

UNIVERSIDAD MILITAR NUEVA GRANADA

Facultad de Ciencias

Maestría en Biología Aplicada

**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA *IN VITRO* DE CONSORCIOS DE HONGOS
PROVENIENTES DE SUELO DEL BOSQUE ALTO ANDINO Y TUSAS DE PALMA DE ACEITE (*Eleaeis
guinensis* Jacq) EN DESCOMPOSICION SOBRE DOS SUSTRATOS: TUSA Y CELULOSA MICROCRISTALINA**

Luz Aida Moya Alvarez

Tesis de Maestría

Directora:

**Esperanza Torres Rojas
Laboratorio de Agrobiotecnología
Universidad Nacional de Colombia**

**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA *IN VITRO* DE CONSORCIOS DE HONGOS
PROVENIENTES DE SUELO DEL BOSQUE ALTO ANDINO Y TUSAS DE PALMA DE ACEITE (*Eleaeis
guinensis* Jacq) EN DESCOMPOSICION SOBRE DOS SUSTRATOS: TUSA Y CELULOSA MICROCRISTALINA**

Luz Aida Moya Alvarez

Tesis de Maestría

**Maestría en Biología Aplicada
Facultad de Ciencias
Universidad Militar Nueva Granada
Bogotá, D. C. 2011**

**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA *IN VITRO* DE CONSORCIOS DE HONGOS
PROVENIENTES DE SUELO DEL BOSQUE ALTO ANDINO Y TUSAS DE PALMA DE ACEITE (*Eleaeis
guinensis* Jacq.) EN DESCOMPOSICION SOBRE DOS SUSTRATOS: TUSA Y CELULOSA
MICROCRISTALINA**

RESUMEN

La celulosa es el polímero más abundante en la naturaleza y en la actualidad una fuente de energía promisoría. Su transformación biológica es posible gracias a la acción de microorganismos capaces de producir diferentes tipos de celulasas. Dentro de las actividades del Centro Colombiano de Genómica y Bioinformática de Ambientes Extremos, GeBix que tiene como uno de sus objetivos explorar la biodiversidad de microorganismos con potencialidad celulolítica del suelo del bosque alto andino del Parque Nacional Natural de los Nevados, se aislaron microorganismos productores de celulasas, siendo los hongos los que reportaron mayor actividad específicamente los pertenecientes al género *Penicillium* (cepas B7, B11, B11M y B19) en sustratos artificiales. En este estudio se utilizaron dichas cepas junto con nuevos aislamientos de hongos obtenidos a partir de tusas de palma en descomposición de los Llanos Orientales de Colombia (cepas TA1 y TA2) con la finalidad de determinar cualitativa y cuantitativamente la actividad celulolítica sobre la tusa como sustrato de interés agroindustrial. La tusa es un subproducto sólido generado a partir de la producción de aceite de palma (*Eleaeis guinensis* Jacq.) de lenta descomposición y causante de problemas ambientales. Se determinaron curvas de proteínas totales y de actividad endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa, entre las 60 y las 300 horas de incubación a 28°C con agitación y se determinó la capacidad celulolítica de consorcios de hongos co-cultivados, así como el antagonismo *in vitro* entre las cepas de estos consorcios. También, se evaluó la actividad hidrolítica de celulosa y tusa de a partir de los consorcios establecidos al mezclar los sobrenadantes producidos por las cepas individualmente. Se usó un modelo factorial con fuente de carbono (celulosa y tusa) como factor principal y cepa (seis) como factor secundario. Se llevó a cabo un análisis de varianza de las variables evaluadas y se hizo una comparación de medias con el programa estadístico SAS. Los resultados mostraron diferencias altamente significativas en la actividad celulolítica de las cepas en los sustratos evaluados, siendo la celulosa microcristalina el sustrato que indujo la mayor actividad enzimática y la cepa B19 la que tuvo la mayor actividad endoglucanasa y exoglucanasa. Por otro lado, el co-cultivo de las cepas de hongos en estudio no favoreció la actividad endoglucanasa ni exoglucanasa, lo cual está de acuerdo con el resultado obtenido en las pruebas de antagonismo en placa, las cuales mostraron interbloqueo entre las cepas. En contraste, la hidrólisis de la tusa fue favorecida por los consorcios de sobrenadantes de B11B19, B11MB19 y TA1B19, los cuales alcanzaron aumentos de más del 400% en comparación con la hidrólisis obtenida por los sobrenadantes de cada cepa cultivada individualmente (entre 53 y 86%). Lo anterior muestra que el uso de consorcios de sobrenadantes producidos por los microorganismos cultivados individualmente tiene un alto potencial para degradar tusas de palma. De esta forma se pretende contribuir a la reducción en el tiempo de descomposición de las tusas y disminuir la fuente de problemas ambientales y sanitarios.

Palabras clave: Celulasa, endoglucanasa, exoglucanasa, β -glucosidasa, co-cultivo, consorcios, hidrólisis, tusa, celulosa.

DETERMINATION OF CELLULOLYTIC CAPACITY *IN VITRO* FROM FUNGAL CONSORTIA OBTAINED FROM COLOMBIAN HIGH YEAN FOREST AND DECOMPOSING OIL PALM (*Eleaeis guinensis* Jacq) EMPTY FRUIT BUNCHES ON TWO SUBSTRATES: MICROCRYSTALLINE CELLULOSE AND EMPTY FRUIT BUNCHES

Luz Aida Moya Alvarez

ABSTRACT

Cellulose is the most abundant polymer in nature and currently is used as a promising energy source. Their biological transformation is made possible by the action of microorganisms able to produce different types of cellulases. One of the goals of the Colombian Center for Genomics y Bioinformatics of Extreme Environments, GeBix, is to explore soil microorganisms, from high Andean forest at the National Park Los Nevados, with high cellulolytic activity. For that, it was isolated different microorganisms and the fungi, specially the genus *Penicillium*, showed the highest cellulolytic activities (strains B7, B11, B11M and B19) using different artificial media culture. In this study, these strains and new fungus isolation (TA1 and TA2), obtained from decaying palm empty fruit bunches (EFB) of oil palm (*Eleaeis guinensis* Jacq) plantations, were used in order to determine qualitatively and quantitatively the cellulolytic activity using two substrates: EFB and microcrystalline cellulose. The agroindustrial substrate, EFB, is a byproduct of palm oil production that presents a slow degradation rate causing serious environmental problems. Curves of total protein, endoglucanase, exoglucanase and β -glucosidase activity were determine from 60 to 300 hours of incubation at 28°C under shaking. The cellulolytic activities from consortia of co-cultured fungi were also determined as well as *in vitro* antagonism between consortium strains. In addition, the hydrolytic activity of the consortia established by mixing the supernatants of each strain was evaluated. A factorial model was used, using carbon source as main factor (cellulose and EFB) and strains (six) as a secondary factor and the results were analyzed using the statistical program SAS. The data showed highly significant differences on cellulolytic activity between strains and media culture used. The microcrystalline cellulose induced the highest enzyme activity in all the strains compared to the EFB and with respect to enzyme activity, the highest endoglucanase and exoglucanase activity were detected with the B19 strain. On the other hand, the co-culture of fungal strains did not increase the endoglucanase or exoglucanase activity, which agrees with the results obtained on the antagonism test plate. In contrast, the results showed that the EFB hydrolysis was improved up to 400%, using the supernatants consortia B11B19, TA1B19, and B11MB19, compared to the hydrolysis obtained by the supernatants of each strain growing individually (from 53 to 86%). These results showed a high potential of the supernatants consortia to degrade EFB contributing to the reduction on their time decomposition and the environmental and health problems.

Keywords: Cellulase, endoglucanase, exoglucanase, β -glucosidase, co-culture, consortia, hidrolisis, empty fruit bunch, oil palm, celullose.

AGRADECIMIENTOS

A Esperanza Torres Rojas por darme la oportunidad y la alegría de desarrollar este trabajo, por su apoyo y acertados comentarios.

A todo el personal del Laboratorio de Agrobiotecnología de la Universidad Nacional. A Manuela Avellaneda quien me introdujo en el tema de las enzimas y compartió sus valiosas experiencias en el tema. A Martha Serrano, por su apoyo y enseñanzas sobre biología molecular y la colaboración en la identificación de los microorganismos. A Rosa Mejía por su colaboración permanente y pertinentes comentarios sobre los procedimientos de laboratorio y por su invaluable amistad. A Nelson Rojas por compartirme sus experiencias en el tema. A Pilar Sánchez por su colaboración en la ejecución de los PCR. A Nelson Vega por su apoyo.

A Edgar Benítez por sus oportunos aportes en el enfoque del análisis estadístico.

Al personal del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional por su colaboración y la oportunidad en el préstamo de equipos para las determinaciones enzimáticas.

Al Centro Colombiano de Genómica y Bioinformática de Ambientes Extremos (GeBiX) por la financiación del proyecto.

A Mauricio Romero y Tania Galindo de CENIPALMA por el apoyo y colaboración para la consecución de las muestras de tusa.

A la Universidad Militar Nueva Granada que con la Maestría en Biología Aplicada contribuye a abrir nuevos horizontes.

A Jesús Alberto García por su apoyo y sus valiosas y oportunas sugerencias y comentarios para la consecución y desarrollo de esta investigación, siempre.

A José y a Gabriel, a Emma, Miguel Angel, Henry y a Constanza, mi soporte.

Dedico este trabajo a Dios, quien cada minuto se manifiesta en mi vida a través de quienes me rodean y me permite el logro de objetivos y el alcance de sueños.

A Jesús Alberto, Gabriel Alberto y José Fernando con quienes, descubro cada día la alegría de vivir y a Emma de Moya por su amor, sus oraciones y su confianza, siempre motivantes.

A mi querido papá q.e.p.d.

**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA *IN VITRO* DE CONSORCIOS DE HONGOS
PROVENIENTES DE SUELO DEL BOSQUE ALTO ANDINO Y TUSAS DE PALMA DE ACEITE (*Eleaeis
guinensis* Jacq) EN DESCOMPOSICION SOBRE DOS SUSTRATOS: TUSA Y CELULOSA MICROCRISTALINA**

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	MARCO TEÓRICO.....	2
2.1	Celulosa.....	2
2.2	Celulasas.....	4
2.3	Modo de acción de las celulasas a través de consorcios.....	7
2.4	Co-cultivo de hongos celulolíticos.....	9
2.5	Clasificación e identificación morfológica y molecular de los hongos filamentosos.....	11
2.6	La tusa de palma como sustrato rico en celulosa.....	11
3	JUSTIFICACIÓN.....	13
4	OBJETIVOS.....	14
4.1	Objetivo General:.....	14
4.2	Objetivos Específicos.....	15
5	MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
5.1	Caracterización del crecimiento y actividad celulolítica <i>in vitro</i> de aislamientos de hongos provenientes de suelo de un transepto de bosque alto-andino y de tusas de palma de aceite en descomposición.....	16
5.1.1	Cepas de hongos.....	16
5.1.2	Preparación del medio de cultivo.....	20
5.1.3	crecimiento de las cepas de hongos.....	21
5.1.4	Determinación de actividad endoglucanasa y exoglucanasa.....	22
5.1.5	Determinación de actividad β -glucosidasa.....	22
5.2	Determinación del efecto del co-cultivo de hongos provenientes de suelo de un transepto de bosque alto-andino sobre la capacidad celulolítica en celulosa y tusa de palma de aceite.....	23
5.3	Determinación de la capacidad celulolítica <i>in vitro</i> , en celulosa y tusa de palma de aceite, de consorcios de sobrenadantes producidos por hongos cultivados individualmente.....	24

5.4	Análisis estadístico	24
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
6.1	Caracterización del crecimiento y actividad celulolítica <i>in vitro</i> de aislamientos de hongos provenientes de suelo de un transecto de bosque alto-andino en celulosa y tusa de palma de aceite	25
6.1.1	Identificación de los aislamientos Provenientes de tusa de palma	25
6.1.2	Curvas de crecimiento	27
6.1.3	Curvas de actividad endoglucanasa	28
6.1.4	Curvas de actividad exoglucanasa	34
6.1.5	Curvas de actividad β -glucosidasa	36
6.2	Determinación del efecto del co-cultivo de hongos provenientes de suelo de un transecto de bosque alto-andino sobre la capacidad celulolítica en celulosa y tusa de palma de aceite	40
6.3	Determinación de la capacidad celulolítica <i>in vitro</i> , en celulosa y tusa de palma de aceite, de consorcios de enzimas producidas por hongos cultivados individualmente	49
7	CONCLUSIONES	57
8	RECOMENDACIONES	59
9	BIBLIOGRAFÍA	60
10	ANEXOS	66

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. GRUPOS DE ALGUNOS MICROORGANISMOS CELULOLÍTICOS REPORTADOS BAJO DIFERENTES CONDICIONES. FUENTE: HTTP://WWW.ENZYMEINDIA.COM /ENZYMES/CELLULASE-SPANISH.ASP	5
TABLA 2. ACTIVIDAD CELULOLÍTICA ESPECÍFICA DE LAS CEPAS PROVENIENTES DEL PNNN INCLUIDAS EN EL PRESENTE ESTUDIO.	17
TABLA 4. COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE HIDRÓLISIS DE CELULOSA Y TUSA DEL SOBRENADANTE DE B19, RESPECTO A CONSORCIOS DE SOBRENADANTES. HIDRÓLISIS POR 2 HORAS EN BUFFER ACETATO A 45°C EN AGITACIÓN A 175 R.P.M. CADA VALOR CORRESPONDE AL PROMEDIO DE TRES REPETICIONES.	53
TABLA 5. EVALUACIÓN DE LA POTENCIACIÓN DE B19 SOBRE LA ACCIÓN HIDROLÍTICA DE LOS SOBRENADANTES DE CINCO CEPAS DE HONGOS VS. ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA Y RELACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA INDIVIDUAL Y DE LOS CONSORCIOS.	54
TABLA 6. GRADO DE SINERGIA DE LOS CONSORCIOS EVALUADOS, CORRESPONDIENTE A LA ACTIVIDAD DE LA MEZCLA / SUMATORIA DE LA ACTIVIDAD INDIVIDUAL OBSERVADA CADA MEDIDA CORRESPONDE AL PROMEDIO DE TRES REPETICIONES.	55

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURA DE LA CELULOSA. DOS UNIDADES DE UNA CADENA DE CELULOSA: LOS RESIDUOS DE D-GLUCOSA ESTÁN EN UNIÓN B1-4 LAS ESTRUCTURAS RÍGIDAS DE LA CADENA PUEDES ROTAR UNA RESPECTO A LA OTRA. (B) DIBUJO A ESCALA DE DOS CADENAS PARALELAS DE CELULOSA, QUE MUESTRAN LA CONFORMACIÓN DE LOS RESIDUOS DE D-GLUCOSA Y EL ENLACE CRUZADO DE HIDRÓGENO. EN LA UNIDAD DE HEXOSA, ABAJO IZQUIERDA, TODOS LOS ÁTOMOS DE HIDRÓGENO SON MOSTRADOS. EN LAS OTRAS TRES UNIDADES DE HEXOSA, LOS HIDRÓGENOS UNIDOS A CARBONOS SON OMITIDOS PARA ACLARAR CÓMO ESTOS NO PARTICIPAN EN EL ENLACE DE HIDRÓGENO. TOMADO DE (LEHNINGER, NELSON Y COX 2008).....	4
FIGURA 2. MECANISMO PROPUESTO PARA LA DEGRADACIÓN DE LA CELULOSA POR CELULASAS NO COMPLEJADAS. (L. LYND, Y OTROS 2002)	6
FIGURA 3. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA DEGRADACIÓN DE CELULOSA POR UN COMPLEJO DE ENZIMAS PRODUCIDAS POR <i>CELULLOMONAS FIMMI</i> . LAS LÍNEAS SÓLIDAS CORRESPONDEN A CELULOSA CRISTALINA. LÍNEAS EN ZIGZAG A CELULOSA AMORFA. CEN6A ES UNA ENDOGLUCANASA QUE NO PERMANECE ADHERIDA AL SUBSTRATO Y CON ALTA AFINIDAD POR LA CELULOSA AMORFA. CEL5A ES UNA CELULASA QUE PERMANECE ADHERIDA AL SUSTRATO Y CAUSA DEPOLIMERIZACIÓN DE LAS REGIONES AMORFAS. CEL 6B ES UNA EXOGLUCANASA QUE ATACA LA CELULOSA POR EL EXTREMO NO REDUCTOR. CEL 48A ES UNA EXOGLUCANASA QUE DECRISTALIZA LA CELULOSA DESDE EL EXTREMO REDUCTOR DEL POLÍMERO DE LA CELULOSA. (MANSFIELD Y MEDER 2003)	7
FIGURA 4. PROCESO DE AISLAMIENTO DE HONGOS CELULOLÍTICOS A PARTIR DE TUSA DE PALMA DE ACEITE, CRECIMIENTO EN CMC, PRUEBA DE IODINA Y ASPECTO DE LA CONSERVACIÓN DE CEPAS.	26
FIGURA 5. MORFOLOGÍA DE COLONIA DE LAS CEPAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO Y MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA (400X) DE LOS AISLAMIENTOS DE HONGOS OBTENIDOS A PARTIR DE TUSA.....	26
FIGURA 6. ELECTROFORESIS DEL ADN EXTRAÍDO DEL AISLAMIENTO DE LOS AISLAMIENTOS Y SUS PRODUCTOS DE AMPLIFICACION. (A) ADN AISLADO DE TA2 Y ADN Λ A 50, 100 Y 150 NG/ μ L. (B) PRODUCTOS DE PCR DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS DE ADN AISLADO DE TA1 Y TA2 CON LOS PRIMERS ITS1 E ITS4.....	27
FIGURA 7. CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y CULTIVO DE LAS CEPAS. (A) PRECULTIVO EN MEDIO SÓLIDO CON CMC COMO FUENTE DE CARBONO. (B) INCUBACIÓN A 28°C Y 130 R.P.M. (C) CULTIVO EN MEDIO CON CELULOSA Y TUSA. (D) CRECIMIENTO EN TUSA, (E) CRECIMIENTO EN CELULOSA Y (F) POOL DE SOBRENADANTES.	28
FIGURA 8. CURVAS DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE HONGOS TA1, TA2, B11M, B19, B11 Y B7 CON TUSA Y CELULOSA COMO ÚNICA FUENTE DE CARBONO. CADA PUNTO DE LA CURVA ES EL PROMEDIO OBTENIDO A PARTIR DE TRES REPETICIONES.	28
FIGURA 9. ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA (UI/ML) Y ENDOGLUCANASA ESPECÍFICA (UI/MG PROTEÍNA) DE LAS CEPAS DE HONGOS EN ESTUDIO A LAS 300 HORAS DE CULTIVO EN MEDIO CON CELULOSA COMO FUENTE DE CARBONO. CADA PUNTO CORRESPONDE AL PROMEDIO DE TRES REPETICIONES.	30

FIGURA 10. PRODUCCIÓN DE ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA (UI/ML) Y ENDOGLUCANASA ESPECÍFICA (UI/MG DE PROTEÍNA) Y MÁXIMOS DE ACTIVIDAD (UI/ML) EN DOS ETAPAS DE CRECIMIENTO DE SIETE CEPAS DE HONGOS. E1 CORRESPONDE AL PROMEDIO DE LAS LECTURAS OBTENIDAS A LAS 60, 156 Y 204 HORAS. E2 AL PROMEDIO DE LAS OBTENIDAS A LAS 252 Y 300 HORAS. CELULOSA: BARRA AZUL, TUSA: BARRA TERRACOTA. CADA LECTURA CORRESPONDE AL PROMEDIO DE TRES REPETICIONES.	33
FIGURA 11. CURVAS DE ACTIVIDAD EXOGLUCANASA (A) Y (B) Y EXOGLUCANASA ESPECÍFICA (C) Y (D) DE LAS CEPAS DE HONGOS EN ESTUDIO, CON CELULOSA Y TUSA COMO FUENTES DE CARBONO, RESPECTIVAMENTE. CADA PUNTO DE LA CURVA ES EL PROMEDIO DE TRES REPETICIONES.	35
FIGURA 12. PRODUCCIÓN DE ACTIVIDAD EXOGLUCANASA (UI/ML) Y EXOGLUCANASA ESPECÍFICA (UI/MG DE PROTEÍNA), Y MÁXIMOS DE ACTIVIDAD (UI/ML) Y DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA (UI/MG DE PROTEÍNA) EN DOS ETAPAS DE CRECIMIENTO DE SIETE CEPAS DE HONGOS. E1 CORRESPONDE AL PROMEDIO DE LAS LECTURAS OBTENIDAS A LAS 60, 156 Y 204 HORAS. E2 AL PROMEDIO DE LAS OBTENIDAS A LAS 252 Y 300 HORAS. CELULOSA: BARRA AZUL, TUSA: BARRA TERRACOTA. CADA BARRA CORRESPONDE AL PROMEDIO DE TRES REPETICIONES.....	36
FIGURA 13. CURVAS DE ACTIVIDAD B-GLUCOSIDASA (UI/ML) Y DE ACTIVIDAD B-GLUCOSIDASA ESPECÍFICA (UI/ML) DE LAS CEPAS DE HONGOS EN ESTUDIO CON (A) CELULOSA Y TUSA (B) COMO FUENTE DE CARBONO. CADA PUNTO CORRESPONDE AL PROMEDIO DE TRES REPETICIONES.	38
FIGURA 14. PRODUCCIÓN DE ACTIVIDAD B-GLUCOSIDASA (UI/ML) Y B-GLUCOSIDASA ESPECÍFICA (UI/MG DE PROTEÍNA) Y MÁXIMOS DE ACTIVIDAD EN DOS ETAPAS DE CRECIMIENTO DE SIETE CEPAS DE HONGOS. E1 CORRESPONDE AL PROMEDIO DE LAS LECTURAS OBTENIDAS A LAS 60, 156 Y 204 HORAS. E2 AL PROMEDIO DE LAS OBTENIDAS A LAS 252 Y 300 HORAS. CELULOSA: BARRA AZUL, TUSA: BARRA TERRACOTA. CADA BARRA CORRESPONDE AL PROMEDIO DE TRES REPETICIONES.	39
FIGURA 15. PROTEÍNAS PRODUCIDAS POR CONSORCIOS DE HONGOS CO-CULTIVADAS 300 HORAS EN MEDIOS CON CELULOSA Y TUSA COMO FUENTES DE CARBONO. CADA BARRA ES EL PROMEDIO DE TRES REPETICIONES. LETRAS DIFERENTES INDICAN DIFERENCIAS EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LOS SUSTRATOS EVALUADOS. **: DIFERENCIAS ALTAMENTE SIGNIFICATIVAS. *: DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS.	41
FIGURA 16. . ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA Y ENDOGLUCANASA ESPECÍFICA PRODUCIDA POR CONSORCIOS DE HONGOS CO-CULTIVADOS DURANTE 300 HORAS EN MEDIOS CON CELULOSA Y TUSA COMO FUENTES DE CARBONO. CADA BARRA ES EL PROMEDIO DE TRES REPETICIONES. LETRAS DIFERENTES INDICAN DIFERENCIAS EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LOS SUSTRATOS EVALUADOS. **: DIFERENCIAS ALTAMENTE SIGNIFICATIVAS. *: DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS. .	42
FIGURA 17. ACTIVIDAD EXOGLUCANASA (UI/ML) Y EXOGLUCANASA ESPECÍFICA (UI/MG PROTEÍNA) DE CEPAS INDIVIDUALES Y CONSORCIOS DE LAS CEPAS DE HONGOS B19, B11, B11M, B7, TA1, TA2 Y <i>T. HARZIANUM</i> EN MEDIO CON CELULOSA Y TUSA. CADA BARRA ES EL PROMEDIO DE TRES REPETICIONES. LETRAS DIFERENTES INDICAN DIFERENCIAS EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN	

LOS SUSTRATOS EVALUADOS. **: DIFERENCIAS ALTAMENTE SIGNIFICATIVAS. *: DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS.	43
FIGURA 18. ACTIVIDAD B-GLUCOSIDASA (UI/ML) Y B-GLUCOSIDASA ESPECÍFICA (UI/MG PROTEÍNA) DE CEPAS INDIVIDUALES Y CONSORCIOS DE LAS CEPAS DE HONGOS B19, B11, B11M, B7, TA1, TA2 Y <i>T. HARZIANUM</i> (TH) EN MEDIO CON CELULOSA Y TUSA. CADA BARRA ES EL PROMEDIO DE TRES REPETICIONES. LETRAS DIFERENTES INDICAN DIFERENCIAS EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LOS SUSTRATOS EVALUADOS. **: DIFERENCIAS ALTAMENTE SIGNIFICATIVAS. *: DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS.	46
FIGURA 19. (A) ASPECTO DEL ANTAGONISMO EN PLACA ENTRE LAS CEPAS DE HONGOS FILAMENTOSOS B7, B11, B11M, B19, TA1 Y TA2. (B) ÍNDICE DE BIOCONTROL DE LA CEPA B19 CON LAS CEPAS B11, B11M, TA1 Y TA2 EN MEDIO PDA. LA BARRA AZUL MUESTRA EL DESARROLLO DE LA PRIMERA CEPA DEL CONSORCIO. LA BARRA VERDE, MUESTRA EL CRECIMIENTO DE B19. SE PRESENTA SOLO UN CONSORCIO DE TRES CEPAS, DONDE LA TERCERA CEPA ES REPRESENTADA POR LA BARRA AMARILLA. CADA BARRA CORRESPONDE AL PROMEDIO DE TRES REPETICIONES.	47
FIGURA 20. ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA Y EXOGLUCANASA DE LOS SOBRENADANTES UTILIZADOS PARA LA HIDRÓLISIS. CEPAS DE BOSQUE ALTOANDINO: B19, B7, B11 Y B11M. CEPAS AISLADAS DE TUSA: TA1 Y TA2. TH: <i>T. HARZIANUM</i> . CADA BARRA CORRESPONDE AL PROMEDIO DE TRES REPETICIONES. CEPAS C LETRAS DIFERENTES INDICAN DIFERENCIAS EN LA ACTIVIDAD	50
FIGURA 21. HIDRÓLISIS DE CELULOSA Y TUSA PRODUCIDA POR SOBRENADANTES DE CONSORCIOS DE ENZIMAS CON DIFERENTE ACTIVIDAD. CADA BARRA CORRESPONDE AL PROMEDIO DE TRES REPETICIONES. CEPAS DE BOSQUE ALTOANDINO: B19, B7, B11 Y B11M. CEPAS AISLADAS DE TUSA: TA1 Y TA2. TH: <i>T. HARZIANUM</i> . LETRAS DIFERENTES INDICAN DIFERENCIAS EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LOS SUSTRATOS EVALUADOS.	51
FIGURA 22. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS SOBRENADANTES UTILIZADOS PARA EL EXPERIMENTO DE HIDRÓLISIS. CADA BARRA CORRESPONDE AL PROMEDIO DE TRES REPETICIONES. CEPAS DE BOSQUE ALTOANDINO: B19, B7, B11 Y B11M. CEPAS AISLADAS DE TUSA: TA1 Y TA2. TH: <i>T. HARZIANUM</i> . LETRAS DIFERENTES INDICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LOS SUSTRATOS EVALUADOS.	51
FIGURA 23. HIDRÓLISIS DE CELULOSA Y TUSA PRODUCIDA POR SOBRENADANTES DE CONSORCIOS DE ENZIMAS ACTIVIDAD HOMOGÉNEA. CADA BARRA CORRESPONDE AL PROMEDIO DE TRES REPETICIONES. CEPAS DE BOSQUE ALTOANDINO: B19, B7, B11 Y B11M. CEPAS AISLADAS DE TUSA: TA1 Y TA2. TH: <i>T. HARZIANUM</i> . LETRAS DIFERENTES INDICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS. NS: NO HAY DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS.	52

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. SECUENCIAS CEPA TA1 ITS-1	66
ANEXO 2. SECUENCIAS CEPA TA2 ITS-1	67
ANEXO 3. CURVA PATRÓN DE ALBÚMINA SÉRICA BOVINO (BSA) UTILIZADA PARA LA DETERMINACIÓN DE CURVAS DE CRECIMIENTO Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.	68
ANEXO 4. CURVAS PATRÓN P-NITROFENOL Y GLUCOSA UTILIZADAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD (A) ENDOGLUCANASA , EXOGLUCANASA Y (B) B-GLUCOSIDASA. CADA PUNTO CORRESPONDE AL PROMEDIO DE TRES REPETICIONES.....	68
ANEXO 5. ANÁLISIS DE VARIANZA DE ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA EN DOS ETAPAS E1 Y E2. ENDO: ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA; X_ENDO: PROMEDIO ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA; CEP: CEPA; SUS: SUSTRATO; CEP_SUS: INTERACCIÓN CEPA SUSTRATO; ENDOE: ENDOGLUCANASA ESPECÍFICA.	69
ANEXO 6. ANÁLISIS DE VARIANZA DE ACTIVIDAD EXOGLUCANASA EN DOS ETAPAS E1 Y E2. ENDO: ACTIVIDAD EXOGLUCANASA; X_ENDO: PROMEDIO ACTIVIDAD EXOGLUCANASA; CEP: CEPA; SUS: SUSTRATO; CEP_SUS: INTERACCIÓN CEPA SUSTRATO; EXOE: EXOGLUCANASA ESPECÍFICA.	70
ANEXO 7. ANÁLISIS DE VARIANZA DE ACTIVIDAD B-GLUCOSIDASA EN DOS ETAPAS E1 Y E2. BETA: ACTIVIDAD B-GLUCOSIDASA; X_BETA: PROMEDIO ACTIVIDAD B-GLUCOSIDASA; CEP: CEPA; SUS: SUSTRATO; CEP_SUS: INTERACCIÓN CEPA SUSTRATO; BETAE: E B-GLUCOSIDASA ESPECÍFICA. ...	71
ANEXO 8. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS Y LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN CO-CULTIVO	72
ANEXO 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL EFECTO DE CONSORCIOS DE ENZIMAS CON DIFERENTE ACTIVIDAD SOBRE LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA.....	75
ANEXO 10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL EFECTO DE CONSORCIOS DE ENZIMAS CON ACTIVIDAD SIMILAR SOBRE LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA.	75

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA *IN VITRO* DE CONSORCIOS DE HONGOS PROVENIENTES DE SUELO DE BOSQUE ALTO ANDINO Y TUSAS DE PALMA DE ACEITE (*ELEAEIS GUINENSIS* JACQ.) EN DESCOMPOSICIÓN SOBRE DOS SUSTRATOS

1 INTRODUCCIÓN

La celulosa es el principal constituyente de la biomasa y en términos de producción anual, uno de los polímeros más importantes sobre la tierra. Sin embargo, su degradación es difícil debido a la estructura misma de la celulosa y a su asociación con otros polímeros como la lignina y la hemicelulosa (O'Sullivan 1997, Lynd 2002, Mansfield y Meder, 2003). En Colombia la agroindustria de la palma de aceite genera grandes volúmenes de biomasa, entre las cuales la tusa es el principal residuo sólido producto de la extracción de aceite a partir de los racimos de frutos frescos cosechados. Así, en 2008 se disponía de alrededor de 496.225 ton de tusa (García, Cárdenas y Yáñez 2009) y su uso como acondicionador del suelo no es muy atractivo debido al alto costo del transporte en campo y a su difícil degradación.

