6.1</b>	<b>Objetivo general.....</b>	<b>40</b>
<b>6.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
<b>7.1</b>	<b>EVALUACIÓN DE LA HABILIDAD XILANOLÍTICA DE CEPAS DE <i>Trichoderma</i> NATIVOS DE LA PROVINCIA DE MISIONES. ....</b>	<b>42</b>
7.1.1	Selección cualitativa.....	42
7.1.1.1	Material biológico.....	42
7.1.1.2	Medio de cultivo.....	42
7.1.1.2.1	Medio de cultivo para mantención de cepas.....	42
7.1.1.2.2	Medio de cultivo para la selección.....	42
7.1.1.3	Detección de la actividad xilanolítica .....	43
7.1.2	Selección cuantitativa.....	43
7.1.2.1	Material biológico.....	43
7.1.2.2	Medio de cultivo.....	43
7.1.2.2.1	Medio de cultivo líquido para la selección.....	43
7.1.2.2.2	Medio líquido utilizado como control para la selección. ....	44
7.1.2.3	Inoculación.....	44
7.1.2.4	Determinación de la actividad enzimática .....	44
7.1.2.5	Análisis estadístico .....	45
<b>7.2</b>	<b>Evaluación de la actividad xilanolítica en medio conteniendo bagazo como fuente de carbono.....</b>	<b>45</b>
7.2.1	Material biológico. ....	45
7.2.2	Medio de cultivo, inoculación y condiciones de cultivo. ....	45
7.2.3	Caracterización bioquímica de la actividad xilanolítica presentes en los sobrenadantes de cultivo producidos. ....	46
7.2.3.1	Zimograma.....	46
7.2.3.2	pH óptimo.....	46
7.2.3.3	Temperatura óptima.....	47
7.2.3.4	Termoestabilidad .....	47
7.2.3.5	Estabilidad en pH .....	48
7.2.4	Análisis estadístico .....	48
<b>7.3</b>	<b>Caracterización del potencial xilanolítico de <i>T. atroviride</i> LBM 117. ....</b>	<b>48</b>
7.3.1	Identificación molecular.....	48
7.3.1.1	Extracción, purificación y cuantificación de ADN genómico obtenido a partir de micelio de la cepa seleccionada. ....	48

7.3.2	Identificación molecular a partir del análisis de las secuencias de RPB-2 y tefl obtenidas de la cepa seleccionada.....	49
7.3.3	Obtención de la región estructural del gen que codifica para una endoxilanasas de <i>T. atroviride</i> LBM 117.....	50
7.3.3.1	Análisis de secuencia .....	51
7.3.4	Evaluación de las diferentes concentraciones de bagazo de caña de azúcar. 52	
7.3.4.1	Material biológico.....	52
7.3.4.2	Medio de cultivo.....	52
7.3.4.3	Análisis estadístico .....	52
7.3.5	Optimización de la concentración de fuente de nitrógeno. ....	53
7.3.5.1	Cultivo para la optimización de las fuentes de nitrógeno .....	53
7.3.5.2	Diseño experimental para la optimización de las fuentes de nitrógeno. 53	
7.3.6	Análisis económico.....	54
<b>7.4</b>	<b>EVALUACIÓN DEL EFECTO DE XILANASA DE <i>T. atroviride</i> LBM 117 EN LA HIDRÓLISIS DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR.....</b>	<b>55</b>
7.4.1	Precipitación enzimática y clarificación del sobrenadante.....	55
7.4.2	Inmovilización.....	55
7.4.2.1	Técnicas de inmovilización.....	55
7.4.2.2	Evaluación del tiempo de reacción.....	56
7.4.2.2.1	Determinación de la actividad enzimática.....	56
7.4.2.3	Evaluación de la inmovilización.....	57
7.4.2.4	Evaluación de la reutilización de la enzima inmovilizada.....	57
7.4.2.5	Evaluación de las características bioquímicas de la enzima libre y la inmovilizada en agar-agar.....	58
7.4.2.5.1	pH óptimo .....	58
7.4.2.5.2	Temperatura óptima.....	58
7.4.2.5.3	Termoestabilidad.....	59
7.4.2.5.4	Efecto de aditivos.....	59
7.4.2.5.5	Parámetros cinéticos .....	59
7.4.2.6	Estudio de la microestructura de la matriz y la xilanasas inmovilizada.....	59
<b>7.5</b>	<b>EVALUACIÓN DE LAS XILANASAS PRODUCIDAS EN EL PRETRATAMIENTO DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR PARA SU UTILIZACIÓN EN LA HIDRÓLISIS... </b>	<b>60</b>
7.5.1	Pretratamiento químico .....	60
7.5.2	Pretratamiento enzimático con xilanasas provenientes del <i>T. atroviride</i> LBM 117.....	60
7.5.3	Hidrólisis del material pretratado.....	61

7.5.3.1	Estudio de la microestructura del bagazo de caña de azúcar pretratado utilizando microscopía electrónica de barrido.....	61
<b>8</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>64</b>
<b>8.1</b>	<b>EVALUACIÓN DE LA HABILIDAD XILANOLÍTICA DE CEPAS DE TRICHODERMA NATIVAS DE LA PROVINCIA DE MISIONES.....</b>	<b>64</b>
8.1.1	Selección cualitativa.....	64
8.1.2	Selección cuantitativa.....	65
8.1.3	Evaluación de la actividad xilanolítica en medio conteniendo bagazo de caña de azúcar como fuente de carbono. ....	68
8.1.3.1	Caracterización bioquímica de la actividad xilanolítica presente en el sobrenadante de cultivo. ....	73
8.1.3.1.1	Determinación del perfil isoenzimático .....	73
8.1.3.1.2	Cuantificación de proteínas totales .....	74
8.1.3.1.3	pH óptimo .....	75
8.1.3.1.4	Temperatura óptima.....	76
8.1.3.1.5	Termoestabilidad .....	78
8.1.3.1.6	Estabilidad en función de pH .....	79
8.1.4	Caracterización del potencial xilanolítico de <i>T. atroviride</i> LBM 117 .....	82
8.1.4.1	Identificación molecular.....	82
8.1.4.2	Obtención de un fragmento génico que codifica para una endo- $\beta$ -1,4-xilanasa	85
8.1.4.3	Evaluación de la influencia de diferentes concentraciones de bagazo de caña de azúcar .....	89
8.1.4.4	Optimización de la fuente de nitrógeno. ....	89
8.1.4.4.1	Validación del modelo .....	93
8.1.4.5	Análisis económico.....	93
<b>8.2</b>	<b>Inmovilización de xilanasas presentes en el sobrenadante.....</b>	<b>94</b>
8.2.1.1	Concentración de proteínas y precipitación de polisacáridos.....	94
8.2.1.2	Tiempo de reacción .....	95
8.2.1.3	Selección de la matriz de inmovilización .....	96
8.2.1.4	Caracterización microscópica de la matriz utilizada para la inmovilización de la xilanasa.....	98
8.2.1.5	Caracterización de la enzima inmovilizada.....	99
8.2.1.5.1	Temperatura y pH óptimos.....	99
8.2.1.5.2	Termoestabilidad .....	100
8.2.1.5.3	Efecto de aditivos sobre la actividad xilanolítica .....	101
8.2.1.5.4	Parámetros cinéticos .....	102

<b>8.3 Evaluación del efecto de xilanasas de <i>T. atroviride</i> LBM 117 sobre la hidrólisis del bagazo de caña de azúcar .....</b>	<b>103</b>
8.3.1.1 Pretratamiento del bagazo de caña de azúcar .....	103
8.3.1.2 Hidrólisis de bagazo de caña de azúcar pretratado .....	104
8.3.1.3 Microscopía electrónica de barrido .....	106
<b>9 DISCUSIÓN.....</b>	<b>109</b>
<b>9.1 Evaluación de la habilidad xilanolítica de cepas de <i>Trichoderma</i> nativas de la provincia de Misiones. ....</b>	<b>109</b>
9.1.1 Selección cualitativa y cuantitativa.....	109
<b>9.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD XILANOLÍTICA EN MEDIO CONTENIENDO BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR COMO FUENTE DE CARBONO.....</b>	<b>110</b>
<b>9.3 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE ENDOXILANASAS PRESENTES EN EL EXTRACTO ENZIMÁTICO .....</b>	<b>116</b>
9.3.1 pH y temperatura óptimos. ....	117
9.3.2 Termoestabilidad y estabilidad en el pH de la actividad xilanolítica. ....	118
<b>9.4 SELECCIÓN DE LA CEPA PARA SU APLICACIÓN: OPTIMIZACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR Y DE LAS FUENTES DE NITRÓGENO. ....</b>	<b>119</b>
<b>9.5 INMOVILIZACIÓN DE XILANASA .....</b>	<b>121</b>
9.5.1 Caracterización de las endoxilanasas inmovilizadas y libres .....	123
9.5.1.1 Efecto de aditivos .....	123
9.5.1.2 Parámetros cinéticos .....	125
9.5.1.3 Termoestabilidad .....	126
9.5.2 Análisis de la microestructura de matriz utilizada para la inmovilización	
127	
<b>9.6 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN ESTRUCTURAL DE UN GEN DE XILANASA DE <i>T. atroviride</i> LBM 117 .....</b>	<b>128</b>
<b>9.7 APLICACIÓN EN EL PRETRATAMIENTO DE LA XILANASA PERTENECIENTE A <i>TRICHODERMA ATROVIRIDE</i> LBM 117 .....</b>	<b>130</b>
<b>10 CONCLUSIONES.....</b>	<b>136</b>
<b>11 BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>140</b>

## 2 ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Biomasa lignocelulósica.</b> Componentes de la biomasa lignocelulósica, tomado de Cuervo <i>et al.</i> , 2009.....	25
<b>Figura 2. Género <i>Trichoderma</i>.</b> a) <i>T. atroviride</i> en medio PDA después de 5 días de cultivo a 28°C en presencia de luz. b) Observación en microscopio óptico donde se aprecia la estructura en forma de árbol típica de <i>Trichoderma</i> con una magnificación de 100X. Elaboración propia. ....	32
<b>Figura 3. Complejo enzimático xilanolítico.</b> Estructura de xilano y las enzimas xilanolíticas que participan en su degradación. Ac: grupo acetilo; $\alpha$ -Araf: $\alpha$ -arabinofuranosa; $\alpha$ -4-O-Me-GlcA: ácido $\alpha$ -4 O-metilglucurónico. (Sunna & Antranikian 1997).....	33
<b>Figura 4. Selección cualitativa.</b> Evaluación de la actividad xilanolítica de las cepas de <i>Trichoderma</i> sp. en medio sólido (PDA) con 0,1% (p/v) de xilano de madera de haya como sustrato. Las placas con cada una de las cepas crecidas hasta que cubrieron el 90% de las mismas (izquierda) fueron teñidas con rojo Congo (derecha) para detectar la secreción de xilanasas. La presencia de decoloración fue interpretada como resultado positivo para la secreción de xilanasas.....	65
<b>Figura 5. Selección cuantitativa de la actividad xilanolítica.</b> Análisis exploratorio de 11 cepas de <i>Trichoderma</i> sp. teniendo en cuenta la variable tiempo de incubación. A) Gráfico de estrella. B) Análisis multivariado y gráfico de conglomerados y C) barras apiladas, cada barra representa una cepa y los porcentajes de la contribución para cada día de actividad xilanolítica.....	67
<b>Figura 6. Selección cuantitativa de la actividad xilanolítica.</b> ANOVA. Comparación de la máxima actividad registrada para cada una de las 11 cepas de <i>Trichoderma</i> sp. nativas de la provincia de Misiones. ....	68
<b>Figura 7. Evaluación de la actividad xilanolítica en medios suplementados con bagazo de caña de azúcar.</b> Actividad xilanolítica de 5 cepas de <i>Trichoderma</i> nativas en medios de cultivos suplementados con 3 concentraciones diferentes de bagazo de caña de azúcar: 5 g L <sup>-1</sup> (■), 10 g L <sup>-1</sup> (▲), 15 g L <sup>-1</sup> (◆) y control (●) durante 30 días en presencia y en ausencia de luz. ....	72
<b>Figura 8. Máxima actividad xilanolítica registrada en cada ensayo para las 5 cepas de <i>Trichoderma</i> analizadas.</b> Comparación de los valores de máxima actividad xilanolítica registrada para cada cepa en los ensayos llevados a cabo en presencia (a) y en ausencia de luz (b).....	73
<b>Figura 9. Perfiles isoenzimáticos.</b> Zimograma con xilano 1%, teñido con rojo Congo. Sobrenadantes de mayor actividad para cada cepa para el (a) ensayo con luz y (b) ensayo sin luz 1. <i>T. harzianum</i> LBM 103 2. <i>Trichoderma</i> sp. LBM 192; 3. <i>T. harzianum</i> LBM 094 4. <i>Trichoderma</i> sp. LBM 193 y 5. <i>T. atroviridae</i> LBM 117. ....	74
<b>Figura 10 Efecto del pH sobre la actividad xilanolítica.</b> Cada curva representa a una cepa, el 100% indica el pH en cual la actividad enzimática fue máxima.....	76

<b>Figura 11. Temperatura óptima.</b> Efecto de la temperatura sobre la actividad xilanolítica en 5 cepas de <i>Trichoderma</i> . Cada curva representa a una cepa, el 100% indica la temperatura a la cual la actividad enzimática fue máxima. ....	77
<b>Figura 12. Termostabilidad.</b> Estabilidad enzimática de xilanasas presentes en sobrenadante de 5 cepas de <i>Trichoderma</i> obtenido en presencia y ausencia de luz a 30°C y 50°C.....	79
<b>Figura 13. Estabilidad en función del pH de la actividad xilanolítica.</b> Evaluación de la estabilidad de la actividad enzimática de xilanasas presentes en sobrenadante de 5 cepas de <i>Trichoderma</i> obtenido en presencia y ausencia de luz a diferentes pH (pH 3, pH 4,8, pH 7 y pH 10).....	81
<b>Figura 14. Identificación molecular de <i>T. atroviride</i> LBM 117.</b> Dendograma consenso con un bootstrap de 1000 repeticiones, que muestra la posición de la cepa LBM 117, inferido por NJ tomado del análisis del alineamiento obtenido de la amplificación del fragmento del gen que codifica para el factor de elongación de la traducción ( <i>tef1</i> ). ....	83
<b>Figura 15. Identificación molecular de <i>T. atroviride</i> LBM 117.</b> Dendograma consenso con un bootstrap de 1000 repeticiones que muestra la posición de la cepa de LBM 117 seleccionada en este trabajo que fue inferido por NJ tomado del análisis del alineamiento obtenido de la amplificación de una región del gen la subunidad 2 de la ARN polimerasa (RPB-2).....	84
<b>Figura 16. Secuencia nucleotídica y aminoacídica correspondiente al gen una endo-<math>\beta</math>-1,4-xilanasas en <i>T. atroviride</i> LBM 117.</b> La secuencia nucleotídica está representada por letras de colores, por encima de la secuencia aminoacídica, la cual está representada por letras en recuadros. El intrón se encuentra subrayada con marrón, los exones en celeste y la región que codifica el péptido señal está subrayada con negro. El último recuadro negro que contiene un asterisco marca al codón de <i>stop</i> . ....	86
<b>Figura 17. Análisis de la región estructural del gen que codifica para una endoxilanasas de <i>T. atroviride</i> LBM 117.</b> Imagen tomada de SignalP. la línea roja vertical más larga indica el punto de escisión. La curva verde se muestra por encima de <i>cutoff</i> sobre la secuencia del péptido señal y cae por debajo de ella justo en el punto de corte, en el aminoácido 19.....	87
<b>Figura 18. Dendograma de endoxilanasas.</b> Dendograma consenso de endoxilanasas con un bootstrap de 1000 repeticiones que muestra la posición de la cepa de LBM 117 seleccionada en este trabajo inferido por NJ. ....	88
<b>Figura 19. Análisis con PROSITE de la secuencia aminoacídica de una endoxilanasas perteneciente a <i>T. atroviride</i> LBM 117.</b> Identificación de dominio catalítico, donde la regla indica la posición en la secuencia y el rombo al sitio activo de la endoxilanasas, pertenecientes a la familia 11 de las glicosil hidrolasas. ....	88
<b>Figura 20. Evaluación de la influencia de diferentes concentraciones de bagazo de caña de azúcar.</b> Actividad xilanolítica presente en sobrenadantes de <i>T. atroviride</i> LBM 117 crecido en presencia de luz con diferentes concentraciones de bagazo de caña de azúcar. ....	89
<b>Figura 21. Optimización de las fuentes de nitrógeno.</b> Diagrama de Pareto de la optimización de fuente nitrógeno estandarizado donde se muestran los factores que resultaron significativos para la actividad xilanolítica. El largo de la barra viene dado por el efecto del factor y la extensión de las barras más allá de la línea vertical muestra cuáles son los	

componentes del medio con influencia significativa sobre la respuesta analizada (actividad xilanolítica) con un nivel de confianza del 95%.....	91
<b>Figura 22. Optimización de la fuente de nitrógeno para el aumento de la actividad xilanolítica de <i>T. atroviride</i> LBM 117.</b> Superficie repuesta tridimensional para los niveles de actividad xilanolítica obtenidos a los 12 días de cultivo de un diseño central compuesto 2 <sup>2</sup> ...	92
<b>Figura 23. Precipitación de proteínas y clarificación de polisacáridos presentes en el sobrenadante optimizado.</b> (A) Gel de poliacrilamida desnaturalizante al 12% teñido con de nitrato de plata, MP marcador de peso molecular 1: sobrenadante de cultivo de <i>T. atroviride</i> LBM 117, 2 sobrenadante precipitado con sulfato de amonio al 70% de saturación y 3 extracto clarificado con Tween 80. (B) Zimograma del extracto clarificado, las flechas indican la presencia de isoenzimas.....	95
<b>Figura 24. Inmovilización de xilanasas.</b> Efecto del tiempo de reacción sobre la actividad de la xilanasa libre (▲) de <i>T. atroviride</i> LBM 117 en comparación a la xilanasa inmovilizada en las dos matrices ensayadas agar – agar 2,5% (●) y acrilamida bisacrilamida 30:1(■) (media ± S.E., n=2).....	96
<b>Figura 25. Inmovilización de endoxilanasas.</b> Reutilización de la xilanasa inmovilizada de <i>T. atroviride</i> LBM 117. Xilanasa inmovilizada en poliacrilamida donde el 100 % corresponde a 5,76 U mL <sup>-1</sup> ( ) y xilanasa inmovilizada en agar- agar donde el 100 % corresponde a 7,55 U.mL <sup>-1</sup> .( ).....	97
<b>Figura 26. Inmovilización de xilanasas de <i>T. atroviride</i> LBM 117 en agar- agar.</b> Imágenes tomadas por SEM A y B matriz agar-agar con la enzima inmovilizada; y control de agar- agar sin la xilanasa en C y D. En el par superior de las fotografías magnificación de 2000 x y en el par inferior magnificación de 3500 x.....	98
<b>Figura 27. Temperatura y pH óptimos de actividad xilanolítica.</b> La línea punteada muestra el comportamiento de la enzima inmovilizada y la línea continua la enzima libre. El 100% corresponde a la máxima actividad enzimática registrada, para la enzima libre fue de 50 U mL <sup>-1</sup> y para la inmovilizada fue de 7 U mL <sup>-1</sup> .....	100
<b>Figura 28. Termoestabilidad de la actividad xilanolítica.</b> Evaluación de la estabilidad de la actividad enzimática inmovilizada en agar- agar a 30, 40 y 50°C durante 72 h.....	101
<b>Figura 29. Parámetros cinéticos de la actividad xilanolítica de la enzima inmovilizada en comparación a la enzima libre</b> .....	103
<b>Figura 30. Pretratamiento enzimático de bagazo de caña de azúcar.</b> Comparación de los niveles de azúcares reductores obtenidos como resultado del efecto hidrolítico de las xilanasas sobre el bagazo de caña de azúcar pretratado con NaOH 3%. Los pretratamientos 1, 2, 3 y 4 corresponden a ensayos con xilanasa inmovilizada en bloques de 25 y 5 mm. Nativa: xilanasa proveniente del sobrenadante optimizado de <i>T. atroviride</i> LBM 117. Comercial: xilanasa proveniente de <i>T. longibrachiatum</i> (Sigma Aldrich).....	104
<b>Figura 31. Hidrólisis del bagazo de caña de azúcar pretratado.</b> Porcentajes de conversión de la holocelulosa utilizado como materia prima bagazo de caña de azúcar. Naranja bagazo de caña de azúcar sin pretratar (cudo), rosa tratado químicamente con NaOH 3%, azul NaOH 3%+xilanasa comercial (XC) y verde NaOH 3%+xilanasa proveniente de <i>T. atroviride</i> LBM 117 (XN). .....	105

---

**Figura 32. Microfotografías de bagazo de caña de azúcar.** En A se aprecia la estructura de partículas de bagazo de caña de azúcar sin pretratar. En B bagazo de caña de azúcar hidrolizado con cóctel de celulasas. C corresponde al bagazo de caña de azúcar pretratado con NaOH 3% y D después de su hidrólisis. E muestra el aspecto microestructural del bagazo de caña de azúcar pretratado con NaOH y xilanas proveniente de *T. atroviride* LBM 117. Las flechas blancas indican tejido parenquimático y las rojas a los vasos conductores..... 107

### 3 ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1. Cebadores para la amplificación de la región estructural de un gen de endoxilanasas.</b> Se muestran las secuencias de los cebadores y los parámetros que resultaron de su análisis en el programa Primer 3. ....	51
<b>Tabla 2. Optimización de fuentes de nitrógeno.</b> Matriz que muestra las fuentes de nitrógeno ensayadas y los 5 niveles de concentración para su optimización. ....	53
<b>Tabla 3. Optimización de fuentes de nitrógeno.</b> Diseño compuesto central $2^2$ con 5 puntos centrales para la optimización de las fuentes de nitrógeno, cada una de las concentraciones de las variables se encuentran codificadas .....	54
<b>Tabla 4. Actividad específica.</b> Determinación de la actividad específica de los extractos con mayor actividad enzimática desarrollados en presencia y en ausencia de luz. ....	75
<b>Tabla 5. Optimización de las fuentes de nitrógeno.</b> Matriz experimental del diseño central compuesto estrellado $2^2$ utilizada para el análisis del efecto de las tres fuentes de nitrógeno sobre la actividad xilanólítica de <i>T. atroviride</i> LBM 117. ....	90
<b>Tabla 6. Validación del modelo de optimización.</b> Concentraciones de fuentes de nitrógeno en los niveles óptimos sugeridos y valores de actividad enzimática esperada y observada .....	93
<b>Tabla 7. Análisis económico.</b> Costo ponderado de cada alternativa de medio de cultivo para la producción de xilanasas. ....	94
<b>Tabla 8 Efecto de aditivos sobre la actividad enzimática de la xilanasas inmovilizada y libre.</b> El 100% corresponde a la máxima actividad detectada, para la enzima libre fue de 50 U mL <sup>-1</sup> y para la enzima inmovilizada fue de 7 U mL <sup>-1</sup> . ....	102
<b>Tabla 9. Parámetros cinéticos calculados para la xilanasas inmovilizada y la libre.</b> Determinación de $K_m$ y $V_{máx}$ en función de la tasa de hidrólisis del xilano de madera de haya a varias concentraciones (0,05 a 2,5 mM). ....	102

## 4 RESUMEN

El aprovechamiento de fuentes alternativas de energía es una de las prioridades del plan de desarrollo estratégico de la Argentina. La utilización del residuo bagazo de caña de azúcar se presenta como una alternativa para la producción de combustibles de segunda generación siendo necesaria la optimización del pretratamiento de la biomasa. Las endoxilanasas secretadas por numerosos microorganismos, dentro de los que se destacan los pertenecientes al género *Trichoderma*, hidrolizan el xilano de la hemicelulosa permitiendo la liberación de azúcares de cinco carbonos fermentables y facilitando la exposición de la fibra de celulosa para su hidrólisis en la etapa de sacarificación. El objetivo de esta tesis fue seleccionar cepas nativas de la provincia de Misiones para la optimización de la producción de xilanasas y profundizar en las características bioquímicas y genéticas de estas enzimas, para evaluar su potencial biotecnológico en el pretratamiento de bagazo de caña de azúcar. En primer lugar, se realizó un *screening* cualitativo de 20 cepas de *Trichoderma* sp. disponibles en el laboratorio, de las cuales 11 resultaron positivas para endoxilanasas. Luego para la cuantificación de la actividad enzimática de las cepas seleccionadas se realizaron cultivos en medio líquido, 5 de ellas presentaron los máximos niveles de actividad. Seguidamente se evaluó la actividad endoxilanolítica de estas cinco cepas en medio de cultivo suplementado con bagazo de caña de azúcar y se seleccionó a la cepa identificada como *T. atroviride* LBM 117 como la más promisorias por mostrar el nivel más alto de actividad endoxilanolítica y con mayor termoestabilidad enzimática a 30 C. Las concentraciones de bagazo de caña y de las 3 fuentes de nitrógeno del medio Mandels fueron optimizadas, logrando un 15% de incremento en los niveles de actividad. El análisis bioeconómico realizado mostró que la producción de endoxilanasas es más rentable en comparación al xilano en estas condiciones. En paralelo se obtuvo una secuencia génica estructural compuesta por 720 pb, que se traduce en 219 aminoácidos. Se corroboró la similitud con secuencias disponibles en las bases de datos lo que arrojó una identidad del 97% con *T. atroviride* (XM 014082116.1). Se logró reutilizar la enzima e incrementar su termoestabilidad respecto a la enzima libre, al inmovilizarla en agar-agar con un rendimiento de la actividad enzimática del 97%. En lo que hace referencia al efecto de diferentes aditivos sobre la actividad, se vio que el cobalto inhibió la actividad tanto de la libre como de la inmovilizada, en cambio el EDTA y el zinc mejoraron la actividad de la enzima inmovilizada un 30%. Por último, se realizó la evaluación del potencial xilanolítico de la enzima nativa y comercial tanto libre como inmovilizada sobre la bioconversión del bagazo de caña de azúcar pretratado con NaOH. Los mayores niveles de azúcares reductores se obtuvieron en el ensayo con la endoxilanasas libre nativa. Luego del proceso de sacarificación de este material se vislumbró que el pretratamiento enzimático permitió la obtención de un 60% más de azúcares reductores que podrían estar disponibles para la fermentación. Convirtiéndose en una estrategia promisorias para su aplicación en la producción de bioetanol.

---

## **ABSTRACT**

The exploitation of alternative sources of energy is one of the priorities of the strategic development plan of Argentina. The use of sugarcane bagasse is an alternative for the production of second generation fuels in which the optimization of the biomass pretreatment become necessary. Secreted microbial endoxylanases, particularly those belonging to the genus *Trichoderma*, hydrolyze the xylan of the hemicellulose which allows the release of five carbon sugars and facilitates the exposure of the cellulose fibers for their hydrolysis in the saccharification step. The objective of this PhD thesis was to select native strains from the province of Misiones to optimize the endoxylanase production and study biochemical and genetic characteristics of these enzymes to evaluate their biotechnological potential in the pretreatment of sugarcane bagasse. In first place, a qualitative screening of 20 *Trichoderma* strains was carried out and 11 of them were endoxylanase producers. Their enzyme activity quantification was carried out in liquid culture medium where 5 of them showed the highest enzyme levels. Endoxylanase activity produced by these 5 strains in culture medium with sugarcane bagasse was then evaluated, and *T. atroviride* LBM 117 was selected since it showed the highest endoxylanase activity and the best enzyme thermostability at 30 °C. The concentrations of sugarcane bagasse and the three nitrogen sources presented in Mandels medium were optimized reaching an improvement of 15% enzyme activity levels. Bioeconomic analysis showed that endoxylanase production in these conditions is more rentable than using commercial xylan. Moreover, it was obtained a structural genic sequence of 720 bp which was translated into 219 amino acids, and was compared to sequences available in databases corroborating a 97% identity with *T. atroviride* (XM 014082116.1). Furthermore, the reuse of the endoxylanase and its thermostability improvement was possible by immobilizing it in agar-agar with an 97% enzyme activity yield. In regard to the effect of different additives on the endoxylanase activity was found that cobalt inhibited the activity of both free and immobilized enzyme whereas EDTA and zinc improved 30% activity of the immobilized enzyme. Lastly, the evaluation of the xylanolytic potential of both free and immobilized native and commercial enzymes was carried out on the NaOH pretreated sugarcane bagasse bioconversion, and the highest levels of reducing sugars were obtained applying the native free endoxylanase. After the saccharification of this material, it was concluded that the enzymatic pretreatment yielded 60% more reducing sugars which could be available for fermentation, being a promising strategy for its application in the process of bioethanol production.

# INTRODUCCIÓN

## 5 INTRODUCCIÓN

### 5.1 ANTECEDENTES GENERALES

La historia del hombre se caracteriza por la búsqueda permanente de fuentes de energía y de sus formas de aprovechamiento. En el transcurso del tiempo se han ido generando distintos modelos energéticos estrechamente relacionados con el desarrollo de la sociedad y su demanda de energía (Cunningham, 2003). El mundo actual hace frente a una disminución progresiva de sus fuentes energéticas debido principalmente a que son no renovables y la demanda aumenta a pasos exorbitantes. Por esto, el panorama global en el mercado bioenergético es incierto (Martínez *et al.*, 2009).

Según datos de la IEA (*International Energy Agency*) la demanda mundial total de energía primaria tiene un marcado predominio de los combustibles fósiles (Anschau *et al.* 2009). En Argentina, el 93% de la energía utilizada proviene de recursos no renovables (gas natural 49%, petróleo 38%, otros 6%) y el 7% de recursos renovables (hidroeléctrica 5%, biomasa 2%; de los cuales 1% corresponde a carbón y 1% al bagazo) (Begenisic 2006), siendo el país más dependiente de combustibles fósiles del Mercosur (López- Miranda *et al.*, 2009).

Además de ser la fuente de energía predominante a nivel global, los combustibles fósiles son las fuentes más importantes de generación de gases invernaderos como el CO<sub>2</sub>, generando grandes impactos ambientales (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006; Hackenberg 2008).

Por lo tanto, cambiar el sistema energético a energías renovables, es posible, urgente y de suma importancia, sustituyendo los recursos fósiles y la energía nuclear por energía eco- amigable; pero estas deben ser almacenadas y distribuidas de forma económicamente rentable (Hackenberg 2008).

---

Esta revolución energética es necesaria “para minimizar los riesgos climáticos y promover un desarrollo económico sostenible” (Vilches & Pérez 2013).

## 5.2 BIOCOMBUSTIBLES: BIOETANOL

Los **biocombustibles** son combustibles obtenidos a partir de biomasa, son aquellos biocarburantes como alcoholes, éteres, ésteres y otros productos químicos que provienen de compuestos orgánicos de base celulósica extraída de plantas silvestres o de cultivo, que sustituyen en mayor o en menor medida el uso de energías provenientes de recursos no renovables (Razo *et al.*, 2007; Callejas & Quezada 2009). De esta forma se reducen las emisiones de CO<sub>2</sub> a la atmósfera, lo que permite disminuir el impacto negativo sobre el ambiente (Callejas & Quezada 2009).

En el mundo la producción de biocombustibles pasó de 18 millones de toneladas en el 2000 a aproximadamente 60 millones de toneladas en 2007. De esta producción, el 90% se encuentra concentrado en Estados Unidos, Brasil y la Unión Europea. Por su parte, el Mercosur tiene importantes potencialidades dado su amplio *stock* de recursos naturales para la producción de biocombustibles (López 2008).

Para que un biocombustible sea una alternativa viable debe dar ganancia energética positiva y beneficios ambientales; además debe ser económicamente competitivo y producirse en grandes cantidades (Martínez *et al.*, 2009). En este sentido se conocen dos estrategias para la producción de biocombustibles, los de **primera generación**, que son aquellos que utilizan como materia prima los mismos cultivos que se utilizan con fines alimenticios y los de **segunda generación** que utilizan a la biomasa lignocelulósica como materia prima.

Sin embargo, en torno al problema de la competencia entre agrocombustibles y alimentos se ha ido desarrollando una amplia y difundida discusión desde comienzos de 2007, debido a los requerimientos de tierras y cultivos para la producción de biocombustibles, como así también el uso creciente de cereales, azúcar, semillas oleaginosas y aceites vegetales para producir sustitutos de los

combustibles fósiles, etanol y biodiesel. Por su parte, la ONU señala que producir etanol a partir de alimentos es “condenar a la muerte por hambre a cientos de miles de personas en el mundo” (López 2008).

Bajo estos conceptos el desarrollo de los biocombustibles de segunda generación presenta ventajas sobre aquellos de primera generación (Gray *et al.*, 2006; Himmel *et al.*, 2007) mostrando menor nivel de impacto ambiental, mayor rendimiento en combustible o energía por hectárea ya que se aprovecha el total de la biomasa, además tienen su potencial en una gran diversidad de materia prima, y en particular, de residuos o desechos de madera y bagazo. (Hackenberg 2008).

Con respecto al aprovechamiento de la biomasa de residuos lignocelulósicos, el combustible líquido que más se ha desarrollado y ha recibido atención en los últimos años como posible sustituto de la gasolina es el **bioetanol**. Este alcohol presenta numerosas ventajas económicas y estratégicas cuando se usa como oxigenante, ya que su alto contenido de oxígeno implica menos cantidades de aditivo y una mejor oxidación de los hidrocarburos de la gasolina (Alzate Cardona 2005; Chauvet & González 2008; Martínez *et al.* 2009; Abril & Navarro 2012). Todos los fabricantes de automóviles que comercializan en el mundo aprueban el uso de ciertas mezclas de etanol y gasolina, logrando una autonomía exitosa en todos los tipos de vehículos y máquinas que requieren gasolina (Cabrera *et al.*, 2000).

El etanol es un componente libre de compuestos aromáticos, de benceno y azufre, por lo tanto, la mezcla con gasolina produce menos humo (partículas) y genera menores emisiones (Stern 2006). Al utilizar una mezcla del 10% de etanol se produce una reducción de emisiones de CO entre 22 y 50% en vehículos de carburador, así como una disminución de hidrocarburos totales entre 20 y 24% (Lopez & Salva 2000).

El bioetanol de segunda generación puede ser producido a partir de la biomasa lignocelulósica obtenida de los residuos generados por numerosas industrias de la foresto agroindustria, pero considerando su eficiencia energética, ambiental,

económica y social, el cultivo más eficiente con este destino resulta ser el bagazo de caña de azúcar (Anschau *et al.*, 2009; Hernández-Salas *et al.*, 2009).

### 5.3 **BIOMASA LIGNOCELULÓSICA**

#### 5.3.1 **Composición de la biomasa lignocelulósica**

La composición y porcentajes de los polímeros en la biomasa lignocelulósica varían entre las especies de plantas, incluso entre la edad y la etapa de crecimiento (Cuervo *et al.*, 2009) (Figura 1). La biomasa está compuesta fundamentalmente por celulosa, en menor proporción hemicelulosa y seguida por lignina y en menor proporción, extractivos y algunos componentes inorgánicos, que se transforman en cenizas después de la combustión del material (Martínez *et al.*, 2009; Abril & Navarro 2012). Estos polímeros se encuentran fuertemente entrelazados y unidos químicamente mediante enlaces covalentes y no covalentes (Pérez *et al.*, 2002; Sánchez 2009).

##### 5.3.1.1 ***Celulosa***

La celulosa es el principal componente de la pared celular vegetal, el homopolímero más abundante sobre la Tierra y un importante recurso renovable (Baldrian & Valášková 2008). Desde el punto de vista estructural, la celulosa es un polímero de cadena lineal, formado por la unión de unidades anhidroglucosa, en cadenas de glucano. Las unidades anhidroglucosa, están unidas por enlaces (1,4)-glucosídicos, sin cadenas laterales, lo que permite la formación de agregados moleculares en forma de microfibrilla, estabilizada por puentes de hidrógeno intermoleculares (Abril & Navarro 2012) haciendo a la fibra de celulosa insolubles, resistente a la hidrólisis y muy resistente al ataque químico (Macarron-Larumbe 1992; Cuervo *et al.*, 2009).

La celulosa usualmente está presente en dos formas: una forma cristalina, organizada como se ha descrito, y la forma amorfa compuesta por una pequeña cantidad de cadenas de celulosa no organizadas, más susceptibles a la degradación enzimática (Ovando-Chacón & Waliszewski 2005; Sánchez 2009).

### 5.3.1.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa es un heteropolímero, conforma un 25-30% del total del peso seco de la madera. Constituye entre el 15 y 30% de la madera proveniente de angiospermas, 7 a 10% de madera de gimnospermas. Típicamente se encuentra en las paredes primarias, especialmente en monocotiledóneas (Subramaniyan & Prema 2002; Collins *et al.*, 2005).

Está formado por D-xilosa, D-manosa, D-galactosa, D-glucosa, L-arabinosa, ácido 4-O metilglucurónico, ácido D-galacturónico y ácido D-glucurónico (Kulkarni *et al.*, 1999; Cuervo *et al.* 2009; Dashtban *et al.*, 2009; Prinsen 2010).

Estos azúcares se encuentran enlazados entre sí por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 o  $\beta$ -1,3. La principal diferencia con la celulosa son sus ramificaciones con cadenas laterales cortas formadas por diferentes azúcares. En contraste con la celulosa, éstos son fácilmente hidrolizables. La hemicelulosa sirve de conexión entre la lignina y la fibra de celulosa y otorga la rigidez a la red de celulosa, hemicelulosa y lignina (Pérez *et al.*, 2002). Sin embargo, las unidades constituyentes, la estructura y el contenido total de la hemicelulosa varían entre los tipos de especies, dentro de la misma especie e incluso según el tejido anatómico y fisiológico del organismo vegetal (Fengel & Wegener 1984).

Se conocen diferentes tipos de hemicelulosas en las plantas; **xilanos**, mananos, glucanos y galactanos constituidos por una cadena lineal de residuos de xilosa, manosa, D-glucosa y galactosa respectivamente (Wilkie 1979; Ebringerová 2005).

El xilano es el principal componente de la hemicelulosa y desde el punto de vista estructural, es un polímero lineal compuesto por subunidades de D-xilosa unidas por enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos (Kulkarni *et al.*, 1999; Martínez-Burgos 2013). Al igual que otros polisacáridos vegetales, el xilano presenta un elevado grado de sustituciones con grupos ácidos O-acetilos,  $\alpha$ -L-arabinofuranosilos, 4-O-metilglucurónicos y ácidos  $\alpha$ -1,2-glucurónicos. El grado de sustitución depende de la fuente de origen. (Kulkarni *et al.*, 1999; Subramaniyan & Prema 2002; Esteves *et al.*, 2004).

Las posibles configuraciones de los tipos más comunes de xilanos, son llamados glucoarabinoxilano que se encuentran con frecuencia en las monocotiledóneas. Estos xilanos presentan unidades L-arabinofuranosil unidas por enlaces (1-3) glicosídicos y ácido glucurónico, presente en general como éter 4-O-metil unido por enlaces (1-2) glicosídicos a la cadena principal de xilosa. La segunda forma más abundante de los xilanos son los glucuronoxilanos, los cuales se encuentran en general en las maderas duras y tienen una estructura similar a la de los glucuronoarabinoxilanos, con la diferencia de que las unidades arabinofuranosil están ausentes (Thompson 1983).

### **5.3.1.3 Lignina**

La lignina es un heteropolímero amorfo, insoluble y ópticamente inactivo, se encuentra principalmente en la lámina media de la pared celular. Con las hemicelulosas forman un matriz alrededor de las microfibrillas de celulosa (Prinsen 2010). Es el componente más recalcitrante del material lignocelulósico; consta de tres unidades distintas de fenilpropano (alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico) que se mantienen unidos por diferentes enlaces (Blanch & Wilke 1983).

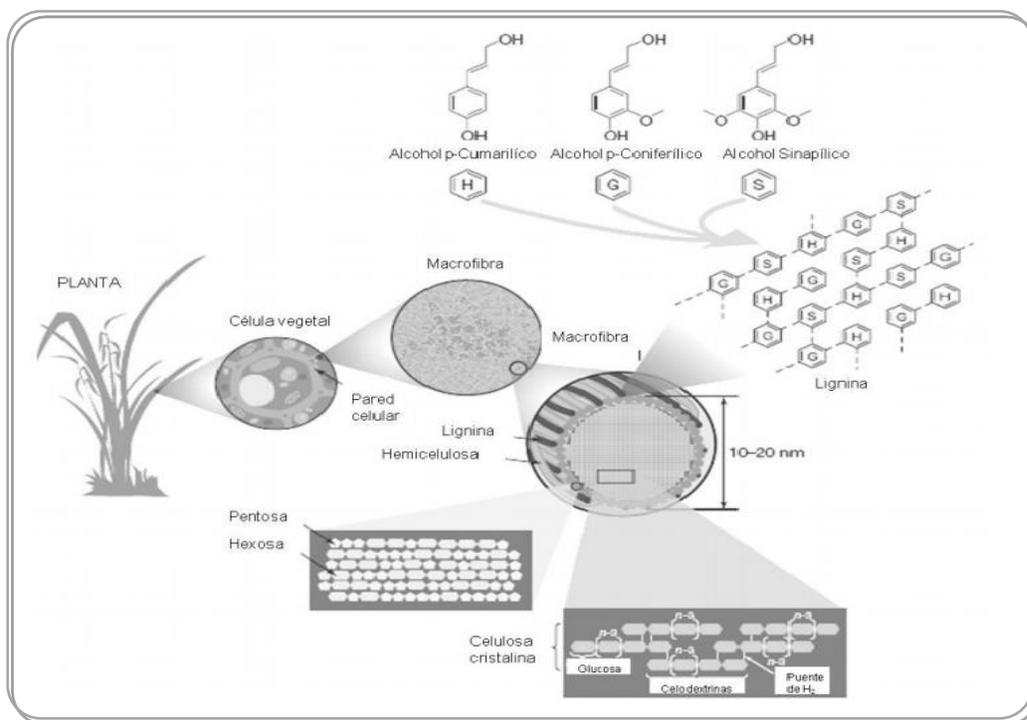
La lignina es de vital importancia para el organismo vegetal. Desempeña funciones en el transporte de agua, nutrientes y metabolitos en el sistema vascular facilitado por sus propiedades como estructura macromolecular. Su hidrofobicidad junto con el nivel de entrecruzamiento con los polisacáridos es importante para la permeabilidad de los poros entre las células vegetales. Juega un papel importante en el sistema de defensa de la planta frente a patógenos y protegen los polisacáridos de la pared celular frente a despolimerización (Sarkanen & Ludwig 1971; Hüchelhoven 2007).

### **5.3.1.4 Extrativos**

Se denominan extractivos a los compuestos orgánicos de bajo peso molecular que están presentes en los materiales lignocelulósicos y que pueden extraerse con

disolventes orgánicos o mezclas de los mismos, tales como etanol-benceno, cloroformo y otros.