Una alternativa para el aprovechamiento de la tusa, que genera valor agregado a la cadena de producción, es la transformación de la celulosa a azúcares más simples, los cuales pueden ser fermentados para producir alcohol (Alam, y otros 2009). Dicha transformación se inicia con la hidrólisis de la celulosa mediante el uso de métodos químicos o biológicos. Los métodos químicos implican el uso de ácidos o bases fuertes en grandes cantidades que de ser liberados al ambiente causarían una gran contaminación ambiental. En contraste, los métodos biológicos ofrecen una alternativa al usar microorganismos capaces de producir celulasas las cuales son enzimas que hidrolizan la celulosa hasta obtener moléculas más simples como la glucosa. Se han reportado microorganismos con actividad celulítica "in vitro" sobre tusa como los hongos *Aspergillus niger* (Prasertsan y otros, 1997), *Trichoderma reesei* (Rodríguez y Piñeros, 2007), *Chaetomium* spp. (Umikalsom, y otros 1997). Sin embargo, es necesario identificar nuevos microorganismos con altos niveles de actividad celulolítica en Colombia.

Como una estrategia para explorar la biodiversidad de microorganismos con potencial celulolítico, procedentes de ambientes extremos, se aislaron bacterias, actinomicetes y hongos filamentosos a partir de suelos de bosque alto andino del Parque Natural Nacional de los Nevados. Esto en el marco del proyecto “Caracterización de Recursos Genéticos de Ambientes Extremos” del Centro Colombiano de Genómica y Bioinformática de Ambientes Extremos, GeBix (Avellaneda, y otros 2009). Los ambientes extremos albergan microorganismos que han sobrevivido a diversos factores como a temperaturas muy fluctuantes, bajo cero en las horas de la madrugada hasta 27°C durante el día, a alta radiación solar y alta presión atmosférica. Estos factores podrían influir sobre la presencia de sistemas enzimáticos particulares cuya única forma de evaluación es el enfrentamiento directo con sustratos de interés, como es el caso de las tusas de palma de aceite. Adicionalmente, se aislaron y evaluaron dos cepas de hongos filamentosos a partir de tusas en descomposición las cuales por estar adaptadas al sustrato podrían mostrar un mayor potencial.

El presente estudio tiene la finalidad de determinar la actividad celulolítica “in vitro” de las cepas aisladas sobre un sustrato natural, tusas de palma de aceite (*Eleaeis guinensis*) y un sustrato artificial, celulosa microcristalina. Para ello, se evaluó la actividad enzimática a partir de consorcios de las cepas en estudio y se determinó la hidrólisis de tusa y celulosa microcristalina producida por consorcios de sobrenadantes de cultivos de los hongos, con el fin de determinar la presencia de sinergismo enzimático.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 CELULOSA

La biomasa contribuye con alrededor del 12% del suministro de energía mundial, mientras que en muchos países en desarrollo sus rangos de contribución están entre el 40 y el 50% (E. Iliopoulou y otros, 2007). La celulosa es el mayor componente de la biomasa vegetal y la base del ciclo del carbono sobre la tierra. Su utilización por los microorganismos ocasiona el mayor flujo de materiales a la biosfera y es de gran interés en relación con la transformación y el

movimiento del carbono a escala global. A pesar de las grandes diferencias en composición y estructura anatómica de las plantas, su contenido está en el rango de 35 a 50% del peso seco de la planta (Lynd, y otros 2002). Aunque se han reportado numerosos ejemplos del potencial biotecnológico de materiales de desecho agroindustrial como el bagazo de caña de azúcar, restos de cosecha de cultivos de maíz, las tusas de palma de aceite y malezas acuáticas, gran parte del potencial de los residuos agroindustriales en la actualidad es subutilizado.

La celulosa es un homopolisacárido ramificado que consta entre 10.000 y 15.000 unidades de D-glucosa, cuya configuración se observa en la figura 1. Los residuos de glucosa están unidos por enlaces glicosídicos β 1-4, los cuales le dan una estructura y características físicas particulares (Lehninger, Nelson y Cox 2008). Su estructura y su forma y grado de cristalinidad depende del origen y de los métodos de aislamiento. En la naturaleza está organizada en unidades denominadas protofibrillas constituidas por aproximadamente 30 moléculas individuales de celulosa, empaquetadas en unidades más grandes llamadas microfibrillas, ensambladas a su vez en fibras de celulosa. Las microfibrillas corresponden al ensamble apretado de varias docenas de cadenas unidas entre sí por débiles puentes de hidrógeno, tanto a lado y lado como arriba y abajo en forma de red, lo que le confiere gran resistencia. Independientemente de su orientación, las cadenas están unidas por puentes de hidrógeno intracadena e intercadena, que forman hojas, las cuales se unen unas a otras por fuerzas de Van der Waals, constituyendo la Celulosa I, la más abundante en la naturaleza (Pizzi y Eaton. 1985). La imposibilidad de que el agua penetre la celulosa explica por qué la celulosa cristalina es insoluble. En la celulosa existen dos tipos de puentes de hidrógeno: los que se forman entre los grupos C3 OH y el oxígeno del anillo piranosa dentro de la misma molécula y los formados entre el grupo C6 OH de una molécula y el oxígeno del enlace glicosídico de otra molécula. La modificación en la estructura de las fibras ha sido observada por microscopía de fuerza atómica y de barrido (Ariffin y otros, 2008).

La celulosa microcristalina (Avicel y Sigmacel) es celulosa cuya región amorfa ha sido hidrolizada dejando únicamente microfibrillas cristalinas, ya que el tratamiento con ácido diluido remueve la hemicelulosa y las regiones amorfas de las fibras de celulosa. Esta celulosa es obtenida a partir de la fibra del algodón. Es descrita por el fabricante como de alta pureza

y recomendada para ser usada en cromatografía de partición. Tienen un tamaño de partícula de 20µm y un pH de 5-7 (11wt. %) (Sigma-Aldrich s.f.).

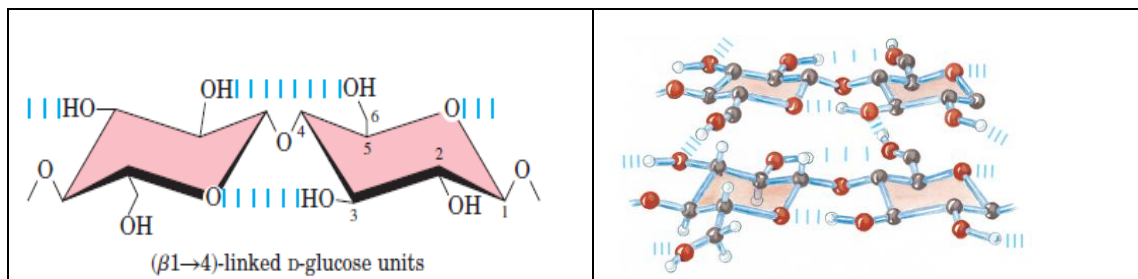


Figura 1. Estructura de la celulosa. Dos unidades de una cadena de celulosa: los residuos de D-glucosa están en unión β 1-4. Las estructuras rígidas de la cadena pueden rotar una respecto a la otra. (b) Dibujo a escala de dos cadenas paralelas de celulosa, que muestran la conformación de los residuos de D-glucosa y el enlace cruzado de hidrógeno. En la unidad de hexosa, abajo izquierda, todos los átomos de hidrógeno son mostrados. En las otras tres unidades de hexosa, los hidrógenos unidos a carbonos son omitidos para aclarar cómo estos no participan en el enlace de hidrógeno. Tomado de (Lehninger, Nelson y Cox 2008)

2.2 CELULASAS

La conversión biológica de la biomasa celulósica ocurre a través de la hidrólisis, química o biológica. Esta última es generada por enzimas, celulasas, producidas por microorganismos de gran diversidad y desempeñan un papel importante en la biosfera en el reciclaje de este polímero. La hidrólisis enzimática ofrece un gran potencial, teniendo en cuenta los altos rendimientos, alta selectividad, bajo costo de energía y condiciones de manejo más suaves que en los procesos químicos (Yang, y otros 2011). Dentro de los organismos celulolíticos se encuentran bacterias, actinomicetos y hongos, tanto aeróbicos como anaeróbicos, mesófilos o termófilos. Cada grupo de microorganismos de acuerdo con sus características fisiológicas se adapta a algunos materiales en particular y es necesario determinar, de acuerdo con las características de la biomasa, las especies más adecuadas para su manejo.

Entre las especies de hongos más reportadas (tabla 1) se incluyen los ascomicetos (ej, *T. reesei* y *Aspergillus niger*), los basidiomicetos que incluyen los hongos de la pudrición blanca (ej. *Panaerochete chrysosporium*) y los hongos de la pudrición café (e.g. *Fomitopsis palustris*) y algunos especies anaeróbicas como *Orpinomyces* sp. que degradan celulosa en el tracto gastrointestinal de los rumiantes.

Tabla 1. Grupos de algunos microorganismos celulolíticos reportados bajo diferentes condiciones. Fuente: <http://www.enzymeindia.com/enzymes/cellulase-spanish.asp>.

GRUPO	ESPECIES
Hongos aeróbicos	<i>Trichoderma viride</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Penicillium pinophilum</i> , <i>Sporotrichum pulverulentum</i> , <i>Fusarium solanum</i> , <i>Talaromyces emersonii</i> y <i>Trichoderma koninguii</i> .
Hongos aeróbicos termófilos	<i>Sporotrichum thermophile</i> , <i>Thermoascus aurantiacus</i> y <i>humicola insolens</i> .
Hongos anaeróbicos mesofílicos	<i>Neocalimastix frontalis</i> , <i>Piromonas communis</i> , <i>Sphaeromonas communis</i> .
Bacterias aeróbicas mesofílicas y termófilas	<i>Cellulomonas</i> sp., <i>Cellvibrio</i> sp., <i>Microbispora bispora</i> , <i>Thermomonospora</i> sp.
Bacterias anaeróbicas mesofílicas y termófilas	<i>Acetivibrio cellulolyticus</i> , <i>Bacteroides succinogenes</i> , <i>Ruminococcus albus</i> , <i>Ruminococcus flavefasciens</i> , <i>Clostridium thermocellum</i> .

Modos de Acción de las enzimas celulolíticas: Existen diferencias en la acción celulolítica de los microorganismos aeróbicos y anaeróbicos. En general, los anaerobios degradan la celulosa vía sistemas complejos de celulasas localizados en policelulosomas, o en la superficie celular y en muchos casos requieren la adhesión a la celulosa (Schwarz 2001). Los degradadores aeróbicos, bacterias y hongos, también utilizan sistemas complejos de celulasas que son secretados al exterior y por lo tanto, son recuperables de los sobrenadantes de los cultivos (Duncan, Farrell, y otros 2006). Las enzimas pueden formar complejos en la superficie de las hifas en crecimiento como ocurre en *Trichoderma reesei* (L. Lynd, y otros 2002). Este hongo filamentoso es uno de los más estudiados y se caracteriza por su efectividad en la degradación de la celulosa tanto nativa como cristalina (Alam y otros, 2005; Lubertozzi y Keasling, 2009; Kumar y Singh 2001; Duncan, Farrell, y otros l., 2006).

Los hongos filamentosos, pueden penetrar los sustratos celulósicos a través de extensiones hifales, además de producir celulasas libres que no forman grandes complejos estables de alto peso molecular y por tanto se denominan sistemas no complejados los cuales se presentan en la siguiente figura. Estos sistemas no son simples aglomeraciones de los tres tipos de enzimas sino que actúan en forma coordinada para hidrolizar eficientemente la celulosa (L. Lynd, y otros 2002). Los tres tipos de enzimas celulolíticas identificadas son las endoglucanasas, las exoglucanasas y las β -glucosidasas o celobiasas, las cuales pueden actuar en forma sinérgica en la degradación de la celulosa. La **endoglucanasa**, carboximetilcelulasa (CMCasa), o 1,4- β -D-glucan-4-glucanohidrolasa (EC 3.2.1.4, de acuerdo con la base de datos relacional integrada de enzimas (IntEnz) de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB), rompe los enlaces internos β -1,4 alterando la estructura cristalina de la celulosa y expone las cadenas polisacáridas de celulosa a la acción de la **exoglucanasa**,

celobiohidrolasas, 1,4- β -D-glucanohidrolasa o celodextrinasa (EC 3.2.1.74), la cual produce tetrasacáridos o disacáridos como la celobiosa. Finalmente, la **β -glucosidasa**, celobiasa o β -D-glucósido glucohidrolasa (EC 3.2.1.21), la cual hidroliza la celobiosa para obtener monosacáridos individuales de glucosa (L. Lynd, y otros 2002).

La celulosa amorfa permite la penetración de la endoglucanasa y en la celulosa cristalina el empaquetamiento es tal que solo los puentes de hidrógeno de los bordes pueden ser alcanzados por las enzimas de tipo exoglucanasa. La consecuencia natural de esta diferencia en la estructura cristalina es que la tasa de hidrólisis es mucho mayor para la celulosa amorfa que para la cristalina (N. Wang s.f.). Normalmente los enlaces glicosídicos β -1,4 no son muy difíciles de romper. Sin embargo, por estos puentes de hidrógeno la celulosa puede formar cristales tan estrechamente empacados, que ni el agua ni las enzimas pueden penetrarlos. Solamente la exoglucanasa, que ataca los enlaces glicosídicos terminales, es efectiva para degradarla (Lynd, y otros 2002). Se han reportado otras formas de clasificación de las celulasas en familias dependiendo de su función, estructura tridimensional o secuencia de aminoácidos (Yang, y otros 2011; Henrissat y Davies 2011).

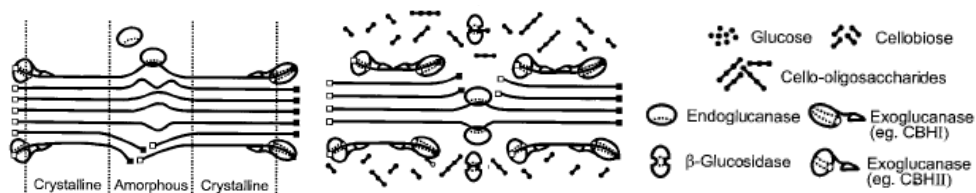


Figura 2. Mecanismo propuesto para la degradación de la celulosa por celulasas no complejadas. (L. Lynd, y otros 2002)

Se ha reportado que algunas celulasas pueden ser inducidas por sustratos. Es el caso de la síntesis de exoglucanasa en *A. niger* la cual puede ser inducida por celobiosa, celodextrina, celulosa o sustratos que contengan celulosa y hemicelulosa. Este hongo requiere una concentración limitante de carbono, nitrógeno o fósforo para la producción de celobiohidrolasas o FPase (enzima degradadora de papel de filtro, por sus siglas en inglés). La adición de actinomicina (represor de transcripción) y cicloheximida, (represor de traducción) reprimió la síntesis de celobiohidrolasas o FPase lo que sugiere que la regulación de síntesis de CBH en este organismo ocurre tanto a nivel transcripcional como de traduccional (Hanif, Yasmeen y Rajoka 2004).

2.3 MODO DE ACCIÓN DE LAS CELULASAS A TRAVÉS DE CONSORCIOS

Los consorcios de enzimas pueden conformarse por enzimas generadas a partir de uno o diferentes microorganismos. Se ha descrito el sinergismo de diferente tipo de celulasas, el cual depende de varios factores, entre los que se encuentran: la naturaleza del sustrato, la composición de las enzimas y su concentración, la afinidad del sustrato por la celulasa, la estereoespecificidad de los componentes y la proporción entre el sustrato y la enzima (Yang, y otros 2011). Mansfield y Meder (2003) describen un modelo de acción para las celulasas producidas por un mismo microorganismo, *Cellulomonas fimmii*, que es similar al encontrado en hongos aeróbicos filamentosos como *T. reesei* (figura 3). Según los autores mencionados, en la bacteria *C. fimmii* se han detectado diferentes isoenzimas con efectos sinérgicos durante la sacarificación de la celulosa. Por ejemplo, las endoglucanasas Cel5A y Cel6A, poseen patrones de acción diferentes. La primera es más activa en la depolimerización de la celulosa y libera más oligosacáridos que la Cel6A pero ambas aumentan la cristalinidad de la celulosa. Cel5A libera más azúcares solubles (celobiosa y celotriosa) y altera significativamente la distribución del peso molecular, mientras que Cel6A tiene un efecto limitado en el tamaño de polímero y libera primariamente celobiosa y glucosa. Adicionalmente, las dos endoglucanasas aumentan ligeramente la cristalinidad de la celulosa. En contraste, las celobiohidrolasas Cel6B y Cel48A, no afectan el peso molecular y liberan únicamente celobiosa o celotriosa. Sin embargo, se ha mostrado que Cel48A es efectiva en la reducción de la cristalinidad de la celulosa, mientras que Cel6B aumenta el índice de cristalinidad.

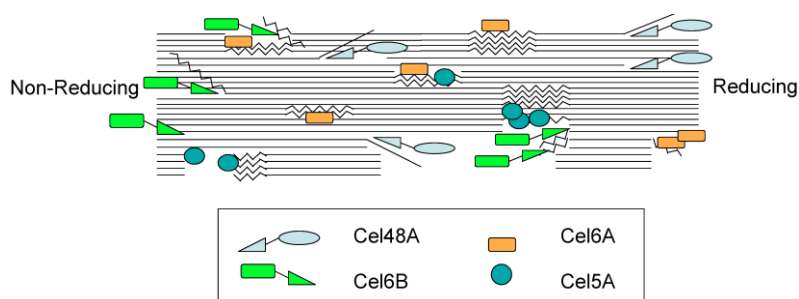


Figura 3. Representación esquemática de la degradación de celulosa por un complejo de enzimas producidas por *Cellulomonas fimmii*. Las líneas sólidas corresponden a celulosa cristalina. Líneas en zigzag a celulosa amorfa. Cel6A es una endoglucanasa que no permanece adherida al sustrato y con alta afinidad por la celulosa amorfa. Cel5A es una celulasa que permanece adherida al sustrato y causa depolimerización de las regiones amorfas. Cel 6B es una exoglucanasa que ataca la celulosa por el extremo no reductor. Cel 48A es una exoglucanasa que decristaliza la celulosa desde el extremo reductor del polímero de la celulosa. (Mansfield y Meder 2003)

Así mismo, *T. reesei*, secreta dos exoglucanasas extracelulares (CBHI y CBHII) capaces de hidrolizar los enlaces glicosídicos, particularmente en la superficie cristalina, y formar celobiosa (dímero β -1,4 glucosídico) como mayor producto de la celulosa. Las dos CBHs hidrolizan la celulosa cristalina de los extremos de la cadena y tienen una organización similar en forma de dos dominios. El dominio de unión a la celulosa (CBD, Cellulose binding domain, por sus siglas en inglés), clasificado como módulo de unión a la celulosa Familia 1 contribuye a la adsorción al sustrato insoluble y el dominio hidrolizante (CD), que cataliza el rompimiento de las uniones glicosídicas. Las dos celobiohidrolasas tienen diferentes tipos de pliegues. El CD de CBHI pertenece a la familia 7 glicosido hidrolasa (GH), conocida como la enzima TrCel7A y la CD de la CBHII pertenece a las GH familia 6 (Servidor Enzima-Carbohidrato-Activa (CAZy, por sus siglas en inglés) llamada TrCel16A. En ambas hidrolasas, los aminoácidos catalíticos se localizan en un túnel relativamente largo, formado por loops superficiales que se extienden del pliegue central del CD. El reconocimiento de la cadena envuelve el residuo W40 de triptófano a la entrada del túnel en el sitio activo (Yang, y otros 2011).

Se han reportado varias formas de sinergismo en la hidrólisis de la celulosa que incluyen: endoglucanasas con exoglucanasas, exoglucanasas con exoglucanasas, endoglucanasas con endoglucanasas, exoglucanasas o endoglucanasas con β -glucosidasas así como entre dominios catalíticos y dominios de reconocimiento. Al igual que sinergismo entre celulosa-enzima-microorganismo y sinergismo espacial por complejos de celulasa (i.e., el celulosoma de *C. thermocellum*). Este sinergismo depende de fuentes de las celulasa o aún de características del sustrato. Por ejemplo el sinergismo del dominio catalítico y el módulo de reconocimiento fue reportado para la enzima CenA de *C. fimi* sobre fibras de algodón y no en celulosa microcristalina. El sinergismo endo–endo solo ha sido reportado en los hongos *Gloeophyllum sepiarium* y *Gloeophyllum trabeum* (Yang, y otros 2011).

En la actualidad las enzimas comerciales tienen en cuenta la acción sinérgica de las enzimas para aumentar su efectividad. Así el coctel de celulasa comercial Celluclast 1.5L (Novozymes) derivado de *T. reesei* está constituido principalmente por celobiohidrolasas y endoglucanasas (700 Unidades de glucanasa por gramo, EGU/g) correspondientes a EGII (Cel 5A) y EGIII (Cel 12A) (F1), EGII y CBHII (Cel 6A) (F2), CBHII y EGI (Cel 7B) (F3), EGI (F4), y CBHI (Cel 7A) (F5) (Zandoná Filho, Siika-Aho y Ramos 2006). Debido al bajo nivel de β -glucosidasa (Jørgensen, y

otros 2005), este sistema comúnmente es suplementado con esta enzima para evitar la inhibición por acumulación de celobiosa, lo cual podría enmascarar los requerimientos mínimos de celulasa a niveles mayores (Kovacs, y otros 2009). Se ha reportado que el sinergismo entre las celulasas disminuye a altas concentraciones de celulosa (alrededor de niveles de saturación). Por lo tanto, para evitar el exceso de enzimas y tomar la mayor ventaja del sinergismo entre celulasas, se requiere que la suplementación de β -glucosidasa esté de acuerdo con la concentración de celulosa del sustrato para una hidrólisis eficiente de varios sustratos lignocelulósicos (Jørgensen, y otros 2005).

2.4 CO-CULTIVO DE HONGOS CELULOLÍTICOS

La producción de diferentes tipos de metabolitos a partir de microorganismos ha tenido varias estrategias. Aunque recientemente algunas bioindustrias han concentrado sus esfuerzos en sistemas dominados por un solo tipo de microorganismos para la producción exitosa de muchas sustancias útiles como amino ácidos, nucleótidos, antibióticos, y enzimas muchos procesos comerciales como la elaboración de la cerveza, tratamiento de efluentes, líquidos que procedan de una planta industrial, y la manufactura de lácteos y productos fermentados convencionales requieren de la acción de múltiples especies microbianas. La mezcla de estas especies es en general la regla en los sistemas naturales, donde las poblaciones microbianas interactúan unas con otras (Taniguchi y Tanaka 2004). De acuerdo con Stoilova, Gargova y Krastanov (2005), el co-cultivo de microorganismos puede aumentar la producción de ácido acético, el contenido de vitaminas en alimentos fermentados, y la producción de enzimas. Estos autores han reportado que, dependiendo de las condiciones de cultivo utilizadas, el co-cultivo de *Thermoascus aurantiacus* y *A. niger* se aumenta la actividad lacasa, celulasa, α -amilasa y glucosamilasa en comparación con las concentraciones obtenidas individualmente por cada especie. Por otro lado, Gutiérrez-Correa y Tengerdy (1997), demuestran que el co-cultivo de hongos permite aumentar la producción de enzimas con poco aumento en su biomasa celular, lo cual indica que las interacciones sinérgicas no están relacionadas con el aumento de crecimiento de biomasa.

De acuerdo con Dashtban, Schraft y Qin (2009), el co-cultivo de hongos celulolíticos ofrece un medio para mejorar la hidrólisis de residuos lignocelulósicos y también aumenta la utilización del producto, ya que minimiza el uso de otras enzimas para el proceso de bioconversión. En algunos casos, algunas cepas de hongos actúan más eficientemente sobre residuos celulósicos, mientras que otros producen más enzimas hemicelulolíticas, las cuales hidrolizan porciones hemicelulósicas. De acuerdo con los mismos autores, la mezcla de cultivos de hongos proporciona ventajas en comparación con los monocultivos ya que permiten aumentar la productividad, la adaptabilidad y el uso del sustrato. Se ha reportado mejoramiento en la actividad celulolítica con el co-cultivo de *T. reesei* y *A. niger* (Ahamed y Vermette 2008), *T. reesei* RUT-C30 y *A. phoenicis* (Wen, Liao y Chen 2005) o *A. ellipticus* y *A. fumigatus* *T. reesei* D1-6 y *A. wentii* Pt 2804 o *T. reesei* LM-UC4 y *A. phoenicis* QM329 en bagazo tratado con amonio, donde se reportan aumentos tanto la actividad celulasa como hemicelulasa (Dashtban, Schraft y Qin 2009).

Este aumento de la actividad correspondería a una relación de sinergismo, no obligatoria, que provee actividades nuevas o aceleradas a las poblaciones microbianas. Estas poblaciones actúan juntas, permitiendo a los microorganismos combinar sus actividades metabólicas para la transformación de sustratos, las cuales no podrían ocurrir con poblaciones individuales (Taniguchi y Tanaka, 2004). En el caso de la degradación de la celulosa, los tres componentes enzimáticos, endoglucanasas (EG), celobiohidrolasas (CBH) y β -glucosidasas tienen que estar presentes en grandes concentraciones. Ninguna de las cepas, incluyendo los mejores mutantes, es capaz de producir altas concentraciones de los tres tipos de enzimas al mismo tiempo. Por ejemplo, *T. reesei* produce CBHs y EGs en altas cantidades, pero la actividad β -glucosidasa es baja a diferencia de *A. niger* que produce más β -glucosidasa pero la EG es limitada (Dashtban, Schraft y Qin 2009).

Las interacciones entre los hongos en cultivos mezclados han sido estudiados por oposición directa de cultivos miceliales en medio sólido y fueron clasificados inicialmente por Porter (1924) quien fue referenciado por Molla, Abd-Aziz y Hanafi (2001), como: (1) entremezcla mutua, (2) (Stoilova, Gargova y Krastanov 2005) entremezcla parcial mutua, (3) etapa temprana de invasión y reemplazo, (4) etapa tardía de invasión y reemplazo, (5) inhibición o punto muerto en el punto de toque y (6) inhibición o punto muerto a distancia.

2.5 CLASIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LOS HONGOS FILAMENTOSOS

La taxonomía de los hongos busca descubrir y clasificar todas las especies de hongos, y brindar una herramienta para su identificación. Los métodos tradicionales de identificación de hongos incluyen microscopía, cultivo o detección de antígenos; sin embargo estos métodos consumen mucho tiempo, tienen bajo grado de sensibilidad, son difíciles de estandarizar y no son específicos (ZHAO, y otros 2001). Ha surgido entonces una nueva metodología en los últimos años a través del trabajo en ecología molecular de hongos. Así, última década se descubren alrededor de 1200 especies nuevas de hongos anualmente, al tiempo que se aumenta el número de unidades taxonómicas moleculares operacionales. No existe una sola base de datos centralizada que compile la información de los nuevos grupos (HIBBETT, y otros 2011). Una de los elementos usados actualmente en la taxonomía de los hongos corresponde a las secuencias espaciadoras internas (ITS) del RNA ribosomal tanto para muestras ambientales mixtas como para micelio de especies cultivadas y fue propuesto como el marcador oficial primario para hongos (Deliberación de 37 micólogos de 12 países en Smithsonian's Conservation and Research Centre, Front Royal, Virginia, May 2007). Hay más de 100.000 secuencias fúngicas de ITS generadas por secuenciamiento Sanger y depositadas en el International Nucleotide Sequence Databases y en otras bases de datos, con lo cual se tiene un material de referencia suficiente para la identificación de taxones fúngicos (Bellemain, y otros 2010). Se ha demostrado que los ITS1 e ITS4 amplifican adecuadamente las especies evaluadas (Manter y Vivanco 2007) (ZHAO, y otros 2001).