Las resinas son extractivos característicos de las maderas y están compuestas por terpenos, lignanos y otros compuestos aromáticos, grasas, ceras, ácidos grasos, y alcoholes, serpentinas, taninos y flavonoides. Los extractivos representan en general entre el 4 y 10% del peso total del material. Los extractivos se encuentran fundamentalmente en los canales resinosos, células parenquimatosas y una pequeña cantidad en la lámina media y pared celular de las traqueidas. Algunos extractivos son tóxicos y protegen a las maderas del ataque de hongos y termitas (Abril & Navarro 2012).



**Figura 1. Biomasa lignocelulósica.** Componentes de la biomasa lignocelulósica, tomado de Cuervo *et al.*, 2009

#### 5.4 TRANSFORMACIÓN DE BIOMASA LIGNOCELULÓSICA A ETANOL

Para convertir el material lignocelulósico a etanol es necesario que los componentes sean hidrolizados a azúcares fermentables, por lo que las fracciones

presentes en la biomasa deben ser procesadas por separado para asegurar una conversión eficiente de estos materiales a etanol (Oliva Domínguez 2003; Sánchez-Riaño *et al.*, 2010). La forma convencional de transformación incluye las siguientes etapas:

Pretratamiento: en este paso se deslignifica y se despolimeriza y solubiliza la hemicelulosa exponiendo las fibras de celulosa para hacerlas más accesibles a las enzimas (Alvira *et al.*, 2010). El pretratamiento es fundamental para permitir un mejor proceso de hidrólisis y de fermentación a la hora de utilizar biomasa lignocelulósica en la producción de bioetanol (Alvira *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2016).

Existen diferentes alternativas de pretratamientos, entre ellos: mecánicos, térmicos, físicoquímicos, químicos, biológicos o combinación de más de uno de ellos (Modig *et al.*, 2008).

El pretratamiento enzimático o biológico es un proceso que complementa la eficiencia de los pretratamientos convencionales (mecánicos y térmicos) y se lleva a cabo por una gran variedad de enzimas hidrolíticas como las hemicelulasas y pectinasas que rompen la estructura de las paredes celulares aumentando la disponibilidad de los componentes de la biomasa (Krishna *et al.*, 2001).

En particular las xilanasas, catalizan la hidrólisis de xilanos que forman parte de la hemicelulosa presentes en las fibras celulósicas, ubicadas entre las cadenas ordenadas de celulosa y la fracción amorfa de lignina. El efecto positivo de la xilanasas en general se atribuye a la eliminación de estos xilanos que deja de fácil acceso para la hidrólisis de la celulosa a glucosa (Roncero *et al.*, 2002).

Hidrólisis: la hidrólisis de la celulosa puede realizarse mediante procesos ácidos o enzimáticos; la hidrólisis ácida se lleva a cabo por ejemplo con ácido clorhídrico, sulfúrico, nítrico, fórmico, fosfórico entre otros. La hidrólisis enzimática es realizada a menudo utilizando un coctel enzimático que incluye celulasas y hemicelulasas (ver sección 7), a partir de la cual se obtiene un hidrolizado compuesto principalmente por monosacáridos solubles que luego serán

fermentados a alcohol (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006). El uso del pretratamiento, facilita el desarrollo de esta etapa maximizando su eficiencia y rendimiento.

Fermentación: la fermentación alcohólica es un proceso biológico en ausencia de aire, originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbonos, para obtener como productos finales un alcohol en forma de etanol, dióxido de carbono en forma de gas y moléculas de ATP que son consumidas por los microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico (Sánchez-Riaño *et al.*, 2010). Han sido estudiados los cultivos de levadura para el proceso de fermentación los cuales ofrecen ventajas como reducción de costos, fácil adquisición, entre otras; que coexisten con desventajas como los largos tiempos de residencia que requieren (Gil *et al.*, 2006; Karimi *et al.*, 2006). El uso de co-cultivos o cultivos mixtos de microorganismos también han sido empleados, con el fin de acelerar el proceso de fermentación o de complementar la acción de los microorganismos para obtener mayores rendimientos en la tasa de conversión de azúcar a etanol (Sánchez-Riaño *et al.*, 2010).

## **5.5 BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR COMO BIOMASA RESIDUAL**

Entre los materiales lignocelulósicos prospectivos para la producción de este combustible, se encuentran los residuos de cultivo como bagazo de caña de azúcar, rastrojo de maíz, paja de trigo, paja de arroz, cascarilla de arroz, paja de cebada, bagazo de sorgo dulce, desechos de celulosa (papel de periódico, papel de oficina y papel reciclado), biomasa herbácea y desechos sólidos urbanos (Talebnia *et al.*, 2010). El bagazo de caña se produce como consecuencia de la fabricación de azúcar a partir del *Saccharum officinarum* (caña de azúcar). Este cultivo es de gran interés económico por ser la principal fuente para producir sacarosa, además de utilizarse para la generación de energía eléctrica y biocombustibles (Hernández-Santoyo *et al.*, 1999; Rabelo *et al.*, 2011; Bussamra *et al.*, 2015; Di Marco *et al.*, 2017). La caña de azúcar se produce en casi 100 países, donde se cultivan más de 24 millones de hectáreas. En Argentina, la elaboración de azúcar es una de las actividades

agroindustriales más antiguas y se concentra en el noroeste argentino (NOA), en las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy, existiendo además un pequeño desarrollo azucarero en el litoral del país. En la actualidad funcionan 23 ingenios azucareros, de los cuales 15 están en Tucumán, 3 en Jujuy, 2 en Salta, 2 en Santa Fe y 1 en Misiones los cuales producen alrededor de 2 millones de toneladas de azúcar por año, provenientes de unas 360.000 hectáreas cultivadas en total. Argentina ha incrementado su crecimiento promedio de caña de azúcar en los últimos años y ahora contribuye al 1,1% de la producción mundial (Pérez et al., 2007). En la Argentina, el uso del bagazo de caña de azúcar para la producción de bioetanol se empezó a fomentar a partir de la sanción de la ley 26.334 en 2008 “Régimen de Promoción de la Producción de Bioetanol” donde se contempla impulsar la conformación de cadenas de valor mediante la integración de productores de caña de azúcar e ingenios azucareros en los procesos de fabricación de bioetanol. El bagazo de caña de azúcar producido en la industria azucarera se quema generalmente en las calderas para producir calor y electricidad. Este residuo se compone de 43% de celulosa, 21-23% lignina, 25-32% de hemicelulosas (principalmente xilanos) y cantidades menores de extractivos y compuestos inorgánicos (Jayapal *et al.* 2013; Clauser *et al.*, 2016).

Los ingenios azucareros generan aproximadamente 270 a 280 kg de bagazo (50% de humedad) por tonelada métrica de caña de azúcar. La producción de etanol a partir de bagazo de caña, a través de la hidrólisis y fermentación, podría producir aproximadamente 280 a 330 litros por tonelada de bagazo seco (Karp *et al.*, 2013; Loha *et al.*, 2013).

El alto contenido en hidratos de carbono presente en el bagazo es la principal ventaja para utilizarlo como sustrato para la bioconversión, además es considerado como un sustrato barato, ya que hay un suministro constante generado dentro de la industria de la caña de azúcar como residuo (Rezende *et al.*, 2002).

## 5.6 ORGANISMOS LIGNOCELULOLÍTICOS

En la naturaleza existen numerosos microorganismos xilófagos que son capaces de degradar la hemicelulosa y la celulosa utilizándolas como fuentes de energía. Los hongos son los organismos predominantemente responsables de la degradación de la lignocelulosa (Hatakka *et al.*, 1989; Arias-Carbajal *et al.*, 2005).

Misiones está incluida dentro de una de las regiones más biodiversas de la Argentina y por lo que es una zona favorable para la búsqueda de nuevas variantes de microorganismos fúngicos (Saparrat *et al.*, 2002; Gil 2007; Levin *et al.*, 2007; Fonseca *et al.*, 2010).

Sistemas xilanolíticos completos, con todas las enzimas necesarias para la degradación del xilano, han sido reportadas en los géneros *Trichoderma* (Tenkanen *et al.*, 1992; Kaur *et al.*, 2005; Da Cunha *et al.*, 2013), *Aspergillus*, (Gottschalk *et al.*, 2010) *Penicillium* (Collins *et al.* 2005; Bajaj *et al.*, 2011). Lograr detectar y caracterizar estas baterías enzimáticas es de gran importancia en biotecnología ya que permite su utilización en los pretratamientos biológicos de la biomasa lignocelulósica 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.

### 5.6.1 *Trichoderma*

Las especies del género *Trichoderma* representan un grupo de hongos filamentosos que de acuerdo con Kuhls *et al.* (1997), Lieckfeldt. *et al.* (1999), Samuels & Chaverri (2003), Samuels (2005) y Jaklitsch *et al.* (2006), su clasificación taxonómica se muestra a continuación (Argumedo-Deliria *et al.*, 2009)

---

Reino: Mycetae (Fungi)

División: Eumycota

Subdivisión: Ascomycotina

Clase: Euascomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Hypocraceae

Género: *Trichoderma*

Actualmente, la *International Subcommission on Trichoderma and Hypocrea Taxonomy*<sup>1</sup> enumera 104 especies que se han caracterizado a nivel molecular (Jaklitsch 2009).

Las especies de *Trichoderma* se consideran cosmopolita del suelo, predominando en los ecosistemas terrestres (suelos agrícolas, pastizales, bosques y desiertos) y acuáticos (Domsch *et al.*, 1980; Sandoval-Denis *et al.*, 2014). Algunas especies son de vida libre en el suelo, oportunistas, simbiontes de plantas y otras son micoparásitas y pueden colonizar distintos ambientes, debido a su alta capacidad reproductiva (Argumedo-Deliria *et al.*, 2009; Seidl *et al.*, 2009).

Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra en un rango de 25 a 30°C. Sin embargo, se pueden adaptar y sobrevivir en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad (Domsch *et al.*, 1980; Rangel *et al.*, 2015).

Es un hongo septado y produce conidióforos altamente ramificados con un contorno cónico o piramidal. En los extremos de los conidióforos se encuentran unas estructuras llamadas fiálides en cuyos extremos se producen conidios donde se acumulan para formar una cabeza conidial (**figura 2**) (Gams & Bissett 1998).

### **5.6.2 Importancia del género *Trichoderma*.**

La capacidad de producir diversos metabolitos y enzimas, de adaptación a diversas condiciones ambientales y sustratos, confiere a *Trichoderma* la posibilidad de ser utilizado en la industria biotecnológica (Martínez-Burgos *et al.*, 2013).

---

<sup>1</sup> <http://www.isth.info/biodiversity/index.php>

El grupo de hongos pertenecientes al género *Trichoderma* tienen muchas propiedades que pueden ser aprovechadas biotecnológicamente, como la capacidad de actividad biocontroladora, ya que poseen propiedades micoparasíticas y antibióticas (Argumedo-Deliria *et al.*, 2009; Bich *et al.*, 2015); se han descrito diferentes mecanismos de acción que regulan el desarrollo de los hongos fitopatógenos diana mediante acción directa (Samuels 1996; Lorito *et al.*, 1996; Durman *et al.*, 2003) e indirecta (Harman 2000).

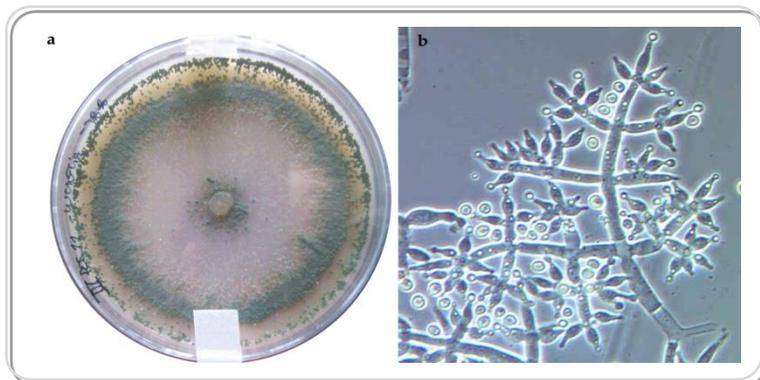
Además, tienen el potencial de sintetizar y liberar enzimas como polisacaridasas tales como (Ramírez-López 2012; Argumedo-Deliria *et al.*, 2009), celulasas (Roussos *et al.*, 1991; Rodríguez & Piñeros 2007; Castrillo *et al.*, 2015), xilanasas (Pérez 2001; Corral 2002; Castañeda *et al.*, 2015; Díaz *et al.*, 2015; Barchuk *et al.*, 2016) y quitinasas (Clavijo & Cotes 1998; Infante *et al.*, 2009), las cuales se aprovechan en numerosos procesos industriales (Verma *et al.*, 2007).

Ha sido reportado en especies de *Trichoderma* sp. tales como *T. harzianum*, *T. atroviride* y *T. reesei* altos niveles en la producción de endoxilasas (Torrönen & Rouvinen 1997; Rezende *et al.*, 2002; Seyis & Aksoz 2005; Ahmed *et al.*, 2007; Meenakshi *et al.*, 2008; Kovacs *et al.*, 2009).

A pesar de esto la aplicación enzimática en procesos a gran escala es un problema recurrente debido a los elevados costos para su aplicación biotecnológica, por lo tanto, es de suma importancia maximizar la capacidad de secreción xilanolítica en medios de cultivos alternativos de bajo costo (Sánchez-Riaño *et al.*, 2010).

La producción de *Trichoderma* a nivel industrial y semindustrial se ha propuesto empleando diferentes sustratos, donde condiciones como humedad y tamaño de partícula en el medio de cultivo juegan un papel fundamental, pH, materia orgánica, contenido de nutrientes como así también la luz y temperatura, ya que es fotosensible y se comporta mejor en condiciones de luz de día o UV 366 nm, aunque todos estos parámetros pueden variar de acuerdo con la cepa con la que se trabaja (Shin *et al.*, 2000; Chávez-García *et al.*, 2008). En estos hongos, la agitación

incrementa la producción enzimática y es necesaria para mantener la homogeneidad del medio con el fin de evitar la formación de cúmulos de gran tamaño y metabólicamente inactivos. Sin embargo, las fuerzas de cizallamiento por encima de 150 rpm pueden interrumpir el tejido microbiano frágil y tiene una marcada influencia sobre la producción de xilanasa (Obregón & Jahazel 2015).

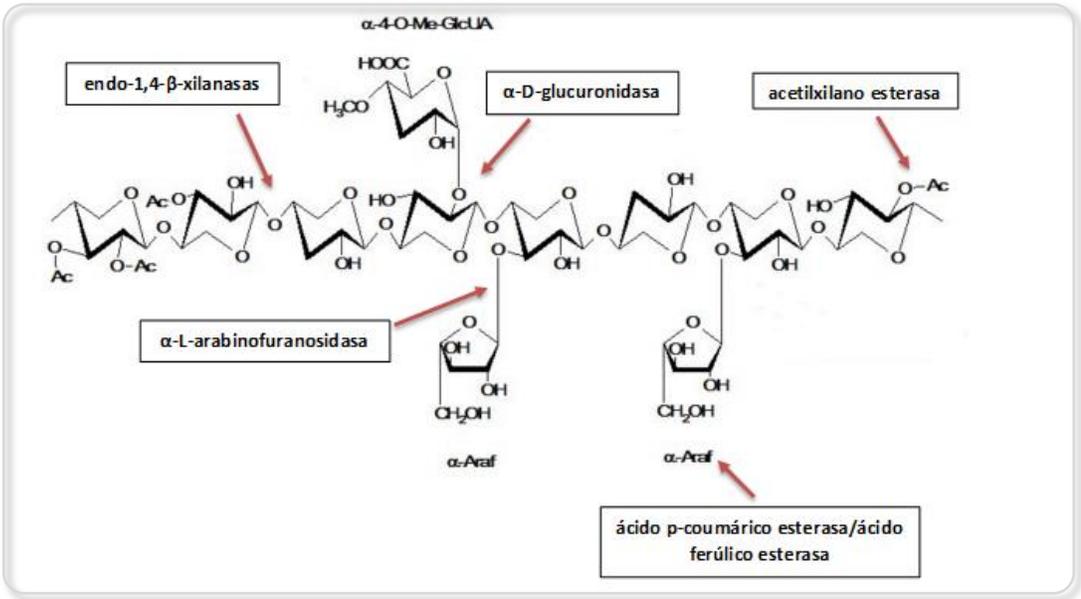


**Figura 2. Género *Trichoderma*.** a) *T. atroviride* en medio PDA después de 5 días de cultivo a 28°C en presencia de luz. b) Observación en microscopio óptico donde se aprecia la estructura en forma de árbol típica de *Trichoderma* con una magnificación de 100X. Elaboración propia.

## 5.7 COMPLEJO ENZIMÁTICO XILANOLÍTICO

La hidrólisis de la hemicelulosa permite la liberación de sus monómeros; y esto sucede por la acción de complejo enzimático que se conoce como complejo enzimático xilanolítico (**figura 3**) (Subramaniyan & Prema 2002; Castro-Saya 2013; Martínez-Restrepo 2014). Si bien el xilano es un polímero complejo, heterogéneo y con una difícil degradación completa a monómeros de xilosa, puede ser hidrolizado totalmente por una gran variedad de enzimas con diferentes especificidades y modos de acción (Sapag *et al.*, 2002; Subramaniyan & Prema 2002; Chen *et al.*, 2009). Este complejo xilanolítico incluye a las endo-1,4- $\beta$ -D-xilanasas (EX) (EC 3.2.1.8),  $\beta$ -D-xilosidasas (BXL) (EC 3.2.1.37) y varias enzimas accesorias incluidas a la L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55),  $\alpha$ -glucuronidasa (EC 3.2.1.139),  $\alpha$ -galactosidasa (EC 3.2.1.22), acetilxilano esterasa (EC 3.1.1.72) y ácido ferúlico

esterasa (EC 3.1.1.73) (Sunna & Antranikian 1997; Visser *et al.*, 2013) (figura 3). Las EC 3.2.1.8 actúan clivando azarosamente los enlaces 1,4 $\beta$ -D- xilosídico, liberando oligosacaridos, que serán blanco de la acción hidrolítica por enzimas anexas (Subramaniyan & Prema 2002; Collins *et al.*, 2005).



**Figura 3. Complejo enzimático xilanolítico.** Estructura de xilano y las enzimas xilanolíticas que participan en su degradación. Ac: grupo acetilo;  $\alpha$ -Araf:  $\alpha$ -arabinofuranosa;  $\alpha$ -4-O-Me-GlcA: ácido  $\alpha$ -4 O-metilglucurónico. (Sunna & Antranikian 1997).

**5.7.1 Clasificación de xilanasas**

Las xilanasas, inicialmente llamadas pentosanasas, fueron descritas por primera vez por Sorensen en 1955 y finalmente clasificadas como xilanasas por Koichiro *et al.* en 1961. Estas enzimas son producidas por bacterias, algas y hongos. La mayoría de estas enzimas estudiadas hasta la fecha son de origen fúngico o bacteriano, extracelulares o unidas a membrana, mesofílicas, y de actividad óptima a pH neutro o ligeramente ácido. Sin embargo, se han descrito xilanasas que son estables y activas en ambientes extremos, con actividad a temperaturas de 5 a 105°C, pH de 2 a 11 y ambientes de hasta 30% de salinidad (Collins *et al.*, 2005; Montoya Mendoza 2012).

Las xilanasas pueden ser agrupadas de acuerdo a sus propiedades catalíticas, ya sean glicosilhidrolasas (GHs) que hidrolizan enlaces glicosídicos, o bien, estearasas de carbohidratos (CEs) que hidrolizan enlaces éster (Bribiesca 2013).

Actualmente existen 96 familias de glicohidrolasas, agrupadas según la conservación de la secuencia primaria del dominio catalítico, como así también según sus propiedades físicoquímicas como peso molecular y punto isoeléctrico. Existen familias que agrupan a las enzimas que han demostrado actividad sobre el xilano, las familias 5, 7, 8, 10, 11, 26 y 43 y de éstas, la 10 y 11 (anteriormente F y G) incluyen principalmente proteínas de actividad endoenzimática y preferencia por el xilano como sustrato. Xilanasas con estas características son consideradas las “verdaderas xilanasas” (Henrissat 1991; Montoya Mendoza 2012).

Las xilanasas de la familia 10 suelen tener pesos moleculares más altos y menores puntos isoeléctricos que las xilanasas de la familia 11 y están compuestas por un dominio de unión a celulosa y un sitio catalítico ligados mediante un péptido de unión (Biely *et al.*, 1980); muestran menor especificidad hacia el sustrato y se ha encontrado que también atacan el enlace glicosídico de los  $\beta$ -D-celobiósidos (Biely 1993). Las xilanasas de la familia 11 son de menor peso molecular. Son subdivididas a su vez en dos subgrupos de acuerdo con su punto isoeléctrico en alcalinas o ácidas y se considera que debido a su tamaño relativamente pequeño, estas pueden atravesar los poros en las redes de hemicelulosa permitiendo una hidrólisis más eficiente (Torrönen & Rouvinen 1997). Las endoxilanasas de la familia 10 son capaces de atacar los enlaces glicosídicos cercanos a puntos de ramificación y hacia el extremo no reductor, mientras que los de la familia 11 no lo hacen (Subramaniyan & Prema 2002); además, estas endoxilanasas requieren un espacio de dos residuos de xilopiranosil no sustituidos entre ramificaciones, en tanto que los de la familia 11 requieren tres residuos consecutivos no sustituidos (Biely 1993; Bribiesca 2013).

---

### 5.7.1.1 *Endo-1,4-β-D-xilanasas*

Las endo-1,4-β-D-xilanasas o más comúnmente llamadas endoxilanasas son consideradas las enzimas clave en el sistema xilanolítico fúngico. Son proteínas monoméricas con masas moleculares y puntos isoeléctricos que oscilan en un amplio rango de acuerdo a la familia a la cual pertenecen. Se encuentran endoxilanasas con masas moleculares entre 8 y 145 kDa y con puntos isoeléctricos que varían entre 3 y 10. El pH óptimo para la actividad catalítica de la endoxilanasas se encuentra entre 4 y 7, mientras que la temperatura óptima se encuentra entre 40 y 60°C. (Wong *et al.*, 1988; Kulkarni *et al.*, 1999; Cuyvers *et al.*, 2011).

### 5.7.2 Inmovilización de enzimas

Las enzimas son biocatalizadores de origen biológico. Para llevar a cabo procesos en los que son utilizadas las enzimas como catalizadores, es importante considerar el mantenimiento y la estabilidad estructural de éstas para reutilizarlas, aumentar la eficiencia de producción y facilitar la recuperación de la enzima al final de la reacción. Una enzima inmovilizada es aquella que se encuentra confinada en un espacio definido en el que se retiene su actividad catalítica y puede ser reutilizada continuamente. Se han desarrollado varias técnicas para la inmovilización de enzimas, las cuales permiten su uso y aplicación en muchas áreas como en la producción de alimentos, farmacéuticos, biomedicina, como biosensores en métodos analíticos, biocombustible, entre otras. Esta estrategia ha sido de gran impacto ya que minimiza los costos de operación y facilita recuperación de la enzima y del producto.

Existen números métodos de inmovilización cuya elección depende de la enzima que se necesita inmovilizar y el fin para el cual se utilizará. La característica de la matriz resulta el parámetro de mayor importancia y determina el rendimiento del método. Las propiedades ideales de un soporte incluyen resistencia física a la

compresión, hidrofilia, inercia hacia las enzimas, resistencia al ataque microbiano y disponibilidad a bajo costo (Brena & Batista-Viera, 2013).

La técnica de inmovilización por atrapamiento, consiste en la inclusión de la enzima por unión covalente o no, dentro de geles o fibras (Subramanian *et al.*, 1999; Chiang *et al.*, 2004; Klotzbach *et al.*, 2008; Nawas *et al.*, 2016). Esta forma de inmovilización minimiza la lixiviación de la enzima y mejora su estabilidad, pero con frecuencia resulta en limitaciones de transporte de sustrato /analito al sitio activo de la enzima. Sin embargo, esta técnica permite la posibilidad de adaptar el material de encapsulación para proporcionar el microambiente óptimo para la enzima, es decir, que coincida con el entorno físico-químico de la enzima y el material de inmovilización (Spahn *et al.*, 2008). La encapsulación eficiente se ha realizado empleando alginato de calcio, que previene la pérdida de la enzima y aumenta la estabilidad mecánica. El atrapamiento por medio de nanomateriales ha revolucionado el área de inmovilización de enzimas y ha ampliado el rango de aplicaciones en el campo de la química fina, biomedicina, biocombustibles, biosensores, etc. La disminución en la lixiviación y el aumento en el índice de eficiencia de atrapamiento, se ha reportado en la actividad lipasa de *Candida rugosa*, mediante el uso de quitosano como soporte; este material se considera no tóxico, biocompatible y de fácil manipulación química, además de su alta compatibilidad con la proteína dada su naturaleza hidrofílica. Así mismo, se ha reportado que la carragenina es otro soporte adecuado para lipasa, pues es un material tolerante a altas temperaturas y solventes orgánicos (Rioux *et al.*, 2013).

La inclusión en geles como agar- agar y poliacrilamida han sido reportado para la inmovilización de xilanasas para su aplicación en la degradación de biomasa lignocelulósica (Bibi *et al.*, 2015; Maalej- Achouri *et al.*, 2009)

El agar está constituido por agarosa un polímero neutro y la agarpectina, un polímero con carga y sulfatado. Al momento de su utilización como matriz para la inmovilización es necesario tener en cuenta la concentración del polímero porque a menor concentración los bloques que se generan para su aplicación se tornan muy

frágiles, por el contrario, cuando los tamaños de poros son grandes se facilita la liberación de la enzima desde la matriz principalmente durante los lavados, llevando a una pérdida en la reutilización (Bibi *et al.*, 2015).

### **5.8 Aplicación de xilanasas para la producción de bioetanol**

Las xilanasas son enzimas hidrolíticas que tienen aplicaciones en numerosas tecnologías verde. Actualmente se llevan a cabo investigaciones que tienen como principal objetivo el desarrollo de xilanasas que se adapten a los requerimientos industriales tales como los de la industria de la pulpa y el papel y la industria de los biocombustibles. El escenario actual muestra la importancia de las energías renovables donde las xilanasas tienen un rol fundamental, ya que de manera cooperativa se involucran con otras enzimas y degradan la biomasa para la producción de etanol celulósico. De esta manera el uso eficiente de materiales lignocelulósicos puede desembocar en la producción de combustibles alternativos a partir de fuentes de azúcares renovables.

Es amplia la bibliografía que avala que el tiempo y método utilizado para el pretratamiento del material para su aplicación en la obtención de biocombustible tiene implicancia directa sobre la eficiencia y rendimiento de la etapa de hidrólisis (Chiaromonti *et al.*, 2012). En este sentido la estrategia empleada para el pretratamiento depende de la composición del residuo y consecuentemente del origen, madurez y variedad del material que se pretende emplear (Andrade *et al.*, 2017). Se ha reportado que el pretratamiento del material utilizando ácidos es muy eficiente en la deslignificación pero tiene la desventaja de que provocan la pérdida de azúcares fermentables. A diferencia de estos los pretratamiento alcalinos están ampliamente difundidos para deslignificar el material sin esa desventaja (Cardona *et al.*, 2010; Pandey *et al.*, 2000). El pretratamiento biológico puede llevarse a cabo utilizando microorganismos, como pueden ser los hongos, o empleando únicamente algún producto de su secreción, como las enzimas tales como las ligninolíticas (lacasas: EC 1.10.3.2, manganeso peroxidasa: EC1.11.1.13 o lignino peroxidasa: EC 1.11.1.14) o las hemicelulolíticas (endoxilanasas o  $\beta$ -xilosidasas).

---

Este tipo de pretratamiento tiene la ventaja de que puede ahorrar el 15% de la electricidad necesaria en la etanólisis y además puede llevarse a cabo en condiciones ambientales, aunque la tasa de hidrólisis es más lenta en comparación a la utilización de otro tipo de tratamiento (Itoh *et al.*, 2003)

El uso de dos o más estrategias para el pretratamiento del material combina las habilidades de los métodos lo que permite una mejor descomposición de la biomasa. De esta manera las ventajas de un pretratamiento químico deslignificante y de uno biológico que permita la hidrólisis de la hemicelulosa podrían incrementar la liberación de azúcares para ser fermentados (Sánchez- Riñao *et al.*, 2010).

# OBJETIVOS

---

## 6 OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Seleccionar cepas nativas de la provincia de Misiones para la optimización de la producción de xilanasas y profundizar en las características bioquímicas y genéticas de estas enzimas, para evaluar su potencial biotecnológico en el pretratamiento de bagazo de caña de azúcar.

### 6.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la capacidad de secreción de  $\beta$ -1,4-endoxilanasas, por especies fúngicas pertenecientes al género *Trichoderma* sp. para seleccionar las promisorias.
2. Caracterizar bioquímicamente la actividad xilanolítica presente en los sobrenadantes de cultivo producidos.
3. Inmovilizar xilanasas provenientes de los sobrenadantes de cultivo y realizar la caracterización bioquímica.
4. Evaluar la aplicación de la enzima inmovilizada y libre en el pretratamiento del bagazo de caña de azúcar.
5. Identificar y caracterizar la región del gen que codifica para una  $\beta$ -1,4-endoxilanasas.



**MATERIALES**  
**Y**  
**MÉTODOS**

## **7 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 EVALUACIÓN DE LA HABILIDAD XILANOLÍTICA DE CEPAS DE *Trichoderma* NATIVOS DE LA PROVINCIA DE MISIONES.**

#### **7.1.1 Selección cualitativa.**

##### ***7.1.1.1 Material biológico.***

Para la selección cualitativa de cepas con mayor habilidad xilanolítica se trabajó con una colección de 20 cepas del género *Trichoderma* pertenecientes al Laboratorio de Biotecnología Molecular del InBioMis- FCEQyN- UNaM, autóctonas de la provincia de Misiones: *T. pleuroticola* LBM 093, *T. harzianum* LBM 094, *T. brevicompactum* LBM 095, *T. harzianum* LBM 100, *T. harzianum* LBM 101, *T. harzianum* LBM 103, *T. atroviride* LBM 112, *T. harzianum* LBM 113, *T. longibrachiatum* LBM 114, *T. longibrachiatum* LBM 115, *T. atroviride* LBM 117, *T. reesei* LBM 118, *T. longibrachiatum* LBM 119, *T. stilbohypoxylis* LBM 120, *T. longibrachiatum* LBM 121, *T. harzianum* LBM 122, *T. citrinoviride* LBM 123, *Trichoderma* sp. LBM 192 y *Trichoderma* sp. LBM 193.

##### ***7.1.1.2 Medio de cultivo.***

###### ***7.1.1.2.1 Medio de cultivo para mantención de cepas.***

Las 20 cepas fueron activadas y mantenidas en medio papa dextrosa agar (PDA) 3,95% (p/v). Para ello se mezclaron los componentes con agua destilada y se esterilizó en autoclave a 1 atmósfera, 121°C por 15 min y se distribuyó en placas de Petri de 90 milímetros para su posterior utilización.

###### ***7.1.1.2.2 Medio de cultivo para la selección***

Para el crecimiento y posterior determinación de la habilidad xilanolítica, se utilizó el medio de cultivo Mandels (Mandels & Reese, 1957) conteniendo 1,4 g L<sup>-1</sup>

de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 g L<sup>-1</sup> de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,4 g L<sup>-1</sup> de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,3 g L<sup>-1</sup> de  $\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,005 g L<sup>-1</sup> de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,0016 g L<sup>-1</sup> de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,0014 g L<sup>-1</sup> de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,02 g L<sup>-1</sup> de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,3 g L<sup>-1</sup> de urea y 0,25 g L<sup>-1</sup> de extracto de levadura; con agar 1,7% (p/v) y xilano de beechowood (Sigma- Aldrich) 1% (p/v) como fuente de carbono, a pH 4,5 ajustado con ácido acético puro. Los componentes se mezclaron y se esterilizaron en autoclave a 121°C y 1 atmósfera durante 15 min, posteriormente el medio se distribuyó en placas de Petri.

### **7.1.1.3 Detección de la actividad xilanólica**

Para la detección de la actividad enzimática, se inoculó un taco de 5 mm de diámetro en el centro de la placa de Petri de 90 mm de diámetro, conteniendo medio descrito en la sección 7.1.1.2.2 y se incubó durante 6 días a 28±1°C. Luego la actividad xilanólica se reveló con rojo Congo 0,1% (p/v) por 15 min y lavados consecutivos con agua corriente. La aparición de un halo de degradación fue considerada resultado positivo. Todo el experimento se realizó por duplicado.

## **7.1.2 Selección cuantitativa.**

### **7.1.2.1 Material biológico.**

Para la selección cuantitativa de cepas con mayor habilidad xilanólica se trabajó con 11 cepas seleccionadas a partir del análisis de los ensayos de selección cualitativos: *T. pleuroticola* LBM 093, *T. harzianum* LBM 094, *T. brevicompactum* LBM 095, *T. harzianum* LBM 100, *T. harzianum* LBM 103, *T. atroviride* LBM 112, *T. atroviride* LBM 117, *T. stilbohypoxyli* LBM 120, *T. harzianum* LBM 122, *Trichoderma* sp. LBM 192 y *Trichoderma* sp. LBM 193.

### **7.1.2.2 Medio de cultivo.**

#### **7.1.2.2.1 Medio de cultivo líquido para la selección.**

Para la determinación, de la actividad enzimática xilanólica, se utilizó el medio Mandel descrito en la sección 7. 1.1.2.2 sin agar.

#### *7.1.2.2.2 Medio líquido utilizado como control para la selección.*

Para la determinación de la actividad enzimática xilanolítica, se utilizó el medio Mandel descrito en la sección 7. 1.1.2.2 sin agar ni xilano.

#### *7.1.2.3 Inoculación*

Para el desarrollo fúngico se preparó una suspensión de esporas para cada cepa en una solución acuosa de Tween 80 0,1% (v/v) previamente esterilizada en autoclave. Para ello se tomaron esporas de placas de Petri conteniendo medio de cultivo según se describió en la sección 7.1.1.2.2 donde los aislamientos fueron crecidos 7 días a  $28 \pm 1$  °C en presencia de luz. Luego se realizó el recuento de esporas en la cámara de Neubauer utilizando como base la técnica propuesta por Alves & Farias (2010) hasta llegar a la concentración establecida ( $2-3 \times 10^7$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ ). Luego se tomó 1 mL de esta suspensión y se inoculó en cada Erlenmeyer de 100 mL conteniendo el medio descrito en apartado 7.1.2.2.2. Los Erlenmeyer se incubaron a  $28^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  en presencia de luz, en condiciones estáticas. El experimento se realizó por duplicado.

#### *7.1.2.4 Determinación de la actividad enzimática*

Para determinar la actividad xilanolítica y analizar la cinética de secreción se tomaron alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  de xilano de madera de haya (Sigma-Aldrich, USA) soluble 1% (p/v) en buffer acetato de sodio 50 mM pH 4,8 para ser incubado con 100  $\mu\text{l}$  del extracto enzimático durante 60 min a  $50^\circ\text{C}$ . Los azúcares reductores liberados se midieron por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) en espectrofotómetro (Mapada® UV-3300) a 540 nm usando xilosa como estándar (Miller 1959).

Una unidad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar un  $\mu\text{mol}$  de xilosa a partir del sustrato en un minuto bajo las condiciones de ensayo.

### **7.1.2.5 Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente utilizando el programa *STATGRAPHICS Centurion* y GraphPad Prism versión 7.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Se realizó un análisis de varianza de dos factores: cepa estudiada y tiempo de cultivo. Para evaluar la existencia de diferencias entre niveles de un factor se realizó el test de la mínima diferencia significativa (LSD) de Fisher. El nivel de confianza empleado fue del 95%. Además, para el análisis multifactorial se utilizó el Infostat versión 2016p (Universidad Nacional de Córdoba).

## **7.2 Evaluación de la actividad xilanolítica en medio conteniendo bagazo como fuente de carbono.**

### **7.2.1 Material biológico.**

Para la evaluación de la actividad xilanolítica se trabajó con 5 cepas seleccionadas en el ensayo de selección cuantitativo: *T. harzianum* LBM 094, *T. harzianum* LBM 103, *T. atroviride* LBM 117, *Trichoderma* sp. LBM 192 y *Trichoderma* sp. LBM 193.

### **7.2.2 Medio de cultivo, inoculación y condiciones de cultivo.**

Para el crecimiento fúngico y la posterior determinación de la actividad xilanolítica se utilizó un medio de cultivo como se describió en la sección 7.1.2.2.2 sin el agregado de agar ni xilano, con las siguientes modificaciones: se evaluaron tres concentraciones distintas de bagazo de caña de azúcar triturado a 40 mesh (5, 10 y 15 g L<sup>-1</sup>) como fuente de carbono. Los componentes se mezclaron y se distribuyeron en Erlenmeyer de 100 mL conteniendo 20 mL de medio y se esterilizaron en autoclave a 121°C y 1 atmósfera durante 15 min.

Para la evaluación de la actividad enzimática en un medio control se utilizó el medio descrito en la sección 7.1.2.4 sin agar.

La inoculación se llevó a cabo como se describió en la sección 7.1.2.3. Los Erlenmeyer fueron incubados por 27 días a  $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  en agitación constante a 100 rpm y se tomaron alícuotas de 200  $\mu\text{L}$  cada 72 h para el análisis de actividad xilanolítica.

Para la evaluación del efecto de la luz sobre la actividad xilanolítica el experimento se realizó considerando el crecimiento en presencia y en ausencia de luz. Todo el ensayo se llevó a cabo por duplicado.

### **7.2.3 Caracterización bioquímica de la actividad xilanolítica presentes en los sobrenadantes de cultivo producidos.**

Para la caracterización de la actividad xilanolítica presente en el sobrenadante se seleccionó el sobrenadante que mostró la mayor actividad para cada cepa detectados durante el desarrollo del ensayo descrito en esta sección.

#### ***7.2.3.1 Zimograma***

Para detectar la presencia de isoenzimas se realizó electroforesis discontinua no desnaturalizante en geles de poliacrilamida al 7,5% (p/v) con xilano 1% (p/v) incorporado en el gel separador. Se sembraron 16 U  $\text{mL}^{-1}$  por carril. Para la corrida electroforética se realizó una pre-corrida a 50 mA por 10 min en buffer Tris-Glicina 1,5 M, pH 8,3 y luego se realizó la corrida a 40 mA hasta que el frente atravesó el gel concentrador, el final de la corrida se realizó a 50 mA. Los geles se fijaron en una solución metanol: ácido acético: agua (4:1:5) por 5 min. Para revelar la actividad enzimática los geles fueron incubados en buffer acetato de sodio 50 mM pH 4,8 a  $50^{\circ}\text{C}$  durante 60 min y luego teñidos con rojo Congo 0,1% (p/v) por 60 min y lavado con NaCl 1M hasta la aparición de la banda (He *et al.*, 2009).

#### ***7.2.3.2 pH óptimo***

Para definir el pH óptimo, se realizó una modificación el protocolo de determinación de actividad enzimática. Para ello las diluciones de los extractos se realizaron con buffers a diferentes pH en el rango de 3 a 10 e incubados con xilano de madera de haya 1% (p/v) preparado en el mismo buffer que la dilución del

sobrenadante. La actividad enzimática se determinó como se describió en la sección 7.1.2.4 y los valores fueron expresados en porcentajes, donde el 100% para cada cepa representó el mayor nivel de actividad enzimática detectada.

Para pH 3 se utilizó el buffer citrato (0,1M), para pH 4, pH 4,8 y pH 5 buffer acetato de sodio (0,05M), para pH 6, pH 7 y pH 8 buffer fosfato de sodio (0,1M) y para pH 9 y pH 10 se utilizó buffer tris-glicina (0,1M).

### **7.2.3.3 Temperatura óptima**

Para determinar la temperatura óptima de actividad xilanolítica se modificó el protocolo de determinación de la actividad enzimática. Para ello se incubó el sobrenadante con xilano de madera de haya 1 % (p/v) a diferentes temperaturas en un rango de 4 a 70°C manteniendo constante el pH óptimo.

Los valores fueron expresados en porcentajes, donde el 100% para cada cepa representó el máximo nivel de actividad enzimática detectado.

Las temperaturas evaluadas fueron 4, 10, 30, 40, 45, 55, 60 y 70°C.

### **7.2.3.4 Termoestabilidad**

Para evaluar la estabilidad de la actividad xilanolítica presente en cada uno de los sobrenadantes de cultivo se realizó una pre-incubación sin el sustrato a 30, 50 y 70°C durante diferentes intervalos de tiempo. Luego se determinó la actividad enzimática a 50°C, pH 4,8 durante 60 min, según se describió en la sección 7.1.2.4 para cada intervalo de tiempo hasta que la actividad cayó hasta 50%. Los resultados se expresaron en porcentajes estableciendo como 100 % al mayor nivel de actividad detectado.

Para la evaluación de la termoestabilidad de la actividad xilanolítica a 30°C, los sobrenadantes de cultivo fueron pre-incubados a diferentes intervalos de tiempo en un rango de 1 a 72 h, evaluando la actividad enzimática a los 1, 3, 6, 12, 24, 48 y 72 h

Para la evaluación de la termoestabilidad de la actividad xilanolítica a 50°C los sobrenadantes de cultivo fueron pre-incubados a intervalos de tiempos

comprendidos entre 30 min y 72 h, evaluando la actividad enzimática a los 30 min, 5, 8, 12, 24, 48 y 72 h.

Para la evaluación de la termoestabilidad de la actividad xilanolítica los sobrenadantes de cultivo fueron sometidos a intervalos de tiempos, determinando la actividad correspondiente a los 2, 4 y 6 min.

#### **7.2.3.5 Estabilidad en pH**

Para la evaluación de la estabilidad enzimática presente en los sobrenadantes de cultivo de cada cepa en función del pH, estos fueron sometidos a una pre-incubación con diferentes buffers a una temperatura constante de 30°C durante diferentes intervalos de tiempo. Luego se determinó la actividad enzimática a 1, 12, 24, 48, 72 h. Los valores fueron expresados en porcentaje, estableciendo como 100% al mayor nivel de actividad xilanolítica detectado.

Los pH evaluados para la estabilidad fueron pH 3 buffer citrato 0,1M, pH 4,8 buffer acetato de sodio 0,05M, pH 7 buffer fosfato de sodio 0,1M y pH 10 con buffer tris-glicina 0,1M.

#### **7.2.4 Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos ANOVA se realizaron mediante el programa *STATGRAPHICS CENTURION 5.0*.

### **7.3 Caracterización del potencial xilanolítico de *T. atroviride* LBM 117.**

#### **7.3.1 Identificación molecular.**

##### **7.3.1.1 *Extracción, purificación y cuantificación de ADN genómico obtenido a partir de micelio de la cepa seleccionada.***

Para la identificación de la cepa seleccionada, se extrajo ADN a partir de cultivos de 5 días en medios de cultivo extracto de malta 12,7 g L<sup>-1</sup>, utilizando el protocolo propuesto por Wining y Landridge (1991) con modificaciones (Fonseca 2013). Para ello el contenido celular fue digerido a 60°C con Proteinasa K 0,1 mg

mL<sup>-1</sup>, β-mercaptoetanol 10 mM y SDS 2% (p/v) en solución buffer Tris-HCl 100 mM (pH 8), NaCl 1,5 M y EDTA 50 mM. El ADN fue purificado con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y acetato de potasio 3 M, luego se precipitó con alcohol isopropílico y etanol 96 %.