2.6 LA TUSA DE PALMA COMO SUSTRATO RICO EN CELULOSA

En Colombia, la agroindustria de la palma de aceite presenta una oportunidad en el uso de la biomasa. Las principales fuentes de biomasa generados en una planta procesadora de aceite son: racimos vacíos (tusas), fibra, cuesco, y efluentes líquidos, entre otros. Una sola planta extractora de aceite de palma de 60 ton de racimos de fruta fresca/año tendría disponibles alrededor de 54.000 toneladas de tusa/año (García-Núñez, García-Pérez y Das 2008), con contenidos de celulosa y hemicelulosa del 47 y 21%, respectivamente y con 41% de carbono, 0,87% de nitrógeno y 0,09% de azufre (J. García 1993). Con una humedad del 65%,

correspondientes a 8.050 ton de materia seca y alrededor de 47% de celulosa, serían aprovechables alrededor de 3.760 ton de celulosa por planta de beneficio de aceite/año. Debido al proceso de esterilización con calor y temperatura al que son sometidos los racimos para la extracción del aceite, tanto los microorganismos como las enzimas que intervienen en su descomposición natural son desnaturalizados aumentando el tiempo de descomposición y la proliferación de insectos que ocasionan además de problemas sanitarios, un impacto ambiental severo (Atlas, 2002 y Prasertan 1996) .

La composición química de la tusa afecta su descomposición, ya que en general los tejidos de las plantas difieren con respecto a su organización. Algunos tipos de células como el mesófilo, tienen paredes delgadas, poco lignificadas, que pueden ser degradadas fácilmente por enzimas hidrolíticas de polisacáridos. Otras, como el esclerénquima, tienen lamelas gruesas y altamente lignificadas que separan las células entre sí. Estas deben ser atacadas desde la superficie interna hacia afuera, como sería el caso de la tusa de palma, en contraste con la celulosa pura que es degradada de afuera hacia adentro a través de la pared secundaria (Alam, y otros 2009). Así, además de la dificultad ocasionada por la estructura de la celulosa misma, hay limitaciones adicionales por la difusión y el transporte del agente celulolítico al sitio de ataque, las cuales limitan su uso en algunos hábitats (Alam, y otros 2009). La descomposición de la tusa es aún más lenta debido a que la extracción del aceite se realiza a alta presión y temperatura por lo tanto ocurre un proceso de esterilización y la degradación natural solo se inicia después de ser recolonizado por microorganismos del ambiente.

Se han realizado evaluaciones de la utilización de tusa de palma para la producción de etanol mediante la fermentación usando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* de los azúcares obtenidos después de la hidrólisis con ácido sulfúrico. Los resultados mostraron que la energía obtenible es de alrededor de 1.32×10^{17} Joules, alrededor del 20% de los requerimientos de energía del sector de transporte en Malasia en 2000, potencial que podría ser mayor si se unen los residuos que contienen xilosa (Yeoh y Lim 2000).

3 JUSTIFICACIÓN.

Los microorganismos celulolíticos cumplen una función importante en el proceso de degradación de material vegetal el cual está constituido principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina (L. Lynd, y otros 2002). La capacidad de degradar celulosa está ampliamente distribuída en las bacterias, actinomicetes y hongos. Entre los hongos de mayor producción de celulasas se encuentran *T. reesei*, varias especies de *Penicillium* y de *Aspergillus*, cuya actividad ha sido evaluada en diferentes sustratos como tamo de trigo, bagazo de caña (Guevara y Zambrano 2006) y tusa de palma de aceite (Rodríguez y Piñeros 2007). Las evaluaciones se han realizado tanto *in vitro* como en biorreactores bajo condiciones controladas y además se ha reportado que la actividad celulolítica aumenta por la acción sinérgica de microorganismos (Lynd, y otros 2002; Ahamed y Vermette 2008) y por la acción directa de consorcios de enzimas (Andersen, y otros 2008). Sin embargo, la eficiencia de los procesos de degradación es, en muchos casos, baja y bioenergéticamente costosa (L. Lynd, y otros 2002) lo que hace necesario continuar con estudios de bioprospección que permitan identificar y caracterizar microorganismos con potencial celulolítico para ser utilizados en la degradación de residuos vegetales de interés agroindustrial.

Los ambientes extremos son hábitats únicos donde es posible que existan especies de microorganismos con recursos genéticos novedosos, adaptados a condiciones muy particulares. Dichas especies constituyen una fuente de generación de metabolitos secundarios y enzimas con capacidades metabólicas diversas, y podrían funcionar en amplios rangos de temperaturas y pH, lo cual los podría hacer aprovechables a través de procesos biotecnológicos (Herbert 1992). Es posible que en los suelos de Bosque Alto Andino del PNNN existan microorganismos con capacidades metabólicas, aún desconocidas, pero potencialmente útiles en una amplia gama de procesos ambientales o industriales. El *Centro Colombiano de Genómica y Bioinformática de Ambientes Extremos* (GeBix) inició la colecta de microorganismos de diferentes ecosistemas del PNNN con la finalidad de determinar la factibilidad de su utilización en procesos biotecnológicos como la degradación de celulosa (GEBIX 2010). Para ello, fueron colectadas muestras de suelo de Bosque Alto Andino y se obtuvieron 118 aislamientos de microorganismos aeróbicos celulolíticos que incluían

bacterias, actinomicetes y hongos (Avellaneda, y otros 2009). Sin embargo, estos microorganismos no han sido evaluados en sustratos naturales y de interés agroindustrial como la tusa de palma de aceite.

Para este estudio se seleccionó tusa como sustrato natural para ser transformado por los microorganismos mencionados, ya que se genera en grandes volúmenes que alcanzan un estimado de 496.225 ton/año en el país (García, Cárdenas y Yáñez 2009) equivalente a 151.596 ton/año de celulosa que podría ser utilizada para la generación de glucosa u otros compuestos de interés comercial. La tusa en general es desaprovechada por la dificultad para su descomposición y es fuente de problemas ambientales, a pesar de presentar características que le permitirían convertirse en un sustrato para el desarrollo y aplicación de tecnologías (Lynd 2002).

Entre las posibilidades de uso de la tusa de palma, se encuentran el compostaje en campo (Suhaimi y Ong 1998-2007), el uso como aditivo al polvo de coco para cultivar hortalizas (Ismail, y otros 2004), para el cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Tabi, Zakil y Fauzan 2008), y para generación de bioaceites a través de la pirólisis (Misson, y otros 2009). Por otro lado, estudios realizados por Yeoh y Lim (2000) mostraron el potencial de uso de los desechos lignocelulósicos de palma de aceite para la producción de etanol después de ser hidrolizados químicamente. A pesar de que las diversas iniciativas alrededor, aún se requiere mayor investigación para su uso masivo, los cuales además de contribuir a la generación de valor agregado en la cadena de producción de aceite de palma, contribuirían a la reducción de un problema ambiental, para el cual aún no se tienen soluciones .

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL:

Determinar la capacidad celulolítica *in vitro* de consorcios de hongos provenientes de un transepto de bosque alto andino del Parque Natural Nacional de Los Nevados y de tusas de palma de aceite en descomposición sobre dos sustratos: tusa y celulosa microcristalina.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar el crecimiento y actividad celulolítica *in vitro* de aislamientos de hongos provenientes de suelo de un transecto de bosque alto-andino y de tusas de palma de aceite en descomposición.

Determinar el efecto del co-cultivo de los hongos seleccionados sobre la actividad celulolítica en un sustrato natural, tusa de palma de aceite, y un sustrato artificial, celulosa microcristalina.

Determinar la capacidad de hidrólisis de tusa y celulosa, *in vitro*, por consorcios de enzimas obtenidos a partir de la mezcla de los sobrenadantes producidas por hongos cultivados individualmente

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO Y ACTIVIDAD CELULOLÍTICA *IN VITRO* DE AISLAMIENTOS DE HONGOS PROVENIENTES DE SUELO DE UN TRANSEPTO DE BOSQUE ALTO-ANDINO Y DE TUSAS DE PALMA DE ACEITE EN DESCOMPOSICIÓN.

5.1.1 CEPAS DE HONGOS.

Las cepas de los hongos empleadas en este estudio se obtuvieron a partir de muestreos de suelo de un transepto de Bosque Alto Andino del Parque Natural Nacional de Los Nevados, PNNN y de tusa de palma de aceite en descomposición.

5.1.1.1 CEPAS DE HONGOS PROVENIENTES DE SUELO DE UN TRANSEPTO DE BOSQUE ALTO ANDINO DEL PNNN.

Con base en estudios realizados en el marco del proyecto de Caracterización de Recursos Genéticos en Ambientes Extremos sobre el aislamiento y caracterización de microorganismos con potencial celulolítico se seleccionaron cuatro (4) cepas de hongos que presentaron las mayores actividades endoglucanasa, exoglucanasa y β -glicosidasa. A continuación se presenta la fuente de las muestras de las cuales se originaron los aislamientos de hongos seleccionados. En general fueron muestras compuestas asociadas a diferentes especies vegetales como se describe a continuación (Avellaneda, y otros 2009):

- B7, muestra de Superpáramo, Valle de las Tumbas asociado a suelo procedente de cenizas volcánicas.
- B11 de suelo de bosque altoandino asociado a *Chusquea fendlerii*, varias especies de musgo, helechos del genero *Pteris*, *Gunnera brefogea*, raices de *Gaiadendron punctatum*, *Freziera canescens*, *Tibuchina grossa*, *Vallea stipulari*.
- B11M muestra de suelo de bosque altoandino asociado a materia organica y Musgos de diferentes clases, Helechos (*Asplenium harpeodes*), Labiadas (*Salvia scutelaroides*), Gunera (*Gunera brephogea*), Campano (*Valleaestipulares*), Madera blanda en descomposición.

- B19, muestra de suelo de bosque altoandino asociado a *Chusquea fendlerii*, varias especies de musgo, helechos del genero *Pteris*, *Gunnera brefogea*, raices de *Gaiadendron punctatum*, *Freziera canescens*, *Tibuchina grossa*, *Vallea stipularis*.

De acuerdo con la caracterización realizada previamente (Avellaneda, y otros 2009) estos hongos corresponden a los géneros *Penicillium* spp (Cepas B7, B11M, B19) y *Penicillium thomii* (Cepa B11). Las actividades enzimáticas se registran en la tabla 2. Se incluyó una cepa de *Trichoderma harzianum*, que se denomina Th, obtenida a partir de un producto comercial la cual fue incluida como control positivo de la actividad celulolítica, de acuerdo a reportes de la literatura (Pinheiro D., y otros 2008).

Tabla 2. Actividad celulolítica específica de las cepas provenientes del PNNN incluidas en el presente estudio.

No.	Nombre	Actividad celulasa (UI/mg proteína)			
		Endoglucanasa	Exoglucanasa	Celulasa total	β -glucosidasa
B7	<i>Penicillium</i> spp.	0,3869	0,4496	0,2812	13,0432
B11	<i>P. thomii</i>	0,5127	0,3401	0,2288	4,4907
B11M	<i>Penicillium</i> spp	0,8945	0,1420	0,0830	15,3229
B19	<i>Penicillium</i> spp	0,0799	2,3162	0,1344	31,0668

5.1.1.2 CEPAS DE HONGOS PROVENIENTES DE TUSA DE PALMA EN DESCOMPOSICIÓN

Los aislamientos fueron obtenidos a partir de un pool de tusas de palma de aceite en diferentes estados de descomposición, de la plantación de la empresa UNIPALMA localizada en Cumaral, Meta, (Latitud 4° 5'54.80"N, longitud 72°57'19.10"O) con el fin de establecer una comparación con la actividad celulolítica de los aislamientos obtenidos del PNNN. El pool es el resultado de mezclar dos muestras compuestas: la primera obtenida a partir de 10 submuestras de aproximadamente 80 g de tusa obtenida 8 días después de ser sacadas de la planta de extracción de aceite. Para ello, en cada sitio se retiraron los primeros 30 cm de tusa y se seleccionó material presente al interior de la pila con ayuda de un palín desinfectado previamente. La segunda muestra fue obtenida a partir de tres puntos seleccionados al azar de una zona de alrededor de una (1) ha donde se ha acumulado material durante 3

meses. Las muestras se mantuvieron en una bolsa sellada bajo refrigeración hasta su uso (tres días después del muestreo).

A partir del pool se tomaron fragmentos de tusa y se maceraron en un mortero estéril, con solución salina 0,85% y tween 80 (1mL/l) y se transfirió a un erlenmeyer estéril donde se completó el volumen a 90 mL con la misma solución. Se llevó a agitación orbital a 130 r.p.m. por 15 min. Con el fin de obtener colonias aisladas, se hicieron diluciones sucesivas en tubos con 9 mL de solución salina y se sembraron alícuotas de 100 µl en placas de agar con medio selectivo para aislamiento de hongos celulolíticos. El medio está compuesto por 0,5 g de KH_2PO_4 , 0.2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g de NH_4NO_3 , 0,02 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2.5 g de extracto de levadura, 10 g de carboximetilcelulosa $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{Na}_8\text{O}_{27}$ (CMC), como única fuente de carbono, y 15 g de agar agar. El pH final del medio fue de 5,0. Después de la esterilización a 121°C y 15 lb de presión por 15 min se adicionó en condiciones asépticas 2.2 mL de una solución de de cloramfenicol (100 p.p.m.) en etanol absoluto. Las placas fueron llevadas a incubación a 25 °C durante 7 días. Las colonias más abundantes fueron separadas y sembradas de nuevo en placas con medio CMC. Se determinó la morfología de colonias y microscópica para la identificación de las cepas. Posteriormente se hicieron repiques de los aislamientos obtenidos en agar PDA para su mantenimiento.

Con el fin de observar la capacidad celulolítica, se realizó la prueba de iodina (Guevara y Zambrano, 2006). Veinte (20) µl de una solución de esporas de los hongos de interés en agua destilada con tween 80, se inoculó en medio sólido que contenía 0.59 g CMC, 0.1g de NaNO_3 , 0.1 K_2HPO_4 , 0.1 KCl, 0.05 MgSO_4 , 0.05 extracto de levadura, 0.1 g de glucosa y 7 g de agar. Las placas fueron llevadas a incubación por 60 horas a temperatura ambiente. Una vez crecidas las colonias se adicionó 5 mL de lugol de Gram por 5 minutos. Al cabo de este tiempo las placas fueron lavadas con agua destilada. Los halos de hidrólisis fueron observados a contraluz y medidos. Como control negativo de la técnica se usó agua destilada estéril.

Mantenimiento de las cepas. Los hongos son mantenidos en tiras de papel Whatman nº 3 a temperatura ambiente en tubos eppendorf. Para su obtención, las tiras de papel se disponen sobre medio PDA y se siembra el inóculo. Después de la esporulación sobre el papel, las tiras se retiran y se transfieren a una caja de petri estéril para ser secadas a 25°C (Jiménez, Comunicación personal).

Preparación del inóculo. Para la siembra se utilizó una modificación de la metodología propuesta por Díaz (2008). Se sembró cada una de las cepas de hongos en placas de PDA, las cuales fueron incubadas hasta la aparición de conidias a 25°C. Seguidamente, se suspendió el contenido de la caja de Petri con la cepa del hongo de trabajo en un tubo Falcon y se hicieron lavados sucesivos con Tween 80 al 1%. Se homogeneizó en vortex y se llevaron a cabo las diluciones adecuadas con el fin de realizar un conteo en la cámara de Newbauer. Para el conteo, se colocarán 10µl de la suspensión en la cámara de Newbauer y se cubrió con una laminilla. El conteo se realizó bajo microscopio de luz, objetivo de 40X, en los cuadrantes adecuados. Se contaron los conidios en 5 cuadros por cuadrante. Las lecturas fueron registradas y el cálculo de la concentración se determinó mediante la siguiente fórmula: $\text{Concentración} = 16 \times 10^4 \times \# \text{ Conidios} \times \text{ID} / 15$, donde: 16×10^4 es el factor de la cámara de Newbauer para 40X. #conidios es el número total de conidios registrados en los 15 cuadrantes. ID es el inverso de la dilución realizada.

5.1.1.2.1 EXTRACCIÓN DE ADN PARA IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS.

La extracción de ADN se realizó a partir de micelio proveniente de cultivos jóvenes de hongos, crecidos en medio sólido con CMC (carboximetilcelulosa sal de sodio, de baja viscosidad, CAS 9004-32-4) al 1%. Se adicionaron 500 µl de buffer de lisis (0,1 M NaCl, Tris-HCl pH: 8,0, 5 % de SDS), un volumen de perlas de vidrio de 0.45 - 0.5 mm equivalente al pellet generado por los hongos y 1 µl de RNAasa. Después de agitar con vortex durante 15 min, el material fue centrifugado a 11000 g por 10min. El sobrenadante fue traspasado a otro tubo eppendorf, donde se adicionó el mismo volumen de Fenol/Cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). La mezcla fue agitada en vortex, centrifugada a 10,000 g por 5 min y el sobrenadante (fase acuosa) transferido a un nuevo tubo eppendorf de 5 mL. Se adicionó el mismo volumen de Cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Después de la agitación se centrifugó a 13000 rpm por 10min. El sobrenadante fue transferido a un nuevo eppendorf y se adicionó el mismo volumen de isopropanol absoluto. Se llevó a agitación y posteriormente a incubación a -20°C durante toda la noche para la precipitación de ácidos nucleicos. En seguida, se llevó a centrifugación a 14000 g por 10 min. El sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido en 500 µl de etanol absoluto 70%. Después de agitación fue centrifugado a 14000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue descartado y se dejó secar a temperatura

ambiente. Finalmente el ADN obtenido fue resuspendido en 50 µl de buffer TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH8).

5.1.1.2.2 AMPLIFICACIÓN DE LOS ITS ADN RIBOSOMAL.

Para la amplificación de los ITS Se preparó la mezcla de reacción constituida por 2,5 µl de Buffer de reacción PCR, MgCl₂ 10X, 1 µl MgCl₂ (50 mM (lote XA8Bla), 6,25 µl de dNTPs (dNTP set 100 mM, grado PCR, Cat 10297-018, lote 302526), 1 mM de deoxinucleótidos trifosfato (dATP, dTTP, dCTP, dGTP-Promega), 6,25 µl de iniciadores ITS1 e ITS4 y 10,25 µl de agua HPLC. Se adicionaron 2,5 µl del ADN extraído previamente y 5 µl de *taq* DNA polimerasa (Recombinante) (Cat 11615-010, lote WHSB1d Brazil). Para un volumen final de 25 µl.

La reacción PCR se realizó en un termociclador con el siguiente programa: denaturación inicial a 96°C por 2 min, luego 35 ciclos de 1 min de denaturación a 95°C, 1 min de anillaje a 55°C y 2 min de extensión a 72 °C. Fue dejado 10 min a 72°C para realizar la extensión final. Los productos de la PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa ultrapura TM (Cat 15510-027, Invitrogen) 1% a 80 voltios en una fuente de poder Power Pac 3000 (Bio Rad) durante 30 minutos. Se usó EZ Vision TMThree, DNA loading buffer, 6X, amresco, para la tinción del ADN. Como marcador se usó Plus DNA Ladder 1 KB (Cat 10787-018 Invitrogen). Se detectaron bandas de 400 pb-600 pb. El ADN amplificado fue secuenciado para su posterior análisis en la base de datos del GenBank en NCBI mediante Basic Local Alignment Search Tool.

5.1.2 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

La preparación del medio de cultivo base contiene modificaciones al medio basal de Mandels y Weber (1969) propuestas por Kumar y Singh, (2001) y Umikalsom y otros, (1997). Su composición es la siguiente: NH₄Cl 0.004 g/L, (NH₄)₂SO₄ 2.1 g/L, KH₂PO₄ 2.0 g/L, CaCl₂ 0.3 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.3 g/L, MnSO₄·5H₂O 0.00156 g/L, ZnSO₄·7H₂O 0.0014 g/L, CoCl₂·6H₂O 0.00266 g/L extracto de levadura 0.25 g/L, ácido succínico 0.01 g/L, celulosa microcristalina en polvo (20 micron) (CAS 90004-34-6jd06, lote 06526CJ, Sigma) 10. g/L. El pH fue ajustado a 5.0 antes de la esterilización.

Como sustrato natural, se utilizó tusa de palma de aceite, proveniente de calderas de esterilización de racimos de una planta extractora. La tusa fue secada en horno a 60 °C y procesada en un molino de martillo a un tamaño de fibra de máximo 10 mm. Posteriormente fue tratada con inmersión en una solución de hidróxido de sodio 0,5M durante 4 horas, lavada con agua para retirar el exceso de álcali y llevada a autoclave por 15 min a 121°C y 15 lb de presión. Luego fue sumergida en una solución de H₂O₂ 0,5% (v/v) por 4 horas y de nuevo lavada con agua corriente (H. Ariffin, y otros 2008). La tusa tratada tenía un contenido de 55.5% de celulosa, 20% de hemicelulosa y 18,2% de lignina (Análisis laboratorio de Nutrición, Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia). Con base en el porcentaje de celulosa obtenido se adicionaron 29 g/L de tusa al medio para éste quedara a una concentración final de 10% de celulosa. Este medio que tenía tusa como única fuente de carbono, se utilizó en todas las evaluaciones de crecimiento y actividad enzimática (Umikalsom y otros, 1997). Para ello se fueron dispensados 10 mL de medio en tubos Falcon de 15 mL por inóculo e incubados a 28 °C en agitación a 130 r.p.m.

5.1.3 CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE HONGOS

Para todas curvas de crecimiento y actividad enzimática se ajustó el inóculo inicial a 2×10^6 conidias /mL en medio CMC 1%. Cada inóculo fue dispensado en tubos Falcon de 15 mL con 5 mL de medio con Celulosa microcristalina o tusa y fueron llevados a incubación a 25°C durante 300 horas para evaluar la actividad de endoglucanasas, exoglucanasa y β -glucosidasa a las 60, 104, 156, 252 y 300 horas de acuerdo a lo reportado por (Hanif, Yasmeen y Rajoka 2004).

La curva de crecimiento se determinó como la curva de proteínas totales medida con el método de Bradford (sigmaaldrich s.f.) (Bradford 1976). Para cada lectura se utilizó 5 mL de cultivo por triplicado (tres tubos) los cuales fueron centrifugados a 5000 r.p.m. por 15 min. El precipitado fue resuspendido en 1 mL de NaOH 1N y llevado a ebullición por 10 min y luego enfriado en baño de hielo. Seguidamente, fue centrifugado a 5000 r.p.m. por 15 min. Se tomaron 100 μ L del sobrenadante y se mezclaron con 100 μ L de NaOH 1N. En placa de ELISA se dispusieron 5 μ L de la solución anterior y se adicionó 250 μ L del reactivo de Bradford. Se mezcló suavemente y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la

absorbancia a 595 nm utilizando como patrón albúmina sérica bovina (BSA 0.1, 0.25, 0.5, 1 y 1.4 mg/mL).

5.1.4 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA Y EXOGLUCANASA

Se determinó la actividad endoglucanasa y exoglucanasa de acuerdo a la metodología reportada por Ghose (1987) con tres repeticiones para cada lectura. Los sobrenadantes fueron almacenados a 4°C hasta la determinación de actividad enzimática. La reacción de evaluación de la degradación de celulosa se realizó utilizando volúmenes máximos de 200 µl en gradillas de un termociclador para ajustar tiempo y temperatura de las diferentes reacciones requeridas. Para la **determinación de endoglucanasas** se utilizó como sustrato 50 µl de carboximetil celulosa (CMC) 0,8% en buffer acetato de sodio pH 5.0, con 50 µl de sobrenadante de cada hongo. Para la **determinación de exoglucanasas** se usó como sustrato 15 µl de p-nitrofenil-β-D-celobiosido (pNPC) al 1% como sustrato en las mismas condiciones y 100 µl de sobrenadante. Ambas reacciones se incubaron a 40°C por 1 hora y fueron detenidas a 4°C por 10 minutos. En seguida, 50 µl de esta solución fue mezclada con 50 µl de una solución de DNS 1%, NaOH 16% y tartrato de sodio-potasio, 43.8% en agua destilada, para la determinación de azúcares reductores liberados. La mezcla fue incubada a 5 min a 90°C y luego enfriada 10 minutos a 4°C. A continuación, fueron adicionados 50 µl de la solución anterior con 250 µl de agua destilada. Se hicieron lecturas de absorbancia a 540 nm en un lector de ELISA del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía. Se hicieron curvas de calibración con Glucosa (0.1, 0.7, 1.5, 2.5 y 3 g/l) para endo y exoglucanasas teniendo en cuenta que una unidad de actividad enzimática corresponde a 1 µmol de glucosa liberada por minuto durante la hidrólisis.

5.1.5 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD B-GLUCOSIDASA

Para la determinación de **actividad β-glucosidasa** se usaron 180 µl de p-nitrofenil-β-D-glicopiranosido (pNPG), como sustrato y 50 µl de sobrenadante. Posterior a la incubación con el sustrato se tomaron 20 µl de esta solución y se adicionaron 80 µl de carbonato de sodio 2% y 180 µl de agua. Se midió la liberación de p-nitrofenol como el incremento en la absorbancia a 405 nm y se usó pNitrofenol (10, 20, 30 y 50 µg/mL) para la curva de calibración de β-glucosidasas (Sadana y Patil 1988).

5.2 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL CO-CULTIVO DE HONGOS PROVENIENTES DE SUELO DE UN TRANSEPTO DE BOSQUE ALTO-ANDINO SOBRE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA EN CELULOSA Y TUSA DE PALMA DE ACEITE

Para la determinación del efecto del co-cultivo de hongos se conformaron consorcios inoculando dos o más cepas en 5 mL de medio semisólido con celulosa microcristalina o tusa de palma, como única fuente de carbono, en tubos Falcon de 15 mL. El inóculo estaba compuesto por 1 mL de una solución de 10^6 esporas /mL en agua con Tween 80 0.01%. Dicho volumen fue dividido en partes iguales de acuerdo con el número de cepas del consorcio. Así, para un consorcio de dos cepas se adicionaron 0,5 mL de cada uno. En los consorcios, la inoculación de B19 fue realizada 48 horas antes, teniendo en cuenta la menor velocidad de crecimiento inicial en comparación con las demás. Los consorcios con tusa y celulosa fueron incubados 25°C por 300 horas en agitación orbital a 130 r.p.m. (Umikalsom y otros, 1997). Se hicieron tres réplicas de cada consorcio y se estableció la actividad enzimática únicamente a las 300 horas de acuerdo a lo reportado por Umikalsom (1997) quien obtuvo a este tiempo las mayores actividades endoglucanasa y β -glucosidasa.

Como complemento para determinar el efecto del co-cultivo de las cepas en conjunto, se realizaron pruebas de antagonismo en agar PDA a 25°C en la oscuridad. Se hicieron tres réplicas de las combinaciones evaluadas. El inóculo obtenido del círculo externo de una colonia de cada cepa, precrecida en PDA, consistió en 20 μ l de una solución de esporas en agua estéril con Tween 80 0.01%. Las gotas fueron dispuestas equidistantes en la superficie del agar, para permitir las mismas condiciones de crecimiento a cada cepa, en cajas de Petri de 9 cm de diámetro (Szekeres y otros, 2006). De acuerdo con la velocidad de crecimiento de las cepas, se inoculó la cepa B19 48 horas antes que las demás. Las cajas fueron incubadas por 10 días y al cabo de este tiempo, se tomaron fotografías de las placas con una cámara digital Kodak DX 3900 a la misma distancia en todos los casos. El área ocupada por cada colonia fue medida con el software J-Image (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) disponible por internet, con el uso de la herramienta “mano libre” “selección manual de la imagen”. Se determinó en cada caso el área total de la caja para la respectiva corrección a cm^2 . La habilidad antagonista se caracterizó con el índice de Biocontrol, BCI, por sus siglas en inglés, calculado con la siguiente ecuación: $\text{BCI} = (\text{área de colonia 1} / \text{área total ocupada por las dos o$

tres cepas) X 100 (Szekeres y otros, 2006).

5.3 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA *IN VITRO*, EN CELULOSA Y TUSA DE PALMA DE ACEITE, DE CONSORCIOS DE SOBRENADANTES PRODUCIDOS POR HONGOS CULTIVADOS INDIVIDUALMENTE.

Los sobrenadantes fueron obtenidos al cultivar las cepas individualmente en tubos Falcon de 15 mL con 10 mL de medio con celulosa microcristalina como fuente de carbono. Cada cultivo fue centrifugado a 10000g por 10 min. Se adicionó Azida de sodio NaN_3 0.001%(w/v) (Wang y otros, 2004). La hidrólisis enzimática se realizó en tubos Eppendorf de 1,5 mL con 100 μL de buffer acetato y 100 μL de sobrenadantes libres de células que contienen la enzima, con celulosa microcristalina o tusas 5% (w/v) como sustrato incubados a 45°C y 175 r.p.m. en agitador orbital. El volumen inoculado de 100 μL se dividió de acuerdo con el número de cepas de cada consorcio, así por ejemplo para consorcios de enzimas provenientes de 2 cepas el volumen de cada una fue de 50 μL y para consorcios de cuatro cepas fue de 25 μL . Se incluyó un blanco que contenía buffer acetato pH 5.0 sin glucosa. La hidrólisis enzimática se realizó por triplicado y se determinó la concentración de la glucosa obtenida a las dos horas, por el método de DNS.