La calidad del ADN se verificó mediante la visualización en geles de agarosa 1 % (p/v) teñidos con gel red. La cuantificación se realizó mediante la medición de la absorbancia a 260 nm, considerando que 1 unidad de absorbancia corresponde a 50 µg µL<sup>-1</sup> de ADN.

### **7.3.2 Identificación molecular a partir del análisis de las secuencias de RPB-2 y tef1 obtenidas de la cepa seleccionada.**

Para la identificación de la cepa se utilizaron los cebadores EF1-728F (5-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3) y EF-986R (5-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3) con los que se amplificó un fragmento del gen que codifica para el factor de elongación de la traducción 1-α (tef1) (Druzhinina et al., 2005). Asimismo, con los cebadores fRPB2-5 F (5-GA(T/C)GA(T/C)(A/C)G(A/T)GATCA(T/C)TT(T/C)GG -3) y fRPB2-7R (5-CCCAT(A/G)GCTTG(T/C)TT(A/G)CCCAT -3) se amplificó una región del gen que codifica para la subunidad 2 de la ARN polimerasa (RPB-2) (Liu et al., 1999). Luego se corroboraron los parámetros de los cebadores utilizando Primer3 (**tabla 1**).

La PCR se llevó a cabo utilizando 1 U de enzima Taq polimerasa (Thermo Scientific, Fermentas) en un volumen final de 20 µL conteniendo 1X de Taq buffer (75 mM Tris-HCl, pH 8,8, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01% v v<sup>-1</sup>, Tween 20), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 10 pmol de cada uno de los cebadores y 60 ng de ADN genómico como molde. Una reacción sin el agregado de ADN se utilizó como control negativo. El ciclado se llevó a cabo en tres etapas; la etapa inicial de pre desnaturalización que constó de 4 min a 94°C, seguida de 40 ciclos divididos en subetapas de 30 s a 94°C de desnaturalización, 30 s de hibridación a 53°C y 30 s a

72°C de extensión y una etapa final de 10 min a 72°C donde sucede la extensión final. Los productos de las PCR se corrieron en un gel de agarosa 2% y se tiñó con gel red.

Para la identificación molecular se secuenciaron los fragmentos obtenidos, los resultados se analizaron mediante el programa Chromaslite 2.01, el cual permite la visualización y edición de los cromatogramas. En primer lugar, se realizó una edición de las secuencias obtenidas, eliminando los segmentos de baja calidad de ambos extremos y corrigiendo errores aparentes de los cromatogramas. En los casos que había más de una secuencia se empleó el programa CAP3 para la construcción de un cóntigo y en los casos que fueron posibles se corrigieron las posiciones discordantes de manera manual, usando como referencia los cromatogramas. El cóntigo se empleó para realizar una búsqueda de secuencias homólogas del reino Fungi mediante el programa Blastn con los parámetros por *default*. Se recuperaron las primeras 100 secuencias y de ese conjunto de secuencias se eliminaron las secuencias redundantes (mismo organismo de igual o distinta cepa que no posean diferencias entre ellas). Para realizar el alineamiento se tomaron las primeras 36 secuencias y se llevó a cabo el alineamiento con el programa MUSCLE en el modo *full processing* y el resto de los parámetros por *default* (Edgar 2004). El dendrograma se llevó a cabo mediante el programa MEGA 7.0. Para la construcción de los dendrogramas a partir de secuencias de RPB-2 y las secuencias *tef1* se utilizó el método de Neighbor joining (NJ) con un bootstrap de 1000 repeticiones.

### **7.3.3 Obtencion de la región estructural del gen que codifica para una endoxilanasasa de *T. atroviride* LBM 117.**

Para la obtención de la región estructural del gen que codifica para una endoxilanasasa, en primer lugar se diseñaron cebadores específicos. Para ello se utilizó un genoma disponible en la base de datos correspondiente a *T. atroviride* IMI 206040.1 (XM 014082116.1). Luego se realizó una búsqueda bioinformática de la región nucleotídica que codifica para el péptido señal y se diseñó un cebadores

sentido, uno que hibridaba aguas arriba de dicha región y el cebador antisentido se diseñó sobre los últimos 20 nucleótidos correspondiente a la región estructural del gen. La PCR se llevó a cabo utilizando 1 U de enzima Taq polimerasa (Thermo Scientific, Fermentas) en un volumen final de 20  $\mu$ L conteniendo 1X de Taq buffer (75 mM Tris-HCl, pH 8,8, 20 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,01% v v-1, Tween 20), 3 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM de dNTPs, 10 pmol de cada uno de los cebadores y 60 ng de ADN genómico como molde. Una reacción sin el agregado de ADN se utilizó como control negativo. El ciclado se llevó a cabo en tres etapas; la etapa inicial de pre desnaturalización que constó de 4 min a 94°C, seguida de 40 ciclos divididos en subetapas de 30 s a 94°C de desnaturalización, 30 s de hibridación a 55°C y 30 s a 72°C de extensión y una etapa final de 10 min a 72°C donde sucede la extensión final. Los productos de las PCR se corrieron en un gel de agarosa 2% y se tiñó con gel red.

**Tabla 1. Cebadores para la amplificación de la región estructural de un gen de endoxilanasas.** Se muestran las secuencias de los cebadores y los parámetros que resultaron de su análisis en el programa Primer 3.

Nombre	Secuencia	% GC	Tm	Long
EX-S	5- ATGGTCGCCTTCACATCTCTCCT-3	52,17	65,59	23
EX-AS	5- CTAGCTGACGTTAATGTTGGCGCT- 3	50	65,72	24

### 7.3.3.1 Análisis de secuencia

En primer lugar se realizó el análisis y la edición de la secuencia obtenida utilizando ChromasLite 2.01, luego se construyó una secuencia consenso que fue empleada en el alineamiento con las secuencias disponible en las bases de datos en el NCBI. Una vez corroborada la identidad de la secuencia del gen de la endoxilanasas, se realizó la traducción de la secuencia utilizando *translate tool* disponible en ExPASy (<http://web.expasy.org>). Luego la secuencia consenso fue evaluada en el PROSITE (<https://prosite.expasy.org/>) para determinar los dominios conservados, sitios y familia proteica a la que pertenece. Con SignalP

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) se pudo establecer la secuencia que corresponde al péptido señal.

### **7.3.4 Evaluación de las diferentes concentraciones de bagazo de caña de azúcar.**

#### ***7.3.4.1 Material biológico.***

Para la evaluación de la influencia de diferentes concentraciones de bagazo de caña de azúcar como fuente de carbono, se seleccionó la cepa que mostró niveles de actividad enzimática más elevados: *T. atroviride* LBM 117.

#### ***7.3.4.2 Medio de cultivo.***

Para el crecimiento fúngico y la posterior determinación de la actividad xilanolítica se utilizó un medio de cultivo como se describió en la sección 7.1.2.2.2, teniendo en cuenta las siguientes modificaciones: se evaluaron tres concentraciones distintas de bagazo de caña de azúcar triturado a 40 mesh 17, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 gL<sup>-1</sup> como fuente de carbono. Los componentes se mezclaron y se distribuyeron en Erlenmeyer de 100 mL conteniendo 20 mL de medio y se esterilizaron en autoclave a 121°C y 1 atmósfera durante 15 min.

Para la evaluación de la actividad enzimática de un medio control se utilizó el medio descrito en la sección 7.1.2.2.1.

La inoculación se llevó a cabo como se describió en la sección 7.1.3.2. Los Erlenmeyers fueron incubados por 27 días 28±1 °C en agitación constante a 100 rpm en presencia de luz. Se tomaron alícuotas de 200 µL cada 72 h para el análisis de la actividad xilanolítica.

#### ***7.3.4.3 Análisis estadístico***

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism versión 7.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Se realizó un análisis de la varianza de un factor (concentración de bagazo de caña de azúcar) a fin de determinar diferencias estadísticamente significativas al 95% de confianza.

### 7.3.5 Optimización de la concentración de fuente de nitrógeno.

#### 7.3.5.1 *Cultivo para la optimización de las fuentes de nitrógeno*

Los hongos fueron activados como se describió en la sección 7.1.1.2.2 y se inocularon según lo detallado en la sección 7.1.1.3. El ensayo se llevó a cabo en Erlenmeyers de 100 mL conteniendo cada uno 20 mL de medio Mandels (sección 7.1.2.2.1) suplementado con 30 g L<sup>-1</sup> de bagazo de caña de azúcar con diferentes concentraciones fuentes nitrógeno según se detalla en la sección 7.3.5.2. Luego se esterilizaron en autoclave a 121°C y 1 atmosfera durante 15 min.

Se incubaron a 28 ± 1 °C a 100 rpm y en presencia de luz durante 12 días. Para la determinación de las actividades enzimáticas (sección 7.1.2.4) se tomaron alícuotas de 200 µL cada 72 h.

#### 7.3.5.2 *Diseño experimental para la optimización de las fuentes de nitrógeno.*

La influencia de las tres fuentes de nitrógeno propuestas por Mandels & Reese (1957) sulfato de amonio, urea y extracto de levadura fue analizadas a cinco niveles de concentración cada una (tabla 1 y 2). En la tabla 2 se muestran las concentraciones de las fuentes de nitrógeno correspondientes a los 19 ensayos, se muestran los 5 puntos centrales propuestos para el diseño compuesto central 2<sup>2</sup> con estrella obtenidos *STATGRAPHICS CENTURION 5.0*.

**Tabla 2. Optimización de fuentes de nitrógeno.** Matriz que muestra las fuentes de nitrógeno ensayadas y los 5 niveles de concentración para su optimización.

Variable	Nivel				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Sulfato de amonio	0,224 g L <sup>-1</sup>	0,7 g L <sup>-1</sup>	1,4 g L <sup>-1</sup>	2,1 g L <sup>-1</sup>	2,576 g L <sup>-1</sup>
Urea	0,048 g L <sup>-1</sup>	0,15 g L <sup>-1</sup>	0,3 g L <sup>-1</sup>	0,45 g L <sup>-1</sup>	0,552 g L <sup>-1</sup>
Extracto de levadura	0,04 g L <sup>-1</sup>	0,125 g L <sup>-1</sup>	0,25 g L <sup>-1</sup>	0,375 g L <sup>-1</sup>	0,46 g L <sup>-1</sup>

El comportamiento del sistema se explicó por la siguiente ecuación del modelo cuadrático:

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j$$

Donde  $y$  es la respuesta predictiva  $\beta_0$  es la constante del modelo;  $\beta_i$  es el coeficiente lineal;  $\beta_{ii}$  es el coeficiente cuadrático;  $\beta_{ij}$  es el coeficiente de interacción.

**Tabla 3. Optimización de fuentes de nitrógeno.** Diseño compuesto central  $2^2$  con 5 puntos centrales para la optimización de las fuentes de nitrógeno, cada una de las concentraciones de las variables se encuentran codificadas

Ensayo	Sulfato amonio	Urea	Extracto levadura
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	-1	-1	-1
7	1	-1	-1
8	-1	1	-1
9	1	1	-1
10	-1	-1	1
11	1	-1	1
12	-1	1	1
13	1	1	1
14	-1,68179	0	0
15	1,68179	0	0
16	0	-1,68179	0
17	0	1,68179	0
18	0	0	-1,68179
19	0	0	1,68179

### 7.3.6 Análisis económico.

Para la determinación del costo total del medio de cultivo para la producción de 10000 UI de xilanasas y evaluar la ventaja de utilizar bagazo de caña de azúcar como fuente alternativa y en reemplazo al xilano, se estimó los costos de los componentes teniendo en cuenta los precios promedio en el mercado, y se determinó el costo medio ponderado total para cada alternativa.

## **7.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE XILANASA DE *T. atroviride* LBM 117 EN LA HIDRÓLISIS DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR**

### **7.4.1 Precipitación enzimática y clarificación del sobrenadante.**

En primer lugar, se procedió a concentrar las proteínas presentes en el sobrenadante de *T. atroviride* LBM 117 obtenido en las condiciones optimizadas. Para ello el sobrenadante se saturó hasta un 70 % con sulfato de amonio por 10 min a 4 °C. Se centrifugó a 8000 rpm 30 min y el *pellet* fue resuspendido en 8 mL de buffer acetato de sodio pH 4,8 50 mM. Luego se dializó en membrana de diálisis en agua destilada toda la noche.

Para la precipitación de los polisacáridos el extracto dializado se clarificó con una solución acuosa de Tween 80 al 0,1 % en una relación 1:2 respecto al extracto. La cuantificación de los polisacáridos se llevó a cabo utilizando la técnica fenol- sulfúrico y se utilizó una curva estándar de glucosa (DuBois *et al.*, 1956).

### **7.4.2 Inmovilización.**

Con el fin de reutilizar las xilanasas presentes en los sobrenadantes de cultivo de *T. atroviride* LBM 117, las enzimas presentes en el sobrenadante clarificado fueron inmovilizadas. Para ello se ensayaron dos matrices de atrapamiento y se evaluó el éxito de la inmovilización.

#### **7.4.2.1 Técnicas de inmovilización.**

- *Inclusión en poliacrilamida.* La inmovilización en gel de poliacrilamida se llevó a cabo en una placa de Petri de 60 mm mezclando 3 mL de una solución de acrilamida y bisacrilamida (30:1) con 4 mL de agua destilada, 2 mL de Tris-HCl 100 mM pH 7 y 1 mL del extracto (31 U mL<sup>-1</sup>) y la polimerización se llevó a cabo a temperatura ambiente adicionando 100 µL de persulfato de amonio 10 % y 6 µL de N,N,N´N-tetrametildiamida 99 %. Después de la polimerización el gel se cortó en pequeños bloques de 5 mm de diámetro. Estas pequeñas piezas fueron lavadas dos veces con 2 mL de buffer acetato de sodio 50 mM a pH 4,8 que se recolectó para

realizar la determinación de actividad enzimática según la sección 7.1.2.4. Finalmente se pesó 50 mg de enzima inmovilizada y se almacenó a 4 °C en tubo cónicos de plástico de 1,5 mL para análisis posteriores (Maalej-Achouri *et al.*, 2009).

- *Atrapamiento en agar- agar.* Para ello se preparó una solución polimérica de agar- agar 2, %(p/v) en buffer acetato de sodio 50 mM a pH 4,8 en baño de agua hirviendo hasta su disolución, luego se dejó enfriar a 50°C y se agregó el sobrenadante en una relación 1:1. La solución se dejó solidificar a temperatura ambiente en placa de Petri de 60 mm. La enzima contenida en la matriz gelificada fue fraccionada en bloques de 5 mm. Estas piezas fueron lavadas dos veces con 2 mL de buffer acetato de sodio 50 mM a pH 4,8 para remover la enzima no inmovilizada, luego se cuantificó la actividad enzimática de estas fracciones según se describió en la sección 7.1.2.4.

#### **7.4.2.2 Evaluación del tiempo de reacción.**

Para la determinación del efecto del tiempo de reacción en la actividad enzimática de las xilanasas inmovilizadas y de las xilanasas libre presentes en el extracto clarificado, se determinó la actividad enzimática a los 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 75 y 90 min de incubación. Para ello a una fracción compuesta por 50 mg de la matriz se le adicionó 100 µL de xilano de madera de haya 1% y se incubó a 50 °C durante el período de tiempo ensayado, luego se tomaron 50 µL de la reacción y se agregó 600 µL de DNS según la técnica descrita en la sección 7.1.2.4. Para la evaluación del tiempo de reacción de la enzima nativa se procedió como se describió en la sección 7.1.2.4 con la modificación en el tiempo de incubación.

##### *7.4.2.2.1 Determinación de la actividad enzimática.*

Para la determinación de la actividad enzimática de las xilanasas inmovilizadas en los pequeños bloques, a una fracción de 50 mg de matriz se le adicionó 100 µL de xilano de madera de haya 1% y se incubó a 50°C por 5 min,

luego se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de la reacción y agregó 600  $\mu\text{L}$  de DNS según la técnica descripta en la sección 7.1.2.4.

#### **7.4.2.3 Evaluación de la inmovilización.**

El rendimiento de la inmovilización fue expresado según la siguiente ecuación:

$$RI \% = \frac{A - B}{A * 100}$$

Y el rendimiento de la actividad fue definida con la siguiente expresión:

$$RA \% = \frac{A}{C * 100}$$

Donde A es la actividad enzimática total usada en la inmovilización, B es la actividad no inmovilizada, A-B es la actividad enzimática teórica inmovilizada y C es la actividad enzimática inmovilizada. La actividad enzimática total es el número de unidades adicionadas al soporte durante la reacción de inmovilización; la actividad enzimática no inmovilizada es el número de unidades determinadas en las fracciones recolectadas de los lavados de los bloques y la actividad inmovilizada es la cantidad de unidades detectadas en el soporte después de la inmovilización y lavados.

#### **7.4.2.4 Evaluación de la reutilización de la enzima inmovilizada.**

La reutilización de las xilanasas inmovilizadas en términos de eficiencia del reciclado fue determinada usando 50 mg de matriz conteniendo las xilanasas inmovilizadas. Para ello, se determinó la actividad enzimática como se describe en la sección 7.1.2.4 por sextuplicado, con un lavado con buffer entre cada ciclo y la incorporación de nuevo sustrato para iniciar el siguiente ciclo.

#### **7.4.2.5 Evaluación de las características bioquímicas de la enzima libre y la inmovilizada en agar-agar.**

Para evaluación de las características bioquímicas de la enzima nativa se tomaron alícuotas del sobrenadante clarificado como se describió en la sección 7.4.2.2.1 y para las de la enzima inmovilizada se pesó 50 mg de la enzima inmovilizada en agar- agar en un tubo cónico de plástico de 1,5 mL.

##### **7.4.2.5.1 pH óptimo**

Para la evaluación de la influencia del pH en la actividad enzimática, la enzima se incubó con xilano de madera de haya 1 % en diferentes buffer de pH de 3 a 10.

La actividad enzimática para la xilanasas nativas se determinó como se describió en la sección 7.1.2.4 y para la enzima inmovilizada se determinó como se describió en la sección 7.4.2.2.1 y los valores fueron expresados en porcentajes, donde el 100% representó el nivel de actividad enzimática más alto detectado. Para pH 3 se utilizó el buffer citrato 0,1M, para pH 4, pH 4,8 y pH 5 buffer acetato de sodio 0,05M, para pH 6, pH 7 y pH 8 buffer fosfato de sodio 0,1M y para pH 9 y pH 10 se utilizó buffer tris-glicina 0,1M.

##### **7.4.2.5.2 Temperatura óptima**

Para determinar la temperatura óptima de actividad xilanolítica, se modificó el protocolo de determinación de la actividad enzimática. Para ello, se incubó la enzima con xilano de madera de haya 1 % (p/v) a diferentes temperaturas en un rango de 4 a 70°C manteniendo constante el pH óptimo.

La actividad enzimática para la nativa se determinó como se describió en la sección 7.1.2.4 y para la enzima inmovilizada se determinó como se describió en la sección 7.4.2.2.1 y los niveles de actividad fueron expresados en porcentajes, donde el 100% representó el nivel de actividad enzimática detectado.

Las temperaturas evaluadas fueron 4, 10, 30, 40, 45, 55, 60 y 70°C.

#### 7.4.2.5.3 *Termoestabilidad.*

Para evaluar la estabilidad de la actividad enzimática a lo largo del tiempo a diferentes temperaturas las muestras fueron pre-incubado sin el sustrato a 30°C, 50°C y 70°C durante diferentes intervalos de tiempo. Los resultados se expresaron en porcentajes estableciendo como 100 % el máximo nivel de actividad detectado.

Los extractos fueron incubados hasta 3 h, tomando alícuotas cada 15 min y la actividad enzimática para la nativa se determinó como se describió en la sección 7.1.2.4 y para la enzima inmovilizada se determinó como se describió en la sección 7.4.2.2.1 y los niveles de actividad enzimática fueron expresados en porcentajes, donde el 100% correspondió al máximo nivel de actividad enzimática detectado.

#### 7.4.2.5.4 *Efecto de aditivos*

Para la evaluación del efecto de aditivos sobre la actividad xilanolítica, se adicionaron a la reacción estándar varios metales y otros reactivos (CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, Urea, EDTA y SDS) a 10 mM. La actividad xilanolítica fue expresada en porcentaje de actividad respecto a la actividad observada en la muestra control a la cual se le adicionó buffer acetato de sodio 50 mM pH 4,8.

#### 7.4.2.5.5 *Parámetros cinéticos*

Se calculó la constante de Michaelis- Menten ( $K_m$ ) y la velocidad máxima ( $V_{máx}$ ) para la enzima nativa y la inmovilizada, usando el gráfico de Lineweaver-Burk. Para ello se utilizó el xilano de madera de haya como sustrato en concentraciones desde 0,05 mM a 2,5 mM.

#### 7.4.2.6 *Estudio de la microestructura de la matriz y la xilanasas inmovilizada.*

Con el fin de evaluar los cambios ocasionados en la superficie de la matriz utilizada para la inmovilización de la xilanasas presentes en los sobrenadantes de cultivo, se llevaron a cabo observaciones en microscopio electrónico de barrido, para ello se fijaron las muestras en FAA (Formaldehído-Alcohol-Ácido acético, 10:50:5). Finalmente, después del secado a Punto Crítico con CO<sub>2</sub> y el metalizado

con oro, la superficie fue observada con un microscopio electrónico de barrido (JEOL 5800LV).

## **7.5 EVALUACIÓN DE LAS XILANASAS PRODUCIDAS EN EL PRETRATAMIENTO DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR PARA SU UTILIZACIÓN EN LA HIDRÓLISIS**

Para el trabajo experimental de la evaluación del pretratamiento de bagazo de caña de azúcar, este fue molido en molino y tamizado con una malla de 40 mesh y se seleccionó la menor fracción (retenida en malla) llamada harina de bagazo de caña de azúcar (bagazo de caña de azúcar).

### **7.5.1 Pretratamiento químico**

Con el objetivo de evaluar el potencial hidrolítico de las xilanasas inmovilizadas y compararlo con el potencial de la xilanasas nativa primeramente se pretrataron 4 g de bagazo de caña de azúcar con 80 mL de NaOH 3% en una relación 1:20 (p/v) en autoclave a 121 °C por 50 min. Luego el material fue filtrado y la fracción sólida se lavó con agua corriente hasta neutralizar el pH. Se secó en estufa a 40 °C por 48 h.

### **7.5.2 Pretratamiento enzimático con xilanasas provenientes del *T. atroviride* LBM 117.**

Para hidrolizar el bagazo de caña de azúcar con endoxilanasas se llevaron a cabo 3 ensayos. En el ensayo 1, a 1 g de bagazo de caña de azúcar pretratado con NaOH 3% se le incorporó las xilanasas inmovilizadas en bloques de 60 x 0,2 mm con una carga enzimática de 300 Ug<sup>-1</sup> de biomasa en Erlenmeyers de 100 mL. La consistencia (peso seco/volumen) del material fue del 5 % en buffer acetato de sodio 50 mM a pH 4,8. Para el ensayo 2, a 1g de bagazo pretratado con NaOH 3% se le agregó enzimas inmovilizada en bloques de 5 x 0,2 mm con una carga enzimática de 300 Ug<sup>-1</sup> de biomasa en Erlenmeyers de 100 mL. La consistencia (peso seco/volumen, %) del material fue del 5 % en buffer acetato de sodio 50 mM a pH 4,8. Y para el ensayo 3, a 1 g de bagazo pretratado se le incorporaron 300 Ug<sup>-1</sup>

de biomasa, tomadas del sobrenadante clarificado, llegando a una consistencia del 5 % con el agregado de buffer acetato de sodio 50 mM a pH 4,8. Como control positivo se realizó el pretratamiento con xilanasas comerciales de *T. longibrachiatum* X2629 (Sigma Aldrich)

Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado a 50 °C durante 24 h a 200 rpm. Para la evaluación de la eficiencia se tomaron muestras cada 3 h y se cuantificó azúcares por la técnica del DNS.

### 7.5.3 **Hidrólisis del material pretratado.**

Para completar el ensayo de aplicación de las endoxilanasas secretadas por *T. atroviride* LBM 117 se evaluó el rendimiento del material pretratado en la etapa de sacarificación. Para ello el material pretratado en los 3 ensayos descritos en la sección anterior, fue filtrado y las fracciones sólidas fueron sometidas a hidrólisis con celulasas comerciales, para ello se incorporó 20 FPUg<sup>-1</sup> de biomasa y 10 U<sub>g</sub><sup>-1</sup> de biomasa de β-glucosidasa de Celluclast 1.5 L® y Novozyme 188® y se tomaron muestras a las 24, 48 y 72 h y se determinaron los niveles de azúcares reductores liberados. El porcentaje de conversión de holocelulosa se calculó utilizando la siguiente fórmula (Selig *et al.*, 2008):

$$\text{Conversión de holocelulosa (\%)} = \left( \frac{\text{azúcares reductores liberados } \left(\frac{g}{L}\right) * 0,9}{\text{holocelulosa en el material lignocelulósico } \left(\frac{g}{L}\right)} \right) * 100$$

La información recolectada en cada intervalo de tiempo, se utilizó para construir las curvas de progreso en la bioconversión de los materiales lignocelulósicos ensayados.

#### 7.5.3.1 ***Estudio de la microestructura del bagazo de caña de azúcar pretratado utilizando microscopía electrónica de barrido***

Con el fin de evaluar los cambios producidos después del pretratamiento, se llevaron a cabo observaciones en microscopio electrónico de barrido, para ello se fijaron las muestras en FAA (Formaldehído-Alcohol-Ácido acético, 10:50:5).

---

Finalmente, después del secado a Punto Crítico con CO<sub>2</sub> y el metalizado con oro, la superficie fue observada con un microscopio electrónico de barrido (JEOL 5800LV).



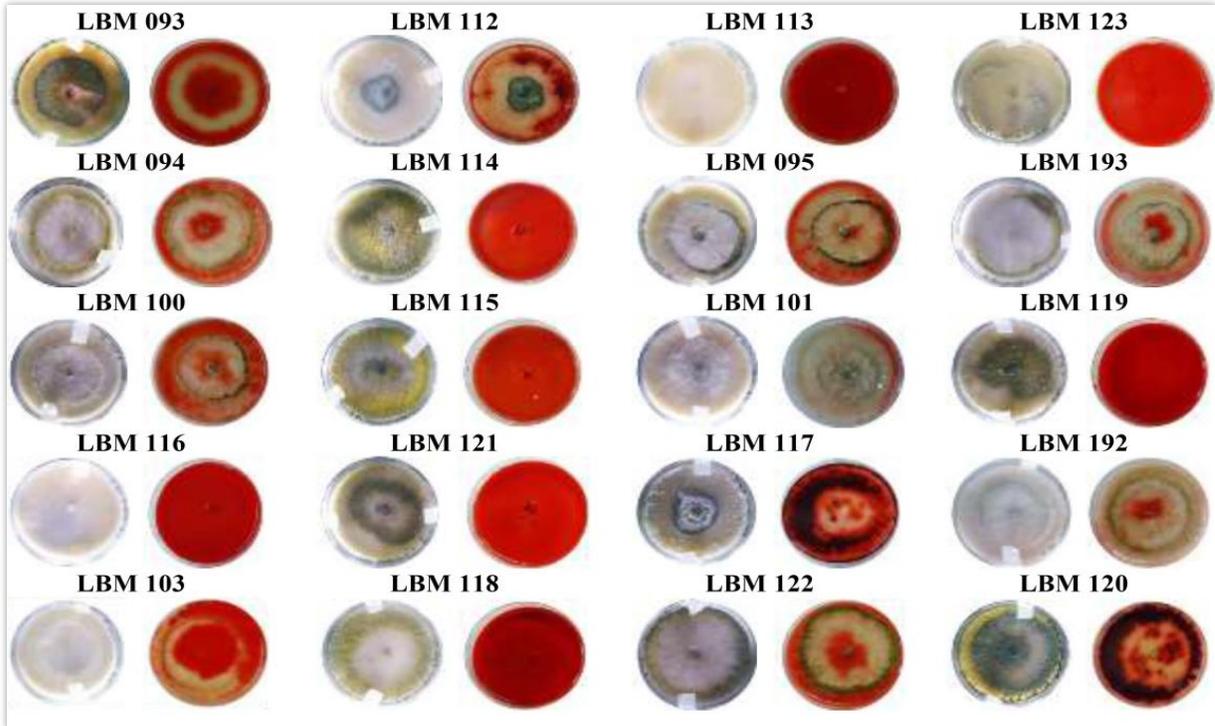
# RESULTADOS

## 8 RESULTADOS

### 8.1 EVALUACIÓN DE LA HABILIDAD XILANOLÍTICA DE CEPAS DE TRICHODERMA NATIVAS DE LA PROVINCIA DE MISIONES.

#### 8.1.1 Selección cualitativa

Como primer paso para la caracterización de la habilidad xilanolítica de las 20 cepas de *Trichoderma* utilizadas en este trabajo se realizaron ensayos cualitativos en placas conteniendo medio Mandels suplementado con xilano como sustrato. La presencia de un halo de degradación permitió la identificación de la actividad xilanolítica en 11 de las 20 cepas analizadas. Estas fueron *Trichoderma* sp. LBM 192, *T. atroviride* LBM 112, *T. atroviride* LBM 117, *T. stilbohypoxyli* LBM 120, *T. harzianum* LBM 122, *Trichoderma* sp. LBM 193, *T. brevicompactum* LBM 095, *T. harzianum* LBM 100, *T. pleurotica* LBM 093, *T. harzianum* LBM 094 y *T. harzianum* LBM 103 (**figura 4**).



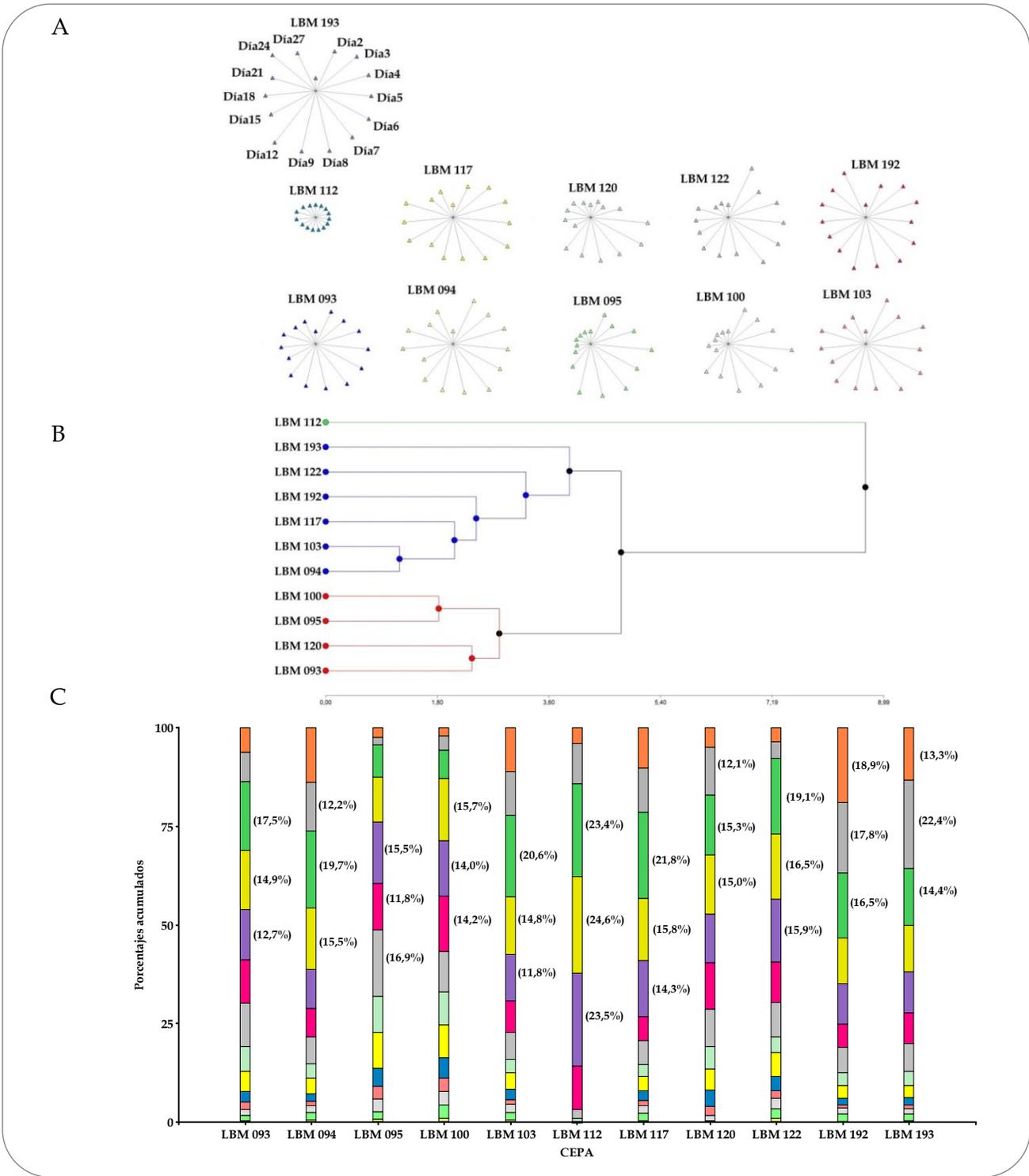
**Figura 4. Selección cualitativa.** Evaluación de la actividad xilanolítica de las cepas de *Trichoderma* sp. en medio sólido (PDA) con 0,1% (p/v) de xilano de madera de haya como sustrato. Las placas con cada una de las cepas crecidas hasta que cubrieron el 90% de las mismas (izquierda) fueron teñidas con rojo Congo (derecha) para detectar la secreción de xilanasas. La presencia de decoloración fue interpretada como resultado positivo para la secreción de xilanasas.

### 8.1.2 Selección cuantitativa

Con el fin de aportar una herramienta cuantitativa para la selección de las cepas de *Trichoderma* sp. con mayor habilidad xilanolítica se realizaron ensayos en medio líquido con las 11 cepas que mostraron actividad xilanolítica positiva en el ensayo cualitativo. Para ello, en primer lugar, se realizó un análisis exploratorio, donde se analizó la influencia de los factores: cepa y tiempo (días de incubación) sobre la actividad xilanolítica (**figura 5**). Para comparar la actividad enzimática detectada en diferentes días para cada cepa se realizó un gráfico de estrellas (**figura 5A**) donde cada radio representó un día de incubación analizado. La magnitud del radio fue determinada por el valor de la actividad enzimática y permitió una comparación día a día entre cepas. A partir de este análisis, se pudo

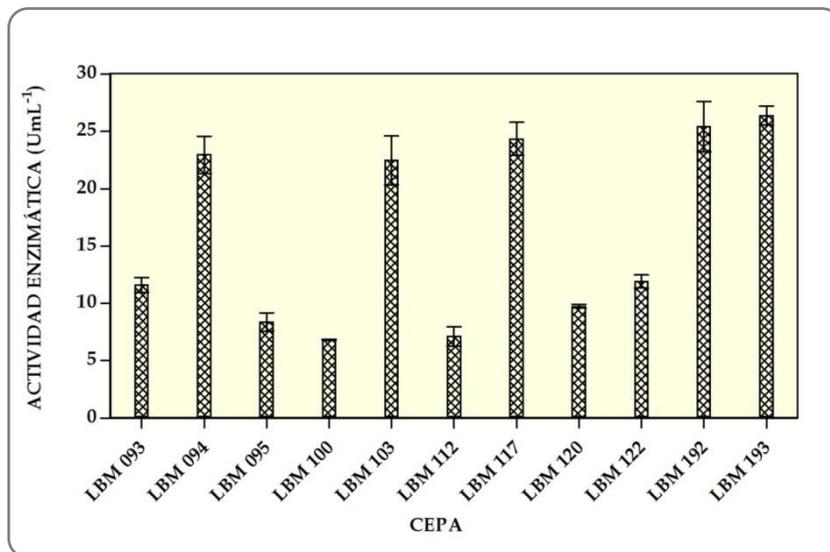
observar tres patrones distintos, uno conformado por *T. atroviride* LBM 112, donde todos los radios de la estrella fueron menores en comparación a las otras cepas debido a su baja actividad enzimática durante los días ensayados. Otro patrón lo conformaron las cepas *T. brevicompactum* LBM 095, *T. harzianum* LBM 103, *T. atroviride* LBM 117, *Trichoderma* sp. LBM 192 y *Trichoderma* sp. LBM 193, cuyos valores de actividad enzimática fueron similares durante los días de cultivo ensayados y el tercer grupo estuvo constituido por las cepas *T. harzianum* LBM 094, *T. harzianum* LBM 100, *T. stilbohypoxyli* LBM 120 y *T. harzianum* LBM 122. En este último patrón se observó que los niveles de actividad enzimática durante los primeros días de cultivo fueron similares al patrón mencionado anteriormente, pero decayeron drásticamente los últimos días de incubación. Esta distribución de las cepas en tres patrones se visualizó claramente en el gráfico de conglomerados del análisis multivariado (**figura 5B**), donde las cepas con el mismo patrón se agruparon en un único conglomerado con un coeficiente cofenético de 0,907, asumiendo de esta manera que el agrupamiento no fue aleatorio.

Para la determinación del día de mayor actividad enzimática para cada cepa se realizó un gráfico de barras apiladas, analizando los porcentajes de contribución donde los mayores porcentajes para cada cepa se correspondieron a los días de mayor actividad enzimática (**figura 5C**).



**Figura 5. Selección cuantitativa de la actividad xilanólítica.** Análisis exploratorio de 11 cepas de *Tichoderma* sp. teniendo en cuenta la variable tiempo de incubación. A) Gráfico de estrella. B) Análisis multivariado y gráfico de conglomerados y C) barras apiladas, cada barra representa una cepa y los porcentajes de la contribución para cada día (2, 4, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 27 y 30 de cultivo desde la parte inferior de la barra) de actividad xilanólítica.

Del análisis de la varianza de la selección cuantitativa de la actividad xilanolítica en medio de cultivo líquido suplementado con xilano de madera de haya (**figura 6**), se obtuvo que las cepas que presentaron los máximos niveles de actividad fueron *T. harzianum* LBM 094 *T. harzianum* LBM 103, *T. atroviride* LBM 117 *Trichoderma* sp. LBM 192, *Trichoderma* sp. LBM 193 (con niveles de entre  $18,16 \pm 0,77$  U mL<sup>-1</sup> y  $27,245 \pm 0,47$  U mL<sup>-1</sup>) entre los días 21 y 27 de cultivo. Por otro lado los máximos niveles de actividad detectados para las cepas: *T. pleurotica* LBM 093 ( $11,619 \pm 0,917$  U mL<sup>-1</sup>), *T. brevicompactum* LBM 095 ( $8,381 \pm 1,128$  U mL<sup>-1</sup>), *T. stilbohypoxyli* LBM 120 ( $9,760 \pm 0,220$  U mL<sup>-1</sup>), *T. harzianum* LBM 122 ( $11,912 \pm 0,804$  U mL<sup>-1</sup>), *T. harzianum* LBM 100 ( $6,840 \pm 0,063$  U mL<sup>-1</sup>) y *T. atroviride* LBM 112 ( $7,129 \pm 1,229$  U mL<sup>-1</sup>), fueron significativamente menores.



**Figura 6. Selección cuantitativa de la actividad xilanolítica.** ANOVA. Comparación de la máxima actividad registrada para cada una de las 11 cepas de *Trichoderma* sp. nativas de la provincia de Misiones.

### 8.1.3 Evaluación de la actividad xilanolítica en medio conteniendo bagazo de caña de azúcar como fuente de carbono.

La producción de las xilanasas es uno de los cuellos de botella para la utilización de las enzimas a escala industrial. Producir enzimas eficientes a bajo costo mejoraría la competitividad para su uso y comercialización. Por lo tanto,

utilizar residuos de agroindustria local se transforma en una alternativa promisoría.

Con el fin de mejorar la actividad xilanolítica, para el desarrollo de esta sección se trabajó con bagazo de caña de azúcar un residuo local de fácil adquisición en la provincia de Misiones y se evaluaron los niveles de actividad enzimática detectados en ensayos con y sin luz. De esta manera se buscó disminuir los costos de producción de la enzima sustituyendo al xilano, reconocido inductor de las xilanasas pero de difícil acceso por su elevado costo.

Para ello se seleccionaron 5 cepas *T. harzianum* LBM 094 *T. harzianum* LBM 103, *T. atroviride* LBM 117 *Trichoderma* sp. LBM 192, *Trichoderma* sp. LBM 193 por presentar los mayores niveles de actividad xilanolítica.

En la **figura 7** se observan los resultados de la actividad xilanolítica para diferentes concentraciones de bagazo de caña de azúcar comparadas con los niveles de actividad obtenidos cuando el medio fue suplementado con xilano como fuente de carbono y teniendo en cuenta el efecto de la luz sobre los niveles de actividad xilanolítica.

Cuando *T. harzianum* LBM 094 fue crecido en presencia de luz (**figura 7 A**), los niveles máximos de actividad enzimática fueron registrados en los ensayos suplementados con 10 y 15 g L<sup>-1</sup> de bagazo de caña de azúcar ( $p > 0,05$ ) a los 15 días de cultivo ( $22,016 \pm 0,55$  U mL<sup>-1</sup>), estos niveles fueron significativamente mayores a los registrados en el ensayo control ( $17,384 \pm 1,76$  U mL<sup>-1</sup>).

De manera similar, cuando la cepa *T. harzianum* LBM 094 fue desarrollada en ausencia de luz (**figura 7 B**) los niveles máximos de actividad enzimática se registraron en todos los ensayos suplementados con bagazo de caña de azúcar ( $p > 0,05$ ) a los 18 días de cultivo (con niveles de entre  $13,412 \pm 0,16$  U mL<sup>-1</sup> y  $17,445 \pm 3,74$  U mL<sup>-1</sup>) y sin diferencias significativas entre ellos ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, sólo el ensayo con 15 g L<sup>-1</sup> bagazo de caña de azúcar mostró diferencias con respecto al control con xilano ( $10,307 \pm 0,13$  U mL<sup>-1</sup>;  $p < 0,05$ ).

Cuando la cepa *T. harzianum* LBM 103 fue desarrollada en presencia de luz (**figura 7 C**), la máxima actividad enzimática se registró en el ensayo suplementado con 15 g L<sup>-1</sup> bagazo de caña de azúcar (24,048 ± 0,98 U mL<sup>-1</sup>) a los 15 días de cultivo, duplicando la actividad registrada en el ensayo control (13,548 U mL<sup>-1</sup> ± 1,48; p<0,05).