5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la evaluación estadística se usó un modelo factorial con fuente de carbono, como factor principal, con dos niveles, celulosa y tusa. El factor secundario fue cepa, con siete niveles correspondientes a las cepas B7, B11, B11M, B19 del PNNN y TA1 y TA2, aislamientos provenientes de tusa en descomposición y una cepa de *Trichoderma harzianum* denominada Th, obtenida a partir de un producto comercial. Las variables evaluadas corresponden a proteínas de la biomasa, y actividad endoglucanasa, endoglucanasa específica, exoglucanasa, exoglucanasa específica, β -glucosidasa, β -glucosidasa específica. Cuando se encontraron diferencias significativas al 0,05 o 0,01%, se realizó la comparación de medias por el método de Tukey y Scheffe. Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas con el software analítico S.A.S.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO Y ACTIVIDAD CELULOLÍTICA *IN VITRO* DE AISLAMIENTOS DE HONGOS PROVENIENTES DE SUELO DE UN TRANSEPTO DE BOSQUE ALTO-ANDINO EN CELULOSA Y TUSA DE PALMA DE ACEITE

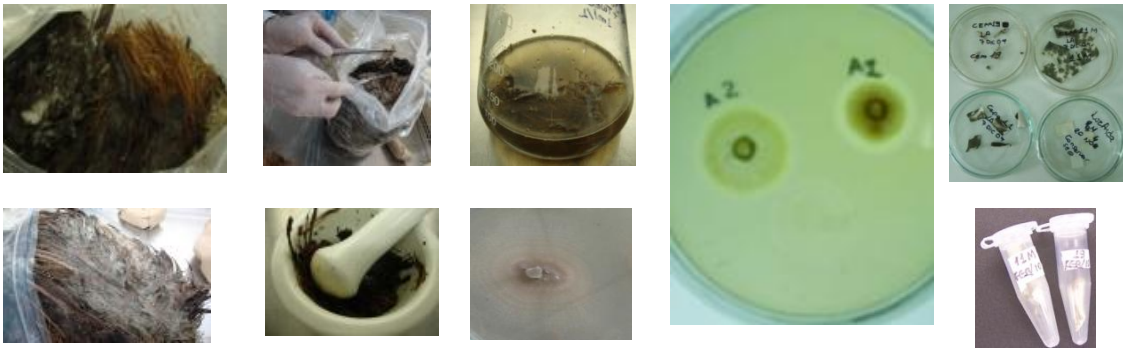
6.1.1 IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS PROVENIENTES DE TUSA DE PALMA.

Los hongos filamentosos obtenidos de tusa en descomposición fueron aislados en medio CMC y posteriormente repicados en medio PDA para su identificación y posterior conservación. Se seleccionaron las dos cepas que obtuvieron los halos más grandes en la prueba de iodina (Figura 4) y fueron denominados TA1 y TA2.

Caracterización morfológica. La morfología macroscópica y microscópica de los aislamientos se presenta en la Figura 5. La colonia del aislamiento TA1 en PDA tiene un diámetro de 5 cm a los 10 días de incubación, inicialmente es de color blanco, aterciopelado, que va oscureciéndose con el tiempo, hasta quedar con zonas blancas y zonas café verdosas pulverulentas. El reverso de la colonia es de color rojo oscuro. Microscópicamente presenta conidióforos pequeños, vesiculares y ascocarpos grandes y redondeados, además de abundantes células de Hülle incoloras. Los ascocarpos se localizan dentro de las zonas amarillentas de la colonia. El aislamiento TA2 en PDA presenta una colonia de crecimiento rápida, plana, vellosa, compacta, blanca al comienzo y verde a los 10 días de cultivo. Microscópicamente se observan conidióforos cortos. Las conidias de los hongos fueron mantenidas mediante conservación en tiras de papel de filtro Whatman como soporte a temperatura ambiente. De acuerdo con la base de datos de hongos Mycobank (Fungal databases, al <http://www.mycobank.org/MycoTaxo.aspx?Link=T&Rec=346743>, 01/01/2000, entered by Mycobank administration, MBSPEC 3609. Fecha de consulta: Agosto 15 de 2011.) la morfología de los aislamientos 1 y 2 corresponden a *Emericella nidulans* y *Aspergillus fumigatus* respectivamente.



(a) Aspecto del tusero y pilas de compostaje de tusa de donde fueron obtenidas las muestras. Fotografías Tania Galindo.



(b) Muestras de tusa usada para los aislamientos de hongos

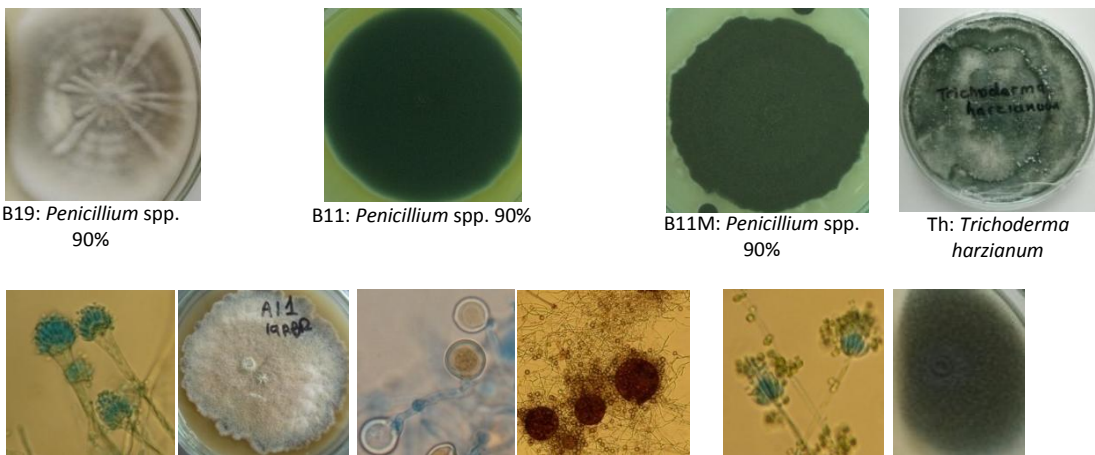
(c) Preparación de la muestra

(d) Crecimiento en medio con CMC como fuente de carbono

(e) Prueba de iodina de los aislamientos TA1 y TA2 en medio CMC

(f) Conservación de las cepas de hongos.

Figura 4. Proceso de aislamiento de hongos celulolíticos a partir de tusa de palma de aceite, crecimiento en CMC, prueba de iodina y aspecto de la conservación de cepas.



B19: *Penicillium* spp. 90%

B11: *Penicillium* spp. 90%

B11M: *Penicillium* spp. 90%

Th: *Trichoderma harzianum*

TA1: *Emericella nidulans*. Conidióforos teñidos con azul de lactofenol (400X), lona en PDA 10 días, posibles células de Hulle (400X), ascos y ascoporas.

TA2: *Aspergillus fumigatus*. Conidióforos (400X) teñidos con azul de lactofenol y aspecto de la colonia en PDA.

Figura 5. Morfología de colonia de las cepas utilizadas en el estudio y morfología microscópica (400X) de los aislamientos de hongos obtenidos a partir de tusa.

Caracterización molecular. Para la identificación molecular, el ADN se obtuvo de cultivos jóvenes crecidos en PDA. Se comprobó la presencia y calidad del ADN obtenido por electroforesis en gel de agarosa (1%) y se hizo la amplificación de los fragmentos ITS 1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS 4 (TCCTCCGCTTAT TGATATGC) (Petti 2007) (Fig. 6). Las muestras para secuencia fueron purificadas por precipitación con etanol y posteriormente la secuenciación fue realizada por extensión del iniciador ITS1 bajo las condiciones del kit “BigDye™ terminator” y usando un secuenciador automático 3730XL (anexos 1 y 2). La secuencia del aislamiento TA1 con 684 bases tuvo una alta homología con las contenidas dentro del GenBank. Los resultados del BLAST del NCBI arrojaron una identidad del 100% con *Emericella nidulans* strain EN-KSU-09 para el aislamiento TA1 y de 99% con *Aspergillus fumigatus* para el aislamiento TA2. Estos dos hongos pertenecen al Reino: Fungi, División: Ascomycota, Subphylum: Pezizomycotina, Clase: Eurotiomycetes, Subclase: Eurotiomycetidae, Orden: Eurotiales, Familia: Trichocomaceae, Género: *Emericella*, Especie: *nidulans* y Género: *Aspergillus*, Especie: *fumigatus*.

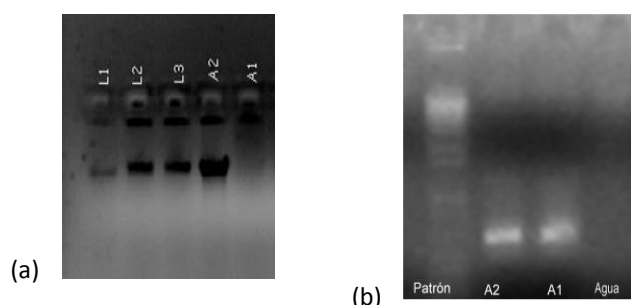


Figura 6. Electroforesis del ADN extraído del aislamiento de los aislamientos y sus productos de amplificación. (a) ADN aislado de TA2 y ADN λ a 50, 100 y 150 ng/ μ l. (b) Productos de PCR de los fragmentos amplificados de ADN aislado de TA1 y TA2 con los primers ITS1 e ITS4.

6.1.2 CURVAS DE CRECIMIENTO

Las condiciones de preparación de inóculo, crecimiento de las cepas y la curva patrón de proteínas se presentan en las Figura 7 y anexo 3.

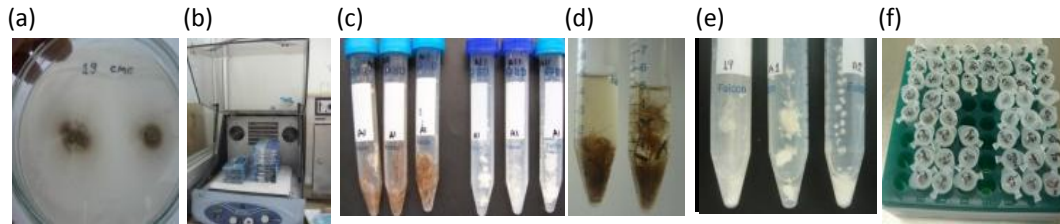


Figura 7. Condiciones de crecimiento y cultivo de las cepas. (a) Precultivo en medio sólido con CMC como fuente de carbono. (b) Incubación a 28°C y 130 r.p.m. (c) cultivo en medio con celulosa y tusa. (d) crecimiento en tusa, (e) Crecimiento en celulosa y (f) pool de sobrenadantes.

Las curvas de crecimiento de las cepas en estudio se presentan en la Figura 8.

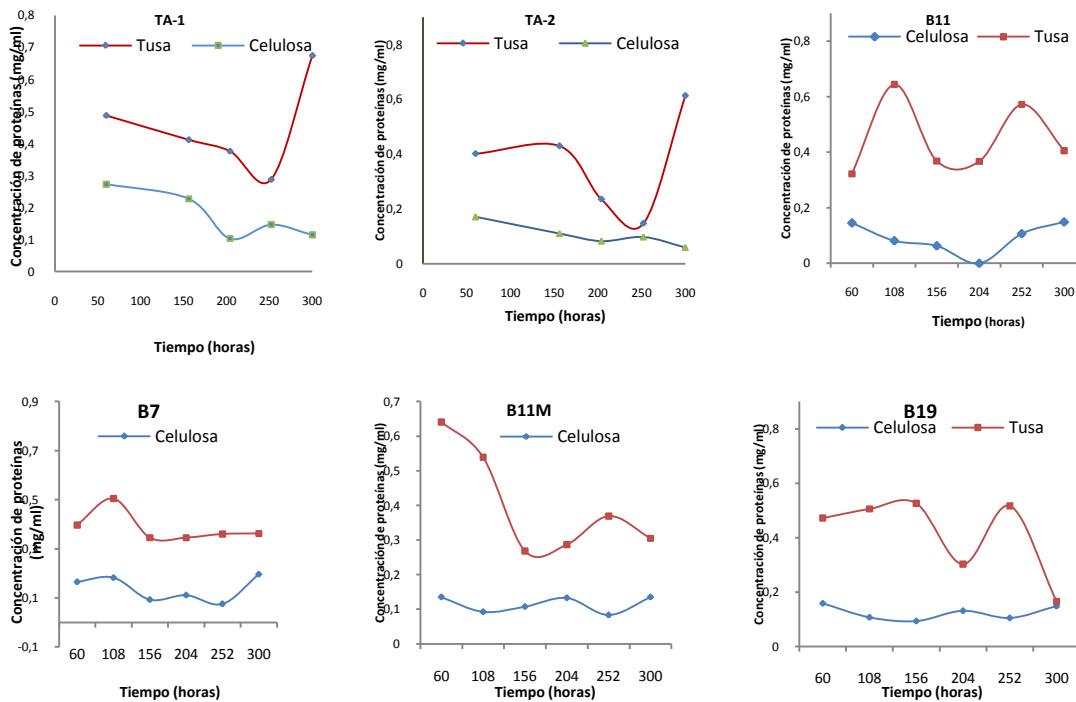


Figura 8. Curvas de crecimiento de las cepas de hongos TA1, TA2, B11M, B19, B11 y B7 con tusa y celulosa como única fuente de carbono. Cada punto de la curva es el promedio obtenido a partir de tres repeticiones.

Se observó que la producción de proteínas es afectada significativamente por la fuente de carbono ($p < 0.001$) y la interacción cepa*fuente de carbono. Todas las cepas estudiadas, TA1, TA2, B11, B7, B11M, y B19, producen más proteína en el sustrato natural que en artificial. Este resultado podría deberse a un mayor contenido de nutrientes y minerales presente en la tusa en comparación con los presentes en el medio que contiene celulosa. Las cepas E11 y

B11M alcanzaron las concentraciones más altas de proteína a las 106 y 60 horas respectivamente (entre 0,6-0,7 mg/mL).

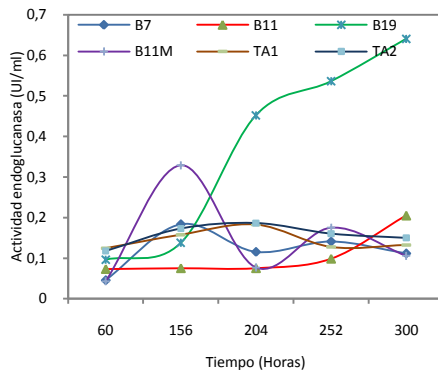
6.1.3 CURVAS DE ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA

Para la determinación de actividad endoglucanasa y exoglucanasa se hicieron curvas patrón con glucosa 0.1, 0.7, 1, 2 y 3 mg /mL con DNS. Para determinar la actividad β -glucosidasa se hizo una curva de paranitrofenol de 10, 20, 30, 40 y 50 μ g/mL. La curva patrón se presentan en el anexo 4.

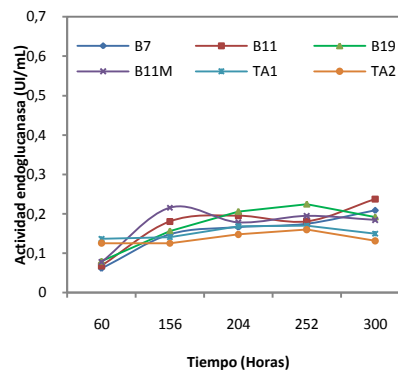
Las curvas de actividad endoglucanasa de las cepas en estudio, en los medios con celulosa y tusa, se presentan en la Figura 9. Las curvas de actividad enzimática se realizaron a partir de 60 horas, teniendo en cuenta algunos estudios preliminares de las cepas y la demostración por algunos autores de que las celulasas son un sistema enzimático inducible que se activa después del contacto de la enzima con el sustrato trayendo como resultado la activación de la síntesis de transcritos de celulasa (Carle-Urioste, y otros 1997). *Chaetomium globosum* por su parte, alcanza la máxima producción de celulasas después de la fase de crecimiento exponencial en medio de cultivo con tusa como fuente de carbono (Umikalsom y otros,1997). En *A. niger*, ocurre un período de inducción de la actividad celobiohidrolasa, al cabo del cual se obtiene la mayor producción enzimática con un óptimo de 80 a 96 horas de crecimiento (Hanif, Yasmeeen y Rajoka 2004).

En general, se observa que en celulosa microcristalina hay mayores diferencias en la actividad endoglucanasa. Bajo las condiciones empleadas se destaca la cepa B19 la cual alcanzó 0,64 UI /mL a las 300 horas de cultivo. En contraste, se observa que en tusa todas las cepas tuvieron una conducta similar, con actividades que están entre 0,07 y 0,21 UI/mL, a lo largo del tiempo evaluado.

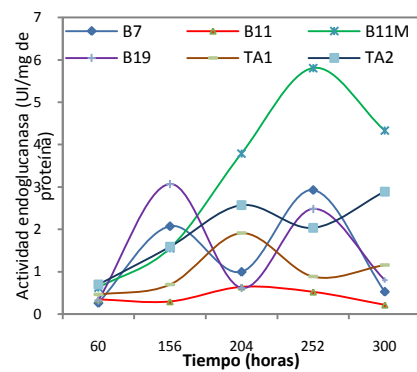
(a) Endoglucanasa en Celulosa



(b) Endoglucanasa en Tusa



(c) Endoglucanasa Específica en Celulosa



(b) Endoglucanasa Específica en Tusa

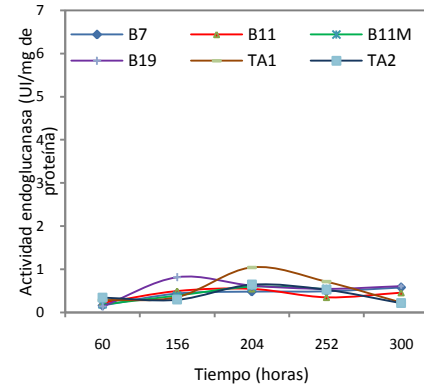


Figura 9. Actividad endoglucanasa (UI/mL) y endoglucanasa específica (UI/mg proteína) de las cepas de hongos en estudio a las 300 horas de cultivo en medio con celulosa como fuente de carbono. Cada punto corresponde al promedio de tres repeticiones.

La actividad específica muestra mayores diferencias a lo largo de las curvas en celulosa microcristalina, aunque se destaca también la cepa B19 con el mayor valor a las 252 horas, lo cual indicaría que en este momento la biomasa del hongo es más eficiente para la producción de las endoglucanasas. En tusa todas las cepas tienen un comportamiento muy similar.

Para facilitar la comparación del crecimiento y la actividad enzimática las curvas de proteínas de la biomasa y de actividad endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa fueron divididas en dos etapas. La Etapa 1 (E1) corresponde al promedio de las lecturas obtenidas a las 60, 156 y 204 horas y la Etapa 2 (E2) al promedio de las obtenidas a las 252 y 300 horas, para cada una de las cepas evaluadas. Cada lectura corresponde al promedio de 3 repeticiones. Se analizó la actividad o producción máxima de cada cepa. Con estas variables fue realizado un

análisis de varianza. Cuando se presentaron diferencias significativas al 5% del estadístico F se realizaron comparaciones de medias por los métodos de Scheffe y Tukey. Los resultados de los análisis estadísticos se presentan en el anexo 5.

En general, la mayor producción de actividad endoglucanasa y endoglucanasa específica se produjo en medio con celulosa como fuente de carbono por la cepa B19. Dichas diferencias se manifestaron en E1 ($p=0,028$) y se hicieron más notorias en E2 cuando B19 alcanzó la mayor actividad en celulosa ($p<0,01$) (figura 10). Estas diferencias ($p<0,01$) en E1 y E2 se observan claramente en la figura 10, tanto en producción total como en producción máxima de actividad endoglucanasa y endoglucanasa específica.

En la literatura relacionada con la actividad enzimática hay diversidad en el tipo de unidades utilizadas. Algunos autores se refieren a la actividad total por unidad de volumen, otros se refieren a la actividad por miligramo de biomasa producida o por mg de proteínas en el sobrenadante. Por esta razón, junto con el interés en conocer la eficiencia de las cepas en la producción de enzimas fueron determinados los dos tipos de actividades y se presenta una comparación con datos obtenidos por otros autores. A pesar de las mencionadas comparaciones, es necesario tener en cuenta que en muchos casos las condiciones de evaluación no son exactamente las mismas. Sin embargo, estas comparaciones aportan una idea al respecto.

Prasertsan y otros (1997), por su parte, se refieren a la eficiencia en la actividad de los hongos por gramo de tusa incluída en el medio. Por esta razón se hizo la conversión para la actividad en las condiciones de este estudio, y se determinó que B19 obtuvo más de 64 UI/g de tusa, actividad mayor que la alcanzada por *A. niger* ATCC 6275 de 23.8 U/g con residuos de la producción de aceite de palma como sustrato (Prasertsan y otros, 1997). Este resultado sugiere la potencialidad de B19 para degradar este sustrato, teniendo en cuenta que el valor obtenido en tusa corresponde alrededor de la tercera parte del obtenido en medio con celulosa microcristalina en este estudio.

A pesar de que la actividad endoglucanasa máxima de B-19 de 0,64 UI /mL es menor que la reportada por Ahamed y Vermette (2008) para *A. niger*, de 2,9 UI /mL en monocultivo, debe ser considerado en futuras investigaciones, teniendo en cuenta que *A. niger* es uno de los hongos reportados por su actividad endoglucanasa y B-glucosidasa y que en el estudio

mencionado, dicha actividad fue obtenida en un medio con cuatro veces la concentración de extracto de levadura y cinco veces la de celulosa. Por lo tanto, sería recomendable estudios para la optimización del medio de cultivo respecto a la actividad endoglucanasa ya que no se ha determinado el efecto del enriquecimiento del medio de cultivo sobre la actividad enzimática de B19. Este hecho es reportado por Jørgensen, y otros (2005) para *P. brasiliense* IBT 20888 con celulosa Solka-Floc, donde lograron duplicar la actividad endoglucanasa con el doble de concentración del sustrato. Como afirma este autor para cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma*, a pesar de que haya similitudes en las proteínas regulatorias hay diferencias esenciales en el mecanismo de regulación, lo que ocasiona diferente respuesta a la composición del medio de cultivo y a sus efectos sobre la actividad celulolítica. Otros trabajos en sustratos naturales reportan que *Aspergillus flavus* Linn NSPR 101 alcanzó una actividad endoglucanasa máxima de 0.0573 UI /mL residuos celulósicos de maíz y 0.0502 UI /mL con bagazo de caña como sustratos, menores que las obtenidas por todas las cepas evaluadas en este estudio (Ojumu, y otros 2003). Así mismo se ha reportado actividad endoglucanasa producida por *Bacillus pumilus* de 0.076 UI/mL, 0.063 UI /mL y 0.025 UI /mL en CMC, tusa de palma y polvo de celulosa, respectivamente casi 10 veces menor que las obtenidas en este estudio (Ariffin y otros, 2008). Emtiazi y otros, (2004), reportaron actividades mayores en el sonicado de un cultivo de *Aspergillus terreus* en medio con 10 g/L de celulosa y usando buffer fosfato 25 mM (pH 6) para las determinaciones, lo que sugiere que en estudios posteriores se podría incluir la sonicación de modo que se tengan en cuenta las enzimas adheridas a la pared de las hifas.

En la primera etapa (E1) se observaron diferencias significativas ($p= 0,032$) entre cepas. B11M alcanzó una actividad endoglucanasa de 0,32 UI /mL a las 156 horas de cultivo y B19 una de 0,13 UI /mL . Este resultado es de interés, pues aunque B19 alcanza el doble de actividad que B11M en la segunda etapa, a las 156 horas la actividad de B11M es mayor, lo cual resulta de interés desde el punto de vista económico como se explica más adelante en la determinación de la hidrólisis de tusa por sobrenadantes producidos individualmente por cada cepa.

Con base en la actividad específica, para B19 se podría sugerir una relación inversa entre la producción de proteínas y la actividad endoglucanasa: a menor producción de proteínas de la biomasa, mayor actividad endoglucanasa. Se podría sugerir que B19 es más eficiente que TA1

y TA2 las cuales producen mayor concentración de biomasa para con la misma actividad enzimática. En general, no se observó declinación en la actividad endoglucanasa de las cepas de la etapa 1 a la 2, lo cual podría indicar que las enzimas de los hongos en estudio, no son inhibidas en las condiciones evaluadas, por los productos de la actividad enzimática como ocurre en algunas cepas reportadas o su concentración no es suficientemente alta para lograrlo (Kaur y otros, 2006).

Aunque se ha reportado actividad endoglucanasa para *T. harzianum* entre 0,39 y 2,78 UI /mL (Melo y otros,1997), la cepa de *T. harzianum* del producto comercial evaluado aquí como comparación tuvo una actividad menor de 0,15 UI /mL , lo cual puede deberse a que esta cepa no fue obtenida por selección por actividad celulolítica sino de un producto comercial orientado hacia el biocontrol. Dicha actividad sin embargo, fue mayor que la reportada para esta especie por Alam y otros (2005) de 0.0413 UI /mL en tusa de palma de aceite como fuente de carbono (humedad de 50%). El valor menor podría originarse en la menor humedad del sustrato.

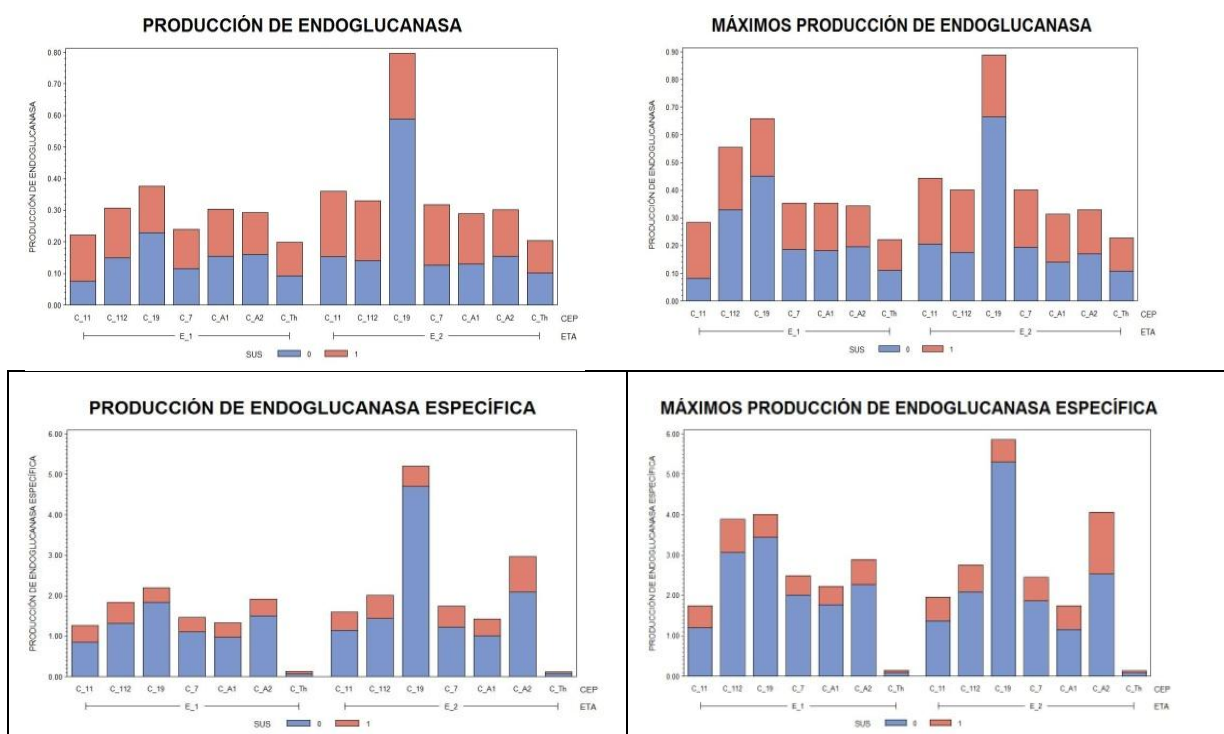


Figura 10. Producción de actividad endoglucanasa (UI/mL) y endoglucanasa específica (UI/mg de proteína) y máximos de actividad (UI/mL) en dos etapas de crecimiento de siete cepas de hongos. E1 corresponde al promedio de las lecturas obtenidas a las 60, 156 y 204 horas. E2 al promedio de las obtenidas a las 252 y 300 horas. Celulosa: barra azul, Tusa: barra terracota. Cada lectura corresponde al promedio de tres repeticiones.

6.1.4 CURVAS DE ACTIVIDAD EXOGLUCANASA

Las curvas de actividad exoglucanasa de los hongos en estudio se presentan en la Figura 11 y los análisis estadísticos en el anexo 6. Aunque con variaciones, las curvas de actividad exoglucanasa tienen similitud con las de endoglucanasa respecto a la mayor actividad de B19 en celulosa microcristalina y a la uniformidad en el comportamiento de las cepas en tusa. Así mismo, las curvas pueden ser diferenciadas en las etapas E1 y E2, ya que hasta las 204 horas el comportamiento fue relativamente homogéneo y luego se diferencia B19, lo cual se puede ver tanto en la figura 11 como en la figura 12.

En la etapa E1 la actividad es muy similar para todas las cepas ($p > 0,05$). En E2 se observan diferencias altamente significativas debidas a la interacción cepa*sustrato ($p < 0,01$), tanto en la producción total en E2 como la producción máxima por B19, la cual alcanza valores casi diez veces mayores que las demás cepas, en celulosa microcristalina. Al igual que la actividad endoglucanasa, la celulosa microcristalina favoreció la actividad exoglucanasa (Figura 12).

A las 300 horas B19 alcanzó una actividad exoglucanasa en celulosa, de 5,3 UI/mL, más de once veces mayor que la de la cepa B11, la segunda en actividad y 26 veces mayor que los aislamientos obtenidos de tusa. Los valores de exoglucanasa específica obtenidos tanto en celulosa como en tusa son mayores que los reportados por Hanif, Yasmeen y Rajoka (2004) de 3,3 IU/mg en celulosa. En tusa, la respuesta fue diferente. La cepa B11 alcanzó una actividad de 0,44, significativamente mayor que las cepas B11M, 19, y los aislamientos TA1 y TA2.