Cuando la cepa *T. harzianum* LBM 103 fue desarrollada en ausencia de luz (**figura 7 D**), los mayores niveles de actividad enzimática se registraron a los 18 días de cultivo, en todos los ensayos suplementados con bagazo de caña de azúcar (20,465 ± 1,4 U mL<sup>-1</sup>) (p>0,05). Sin embargo, sólo el ensayo con 15 g L<sup>-1</sup> de bagazo de caña de azúcar (22,031 ± 1,58 U mL<sup>-1</sup>) mostró diferencias con respecto al control (17,283 U mL<sup>-1</sup> ± 1,44; p<0,05), mejorando 1,2 veces la actividad xilanolítica.

En presencia de luz, para *T. atroviride* LBM 117 (**figura 7 E**) los valores de máxima actividad enzimática se registraron en los ensayos suplementados con 10, 15 g L<sup>-1</sup> y control (con niveles de entre 22,065 ± 4,16 U mL<sup>-1</sup> y 28,908 ± 1,93 U mL<sup>-1</sup>) entre los días 9 y 18 de cultivo.

Cuando *T. atroviride* LBM 117 se desarrolló en ausencia de luz (**figura 7 F**), la máxima actividad enzimática se produjo en los ensayos suplementados con 10 y 15 g L<sup>-1</sup> de bagazo de caña de azúcar (26,314 ± 1,41 U mL<sup>-1</sup> y 24,901 ± 3,41 U mL<sup>-1</sup> respectivamente) y control con xilano en el día 24 de cultivo (23,151 ± 5,65 U mL<sup>-1</sup>), (p<0,05). En el ensayo con 5 g L<sup>-1</sup> de bagazo de caña de azúcar los valores de actividad fueron los más bajos respecto a los demás, con un máximo de actividad enzimática de 11,742 ± 4,59 U mL<sup>-1</sup> entre los 24 y 27 días de cultivo (p>0,05).

En el análisis de *Trichoderma* sp. LBM 192 desarrollado en presencia de luz (**figura 7 G**) los niveles máximos de actividad enzimática se registraron en los ensayos suplementados con 10 y 15 g L<sup>-1</sup> de bagazo de caña de azúcar y control a los 9 días de cultivos (p>0,05) (16,441 ± 0,883 U mL<sup>-1</sup>).

Cuando *Trichoderma* sp. LBM 192 se desarrolló en ausencia de luz (**figura 7 H**), el ensayo que mostró la mayor actividad enzimática fue el control, con un máximo de 20,064 ± 0,81 U mL<sup>-1</sup> (p<0,05) a los 18 días de cultivo, duplicando a la

máxima actividad obtenida en los ensayos suplementados con bagazo de caña de azúcar.

El crecimiento de *Trichoderma* sp. LBM 193 en presencia de luz (**figura 7 I**) reveló que el máximo nivel de actividad enzimática se detectó en los ensayos con 10 y 15 g L<sup>-1</sup> de bagazo de caña de azúcar y control a los 15 días de cultivo (23,945 ± 2,73 U mL<sup>-1</sup>).

Cuando *Trichoderma* sp. LBM 193 se desarrolló en ausencia de luz (**figura 7 J**), la máxima actividad enzimática se registró para los ensayos con 15 g L<sup>-1</sup> de bagazo de caña de azúcar y el control. Los niveles fueron de 21,999 ± 2,18 U mL<sup>-1</sup> al día 18 de cultivo y 19,234 U mL<sup>-1</sup> ± 3,97 entre los días 18 y 21 respectivamente (p>0,05).

Del análisis de la máxima actividad registrada para cada cepa en el ensayo con luz, las cepas *T. atroviride* LBM 117, *Trichoderma* sp. LBM 192 y *Trichoderma* sp. LBM 193, mostraron sus niveles máximos de actividad en los medios conteniendo 10 y 15 g L<sup>-1</sup> de bagazo de caña de azúcar y los controles (p>0,05), mientras que las cepas *T. harzianum* LBM 103 y *T. harzianum* LBM 094 registraron su máxima actividad xilanolítica en los ensayos suplementados con 15 g L<sup>-1</sup> de bagazo de caña de azúcar los cuales fueron significativamente superior respecto al control (p<0,05) (**figura 8 A**).

En este sentido, del análisis de las cepas desarrolladas en ausencia de luz, *T. atroviride* LBM 117 mostró niveles de máxima actividad enzimática tanto en medios suplementados con bagazo de caña de azúcar (10 y 15 g L<sup>-1</sup>) como en el control. *Trichoderma* sp. LBM 193 mostró su máxima actividad xilanolítica en los medios con 15 g L<sup>-1</sup> de bagazo de caña de azúcar y control (p>0,05). Para *T. harzianum* LBM 103 y *T. harzianum* LBM 094, se observó la máxima actividad enzimática en los ensayos suplementados con bagazo de caña de azúcar (p<0,05) (**figura 8b**). Distinto fue el comportamiento de *Trichoderma* sp. LBM 192, ya que esta cepa mostró su nivel mas alto de actividad enzimática en el ensayo control (p<0,05).

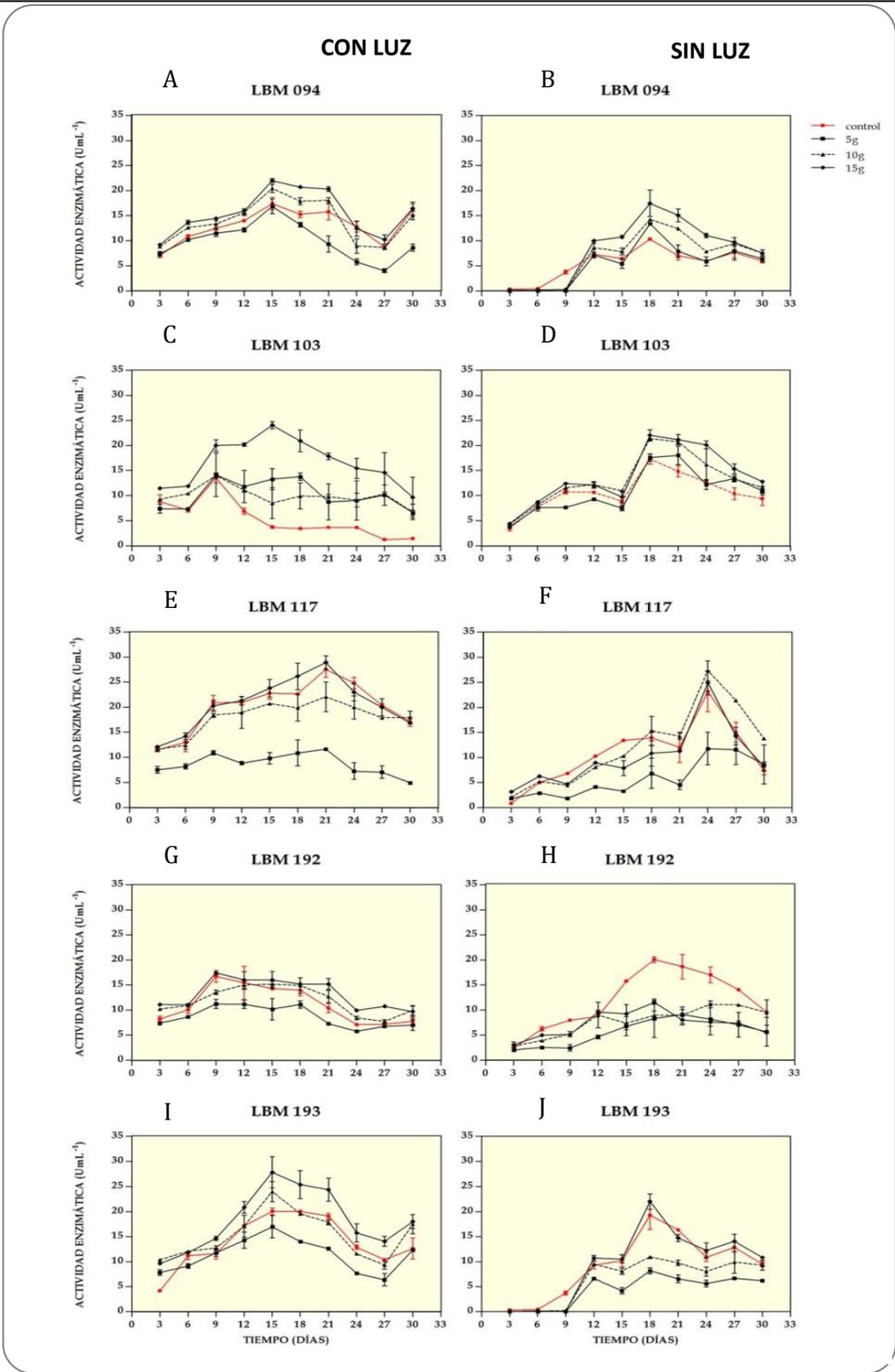
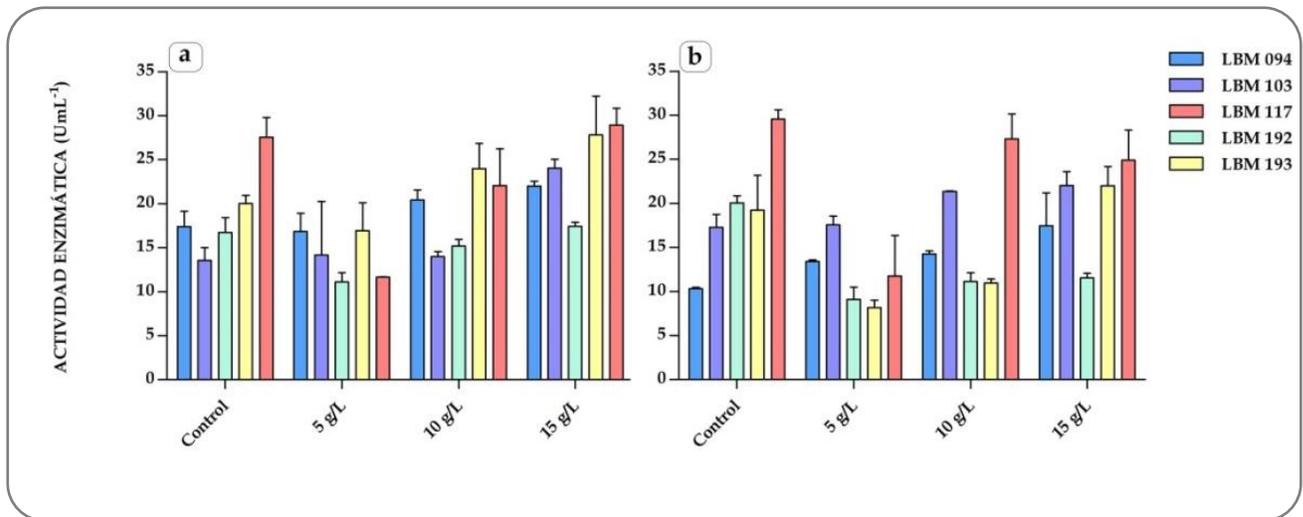


Figura 7. Evaluación de la actividad xilanolítica en medios suplementados con bagazo de caña de azúcar. Actividad xilanolítica de 5 cepas de *Trichoderma* nativas en medios de

cultivos suplementados con 3 concentraciones diferentes de bagazo de caña de azúcar: 5 g L<sup>-1</sup> (■), 10 g L<sup>-1</sup> (▲), 15 g L<sup>-1</sup> (◆) y control (●) durante 30 días en presencia y en ausencia de luz.



**Figura 8. Máxima actividad xilanólítica registrada en cada ensayo para las 5 cepas de *Trichoderma* analizadas.** Comparación de los valores de máxima actividad xilanólítica registrada para cada cepa en los ensayos llevados a cabo en (a) presencia de luz para la cepa LBM 192 9 días para LBM 193 15 días, para la cepa LBM 117 9 días, para la LBM 094 15 días y para la cepa LBM 103 15 días de cultivo mientras que para los ensayos en (b). ausencia de luz las máximas actividades se registraron a los 18, 18, 24, 18 y 18 días de cultivo para las mismas cepas.

### 8.1.3.1 Caracterización bioquímica de la actividad xilanólítica presente en el sobrenadante de cultivo.

Para la caracterización bioquímica de la actividad xilanólítica presente en los sobrenadantes se seleccionaron aquellos que mostraron los máximos niveles de actividad para cada ensayo.

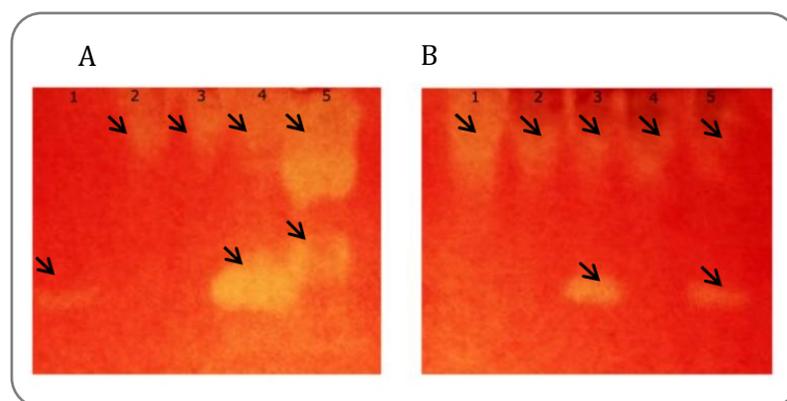
#### 8.1.3.1.1 Determinación del perfil isoenzimático

En esta etapa se evaluaron los perfiles isoenzimático de xilanasas presentes en los sobrenadantes utilizando xilano de madera de haya como sustrato y se reveló con rojo Congo.

Para los sobrenadantes seleccionados del experimento desarrollado en presencia de luz, se observaron dos grupos de perfiles isoenzimáticos. Para las cepas *T. atroviride* LBM 117 y para *Trichoderma* sp. LBM 193 se detectaron dos

isoenzimas identificadas por la visualización de una zona más clara en el gel resultado de actividad xilanolítica (**figura 9 A** carriles 4 y 5) y en el sobrenadante de *Trichoderma* sp. LBM 192, *T. harzianum* LBM 094 y *T. harzianum* LBM 103 se detectó una enzima con actividad xilanolítica la cual mostró mayor movilidad (**figura 9 A** carriles 1, 2 y 3)

Con respecto a los sobrenadantes pertenecientes a las cepas desarrolladas en ausencia de luz se registró una enzima con actividad xilanolítica para *T. harzianum* LBM 103, *Trichoderma* sp. LBM 192 y *Trichoderma* sp. LBM 193 (**figura 9 B** carriles 1,2 y 4), mientras que para *T. harzianum* LBM 094 y *T. atroviride* LBM 117 (**figura 9 B** carriles 3 y 5) mostraron dos isoenzimas con la misma movilidad.



**Figura 9. Perfiles isoenzimáticos.** Zimograma con xilano 1%, teñido con rojo Congo. Sobrenadantes de mayor actividad para cada cepa según figura 8 para el (a) ensayo con luz y (b) ensayo sin luz 1. *T. harzianum* LBM 103 2. *Trichoderma* sp. LBM 192; 3. *T. harzianum* LBM 094 4. *Trichoderma* sp. LBM 193 y 5. *T. atroviridae* LBM 117.

#### 8.1.3.1.2 Cuantificación de proteínas totales

Cuando se midió la concentración de proteínas totales presentes en el medio y su respectiva actividad específica en los sobrenadantes pertenecientes a los ensayos llevado a cabo en presencia de luz (**tabla 4**), se observó que las cepas *T. atroviride* LBM 117 y *T. harzianum* LBM 094 presentaron las mayores concentraciones ( $p < 0,05$ ) representadas por  $1,876 \text{ mg mL}^{-1}$  y  $1,680 \text{ mg mL}^{-1}$  respectivamente, mientras que *Trichoderma* sp. LBM 192 mostró la menor concentración proteica de todas las cepas evaluadas con  $1,274 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $p < 0,05$ ). La

mayor actividad específica se observó en *T. harzianum* LBM 103 seguido por las cepas *Trichoderma* sp. LBM 193 y *T. atroviride* LBM 117.

Cuando la evaluación de la concentración de proteínas y actividad específica se llevó a cabo utilizando los sobrenadantes obtenidos de los ensayos desarrollado en ausencia de luz, se observó la mayor concentración de proteínas en los sobrenadantes pertenecientes a la cepa *T. harzianum* LBM 192 representado por 2,745 mg mL<sup>-1</sup>, seguido por *T. harzianum* LBM 094 con 2,358 mg mL<sup>-1</sup>. La menor concentración proteica se observó en *Trichoderma* sp. LBM 193 con 1,263 mg mL<sup>-1</sup>. Cuando se analizó la actividad específica, se registró los mayores niveles en los sobrenadantes pertenecientes a las cepas *T. atroviride* LBM 117 y *Trichoderma* sp. LBM 193.

Estos resultados mostraron a *T. atroviride* LBM 117 y *Trichoderma* sp. LBM 193 como las cepas con mayor rendimiento xilanolítico definido por su actividad específica.

**Tabla 4. Actividad específica.** Determinación de la actividad específica de los extractos con mayor actividad enzimática desarrollados en presencia y en ausencia de luz.

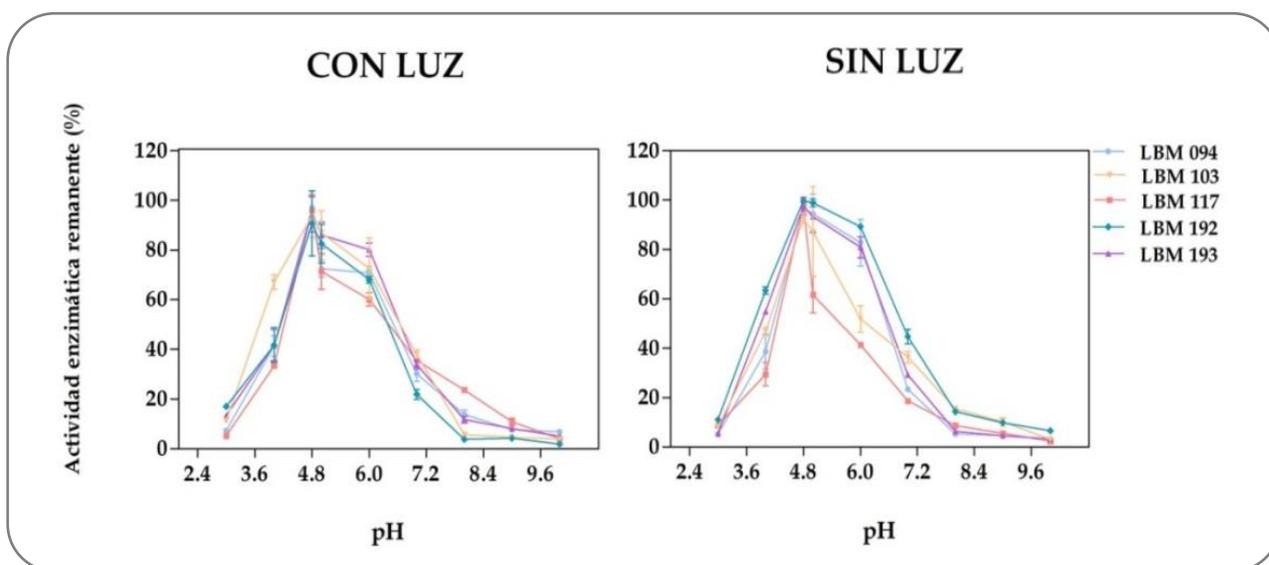
Ensayo	Cepa	Proteína (mg mL <sup>-1</sup> )	Actividad enzimática (U mL <sup>-1</sup> )	Actividad específica (U mg <sup>-1</sup> )
CON LUZ	LBM 094	1,680±0,08	22,016	13,099
	LBM 103	1,288±0,09	24,048	18,663
	LBM 117	1,876±0,21	28,908	15,403
	LBM 192	1,274±0,14	17,417	13,665
	LBM 193	1,568±0,12	27,819	17,734
SIN LUZ	LBM 094	2,358±0,09	17,445	7,396
	LBM 103	1,703±0,11	22,031	12,935
	LBM 117	1,484±0,14	26,314	17,724
	LBM 192	2,745±0,10	20,064	7,309
	LBM 193	1,263±0,12	21,999	17,413

#### 8.1.3.1.3 pH óptimo

Para la determinación del pH óptimo de la actividad enzimática presente en el sobrenadante, se seleccionaron los sobrenadantes que exhibieron los máximos niveles de actividad xilanolítica en los ensayos en presencia y ausencia de luz para cada cepa como se detalló en la sección 7.1.3.4.

Respecto al ensayo llevado a cabo en presencia de luz para *T. harzianum* LBM 103, *Trichoderma* sp. LBM 192 y *Trichoderma* sp. LBM 193, se registró la mayor actividad enzimática a pH 4,8 y 5 ( $p > 0,05$ ). Para *T. harzianum* LBM 094 y *T. atroviride* LBM 117, la máxima actividad fue observada a pH 4,8 ( $p < 0,05$ ) (**figura 10 A**).

Del análisis de la actividad enzimática en los sobrenadantes obtenidos a partir de los ensayos llevados a cabo en ausencia de luz (**figura 10 B**), se observó que para *T. harzianum* LBM 094, *T. harzianum* LBM 103, *Trichoderma* sp. LBM 192 y *Trichoderma* sp. LBM 193 la máxima actividad enzimática fue a pH 4,8 y 5 ( $p > 0,05$ ). Para *T. atroviride* LBM 117 el pH óptimo fue de 4,8 ( $p < 0,05$ ).



**Figura 10 Efecto del pH sobre la actividad xilanolítica.** Cada curva representa a una cepa, el 100% indica el pH en cual la actividad enzimática fue máxima.

Máxima actividad registrada en a expresada en U mL<sup>-1</sup>: LBM 094= 22,796 ± 0,996 LBM 103= 25,483 ± 2,386 LBM 117=27,841 ± 1,645 LBM 192=14,794 ± 2,129 LBM 193= 23,320 ± 1,830 sobrenadantes en 5 cepas de *Trichoderma* sp.. El 100% de la actividad se definió

Máxima actividad registrada en b expresada en U mL<sup>-1</sup>: LBM 094= 21,025 ± 0,529 LBM 103= 21,366 ± 0,483 LBM 117= 28,696 ± 0,868 LBM 192= 22,942 ± 0,069 LBM 193= 22,618 ± 0,850

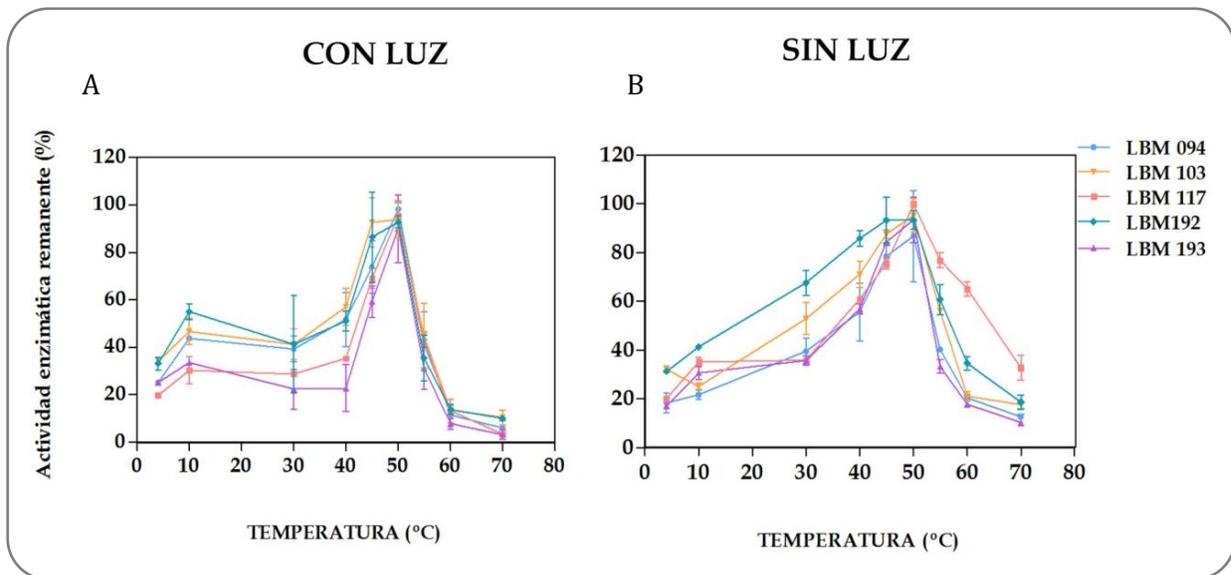
#### 8.1.3.1.4 Temperatura óptima

Una vez determinado el pH óptimo de las xilanasas presentes en los sobrenadantes de cada cepa, se lo mantuvo constante para la determinación de la

temperatura óptima. Y se determinó la actividad enzimática como se indica en la sección 7.1.2.4.

Al evaluar los sobrenadantes pertenecientes a las cepas desarrolladas en presencia de luz (**figura 11 A**), se observó a 50°C la mayor actividad enzimática en *T. harzianum* LBM 094, *T. atroviride* LBM 117 y *Trichoderma* sp. LBM 193 ( $p < 0,05$ ). Para *T. harzianum* LBM 103 y *Trichoderma* sp. LBM 192 se observó la mayor actividad entre 45°C y 50°C ( $p > 0,05$ ).

De la evaluación de la actividad enzimática de los sobrenadantes obtenidos de las cepas correspondientes a los ensayo llevados a cabo sin luz (**figura 11 B**), se registró en *T. harzianum* LBM 094 y *T. harzianum* LBM 103, la temperatura máxima de actividad entre 45 y 50°C ( $p > 0,05$ ). Para *T. atroviride* LBM 117 y para *Trichoderma* sp. LBM 193 la temperatura óptima de actividad enzimática se registró a los 50°C ( $p < 0,05$ ) y en *Trichoderma* sp. LBM 192 se observó la mayor actividad enzimática entre 40°C y 50°C ( $p > 0,05$ ).



**Figura 11. Temperatura óptima.** Efecto de la temperatura sobre la actividad xilanolítica en 5 cepas de *Trichoderma*. Cada curva representa a una cepa, el 100% indica la temperatura a la cual la actividad enzimática fue máxima.

Máxima actividad registrada en a y expresada en  $U\ mL^{-1}$ ; LBM 094=  $22,0146 \pm 0,554$ , LBM 103=  $19,7726 \pm 2,206$ , LBM 117=  $28,9080 \pm 1,931$ , LBM 192=  $16,2359 \pm 3,583$ , LBM 193=  $27,8190 \pm 4,390$

Máxima actividad registrada en b y expresada en  $U\ mL^{-1}$ ; LBM 094=  $17,4459 \pm 3,749$ , LBM 103=  $22,0317 \pm 1,587$ , LBM 117=  $25,3131 \pm 0,005$ , LBM 192=  $20,6417 \pm 0,817$ , LBM 193=  $21,9991 \pm 2,185$

#### 8.1.3.1.5 Termoestabilidad

La estabilidad de la actividad enzimática de los sobrenadantes seleccionados para cada cepa se evaluó a 30, 50 y 70 °C a diferentes intervalos de tiempos hasta las 72 h, a pH 4,8.

Al evaluar la estabilidad a 30°C en los sobrenadantes enzimáticos obtenidos de los ensayos desarrollados en presencia de luz para *Trichoderma* sp. LBM 192 y *Trichoderma* sp. LBM 193 se registró que la actividad fue superior al 50 % hasta las 12 h. Para *T. harzianum* LBM 094, *T. harzianum* LBM 103 y *T. atroviride* LBM 117 la actividad se mantuvo por encima del 50% hasta las 24 h de incubación (**figura 12 A**).

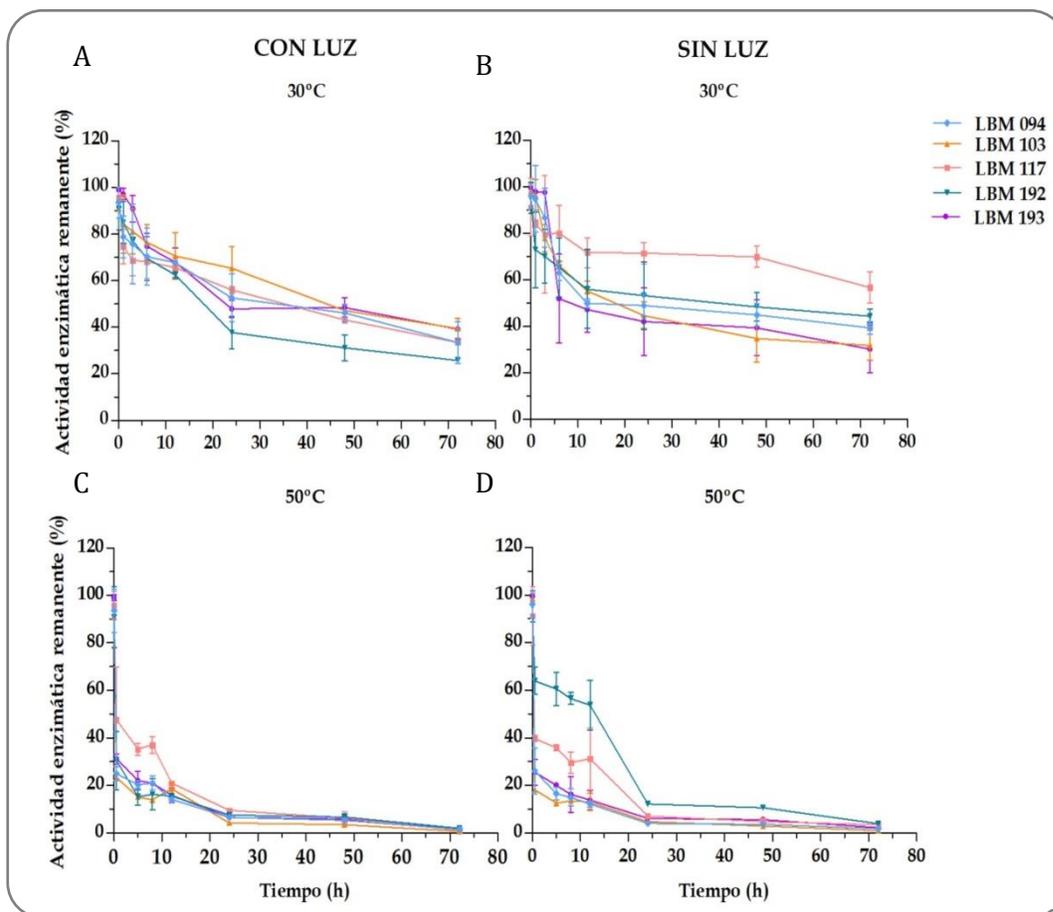
La termoestabilidad a 30°C de la actividad xilanolítica para los sobrenadantes obtenidos de los ensayos llevados a cabo en ausencia de luz de *T. harzianum* LBM 103 y *Trichoderma* sp. LBM 193 se mantuvo en el 50% hasta las 12 h de incubación. En *T. harzianum* LBM 094, *Trichoderma* sp. LBM 192 y *T. atroviride* LBM 117 se registró que la actividad enzimática remanente se mantuvo en niveles cercanos al 50% hasta las 24, 48 y 72 h de incubación respectivamente (**figura 12 B**).

Del análisis de la estabilidad a 50°C de la actividad enzimática en los sobrenadantes obtenidos del ensayo llevado a cabo en presencia de luz para *T. harzianum* LBM 094, *T. harzianum* LBM 103, *Trichoderma* sp. LBM 192 y *Trichoderma* sp. LBM 193 se registró que la actividad enzimática remanente fue de 30% después de los 30 min de incubación, mientras que *T. atroviride* LBM 117 mantuvo este porcentaje de actividad enzimática después de las 5 h de incubación (**figura 12 C**).

A 50°C la estabilidad enzimática en los sobrenadantes obtenidos de los ensayos desarrollados en ausencia de luz, después de los 30 min de incubación, para la cepa *T. harzianum* LBM 103 la actividad se mantuvo en el orden del 20%, para *T. harzianum* LBM 094 y *Trichoderma* sp. LBM 193 se mantuvo en niveles cercanos al 30%. La actividad enzimática residual para *T. atroviride* LBM 117 mantuvo niveles cercanos al 30% hasta las 12 h de incubación. Con respecto a la

cepa *Trichoderma* sp. LBM 192 la actividad enzimática residual se mantuvo por encima del 50% hasta a las 12 h (figura 12 D).

A 70°C la estabilidad enzimática se mantuvo en niveles cercanos al 30 % únicamente por 2 min de incubación.



**Figura 12. Termoestabilidad.** Estabilidad enzimática de xilanasas presente en sobrenadante de 5 cepas de *Trichoderma* obtenido en presencia y ausencia de luz a 30°C y 50°C.

#### 8.1.3.1.6 Estabilidad en función de pH

La estabilidad de la actividad enzimática de los sobrenadantes seleccionados para cada cepa se evaluó a pH 3; 4,8; 7 y 10 a diferentes intervalos de tiempos hasta las 72 h a 30°C.

A pH 3 la actividad enzimática en los sobrenadantes para los ensayos con y sin luz, mostraron comportamientos similares. Las cepas *T. harzianum* LBM 094, *T.*

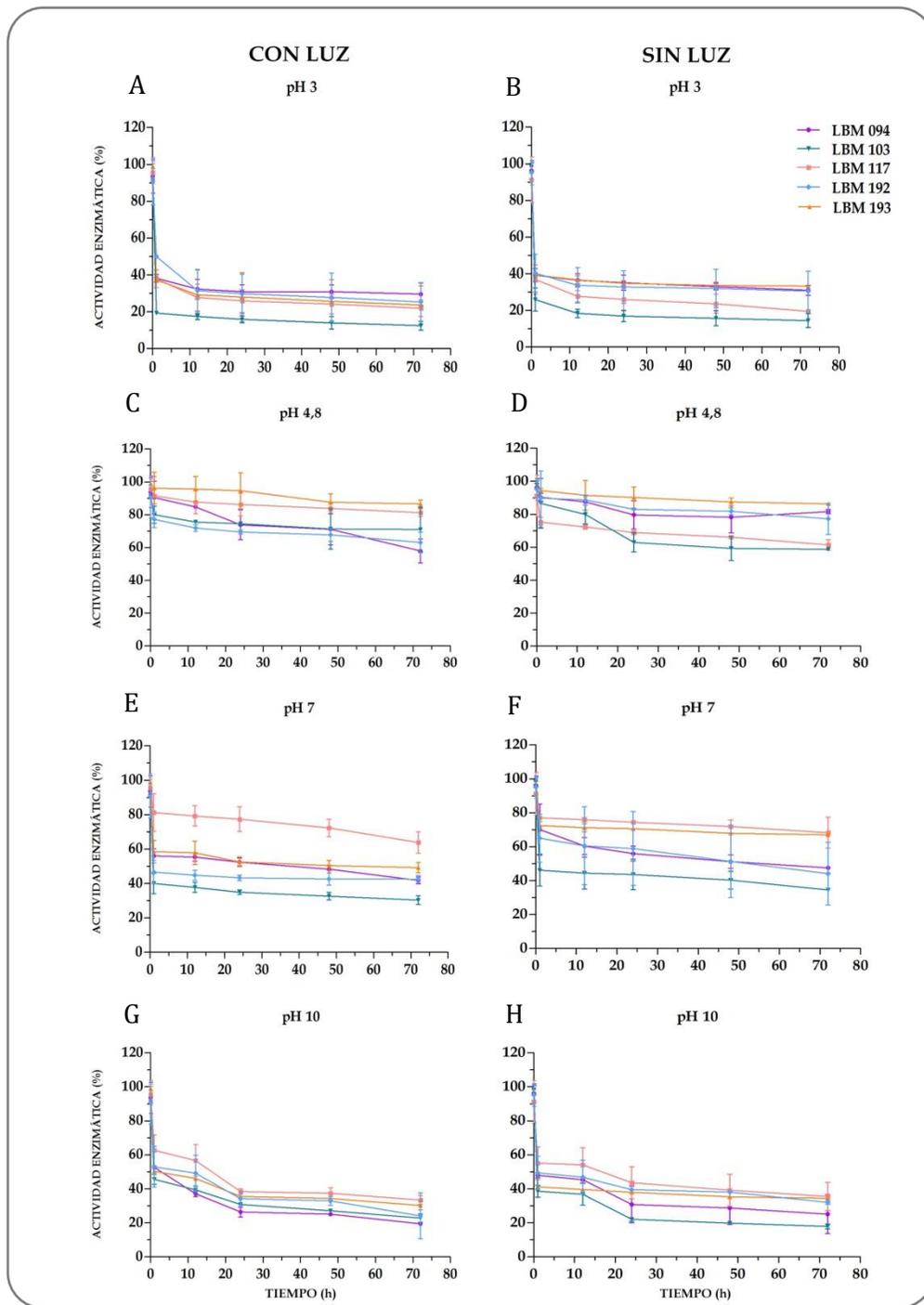
*atroviride* LBM 117, *Trichoderma* sp. LBM 192 y *Trichoderma* sp. LBM 193 mostraron niveles cercanos al 30% de actividad enzimática residual después de las 72 h de incubación, mientras que para la cepa *T. harzianum* LBM 103 la actividad enzimática se mantuvo en niveles cercanos al 15 % hasta las 72 h de incubación (**figura 13 A y B**).

Del análisis de la estabilidad enzimática a pH 4,8 en presencia de luz las cepas *T. harzianum* LBM 094, *T. harzianum* LBM 103, y *Trichoderma* sp. LBM 192 mantuvieron niveles de actividad superiores al 60% hasta los 72 h. Las cepas *T. atroviride* LBM 117 y *Trichoderma* sp. LBM 193 registraron niveles de actividad enzimática residual superiores al 80% (**figura 13 C**).

La estabilidad enzimática a pH 4,8, en ausencia de luz para las cepas *T. harzianum* LBM 094, *Trichoderma* sp. LBM 192 y *Trichoderma* sp. LBM 193 se mantuvo en niveles superiores al 80%. Las cepas *T. harzianum* LBM 103 y *T. atroviride* LBM 117 mantuvieron niveles en el orden del 60% de actividad enzimática remanente hasta las 72 h (**figura 13 D**).

A pH 7 para ambos ensayos (con y sin luz) la cepa *T. harzianum* LBM 103 mantuvo entre el 30 y 40% de la actividad enzimática. Para las cepas *T. harzianum* LBM 094 y *Trichoderma* sp. LBM 192 la actividad enzimática residual se mantuvo en niveles de entre el 40 y 50 % y para las cepas *T. atroviride* LBM 117 y *Trichoderma* sp. LBM 193, se mantuvo entre el 50 y 60% de la actividad enzimática inicial (**figura 13 E y F**).

Del análisis de la estabilidad de la actividad enzimática a pH 10 de los sobrenadantes obtenidos de los ensayos desarrollados en presencia y ausencia de luz, se observó que en las cepas *T. harzianum* LBM 094, *T. harzianum* LBM 103 *Trichoderma* sp. LBM 192 y *Trichoderma* sp. LBM 193 se mantuvo entre el 40 y 50% de la actividad enzimática inicial después de 1 h de incubación y para *T. atroviride* LBM 117 se mantuvo en el orden del al 50% después de las 12 h de incubación (**figura G y H**).



**Figura 13. Estabilidad en función del pH de la actividad xilanólica.** Evaluación de la estabilidad de la actividad enzimática de xilanasas presentes en sobrenadante de 5 cepas de *Trichoderma* obtenido en presencia y ausencia de luz a diferentes pH (pH 3, pH 4,8, pH 7 y pH 10).

---

#### **8.1.4 Caracterización del potencial xilanolítico de *T. atroviride* LBM 117**

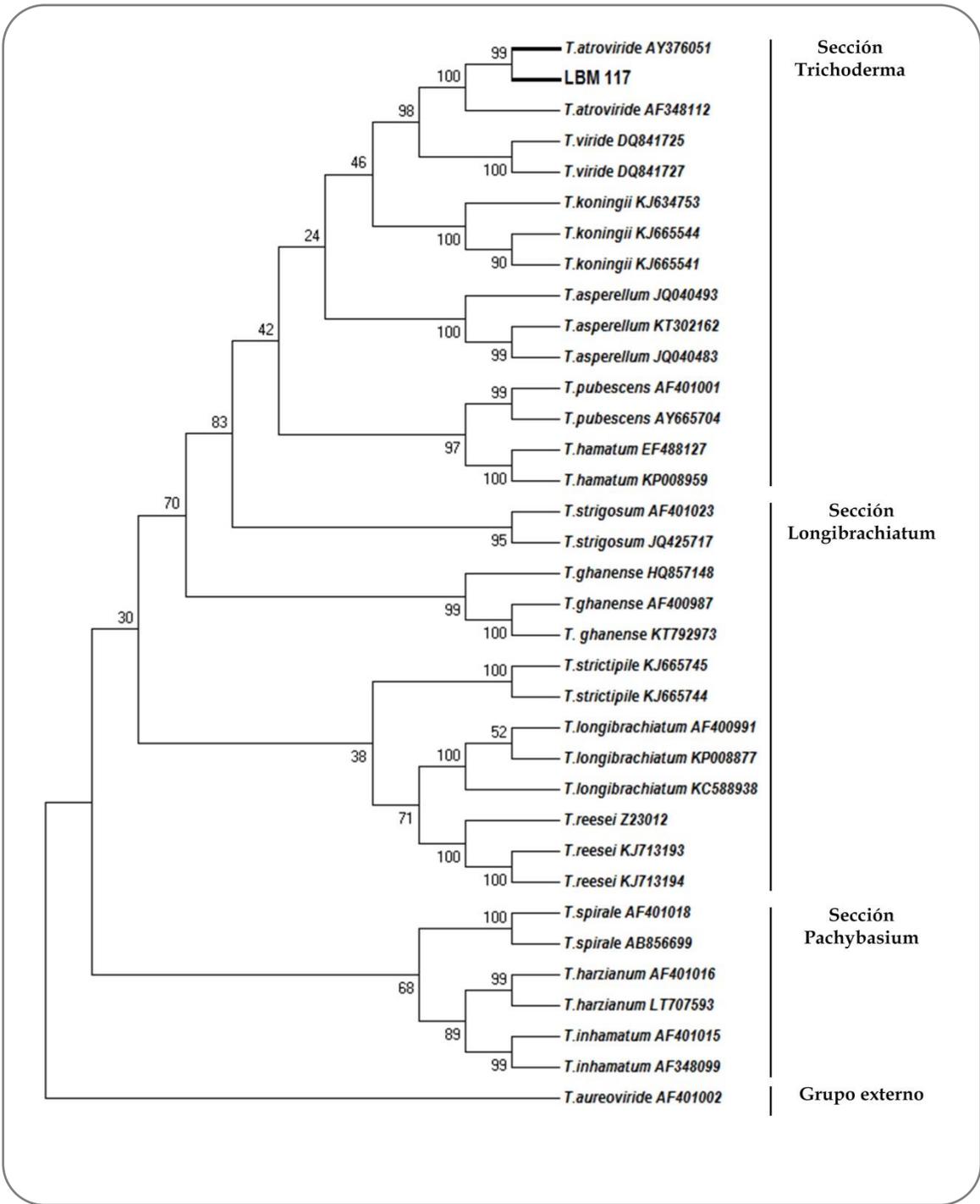
Del análisis realizado en las secciones anteriores resultó que *T. atroviride* LBM 117 se presentó como la cepa con mayor potencial biotecnológico, ya que su actividad xilanolítica fue alta y ésta se mostró como la más estable a 30°C por lo que fue seleccionada para realizar los ensayos siguientes.

##### **8.1.4.1 Identificación molecular**

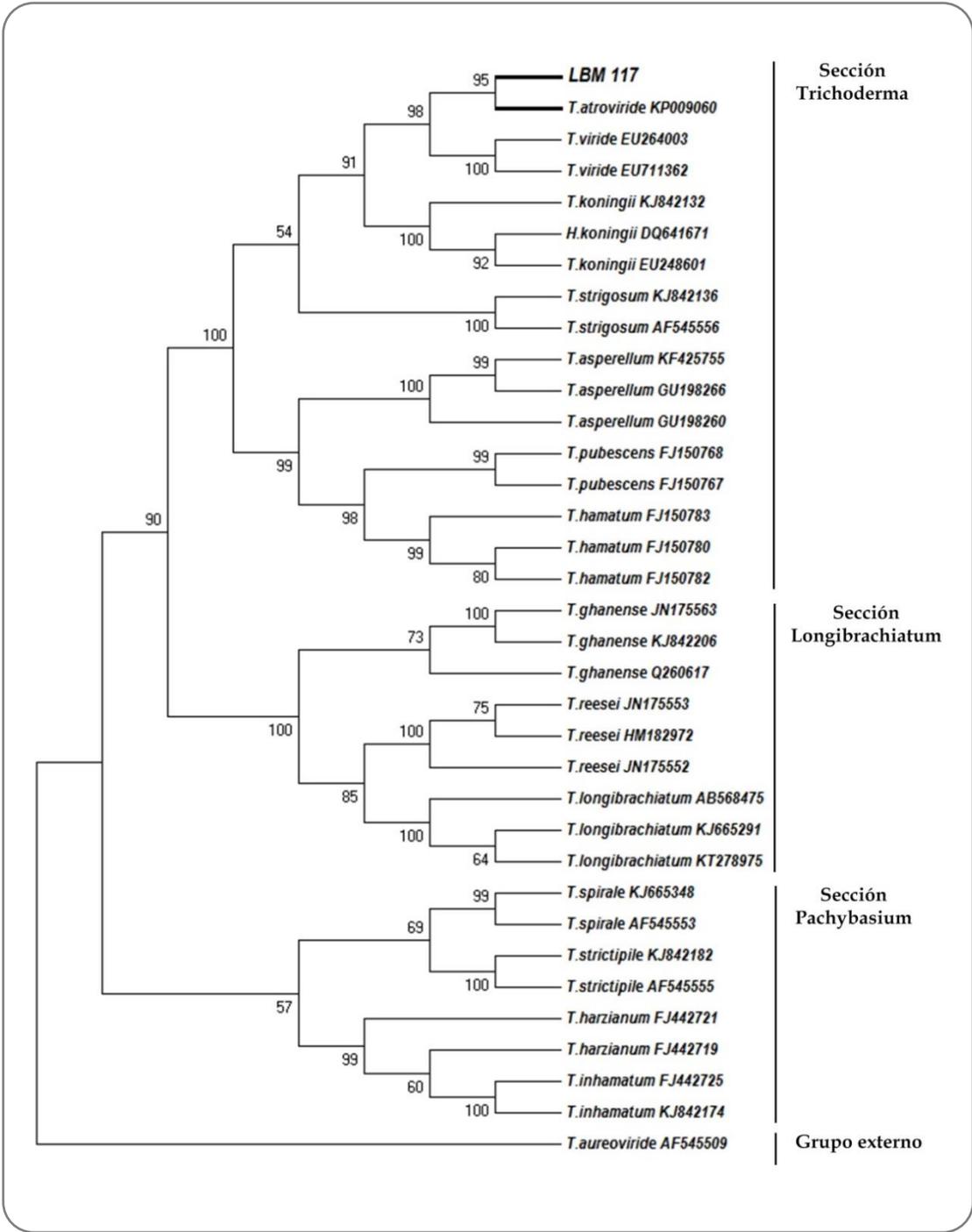
Debido a la importancia biotecnológica del género *Trichoderma* es necesario identificar correctamente la especie con la que se trabaja.

Para ello se procedió a realizar la identificación molecular mediante el empleo de cebadores que permitieron la amplificación de un fragmento de 664 pb del gen que codifica para el factor de elongación de la traducción (*tef1*) y además se amplificó una región de 890 pb que codifica para la subunidad 2 de la ARN polimerasa (RPB-2), ambos fragmentos fueron secuenciados.

Del análisis bioinformáticos de dichas secuencias se obtuvo que la cepa LBM 117 se agrupó en un clado con *T. atroviride* (AY376051 y AF34812) con un 99% de identidad para *tef1* (**figura 14**) y con 98% de identidad para RPB-2 (KP009060) (**figura 15**).



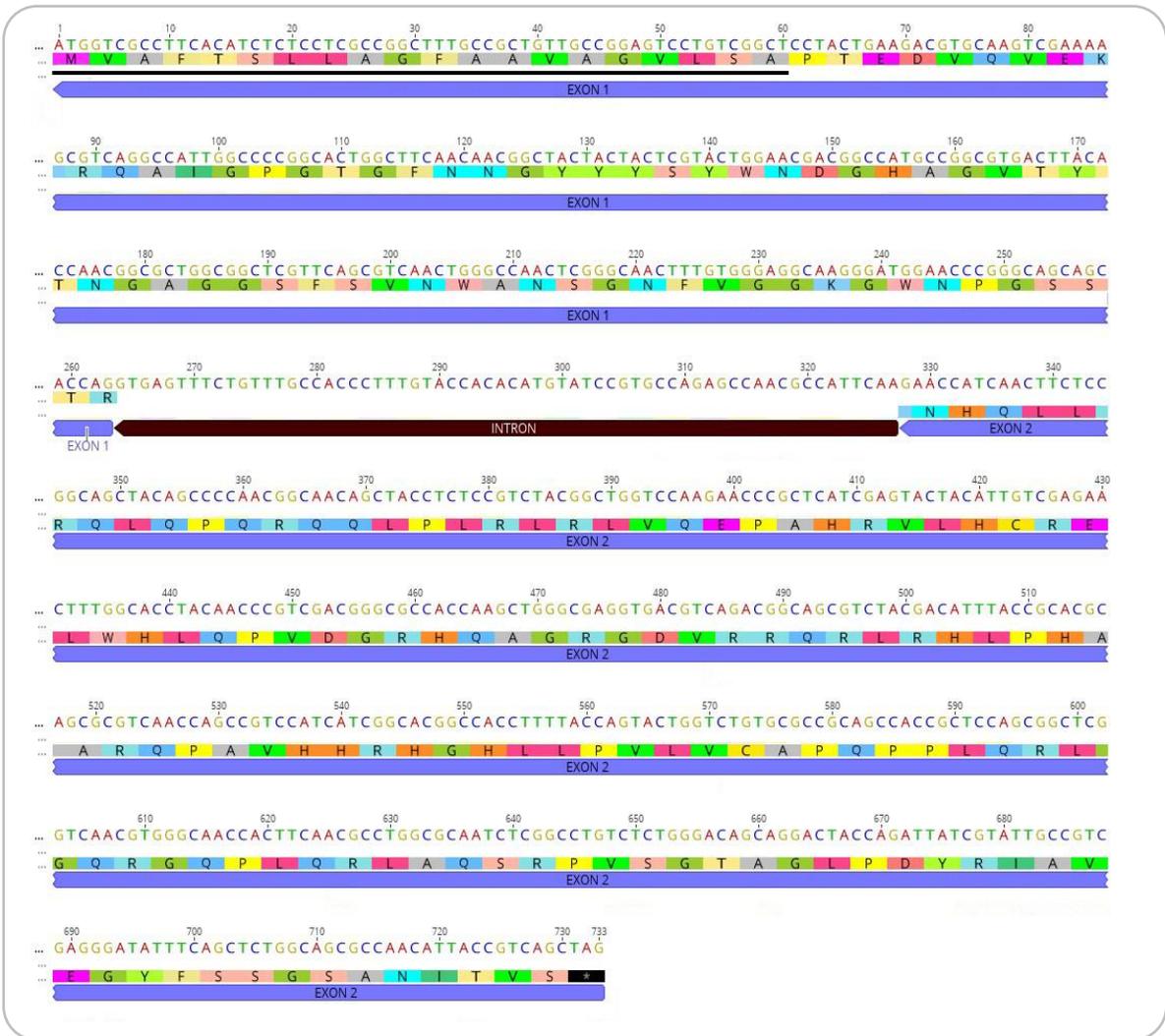
**Figura 14** Identificación molecular de *T. atroviride* LBM 117. Dendograma consenso con un bootstrap de 1000 repeticiones, que muestra la posición de la cepa LBM 117, inferido por NJ tomado del análisis del alineamiento obtenido de la amplificación del fragmento del gen que codifica para el factor de elongación de la traducción (*tef1*).



**Figura 15. Identificación molecular de *T. atroviride* LBM 117.** Dendograma consenso con un bootstrap de 1000 repeticiones que muestra la posición de la cepa de LBM 117 seleccionada en este trabajo que fue inferido por NJ tomado del análisis del alineamiento obtenido de la amplificación de una región del gen la subunidad 2 de la ARN polimerasa (RPB-2).

#### **8.1.4.2 Obtención de un fragmento génico que codifica para una endo- $\beta$ -1,4-xilanasa**

Utilizando cebadores EX-S y EX-AS diseñados a partir del genoma de *T. atroviride* IMI 206040 (XM 014082116.1) fue posible obtener una banda única de 720 pb que fue secuenciada y analizada con el programa *Chromas Lite*. Se registró una secuencia génica estructural compuesta por 720 pb, en la cual se localizó la presencia de dos exones separados por un intrón de 64 pb. El exón 1 estuvo conformado por 263 pb que codifican para 88 aminoácidos, el exón 2 por 393 pb que codifican para otros 131 aminoácidos. La secuencia génica estructural que codifica para endo- $\beta$ -1,4-xilanasa, perteneciente a la cepa *T. atroviride* LBM 117, junto a la secuencia aminoacídica deducida mediante programas bioinformáticos se muestran en la **figura 16**.

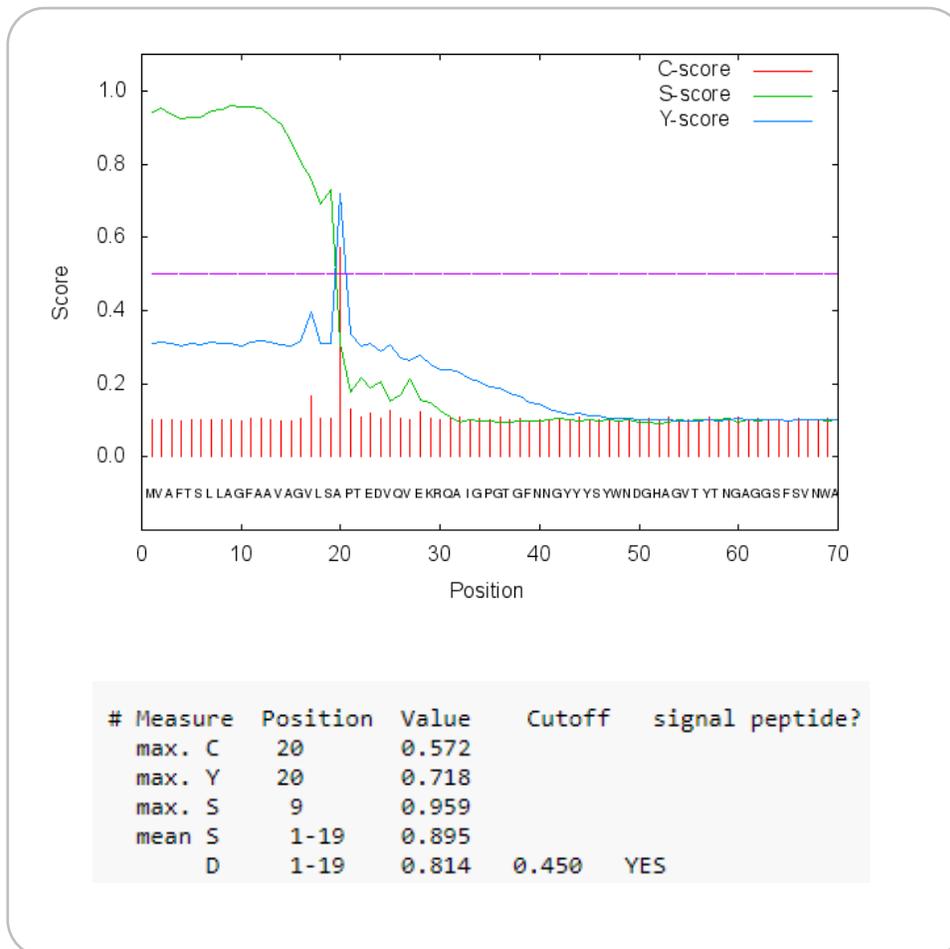


**Figura 16** Secuencia nucleotídica y aminoacídica correspondiente al gen una endo-β-1,4-xilanasa en *T. atroviride* LBM 117. La secuencia nucleotídica está representada por letras de colores, por encima de la secuencia aminoacídica, la cual está representada por letras en recuadros. El intrón se encuentra subrayada con marrón, los exones en celeste y la región que codifica el péptido señal esta subrayada con negro. El último recuadro negro que contiene un asterisco marca al codón de stop.

Esta secuencia contiene información para producir una proteína madura de 203 aminoácidos con una secuencia péptido señal de 19 aminoácidos con sitio de clivaje A-P.

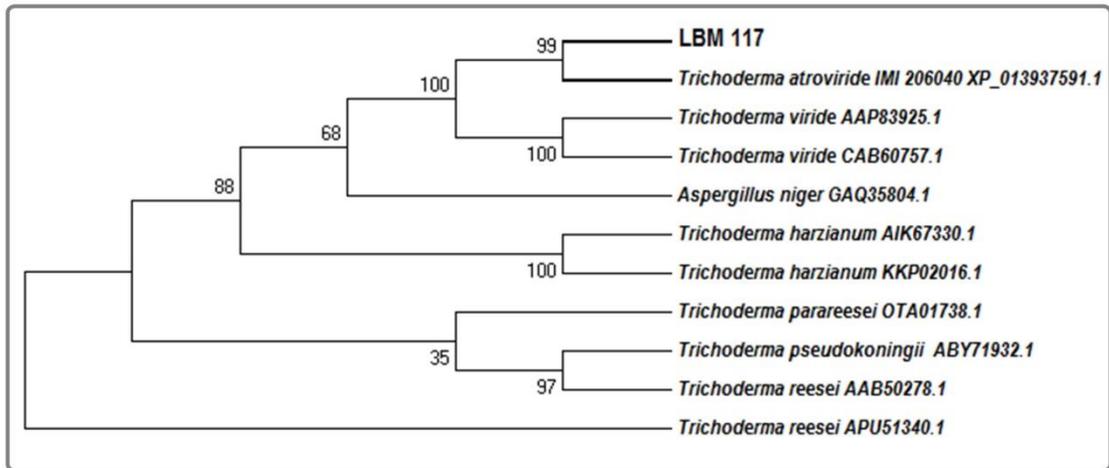
En la **figura 17** se puede observar que el *score C* muestra un pico en el sitio de escisión, el aminoácido inmediatamente posterior (P) es el primero correspondiente a la proteína madura. Los valores de las medias de los parámetros

que arroja SignalP son todos superiores a 0,1 lo que confirmó que se trató de una proteína de secreción (**figura 17**).



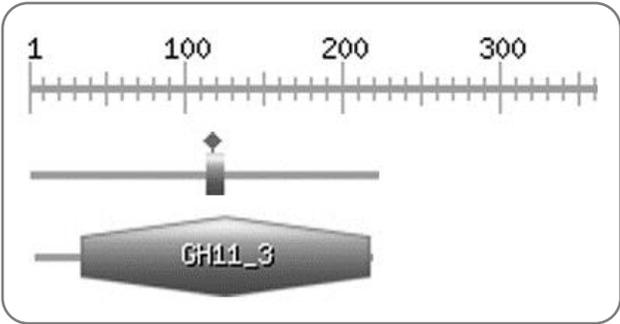
**Figura 17. Análisis de la región estructural del gen que codifica para una endoxilanasas de *T. atroviride* LBM 117.** Imagen tomada de SignalP. La línea roja vertical más larga indica el punto de escisión. La curva verde se muestra por encima de *cutoff* sobre la secuencia del péptido señal y cae por debajo de ella justo en el punto de corte, en el aminoácido 19.

Del análisis del alineamiento de la secuencia obtenida con las bases de datos se obtuvo una identidad del 98% con una glicosil hidrolasa de la familia 11 perteneciente a *T. atroviride* IMI 206040. Como resultado del alineamiento se construyó el dendograma que contribuyó con la identificación correcta de la cepa seleccionada en este trabajo.



**Figura 18. Dendograma de endoxilanasas.** Dendograma consenso de endoxilanasas con un bootstrap de 1000 repeticiones que muestra la posición de la cepa de LBM 117 seleccionada en este trabajo inferido por NJ.

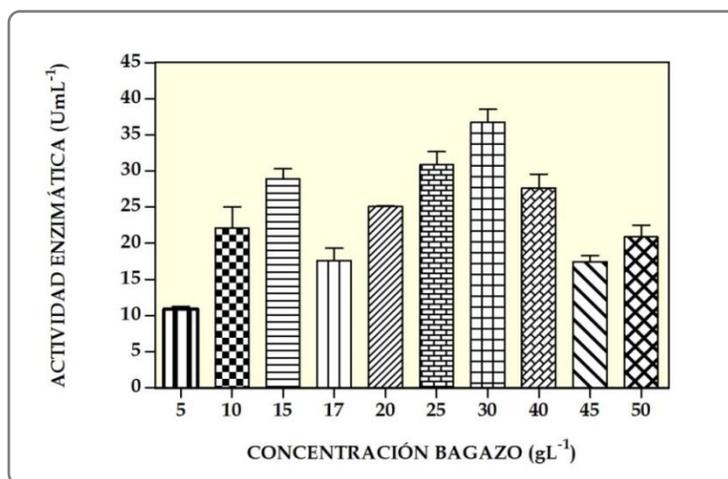
Con el fin de identificar dominios y motivos en la secuencia aminoacídica deducida de la secuencia nucleotídica obtenida, se utilizó la herramienta PROSITE. En la **figura 19** se observa el resultado del análisis realizado donde se visualiza el sitio activo nucleofílico correspondiente a las glicosil hidrolasas de la familia 11 (GH11), cuya actividad catalítica corresponde a la endohidrólisis de las uniones del xilano. Esta es una familia proteica monoespecífica e incluye únicamente a las endoxilanasas.



**Figura 19. Análisis con PROSITE de la secuencia aminoacídica de una endoxilanasas perteneciente a *T. atroviride* LBM 117.** Identificación de dominio catalítico, donde la regla indica la posición en la secuencia y el rombo al sitio activo de la endoxilanasas, pertenecientes a la familia 11 de las glicosil hidrolasas.

### 8.1.4.3 Evaluación de la influencia de diferentes concentraciones de bagazo de caña de azúcar

Para establecer la mejor concentración de bagazo de caña de azúcar que permita obtener los máximos niveles de actividad xilanasa, se evaluó el efecto de siete concentraciones diferentes de esta fuente de carbono en presencia de luz y se monitoreó los niveles de actividad enzimática durante 30 días de incubación cada 72 h (figura 20). Del análisis de la varianza se determinó que la mayor actividad enzimática se alcanzó en el ensayo suplementado con 30 g L<sup>-1</sup> de bagazo de caña de azúcar luego de 12 días de cultivo con 36,749 ± 2,522 U mL<sup>-1</sup> (p < 0,05)



**Figura 20. Evaluación de la influencia de diferentes concentraciones de bagazo de caña de azúcar.** Actividad xilanólítica presente en sobrenadantes de *T. atroviride* LBM 117 crecido en presencia de luz con diferentes concentraciones de bagazo de caña de azúcar a los 12 días de cultivo

### 8.1.4.4 Optimización de la fuente de nitrógeno.

Las concentraciones de las fuentes de nitrógeno presentes en el medio de cultivo al igual que las fuentes de carbono juegan un rol importante en los niveles de actividad enzimática. En esta sección se trabajó con la concentración de bagazo (30 g L<sup>-1</sup>) que permitió obtener los niveles más altos de actividad en la sección anterior y para la optimización de las fuentes de nitrógeno se evaluaron diferentes concentraciones de extracto de levadura, urea y sulfato de amonio, presentes en medio Mandels (Mandels y Reese, 1957) empleado en este trabajo.

Para ello se realizó un diseño de superficie respuesta central compuesto con 5 puntos centrales. Cada fuente de nitrógeno se evaluó a 5 niveles, luego se realizó la validación del modelo.

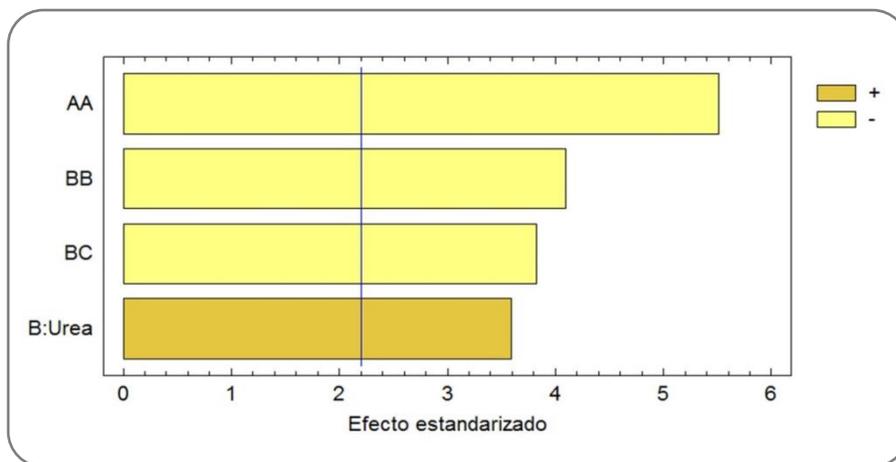
En la **tabla 5** se muestran los resultados obtenidos en cuanto a los niveles de actividad xilanolítica de acuerdo a las diferentes concentraciones de las tres fuentes de nitrógeno que se analizaron. Los ensayos 1 a 5 corresponden a los puntos centrales

**Tabla 5. Optimización de las fuentes de nitrógeno.** Matriz experimental del diseño central compuesto estrellado 2<sup>2</sup> utilizada para el análisis del efecto de las tres fuentes de nitrógeno sobre la actividad xilanolítica de *T. atroviride* LBM 117.

Ensayo	Variable codificada			Variable real			Respuesta
	A	B	C	Sulfato amonio (g L <sup>-1</sup> )	Urea (g L <sup>-1</sup> )	Extracto de levadura (g L <sup>-1</sup> )	AEX (U mL <sup>-1</sup> )
1	0	0	0	1,4	0,3	3,25	32,18
2	0	0	0	1,4	0,3	3,25	26,609
3	0	0	0	1,4	0,3	3,25	34,856
4	0	0	0	1,4	0,3	3,25	24,042
5	0	0	0	1,4	0,3	3,25	35,239
6	-1	-1	-1	0,7	0,15	0,25	10,224
7	1	-1	-1	2,1	0,15	0,25	7,384
8	-1	1	-1	0,7	0,45	0,25	26,828
9	1	1	-1	2,1	0,45	0,25	27,046
10	-1	-1	1	0,7	0,15	6,25	22,349
11	1	-1	1	2,1	0,15	6,25	18,963
12	-1	1	1	0,7	0,45	6,25	6,018
13	1	1	1	2,1	0,45	6,25	20,929
14	-1,68179	0	0	0,224	0,048	3,25	12,791
15	1,68179	0	0	2,576	0,552	3,25	14,429
16	0	-1,68179	0	1,4	0,048	3,25	6,674
17	0	1,68179	0	1,4	0,552	3,25	30,542
18	0	0	-1,68179	1,4	0,3	0	32,672
19	0	0	1,68179	1,4	0,3	8,29	34,911

Como resultado del análisis del diseño se obtuvo que sólo urea tiene efecto significativo y positivo sobre la actividad xilanolítica. La interacción entre la urea y

el extracto de levadura tuvo efecto significativo pero negativo, al igual que el efecto cuadrático del sulfato de amonio y urea (**figura 21**).



**Figura 21. Optimización de las fuentes de nitrógeno.** Diagrama de Pareto de la optimización de fuente nitrógeno estandarizado donde se muestran los factores que resultaron significativos para la actividad xilanólítica. El largo de la barra viene dado por el efecto del factor y la extensión de las barras más allá de la línea vertical muestra cuales son los componentes del medio con influencia significativa sobre la respuesta analizada (actividad xilanólítica) con un nivel de confianza del 95%.

La ecuación del modelo resultó ser:

$$AE = 30,9988 + 4,5492urea - (6,8985sulfato\ de\ amonio)^2 - (5,13143urea)^2 - 6,3288urea\ extracto\ de\ levadura$$

En el gráfico de superficie respuesta tridimensional (**figura 22**) se puede observar que la actividad enzimática es máxima cuando la urea tiende al máximo nivel, el sulfato de amonio en su nivel medio y el extracto de levadura en su nivel más bajo.

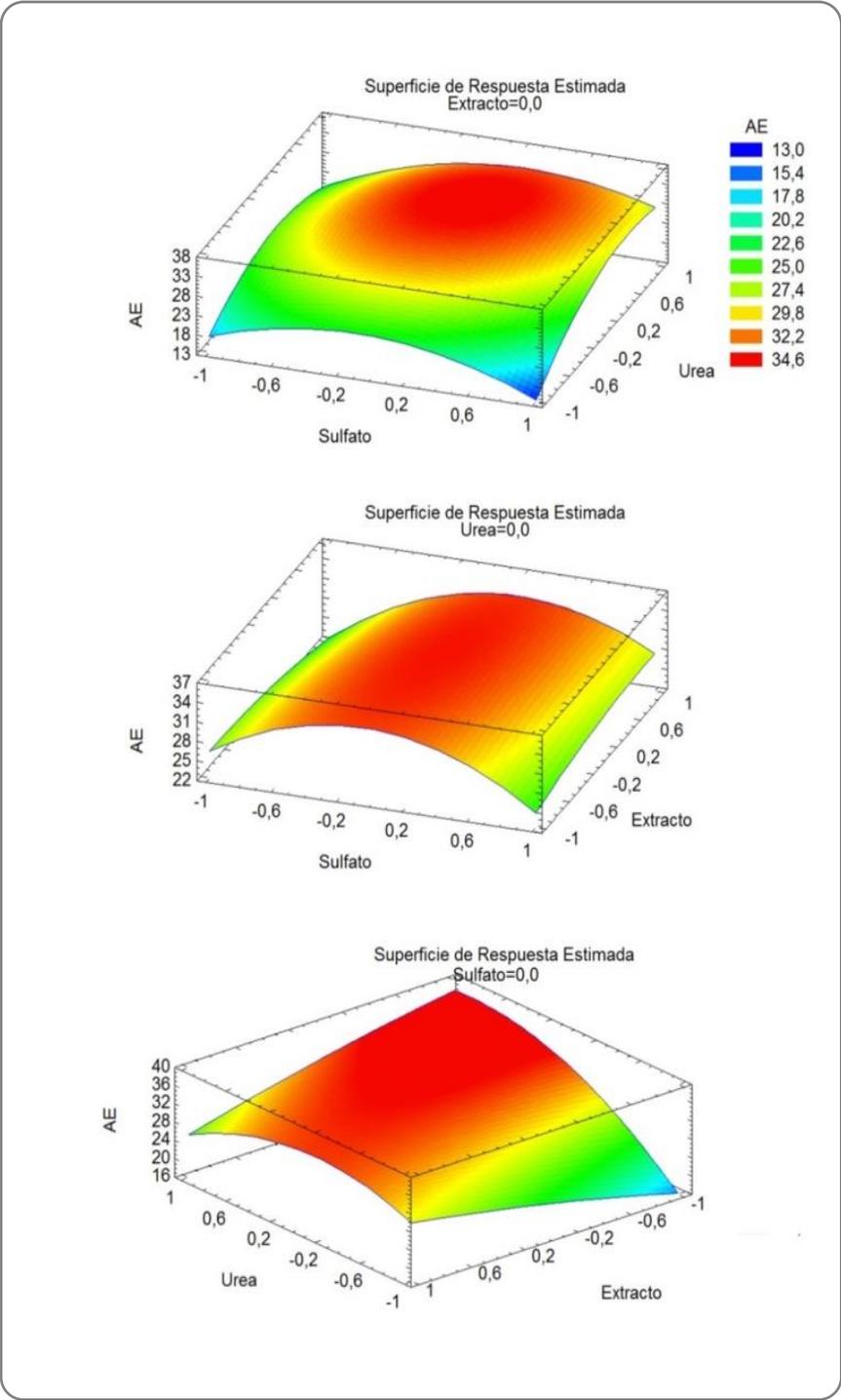


Figura 22. Optimización de la fuente de nitrógeno para el aumento de la actividad xilanolítica de *T. atroviride* LBM 117. Superficie repuesta tridimensional para los niveles de actividad xilanolítica obtenidos a los 12 días de cultivo de un diseño central compuesto 2<sup>2</sup>.

8.1.4.4.1 Validación del modelo

Basado en el análisis estadístico de los resultados experimentales obtenidos, se llevó a cabo la validación del modelo por triplicado. En la **tabla 6** se aprecia la concentración óptima que arrojó el programa estadístico de cada una de las fuentes de nitrógeno que se evaluaron. Se pudo observar que las actividades enzimáticas obtenidas no muestran diferencia con el valor esperado ( $p < 0,005$ ).

**Tabla 6. Validación del modelo de optimización.** Concentraciones de fuentes de nitrógeno en los niveles óptimos sugeridos y valores de actividad enzimática esperada y observada

Factor	Óptimo			
	Variable codificada	Variable real ( $g L^{-1}$ )	Valor esperado ( $U mL^{-1}$ )	Valor obtenido ( $U mL^{-1}$ )
Sulfato de amonio	0,0586589	1,4406		
Urea	1,46918	1,1115	42,211	45,642 ± 3,651
Extracto de levadura	-1,68179	0		

8.1.4.5 Análisis económico

Para la determinación del costo total del medio de cultivo para la producción de 10000 UI de xilanasas y evaluar la ventaja de utilizar bagazo de caña de azúcar como fuente alternativa al xilano, se estimaron los costos de los componentes teniendo en cuenta los precios promedio en el mercado, y se determinó el costo medio ponderado total para cada alternativa. Los resultados se muestran en la **tabla 7**. La producción de xilanasas utilizando bagazo de caña de azúcar como fuente de carbono fue 57 veces más barata en comparación al costo que implica su producción con xilano de madera de hayas, convirtiéndose en una alternativa económica.

**Tabla 7. Análisis económico.** Costo ponderado de cada alternativa de medio de cultivo para la producción de xilanasas.

Fuente de carbono	Concentración (g L <sup>-1</sup> )	Costo total (U\$S kg <sup>-1</sup> )	Productividad (U L <sup>-1</sup> )	Costo total estandarizado (U\$S/10000 U)
Bagazo de caña de azúcar	30	1,59	43000	0,37
Xilano de madera de haya (Sigma- Aldrich®)	10	41,06	19300	21,28

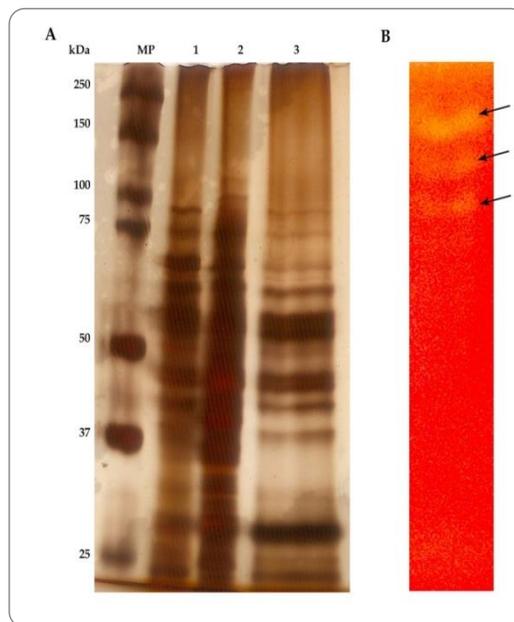
## 8.2 Inmovilización de xilanasas presentes en el sobrenadante.

Para llevar a cabo una aplicación sustentable, el costo de la enzima es uno de los principales factores que determinan la economía del proceso. La inmovilización enzimática puede asegurar una amplia termoestabilidad y su resistencia a condiciones extremas y reactivos químicos para aplicaciones industriales. Además, las xilanasas inmovilizadas se pueden separar fácilmente de los productos de la reacción, permitiendo que las enzimas puedan ser empleadas continuamente en operaciones en biorreactor. Reducir los costos en base a un mejor rendimiento de la actividad de la enzima optimizando el proceso de inmovilización es crucial en investigaciones para la aplicación industrial. Además, se deben evitar las condiciones de inmovilización que provoquen problemas de plegado de la enzima. Sumado a todo lo previamente mencionado, el análisis de los parámetros enzimáticos resulta muy importante para determinar las mejores condiciones donde por ejemplo la estabilidad enzimática sea máxima. Es por ello que en este apartado se realizó la inmovilización de las xilanasas presente en el sobrenadante optimizado utilizando dos matrices, poliacrilamida y agar-agar.

### 8.2.1.1 Concentración de proteínas y precipitación de polisacáridos

Para aumentar el rendimiento de la etapa de inmovilización de las xilanasas, las proteínas presentes en el sobrenadante (**figura 23 A** carril 1) se precipitaron y concentraron dos veces con sulfato de amonio al 70% de saturación (**figura 23 A**

carril 2). Como resultado de la precipitación se obtuvo un extracto coloreado marrón oscuro, por lo tanto, fue necesario clarificarlo con Tween 80 al 0,1% en una relación 2:1 (v/v) para la precipitación de los polisacáridos (**figura 23 A** carril 3). Estos fueron cuantificados según el método de fenol- sulfúrico lográndose precipitar el 80 % de los polisacáridos totales (de 75 a 15 mg mL<sup>-1</sup> de hidratos de carbono totales). En un zimograma se pudo corroborar la presencia de tres isoenzimas (**figura 23 B**).

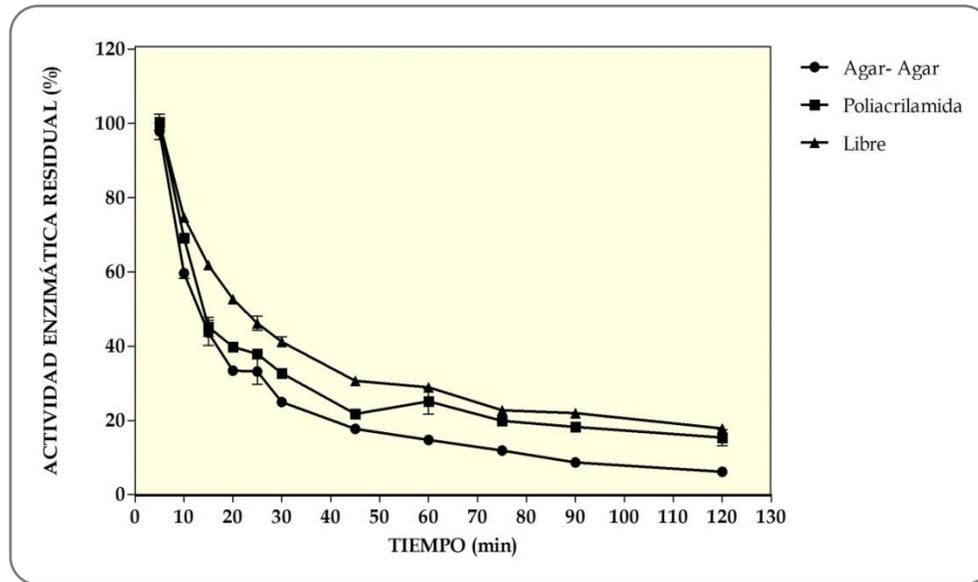


**Figura 23. Precipitación de proteínas y clarificación de polisacáridos presentes en el sobrenadante optimizado.** (A) Gel de poliacrilamida desnaturante al 12% teñido con nitrato de plata, MP marcador de peso molecular 1: sobrenadante de cultivo de *T. atroviride* LBM 117, 2 sobrenadante precipitado con sulfato de amonio al 70% de saturación y 3 extracto clarificado con Tween 80. (B) Zimograma del extracto clarificado, las flechas indican la presencia de isoenzimas.

#### 8.2.1.2 Tiempo de reacción

En primer lugar, se estudió el efecto del tiempo de reacción sobre la actividad catalítica de la xilanasas libre en comparación a la enzima inmovilizada en agar-agar y en poliacrilamida. En los tres ensayos la actividad de la xilanasas disminuye a medida que aumenta el tiempo de incubación. En la **figura 24** se

puede visualizar que a los cinco minutos se obtiene la máxima actividad enzimática, tanto para la xilanasa libre como en la inmovilizada.



**Figura 24. Inmovilización de xilanasas.** Efecto del tiempo de reacción sobre la actividad de la xilanasa libre ( $\blacktriangle$ ) de *T. atroviride* LBM 117 en comparación a la xilanasa inmovilizada en las dos matrices ensayadas agar - agar 2,5% ( $\bullet$ ) y acrilamida bisacrilamida 30:1( $\blacksquare$ ) (media  $\pm$  S.E., n=2)

### 8.2.1.3 Selección de la matriz de inmovilización

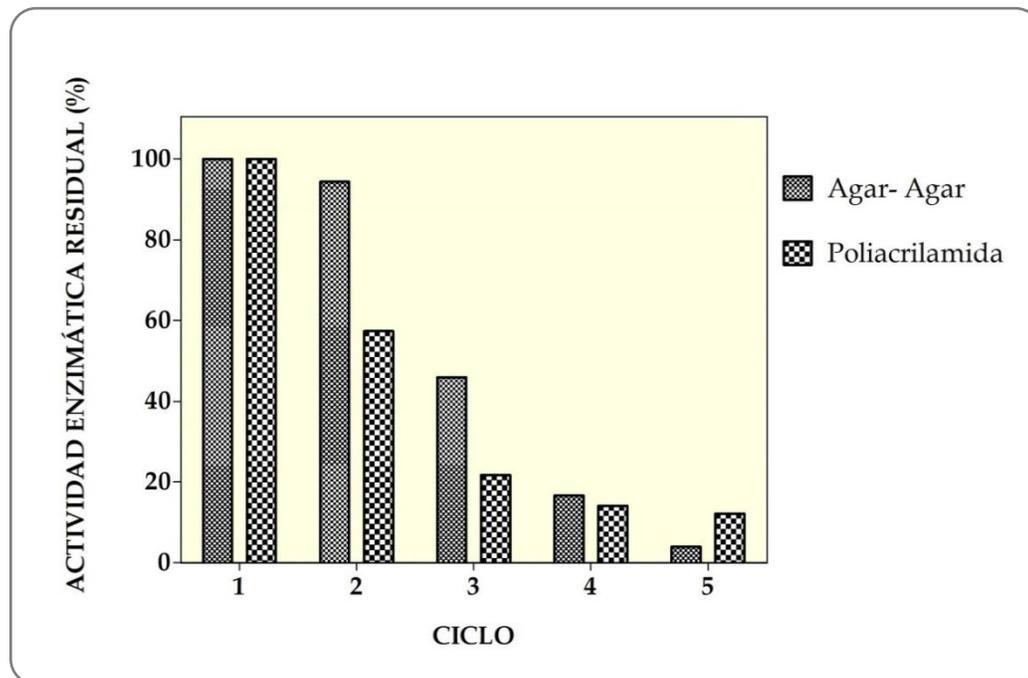
Para la selección de la matriz de inmovilización se compararon dos parámetros, por un lado, el rendimiento de la inmovilización de la matriz y por otro los ciclos de reutilización.

Para el cálculo del rendimiento de inmovilización y el rendimiento de la actividad xilanolítica inmovilizada se cuantificó la actividad enzimática antes de la inmovilización y ese nivel se tomó como la actividad enzimática inicial total ( $A_i$ ). La actividad enzimática inicial fue de  $50 \text{ U mL}^{-1} \pm 2$  ( $A_i$ ), la actividad enzimática luego de los dos lavados con buffer de los pequeños bloques de poliacrilamida conteniendo la enzima inmovilizada ( $A_I$ ) fue de  $5,76 \text{ U mL}^{-1}$ , de esto resultó que el rendimiento de la inmovilización fue de un 88%. Para el caso de la inmovilización

en agar- agar, la AI fue de  $7,55 \text{ U mL}^{-1}$  con un rendimiento de la actividad enzimática de 97%.

La reutilización de la enzima inmovilizada es un parámetro importante para determinar la factibilidad comercial del bioproceso. Por ello la xilanasa inmovilizada se sometió a ciclos consecutivos de reacción. De este ensayo se obtuvo que la enzima inmovilizada en agar exhibió casi el 50% de actividad enzimática después del tercer ciclo (**figura 25**), luego en el cuarto y quinto ciclo la actividad enzimática disminuyó por debajo del 20% ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, la inmovilización en poliacrilamida mostró una actividad enzimática de casi un 60 % al segundo ciclo y menos del 40% después del tercer ciclo ( $p < 0,05$ ).