La cepa B19 alcanzó una actividad exoglucanasa específica máxima de 44 UI/mg proteína en medio con celulosa microcristalina a las 252 horas de crecimiento, más de diez veces la obtenida por *A. niger* NIAB 280 de 3,3 IU/mg proteína en medio de sales de Vogel, el cual tiene variaciones en fuente de nitrógeno y micronutrientes, entre otros, respecto al medio con sales de Mandels utilizado en este estudio, con α -celulosa (Hanif, Yasmeen y Rajoka, 2004). En medio con tusa de palma, B19 alcanzó una actividad exoglucanasa de 4 IU/mg proteína, mayor que la reportada por los mismos autores en tamo de trigo pretratado con álcali (2,82 IU/mg proteína). Teniendo en cuenta la composición de la tusa utilizada, es posible que sus altos contenidos de lignina y hemicelulosa impidan el acceso a la celulosa o

causen algún tipo de inhibición de la actividad exoglucanasa. Sería importante que para próximos estudios se incluyan otros pretratamientos de la tusa con el fin de aumentar la disponibilidad de celulosa, de modo que se logren valores de exoglucanasa similares a los obtenidos en celulosa micricristalina. Así mismo, es posible que además de las condiciones intrínsecas de cada microorganismo, las variaciones en la composición del medio de cultivo contribuyan a las diferencias con los reportes de la literatura, lo cual tendría que ser tenido en cuenta en posteriores investigaciones.

Considerando las actividades endoglucanasa y exoglucanasa exhibidas por la cepa B19, obtenida de suelo del PNNN se puede concluir su potencialidad para usos biotecnológicos. Sería importante realización de estudios de optimización de la actividad de estas dos enzimas, que evalúen su respuesta a composición del medio en relación con fuentes de carbono, nitrógeno, minerales, pH y a condiciones de cultivo como agitación, temperatura, aireación, tamaño de inóculo, entre otros.

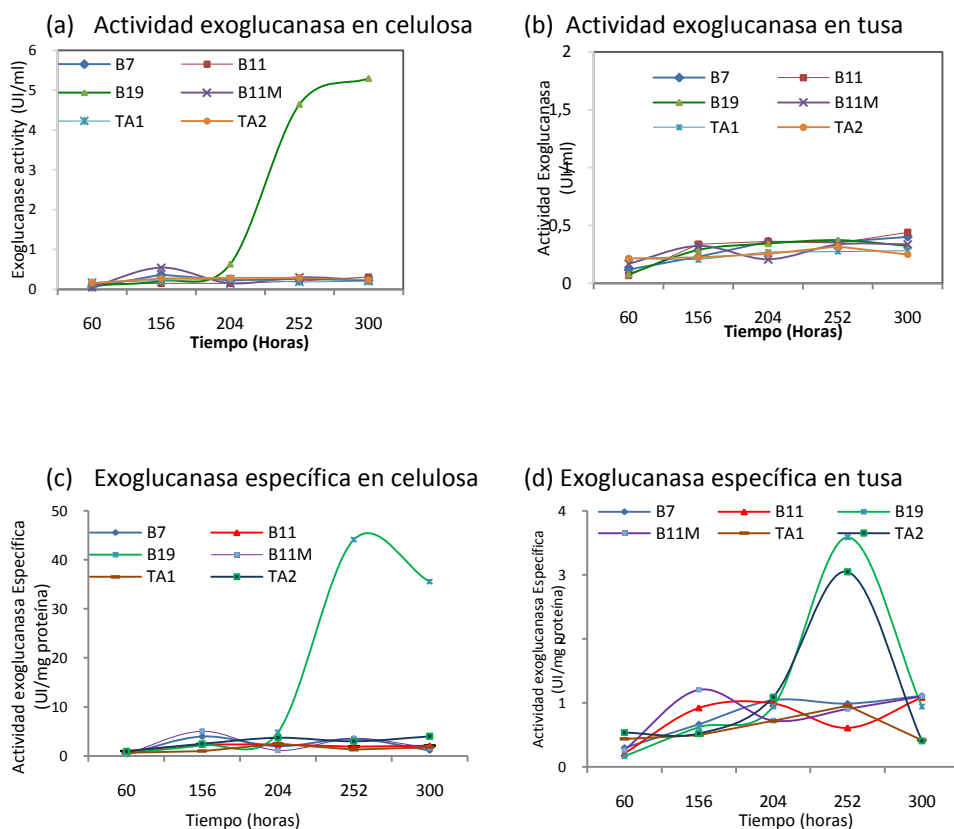


Figura 11. Curvas de actividad exoglucanasa (a) y (b) y exoglucanasa Especifica (c) y (d) de las cepas de hongos en estudio, con celulosa y tusa como fuentes de carbono, respectivamente. Cada punto de la curva es el promedio de tres repeticiones.

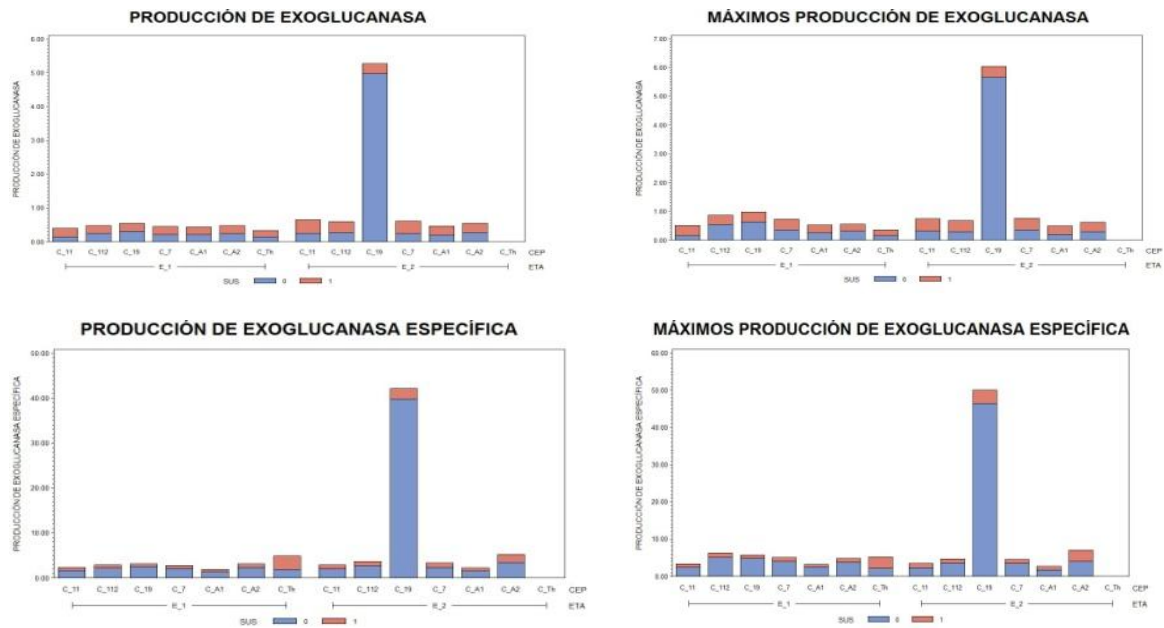


Figura 12. Producción de actividad exoglucanasa (UI/mL) y exoglucanasa específica (UI/mg de proteína), y máximos de actividad (UI/mL) y de actividad específica (UI/mg de proteína) en dos etapas de crecimiento de siete cepas de hongos. E1 corresponde al promedio de las lecturas obtenidas a las 60, 156 y 204 horas. E2 al promedio de las obtenidas a las 252 y 300 horas. Celulosa: barra azul, Tusa: barra terracota. Cada barra corresponde al promedio de tres repeticiones

6.1.5 CURVAS DE ACTIVIDAD B-GLUCOSIDASA

La actividad β -glucosidasa se presenta en la figuras 13 y 14. Se observaron diferencias altamente significativas en la producción de actividad ($p < 0,01$) debidas a la interacción cepa*sustrato en la dos etapas de crecimiento de los hongos (Figura 13). Los análisis estadísticos se presentan en el anexo 7. En general, la actividad en tusa fue menor. Para B7 por ejemplo, que había alcanzado un máximo de 2,3 UI /mL en celulosa microcristalina, se redujo a 1,6 UI /mL en tusa; para B11 por su parte de valores superiores a 1 UI /mL se redujo a menos de 0,3 UI /mL en tusa a las 252 horas. Para B19 la actividad en tusa fue una cuarta parte de la obtenida en celulosa microcristalina. A diferencia de las cepas mencionadas, para B11M la curva fue muy similar en los dos sustratos.

En la etapa E1, B7 mostró la mayor actividad β -glucosidasa en tusa. Las demás cepas mostraron mayor actividad en medio con celulosa, como ocurrió también en las actividades endo y exoglucanasa. La mayor actividad β -glucosidasa, 3.081 UI/mL, fue obtenida por la cepa de *T. harzianum*, en medio con celulosa. *T. harzianum* ha sido reportado por Verma y otros (2007) por su producción de aryl- β -glucosidasa, β -glucosidasa, β -1,3-glucanasa,

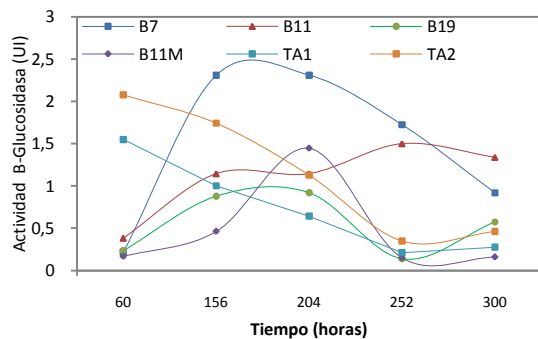
celobiohidrolasa. Por su parte, Ahamed y otros (2009) encontraron que la mayor actividad β -glucosidasa de 0,92 UI /mL era producida en un medio con CMC como fuente de carbono, por encima de glucosa, residuos de trigo, maíz y viruta de madera. Así mismo, encontraron una actividad β -glucosidasa específica de 0,35 UI/ mg de proteína en una fracción purificada de la enzima, diez veces menor que la obtenida por la cepa B-7 en el presente estudio.

En la etapa E2, la mayor actividad fue presentada por B7, con valores de 1.53 y 1.03 UI /mL con celulosa y tusa, respectivamente. Es interesante que a diferencia de las actividades endoglucanasa y exoglucanasa, no se observó gran diferencia entre la actividad lograda en celulosa microcristalina y en tusa. Estos resultados están de acuerdo con los reportes de la literatura que coinciden en que, los hongos con alta actividad endo y exoglucanasa, exhiben proporcionalmente menor actividad β -glucosidasa (Alam y otros, 2005). Los valores obtenidos se acercan a los reportados por otros autores (Adsul y otros, 2004) quienes evaluaron la actividad de *Penicillium janthinellum* NCIM 1171 y *Trichoderma viride* NCIM 1051 en un medio con bagazo de caña como fuente de carbono y celulosa en polvo (CP-123). La mayor actividad de β -glucosidasa fue de 2.3 UI /mL en *P. janthinellum*.

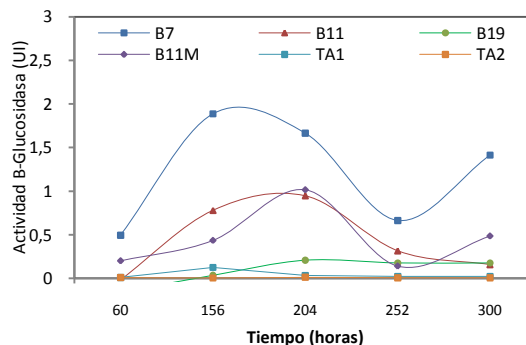
En el presente estudio la cepa B7 alcanzó 1.8 UI /mL de actividad β -glucosidasa con tusa, mayor que producido por *Chaetomium globosum* (1.3 UI/mL) en un medio con una concentración de extracto de levadura diez veces mayor y tusa delignificada con casi el doble de disponibilidad de celulosa y menor contenido de lignina (Umikalsom y otros, 1997). Así mismo, la actividad obtenida superó más de diez veces el máximo de 0,1 UI /mL obtenido a los 4-10 días de incubación por *T. reesei* en un medio a base de estiércol pretratado y con contenidos de celulosa y lignina similares a los de la tusa utilizada en este estudio (Wen y otros, 2005). Sería importante la realización de una evaluación del efecto de la concentración de la fuente de carbono, ya que se ha reportado el aumento de actividad β -glucosidasa de 1.8 a 5.7 UI /mL con el aumento de la concentración de celulosa de 20 a 40 g/L en *Penicillium brasilianum* (Jørgensen, y otros, 2005). El mismo autor reportó que *Penicillium pinophilum* IBT 4186 obtuvo una actividad β -glucosidasa de 18.6 UI /mL en medio con celulosa Solka-Floc 200 FCC como fuente de carbono mayor que las obtenidas en este estudio tanto en medio con celulosa como con tusa. La diferencia observada podría deberse, entre otros factores, a condiciones intrínsecas del hongo, a una concentración cuatro veces mayor de celulosa en el medio, o a la adición de urea, sulfato férrico, peptona y xilanos al medio,

reportados por el mismo autor como inductores de celulasas. En tusa la actividad β -glucosidasa de TA1 y TA2 no fue detectable.

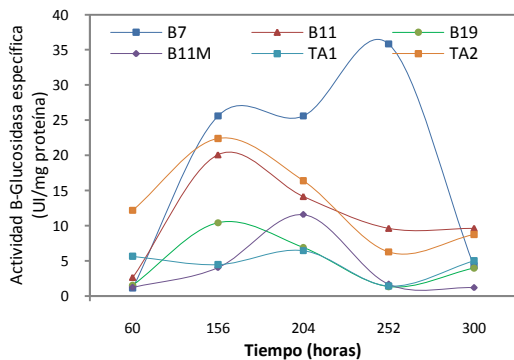
(a) β -glucosidasa en celulosa



(b) β -glucosidasa en Tusa



(c) β -glucosidasa específica en celulosa



(d) β -glucosidasa específica en Tusa

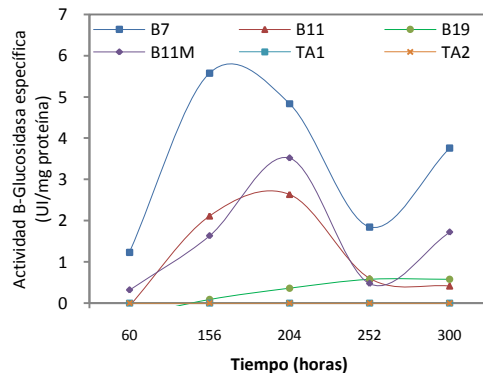
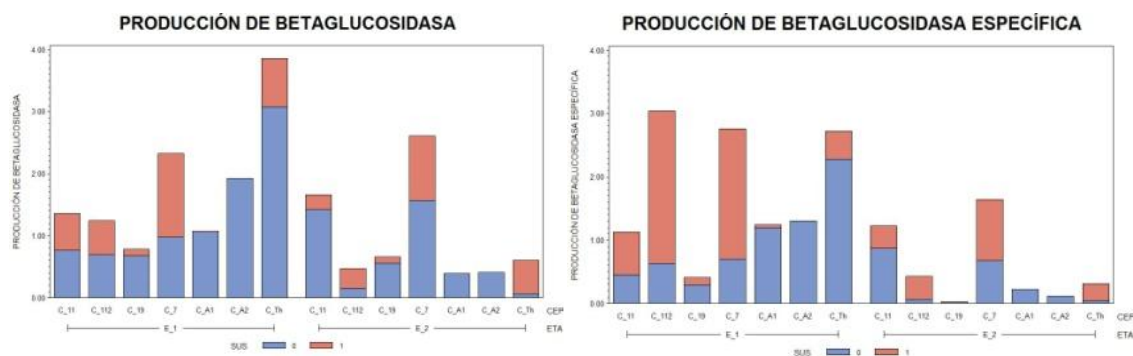


Figura 13. Curvas de actividad β -glucosidasa (UI/mL) y de actividad β -glucosidasa específica (UI/mL) de las cepas de hongos en estudio con (a) celulosa y tusa (b) como fuente de carbono. Cada punto corresponde al promedio de tres repeticiones.



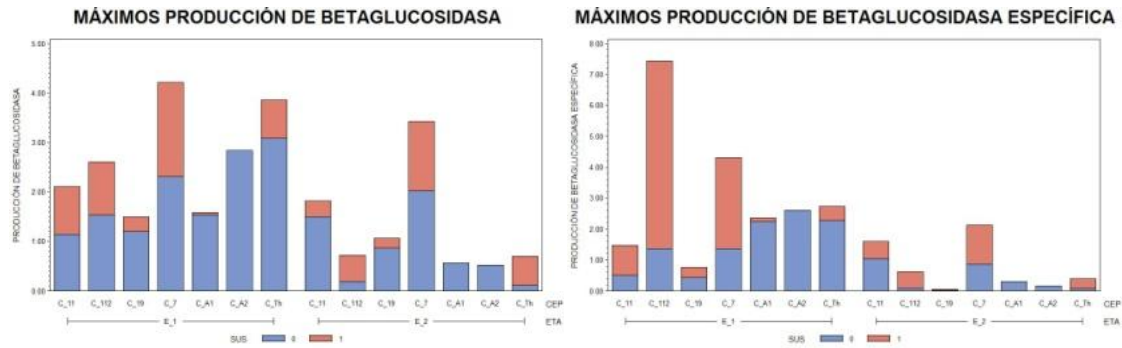


Figura 14. Producción de actividad β -glucosidasa (UI/mL) y β -glucosidasa específica (UI/mg de proteína) y máximos de actividad en dos etapas de crecimiento de siete cepas de hongos. E1 corresponde al promedio de las lecturas obtenidas a las 60, 156 y 204 horas. E2 al promedio de las obtenidas a las 252 y 300 horas. Celulosa: barra azul, Tusa: barra terracota. Cada barra corresponde al promedio de tres repeticiones.

Es posible que la cepa B7 haya sido inducida en la primera etapa a una baja producción de endoglucanasas en el medio con celulosa y que similar a lo reportado por Kaur, pueda existir una represión de la endoglucanasa por inhibición por glucosa procedente de la acumulación de oligosacáridos solubles de bajo peso molecular por actividad mayor de β -glucosidasa. (Kaur y otros, 2006).

La cepa B19 a las 60 horas de incubación mostró una actividad endoglucanasa de 0,09 y 0,079 U/mL, en celulosa y tusa respectivamente, en condiciones de crecimiento semejantes a las utilizadas por otros autores los cuales obtuvieron una actividad de 0,086 UI /mL en tusa sin pretratamiento (Rodríguez y Piñeros, 2007). Los mismos autores, obtuvieron 0,614 UI /mL después de un pretratamiento biológico con *Pleurotus ostreatus* y 0,536 UI /mL con la adición de un suplemento de nitrato de sodio, por lo cual se esperarían resultados similares de B19 en tusa.

6.2 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL CO-CULTIVO DE HONGOS PROVENIENTES DE SUELO DE UN TRANSEPTO DE BOSQUE ALTO-ANDINO SOBRE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA EN CELULOSA Y TUSA DE PALMA DE ACEITE

Con base en los reportes en la literatura (Wen y otros 2005), en los cuales se han obtenido aumentos en la actividad enzimática por consorcios conformados por cepas de alta actividad como *T. reesei* con otras de menor actividad, se conformaron consorcios con la cepa que había mostrado la mayor actividad endoglucanasa y exoglucanasa en las curvas de crecimiento en medio con celulosa, que corresponde a la cepa B19. Se realizó un experimento factorial con dos sustratos (celulosa y tusa); 9 consorcios de cepas; y un testigo B19. Los consorcios evaluados fueron TA1TA2, B19TA2, B19B11M, B19TA1, B19TA1TA2, B19Th, B19B11, B19B7, B19B7B11B11M. El tiempo de lectura fue de 300 horas. Teniendo en cuenta que se han reportado diferencias de la producción de celulasas ocasionadas por el tiempo de inoculación, (Stoilova y otros, 2005), y a que B19 muestra crecimiento más lento que las demás cepas, su inoculación se realizó 48 horas antes de la inoculación de los demás miembros del consorcio.

Los resultados mostraron una relación entre la actividad endoglucanasa, endoglucanasa específica, y la actividad exoglucanasa y exoglucanasa específica, cuyo comportamiento es similar en todos los consorcios, aunque varía su magnitud. Dichas actividades al parecer están en relación inversa con la producción de proteínas, teniendo en cuenta que los consorcios con mayor actividad presentan menor producción de proteínas (Figura 15). Este hecho es particularmente notorio en la cepa control, B19, con la menor producción de proteínas y la mayor actividad endo y exoglucanasa. En la literatura se ha reportado que la interacción sinérgica de los hongos co-cultivados no está directamente relacionada con el crecimiento, como producción de biomasa, sino que es responsable del aumento en la producción de enzimas (Gutierrez-Correa y otros, 1999).

Como se esperaba con los resultados en las curvas de crecimiento individuales, la mayor actividad endo y exoglucanasa ocurrió en el medio con celulosa, excepto para el consorcio B19B11M, el cual presentó mayor actividad en tusa. Este consorcio resulta interesante por el potencial de su actividad sobre la tusa.

Se observaron diferencias altamente significativas en la producción de proteínas, debidas a la interacción sustrato*consorcio. En promedio, la mayor concentración de proteínas fue observada en tusa para los consorcios TA1TA2, B19TA1, B19TA1TA2, B19Th y B1911 p(< 0.01) y B19B11M p(0.036049). Los análisis de varianza de la producción de proteínas y las actividades enzimáticas en co-cultivo se presentan en el Anexo 6. El resultado obtenido en producción de proteínas para la cepa B19 no coincide con los hallazgos de Ahamed quien observó que las proteínas totales fueron significativamente ($p < 0.01$) mayores (1.5 veces) en los cultivos mixtos conformados por *Trichoderma* y *A. niger* en comparación con los monocultivos (Ahamed y Vermette, 2008).

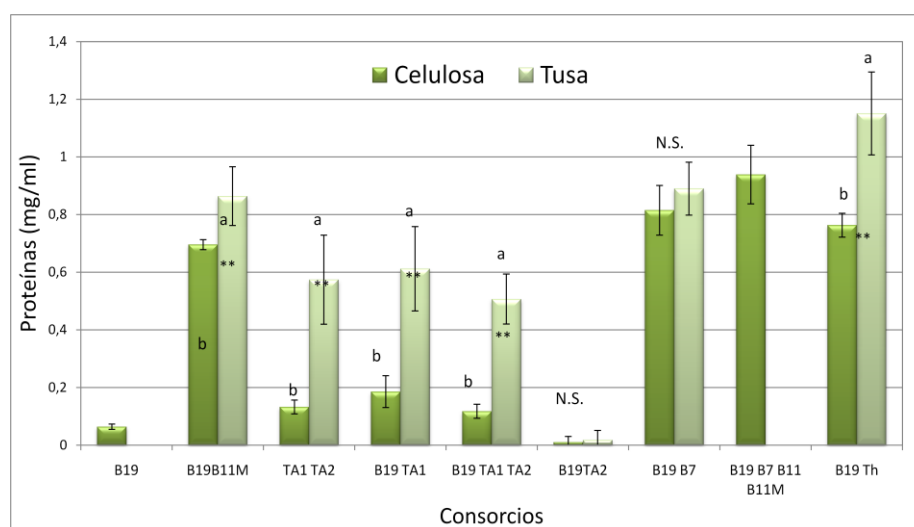


Figura 15. Proteínas producidas por consorcios de hongos co-cultivadas 300 horas en medios con celulosa y tusa como fuentes de carbono. Cada barra es el promedio de tres repeticiones. Letras diferentes indican diferencias en la actividad enzimática en los sustratos evaluados. **: Diferencias altamente significativas. *: Diferencias significativas. .

La actividad endoglucanasa de los consorcios crecidos en co-cultivo se observa en la figura 16. Se presentaron diferencias altamente significativas debidas a la interacción sustrato*consorcio ($p < 0.01$). La mayor actividad se observó en medio con celulosa excepto para B19B11M con mayor actividad sobre tusa. Los consorcios B19TA1 y B19B7 con actividad 0,3426 UI /mL y 0,2259 UI/mL , mostraron diferencias altamente significativas ($p > 0,01$). Los consorcios B19TA1TA2, B19B11M y B19TA1TA2 presentaron diferencias significativas con $p = 0.027998$, 0.040957 y 0.027998 , respectivamente). Sin embargo, ninguno de los consorcios superó a la cepa B19 creciendo individualmente. Los consorcios con las cepas B11, y *T. harzianum* presentaron significativamente menor actividad, con promedios de 0,0653 y 0,046 UI/mL , respectivamente, de acuerdo con el análisis de promedios por el método de

Scheffe. El consorcio de los aislamientos TA1TA2 alcanzó una actividad de 0,1351 UI/mL . A diferencia de estudios en los cuales los consorcios mostraron mayor actividad enzimática que las cepas por separado (Ahamed y Vermette 2008), en el presente estudio, la actividad endoglucanasa de la cepa control, B19 no fue superada por ninguno de los consorcios evaluados. La actividad endoglucanasa específica se presenta también en la Figura 16, donde se muestra diferencias significativas debidas a la interacción sustrato*consorcio en los consorcios B19TA2 y B19B11 ($p>0.01$). La endoglucanasa específica de los consorcios B19B11 y B19TA2 fue mayor, lo cual indica que la biomasa en estos consorcios es más eficiente para la producción de actividad endoglucanasa. Lo mismo ocurre para B19TA2 respecto a la exoglucanasa y a la β -glucosidasa.

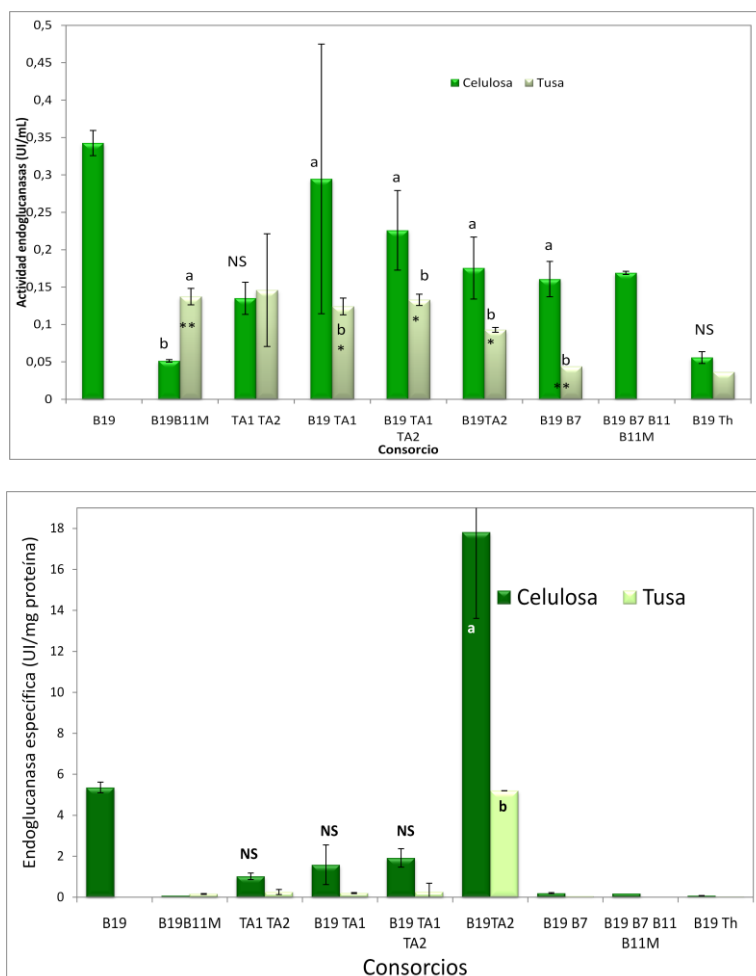


Figura 16. . Actividad endoglucanasa y endoglucanasa específica producida por consorcios de hongos co-cultivados durante 300 horas en medios con celulosa y tusa como fuentes de carbono. Cada barra es el promedio de tres repeticiones. Letras diferentes indican diferencias en la actividad enzimática en los sustratos evaluados. **: Diferencias altamente significativas. *: Diferencias significativas. .

La actividad exoglucanasa y exoglucanasa específica de los consorcios se presentan en la Figura 17. Se presentaron diferencias significativas en la actividad debido al consorcio, al sustrato y a su interacción ($p > 0.01$, 0.04 y 0.02, respectivamente). Hubo diferencias altamente significativas debidas al sustrato en el consorcio B19TA1 ($p > 0,01$) y significativas ($p > 0.05$) en los consorcios B19TA1TA2 y B19B7 con los mayores valores en el medio con celulosa. Un efecto similar se presentó en la exoglucanasa específica en el medio con celulosa ($p < 0.01$), donde los consorcios B19TA2, B1911 y B19TA1TA2 presentaron diferencias altamente significativas ($p < 0.01$ y 0.039).