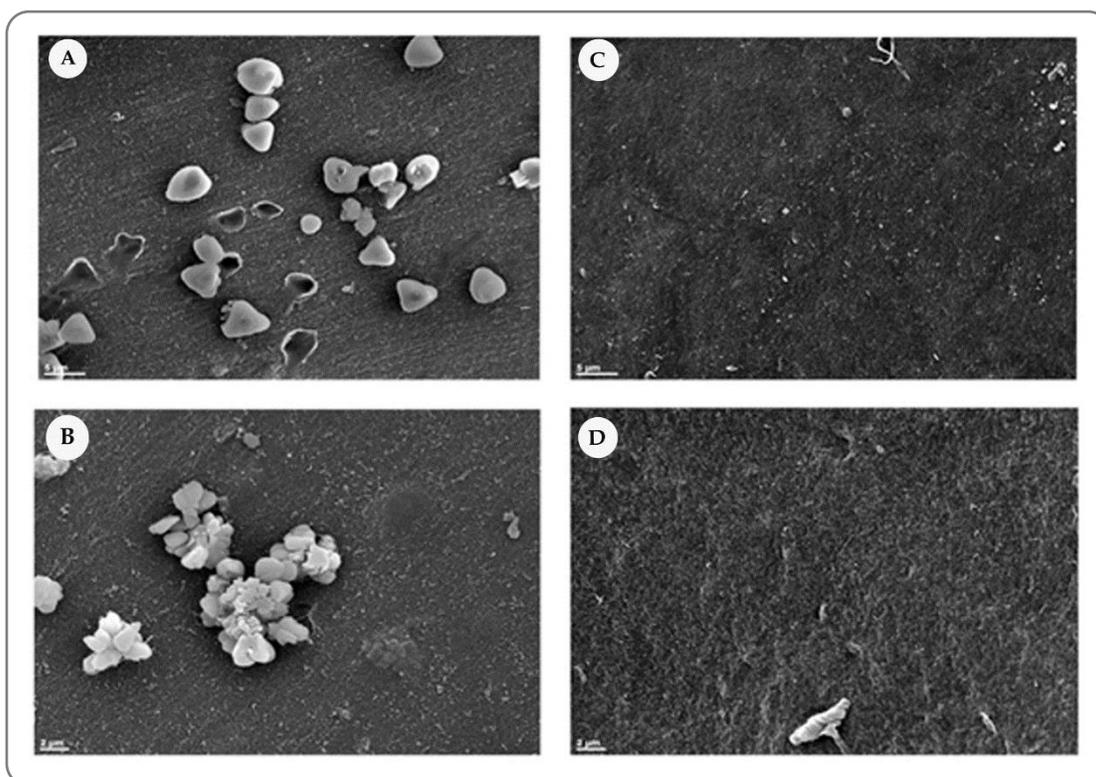
En este sentido la matriz agar- agar resultó más eficiente respecto a los niveles del rendimiento y a los ciclos de reutilización. Por estas razones se seleccionó esta matriz para continuar con otros ensayos de caracterización de la xilanasa inmovilizada.



**Figura 25. Inmovilización de endoxilanasa.** Reutilización de la xilanasa inmovilizada de *T. atroviride* LBM 117. Xilanasa inmovilizada en poliacrilamida donde el 100 % corresponde a  $5,76 \text{ U mL}^{-1}$  (■) y xilanasa inmovilizada en agar- agar donde el 100 % corresponde a  $7,55 \text{ U.mL}^{-1}$ . (■)

### 8.2.1.4 Caracterización microscópica de la matriz utilizada para la inmovilización de la xilanasa

La morfología de la superficie del polímero utilizado como matriz con y sin la xilanasa inmovilizada se examinó con microscopio electrónico de barrido a varias escalas de magnificación (**figura 26**). De esta manera fue posible visualizar diferencias notorias, puesto que en el agar que contenía la enzima inmovilizada (**figura 26 A y B**) se observaron pequeños poros ocupados por partículas o agregados de estas, también se pudo ver como algunos de estos poros se encontraron vacíos evidenciando un desprendimiento de las mismas (**figura 26 A**). Mientras que en la imagen tomada del agar sin la xilanasa inmovilizada se observó una superficie relativamente lisa (**figura 26 C y D**).



**Figura 26. Inmovilización de xilanasa de *T. atroviride* LBM 117 en agar- agar.** Imágenes tomadas por SEM A y B matriz agar-agar con la enzima inmovilizada; y control de agar- agar sin la xilanasa en C y D. En el par superior de las fotografías magnificación de 2000 x y en el par inferior magnificación de 3500 x.

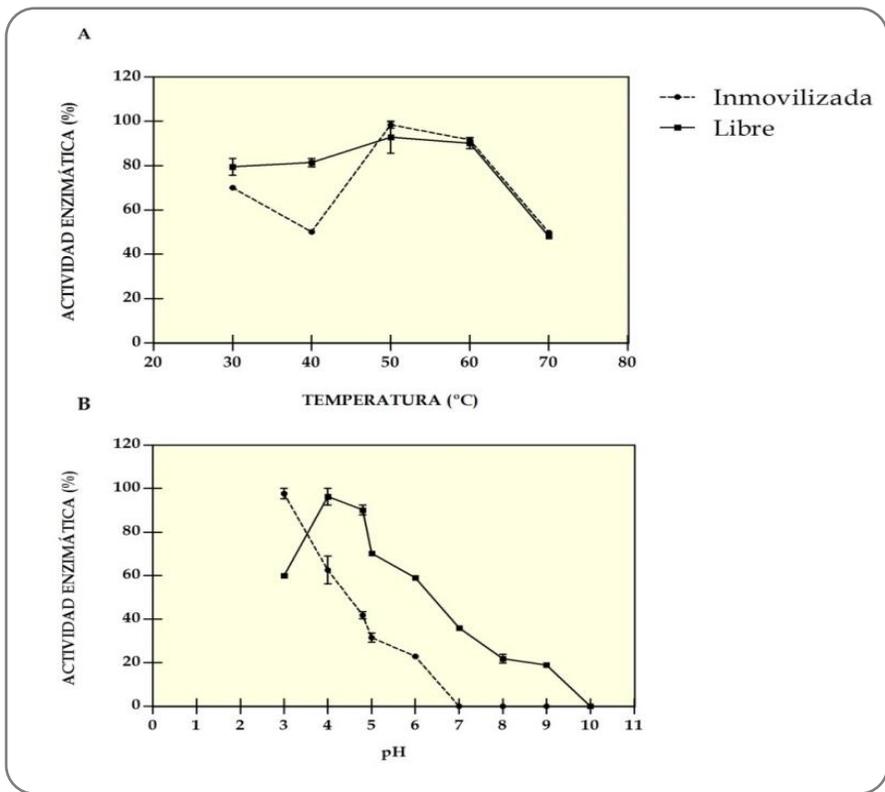
### 8.2.1.5 Caracterización de la enzima inmovilizada

Para la caracterización de la actividad de la xilanasas inmovilizada y su comparación con la enzima libre se evaluó el pH y la temperatura óptimos, luego se analizó el efecto de iones y compuestos sobre la actividad enzimática. Finalmente se compararon los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$ .

#### 8.2.1.5.1 Temperatura y pH óptimos.

Para la estimación de la temperatura óptima de actividad catalítica de la xilanasas se evaluó la actividad a cinco temperaturas. Para el caso de la enzima libre la temperatura óptima se mantuvo en un rango de entre 30 y 60 °C ( $p > 0,05$ ). Pero para la enzima inmovilizada la temperatura óptima de actividad fue de 50 °C y mostrando una disminución de la actividad enzimática ( $p < 0,05$ ) cuando ésta se evaluó a temperaturas distintas a la óptima (**figura 27 A**)

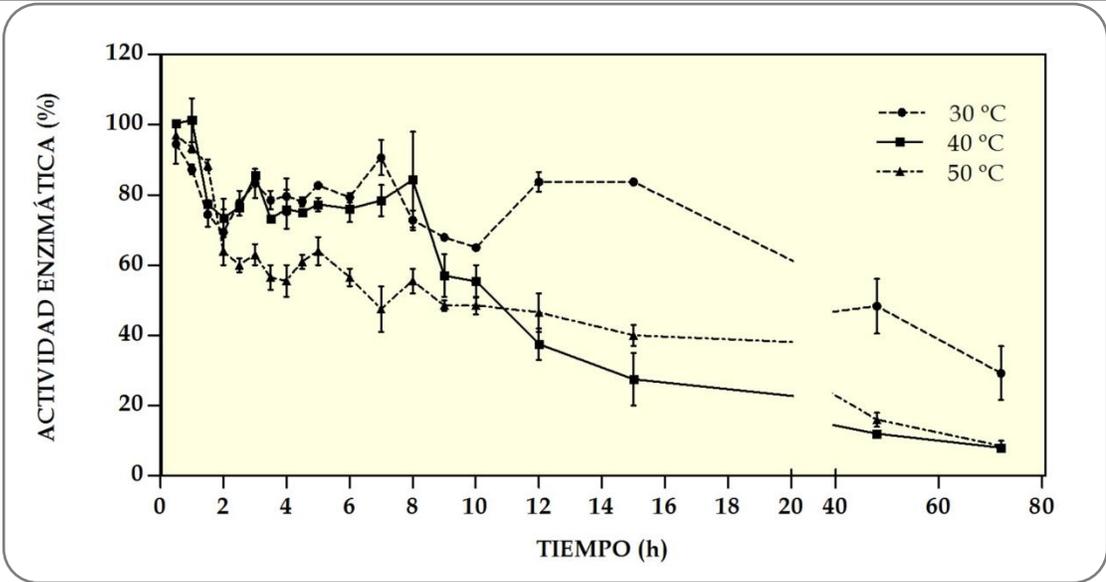
Para la determinación del pH óptimo se evaluó la actividad enzimática a nueve pH. Del análisis de varianzas para los niveles de actividad enzimática de la enzima libre resultó que al pH 4 la actividad fue máxima siendo significativamente menor a los demás pH ensayados. Para el caso de la enzima inmovilizada el pH óptimo fue 3 y mostró una amplia diferencia con la actividad detectada a los demás pH (**figura 27 B**).



**Figura 27. Temperatura y pH óptimos de actividad xilanólica.** La línea punteada muestra el comportamiento de la enzima inmovilizada y la línea continua la enzima libre. El 100% corresponde a la máxima actividad enzimática registrada, para la enzima libre fue de 50 U mL<sup>-1</sup> y para la inmovilizada fue de 7 U mL<sup>-1</sup>.

*8.2.1.5.2 Termoestabilidad*

Una de las principales razones que se pretende al inmovilizar una enzima es aumentar su termoestabilidad ya que esto brinda una ventaja a la hora de la aplicación biotecnológica que se pretende. En este trabajo se evaluó la termoestabilidad de la xilanasa inmovilizada en agar-agar y se observó que la inmovilización otorga una mayor estabilidad a 50 °C manteniendo la actividad enzimática en niveles cercanos al 40% hasta después de las 24 h de incubación. Por otro lado, a 30 y 40 °C la actividad enzimática es menor que en la enzima libre (figura 28).



**Figura 28. Termoestabilidad de la actividad xilanólítica.** Evaluación de la estabilidad de la actividad enzimática inmovilizada en agar- agar a 30, 40 y 50°C durante 72 h.

8.2.1.5.3 Efecto de aditivos sobre la actividad xilanólítica

El efecto de diez aditivos sobre la actividad enzimática de la xilanasas inmovilizada y libre fueron estudiadas, para ello se determinó la actividad remanente en presencia de 10 mM de cada compuesto. Del análisis de la actividad de la enzima libre se vislumbró que el cobalto tuvo un efecto inhibitorio y en ningún caso hubo un aumento de la actividad ( $p > 0,05$ ). Para el caso de la enzima inmovilizada el cobalto también provocó la disminución de la actividad enzimática, pero por el contrario cuando se adicionó EDTA o zinc la actividad enzimática se incrementó casi un 30% (tabla 8).

**Tabla 8 Efecto de aditivos sobre la actividad enzimática de la xilanasa inmovilizada y libre.** El 100% corresponde a la máxima actividad detectada, para la enzima libre fue de 50 U mL<sup>-1</sup> y para la enzima inmovilizada fue de 7 U mL<sup>-1</sup>.

Aditivo	Inmovilizada (Actividad relativa %)	Libre (Actividad relativa %)
CaCl <sub>2</sub>	105 ±2	99±1
ZnCl <sub>2</sub>	120±12 (*)	96±0
CoCl <sub>2</sub>	70±13(*)	55±13(*)
FeCl <sub>2</sub>	94±4	96±1
CuSO <sub>4</sub>	93±5	96±7
MgSO <sub>4</sub>	88±3	89±8
MnSO <sub>4</sub>	87±10	95±4
Urea	104±2	100±0
EDTA	128±15 (*)	106±4
KCl	100±12	97±2
CONTROL	100	100

\* p<0,05

#### 8.2.1.5.4 Parámetros cinéticos

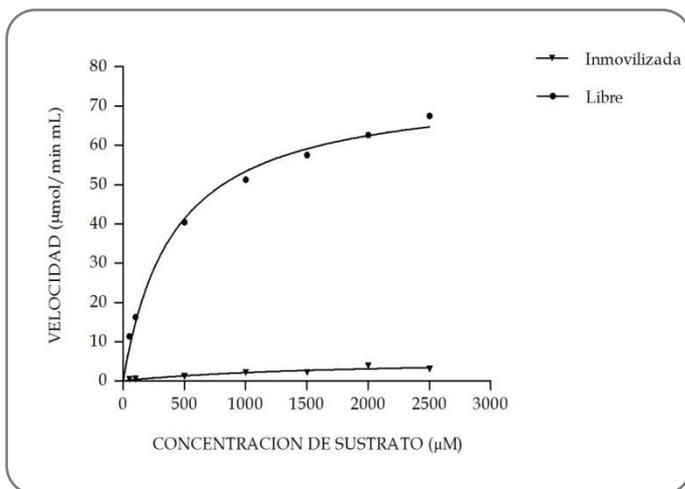
Para la determinación de los parámetros cinéticos de la xilanasa inmovilizada y la libre se determinó la actividad enzimática con diferentes concentraciones de xilano de madera de haya. Los valores de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  se calcularon según la regresión hiperbólica de Michaelis -Menten (**tabla 9**).

**Tabla 9. Parámetros cinéticos calculados para la xilanasa inmovilizada y la libre.** Determinación de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  en función de la tasa de hidrólisis del xilano de madera de haya a varias concentraciones (0,05 a 2,5 mM).

	Inmovilizada		Libre	
	$K_m$ ( $\mu\text{mol mL}^{-1}$ )	$V_{m\acute{a}x}$ $\mu\text{mol (min mL)}^{-1}$	$K_m$ ( $\mu\text{mol mL}^{-1}$ )	$V_{m\acute{a}x}$ $\mu\text{mol (min mL)}^{-1}$
Xilano de madera de haya a 50°C	1693	5,68	411,8	75,29

En la **figura 29** se puede observar el comportamiento diferencial de la enzima inmovilizada y de la enzima libre respecto a la velocidad de aparición de xilosa en función de la concentración del xilano. La  $V_{m\acute{a}x}$  de la enzima libre fue más elevada

que la de la inmovilizada ( $p < 0,05$ ). En cambio, la  $K_m$  de la libre es menor que la  $K_m$  de la inmovilizada ( $p < 0,05$ ).



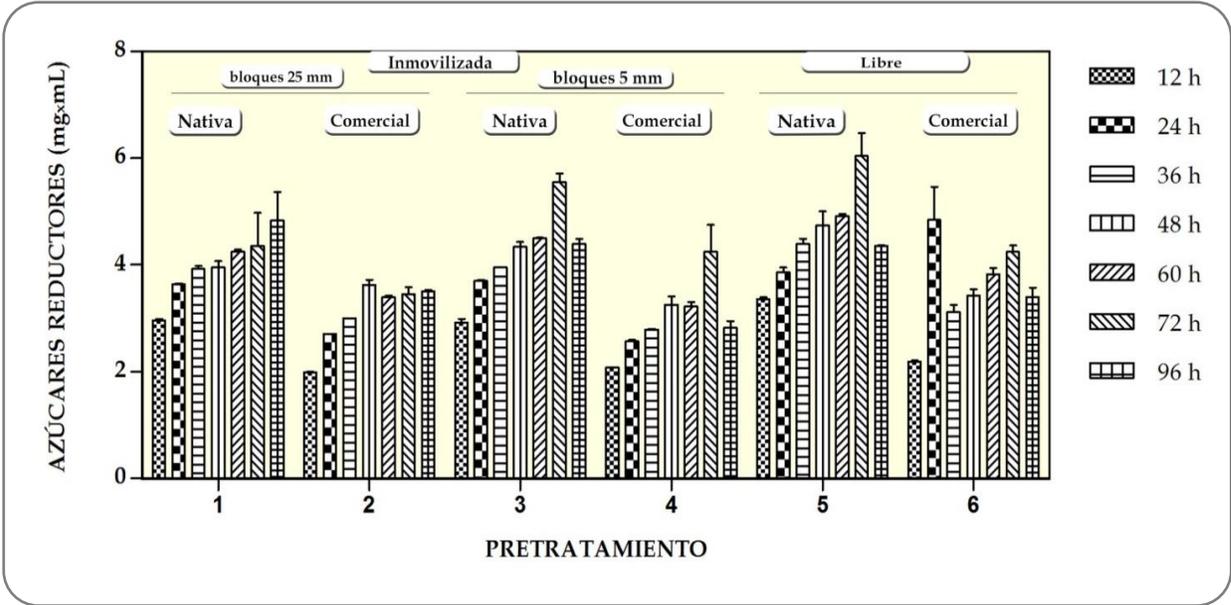
**Figura 29. Parámetros cinéticos de la actividad xilanólica de la enzima inmovilizada en comparación a la enzima libre**

### **8.3 Evaluación del efecto de xilanasas de *T. atroviride* LBM 117 sobre la hidrólisis del bagazo de caña de azúcar**

#### ***8.3.1.1 Pretratamiento del bagazo de caña de azúcar***

Para evaluar la eficiencia de las xilanasas sobre la hidrólisis de la hemicelulosa del bagazo de caña de azúcar se comparó la cantidad de azúcares reductores ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) liberados de este residuo por la acción de la enzima libre e inmovilizada y se comparó con los azúcares liberados por la enzima comercial libre e inmovilizada (**figura 30**).

Como resultado de los pretratamientos enzimáticos se detectó que el tratamiento con la enzima nativa libre de *T. atroviride* LBM117 mostró el máximo nivel de azúcares reductores liberados ( $6,46 \pm 0,61 \text{ mg mL}^{-1}$ ) a las 72 h de incubación ( $p < 0,01$ ).



**Figura 30. Pretratamiento enzimático de bagazo de caña de azúcar.** Comparación de los niveles de azúcares reductores obtenidos como resultado del efecto hidrolítico de las xilanasas sobre el bagazo de caña de azúcar pretratado con NaOH 3%. Los pretratamientos 1, 2, 3 y 4 corresponden a ensayos con xilanasas inmovilizadas en bloques de 25 y 5 mm. Nativa: xilanasas provenientes del sobrenadante optimizado de *T. atroviride* LBM 117. Comercial: xilanasas provenientes de *T. longibrachiatum* (Sigma Aldrich). Sin diferencia entre las muestras a las 72 h de la enzimas en 5 mm y la nativa libre

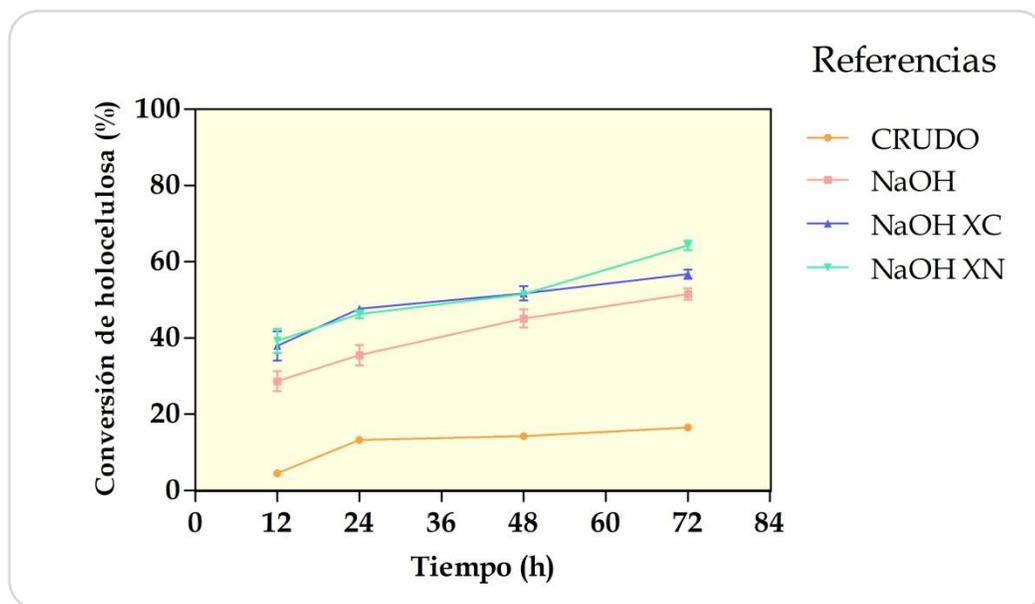
**8.3.1.2 Hidrólisis de bagazo de caña de azúcar pretratado**

La hidrólisis del bagazo de caña de azúcar pretratado fue realizada con un cóctel de celulasas comerciales. Los niveles de azúcares reductores para el bagazo de caña de azúcar pretratado con NaOH 3% fueron de  $19 \pm 0,75 \text{ mg mL}^{-1}$ . Para el caso del bagazo de caña de azúcar pretratado con NaOH 3% y luego con la xilanasas comercial se liberaron  $20,33 \pm 9,83 \text{ mg mL}^{-1}$  de azúcares reductores y para el pretratado con las xilanasas provenientes de *T. atroviride* LBM 117 fue de  $23,03 \pm 0,63 \text{ mg mL}^{-1}$ , nivel que mostró ser más elevado respecto a los demás ensayos ( $p < 0,05$ ).

Del cálculo de los porcentajes de conversión de la holocelulosa (que resulta de la sumatoria de celulosa y hemicelulosa) se obtuvo que los patrones de

bioconversión del bagazo de caña de azúcar pretratado químicamente con NaOH 3% más xilanasa comercial y el NaOH 3% más xilanasa procedente de *T. atroviride* LBM 117 fueron similares durante las primeras horas de hidrólisis. Sin embargo, a las 48 h se puede observar una diferencia a favor del segundo pretratamiento debido a una mayor bioconversión (**figura 31**).

Para poder obtener buen rendimiento de azúcares reductores y por lo tanto alto porcentaje de conversión de holocelulosa es necesario que el material sea deslignificado químicamente. Este pretratamiento combinado con el biológico utilizando enzimas hemicelulolíticas (xilanasa autóctonas o comerciales) permitieron una transformación más eficiente de la biomasa lignocelulósica (**figura 31**).



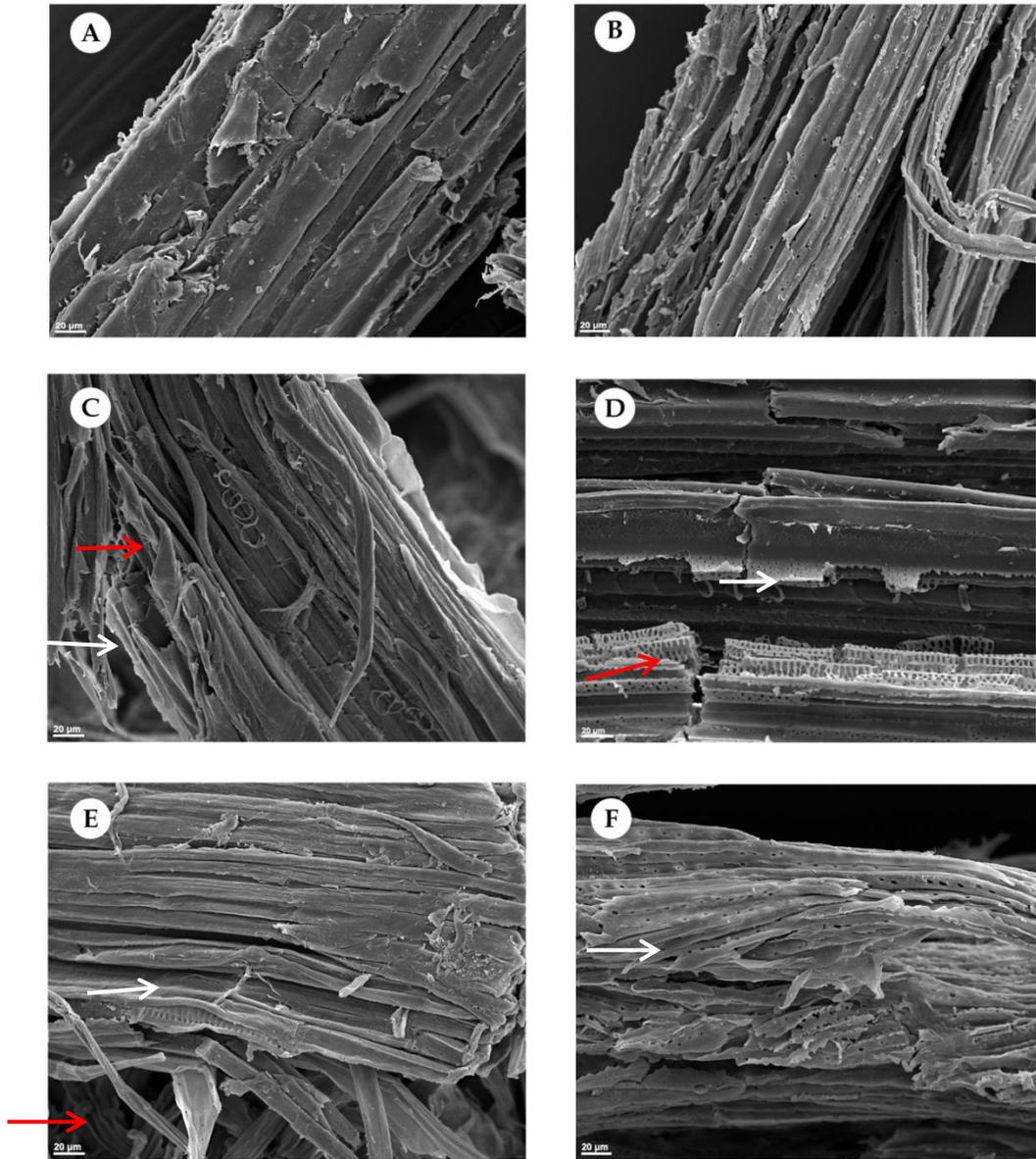
**Figura 31. Hidrólisis del bagazo de caña de azúcar pretratado.** Porcentajes de conversión de la holocelulosa utilizado como materia prima bagazo de caña de azúcar. Naranja bagazo de caña de azúcar sin pretratar (cudo), rosa tratado químicamente con NaOH 3%, azul NaOH 3%+xilanasa comercial (XC) y verde NaOH 3%+xilanasa provenientes de *T. atroviride* LBM 117 (XN).

---

### **8.3.1.3 Microscopía electrónica de barrido**

Con el fin de evaluar los posibles cambios en la microestructura del bagazo de caña de azúcar se tomaron microfotografías con microscopio electrónico de barrido del material (**figura 32**).

En la muestra sin pretratamiento se observó la estructura típica de las partículas de bagazo de caña de azúcar (**Figura 32 A**). En las demás imágenes se pudo ver una clara alteración en la estructura del parénquima y de los vasos conductores ocasionada por los pretratamientos químico (**figura 32 C**, flecha blanca, flecha roja respectivamente), químico/ enzimático (**figura 32 E**) y sacarificación (**figura B, D y F**) que incrementaron la exposición de las fibras de celulosa, que se mostraron más laxas y desorganizadas, esto facilitó la liberación de azúcares reductores durante los tratamientos.



**Figura 32. Microfotografías de bagazo de caña de azúcar.** En A se aprecia la estructura de partículas de bagazo de caña de azúcar sin pretratar. En B bagazo de caña de azúcar hidrolizado con cóctel de celulasas. C corresponde al bagazo de caña de azúcar pretratado con NaOH 3% y D después de su hidrólisis. E muestra el aspecto microestructural del bagazo de caña de azúcar pretratado con NaOH y xilanasas provenientes de *T. atroviride* LBM 117. Las flechas blancas indican tejido parenquimático y las rojas a los vasos conductores.

# DISCUSIÓN

## 9 DISCUSIÓN

### 9.1 Evaluación de la habilidad xilanolítica de cepas de *Trichoderma* nativas de la provincia de Misiones.

#### 9.1.1 Selección cualitativa y cuantitativa

Las enzimas xilanolíticas son un grupo de enzimas que hidrolizan los polímeros de xilano, que constituye uno de los principales componentes estructurales de las paredes celulares de las plantas. Este complejo enzimático es secretado por una amplia variedad de microorganismos reportados en la bibliografía, de entre los cuales, los hongos filamentosos como *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Penicillium* son especialmente interesantes, ya que sus niveles de actividad enzimática son los más elevados (Bajaj *et al.* 2011; Bakri *et al.* 2010; Gottschalk *et al.* 2010; Da Cunha *et al.* 2013).

Para detectar cepas fúngicas productoras de xilanasas extracelulares generalmente en primer lugar se realiza la evaluación cualitativa usando medio sólido con xilano como única fuente de carbono. Esta estrategia está basada en el principio de difusión, donde el rojo Congo se une específicamente al xilano, un carbohidrato de alto peso molecular, coloreando los sectores del medio sólido que lo contengan y dejando decoloradas las zonas donde se haya producido la hidrólisis del sustrato (Teather & Wood, 1982; Saczi & Erenler, 1986; Ribeiro *et al.*, 2014). La detección de halo es una manera fácil y rápida de llevar a cabo un *screening* (Murashima *et al.*, 2002; Florencio *et al.*, 2016). En este trabajo esta técnica permitió detectar claramente la presencia de un halo de degradación en 11 de las 20 cepas analizadas de *Trichoderma* nativas de la provincia de Misiones.

Permitiendo de esta manera reducir casi a la mitad el número de cepas a analizar en cuanto a su capacidad secretora de xilanasas.

Las especies del género *Trichoderma* se caracterizan por un aumento en la esporulación en presencia de luz y además estas esporas se dispersan sobre la placa dificultando la interpretación del resultado cuando el micelio cubre toda la superficie de la misma (Tish *et al.*, 2017). Por este motivo, en este trabajo fue necesario monitorear el crecimiento fúngico diariamente hasta que el desarrollo cubriera el 80% de la placa.

Numerosos autores han destacado que la fuente de carbono que se utilice en el medio de cultivo tiene influencia sobre la actividad enzimática (Royer & Nakas, 1989; Bakri *et al.*, 2010; Tallapragada & Venkatesh, 2011). Específicamente, la bibliografía apunta al xilano de *beechwood* como inductor de la actividad xilanolítica (Biely *et al.*, 1980; Espiner *et al.*, 1992; Farrell *et al.*, 1996; Ahmed *et al.*, 2003; Kaur *et al.*, 2005; Goyal *et al.*, 2008; Khucharoenphaisan *et al.*, 2010; Da Cunha *et al.*, 2013), por lo tanto, para garantizar una secreción eficiente de xilanasas, durante el ensayo de selección que se llevó a cabo en este trabajo se utilizó xilano de madera de haya comercial como sustrato y posible inductor de la actividad xilanolítica en hongos nativos de Misiones. Al final de este experimento, *Trichoderma* sp. LBM 193, *T. atroviride* LBM 117, *T. harzianum* LBM 103, *T. harzianum* LBM 094 y *Trichoderma* sp. LBM 192 se agruparon en el gráfico del conglomerado lo que indicó que no había diferencias significativas entre ellos, siendo este *cluster* un grupo prometedor ya que sus niveles de actividad xilanolítica estuvieron por encima de 20 U mL<sup>-1</sup>. Por tales motivos fueron seleccionados para continuar con los experimentos de caracterización de la actividad xilanolítica en medio líquido.

## **9.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD XILANOLÍTICA EN MEDIO CONTENIENDO BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR COMO FUENTE DE CARBONO.**

Las xilanasas por su acción hidrolítica sobre la hemicelulosa han sido clasificadas como una de las enzimas mas importantes industrialmente, actuando

en numerosas aplicaciones biotecnológicas (Collins *et al.* 2005; Beg *et al.*, 2001), dentro de las cuales se destacan la industria de la pulpa y papel (utilizadas en el blanqueo de la pulpa) (Viikari *et al.*, 1999); la industria alimenticia (utilizadas en los tratamientos de los cultivos forrajeros para la alimentación del ganado, producción de jarabes, gaseosas y pan entre otros) (Harris & Ramalingam 2007).; la industria textil, (utilizadas en la eliminación de impurezas durante el bioprocesamiento textil) (Duran & Duran, 2000) y en la producción de bioetanol (utilizadas en el proceso de pretratamiento e hidrólisis) (Dhiman *et al.*, 2008).

Para que la aplicación a escala industrial sea viables es necesario contar con un medio de cultivo que induzca la actividad enzimática de manera tal que se puedan contar con niveles altos de actividad (Gutierrez-Correa *et al.*, 1998; Da Cunha *et al.*, 2013).

Si bien el xilano es ampliamente reconocido por actuar como inductor de la actividad xilanolítica, es un polímero de muy difícil acceso y costoso, de este modo la producción a gran escala se ve dificultada. Es por ello que se hace necesario explorar en la búsqueda de microorganismos secretores de xilanasas en medios de cultivo alternativos (Gutierrez-Correa *et al.*, 1998; Bakri *et al.*, 2010).

En este sentido numerosos autores han evaluado medios de cultivos suplementados con diferentes residuos provenientes de la forestoindustria y han logrado niveles significativos de actividad xilanolítica. Por ejemplo Reis *et al.* (2003) y Bakri *et al.* (2010) evaluaron la actividad xilanolítica en el salvado de trigo en medios suplementados con 10 g L<sup>-1</sup> y detectaron niveles de entre 113 y 174 U mL<sup>-1</sup> logrando diferencias estadísticamente significativas respecto a los medios que contenían medios de cultivo con xilano como fuente de carbono. Raj & Chandra (1995) y Li *et al.* (2007) utilizando el mismo residuo lignocelulósico, registraron niveles de actividad enzimática de entre 23 y 30 U mL<sup>-1</sup> en medios suplementados con 5 gL<sup>-1</sup> y 30 gL<sup>-1</sup> respectivamente. Por otra parte, Fernandez-Islas (2013) evaluó la actividad enzimática producida en salvado de trigo y Oliveira *et al.* (2006) evaluaron al actividad xilanolítica en mazorca de maíz y cáscara de avena con

niveles de entre 54,8 y 55,3 U mL<sup>-1</sup> y atribuyen estos valores a que los altos niveles de hemicelulosa en estos residuos actúan como inductores de las actividades xilanolíticas.

Lemos *et al.* (2000) y por otra parte Gottschalk *et al.* (2010) evidenciaron niveles de 30 y 25 U mL<sup>-1</sup> de actividad enzimática respectivamente en medios conteniendo bagazo de caña de azúcar en concentraciones de 20 g L<sup>-1</sup> niveles de actividad similares a los obtenidos en este trabajo. Así también Gutierrez-Correa & Tengerdy (1998) y Da Cunha *et al.* (2013) evidenciaron actividad xilanolítica similares lo que permitió su aplicación en la hidrólisis.

El bagazo de caña de azúcar es un residuo que proviene de la industria azucarera y su composición química juega un rol importante a la hora de evaluarlo como fuente de carbono, ya que el mismo se compone de cantidades significativas de celulosa y hemicelulosa, con un alto porcentaje de xilano (20,6%), haciendo que este residuo sea adecuado para la producción de xilanasas (Aguilar *et al.*, 2002). Además, el bajo porcentaje de lignina presente en el bagazo aumenta la disponibilidad de xilano para actuar como inductor (Jayapal *et al.* 2013) y sumado a esto el porcentaje de cenizas también es menor respecto a otros residuos de la forestoindustria como paja de arroz y paja de trigo (Pandey *et al.*, 2000; Márquez-Araque *et al.*, 2007).

En este trabajo se evaluó el comportamiento de cinco cepas de *Trichoderma* nativos de Misiones y se analizó los niveles de actividad enzimática en medio suplementado con bagazo de caña de azúcar. De esta evaluación se registró para *Trichoderma* sp. LBM 103, *T. atroviride* LBM 117 y *Trichoderma* sp. LBM 193 niveles máximos de actividad enzimática aproximados a 29 UmL<sup>-1</sup>. Bajo las mismas condiciones de cultivo, Lemos *et al.* (2000) registraron en *A. awamori* niveles máximos de actividad xilanolítica similares a los obtenidos en este trabajo, en medios suplementados con bagazo de caña de azúcar sin tratar como fuente de carbono. Por su parte, Oliveira *et al.* (2006) evaluaron la producción de xilanasas en *Penicillium janthinellum* utilizando también como fuente de carbono al bagazo de

caña de azúcar y registraron la máxima actividad en 23 U mL<sup>-1</sup>. A su vez Bajaj *et al.* (2011) evaluaron el efecto de salvado de trigo, salvado de arroz y aserrín de eucalipto sobre la producción de xilanasas trabajando con *Penicillium* sp. y detectaron niveles de 21,8 U mL<sup>-1</sup>, 20,6 U mL<sup>-1</sup> y 10,7 U mL<sup>-1</sup> respectivamente. Márquez-Araque (2007) reportaron que en paja de trigo *Trameters gallica* produjo al menos dos tipos de enzimas con actividad de xilanasas con un máximo de actividad de 33,3 U mL<sup>-1</sup>.

Las cepas *T. harzianum* LBM 094 y *Trichoderma* sp. LBM 192 evaluadas en el presente trabajo mostraron niveles de máxima actividad comparativamente similares a los obtenidos por Gottschalk (2010) para *T. reesei* y *A. awamori* en medios de cultivos suplementados con bagazo de caña de azúcar, mostrando como máxima actividad 10 y 25 U mL<sup>-1</sup> respectivamente. Estos resultados son similares también a los obtenidos por Da Cunha *et al.* (2013) con *T. auroviride* que registraron como máxima actividad endoxilanolítica 20,39 U mL<sup>-1</sup>.

El pretratamiento físico de la biomasa previo a su utilización incrementa los niveles de producción ya que el material cuando está triturado y molido aumenta el área de contacto de sus componentes con las enzimas hidrolíticas (Sanchez-Riaño *et al.*, 2010; Cuervo 2001). Krishna *et al.* (2001) registraron altos rendimientos en la hidrolisis enzimática cuando pre-trataron físicamente diferentes materiales lignocelulósicos. Resultados similares obtuvo Geng (2010) al utilizar materiales agrícolas particulados y observó una mayor producción de celulasas y xilanasas en *T. reesei*. Esto motivó la utilización de bagazo triturado en este trabajo para suplementar los medios de cultivo.

Otro factor que influye en los niveles de producción enzimática es la concentración de los componentes en el medio de cultivo (Castrillo *et al.*, 2014; Díaz *et al.* 2015). En este trabajo se evaluó el efecto de tres concentraciones diferentes de la fuente de carbono (5, 10 y 15 g L<sup>-1</sup>). En los ensayos suplementados con mayores concentraciones de bagazo (10 y 15 g L<sup>-1</sup>) para las cepas *Trichoderma* sp. LBM 103, *T. atroviride* LBM 117 y *Trichoderma* sp. LBM 193 los niveles máximos de actividad

enzimática fueron similares a los registrados en los ensayos controles suplementados con xilano. Mejor aún fue el comportamiento de las cepas *T. harzianum* LBM 094 y *Trichoderma* sp. LBM 192 ya que los niveles de actividad registrados en los ensayos suplementados con bagazo de caña de azúcares más concentrados fueron superiores a los mostrados por el xilano. Y en todas las cepas evaluadas los niveles de actividad enzimática más bajos se registraron en los ensayos suplementados con la menor concentración de bagazo de caña de azúcar ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ). Estos resultados ponen en evidencia la importancia de optimizar la concentración de la fuente de carbono para lograr el efecto deseado y mejorar los niveles de actividad enzimática.

La influencia de diferentes concentraciones de bagazo de caña de azúcar sobre la actividad xilanolítica también fue reportada por Meenakshi *et al.* (2008), quienes mostraron que la producción de xilanasas por *T. viride* se incrementó con el aumento de la concentración de este residuo en el medio. Resultados similares fueron observados por Gottschalk *et al.*, 2010, en *T. reesei* y *A. awamori*, quienes al evaluar diferentes concentraciones de bagazo de caña, registraron un aumento de actividad a directamente proporcional a la concentración del residuo, obteniendo los niveles máximos de actividad xilanolítica cuando el medio fue suplementado con  $20 \text{ g L}^{-1}$ . En este sentido se han observado resultados similares para otros materiales lignocelulósicos, como paja de maíz con *T. reesei* y *A. niger* donde la concentración óptima fue de  $30 \text{ g L}^{-1}$  (Chen *et al.* 2008).

Algunos autores mostraron que al utilizar fuentes de carbono fácilmente hidrolizables, como glucosa y glicerol, no obtenían xilanasas. Sin embargo, cuando fue cultivado con azúcares más complejos, como xilano o sustratos celulósicos, las cepas fúngicas analizadas habían mostrado actividad xilanolítica, demostrando que actúan como inductores. (Kulkarni *et al.*, 1999; Mach & Zeilinger 2003). Varios reportes han respaldado estos resultados, donde materiales lignocelulósicos inducen la producción de xilanasas y azúcares fácilmente metabolizables, tales

---

como glucosa o xilosa, son supresores de la síntesis de xilanasas (Gessesse & Mamo 1999; Oliveira *et al.*, 2006).

Otro factor que juega un rol importante en la actividad enzimática es el tiempo de cultivo y esto depende de la cepa en estudio y los componentes del medio de cultivo (Bajaj *et al.* 2011; Bakri *et al.* 2010). En este trabajo se analizó los niveles de actividad enzimática durante 30 días de cultivo, hasta detectar el día de mayor actividad. Las cepas *T. harzianum* LBM 103 y *Trichoderma* sp. LBM 192 tuvieron su máxima actividad enzimática en menor tiempo respecto a las demás cepas analizadas en este trabajo (día 9 de cultivo), ya que para *Trichoderma* sp. LBM 193 y *T. harzianum* LBM 094 se registró la máxima actividad a los 15 días de cultivo y *T. atroviride* LBM 117 a los 18 días de cultivo. En este sentido, Da Cunha *et al.* (2013) reportaron la mayor actividad enzimática a los 3 días de cultivo en medios suplementados con la fuente de carbón bagazo de caña de azúcar para *T. atroviride* y *Penicillium* sp. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Gottschalk *et al.* (2010) para *A. awamori* y *T. reesei*. En este sentido Oliveira *et al.* (2006) registraron la máxima actividad xilanolítica a los 5 días de cultivo para *Penicillium* sp. en medio conteniendo 10 g L<sup>-1</sup> de bagazo de caña de azúcar. Por otro lado, Biswas *et al.* (1998) registraron la mayor actividad para *Aspergillus* a los 16 días de cultivo utilizando bagazo de caña de azúcar sin pretratar como fuente de carbono. La actividad xilanolítica registrada en los primeros días de cultivo se puede atribuir a la presencia en gran cantidad de xilanos y sustratos celulósicos que actuaron como inductores en la producción enzimática. Esta producción se mantuvo en aumento hasta que los azúcares simples resultantes de la hidrólisis enzimática del xilano alcanzaron niveles significativos como para inhibir la transcripción de xilanasas, por ese motivo la actividad disminuyó los días posteriores de cultivo (Mach & Zeilinger 2003).

Por otro lado se ha reportado que la exposición de *Trichoderma* a la luz tiene efecto sobre la esporulación (Cruz 2007). Según Chávez-García *et al.* (2008) es indispensable la aplicación directa de luz para promover la esporulación ya que

posee un efecto estimulante en la producción constante de conidios de algunas especies de *Trichoderma*. Existe una relación directa entre la esporulación como resultado de la exposición a la luz y el metabolismo de la fuente de carbono disponible (Gato-Cárdeas 2010; Muñoz-Centeno *et al.*, 2012; Cruz, 2007).

Por ello en este trabajo se evaluó la influencia de la luz sobre la actividad enzimática y se registró que, en todas las cepas analizadas, los niveles de actividad enzimática fueron superiores en los ensayos con luz, a excepción de la cepa *T. atroviride* LBM 117 que no mostró diferencias entre ambos ensayos. Además, en los ensayos con luz, la máxima actividad enzimática se alcanzó de 3 a 6 días antes respecto a los ensayos sin luz, lo cual es muy importante y deseable ya que disminuye el tiempo necesario para la obtención de la enzima para su aplicación.

Durante el desarrollo de este trabajo el crecimiento fúngico se llevó a cabo en agitación constante a 100 rpm ya que en numerosas especies de *Trichoderma* la agitación incrementa la producción enzimática y es necesaria para mantener la homogeneidad del medio con el fin de evitar la formación de cúmulos de gran tamaño y metabólicamente inactivos. Sin embargo, las fuerzas de cizallamiento por encima de 150 rpm pueden interrumpir el tejido microbiano frágil perjudicando la producción de xilanasas (Obregón & Jahaziel 2015).

### **9.3 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE ENDOXILANASAS PRESENTES EN EL EXTRACTO ENZIMÁTICO**

Conocer las características bioquímicas de la actividad enzimática presentes en el sobrenadante es de suma importancia para maximizar la acción hidrolítica de las xilanasas al momento de su aplicación a escala industrial (Shin *et al.* 2000; Sánchez-Riaño *et al.* 2010; Dhiman *et al.* 2008).

### 9.3.1 pH y temperatura óptimos.

Numerosos reportes en la bibliografía establecen la catálisis óptima de las xilanasas en el rango de pH entre 4 y 7 (Cayetano-Cruz *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 1997).

Los resultados obtenidos de la evaluación del pH óptimo en el presente trabajo concuerdan con los rangos de pH definidos como óptimos para xilanasas en la bibliografía.

En este trabajo el pH óptimo se mantuvo en el rango de 4 a 6 y tal como lo ha reportado Bakri *et al.* (2010) en sus estudios realizados con *A. terreus* a pH más alcalino y más ácido del rango óptimo la actividad enzimática decae abruptamente. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado para *T. longibrachiatum* que mostró su catálisis máxima cuando el pH de la determinación enzimática osciló entre 4 y 6 (Royer & Nakas 1989; Chen *et al.* 1997). Por su lado Abirami *et al.* (2011), para *Neurospora crassa* y Fernández-Espinar *et al.* (1994) para *A. nidulans* reportaron pH óptimos de 5,5 y 6 respectivamente.

Para determinar la temperatura a la cual la actividad xilanolítica es máxima, en este trabajo se evaluaron temperaturas en el rango 4°C a 70°C y los resultados obtenidos mostraron los niveles más altos en el rango de 40 a 50°C para todas las cepas de *Trichoderma* analizadas.

Estos resultados también concuerdan con los obtenidos por numerosos autores quienes demostraron que las xilanasas fúngicas típicamente tienen temperaturas óptimas alrededor de 50°C (Ruckmanl & Rajendran 2001; Shah & Madamwar 2005; Sudan & Bajaj 2007; Dutta *et al.*, 2007; Murthy & Naidu 2010). Resultados similares se registraron en los trabajos desarrollados por Bajaj *et al.* (2011) con *Penicillium* sp. y para *T. reesei* quienes reportaron la temperatura óptimas de 30 °C.

Chen *et al.* (1997) hallaron que la catálisis de la xilanasas en el hongo *T. longibrachiatum* fue óptima a los 45°C. A su vez, Souza-Querido *et al.* (2006) observaron para *P. expansum* que la actividad xilanolítica fue máxima a 40°C.

Cuando Lemos *et al.* (2000) evaluaron la actividad xilanolítica de *A. awamori*, el rango de máxima actividad se registró en un intervalo de 30 a 70 °C y estos resultados fueron similares a los obtenidos por Bakri *et al.* (2010) en *A. terreus*, donde la temperatura óptima fue a 60°C.

### **9.3.2 Termoestabilidad y estabilidad en el pH de la actividad xilanolítica.**

La estabilidad enzimática en el sobrenadante se ve influenciada en gran medida por la acción del pH y la temperatura. En este sentido dependiendo del pH y la temperatura del medio la enzima puede sufrir inactivación, desnaturalización o también puede ocurrir una desfavorable distribución de carga entre el sustrato y las moléculas de las enzimas que aumentan al transcurrir el tiempo (Shah 2005). Por lo tanto, su evaluación es importante para lograr una aplicación industrial óptima.

Es por ello que en este trabajo se evaluó el efecto del pH y la temperatura sobre la estabilidad enzimática en 5 cepas de *Trichoderma* sp. De este análisis se evidenció que a la temperatura de 30° C la estabilidad enzimática fue mayor con respecto a las demás temperaturas evaluadas. A pH 4,8 la actividad de la enzima fue mas estable.

Estos valores están en concordancia con numerosos trabajos expuestos en la bibliografía. Bakri *et al.* (2010) trabajaron con *A. terreus* y realizaron pruebas de estabilidad térmica de la actividad xilanolítica y los resultados indicaron que el intervalo de temperatura adecuado para la aplicación industrial de xilanasa fue de entre 30 y 50°C, ya que la actividad enzimática se mantuvo durante 3 h. Por otra parte, Krisana *et al.* (2005) observaron que *A. niger* mantuvo el 100% de actividad enzimática a 30°C hasta los 30 min de incubación.

Resultados similares a los obtenidos en este trabajo para la estabilidad a 70°C fue registrados por Bajaj *et al.* (2011), quienes reportaron una pérdida total de la actividad xilanolítica para *Penicillium* sp. a los 30 min. Bakri *et al.* (2010) también mostró resultados similares en *A. terreus*, registrando que a 65°C la actividad

xilanasas fueron sólo 6,8% después de 1 h y no hubo disminución significativa en la actividades xilanasas después de 3 h de incubación de 30 a 45°C.

Respecto a la estabilidad de la actividad enzimática a diferentes pH a lo largo del tiempo, en este trabajo se registró que las cinco cepas analizadas hasta las 72 h a pH 4,8 mostraron niveles superiores al 60 % de actividad y a pH 7 se mantuvo en el orden del 40 y 60%. Bakri *et al.* (2010) también evaluaron la estabilidad de la actividad enzimática a diferentes pH y registraron que en el rango de pH 5 a 7 para *A. terreus*, la actividades xilanasas mantuvo niveles de 90% después de 1 h. A pH fuera de este rango la actividad decae significativamente. Comportamientos similares fueron reportados por Li *et al.* (2007) en otras cepas de hongos filamentosos.

#### **9.4 SELECCIÓN DE LA CEPA PARA SU APLICACIÓN: OPTIMIZACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR Y DE LAS FUENTES DE NITRÓGENO.**

Numerosas son las variables que tienen influencia sobre la producción enzimática de microorganismos. Una de estas es la concentración de los diferentes componentes del medio de cultivo, principalmente las fuentes de carbono y nitrógeno. Muchos autores sugieren que es imprescindible evaluar el efecto de dichos elementos para poder lograr un incremento de la actividad enzimática que se pretende.

En este trabajo en primer lugar se analizó la influencia de 7 concentraciones de bagazo de caña de azúcar. De acuerdo a los resultados obtenidos, la máxima actividad xilanolítica se registró cuando se suplementó con 30 g L<sup>-1</sup>. En este sentido Gelain *et al.* (2017) evaluaron 5 concentraciones de bagazo de caña de azúcar (5, 10, 20, 30 y 40 g L<sup>-1</sup>) logrando los máximos niveles con 10 g L<sup>-1</sup>, también Di Marco *et al.* (2017) registraron la máxima actividad enzimática en medio de cultivo suplementado con esa misma concentración de bagazo de caña de azúcar. Por otro lado, Rezende *et al.* (2002) obtuvieron altos niveles de actividad xilanolítica para *T.*

*harzianum* en fermentación en estado sólido con 100 g L<sup>-1</sup> de dicho residuo. Todos estos autores coinciden en que cuando realizan la caracterización del bagazo de caña de azúcar, sus resultados muestran que se trata de un residuo rico en celulosa y hemicelulosa, por lo tanto, resulta interesante su utilización como fuente de carbono inductora de actividades enzimáticas hidrolíticas, tal como lo describe Brienzo *et al.* (2016).

En este sentido la utilización de diferentes residuos agroindustriales como sustrato surgen principalmente como alternativas para reducir el costo de producción de xilanasas. Residuos agroindustriales son generalmente considerado como sustratos rentable y ecológico para los procesos de producción de xilanasas que incluyen al bagazo de caña de azúcar (Kaushik & Malik, 2016). En concordancia con estos resultados, en este trabajo se logró abaratar 57 veces los costos de la producción de xilanasas en medio de cultivo suplementado con un residuo de la industria local, el bagazo de caña de azúcar, en reemplazo al xilano.

La utilización de medios de cultivo con fuentes de carbono y nitrógeno económicas permite la obtención de niveles de actividad enzimática hidrolítica en hongos filamentosos aplicables en procesos biotecnológicos (Thomas *et al.*, 2016).

Por consiguiente las fuentes de nitrógeno del medio Mandels Mandels & Reese, 1957) también fueron optimizadas en el presente trabajo. Esto fue realizado debido a que, muchos autores que han trabajado con xilanasas, sugieren la optimización de las mismas para la cepa en particular con la que se trabaje, de manera de aumentar la actividad producida (Kheng & Omar, 2005; Thomas *et al.*, 2016). De acuerdo a los resultados de la optimización de las fuentes de nitrógeno, los valores óptimos obtenidos fueron 1,4406 g L<sup>-1</sup> de sulfato de amonio y 1,1115 g L<sup>-1</sup> de urea. Bagar *et al.* (2003) optimizaron las concentraciones de salvado de trigo y sulfato de amonio logrando un incremento de la actividad xilanolítica. Xu *et al.* (2008) publicaron que la urea fue la fuente de nitrógeno más significativa y de efecto positivo sobre la producción de xilanasas en *Aspergillus niger* XY-1 resultado que coincidieron con los obtenidos en este trabajo. Por el contrario, Bakri *et al.*

(2010) también evaluaron el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno, pero detectaron que la urea produjo un efecto negativo sobre la actividad xilanolítica. Es sabido que el extracto de levadura tiene efecto positivo sobre la actividad xilanolítica, pero curiosamente para *T. atroviride* LBM 117 esta fuente de nitrógeno no tuvo la influencia significativa sobre la actividad.

Es importante destacar que fue posible validar el modelo optimizado para la actividad xilanolítica de *T. atroviride* LBM 117 obteniéndose niveles de 45 U mL<sup>-1</sup> que fueron aceptables y comparables a los obtenidos por otros autores (Lemos *et al.*, 2000) para iniciar los estudios de inmovilización enzimática y de pretratamiento biológico del material lignocelulósico.

## 9.5 INMOVILIZACIÓN DE XILANASA

Las xilanasas hidrolizan los xilanos de la hemicelulosa y son producidas en la naturaleza por numerosos microorganismos, destacándose como ya se ha mencionado el género *Trichoderma*. A pesar de esto, el uso de las enzimas tiene algunos problemas prácticos, dentro de los que se destacan los altos costos del aislamiento y purificación, su inestabilidad en el ambiente natural una vez aisladas y su sensibilidad a las condiciones de proceso. Además, se dificulta la recuperación de la enzima en su forma activa a partir de la mezcla de catálisis. Para saltar estas dificultades se han propuesto numerosas estrategias dentro de las que se destacan la inmovilización de enzimas.

La preparación y uso de enzimas inmovilizadas permite una fácil separación del producto y la reutilización de la enzima (Adlercreutz 2013; Liese & Hilterhaus 2013; Longo & Sanromán 2006; Sharma *et al.*, 2001). Esto último constituye una de las principales ventajas de las enzimas inmovilizadas pues su utilización durante varios ciclos en los procesos a gran escala genera con el paso del tiempo, una reducción de costos (Tischer *et al.*, 1999).

Una de las posibles soluciones entonces es producir la enzima para luego inmovilizarla con el fin de mejorar la estabilidad a lo largo del tiempo y su resistencia a condiciones extremas y reactivos químicos. Además, la inmovilización

---

de las xilanasas permite que las enzimas puedan ser empleadas continuamente en operaciones en biorreactor.

A la hora de la selección de la matriz se deben tener en cuenta numerosos factores como por ejemplo: las propiedades mecánicas, tales como la durabilidad, la flexibilidad, la resistencia al ataque de microorganismos y elementos químicos; su hidrofilia, como la capacidad de incorporar agua dentro de la matriz; la permeabilidad; el costo y la disponibilidad.

Para ello muchas matrices han sido ensayadas por diferentes autores para la inmovilización por atrapamiento de xilanasas, tales como alginato (Kumar *et al.*, 2017; Pal *et al.*, 2012), gelatina (Maalej- Achouri *et al.*, 2009) y quitosano (Driss *et al.*, 2014), poliacrilamida y agar- agar (Bibi *et al.*, 2015).

En este sentido en el presente trabajo se compararon dos matrices: agar-agar 2,5 % (p/v) y acrilamida bisacrilamida (30:1), para la inmovilización de xilanasas presentes en sobrenadante de cultivo proveniente de *T. atroviride* LBM 117.

El agar- agar no reacciona con proteínas y además ha resultado eficiente en la inmovilización de otras enzimas, como las pectinasas (Rehman *et al.*, 2013). Resulta ser una matriz resistente en soluciones acuosas y se mantiene en su forma de gel en valores de pH superiores a 3. En este trabajo este polímero resultó ser una matriz maleable y económica, aunque el rendimiento en la reutilización se vio disminuida por el desprendimiento durante los ciclos sucesivos de uso de la enzima. Con una concentración del polímero de 2,5% el rendimiento fue 97 % con tres ciclos de reutilización. En estas condiciones Bibi *et al.* (2015) inmovilizaron xilanasas provenientes de *Geobacillus stearothermophilum* y obtuvieron un menor rendimiento (75%) en comparación a nuestros resultados, aunque la actividad enzimática se mantuvo durante cinco ciclos de reutilización con un 50 % de actividad enzimática remanente.

La inmovilización en poliacrilamida también resultó un procedimiento sencillo, aunque menos eficiente en comparación con agar- agar para la

inmovilización de xilanasas ensayadas en este trabajo, obteniéndose menor rendimiento y un ciclo menos de reutilización. Esto pudo deberse a que las cadenas laterales de la matriz fueron capaces de reaccionar con los componentes del medio para originar grupos de ácido acrílico. En estas condiciones, la enzima está embebida en una red tridimensional cargada negativamente formada por muchos grupos carboxilos ionizados. La enzima así queda expuesta a un campo electrostático fuerte, que puede afectar notablemente su modo de acción (Sarbu *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta el rendimiento de la inmovilización y los ciclos de reutilización obtenidos en el presente trabajo se evidenció que la inmovilización en agar-agar resultó ser más eficiente que la poliacrilamida para las xilanasas de *T. atroviride* LBM 117. Por lo tanto esta matriz fue seleccionada para continuar la caracterización y aplicación en el pretratamiento del bagazo de caña de azúcar.

### **9.5.1 Caracterización de las endoxilanasas inmovilizadas y libres**

Al momento de la aplicación biotecnológica es necesario tener en cuenta la influencia de las condiciones del proceso, como ser la temperatura, las condiciones de pH, el efecto de ciertos iones y otros aditivos. Por este motivo en este trabajo se caracterizó la actividad enzimática de las xilanasas inmovilizada en diferentes condiciones de temperatura, pH y además se evaluó el efecto de ciertos iones metálicos y otros aditivos sobre la actividad enzimática.

#### ***9.5.1.1 Efecto de aditivos***

Ciertas impurezas pueden estar presentes en los sustratos lignocelulósicos que serán hidrolizados por la acción catalítica de las enzimas, por esta razón es necesario evaluar el efecto que tiene ciertos metales y otros compuestos sobre la actividad enzimática. Los iones metálicos pueden actuar de diferentes maneras sobre la actividad xilanolítica influyendo en la actividad de las enzimas de múltiples maneras. En este sentido pueden aceptar o donar electrones para activar electrófilos o nucleófilos; ellos mismos pueden actuar como electrófilos y pueden

enmascarar el efecto de los nucleófilos para prevenir reacciones secundarias no deseadas. Además, pueden unir enzima y sustrato y mantener los grupos reaccionantes en la orientación tridimensional requerida o pueden simplemente estabilizar la conformación catalíticamente activa de la enzima. En este trabajo se evaluó el efecto de 10 mM de nueve aditivos ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_3$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ , Urea, EDTA y KCl) sobre la actividad xilanólica de la enzima libre e inmovilizada en agar-agar.

Para ambos casos el cobalto fue un inhibidor de la actividad enzimática disminuyéndola por debajo del 50%.

García-Huante *et al.* (2016) compararon la actividad xilanólica cuando le adicionaban dos concentraciones distintas de diferentes iones metálicos. Puntualmente para el caso del cobalto a 5 mM provocó una disminución de actividad enzimática, sin embargo cuando la concentración del ion fue de 1 mM no notaron tal efecto.

Wu *et al.* (2006) también evaluaron la actividad xilanólica a tres concentraciones distintas de varios iones metálicos (0,1, 1 y 10 mM) y a la concentración de 1 mM la actividad enzimática apenas fue del 19 % respecto al control sin aditivo, por lo tanto, lo consideraron como un fuerte inhibidor de la actividad catalítica. Estos resultados también concuerdan con los obtenidos por Gaffney *et al.* (2009), quienes evidenciaron una disminución en la actividad enzimática en presencia de cobalto. Por el contrario otros autores sugieren que el cobalto incrementa la actividad xilanólica casi un 20% en presencia de 10 mM de este metal (Poorna & Prema 2006).

Respecto al EDTA, en algunos reportes de la literatura se lo evidencia como un supresor de la actividad enzimática, sugiriendo que este quelante de iones inhibe la participación de éstos en la acción catalítica de la enzima (Kumar *et al.*, 2017; García-Huante *et al.*, 2016; Maalej- Achouri *et al.*, 2009). Por el contrario en este trabajo el EDTA mejoró la actividad xilanólica inmovilizada. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos Poorna & Prema (2006), quienes

evidenciaron una leve influencia positiva de este quelante sobre la actividad catalítica de las xilanasas libre. Losonczy *et al.* (2005) han estudiado el efecto del EDTA sobre la actividad enzimática xilanolítica y demostraron un marcado incremento de la actividad hidrolítica de xilanasas en presencia de EDTA. Ellos sugieren que este aditivo ayuda a la creación de espacios libres y accesibles para la enzima, es decir que el EDTA y las xilanasas actuarían de manera sinérgica para lograr un incremento en la liberación de azúcares.

### 9.5.1.2 Parámetros cinéticos

La  $K_m$  es la cantidad de sustrato que se necesita para llegar a la mitad de la velocidad máxima y da un indicio de la afinidad de la enzima por el sustrato. Cuando se analizaron los valores de  $K_m$  obtenidos para la xilanasas inmovilizadas en este trabajo se puede observar que este parámetro es mayor por lo tanto menos afín al xilano en comparación a la enzima libre. El valor de  $V_{m\acute{a}x}$  arroja una estimación de la cantidad de sitios activos presentes en la enzima, es la velocidad que se obtendría cuando todos los sitios de la enzima se encuentran unidos al sustrato. Del análisis de la  $V_{m\acute{a}x}$  resultó que el valor para la enzima inmovilizada fue menor al valor de  $V_{m\acute{a}x}$  para la enzima libre, lo que sugirió menor cantidad de sitios catalíticos activos de la enzima cuando está inmovilizada. La diferencia descrita entre valores de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  de las xilanasas inmovilizada respecto a la libre puede deberse a que la distribución espacial de la enzima en la matriz del agar dificultó la accesibilidad del sustrato a los sitios catalíticos de la enzima. Además el agar entorpece la llegada del xilano, ya que esta es una molécula de alto peso molecular. En este sentido Bibi *et al.* (2015) encontraron resultados similares cuando inmovilizaron endoxilanasas provenientes de *G. stearothermophilum* en agar-agar al 2,5% donde observaron un aumento en la  $K_m$  y una disminución en la  $V_{m\acute{a}x}$ . Estos autores sugirieron que los parámetros cinéticos pueden variar dependiendo de la matriz usada y del origen del sustrato usado ya que este es un polímero que puede provenir de diferentes fuentes.

En concordancia con nuestros resultados Kapoor *et al.* (2008) inmovilizaron xilanasas por atrapamiento en gelatina y observaron un aumento en la  $K_m$  con una disminución en la  $V_{m\acute{a}x}$  cuando usaron xilano de madera de haya como sustrato. Los autores sugirieron que este hecho pudo deberse a la resistencia de la transferencia de masas del sustrato en la matriz de inmovilización y además afirmaron que el tamaño de poro para la difusión del sustrato fue pequeño lo que dificultó la penetración del xilano en las profundidades de la matriz y en consecuencia la enzima no pudo hidrolizar el sustrato aun teniendo su sitio catalítico activo. Por otro lado, puede ocurrir que en las regiones de la matriz donde la enzima es altamente activa por el posicionamiento, se acumulen altas cantidades de producto impidiendo la llegada de nuevo sustrato. La disminución en los valores de  $V_{m\acute{a}x}$  sugiere que puede deberse a cambios conformacionales ocasionados por el nuevo entorno generado y a que los sitios activos de las enzimas pueden estar obstruidos por la matriz empleada.

#### **9.5.1.3 Termoestabilidad**

Uno de los principales objetivos de la inmovilización de enzimas es incrementar la termoestabilidad. En este trabajo se evaluó la termoestabilidad de la enzima libre y la inmovilizada a 30, 40 y 50°C. Como resultado se obtuvo que la inmovilización incrementara la termoestabilidad a 50°C logrando niveles de 40% de actividad a las 24 h de incubación mientras que en la libre no superó las 12 h. En este sentido es amplia la bibliografía que soporta la idea de un incremento de la termoestabilidad cuando la enzima se inmoviliza. Tal es el caso de Kumar *et al.* (2017) quienes reportaron un incremento de estabilidad enzimática a 60°C cuando inmovilizaron xilanasas por atrapamiento. Bibi *et al.* (2015) también lograron incrementar la termoestabilidad de las xilanasas cuando esta se inmovilizó en agar-agar. Dicha tolerancia térmica se desarrolla debido al efecto estabilizador del soporte de inmovilización que ayuda a proteger la estructura conformacional de la enzima a la exposición directa al calor y eventualmente disminuye la velocidad de

desnaturalización de la enzima manteniendo la estructura catalítica. Otras enzimas como las pectinasas también han aumentado su termoestabilidad mediante inmovilización en agar- agar, incrementando la estabilidad a 30 y 40°C logrando mantener entre el 70 y 80% de actividad después de las 120 h de incubación, mientras que a 50°C la actividad cae después de 72 h de incubación. Otros autores también evaluaron la actividad catalítica de lacasa inmovilizada por atrapamiento y detectaron que la actividad declinaba más lentamente respecto a la enzima libre en las mismas condiciones, sugiriendo que el soporte mantiene inalterable la conformación activa de la enzima disminuyendo el efecto ocasionado por el impacto de altas temperaturas (Lu *et al.*, 2007).

### **9.5.2 Análisis de la microestructura de matriz utilizada para la inmovilización**

La microscopía electrónica de barrido, es la estrategia más ampliamente utilizada para caracterizar propiedades tales como la forma, tamaño y distribución de materiales a nanoescala. En este trabajo se comparó la morfología superficial del agar- agar con y sin la enzima inmovilizada utilizando SEM. En la microfotografía donde se observó la matriz conteniendo a la enzima inmovilizada se pudo visualizar pequeñas partículas agregadas ocupando poros formados sobre la superficie de la matriz. Sin embargo, esas partículas no se observaron en la matriz donde no fue inmovilizada las enzimas. Resultados similares observaron Bibi *et al.* 2015, cuando inmovilizaron xilanasas en agar- agar. Análisis similares de SEM para otras enzimas también revelaron microestructuras similares. Así Rehman *et al.*, 2013, pudieron observar sobre la superficie del agar- agar poros cubierto con agregados cristalinos, los cuales los autores suponen que fueron las pectinasas que inmovilizaron en agar- agar. Bilal *et al.*, 2016 también visualizaron cambios notorios a nivel superficial del agar- agar cuando inmovilizan manganeso peroxidasa sugiriendo que este hecho se debió a que las enzimas se inmovilizaron por atrapamiento. Nawas *et al.* (2016) también inmovilizaron por atrapamiento en agarosa maltasa y examinaron los cambios en la superficie de la matriz utilizando

SEM y detectaron agregados irregulares sobre la agarosa después de la inmovilización, la cual previamente se veía como una superficie homogénea, atribuyendo estos cambios a la inmovilización de la enzima.

## **9.6 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN ESTRUCTURAL DE UN GEN DE XILANASA DE *T. atroviride* LBM 117**

Las especies de *Trichoderma* han sido identificadas hace más de 200 años por Persoon (Persoon 1794). Estas especies se caracterizan por ser cosmopolitas colonizando materia muerta en descomposición.

Existen numerosas dificultades que se presentan a la hora de la caracterización morfológica del género *Trichoderma* principalmente relacionadas a la homoplasia de los caracteres fenotípicos y tiene la desventaja de que especies poco relacionadas tienen la morfología del micelio muy similar en los mismos medios de cultivo.

Los métodos moleculares representan una estrategia sensible y rápida en comparación a las técnicas morfológicas y son utilizadas para complementarlas (Chakraborty *et al.*, 2011). Sin embargo, se sabe que para la correcta identificación a nivel de especie de un organismo es necesario integrar varios métodos y así poder considerar más de un criterio y eliminar la mayor cantidad de errores posibles.

La cepa LBM 117, hongo seleccionado en este trabajo fue identificado preliminarmente como *Trichoderma atroviride* por nuestro grupo de investigación utilizando claves morfológica y únicamente las secuencias de las regiones ITS del rDNA (datos no publicados). Sin embargo, actualmente es sabido que los ITS por sí solos no son suficientemente informativos para resolver especies estrechamente relacionadas en géneros como *Trichoderma*. En este sentido Kopchinskiy *et al.* (2005) encontraron numerosos errores de identificación entre las secuencias depositadas en Genbank, que a menudo no incluye todas las especies del género. Sumado a esto, se han encontrado copias parálogas de genes que codifican ARN en algunos géneros de *Hypocreales* que pueden resultar en identificaciones engañosas basadas

en ITS únicamente. Es por eso que en resulta de gran utilidad la aplicación de otros marcadores moleculares. Dentro de estos se destacan los marcadores *tef1* y *rpb2* que son genes de copia única, los que tienen la ventaja de que cualquier variación de secuencia en una espora puede atribuirse inequívocamente a una variante. Estos marcadores moleculares son utilizados para estudios de relaciones evolutivas en numerosas especies incluyendo géneros de hongos filamentosos. Sumado a esto numerosos autores han reportado la amplificación de dichas secuencias para la identificación de especies del género *Trichoderma* morfológicamente similares incluso son muy útiles para el análisis de niveles taxonómicos superiores (Chaverri *et al.*, 2003; Jaklitsch *et al.*, 2009; Helgason *et al.*, 2003). El gen que codifica para el factor de elongación 1-alpha (*tef1*) suele estar presente en una sola copia y tiene un alto nivel de secuencias polimórficas entre especies emparentadas y codifica el factor de elongación de la traducción que controla la velocidad y la fidelidad de la síntesis de proteínas. En este sentido el uso de marcadores presentes en genes de copia única que codifican proteína podrían ser una solución a los múltiples problemas asociados con marcadores basados en rDNA. Aunque se reconoce que los marcadores que codifican proteínas, incluido el gen *rpb2*, tienen un mejor poder de resolución de especies que los marcadores de ADNr, poseen la desventaja de carecer de cebadores universales lo que limita su utilización como posibles códigos de barras. Pero de todos modos se presentan como marcadores complementarios a los típicos ITS (Větrovský *et al.*, 2016).

La base de dato TrichoBLAST (<http://www.isth.info/tools/blast>) permite identificar los aislados de *Trichoderma* basados en los cinco marcadores filogenéticos más frecuentemente utilizados para este género: (1) ITS1 y ITS2, (2) *tef1*: cuarto intrón, (3) *tef1*: quinto intrón, (4) *tef1*: sexto exón, y (5) *rpb2*. Teniendo en cuenta que las bases de datos de referencia de TrichOKEY y TrichoBLAST (ISTH 2008) se actualizan constantemente de acuerdo con los últimos hallazgos, estas herramientas de búsqueda *on line* resultan muy eficientes y permiten

identificar los aislados de *Trichoderma* o sugerirlos como representantes de especies potencialmente nuevas (Sharma *et al.*, 2017).

En este trabajo la identificación del aislamiento en estudio LBM 117 fue confirmada utilizando los marcadores *tef1* y *rpb2*. Para corroborar la identidad se realizaron dendogramas que reflejaron el agrupamiento de la cepa en un único clado con otra cepa de *T. atroviride* dentro de la sección *Trichoderma*.

Para evitar más confusión en la filogenia de hongos, que se almacenan en colecciones de cultivos microbianos y que son reportados para su uso en aplicaciones biotecnológicas, como la producción de enzimas, es vital realizar estudios y caracterización de genes a nivel sistemático y del tipo funcional-comparativos (Hilden *et al.*, 2008).

La identificación de la cepa en estudio también fue corroborada con la amplificación de la región estructural del gen que codifica para una endoxilanasas y la secuencia de la proteína mostró un 99% de identidad. Confirmando de esta manera de identidad de la cepa.

Respecto a la secuencia nucleotídica obtenida en este trabajo corresponde a una endoxilanasas correspondiente a la familia 11 de las glicosil hidrolasas (EC 3.2.1.8). Las proteínas integrantes de esta familia de las glicosil hidrolasas (las anteriormente llamadas familia G) tienen secuencias génicas, estructuras proteicas y mecanismos catalíticos similares y se caracterizan por ser altamente selectivas respecto al sustrato con una alta eficiencia catalítica. Estas enzimas son de bajo peso molecular y se denominan “verdaderas xilanasas”, ya que son activas específicamente sobre sustratos que contienen D-xilosas (Motta *et al.*, 2013).

#### **9.7 APLICACIÓN EN EL PRETRATAMIENTO DE LA XILANASA PERTENECIENTE A TRICHODERMA ATROVIRIDE LBM 117**

El bioetanol de segunda generación es el que se produce a partir de residuos lignocelulósicos provenientes de la forestoindustria, los cuales representan una fuente abundante de carbohidratos y de bajo costo, con la ventaja adicional de ser sustratos renovables y por lo tanto, amigables con el ambiente. Estos residuos están

compuestos principalmente de lignina, celulosa y hemicelulosa. La lignina y la hemicelulosa se encuentran recubriendo a la celulosa haciéndola impermeable.

Según el documento “Biotecnología Argentina al 2030”, nuestro país aprovecha sus ventajas comparativas, integrando nuevas cadenas de mayor valor agregado: desde la producción de cultivos hasta el procesamiento de residuos agrícolas, industriales y urbanos. De esta manera, presenta a la biomasa como un componente esencial de la producción de energía, combustibles, insumos industriales y materiales de distinto tipo.

En este sentido, la utilización de la biomasa lignocelulósica ha emergido como la tecnología más destacada para la producción eficiente de bioetanol y otros productos de valor agregado. Entre los materiales lignocelulósicos prospectivos para la producción de este combustible, se encuentra el bagazo de caña de azúcar (Talebnia *et al.*, 2010) que se genera como consecuencia de la fabricación de azúcar a partir de la caña de azúcar.

A nivel nacional, el uso del bagazo de caña de azúcar para la producción de bioetanol se empezó a fomentar a partir de la sanción de la ley 26.334 en 2008 “Régimen de promoción de la producción de bioetanol”, donde se contempla impulsar la conformación de cadenas de valor mediante la integración de productores de caña de azúcar e ingenios azucareros en los procesos de fabricación de bioetanol.

El pretratamiento de la biomasa es el primer paso en el proceso del bioetanol y es la etapa que presenta los mayores desafíos. Se considera como el paso crítico y tiene un gran impacto en la digestibilidad de la celulosa e influye fuertemente en los costos derivados de desintoxicación, carga de enzimas, demandas de tratamiento de desechos y otras variables. El pretratamiento constituye más del 40% del coste total del proceso. Un pretratamiento adecuado puede aumentar la concentración de azúcares fermentables después de la hidrólisis enzimática, incrementando así la eficiencia general del proceso. Un pretratamiento ideal evita las necesidades de reducción de tamaño de la biomasa y hace que ésta

sea susceptible de hidrólisis rápida con mayores rendimientos de azúcares monoméricos, además debe limitar la formación de compuestos inhibidores y minimizar las demandas de energía y los requerimientos de capital y costo operacional (Sindhu *et al.*, 2016).

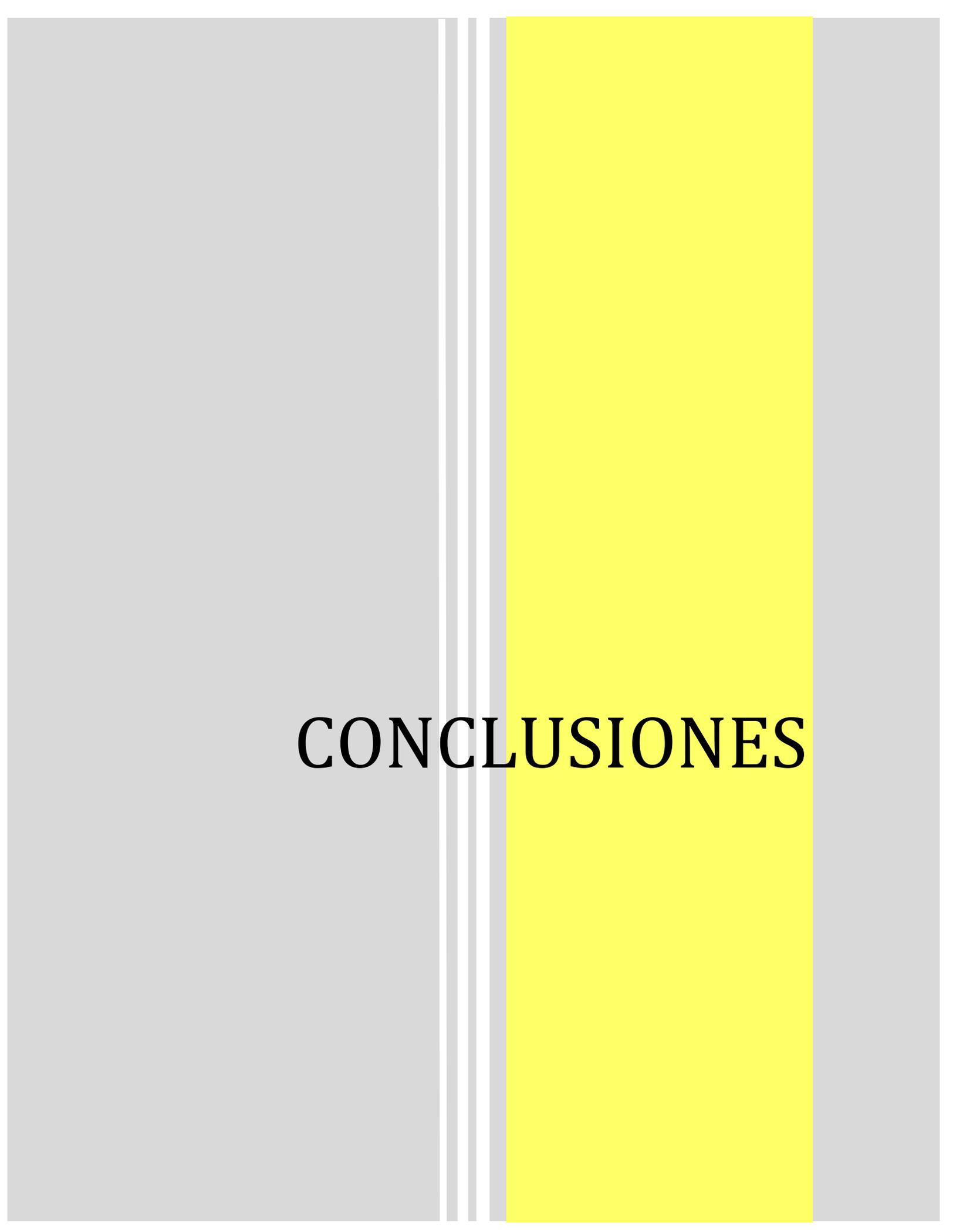
En este trabajo se seleccionó una combinación de dos estrategias para lograr un pretratamiento eficiente del bagazo de caña de azúcar. Para ello en primer lugar se pretrató el material con NaOH 3% (Castrillo 2015). El pretratamiento con álcalis, provoca un hinchamiento de las fibras y se llevan a cabo reacciones del tipo sulfatación y saponificación (Castrillo 2015). Esto provoca un estado de inflamación de los componentes de la pared celular lo que la torna mucho más accesible a enzimas. Thomas *et al.* (2016) pretrataron bagazo de caña de azúcar con NaOH 2% y luego sometieron al residuo a una hidrólisis con sobrenadante producido por *Aspergillus*, enriquecido en xilanasas y suplementado con celulasas comerciales y lograron superar la concentración de azúcares reductores en comparación a los ensayos llevados a cabo sin el agregado de xilanasas, por lo que sugieren que la incorporación de xilanasas mejora el rendimiento del proceso. Yang *et al.* (2015) evaluaron el efecto de la adición de xilanasas en una etapa posterior a un pretratamiento con ácido diluido, logrando incrementar los niveles de glucosa liberados en comparación al control. Esto sugirió un comportamiento sinérgico de dichas enzimas con las celulasas e incluso postularon la idea de un efecto bloqueador sobre el xilano que ejercen estas enzimas incrementando la porosidad del material haciendo que las fibras se tornen más susceptibles al ataque. A pesar de esto los autores sugirieron que la acción de las xilanasas se potenció con la utilización de surfactantes como el polietilenglicol.

La utilización de pretratamientos alcalinos se prefieren respecto a los ácidos, ya que algunos autores sugieren que a pesar de que aquellos que utilizan ácidos pueden eliminar de manera más eficiente la lignina también ocasionan pérdidas significativas de la hemicelulosa y hasta de celulosa lo que por lo tanto disminuye el rendimiento de proceso (Maitán- Alfenas *et al.*, 2015)

La etapa siguiente al pretratamiento es la hidrólisis enzimática la cual incluye los pasos de procesamiento que convierten los polímeros de carbohidratos en azúcares monoméricos. Por lo tanto, la cristalinidad de la celulosa y su grado de polimerización, la accesibilidad a las fibras que es impedida por el efecto protector de la lignina y el revestimiento por hemicelulosas, son los principales factores que contribuyen a la resistencia de la biomasa a esta hidrólisis y por lo tanto afectan directamente la eficiencia del proceso (Sindhu *et al.*, 2016). En este trabajo se ha logrado convertir a azúcares el 63% de la holoocelulosa presente en bagazo de caña de azúcar pretratado química y biológicamente. Así Liu *et al.* (2017) han descrito que utilizando un cóctel enzimático comercial sobre bagazo de caña de azúcar pretratado con álcalis a diferentes consistencias obtuvieron 48% de conversión de celulosa. Por otro lado, Da Silva *et al.* (2016) reportaron niveles de 80% de conversión de celulosa aplicando un cóctel enzimático comercial al bagazo de caña de azúcar con un pretratamiento hidrotérmico. La bibliografía en este sentido es muy diversa y los niveles de conversión dependen del material que se hidroliza y de los pretratamiento que han recibido. Para la producción de etanol celulósico, Eliana *et al.* (2013) compararon el efecto de diferentes pretratamientos sobre el pasto elefante y mostraron que el pretratamiento alcalino con NaOH provocó cambios en mayor medida sobre la lignina dejando casi intacta a la hemicelulosa y a la celulosa y fue este pretratamiento que mostró el rendimiento más elevados en la hidrólisis, y fermentación simultánea. Los autores de Souza Moretti *et al.* (2016) compararon el resultado de la hidrólisis de bagazo de caña de azúcar pretratado con irradiación y con el bagazo sin pretratar y mostraron que después de la hidrólisis enzimática con celulasas comerciales lograron los mayores niveles de azúcares monoméricos, sugiriendo que el pretratamiento hace a las fibras más susceptibles al ataque enzimático. Resultados similares se obtuvieron en este trabajo donde el material pretratado permitió la obtención de los mayores niveles de azúcares fermentables. En este sentido las acciones de los pretratamientos fueron evidenciados en las microfotografías, donde se observaron a las fibras más

---

rejaladas y laxas en comparación al bagazo de caña que no recibió pretratamiento que se mostraron rígidas y con un alto grado de organización. Pal *et al.* (2017) también observó cambios a nivel estructural del bagazo de caña de azúcar cuando fueron pretratados con explosión de vapor y en el bagazo de caña de azúcar sin pretratar observaron una estructura compacta, sugiriendo la necesidad de pretratamiento para permitir la permeabilidad de las enzimas hidrolíticas. Resultados similares observaron Liu *et al.* (2017) y atribuyeron la distención de las fibras registradas por SEM al efecto del bisulfito durante el pretratamiento.



# CONCLUSIONES

## 10 CONCLUSIONES

1. Las pruebas de *screening* cualitativo y cuantitativo con xilano de madera de haya como fuente de carbono, mostraron que *T. harzianum* LBM 094, *T. harzianum* LBM 103, *T. atroviride* LBM 117, *Trichoderma* sp. LBM 192, *Trichoderma* sp. LBM 193, cepas autóctonas de la provincia de Misiones (Argentina), exhibieron el mejor potencial xilanolítico presentándose como candidatos promisorios para su utilización en la bioconversión de la biomasa lignocelulósica.
2. Los niveles de actividad xilanolítica de las 5 cepas de *Trichoderma* dependieron de la concentración del bagazo de caña de azúcar. Todas las cepas mostraron los niveles más altos de actividad con las mayores concentraciones del residuo, mejorando o igualando al control en 4 cepas.
3. La actividad xilanolítica fue modificada debido al efecto de la luz, observándose que el nivel más alto de actividad se adelantó entre 3 y 6 días respecto a los ensayos desarrollados en ausencia de luz; permitiendo además mejorar la actividad en 4 cepas. Así mismo, se pudo evidenciar cambios en los perfiles enzimáticos de *Trichoderma* sp. LBM 193 y *T. harzianum* LBM 094. Mientras que las cepas *T. atroviride* LBM 117, *Trichoderma* sp. LBM 192 y *T. harzianum* LBM 103 mostraron el mismo perfil isoenzimático en ambos ensayos.
4. Las características de las actividades xilanolíticas fueron iguales en ambos ensayos. La temperatura óptima de actividad se mantuvo entre 45 y 50°C y

---

el pH óptimo entre 4,8 y 5. La mayor termoestabilidad se evidenció a 30°C y pH 4,8 para todas las cepas.