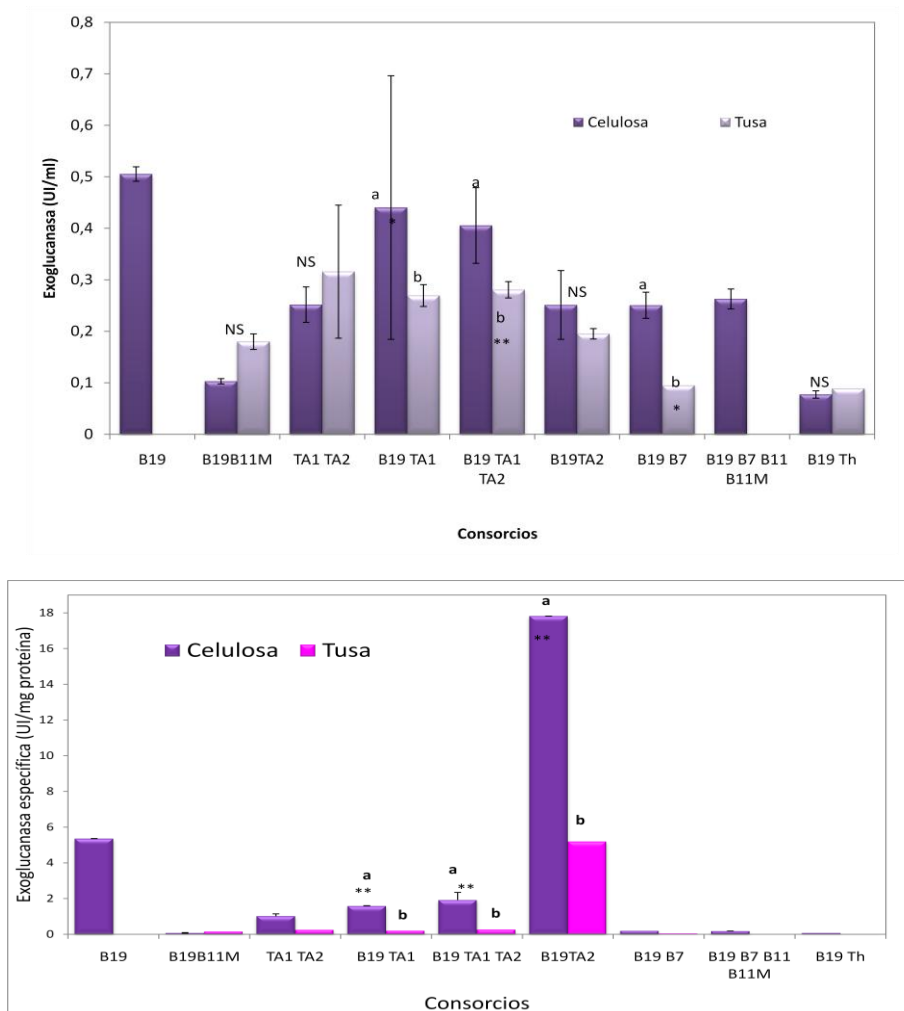


Figura 17. Actividad exoglucanasa (UJ/mL) y exoglucanasa específica (UJ/mg proteína) de cepas individuales y consorcios de las cepas de hongos B19, B11, B11M, B7, TA1, TA2 Y *T. harzianum* en medio con celulosa y tusa. Cada barra es el promedio de tres repeticiones. Letras diferentes indican diferencias en la actividad enzimática en los sustratos evaluados. **: Diferencias altamente significativas. *: Diferencias significativas.

La **actividad β -glucosidasa y β -glucosidasa específica** de los consorcios se presentan en la Figura 18. De acuerdo con el diseño inicial del experimento, los consorcios fueron conformados con la cepa B19 con el fin de potencializar las actividades endoglucanasa y exoglucanasa principalmente, aunque también fue determinada la β -glucosidasa. En este aspecto se encontraron resultados interesantes por mayor actividad de los consorcios en comparación con las cepas individuales, aunque ninguno de los consorcios obtuvo mayor actividad que la expuesta por la cepa B7 a las 300 horas de crecimiento individual obtenido en la curva de actividad.

Se observó un efecto positivo de los consorcios sobre la actividad β -glucosidasa respecto a B19, con diferencias altamente significativas debidas al consorcio ($p= 0,013$) y a la interacción consorcio*sustrato ($p<0,01$). Así, el consorcio B19TA2, mostró cuatro veces mayor actividad que B19 creciendo individualmente, en medio con celulosa, es decir que la conformación de este consorcio es benéfica para la producción de actividad β -glucosidasa. La actividad en celulosa tuvo diferencias altamente significativas ($p<0,01$) en comparación con la actividad en tusa. El consorcio por su parte B19B7 mostró actividad significativamente mayor en tusa ($p= 0,0217$). Los demás consorcios no mostraron diferencias significativas en la actividad β -glucosidasa en los dos sustratos. La actividad específica solo fue significativamente mayor en medio con celulosa en el consorcio B19TA2.

Aunque el consorcio B19TA2 alcanzó la mayor actividad β -glucosidasa, con 0,5 UI /mL en medio con celulosa, mostró menor actividad que la reportada de 0,7 UI /mL para un consorcio de *T. reesei* con *A. phoenicis* en estiércol pretratado (26% de celulosa y 11% de lignina (Wen y otros, 2005). Es interesante sin embargo, el consorcio B7B19, el cual obtuvo una actividad β -glucosidasa de 0,3 IU/mL, no muy diferente del obtenido por Wen y colaboradores, en medio con tusa la cual tenía una disponibilidad de celulosa de 30%, pero casi tres veces el contenido de lignina y casi el doble de hemicelulosa. El potencial del consorcio B7B19 se basa entonces en su actividad β -glucosidasa y probablemente en otras actividades enzimáticas, posiblemente hemicelulasas que deberían ser evaluadas posteriormente.

Teniendo en cuenta que hay numerosos factores que pueden afectar la actividad enzimática, se evaluó la posibilidad de algún tipo de biocontrol mutuo por antagonismo de las cepas en los cultivos mixtos. Con base en las diferencias observadas en el tiempo de crecimiento de las

cepas evaluadas, la cepa B19 fue inoculada 48 horas antes que las otras cepas y el tamaño de colonias fue medido a los 10 días. Los resultados obtenidos muestran ser reproducibles con las cepas evaluadas y se presentan en la figura 19. Se determinó en cada caso el área total de la caja para la respectiva corrección a cm^2 . La habilidad antagonista se caracterizó con el índice de Biocontrol, BCI (Szekeres y otros, 2006). Los consorcios evaluados fueron las combinaciones de la cepa B19, la de mayor actividad endo y exoglucanasa, con los aislamientos obtenidos de tusa y dos cepas del PPPN.

En la figura 19 se observa interbloqueo en el punto de toque (Molla, Abd-Aziz y Hanafi 2001) entre las cepas de los consorcios B19B11, B19TA2, e interbloqueo en la distancia en los consorcios B1911M, B19TA1 y B11B11M. Cuando crecieron conjuntamente B19, TA2 y TA1 se repite el interbloqueo en el punto en la distancia de B19 con TA1 y entre TA1 y TA2. Es interesante que a pesar de que B19 no crece rápidamente en comparación con las otras cepas, en ningún caso hubo crecimiento entremezclado con las demás cepas de hongos, según lo cual posee mecanismos que mantienen su independencia. En la gráfica se muestra el porcentaje de desarrollo de cada cepa en seis consorcios. Se observa que en cinco de los consorcios el mayor desarrollo fue obtenido por B19. Este dato es interesante ya aunque el crecimiento de B19 es lento, por lo cual fue inoculado con anterioridad, no es superado en crecimiento por ninguna de las cepas evaluadas en los consorcios. Este resultado está de acuerdo con los obtenidos en la actividad enzimática de los consorcios, donde no se observó sinergismo entre las cepas en relación con las actividades endoglucanasa y exoglucanasa. Sin embargo, es interesante que a pesar del interbloqueo, la actividad β -glucosidasa sí fue mayor en los consorcios en medio con celulosa, en comparación con B19. Es posible que los metabolitos producidos como consecuencia del co-cultivo estimulen algún mecanismo de control de la transcripción de genes que codifican la producción de β -glucosidasa en forma similar al estímulo producido por el crecimiento sobre pino en *Phanerochaete carnosa*, el cual produce más transcritos de los genes que codifican 6 manganeso peroxidasa, 5 celulasas, 2 hemicelulasa y una lignina peroxidasa, entre otras, en comparación con los transcritos producidos es cultivado en un medio de cultivo nutritivo sintético (MacDonald, y otros 2011)

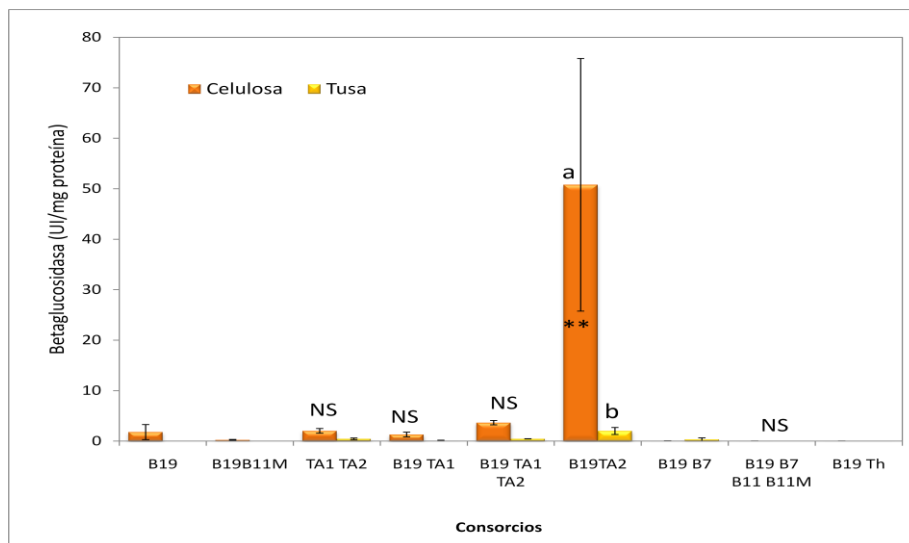
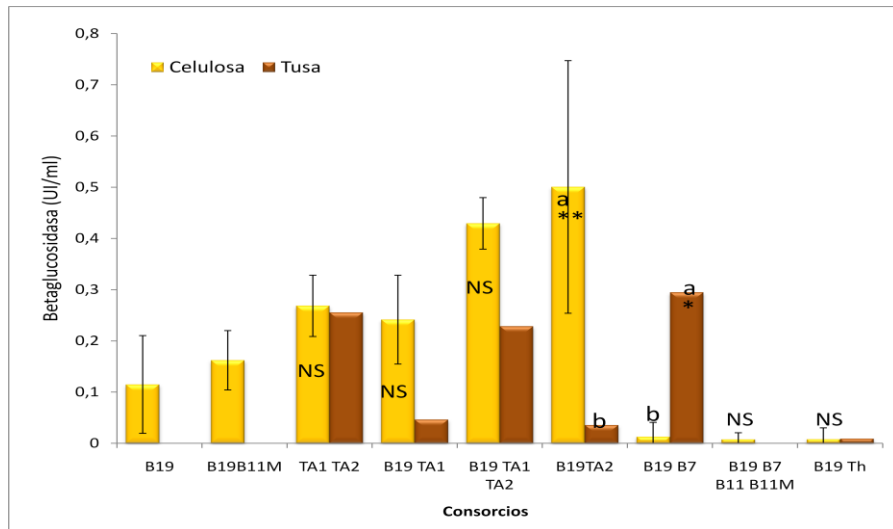


Figura 18. Actividad β -glucosidasa (UI/mL) y β -glucosidasaespecífica (UI/mg proteína) de cepas individuales y consorcios de las cepas de hongos B19, B11, B11M, B7, TA1, TA2 Y *T. harzianum* (Th) en medio con celulosa y tusa. Cada barra es el promedio de tres repeticiones. Letras diferentes indican diferencias en la actividad enzimática en los sustratos evaluados. **: Diferencias altamente significativas. *: Diferencias significativas.

Resulta de gran interés el hecho de que la actividad β -glucosidasa pueda ser estimulada con la siembra en cultivo mezclado con la cepa adecuada. Así, aunque ninguna de las dos cepas es promisorias por dicha actividad, su trabajo conjunto favorece la actividad en la mayoría de cepas. Podría existir algún mecanismo de antagonismo capaz de estimular la producción de β -glucosidasa, pero no de endoglucanasa, ni exoglucanasas. De acuerdo con los resultados presentados aquí, la evaluación previa de antagonismo en placas podría ser usada como parámetro para evaluar la posibilidad de adaptación y crecimiento de consorcios de microorganismos que van a ser utilizados en la degradación de un material, como lo sugieren

Molla, Abd-Aziz y Hanafi (2001). Sin embargo, es posible que inhibiciones en el crecimiento, causadas por la producción de metabolitos secundarios puedan estimular mecanismos enzimáticos, como ocurrió con la actividad β -glucosidasa en los consorcios con B19 en medio con celulosa y al mismo tiempo inhibir otros (endoglucanasas y exoglucanasas).

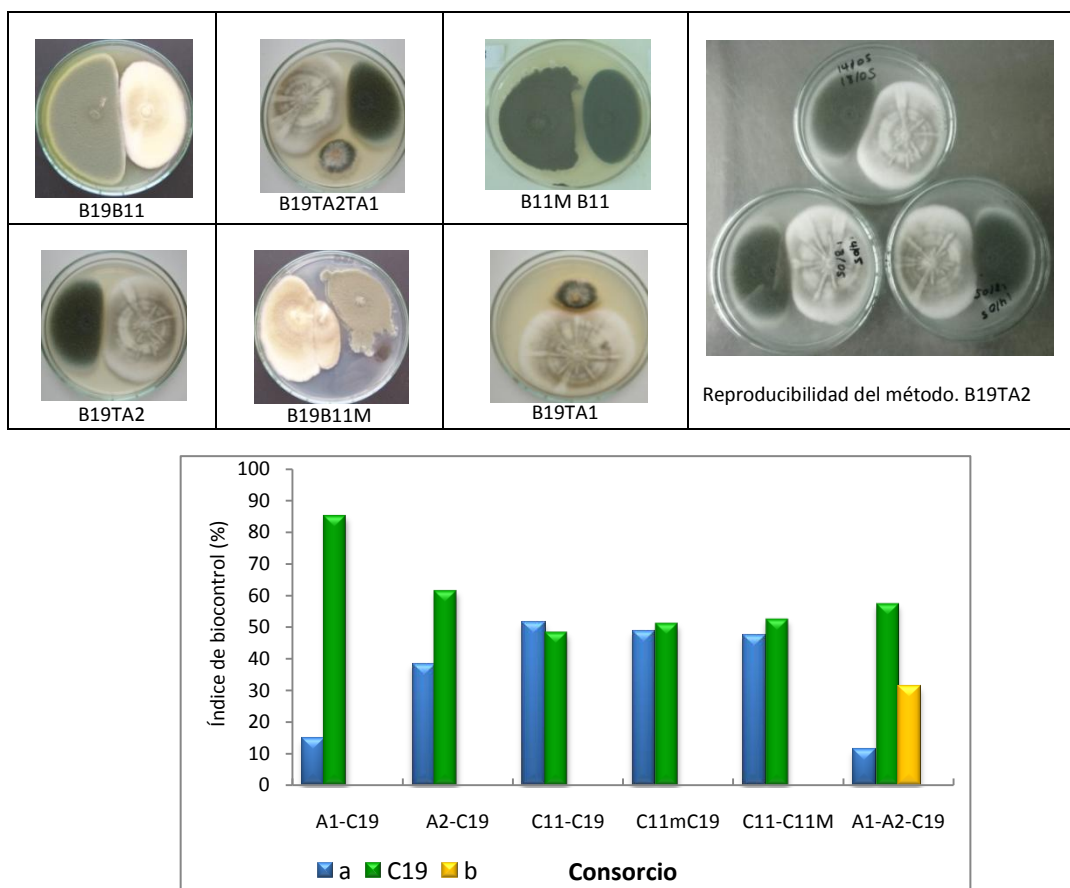


Figura 19. (a) Aspecto del antagonismo en placa entre las cepas de hongos filamentosos B7, B11, B11M, B19, TA1 y TA2. (b) Índice de biocontrol de la cepa B19 con las cepas B11, B11M, TA1 y TA2 en medio PDA. La barra azul muestra el desarrollo de la primera cepa del consorcio. La barra verde, muestra el crecimiento de B19. Se presenta solo un consorcio de tres cepas, donde la tercera cepa es representada por la barra amarilla. Cada barra corresponde al promedio de tres repeticiones.

Se observa que B19 ejerce el mayor control sobre TA1 y TA2 y que el efecto es similar cuando se crecen las tres cepas en consorcio. Probablemente B19 posee algún mecanismo de antagonismo que le otorga ventajas competitivas por espacio y posiblemente por nutrientes. Sin embargo, estas capacidades no se reflejan en la actividad celulolítica, pues a pesar de que no hay inhibición en el crecimiento de las colonias de B19, si hay inhibición de la actividad endoglucanasa y exoglucanasa y ninguno de los consorcios logra una actividad mayor que la

de la cepa crecida individualmente. Sin embargo, la competencia al parecer estimula la actividad β -glucosidasa como ya se mencionó.

El método de análisis de antagonismo basado en imágenes del crecimiento de los hongos es ventajoso pues tiene en cuenta varios mecanismos como competición por espacio y nutrientes, producción de metabolitos antifúngicos y micoparasitismo (Szekeres y otros, 2006). Aunque los ensayos de confrontación in vitro son aplicados para la evaluación de habilidades antagonistas de algunos hongos y han probado correlacionar con estudios in vivo (Arisan-Atac y otros, 1995) para el caso de la influencia del antagonismo sobre la actividad de consorcios sería necesario otro tipo de pruebas que tengan en cuenta metabolitos producidos a partir de celulosa, los cuales pueden tener mayor efecto sobre la actividad enzimática que los que afectan la producción de estructuras y crecimiento de colonias.

Debido a las diferencias en el crecimiento y desarrollo fúngico en medio sólido en comparación con medio líquido en agitación, y a que el efecto de los consorcios es diferente de acuerdo con la enzima que va a ser determinada, la evaluación de antagonismo en PDA no puede ser el parámetro para la conformación de consorcios eficientes por su actividad celulolítica. Posiblemente los resultados de antagonismo en placa sean aplicables a la actividad endo y exoglucanasa, pero es necesario validar la información obtenida aquí, de acuerdo con la especie y cepa de los hongos que van a ser comparados. Se requiere entonces la evaluación clara del efecto sobre la enzima deseada.

Otros autores han reportado aumentos de 1,2 veces en la actividad β -glucosidasa con el co-cultivo de *Thermoascus aurantiacus*, y *Aspergillus niger* en comparación con el monocultivo de *A. niger* crecido solo (Stoilova y otros, 2005). En el co-cultivo hay diferencia en la actividad celulasa de acuerdo con el momento de inoculación, con mejores resultados cuando *A. niger* es inoculado 48 h después de *T. aurantiacus*. En este reporte se demostró que debido a la diferencia en las tasas de crecimiento individuales de los hongos la tasa de producción de enzimas y la posible dominancia de un hongo sobre el otro, la cantidad de inóculo y el tiempo de inoculación tienen que ser ajustados cuidadosamente, ya que a mayor tiempo transcurrido entre la primera y la segunda inoculación, la actividad β -glucosidasa es menor. En un estudio similar en bagazo de caña se obtuvo el sinergismo de una cepa de *T. reesei* en co-cultivo con *A. niger* con el aumento de 85 % en la actividad endoglucanasa y 147% en la B-glucosidasa (Gutierrez-Correa y otros, 1999).

En general es posible que los resultados del co-cultivo de hongos hayan sido afectados por el tiempo de inoculación de las cepas de los consorcios. Se reportó sinergismo solamente para las actividades celulasa y β -glucosidasa cuya mayor actividad se observó cuando la segunda especie fue inoculada 24 horas después de la primera.

Aunque es posible que la actividad enzimática o la producción de enzimas no sea potencializada con el co-cultivo, sería necesario evaluar la hidrólisis de la celulosa a lo largo del mismo, ya que la actividad endo y exoglucanasa puede verse afectada por la celobiosa producida inicialmente. Así, aunque la enzima esté presente no tiene actividad. Si este fuera el caso, sería importante incluir un hongo capaz de generar alta actividad β -glucosidasa o adicionar esta enzima de una fuente externa, de acuerdo con recomendaciones de la literatura (Alam y otros, 2005).

Los resultados obtenidos de co-cultivo en sustrato semisólido podrían mejorar en medio sólido, teniendo en cuenta que se ha reportado que en estas condiciones la colonización del sustrato podría estar acompañada de mejores asociaciones simbióticas, donde cada especie tiene su propio nicho de crecimiento y degradación de sustrato. Así mismo, la menor tasa de crecimiento podría generar mayor equilibrio de la población (Dueñas y otros, 1995). Se ha reportado la potenciación de la actividad enzimática a través del co-cultivo de *T. reesei* y *A. niger* o *A. phoenicis*, con títulos de actividad de xilanasas de 2600 ± 2800 IU/g peso seco (Pandey y otros, 2004). Se hacen necesarias evaluaciones posteriores, que tengan en cuenta además tiempo de inoculación de las cepas del consorcio y tamaño del inóculo, que permitan optimizar la actividad celulasa de cada cepas individualmente en los consorcios.

6.3 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA *IN VITRO*, EN CELULOSA Y TUSA DE PALMA DE ACEITE, DE CONSORCIOS DE ENZIMAS PRODUCIDAS POR HONGOS CULTIVADOS INDIVIDUALMENTE

Teniendo en cuenta que los objetivos 1 y 2 buscaban evaluar la inducción de actividad celulolítica de los hongos por celulosa y tusa, a través de la determinación de actividad endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa, indirectamente con el uso de sustratos específicos para cada enzima, el tercer objetivo buscó determinar el efecto degradador de las enzimas producidas directamente sobre el sustrato tusa, en comparación con celulosa, de

modo que se tenga una visión completa del potencial celulolítico *in vitro* de los consorcios de hongos provenientes de bosque alto-andino en tusas de palma de aceite.

Para la determinación de capacidad hidrolítica de consorcios de enzimas fueron obtenidos los sobrenadantes de cada una de las cepas a las 300 horas de cultivo en celulosa. Los sobrenadantes fueron caracterizados individualmente por su actividad endoglucanasa y exoglucanasa antes de la conformación de los consorcios (Figura 20). Los consorcios se obtuvieron de la mezcla de una proporción 1:1 de los sobrenadantes individuales.

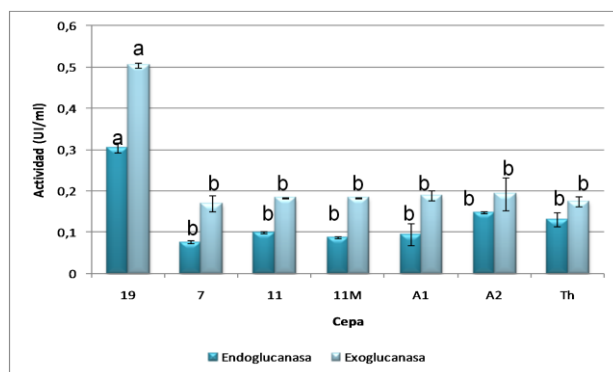


Figura 20. Actividad endoglucanasa y exoglucanasa de los sobrenadantes utilizados para la hidrólisis. Cepas de bosque altoandino: B19, B7, B11 y B11M. Cepas aisladas de tusa: TA1 y TA2. Th: *T. harzianum*. Cada barra corresponde al promedio de tres repeticiones. Cepas c Letras diferentes indican diferencias en la actividad

La actividad hidrolítica de los sobrenadantes en celulosa y tusa, se presenta en la figura 21. Se determinó que hay efecto significativo de la interacción consorcio*sustrato ($p < 0,01$). Los análisis estadísticos del efecto de los consorcios sobre la actividad hidrolítica se presenta en el anexo 8. La mayor hidrólisis se produjo en tusa, excepto en el consorcio B19TA1TA2. Se observó, sin embargo, que el sobrenadante de la cepa B19 produjo significativamente mayor actividad hidrolítica, que las demás cepas y consorcios evaluados.

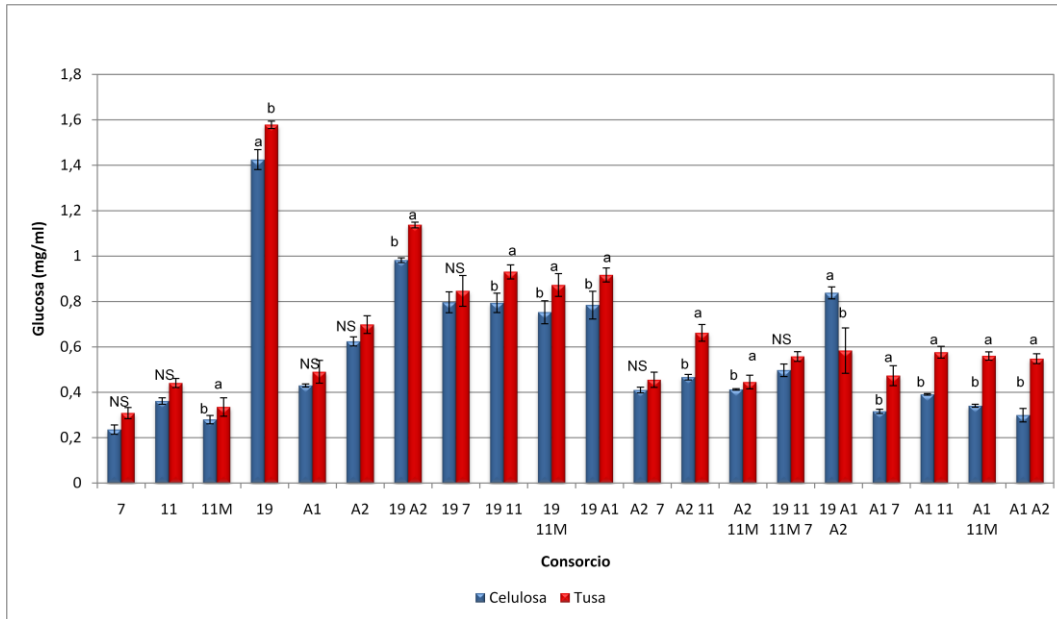


Figura 21. Hidrólisis de celulosa y tusa producida por sobrenadantes de consorcios de enzimas con diferente actividad. Cada barra corresponde al promedio de tres repeticiones. Cepas de bosque altoandino: B19, B7, B11 y B11M. Cepas aisladas de tusa: TA1 y TA2. Th: *T. harzianum*. Letras diferentes indican diferencias en la actividad enzimática en los sustratos evaluados.

Teniendo en cuenta que B19 presentó la mayor hidrólisis, posiblemente porque la actividad enzimática del sobrenadante de esta cepa era tres veces mayor que el de las demás cepas en estudio, se realizó un nuevo experimento, con el sobrenadante de B19 diluído 1:3.5, con lo que se esperaba que las actividades endoglucanasa y exoglucanasa fueran similares a las exhibidas por los sobrenadantes de las otras cepas. La actividad endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa de los sobrenadantes para el segundo experimento se presentan en la Figura 22.

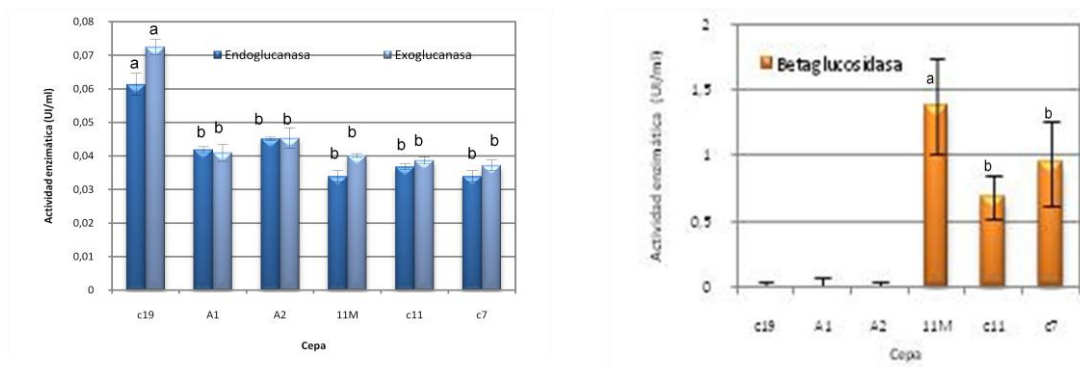


Figura 22. Actividad enzimática de los sobrenadantes utilizados para el experimento de hidrólisis. Cada barra corresponde al promedio de tres repeticiones. Cepas de bosque altoandino: B19, B7, B11 y B11M. Cepas aisladas de tusa: TA1 y TA2. Th: *T. harzianum*. Letras diferentes indican diferencias significativas en la actividad enzimática en los sustratos evaluados.

Se realizó la hidrólisis de tusa y celulosa por consorcios de sobrenadantes en las condiciones mencionadas. Los resultados se presentan en la Figura 23.

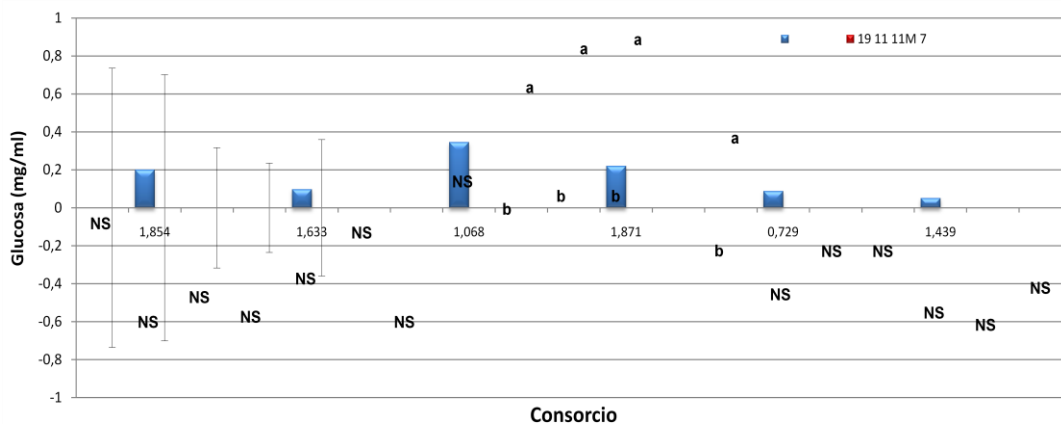


Figura 23. Hidrólisis de celulosa y tusa producida por sobrenadantes de consorcios de enzimas actividad homogénea. Cada barra corresponde al promedio de tres repeticiones. Cepas de bosque altoandino: B19, B7, B11 y B11M. Cepas aisladas de tusa: TA1 y TA2. Th: *T. harzianum*. Letras diferentes indican diferencias significativas. NS: No hay diferencias significativas.