5. *T. atroviride* LBM 117 fue seleccionado para su aplicación en el pretratamiento de bagazo de caña de azúcar, por mostrar altos niveles de actividad xilanolítica y la mayor termoestabilidad a 30°C, característica que facilita la aplicación en el proceso biotecnológico que se pretende.
6. Los niveles de la actividad xilanolítica de *T. atroviride* LBM 117 fueron optimizados, alcanzando 45 U mL<sup>-1</sup> en medio de cultivo Mandels con 1,4406 g L<sup>-1</sup> de sulfato de amonio y 1,1115 g L<sup>-1</sup> de urea, suplementado con 30 g L<sup>-1</sup> de bagazo de caña de azúcar y cultivado a 28°C en presencia de luz y con agitación a 100 rpm.
7. La producción de xilanasas a partir de *T. atroviride* LBM 117 en el medio de cultivo suplementado con bagazo de caña de azúcar como única fuente de carbono en reemplazo del xilano de madera de haya resultó ser 57 veces más económica, posicionándose como una alternativa de relevancia para iniciar el escalado de la producción.
8. La identificación de la cepa seleccionada como *T. atroviride* LBM 117 fue confirmada mediante identificación molecular utilizando los marcadores RPB2 y *tef1*. Además se pudo lograr la amplificación de una región estructural de 720 pb correspondiente al gen de una endoxilanasas que codifica para una proteína madura de 203 aminoácidos perteneciente a la familia 11 de las glicosilhidrolasas, la cual se sabe es monoespecífica de la endohidrólisis del xilano.
9. La inmovilización por atrapamiento de las xilanasas provenientes de *T. atroviride* LBM 117 en la matriz agar-agar resultó ser más eficiente respecto a

---

la poliacrilamida debido a que mostró el mejor rendimiento y permitió la reutilización por más ciclos. Con microscopía electrónica de barrido se evidenció la presencia de pequeños acúmulos en la superficie del agar lo que evidenció de manera indirecta la efectividad de la inmovilización.

10. De la evaluación de las características de las actividades xilanolíticas se observó que el pH óptimo de la enzima inmovilizada fue de 3 mientras que la enzima libre fue de 4. La temperatura óptima de actividad para la inmovilizada fue de 50°C, mientras que para la enzima libre fue entre 30 y 60°C. La enzima inmovilizada mostró ser más estable a 50°C que la enzima libre. Por lo tanto, el proceso de inmovilización incrementó el tiempo de utilización de la enzima, factor fundamental en el desarrollo industrial de un biocatalizador inmovilizado.
11. En la enzima inmovilizada el Co inhibió la actividad enzimática, mientras que el Zn y el EDTA la incrementaron tal como ocurre con la enzima libre. La  $V_{m\acute{a}x}$  de la enzima libre fue más elevada que la registrada para la enzima inmovilizada por lo que se asume que la cantidad de sitios activos de esta última podrían estar disminuidos. La  $K_m$  de la enzima inmovilizada fue mayor lo que sugiere que la inmovilización provoca una disminución de la afinidad por el sustrato.
12. La combinación de pretratamiento alcalino con la utilización de xilanasas libre obtenida del cultivo de *T. atroviride* LBM 117 resultó ser el tratamiento más eficiente ya que mostró los niveles más altos de conversión de holocelulosa. Los efectos del pretratamiento biológico (alteración en la estructura del parénquima y de los vasos conductores) incrementaron la exposición de las fibras de celulosa, que se mostraron más laxas y desorganizadas, facilitando la liberación de azúcares reductores durante los

---

tratamientos. Además se evidenció que todas las xilanasas testeadas en este trabajo durante el pretratamiento de bagazo de caña de azúcar deslignificado con hidróxido de sodio, permitieron obtener mayores niveles de azúcares fermentables respecto al pretratamiento alcalino únicamente.

## 11 BIBLIOGRAFÍA

### A

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*. J. Nat. Prod. Plant Resour. 1(4):117-125.

Abril A, Navarro EA. (2012). Etanol a partir de biomasa lignocelulósica. Aleta.

Adlercreutz, P. (2013). Immobilisation and application of lipases in organic media. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6406-6436.

Aguilar R, Ramirez JA., Garrote G, Vázquez M (2002). Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *Journal of Food Engineering*, 55(4), 309-318.

Ahmed S, Jabeen A, Jamil A. (2007). Xylanase from *Trichoderma harzianum*: Enzyme characterization and gene isolation. *Journal of the Chemical Society of Pakistan* 29(2): 176-182.

Ahmed, S., Ul-Ain, Q., Aslam, N., Naeem, S., Ul-Rahman, S., & Jamil, A. (2003). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 22, 1912-1916

Alves RT, Faria M. (2010). Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos. *Planaltina (DF), Embrapa Cerrados*.

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

Alzate Cardona CA. (2005). Producción biotecnológica de alcohol carburante I, obtención a partir de diferentes materias primas. *Revista de ciencia y tecnología de América*. ISSN 0378-1844, Vol. 30, 11. 671-678.

Andrade, L. P., Crespim, E., de Oliveira, N., de Campos, R. C., Teodoro, J. C., Galvão, C. M. A., & Maciel Filho, R. (2017). Influence of sugarcane bagasse variability on sugar recovery for cellulosic ethanol production. *Bioresource Technology*, 241, 75-81.

Anschau RA, Flores Marco N, Carballo SM, Hilbert J. (2009). Evaluación del potencial de producción de biocombustibles en Argentina, con criterios de sustentabilidad social, ecológica y económica, y gestión ordenada del territorio. El caso de la caña de azúcar y el bioetanol. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires, Argentina, 12.

Argumedo-Deliria R, Alarcón A, Ferreyra-Cerrato R, Peña-Cabriales JJ. (2009). El género fúngico *Trichoderma* y su relación con los contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista internacional de contaminación ambiental* 25(4): 257-269.

Arias-Carbajal GMO, García GB, Betancourt D. (2005). Biotransformación de Residuos Lignocelulosicos con Hongos Pleurotus. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 36.

## B

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

Bakri Y, Masson M, & Thonart P (2010). Isolation and identification of two new fungal strains for xylanase production. Applied biochemistry and biotechnology, 162(6), 1626-1634.

Baldrian P, Valášková V. (2008). Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. FEMS microbiology reviews 32(3): 501-521.

Barchuk ML, Díaz GV, Coll PAF, Velazquez JE, Fonseca M I, 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. ISSN: 2322 - 0392. Int. J. Rec. Biotech.4 (2): 25-34.

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.

Begenisic, E. S. D. O. F., en la Argentina, A. O. (2006). *Perspectivas de los biocombustibles en la Argentina y en Brasil*.

Bibi, Z., Shahid, F., Qader, S. A. U., & Aman, A. (2015). Agar-agar entrapment increases the stability of endo- $\beta$ -1, 4-xylanase for repeated biodegradation of xylan. *International journal of biological macromolecules*, 75, 121-127.

Bich GA, Castrillo ML, Silva MR, Díaz GV, Villalba LL, Zapata PD, Medvedeff MG (2015). Entomopathogenic Fungi in Misiones Province: A Review. RECyT 17. 23, 54-58.

Biely P, Kratzy Z, Vrsanska M, Urmanicova D. (1980). Induction and inducers of endo-1,4-B-xylanase in the yeast *Cryptococcus albidus*. *Em. Journal Biochemistry* 108: 323-3329.

Biely P. (1993). Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. *Hemicellulose and hemicellulases* 29-51.

Bilal, M., Asgher, M., Shahid, M., & Bhatti, H. N. (2016). Characteristic features and dye degrading capability of agar-agar gel immobilized manganese peroxidase. *International journal of biological macromolecules*, 86, 728-740.

Biswas, S.R., Mishra, A.K. and Nanda, G (1988). Xylanase and xylosidase production by *Aspergillus ochraceus* during growth on lignocelluloses. *Biotechnol. Bioeng.*, 31: 613-616.

Blanch H, Wilke C (1983). Sugars and chemicals from cellulose. *Rey. Chein. Lng.* 1:71-119.

Brena, B., González-Pombo, P., & Batista-Viera, F. (2013). Immobilization of enzymes: a literature survey. *Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition*, 15-31.

Bribiesca BLC. (2013). Enzimas xilanolíticas bacterianas y sus aplicaciones industriales. *Vertientes Revista Especializada en Ciencias de la Salud* 16(1): 19-22.

Brienzo, M., Carvalho, A. F. A., de Figueiredo, F. C., & de Oliva Neto, P. (2016). Sugarcane bagasse hemicellulose properties, extraction technologies and xylooligosaccharides production. In *Food Waste: Practices, Management and Challenges* (pp. 155-188). Nova Science Publishers New York.

Bussamra BC, Freitas S, da Costa AC. (2015). Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. *Bioresource technology* 187: 173-181.

## C

Cabrera SL, Gómez AA, Martínez A, Quintero R (2000). Biocombustibles a partir de recursos lignocelulósicos: estudio del caso, bagazo de caña en México, Centro de Investigación en Biotecnología UAEM, Instituto Mexicano del Petróleo, Instituto de Biotecnología-UNAM. 21 pp.

Callejas ES, Quezada VG. (2009). Los biocombustibles. *El Cotidiano* 157(157): 75-82.

Camassola, M., & Dillon, A. J. (2009). Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. *Industrial Crops and Products*, 29(2), 642-647.

Cardona CA, Quintero JA, Paz IC (2010). Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. *Bioresource technology*. 101(13), 4754-4766.

Castañeda Y, Arana A, Álvarez R, Román A, Gutiérrez A, Téllez A (2015). Producción de enzimas hidrolíticas utilizando residuos lignocelulósicos y *Trichoderma harzianum* en fermentación en estado sólido.

Castrillo M, Bich G, Kramer G, Velazquez J, Rodriguez M, Zapata P, Villalba L (2015). Evaluation of Synthetic and Semi-synthetic Culture Media for Endo-1, 4- $\beta$ -Glucanases Secretion by *Trichoderma koningiopsis*. *Procedia Materials Science*, 8, 786-792.

Castro-Saya Y. (2013). Estudio de la bioquímica de enzimas lignocelulolíticas. Trabajo de grado presentado para optar al título de Especialista en Microbiología Industrial.

Cayetano-Cruz, M., de los Santos, A. I. P., García-Huante, Y., Santiago-Hernández, A., Pavón-Orozco, P., y López, V. E. L., & Hidalgo-Lara, M. E. (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.

Chauvet M, González RL. (2008). Biocombustibles y cultivos biofarmacéuticos: ¿oportunidades o amenazas? *Revista El Cotidiano* 147: 51-61.

Chaverri, P., Castlebury, L. A., Samuels, G. J., & Geiser, D. M. (2003). Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum*/*Hypocrea lixii* complex. *Molecular phylogenetics and evolution*, 27(2), 302-313.

Chávez-García M, Montaña-Lara JS, Martínez-Salgado MM, Mercado-Reyes M, Rodríguez MX, Quevedo-Hidalgo B. (2008). Efecto del sustrato y la exposición a la luz en la producción de una cepa de *Trichoderma* sp. *Universitas Scientiarum* 13(3): 245-251.

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  $\beta$ -endoxylanases from *Trichoderma* sp. K9301 and their actions in xylooligosaccharide production. *Bioresource Technology* 100: 5230-5236.

Chen M, Zhao J, Xia L (2008). Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars. *Carbohydrate Polymers*,71(3), 411-415.

Chiaramonti, D., Prussi, M., Ferrero, S., Oriani, L., Ottonello, P., Torre, P., & Cherchi, F. (2012). Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. *Biomass and Bioenergy*, 46, 25-35.

Chico, B., Camacho, C., Pérez, M., Longo, M. A., Sanromán, M. A., Pingarrón, J. M., & Villalonga, R. (2009). Polyelectrostatic immobilization of gold nanoparticles-modified peroxidase on alginate-coated gold electrode for mediatorless biosensor construction. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 629(1), 126-132

Clauser, N. M., Gutiérrez, S., Area, M. C., Felissia, F. E., & Vallejos, M. E. (2016). Small-sized biorefineries as strategy to add value to sugarcane bagasse. *Chemical Engineering Research and Design*, 107, 137-146.

Clavijo A, Cotes AM. (1998). Evaluación de la actividad quitinasa en procesos de control biológico de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate, mediante fitoinvigorización de semillas en presencia de *Trichoderma koningii*. *Revista Colombiana de Biotecnología* 1(2): 58-66.

Collins T, Gerday C, Feller G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 3-23.

Corral OL. (2002). Las xilanasas microbianas y sus aplicaciones.

Cruz L (2007). Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Trabajo de Diploma, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, DC.

Cuervo L, Folch JL, Quiroz RE. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Bio Tecnología* 13(3): 11-25.

Cunningham RE. (2003). La energía, historia de sus fuentes y transformación. *Petrotecnia* 52-60.

Cuyvers S, Dornez E, Moers K, Pollet A, Delcour J, Courtin C. (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, A. S. A., de Souza, M. F., Ballesteros, I., Manzanares, P., Ballesteros, M., & Bon, E. P. (2016). High-solids content enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated sugarcane bagasse using a laboratory-made enzyme blend and commercial preparations. *Process Biochemistry*, 51(10), 1561-1567.

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

de Souza Moretti, M. M., Perrone, O. M., Nunes, C. D. C. C., Taboga, S., Boscolo, M., da Silva, R., & Gomes, E. (2016). Effect of pretreatment and enzymatic hydrolysis on the physical-chemical composition and morphologic structure of sugarcane bagasse and sugarcane straw. *Bioresource technology*, 219, 773-777.

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

Di Marco E, Soraire PM, Romero C. M., Villegas, L. B., & Martínez, M. A. (2017). Raw sugarcane bagasse as carbon source for xylanase production by *Paenibacillus* species: a potential degrader of agricultural wastes. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-11.

Díaz GV, Giorgio EM, Fonseca MI, Villalba LL, Zapata PD (2015). Statistical Optimization of Medium Components of Xylanase Production by *Irpex lacteus* BAF 1168 strain F under liquid fermentation. *Journal of Advances in Biotechnology* 5(1):539-569.

Domsch KH, Gams W, Anderson TH. (1980). *Compendium of soil fungi*. Volume 2. Academic Press (London) Ltd.

Driss, D., Driss, Z., Chaari, F., & Chaabouni, S. E. (2014). Immobilization of His-tagged recombinant xylanase from *Penicillium occitanis* on Nickel-chelate Eupergit C for increasing digestibility of poultry feed. *Bioengineered*, 5(4), 274-279.

Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G., Komoń, M., Bissett, J., Szakacs, G., & Kubicek, C. P. (2005). An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology*, 42(10), 813-828.

DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.

Duran, N., & Duran, M. (2000). Enzyme applications in the textile industry. *Coloration Technology*, 30(1), 41-44.

Durman S, Menéndez A, Godeas A. (2003). Evaluación de *Trichoderma* sp. como antagonista de *Rhizoctonia solani* "in vitro" y como biocontrolador del damping off de plantas de tomate en invernadero. *Revista Argentina de Microbiología* 31(1):13-18.

Dutta T, Sengupta R, Sahoo R, Ghosh S (2007) A novel cellulase-free alkaliphilic xylanase from alkalitolerant *Penicillium citrinum*: production, purification and characterization. *Lett Appl Microbiol* 44:206-211.

## E

Ebringerová A (2005). Structural diversity and application potential of hemicelluloses. In *Macromolecular Symposia*. WILEY-VCH Verlag (Vol. 232, No. 1, pp. 1-12).

Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792-1797.

Eliana, C., Jorge, R., Juan, P., & Luis, R. (2014). Effects of the pretreatment method on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentability of the cellulosic fraction from elephant grass. *Fuel*, 118, 41-47.

Espiner MTF, Ramon D, Pinaga F, Valles S (1992). *FEMS Microbiology Letters*, 9, 92-96.

Esteves FL, Ruelle V, Lamotte-Brasseur J, Quinting B, Frere JM. (2004). Acidophilic adaptation of family 11 endo- $\beta$ -1,4-xylanases: modeling and mutational analysis. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 13: 1209-1218.

## F

Farrell RL, Biely P, McKay DL (1996). Biotechnology in the pulp and paper industry. In E. Srebotnik & Messner K (Eds.), *Proceedings of the 6th international conference of Biotechnology in the Pulp and Paper Industry* (pp. 485-489). Vienna: Facultas-Universitätsverlag.

Fengel D, Wegener G. (1984). *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter 613: 1960-82.

Fernández-Espinar M, Piñaga F, de Graff L, Visser J, Ramón D, Vallés S (1994). Purification, characterization and regulation of the synthesis of an *Aspergillus nidulans* acidic xylanase. *Appl Microbiol Biotechnol* 42:555-562.

Fernandez-Islas F (2013). Producción de xilanasas por cepas de *Aspergillus niger* en cultivo sólido sobre salvado de avena y salvado de trigo (Doctoral dissertation).

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 (2013). 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. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. San Miguel de Tucumán. Argentina.

Fonseca, M. I., Shimizu, E., Zapata, P. D., & Villalba, L. L. (2010). Copper inducing effect on laccase production of white rot fungi native from Misiones (Argentina). *Enzyme and microbial technology*, 46(6), 534-539.

## G

Gams W, Bissett J. (1998). Morphology and identification of *Trichoderma*. *Trichoderma and Gliocladium* 1: 3-34.

Gato-Cárdenas Y (2010). Métodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum* rifai. *Fitosanidad*, 14(3), 189-195.

Gelain, L., da Cruz Pradella, J. G., & da Costa, A. C. (2015). Mathematical modeling of enzyme production using *Trichoderma harzianum* P49P11 and sugarcane bagasse as carbon source. *Bioresource technology*, 198, 101-107.

Gessesse A, Mamo G (1999). High-level xylanase production by an alkaliphilic *Bacillus* sp. by using solid state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(1), 68-72.

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 banano y de almidón de yuca. *Dyna* 73(150): 21-27.

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

Goyal, M., Kalra, K. L., Sareen, V. K., & Soni, G. (2008). Xylanase production with xylan rich lignocellulosic wastes by a local soil isolate of *Trichoderma viride*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(3), 535-541.

Gray K, Zhao L, Emptage M. (2006). Bioethanol. *Current Opinion Chemical Biology*. 10: 141- 146.

Gutierrez-Correa M, Tengerdy RP (1998). Xylanase production by fungal mixed culture solid substrate fermentation on sugar cane bagasse. *Biotechnology Letters*, 20(1), 45-47.

## H

Hackenberg N. (2008). Biocombustibles de segunda generación. *Revista Virtual REDESMA*, 2, 49

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

Harman GE. (2000). Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant disease* 84(4): 377-393.

Harris, A. D., & Ramalingam, C. (2010). Xylanases and its application in food industry: a review. *Journal of Experimental Sciences*, 1(7).

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.

He J, Yu B, Zhang K, Ding X, Chen D. (2009). Expression of endo-1,4-beta-xylanase from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and functional characterization of the produced enzyme. *BMC Biotechnol* 9(56):1-10.

Helgason, T., Watson, I. J., & Young, J. P. W. (2003). Phylogeny of the Glomerales and Diversisporales (Fungi: Glomeromycota) from actin and elongation factor 1-alpha sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 229(1), 127-132.

Henrissat B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal* 280(2): 309-316.

Hernández-Salas JM, Villa-Ramírez MS, Veloz-Rendón JS, Rivera-Hernández KN, González-César RA, Plascencia-Espinosa MA, Trejo-Estrada SR. (2009). Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. *Bioresource Technology* 100(3): 1238-1245.

Hernández-Santoyo A, García-Hernández E, Rodríguez-Romero A. (1999). Celulosomas: sistemas multienzimáticos. *Journal of the Mexican Chemical Society ISSN (Versión impresa): 1870-249X. ISSN (Versión en línea): 1665-9686.*

Himmel M, Ding S, Johnson D, Adney W, Nimlos M, Brady J, Foust T. (2007). Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* 315: 804-807.

Huang, L. C. L., & Chang, H. C. (2004). Adsorption and immobilization of cytochrome c on nanodiamonds. *Langmuir*, 20(14), 5879-5884.

Hückelhoven R (2007). "Cell Wall-Associated Mechanisms of Disease Resistance and Susceptibility." *Annual Review of Phytopathology* 45, 101- 127.

## I

Infante D, Martínez B, González N, Reyes Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de protección vegetal* 24(1): 14-21.

Itoh, H., Wada, M., Honda, Y., Kuwahara, M., & Watanabe, T. (2003). Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi. *Journal of Biotechnology*, 103(3), 273-280.

## J

Jaklitsch WM, Samuels GJ, Dodd SL, Lu BS, Druzhinina IS. (2006). *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. *Studies Mycol* 55: 135-177.

Jaklitsch, W. M. (2009). European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. *Studies in mycology*, 63, 1-91.

Jampala, P., Preethi, M., Ramanujam, S., Harish, B. S., Uppuluri, K. B., & Anbazhagan, V. (2017). Immobilization of levan-xylanase nano hybrid on an alginate bead improves xylanase stability at wide pH and temperature. *International journal of biological macromolecules*, 95, 843-849.

Jayapal N, Samanta AK, Kolte AP, Senani S, Sridhar M, Suresh KP, Sampath KT (2013). Value addition to sugarcane bagasse: Xylan extraction and its process optimization for xylooligosaccharides production. *Industrial Crops and Products*, 42, 14-24.

## K

Kapoor, M., Nair, L. M., & Kuhad, R. C. (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(1), 88-97.

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.

Karp SG, Woiciechowski AL, Soccol VT, Soccol CR. (2013). Pretreatment strategies for delignification of sugarcane bagasse: a review. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 56(4): 679-689.

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.

Kaushik, P., & Malik, A. (2016). Production and Characterization of Xylanases from Fungal Isolate *Aspergillus Terreus* and Development of Low Cost Fermentation Media. *Journal of Medical and Bioengineering* Vol, 5(1).

Kheng, P. P., & Omar, I. C. (2005). Xylanase production by a local fungal isolate, *Aspergillus niger* USM AI 1 via solid state fermentation using palm kernel cake (PKC) as substrate. *Songklanakar J. Sci. Technol*, 27(2), 325-336.

Khucharoenphaisan K, Tokuyama S, Ratanakhanockchai K, Kitpreechavanich V (2010). Induction and repression of B-xylanase of *Thermomyces lanuginosus* TISTR3465. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 13 (5):209-125.

Klotzbach, T., Watt, M., Ansari, Y., & Minteer, S. D. (2006). Effects of hydrophobic modification of chitosan and Nafion on transport properties, ion-exchange capacities, and enzyme immobilization. *Journal of Membrane Science*, 282(1), 276-283.

Koichiro S, Masako Y, Shozo T (1961). Studies on xylanase of *Pericularia oryzae*. *The journal of Biochemistry*. Vol. 50 N. 6 P 538-543.

Kovacs K, Macrelli S, Szakacs G, Zacchi G. (2009). Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated lignocellulosic materials with *Trichoderma atroviride* enzymes

produced in-house. *Biotechnology for Biofuels* 2(1): 1.

Krisana A, Rutchadaporn S, Jarupan G, Lily E, Sutipa T, Kanyawim K (2005). Endo-1,4- $\beta$ -xylanase B from *Aspergillus cf. niger* BCC14405 isolated in Thailand: Purification, characterization and gene isolation. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 38(1):17-23.

Krishna SH, Reddy TJ, Chowdary GV. (2001). Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresource technology* 77(2): 193-196.

Kuhls K, Lieckfeldt E, Sammuels GJ, Meyer W, Kubicek CP, Börner T. (1997). Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia* 89: 442-460.

Kulkarni N, Shendye A, Rao M. (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology reviews* 23: 411-456.

Kumar, R., Kim, S. J., Kim, K. H., Lee, S. H., Park, H. S., & Jeon, B. H. (2017). Removal of hazardous hexavalent chromium from aqueous phase using zirconium oxide-immobilized alginate beads. *Applied Geochemistry*.

## L

Lemos JLS, Bon EP, Santana MDFE, Pereira Junior N (2000). Thermal stability of xylanases produced by *Aspergillus awamori*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31(3), 205-210.

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: 995-1002.

Li Y, Liu Z, Cui F, Xu Y, Zhao H (2007). Statistical optimization of xylanase production from new isolated *Penicillium oxalicum* ZH-30 in submerged fermentation. *Biochem. Eng. J.*, 34: 82-86.

Lieckfeldt E, Samuels GJ, Nirenberg H, Petrini O. (1999). A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species. *Appl. Environ. Microbiol* 65: 2428-2428.

Liese, A., & Hilterhaus, L. (2013). Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6236-6249.

Liu, Y. J., Whelen, S., & Hall, B. D. (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution*, 16(12), 1799-1808.

Liu, Y., Li, R., Wang, J., Zhang, X., Jia, R., Gao, Y., & Peng, H. (2017). Increased enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse by a novel glucose-and xylose-stimulated  $\beta$ -glucosidase from *Anoxybacillus flavithermus* subsp. *yunnanensis* E13 T. *BMC biochemistry*, 18(1), 4.

Liu, Z. J., Lan, T. Q., Li, H., Gao, X., & Zhang, H. (2017). Effect of bisulfite

treatment on composition, structure, enzymatic hydrolysis and cellulase adsorption profiles of sugarcane bagasse. *Bioresource technology*, 223, 27-33.

Loha YR, Sujana D, Rahmana ME, Dasb CA. (2013). Sugarcane bagasse the future composite material: A literature review. *Resources, Conservation and Recycling* 75: 14- 22.

Lopez JG, Salva JJ. (2000). Preliminary test on combustion of wood derived fast pyrolysis oils in a gas turbine combustor. *Biomass Bioenergy* 19:119-128.

López JH. (2008). Geopolítica del petróleo y crisis mundial. *Dyna*, 75(156).

Lopez-Miranda J, Soto-Cruz NO, Rutiaga-Quinones OM, Medrano-Roldan H, Arévalo-Nino K (2009). Optimización del proceso de obtención enzimática de azúcares fermentables a partir de aserrín de pino. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 25: 95-102.

Lorito M, Farkas V, Rebuffat S, Bodo B, Kubicek CP. (1996). Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. *Journal of Bacteriology* 178(21): 6382-6385.

Losonczy, A., Csiszar, E., Szakács, G., & Bezur, L. (2005). Role of the EDTA chelating agent in bioscouring of cotton. *Textile research journal*, 75(5), 411-417.

Lu, L., Zhao, M., & Wang, Y. (2007). Immobilization of laccase by alginate-chitosan microcapsules and its use in dye decolorization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(2), 159-166.

## M

Maalej-Achouri, I., Guerfali, M., Gargouri, A., & Belghith, H. (2009). Production of xylo-oligosaccharides from agro-industrial residues using immobilized *Talaromyces thermophilus* xylanase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59(1), 145-152.

Macarrón-Larumbe R. (1992). Purificación y caracterización de endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*. Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones.

Mach RL, Zeilinger S. (2003). Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 515-522.

Maitan-Alfnas, G. P., Visser, E. M., Alfnas, R. F., Nogueira, B. R. G., de Campos, G. G., Milagres, A. F. and Guimaraes, V. M. (2015). The influence of pretreatment methods on saccharification of sugarcane bagasse by an enzyme extract from *Chrysosporthe cubensis* and commercial cocktails: A comparative study. *Bioresource technology*, 192, 670-676.

Mandels M, Reese ET. (1957). Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *Journal of Bacteriology* 73(2): 269.

Márquez-Araque AT, Mendoza Martínez GD, González Muñoz SS, Buntinx Dios SE, Loera Corral O (2007). Actividad fibrolítica de enzimas producidas por *Trametes* sp. EUM1, *Pleurotus ostreatus* IE8 y *Aspergillus niger* AD96. 4 en fermentación sólida. *Interciencia*, 32(11), 780-785.

Martínez CC, Valverde ME, López OP. (2009). Biocombustibles: biomasa lignocelulósica y procesos de producción. CONCYTEG 54.

Martínez-Burgos PA (2013). Caracterización química y estructural de hemicelulosas de genotipos de *Eucalyptus globulus* contrastantes en densidad y rendimiento pulpable (Doctoral dissertation, Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Forestales).

Martínez-Restrepo JM. (2014). Selección de hongos filamentosos con potencial para la degradación de lignocelulosa aislados de desechos agroindustriales de café e higuera. Tesis (Bacterióloga). Universidad Católica de Manizales, Facultad de Salud.

Meenakshi G, Kalra KL, Sareen VK, Soni G. (2008). Xylanase production with xylan rich lignocellulosic wastes by a local soil isolate of *Trichoderma viride*. Brazilian Journal of Microbiology 39: 535-541.

Miller GL. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical chemistry 31(3): 426-428.

Modig T, Almeida JM, Gorwa-Grauslund MF, Lidén G. (2008). Variability of the response of *Saccharomyces cerevisiae* strains to lignocellulose hydrolysate. Biotech and Bioeng 100: 423-429.

Montoya Mendoza AM (2012). Caracterización de una endo-xilanasa producida por *Bacillus flexus* NJY2 (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).

Muñoz-Centeno T (2012). Obtención del epigenoma de *Trichoderma atroviride* en respuesta a la luz azul. <http://hdl.handle.net/11627/244>.

Murthy PS, Naidu MM (2010) Production and application of xylanase from *Penicillium* sp. utilizing coffee by-products. Food Bioprocess Technol. doi:10.1007/s11947-010-0331-7.

## N

Nawaz, M. A., Karim, A., Bibi, Z., Rehman, H. U., Aman, A., Hussain, D. & Qader, S. A. U. (2016). Maltase entrapment approach as an efficient alternative to increase the stability and recycling efficiency of free enzyme within agarose matrix. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 64, 31-38.

## O

Obregón V, Jahaziel I (2015). Producción de enzimas fibrolíticas por *A. Niger* GSI mediante fermentación en estado sólido de rastrojo de maíz y su evaluación en la digestibilidad in vitro de un subproducto agroindustrial (Doctoral dissertation).

Oliva Domínguez JM. (2003). Efecto de los productos de degradación originados en la explosión por vapor de biomasa de chopo sobre "*Kluyveromyces marxianus*". CIEMAT.

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.

Ovando-Chacón SL, Waliszewski KN. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia* 21: 111-120.

## P

Pal, A., & Khanum, F. (2012). Covalent immobilization of xylanase on the surface of alginateglutaraldehyde beads decreases the 'catalytic efficiency' but provides 'low temperature stabilization' effect. *Journal of Biochemical Technology*, 3(4).

Pandey A, Soccol CR, Nigam P, Soccol VT (2000). Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource technology*, 74(1), 69-80.

Perez, D., Fandos, C., Scandaliaris, J., Mazzone, L., Soria, F., & Scandaliaris, P. (2007). Estado actual y evolución de la productividad del cultivo de caña de azúcar en Tucumán y el noroeste argentino en el período 1990-2007. *EEAOC Publicación Especial*, 34.

Pérez J, Muñoz-Dorado J, de la Rubia T, Martínez J. (2002). Biodegradation and biotreatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbial* 5: 53-63.

Pérez VH. (2001). Aplicación de Sistemas de Dos Fases Acuosa PEG/Fosfato para la Producción y Recuperación Primaria de Xilanasas de *Trichoderma Harzianum* Rifai-Edición Única.

Persoon CH (1794) "Neuer Versuch einer systematischen Eintheilung der Schwammme." *Roemer, Neues Magaz, Bot. I*, 63-128. *Trichoderma*, p. 92.

Poorna, C. A., & Prema, P. (2006). Production and partial characterization of endoxylanase by *Bacillus pumilus* using agro industrial residues. *Biochemical Engineering Journal*, 32(2), 106-112.

Prinsen P. (2010). Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas.

Pal, S., Joy, S., Kumbhar, P., Trimukhe, K. D., Gupta, R., Kuhad, R. C., ... & Padmanabhan, S. (2017). Pilot-scale pretreatments of sugarcane bagasse with steam explosion and mineral acid, organic acid, and mixed acids: synergies, enzymatic hydrolysis efficiencies, and structure-morphology correlations. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 7(2), 179-189.

## R

Rabelo SC, Carrere H, Maciel Filho R, Costa AC (2011). Production of bioethanol, methane and heat from sugarcane bagasse in a biorefinery concept. *Bioresource technology*, 102(17), 7887-7895.

Rodhe, A. V., Sateesh, L., Sridevi, J., Venkateswarlu, B., & Rao, L. V. (2011). Enzymatic hydrolysis of sorghum straw using native cellulase produced by *T. reesei* NCIM 992 under solid state fermentation using rice straw. *3 Biotech*, 1(4), 207-215.

Ramírez-López C. (2012). Producción de polisacarosidos por Fermentación sólida a partir de cultivos de hongos termofílicos y su uso para la clarificación de mostos derivados de jugo de manzana (Doctoral dissertation).

Rangel DE, Braga GU, Fernandes ÉK, Keyser CA, Hallsworth JE, Roberts DW. (2015). Stress tolerance and virulence of insect-pathogenic fungi are determined by environmental conditions during conidial formation. *Current genetics* 61(3): 383-404.

Razo C, Ludeña C, Saucedo A, Astete-Miller S, Hepp J, Vildósola A. (2007). Producción de biomasa para biocombustibles líquidos: el potencial de América Latina y el Caribe. CEPAL.

Rehman, H. U., Aman, A., Silipo, A., Qader, S. A. U., Molinaro, A., & Ansari, A. (2013). Degradation of complex carbohydrate: immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support. *Food chemistry*, 139(1), 1081-1086.

Reis, S. D., Costa, M. A. F., & Peralta, M. (2003). *Biological Science*, 25, 221-225.

Rezende M, de Melo Barbosa A, Dalberto Vasconcelos A, SakuradaEndo A. (2002). "Xylanase production by *Trichoderma harzianum* Rifai by solid state fermentation on sugarcane bagasse". *Brazilian Journal of Microbiology* 33: 67-72.

Ribeiro, L. F. C., Ribeiro, L. F., Jorge, J. A., & Polizeli, M. L. T. M. (2014). Screening of Filamentous Fungi for Xylanases and Cellulases Not Inhibited by Xylose and Glucose.

Rioux, J. D., Xavier, R. J., Taylor, K. D., Silverberg, M. S., Goyette, P., Huett, A., & Shugart, Y. Y. (2007). Genome-wide association study identifies five novel susceptibility loci for Crohn's disease and implicates a role for autophagy in disease pathogenesis. *Nature genetics*, 39(5), 596

Rodríguez I, Piñeros Y. (2007). Producción de complejos enzimáticos celulolíticos mediante el cultivo en fase sólida de *Trichoderma* sp. sobre los racimos vacíos de palma de aceite como sustrato. *Vitae* 14(2): 35-42.

Rodríguez MD (2016) Optimización de las condiciones de secreción de celulasas de hongos nativos de la provincia de misiones (Argentina) para su aplicación en la sacarificación enzimática. Tesis presentada a la FCEQyN de la Universidad Nacional de Misiones para optar al grado académico de Posadas, República Argentina.

Roncero MB, López ALT, Pastor JFC, Vidal T (2002). Blanqueo TCF de pastas de eucalyptus. Utilización de xilanasas. Afinidad: Revista de química teórica y aplicada, 59(500), 371-385.

Roussos S, Raimbault M, Viniegra-Gonzalez G, Saucedo-Castañeda G, Lonsane BK. (1991). Scale-up of cellulases production by *Trichoderma harzianum* on a mixture of sugar cane bagasse and wheat bran in solid state fermentation system. *Micología Neotropical Aplicada* (4): 83-98.

Royer J, Nakas P (1989). Xylanase production by *Trichoderma longibrachiatum*.

Enzyme Microbial Technology 11:405-410.

Ruckmanl A, Rajendran A (2001) Production of cellulase poor xylanase by an alkali tolerant strain of *Aspergillus flavus*. Indian J Microbiol 41:115-118

## S

Samuels GJ, Chaverri P. (2003). *Hypocrea/Trichoderma* (ascomycota, hypocreales, hypocreaceae): species with green ascospores. Stud. Mycol 48: 1-116.

Samuels GJ. (1996). *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. Mycological Research 100(8): 923-935.

Samuels GJ. (2005). Changes in taxonomy, occurrence of the sexual stage and ecology of *Trichoderma* sp. Phytopathology 96: 195-206.

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.

Sandoval-Denis M, Sutton D A, Cano-Lira JF, Gené J, Fothergill AW, Wiederhold N P, Guarro J. (2014). Phylogeny of the clinically relevant species of the emerging fungus *Trichoderma* and their antifungal susceptibilities. Journal of clinical microbiology 52(6): 2112-2125.

Sandoval-Vega MC, Noeltling-Zenobio MCI (2012). Producción de conidios de *Trichoderma harzianum* Rifai en dos medios de multiplicación. Fitosanidad, 15(4), 215-221.

Sarbu, A., De Pinho, M. N., do Rosário Freixo, M., Goncalves, F., & Udrea, I. (2006). New method for the covalent immobilization of a xylanase by radical grafting of acrylamide on cellulose acetate membranes. Enzyme and microbial technology, 39(1), 125-130.

Sapag A, Wouters J, Lambert C, de Ioannes P, Eyzaguirre J, Depiereux E. (2002). The endoxylanases from family 11: computer analysis of protein sequences reveals important structural and phylogenetic relationships. Journal of Biotechnology 95: 109-131

Saparrat M, Martínez M, Cabello M, Arambarri A (2002). Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. Revista Iberoamericana de Micología. 19: 181-185.

Sarkanen KV, Ludwig CH. (1971). Lignins: occurrence, formation, structure and reactions. Lignins: occurrence, formation, structure and reactions. Wiley-Interscience.

Seidl V, Seibel C, Kubicek CP, Schmoll M. (2009). Sexual development in the industrial workhorse *Trichoderma reesei*. Proceedings of the National Academy of Sciences 106(33): 13909-13914.

Selig, M., Weiss, N., & Ji, Y. (2008). *Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP): Issue Date, 3/21/2008*. National

Renewable Energy Laboratory.

Seyis I, Aksoz N. (2005). Effect of carbon and nitrogen sources on xylanase production by *Trichoderma harzianum* 1073 D3. *International biodeterioration & biodegradation*, 55(2): 115-119.

Shah AR, Madamwar D (2005) Xylanase production by a newly isolated *A. foetidus* strain and its characterization. *Process Biochem* 40:763-777

Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology advances*, 19(8), 627-662.

Sharma, V., & Salwal, R. (2017). Molecular Markers and Their Use in Taxonomic Characterization of *Trichoderma* spp. In *Molecular Markers in Mycology* (pp. 37-52). Springer International Publishing.

Shin CS, Lee JP, Lee JS, Park SC. (2000). Enzyme production of *Trichoderma reesei* Rut C-30 on various lignocellulosic substrates. In *Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 237-245). Humana Press.

Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2016). Biological pretreatment of lignocellulosic biomass—An overview. *Bioresource technology*, 199, 76-82.-

Sörensen H. (1955). Xylanase in the soil and the rumen. *Nature*, 176(4471), 74-74.

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.

Spahn, C., & Minter, S. D. (2008). Enzyme immobilization in biotechnology. *Recent patents on engineering*, 2(3), 195-200.

Stern DI. (2006). Reversal of the trend in global anthropogenic sulfur emissions. *Global Environ Change* 16 (2): 207-220.

Subramanian, A., Kennel, S. J., Oden, P. I., Jacobson, K. B., Woodward, J., & Doktycz, M. J. (1999). Comparison of techniques for enzyme immobilization on silicon supports. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(1), 26-34.

Rezende, M. I., Barbosa, A. D. M., Vasconcelos, A. F. D., & Endo, A. S. (2002). Xylanase production by *Trichoderma harzianum* rifai by solid state fermentation on sugarcane bagasse. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(1), 67-72.

Subramaniyan S, Prema P. (2002). Biotechnological of microbial xylanases: enzymology, molecular biology and application. *Critical Reviews in Biotechnology* 22(1):33-46.

Sudan R, Bajaj BK (2007) Production and biochemical characterization of xylanase from an alkali-tolerant novel species *Aspergillus niveus* RS2. *World J Microbiol Biotechnol* 23:491-500.

Sunna A, Antranikian G. (1997). Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical reviews in biotechnology* 17(1): 39-67.

## T

Talebnia F, Karakashev D, Angelidaki I. (2010). Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource technology*, 101(13), 4744-4753

Tallapragada P, Venkatesh K (2017). Isolation, identification and optimization of xylanase enzyme produced by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1(4), 137-147.

Teather R, Wood P. (1982). Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rument. *Appl. Environ. Microbiol.* 4(43): p.777-780.

Tenkanen M, Puls J, Poutanen K. (1992). Two major xylanases of *Trichoderma reesei*. *Enzyme and Microbial Technology*. 14(7): 566-574.

Thomas, L., Parameswaran, B., & Pandey, A. (2016). Hydrolysis of pretreated rice straw by an enzyme cocktail comprising acidic xylanase from *Aspergillus sp.* for bioethanol production. *Renewable Energy*, 98, 9-15.

Thompson NS. (1983). Hemicellulose as a biomass resource. In: Wood and agricultural residues. J. Soltes, ed. Academic Press. pp 101-119.

Torronen A, Rouvinen J. (1997). "Structural and functional properties of low molecular weight endo-1,4-p-xylanases". *Journal of Biotechnology* 57: 137-149.

Tisch, D., Pomraning, K. R., Collett, J. R., Freitag, M., Baker, S. E., Chen, C. L. & Stappeler, E. (2017). Omics analyses of *Trichoderma reesei* CBS999.97 and QM6a indicate a relevance of female fertility for CAZyme and transporter levels. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM-01578.

## V

Verma M, Brar SK, Tyagi RD, Surampalli RY, Valero JR. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma sp.*: panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* 37(1): 1-20.

Větrovský, T., Kolařík, M., Žifčáková, L., Zelenka, T., & Baldrian, P. (2016). The *rpb2* gene represents a viable alternative molecular marker for the analysis of environmental fungal communities. *Molecular ecology resources*, 16(2), 388-401.

Viikari, L., Kantelinen, A., Sundquist, J., & Linko, M. (1994). Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. *FEMS Microbiology Reviews*, 13(2-3), 335-350.

Vilches A & Pérez DG. (2013). La transición energética y la Ciencia de la Sostenibilidad. *Current Trends in Energy and Sustainability*, 171.

Visser EM, Falkoski DL, Almeida MN, Maitan-Alfenas GP, Guimarães VM (2013). Production and application of an enzyme blend from *Chrysosporthe cubensis* and *Penicillium pinophilum* with potential for hydrolysis of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology* 144: 587-594.

## W

Weining, S., & Langridge, P. (1991). Identification and mapping of polymorphisms in cereals based on the polymerase chain reaction. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 82(2), 209-216.

Wilkie KCB. (1979). The hemicelluloses of grasses and cereals. *Adv. Carb. Chem. Biochem* 36: 215-264.

Wong K, Tan L, Saddler J. (1988). Multiplicity of  $\beta$ -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*

## X

Xu Y, Li Y, Xu S, Liu Y, Wang X, Tang J (2008). Improvement of xylanase production by *Aspergillus niger* XY-1 using response surface methodology for optimizing the medium composition. *Journal of Zhejiang University Science B*:558-566.