Se observó que B19 produjo la mayor hidrólisis en comparación con los demás sobrenadantes producidos por cepas individuales, aunque la diferencias fueron menores que las presentadas en el experimento anterior. Teniendo en cuenta este hecho, la hidrólisis de B19 fue usada como punto de comparación de la producida por los consorcios y se asumió que producía una hidrólisis de 100%. De acuerdo con el análisis de varianza, hay diferencias altamente significativas en la hidrólisis debidas a la interacción consorcio*sustrato ($p < 0,01$) (anexo 9). En celulosa las diferencias fueron menores. En tusa, los consorcios de B19 con B11, B11M, TA1 y Th alcanzaron hidrólisis mayores en un 86, 110, 111 y 66%, respectivamente a la mostrada por B19 individual, como se presenta en la Tabla 2, por lo cual se puede concluir que hay un efecto sinérgico entre dichos sobrenadantes.

Cepa o consorcio	Hidrólisis respecto a B19 (%)	
	Celulosa	Tusa
B19	100 %	100%
B11	50,08	62,27
B7	32,68	43,58
B11M	38,76	47,37
Th	30,57	42,29
TA1	59,54	69,24
TA2	86,48	98,70
B19B7	89,86	127,13
B19B11	108,94	186,73
B19B11M	112,41	210,07
B19TA1	116,29	211,79
B19Th	82,59	166,23
B19TA2	98,13	91,38
TA1 TA2	86,73	87,93
B11B11MB7	46,95	49,09
B19TA1TA2	90,28	90,78
B19B11 B11MB7	57,765	59,94
TA1B11B11MB7	38,51	42,97
TA2 11 B11MB7	51,34	61,84

Tabla 3. Comparación del porcentaje de hidrólisis de celulosa y tusa del sobrenadante de B19, respecto a consorcios de sobrenadantes. Hidrólisis por 2 horas en buffer acetato a 45°C en agitación a 175 r.p.m. Cada valor corresponde al promedio de tres repeticiones.

Es interesante que a pesar de haberse diluído la actividad del sobrenadante producido por B19 para la conformación de los consorcios de enzimas, la hidrólisis de la tusa por los consorcios B19B11, B19B11M, B19TA1 fue similar a la obtenida por B19 individualmente en el primer experimento, donde la actividad era 3 veces mayor. Aunque en este caso la dilución se refiere a endo y exoglucanasas, un hecho similar ha sido reportado para B-glucosidasa por Jørgensen, y otros (2005) quien observó que la adición del doble de actividad B-glucosidasa, no resulta en un aumento en la sacarificación del sustrato. Para probar si ocurre un fenómeno similar para las endoglucanasas y las exoglucanasas sería necesario evaluar extractos purificados de enzimas. Estos resultados muestran una posibilidad de reducción de costos de la hidrólisis de la tusa con el uso de sobrenadantes de cultivos producidos individualmente, ya que es posible conformar consorcios con sobrenadantes con menor actividad enzimática, los cuales pueden ser obtenidos en la mitad del tiempo de incubación con la consecuente reducción en el consumo de energía, en el caso de B19. Es necesario evaluar la relación de la actividad enzimática con la concentración del sustrato, pues es posible que mayores concentraciones de sustrato aumenten la efectividad de la hidrólisis de acuerdo con los resultados de Jørgensen, y otros (2005) con B-glucosidasa.

Cuando se comparó la hidrólisis de cada sobrenadante individual con la obtenida cuando estaba en consorcio con B19, lo cual se presenta en la Tabla 3, se observó que en tusa la

hidrólisis del consorcio del sobrenadante B19 con TA1 fue 306% mayor que la obtenida por la TA1 individualmente. Para B11M la hidrólisis con B19 fue 441% mayor, en comparación con B11M individual. En celulosa, aunque en todos los casos la hidrólisis aumentó, la proporción del aumento fue menor. Solamente en el consorcio con TA2 la hidrólisis fue mayor en celulosa que en tusa.

Cepa	Actividad Endoglucanasa (UI /mL)	Hidrólisis de la cepa individual (mg glucosa/mL)		Hidrólisis del consorcio con B19 (mg glucosa/mL)		Porcentaje hidrólisis del consorcio con B19 (%)	
		Celulosa	Tusa	Celulosa	Tusa	Celulosa	Tusa
B19	0,061	0,721	0,707	-	-	-	-
TA1	0,041	0,429	0,489	0,839	1,498	195,571	306,339
TA2	0,045	0,624	0,698	0,708	0,646	113,461	92,5501
B 11	0,036	0,361	0,44	0,786	1,32	217,728	300
B 7	0,034	0,235	0,308	0,64	0,89	272,340	288,96
Th	0,059	0,22	0,29	0,59	1,17	268,182	403,448
B11M	0,034	0,279	0,335	0,81	1,48	290,323	441,791

Tabla 4. Evaluación de la potenciación de B19 sobre la acción hidrolítica de los sobrenadantes de cinco cepas de hongos vs. actividad endoglucanasa y relación de la actividad hidrolítica individual y de los consorcios.

Es importante determinar la sinergia entre las enzimas cuando actúan en consorcio. De acuerdo con Andersen y otros (2008.) una medida de la sinergia puede ser calculada como la proporción de la actividad exhibida por una mezcla de componentes dividida por la suma de actividades de los componentes por separado y la cual puede obtenerse con base en la formación de producto, o en la medida de la conversión del sustrato. A esta medida se le denomina grado de sinergia (DS, por sus siglas en inglés). De acuerdo con Andersen, cuando el DS es mayor que 1 se dice que hay sinergia entre los componentes del consorcio. Si es menor que 1 hay competencia.

Con la información obtenida de la hidrólisis de los consorcios y las cepas individuales, se calculó el DS de los consorcios con base en la concentración de glucosa obtenida como producto de la hidrólisis de celulosa y tusa por los sobrenadantes correspondientes a una mezcla de enzimas endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa, producidas por cada cepa (Tabla 4). Se determinó que ocurre sinergia de los consorcios solamente en tusa, en los consorcios B19B11, B19B11M, B19TA1 y B19Th, con valores de DS mayores que 1. En los demás consorcios hay competencia, tanto en tusa como en celulosa, ya que el DS es menor que 1. Es interesante la sinergia entre B19, la cepa con mayor actividad endoglucanasa y exoglucanasa con B11 y B11M, cepas con alta actividad β -glucosidasa, en comparación con

TA1 y TA2. En estos consorcios la endoglucanasa y la exoglucanasa habrían iniciado la hidrólisis y la β -glucosidasa habría hidrolizado la celobiosa producida por las dos primeras para producir glucosa, como ha sido descrito en la literatura como uno de los posibles mecanismos de acción del complejo de enzimas celulasa. Dicho efecto se ha observado en consorcios establecidos de enzimas de *A. niger* con *T. reesei*, este último deficiente en β -glucosidasa, esencial para convertir la celobiosa en glucosa (Alam y otros, 2005). El sinergismo de las endoglucanasas y exoglucanasas con la β -glucosidasa, ha sido descrito en la interacción de enzimas de *P. pinophilum* y *T. koningii* (Wood y McCrae, 1986). La misma explicación, sin embargo, no se aplica al consorcio B19TA1, el cual tiene un DS mayor que 1 pero la actividad β -glucosidasa de las dos cepas es muy baja.

Los resultados obtenidos en el presente estudio no están de acuerdo con la afirmación de Andersen (2008), de que como regla general los más altos DS ocurren en sustratos altamente cristalinos (como celulosa cristalina y algodón) y disminuyen con la disminución de la cristalinidad del sustrato. En este caso los mayores DS corresponden a los consorcios obtenidos en tusa, sustrato de menor cristalinidad que la celulosa microcristalina, donde los DS fueron menores.

Consortio	Grado de sinergia (DS)	
	Celulosa	Tusa
B19B7	0,669	0,877
B19C11	0,726	1,151
B19B11M	0,81	1,420
B19TA1	0,729	1,252
B19TA2	0,526	0,460
B19Th	0,627	1,173
B19TA1TA2	0,367	0,339
B19B11B11MB7	0,2608	0,237
TA1TA2	0,5940	0,5236
B11B11MB7	0,3864	0,3204
TA1 B11 B11M 7	0,2127	0,1932
TA2 B11 B11M 7	0,2468	0,2455

Tabla 5. Grado de sinergia de los consorcios evaluados, correspondiente a la actividad de la mezcla / Sumatoria de la actividad individual observada Cada medida corresponde al promedio de tres repeticiones.

La hidrólisis producida por B19 de 0,721 y 0,707 g/L, en celulosa microcristalina y tusa respectivamente, generada por sobrenadantes con 0,3 UI /mL de actividad endoglucanasa y 0,5 de actividad exoglucanasa es similar a la obtenida por Ariffin y otros (2008) de 0.73 g/L de azúcares reductores en tusa sin tratar utilizando una enzima pura que contenía 56.5 UI /mL FPasa, 147.5 UI /mL CMCasa, y 16.8 UI /mL β -glucosidasa con la que la hidrólisis produjo.

Considerando la diferencia en la actividad de las enzimas utilizadas en este estudio, se podría concluir que hay una alta eficiencia de los sobrenadantes de B19 utilizados en el presente estudio. Es importante entonces la evaluación posterior de pretratamientos que permitan hacer más disponible la celulosa para la acción de las enzimas y sea posible aumentar su eficiencia.

En el presente estudio se determinó que los consorcios B19B11, B19B11M y B19TA1 obtuvieron 1,5 g de azúcares reductores/g de tusa 5% (W/V) y 0,8 g/g de celulosa 5% (W/V) con sobrenadantes con 0,065 y 0,075 UI /mL de actividad endoglucanasa y exoglucanasa para B19 y 0,04 para las demás cepas. Este resultado está de acuerdo con los obtenidos previamente por Umikalsom, y otros (1997) quien obtuvo 0,7 g azúcares reductores/g de tusa delignificada (78%celulosa y 5,5 de lignina) con enzimas de *Chaetomium globosum* con 15UI /mL PFasa, 428 CMCasa (Endoglucanasa) y 90 β -glucosidasa. El sobrenadante de B19 actuando individualmente produjo 0,75 g de azúcares reductores tanto en tusa como en celulosa. Otros autores reportaron que un hongo endófito aislado del paramo de Cruz Verde (Cundinamarca) fue capaz de producir más de 25 g/L de azúcares reductores en 6 días con tusa pretratada químicamente como fuente de carbono, posiblemente por acción de endo y exoglucanasas (González, Jiménez y Susa, y otros 2008). Este dato sustenta la importancia de evaluaciones de pretratamiento de la tusa con el fin de aumentar la capacidad de hidrólisis enzimática. Sin embargo, no es comparable con el obtenido por las cepas en estudio, cuya evaluación se realizó a las 2 horas de incubación y no es posible extrapolar a los seis días pues no se conoce la linealidad de la reacción. En general, se podría afirmar que con el tiempo la digestibilidad de la tusa se hace mayor debido tanto a una reducción del índice de cristalinidad de la celulosa como a un aumento del área superficial de la misma (Park, y otros 2010). Se hace necesarias evaluaciones más detalladas para determinar el tipo de sinergismo observado. Así mismo, sería necesaria la evaluación en el tiempo, donde se relacionarían además factores de estabilidad de la mezcla de enzimas del sobrenadante. Es posible que los consorcios que resultaron efectivos en el aumento de la digestión de la tusa contribuyan a disminuir la rugosidad de la superficie de la celulosa cristalina con el aumento del tráfico de las celulasas, el aplanado de la superficie, la eliminación de obstáculos y el aumento del número de entradas y salidas de las enzimas lo cual reduce la congestión, mejoran la movilidad de las celulasas y aumentan la eficiencia de la hidrólisis (Igarashi, y otros 2011).

7 CONCLUSIONES

Esta investigación ha permitido determinar la capacidad celulolítica *in vitro* de consorcios de hongos provenientes de un transepto de bosque alto andino del Parque Natural Nacional de Los Nevados y de tusas de palma de aceite en descomposición sobre dos sustratos, tusa y celulosa microcristalina en condiciones de laboratorio, de acuerdo con los objetivos propuestos:

Con la caracterización del crecimiento y actividad celulolítica de los aislamientos de hongos provenientes de bosque alto-andino y de tusas de palma de aceite en descomposición, se puede concluir que en las condiciones evaluadas la tusa genera la mayor producción de proteínas en las cepas evaluadas, sin embargo, la celulosa microcristalina induce las mayores actividades endoglucanasa y exoglucanasa, en la cepa B11M a las 156 horas de incubación y en la cepa B19 a partir de las 204 horas. La cepa B7, por su parte, tiene potencial por la actividad β -glucosidasa obtenida. Estos resultados corroboran lo reportado en la literatura, en relación con que no se conocen hongos capaces de generar alta actividad endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa, simultáneamente.

En las condiciones evaluadas, tanto en celulosa microcristalina como en tusa, el co-cultivo de los hongos en estudio estimula principalmente la producción de proteínas en los consorcios evaluados pero no las actividades endoglucanasa y exoglucanasa, en comparación con las exhibidas por la cepa B19, aunque las actividades específicas de los consorcios B19B11 y B19TA2 sí aumentaron, lo cual indicaría que la actividad por unidad de biomasa aumenta, es decir que estos consorcios son capaces de generar actividad enzimática por unidad de biomasa. La actividad β -glucosidasa al parecer sí es estimulada por los consorcios de hongos co-cultivados en los cuales aumenta en comparación con la actividad de B19 crecida individualmente y usada como parámetro de comparación. Sin embargo ninguno de los consorcios genera mayor actividad β -glucosidasa que las cepas B7 y B11, las de mayor actividad individualmente a las 300 horas de incubación en las curvas de actividad, lo cual confirma que la interacción sinérgica de los hongos co-cultivados no está directamente relacionada con el crecimiento, como producción de biomasa, sino que es responsable del aumento en la producción de enzimas (Gutierrez-Correa y otros, 1999). La reducción en la actividad endoglucanasa y la exoglucanasa posiblemente se explicarían por el interbloqueo, observado en general entre todas las cepas, en la evaluación de antagonismo en placa, lo

cual podría indicar que algunos metabolitos producidos por las cepas individuales lograrían reducir la generación de actividad de estas enzimas. Sin embargo, estos mismos estimularían la actividad β -glucosidasa, lo cual debería ser estudiado posteriormente.

A través de este estudio se determinó la capacidad de hidrólisis de tusa y celulosa, *in vitro*, por consorcios de enzimas obtenidos a partir de la mezcla de los sobrenadantes producidas por hongos cultivados individualmente. Al respecto se ratificó el potencial de la mezcla de enzimas presentes en los sobrenadantes de B19 con la conformación de consorcios con los sobrenadantes producidos individualmente por B11, B11M, y TA2, los cuales aún con bajas actividades enzimáticas aumentan la hidrólisis de tusa de las cepas acompañantes hasta alrededor de 400%. La acción de dichos consorcios podría ser complementada con la adición oportuna del sobrenadante de B7 de gran interés por su actividad β -glucosidasa. Los resultados permiten concluir que La eficiencia de la hidrólisis de tusa por los consorcios de sobrenadantes B19B11, B19B11M, B19TA1 es mayor que la obtenida por sobrenadantes producidos por las cepas individualmente. Esta conclusión es posible ya que los consorcios en los cuales la actividad enzimática de B19 fue diluida, alcanzaron valores de hidrólisis similares a los obtenidos por el sobrenadante de B19 con actividad tres veces mayor. El hecho de que actividades menores requieran menor tiempo de incubación significa una economía de energía que debe entrar al sistema, lo cual debe ser tenido en cuenta para estudios posteriores.

La utilización de consorcios de sobrenadantes procedentes del cultivo de los hongos en estudio tiene gran potencial para el tratamiento inicial de la tusa después de la extracción de aceite, teniendo en cuenta que la temperatura después del proceso de esterilización en la planta de beneficio podría ser óptima para la acción de las celulasas. Así, se podría iniciar la hidrólisis a glucosa de las tusas más rápidamente, lo cual podría permitir una mayor velocidad de colonización por microorganismos degradadores por un aumento en la concentración de sustrato fácilmente utilizable y por lo tanto podría reducir el tiempo de su descomposición, lo cual debería ser evaluado posteriormente. Por otra parte, estudios posteriores podrían dirigirse hacia la optimización de la hidrólisis para generación de glucosa con diferentes fines.

8 RECOMENDACIONES

En concordancia con los resultados obtenidos y la información referenciada en este estudio para la producción de enzimas con actividad celulolítica, sería recomendable la realización de estudios para la optimización de la composición del medio de cultivo y condiciones de incubación de los hongos promisorios que pueden ser seleccionados a partir del presente estudio. El potencial de dichas cepas podría ser optimizado con la evaluación de modificaciones en fuente y concentración de nutrientes, pH, tamaño de partícula, adición de inductores de celulasas, tiempos de cultivo, entre otros. Debe considerarse la realización de pretratamientos químicos o biológicos de la tusa de palma, con el fin de aumentar la eficiencia de las enzimas. Dentro de los tratamientos biológicos es recomendable explorar con especies de hongos nativos del bosque altoandino y ampliar la búsqueda a microorganismos degradadores de tusa a la zona de producción de palma de aceite.

Es importante comparar el potencial biotecnológico de B19 con una cepa de *T. reesei* caracterizada previamente por su actividad celulolítica, así como el potencial de las celulasas producidas por las cepas de este estudio con celulasas comerciales, de modo que se tenga una mejor dimensión de los aportes reales de estos microorganismos. Deben incluirse estudios de la estabilidad de los extractos enzimáticos. Así mismo, en estudios posteriores deberían tenerse en cuenta también enzimas degradadoras de hemicelulosa y lignina, las cuales pueden ser parte de las enzimas celulolíticas expresadas en los hongos del presente estudio.

Ampliar la investigación en caracterización de la tusa en Colombia y pretratamientos que hagan la celulosa de la tusa más disponible para la acción enzimática, incluyendo la exploración de la factibilidad del pretratamiento biológico de la tusa con especies nativas de hongos procedentes del bosque altoandino, y extender la búsqueda microorganismos degradadores de tusa a la zona de producción de palma de aceite.

9 BIBLIOGRAFÍA

- Adney, W., y otros. Probing the role of N-linked glycans in the stability and activity of fungal cellobiohydrolases by mutational analysis. *Cellulose* 16 (2009): 699–709.
- Adsul, M.G., Ghuleb, J.E., Singhb, R., Shaikhb, H., Bastawdea, K.B., K.B. Gokhalea, K.B. & Varmab, A.J.. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulose and xylanase production. 2004.
- Aguiar, C. I. Biodegradación de celulosa de bagazo de caña de azúcar por hongos celulolíticos. *Ciencia y tecnología alimentaria. Vol 3:2.*, 2001: 117-121.
- Ahamed, A. ; Vermette, P. Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor. *Biochemical Engineering Journal* 42 (2008): 41-46.
- Alam, M.Z., N. Muhammad, y M. Mahmat. Production of cellulase from oil palm biomass as substrate by solid state bioconversion. *American Journal of Applied Sciences.*, 2005.
- Andersen, N., Johansen, K., Michelsen, M., Stenby, E., Krogh, M. ; Olsson, L. Hydrolysis of cellulose using mono-component enzymes shows synergy during hydrolysis of phosphoric acid swollen cellulose (PASC), but competition on Avicel. *Enzyme and microbial Technology.* 42 (2008.): 362-370.
- Arantes, V., y J.N. Saddler. «Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. Review.» *Biofuels* 4, nº 3 (2011).
- Ariffin, H., M.A. Hassan, Md S. UmiKalsom, N. Abdullah, F.M. Ghazali, y Y. Shirai. Production of Bacterial Endoglucanase from Pretreated Oil Palm Empty Fruit Bunch by *Bacillus pumilus* EB3. *Journal of bioscience and bioengineering* 106, nº 3 (2008): 231–236.
- Arisan-Atac, I., Heidenreich, E., Kubicek, C.P. Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting identifies subgroups of *Trichoderma viride* and other *Trichoderma* sp. capable of chestnut blight biocontrol. *FEMS Microbiol. Lett.* 126 (1995): 249– 256.
- Atlas, R. & Bartha, R. *Ecología Microbiana y microbiología ambiental Cuarta edición.* . . Madrid.: Addison Wesley Ed, 2002.
- Avellaneda, L.M., E. Torres Rojas, C.P. Guevara, y N. Rojas. *Aislamiento y caracterización de microorganismos con potencial celulolítico presentes en suelos del Parque Nacional Natural de los Nevados.* . Informe de Avance de ejecución, Bogotá: GeBiX, 2009.
- Bellemain, E., T. Carlsen, C Brochmann, E. Coissac, y P. Kausrud, H. Taberlet. «ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biase.» *BMC Microbiology* 10, nº 189 (2010).
- CA., Petti. «Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing.» *CID* 44:44: (2007): 1108 -121414.
- Chen, Y., y Stipanovic. «Effect of digestion of pure cellulose on crystallinity and average chain length for bacterial and microcrystalline celluloses.» *Cellulose* 14 (2007): 283-293.

Chew, T.L. & Bhatia, S. Catalytic processes towards the production of biofuels in a palm oil and oil palm biomass-based biorefinery. *Review. Bioresource Technology* 99 (2008): 7911–7922.

Creaser EH, Porter RL, Britt KA, Pateman JA, Day CK. Purification and preliminary characterization of alcohol dehydrogenase from *Aspergillus nidulans*. *Biochem J* 225 (1984): 449–54.

Dashtban, M., H. Schraft, y W. Qin. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *Review. Int. J. Biol. Sci.* 5, nº 6 (2009): 578-595.

Díaz, A. Universidad Militar Nueva Granada. . . *Guías de Prácticas de Laboratorio. Cuantificación de inóculo. Fermentación líquida.* . UMNG, 2008.

Dueñas, R., R. Tengerdy, y M. Gutiérrez-Correa. Cellulase production by mixed fungi in solid-substrate fermentation of bagasse. *Word Journal of microbiology and biotechnology.* Volume 11, nº 3 (1995): 333-337.

Duncan, S.M., Farrell, R.L. Thwaites, J.M., Held, B.W. Arenz, B.E., Jurgens, J.A. & Blanchette, R.A. «Endoglucanase-producing fungi isolated from Cape Evans historic expedition hut on Ross Island, Antarctica.» *Environmental Microbiology* 8, nº 7 (2006): 1212.

Emtiazi, N. Naghavi & A. Bordbar. Biodegradation of lignocellulosic waste by *Aspergillus terreus*. 2004.

Friend, J. The role of lignification in the resistance of plants to attack by pathogens. *Applied biochemistry and biotechnology* 9, nº 4 (1984).

García, J:A. Estado actual del manejo de efluentes en Colombia.. *Revista Palmas* 14 , nº Especial (1993): 141.

García-Núñez, J. A.; Cárdenas, M. M.; Yáñez-Angarita, E. (2010). Generación y uso de biomasa en plantas de beneficio de palma de aceite en Colombia. *Palmas*, 31(2), 41-48.

García-Núñez, J. A., M. García-Pérez, y K. C Das. Determination Of Kinetic Parameters Of Thermal Degradation Of Palm Oil Mill By-Products Using Thermogravimetric Analysis and Differential Scanning Calorimetry. *Transactions of the ASABE.* 51 (2008).

Ghose, V. K. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59 (1987): 257-268.

González, A.F., I.C. Jiménez, M. Rodríguez, S. Restrepo, y J.M. Gómez. Biocombustibles de segunda generación y Biodiesel: Una mirada a la contribución de la Universidad de los Andes. *Revista de Ingeniería*, nº 28 (Diciembre 2008.).

Guevara, C., y M. M. Zambrano. Sugarcane cellulose utilization by defined microbial consortium. *FEMS Microbiol Lett* 255 (2006): 52–58.

Gutierrez-Correa, M., L. Portala, P. Morenoa, y R. Tengerd. Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. *Bioresource Technology* 68, nº 2 (1999): 173-178.

Hanif, A.; Yasmeen, A.; Rajoka, M.I. Induction, production, repression, and de-repression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* 94 (2004): 311–319.

Henrissat, B; Davies, G.J. 2011. Glycoside Hydrolases and Glycosyltransferases. Families, Modules, and Implications for Genomics. *Plant Physiology*: 157(2).

Huang, X.P., y C. Monk. Purification and characterization of a cellulase (CMCase) from a newly isolated thermophilic aerobic bacterium *Caldibacillus cellulovorans* gen. nov., sp. nov. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20 (2004): 85–92.

Iliopoulou, E., E.V. Antonakou, S.A. Karakoulia, I.A. Vasalos, A.A. Lappas, y K.S. Triantafyllidis. Catalytic conversion of biomass pyrolysis products by mesoporous materials: effect of steam stability and acidity of Al-MCM-41 catalysts. *Chem. Eng. J.* 134 (2007): 51–57.

Iliopoulou, E.F., E.V. Antonakou, S.A. Karakoulia, I.A. Vasalos, A.A. Lappas, y K.S. Triantafyllidis. Catalytic conversion of biomass pyrolysis products by mesoporous materials: effect of steam stability and acidity of Al-MCM-41 catalysts. *Ch. Chem. E.*

Itavara M, Siika-aho M & Vilkar L. Enzymatic degradation of cellulose based materials. *J. Environ. Poly. Deg.* 7 (1999): 67–73.

Jørgensen, H., A. Mørkeberg, K. B.R. Krogh, y Olsson. L. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. *Enzyme and Microbial Technology* 36 (2005): 42-48.

Kasana, R.C., R. Salwan, E. Dhar, S. Dutt, y A. Gulati. A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Current Microbiology* (2008) 57 (2008): 503–507.

Kaur, J., Chadha, B. & Saini, H. 2006. Regulation of cellulase production in two thermophilic fungi *Melanocarpus* sp. MTCC 3922 and *Scytalidium thermophilum* MTCC 4520. *Enzyme and Microbial Technology* 38 (2006): 931–936.

Kling, S.H., N.C. Carvalho, M.A. Ferrara, J.C.R. Torres, D.B. Magalhaes, y D.D.Y. Ryu. Enhancement of enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse by steam explosion pre-treatment. *Biotechnology and Bioengineering* 29 (1987): 1035-1039.

Kumar, R., Singh, R. Semi-solid-state fermentation of *Eichhornia crassipes* biomass as lignocellulosic biopolymer for cellulase and β -glucosidase production by cocultivation of *Aspergillus niger* RK3 and *Trichoderma reesei* MTCC164. . *Applied Biochemi*, 2001.

Kuo, C.H., y C.K. Lee. Enhancement of enzymatic saccharification of cellulose by cellulose dissolution pretreatments. *Carbohydrate polymers* 77 (2009): 41-46.

Lambers, H., F.S. Chapin, y T.L. Ponds. Effects of microbial pathogens. *Plant physiological ecology*, 2008: 479-489.

Lo, C-Y, Saratale., G., Chen, W-M., Bai, M-D, Chang, J. Isolation of cellulose-hydrolytic bacteria and applications of the cellulolytic enzymes for cellulosic biohydrogen production. *Enzyme and microbial technology* 44 (2009): 417-425.

López Miranda, J., Soto-Cruz, N., Rutiaga-Quiñoves, O., Medrano-Roldán, H. & Arévalo-Niño, K. Optimización del procesp de obtención enzimática de azúcares fermentables a partir de aserrín de pino. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 25 , nº 2 (2009): 95-102.

Lubertozi, D., y J.D. Keasling. Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. Research review paper. *Biotechnology Advances* 27 (2009): :53–75.

Lynd, L. R., P.J. Wimer, W. H. van Zyl, y I. S. Pretorius. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology . *Microbiol. And Molec.Biol. Rev.* 66, nº 3 (2002): 506–577.

MacDonald, J., D., Canam, T. Doering, Y. Gong, D.S. Guttman, y M.M. Campbell. «Transcriptomic responses of the softwood-degrading white-rot fungus *Phanerochaete carnos*a during growth on coniferous and deciduous wood.» *aem.asm.org*. 11 de Noviembre de 2011. <http://aem.asm.org/content/early/2011/03/25/AEM.02490-10.full.pdf> (último acceso: 11 de Noviembre de 2011).

Mandels M, Weber J The production of cellulases. *Adv. Chem Ser* (1969) 95: 391±414.

Melo, I. S., Faul, J. L. & Graeme-Cook, K. A. Relationship between in vitro cellulase production of v-induced mutants of *Trichoderma harzianum* and their bean rhizosphere competence. *Mycol. Res.* 101, nº 11 (1997): 1389-1392.

Menezes, T. & Hioshii, S.H. Efeito do tratamento de bagaco de cana na extensao da hidrolise de celulose. *Col. ITAL.*, 1982: 123-135.

Misson, M., R. Haron, M. Kamaroddin, y S. Amin. Pretreatment of empty palm fruit bunch for production of chemicals via catalytic pyrolysis. *Bioresource Technology* 100 (2009): 2867–2873.

Molla, A.H. Fakhru-Razi, A.; Abd-Aziz, S.; Hanafi, M.M. In-vitro compatibility evaluation of fungal mixed culture for bioconversion of domestic wastewater sludge. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* (2001). 17:849–856

Ojumu, T.V., B.O Solomon, B. Amigun, E. Betiku, y S.K Layokun. Cellulase Production by *Aspergillus flavus* Linn Isolate NSPR 101 fermented in sawdust, bagasse and corncob. *African Journal of Biotechnology* . 2003. Vol. 2 (6), pp. 150–152.

O`Sullivan. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose* (1997). 4. 173-207.

Park, S., J.O. Baker, M.E. Himmel, P.A. Parilla, y D.K. Johnson. «Celulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance.» *Biotechnology for Biofuels* 3, nº 10 (2010).

Pandey, A., C.R. Soccol, P. Nigam, y V. Soccol. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. Review paper. *Bioresource Technology* 29 (2000): 7469-80.

Pandey, W., Y. Zhang, H Yang, y P. Gao. Quantitative estimate of the effect of cellulase components during degradation of cotton fibers. *Carbohydrate Research* 339 (2004): 819–824.

Pečiulytė, D. Isolation of cellulolytic fungi from waste paper gradual recycling materials. *EKOLOGIJA* 53, nº 4 (2007): 11–18.

- Prasertsan, P., A.H Kittikun, A. Kungphae, y J. Maneesri. Optimization for xylanase and cellulase production from *Aspergillus niger* ATCC 6275 in palm oil mill wastes and its application. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, nº 13 (1997): 555-559.
- Prasertsan, S., y P. Prasertsan. Biomass residues from palm oil mills in thailand:an overview on quantity and potential usage. *Biomass and Bioenergy* 11, nº 5 (1996): 387-395.
- Rahman, S.H.A., J.P. Choudhury, A.L. Ahmad, y A.H. Kamaruddin. Optimization studies on acid hydrolysis of oil palm empty fruit bunch fiber for production of xylose. *Bioresource Technology* 98 (2007): 554–559.
- Rodríguez, I., y Y. Piñeros. 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, nº 2 (2007): 35-42.
- Saville, B, M. Khavine, G. Seetharam, B. Marandi, y Y-L Zuo. Characterization and Performance of Immobilized Amylase and Cellulase . *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2004: 113–116.
- Schwarz, W. H. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56 (2001): 634–649.
- Singhaniaa, R.R., Kumar Patel, A., Soccolc, C. & Pandey, A. Recent advances in solid-state fermentation. Review. *Biochemical Engineering Journal* 44 (2009.): 13–18.
- Stoilova, I.S., Gargova, S.A. & Krastanov, A.I. Production of enzymes by mixed culture from micelial fungi in solid-fermentation. *Biotechnol. & Biotechnol Eq.* 19/1 (2005).
- Szekeres, A., B. Leitgeb, L. Kredics, L. Manczinger, y C. Va'gvo" lgyi. A novel, image analysis-based method for the evaluation of in vitro antagonism. *Journal of Microbiological Methods* 65 (2006): 619–622.
- Taniguchi, M, y T. Tanaka. Clarification of Interactions among Microorganisms and Development of Co-culture System for Production of Useful Substances. *Adv Biochem Engin/Biotechnol.* 90 (2004): 35–62.
- Umikalsom, M. S., A.B. Ariff, H.S. Zulkifli, C.C. Tong, M.A. Hassan, y M.I.A. Karim. The treatment of oil palm empty fruti bunch fibre for subsequent use as substrate for cellulase production by *Chaetomium globosum* Kunze. *Bioresource technology* 62 (1997): 1-9.
- Van Soest, P.J.; Robertson, J. B.; Lewis, B. A. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science* 74 (1991): 3583-3597.
- Verma, M., S. K. Brar, R.D. Tyagi, R.Y. Surampalli, y J.R. Val'er. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* 37 (2007): 1–20.
- Wang, L.C., Y. Zhang, H. Yang, y P. Gao. Quantitative estimate of the effect of cellulase components during degradation of cotton fibers. *Carbohydrate Research* 339 (2004): 819–824.

Wang, NS. *Cellulose degradation*. <http://www.eng.umd.edu/~nsw/ench485/lab4.htm> (último acceso: 2 de September 2011).

Wen, Z., Liao, W. & Chen, S. Production of cellulases/B-glucosidase by mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. *Process Biochemistry* 40 (2005): 3087-3094.

Wood, T. & McCrae, S.I. The cellulase of *Penicillium pinopilum*. Synergism between enzyme components in solubilizing cellulose with special referencie to the involvment of two inmunologically distinct cellobiohydrolases. *Biochemistry Journal* 234 (1986): 93-99.

Yang, B., Z. Dai, S.-Y. Ding, y C.E. Wyman. «Enzymatic hydrolysis of cellulosic biomass.» *Biofuels* 2, nº 4 (2011): 421–450.

Zambrano, M. Baena, S., Venegas de Balzer, I., Alvarez, D., Torres, E., Chacón, M., López, C., Nemogá, G., Vélez, P., Moreno., P., Restrepo, S., Alvarez, L., Barraza, F.& González, J. 1.1.1. Colombian Center for genomics and bioinformatics of extreme environments. . Third progress report and final report. Phase I., 2010.

Zhang, Y.H., y otros. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. *Biotechnol Bioeng* 97 (2007): 214-223.

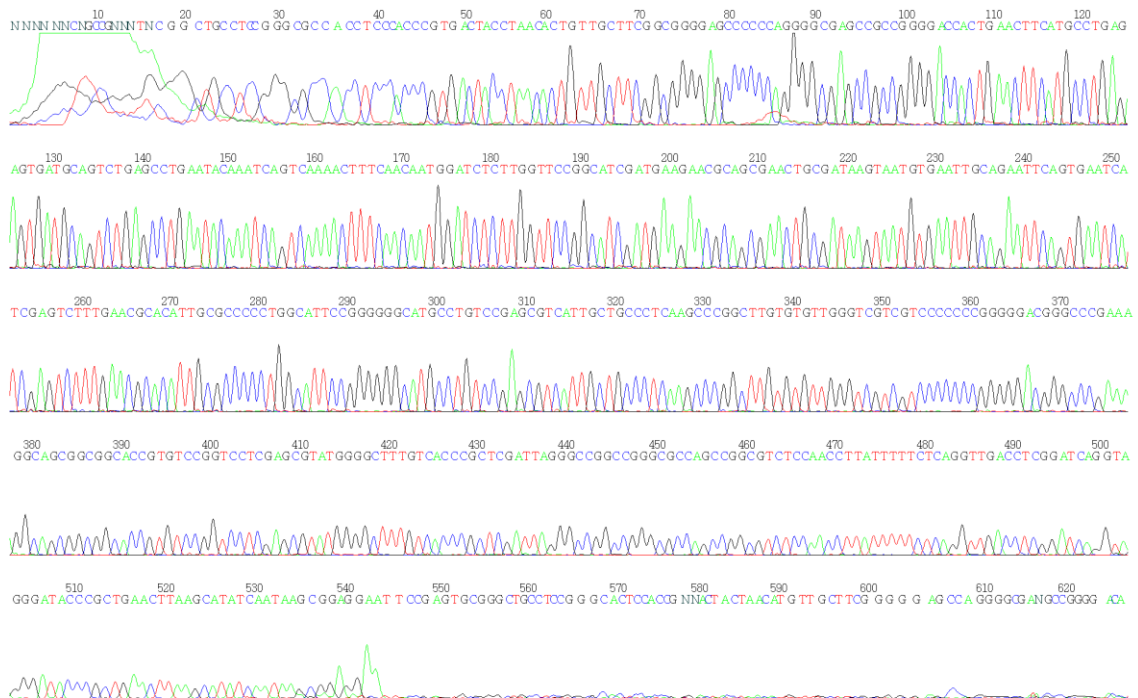
10 ANEXOS

Anexo 1. Secuencias Cepa TA1 ITS-1



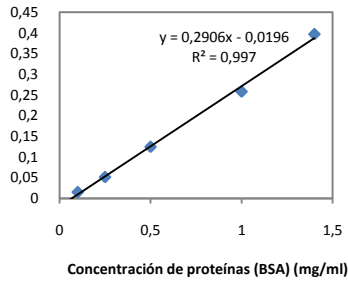
File: TA1-ITS1.ab1 Run Ended: 2011/3/3 17:35:59 Signal G:124 A:129 C:130 T:96

Sample: TA1 ITS1 Lane: 96 Base spacing: 15.834011 684 bases in 8182 scans Page 1 of 2

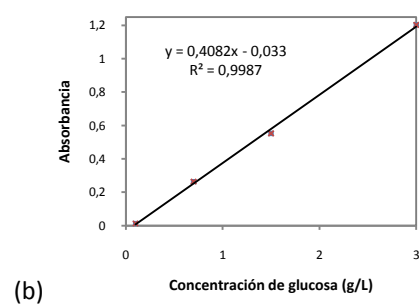
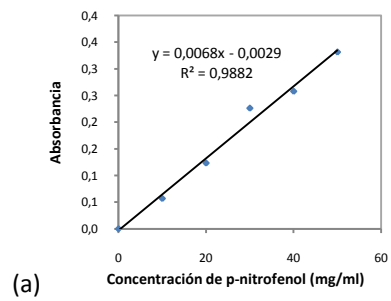


Anexo 3. Curva patrón de albúmina sérica bovino (BSA) utilizada para la determinación de curvas de crecimiento y actividad enzimática.

Curva patrón de Proteínas (Bradford)



Anexo 4. Curvas patrón p-nitrofenol y glucosa utilizadas para la determinación de actividad (a) endoglucanasa , exoglucanasa y (b) β -glucosidasa. Cada punto corresponde al promedio de tres repeticiones.



Anexo 5. Análisis de varianza de Actividad endoglucanasa en dos etapas E1 y E2. ENDO: Actividad endoglucanasa; X_ENDO: Promedio actividad endoglucanasa; CEP: Cepa; SUS: Sustrato; CEP_SUS: Interacción cepa sustrato; ENDOE: Endoglucanasa Especifica.

ETA	Dependent	HypothesisType	Source	DF	SS	MS	FValue	ProbF
E_1	ENDO	3	CEP	6	0,086432	0,014405	2,39942	0,032771827
E_2	ENDO	3	CEP*SUS	6	0,450982	0,075164	23,93384	3,40812E-15

ETA	Dependent	HypothesisType	Source	DF	SS	MS	FValue	ProbF
E_1	ENDO	3	CEP	6	0,086432	0,014405	2,39942	0,032771827
E_2	ENDO	3	SUS	1	0,014886	0,014886	4,740016	0,032842619

ETA	Dependent	HypothesisType	Source	DF	SS	MS	FValue	ProbF
E_1	X_ENDO	3	CEP*SUS	6	0,113592	0,018932	8,428152	2,85177E-05
E_2	X_ENDO	3	CEP*SUS	6	0,278238	0,046373	15,91552	7,07959E-08

ETA	Effect	Dependent	CEP	DF	SS	MS	FValue	ProbF
E_1	CEP_SUS	ENDO	C_19	1	0,02968	0,02968	4,943743	0,028369496
E_2	CEP_SUS	ENDO	C_19	1	0,433243	0,433243	137,9545	3,26201E-18
E_2	CEP_SUS	ENDO	C_7	1	0,012741	0,012741	4,057184	0,047827871

ETA	Effect	Dependent	CEP	DF	SS	MS	FValue	ProbF
E_1	CEP_SUS	ENDOE	C_112	1	2,90185	2,90185	6,537108	0,012022773
E_1	CEP_SUS	ENDOE	C_19	1	9,823564	9,823564	22,12991	7,94638E-06
E_1	CEP_SUS	ENDOE	C_7	1	2,550431	2,550431	5,745451	0,018333723
E_1	CEP_SUS	ENDOE	C_TA2	1	5,435136	5,435136	12,24394	0,00069086
E_2	CEP_SUS	ENDOE	C_11	1	1,47878	1,47878	5,527925	0,021536108
E_2	CEP_SUS	ENDOE	C_112	1	2,290793	2,290793	8,563366	0,004621822
E_2	CEP_SUS	ENDOE	C_19	1	52,63342	52,63342	196,7525	5,0868E-22
E_2	CEP_SUS	ENDOE	C_7	1	1,425449	1,425449	5,328568	0,023937317
E_2	CEP_SUS	ENDOE	C_TA1	1	1,115237	1,115237	4,168942	0,044941444
E_2	CEP_SUS	ENDOE	C_TA2	1	4,410117	4,410117	16,48575	0,000126019

ETA	Dependent	HypothesisType	Source	DF	SS	MS	FValue	ProbF
E_1	ENDOE	3	CEP	6	9,35872	1,559787	3,51379	0,003335806
E_1	ENDOE	3	SUS	1	15,69582	15,69582	35,35857	3,79057E-08
E_2	ENDOE	3	CEP	6	45,30723	7,551205	28,22767	6,98577E-17
E_2	ENDOE	3	SUS	1	29,53356	29,53356	110,4014	4,90641E-16
E_2	ENDOE	3	CEP*SUS	6	33,82216	5,637026	21,07215	5,88912E-14

ETA	Dependent	HypothesisType	Source	DF	SS	MS	FValue	ProbF
E_1	X_ENDOE	3	CEP	6	15,70331	2,617218	17,86976	2,08188E-08
E_1	X_ENDOE	3	SUS	1	22,4655	22,4655	153,3893	7,04591E-13
E_1	X_ENDOE	3	CEP*SUS	6	8,084486	1,347414	9,199835	1,35101E-05
E_2	X_ENDOE	3	CEP	6	29,85949	4,976582	33,99187	1,31839E-11
E_2	X_ENDOE	3	SUS	1	20,80514	20,80514	142,1067	1,74116E-12
E_2	X_ENDOE	3	CEP*SUS	6	21,40404	3,56734	24,36623	6,66326E-10

Anexo 6. Análisis de varianza de Actividad exoglucanasa en dos etapas E1 y E2. ENDO: Actividad exoglucanasa; X_ENDO: Promedio actividad exoglucanasa; CEP: Ceba; SUS: Sustrato; CEP_SUS: Interacción ceba sustrato; EXOE: Exoglucanasa Específica.

ETA	Dependent	HypothesisType	Source	DF	SS	MS	FValue	ProbF
E_2	EXO	3	CEP	5	54,98582	10,99716	71,43128	5,70872E-24
E_2	EXO	3	SUS	1	8,921497	8,921497	57,94894	2,24965E-10
E_2	EXO	3	CEP*SUS	5	56,80201	11,3604	73,79067	2,4894E-24

ETA	Dependent	HypothesisType	Source	DF	SS	MS	FValue	ProbF
E_1	X_EXO	3	CEP	6	0,427929	0,071321	12,28303	9,53356E-07
E_1	X_EXO	3	CEP*SUS	6	0,2584	0,043067	7,416962	8,07005E-05
E_2	X_EXO	3	CEP	5	36,11821	7,223642	30,21152	1,30537E-09
E_2	X_EXO	3	SUS	1	6,112586	6,112586	25,56474	3,60568E-05
E_2	X_EXO	3	CEP*SUS	5	36,25266	7,250532	30,32399	1,25696E-09

ETA	Effect	Dependent	CEP	DF	SS	MS	FValue	ProbF
E_2	CEP_SUS	EXO	C_19	1	65,5712	65,5712	425,913	6,1161E-29
E_2	CEP_SUS	EXO		5	111,7115	22,34229	145,1227	3,60456E-32

ETA	Effect	Dependent	CEP	DF	SS	MS	FValue	ProbF
E_1	CEP_SUS	EXOE	C_112	1	9,507266	9,507266	7,886374	0,005959652
E_1	CEP_SUS	EXOE	C_19	1	17,55054	17,55054	14,55835	0,000232046
E_1	CEP_SUS	EXOE	C_7	1	9,243227	9,243227	7,667351	0,006669861
E_1	CEP_SUS	EXOE	C_TA2	1	12,49958	12,49958	10,36852	0,001715235
E_2	CEP_SUS	EXOE	C_19	1	4235,568	4235,568	393,3599	4,92111E-28
E_2	CEP_SUS	EXOE		5	7025,957	1405,191	130,501	6,67E-31

ETA	Dependent	HypothesisType	Source	DF	SS	MS	FValue	ProbF
E_1	EXOE	3	CEP	6	17,29802	2,883004	2,391481	0,033299062
E_1	EXOE	3	SUS	1	30,75804	30,75804	25,51411	1,90698E-06
E_1	EXOE	3	CEP*SUS	6	19,88602	3,314337	2,749276	0,016117879
E_2	EXOE	3	CEP	5	3750,364	750,0728	69,65974	1,08113E-23
E_2	EXOE	3	SUS	1	976,9958	976,9958	90,73422	1,30298E-13
E_2	EXOE	3	CEP*SUS	5	3286,614	657,3228	61,04599	2,97417E-22

ETA	Dependent	HypothesisType	Source	DF	SS	MS	FValue	ProbF
E_1	X_EXOE	3	CEP	6	11,9403	1,990049	5,76671	0,000523562
E_1	X_EXOE	3	SUS	1	50,90734	50,90734	147,5179	1,12002E-12
E_1	X_EXOE	3	CEP*SUS	6	26,45701	4,409502	12,77773	6,49826E-07
E_2	X_EXOE	3	CEP	5	2612,811	522,5622	61,51634	6,75928E-13
E_2	X_EXOE	3	SUS	1	638,3057	638,3057	75,14174	7,40906E-09
E_2	X_EXOE	3	CEP*SUS	5	2116,207	423,2414	49,82424	6,77118E-12

Anexo 7. Análisis de varianza de actividad β -glucosidasa en dos etapas E1 y E2. BETA: Actividad β -glucosidasa; X_BETA: Promedio actividad β -glucosidasa; CEP: Ceba; SUS: Sustrato; CEP_SUS: Interacción ceba sustrato; BETAE: E β -glucosidasa Específica.

ETA	Dependent	HypothesisType	Source	DF	SS	MS	FValue	ProbF
E_1	BETA	3	CEP	6	15,51082	2,585137	7,425799	1,47747E-06
E_1	BETA	3	SUS	1	16,34298	16,34298	46,94515	6,72927E-10
E_2	BETA	3	CEP	6	12,9267	2,154451	21,75714	2,91525E-14
E_2	BETA	3	SUS	1	2,323931	2,323931	23,46868	7,355E-06
E_2	BETA	3	CEP*SUS	6	5,057363	0,842894	8,51213	6,0058E-07
ETA	Dependent	HypothesisType	Source	DF	SS	MS	FValue	ProbF
E_1	CEP_SUS	BETA	C_19	1	1,476265	1,476265	4,240566	0,042148618
E_1	CEP_SUS	BETA	C_TA2	1	16,61968	16,61968	47,74	5,12468E-10
E_1	CEP_SUS	BETA	C_Th	1	7,990341	7,990341	22,95223	5,97224E-06
E_2	CEP_SUS	BETA	C_11	1	4,198513	4,198513	42,39951	9,58872E-09
E_2	CEP_SUS	BETA	C_19	1	0,612894	0,612894	6,189433	0,015235615
E_2	CEP_SUS	BETA	C_7	1	0,861063	0,861063	8,695616	0,004333058
E_2	CEP_SUS	BETA	C_TA1	1	0,453894	0,453894	4,583741	0,035760714
E_2	CEP_SUS	BETA	C_TA2	1	0,49283	0,49283	4,976938	0,028893456
E_2	CEP_SUS	BETA	C_Th	1	0,687511	0,687511	6,942963	0,010353147
ETA	Dependent	HypothesisType	Source	DF	SS	MS	FValue	ProbF
E_1	X_BETA	3	CEP	6	9,994022	1,66567	7,836195	5,19645E-05
E_1	X_BETA	3	SUS	1	15,7897	15,7897	74,28309	2,29929E-09
E_1	X_BETA	3	CEP*SUS	6	9,463429	1,577238	7,420163	8,04257E-05
E_2	X_BETA	3	CEP	6	10,0278	1,6713	18,75769	1,23407E-08
E_2	X_BETA	3	SUS	1	1,578987	1,578987	17,72163	0,000238906
E_2	X_BETA	3	CEP*SUS	6	3,123586	0,520598	5,842884	0,000477765
ETA	Effect	Dependent	CEP	DF	SS	MS	FValue	ProbF
E_1	CEP_SUS	BETAE	C_112	1	14,39702	14,39702	13,2519	0,000439024
E_1	CEP_SUS	BETAE	C_7	1	8,159399	8,159399	7,51041	0,007303027
E_1	CEP_SUS	BETAE	C_TA1	1	6,008905	6,008905	5,530964	0,020704478
E_1	CEP_SUS	BETAE	C_TA2	1	7,6685	7,6685	7,058558	0,009225059
E_1	CEP_SUS	BETAE	C_Th	1	5,014108	5,014108	4,615293	0,034178232
E_2	CEP_SUS	BETAE	C_11	1	0,788454	0,788454	17,81925	7,17496E-05
E_2	CEP_SUS	BETAE	C_112	1	0,27422	0,27422	6,19743	0,015172632
E_2	CEP_SUS	BETAE	C_7	1	0,239082	0,239082	5,403309	0,02300536
ETA	Dependent	HypothesisType	Source	DF	SS	MS	FValue	ProbF
E_1	BETAE	3	CEP	6	25,00609	4,167681	3,836189	0,001782963
E_1	BETAE	3	CEP*SUS	6	41,5645	6,927417	6,376419	1,0998E-05
E_2	BETAE	3	CEP	6	6,827889	1,137982	25,71867	6,42838E-16
E_2	BETAE	3	CEP*SUS	6	1,638087	0,273015	6,170198	3,11824E-05
ETA	Dependent	HypothesisType	Source	DF	SS	MS	FValue	ProbF
E_1	X_BETAE	3	CEP	6	43,83623	7,306038	10,65051	3,65149E-06
E_1	X_BETAE	3	CEP*SUS	6	59,11705	9,852841	14,36316	2,03049E-07
E_2	X_BETAE	3	CEP	6	5,710762	0,951794	19,3007	9,04651E-09
E_2	X_BETAE	3	CEP*SUS	6	1,162909	0,193818	3,930292	0,005660014

Anexo 8. Análisis de varianza de la producción de proteínas y las actividades enzimáticas en co-cultivo .

Dependent	Fuente de variación	DF	SS	MS	FValue	ProbF
PROTEÍNA	CON	9	5,569678	0,618853	69,14901	< 0,01
PROTEÍNA	SUS	1	1,429801	1,429801	159,7621	< 0,01
PROTEÍNA	CON*SUS	7	0,763287	0,109041	12,18396	< 0,01

Effect	Dependent	CON	DF	SS	MS	FValue	ProbF
CON_SUS	PRO	TA1_TA2	1	0,292619	0,292619	32,69646	< 0,01
CON_SUS	PRO	B19TA2	1	9,61E-05	9,61E-05	0,010736	0,918048984
CON_SUS	PRO	B19_B11M	1	0,042448	0,042448	4,743075	0,036048692
CON_SUS	PRO	B19_TA1	1	0,272361	0,272361	30,43294	< 0,01
CON_SUS	PRO	B19_TA1_TA2	1	0,227054	0,227054	25,37037	< 0,01
CON_SUS	PRO	B19_Th	1	0,225327	0,225327	25,17744	< 0,01
CON_SUS	PRO	B19_B11	1	1,124779	1,124779	125,6799	< 0,01
CON_SUS	PRO	B19_B7	1	0,008403	0,008403	0,938968	0,339008785
CON_SUS	PRO		9	3,86884	0,429871	48,03266	< 0,01
CON_SUS	PRO		7	2,464125	0,352018	39,33355	< 0,01

ENDOGLUCANASA

Dependent	HypothesisType	Source	DF	SS	MS	FValue	ProbF
ENDO	3	CON	9	0,229767	0,02553	10,3458	< 0,01
ENDO	3	SUS	1	0,03543	0,03543	14,35795	< 0,01
ENDO	3	CON*SUS	7	0,067368	0,009624	3,900082	< 0,01

Effect	Dependent	CON	DF	SS	MS	FValue	ProbF
CON_SUS	ENDO	TA1_TA2	1	0,000176	0,000176	0,071342	0,79091634
CON_SUS	ENDO	B19	0	0			
CON_SUS	ENDO	B19_B11M	1	0,011092	0,011092	4,494852	0,040957422
CON_SUS	ENDO	B19_TA1	1	0,043671	0,043671	17,69738	0,000164147
CON_SUS	ENDO	B19_TA1_TA2	1	0,012939	0,012939	5,243305	0,027998197
CON_SUS	ENDO	B19_Th	1	0,000578	0,000578	0,234371	0,631233748
CON_SUS	ENDO	B19_B11	1	0,003549	0,003549	1,438137	0,238274983
CON_SUS	ENDO	B19_B7	1	0,020502	0,020502	8,308545	0,006615863
CON_SUS	ENDO	B19_B7_B11_B11M	0	0			

Effect	Dependent	Method	Line1	Line2	Mean	N	Level
CON	ENDO	Scheffe		A	0,342612	3	B19
CON	ENDO	Scheffe	B	A	0,209448	6	B19_TA1
CON	ENDO	Scheffe	B	C	0,179486	6	B19_TA1_TA2
CON	ENDO	Scheffe	B	C	0,169048	3	
CON	ENDO	Scheffe	B	C	0,140497	6	TA1_TA2
CON	ENDO	Scheffe	B	C	0,13418	6	B19TA2
CON	ENDO	Scheffe	B	C	0,102241	6	B19_B7
CON	ENDO	Scheffe	B	C	0,094342	6	B19_B11M
CON	ENDO	Scheffe		C	0,065397	6	B19_B11
CON	ENDO	Scheffe		C	0,046042	6	B19_Th
SUS	ENDO	T	A		0,170064	30	Cel

SUS ENDO T B 0,094286 24 Tusa

ENDOGLUCANASA ESPECÍFICA

Dependent	HypothesisType	Source	DF	SS	MS	FValue	ProbF
ENDOE	3	CON	9	723,8378	80,42643	75,17026	1,24029E-20
ENDOE	3	SUS	1	130,7838	130,7838	122,2366	3,97592E-13
ENDOE	3	CON*SUS	7	262,4121	37,48745	35,0375	3,20524E-14

Effect	Dependent	CON	DF	SS	MS	FValue	ProbF
CON_SUS	ENDOE	TA1_TA2	1	0,879814	0,879814	0,822315	0,370534374
CON_SUS	ENDOE	B19TA2	1	238,9586	238,9586	223,3418	5,18968E-17
CON_SUS	ENDOE	B19_B11M	1	0,010881	0,010881	0,010169	0,920234125
CON_SUS	ENDOE	B19_TA1	1	2,871925	2,871925	2,684234	0,110058097
CON_SUS	ENDOE	B19_TA1_TA2	1	4,12542	4,12542	3,855808	0,057333548
CON_SUS	ENDOE	B19_Th	1	0,002611	0,002611	0,00244	0,960872795
CON_SUS	ENDOE	B19_B11	1	146,3139	146,3139	136,7517	8,09841E-14
CON_SUS	ENDOE	B19_B7	1	0,032846	0,032846	0,030699	0,861894824
CON_SUS	ENDOE	B19_B7_B11_B11M	0	0			

EXOGLUCANASA

Dependent	HypothesisType	Source	DF	SS	MS	FValue	ProbF
EXO	3	CON	9	0,683271	0,075919	14,2762	1,88536E-09
EXO	3	SUS	1	0,024086	0,024086	4,529213	0,040236204
EXO	3	CON*SUS	7	0,09968	0,01424	2,677771	0,024390497

Dependent	HypothesisType	Source	DF	SS	MS	FValue	ProbF
EXOE	3	CON	9	1678,903	186,5448	68,13738	6,50562E-20
EXOE	3	SUS	1	178,2441	178,2441	65,10546	1,37321E-09
EXOE	3	CON*SUS	7	308,621	44,08871	16,10385	2,21084E-09

Effect	Dependent	CON	DF	SS	MS	FValue	ProbF
CON_SUS	EXO	TA1_TA2	1	0,006141	0,006141	1,154822	0,289692078
CON_SUS	EXO	B19TA2	1	0,004718	0,004718	0,887282	0,352493401
CON_SUS	EXO	B19_B11M	1	0,008885	0,008885	1,670774	0,20438988
CON_SUS	EXO	B19_TA1	1	0,04396	0,04396	8,266471	0,006741206
CON_SUS	EXO	B19_TA1_TA2	1	0,023367	0,023367	4,393992	0,043157744
CON_SUS	EXO	B19_Th	1	0,000199	0,000199	0,037372	0,847795706
CON_SUS	EXO	B19_B11	1	1,19E-05	1,19E-05	0,002247	0,962455565
CON_SUS	EXO	B19_B7	1	0,036484	0,036484	6,860647	0,012816037
CON_SUS	EXO	B19_B7_B11_B11M	0	0			

Effect	Dependent	CON	DF	SS	MS	FValue	ProbF
CON_SUS	EXOE	TA1_TA2	1	2,738462	2,738462	1,000251	0,323925167
CON_SUS	EXOE	B19	0	0			
CON_SUS	EXOE	B19TA2	1	317,8463	317,8463	116,0966	8,15156E-13
CON_SUS	EXOE	B19_B11M	1	0,005451	0,005451	0,001991	0,964656998
CON_SUS	EXOE	B19_TA1	1	5,591443	5,591443	2,042331	0,161595505
CON_SUS	EXOE	B19_TA1_TA2	1	12,56031	12,56031	4,587781	0,039038781
CON_SUS	EXOE	B19_Th	1	0,000869	0,000869	0,000317	0,985884168
CON_SUS	EXOE	B19_B11	1	148,0616	148,0616	54,08099	1,13318E-08

CON_SUS	EXOE	B19_B7	1	0,06068	0,06068	0,022164	0,882482391
CON_SUS	EXOE	B19_B7_B11_B11M	0	0			
CON_SUS	EXOE		9	1690,185	187,7983	68,59524	5,81247E-20
CON_SUS	EXOE		7	297,3395	42,47707	15,51518	3,589E-09

BETAGLUCOSIDASA

Dependent	HypothesisType	Source	DF	SS	MS	FValue	ProbF
BETA	3	CON	8	0,462935	0,057867	2,950183	0,013721254
BETA	3	SUS	1	0,063176	0,063176	3,220845	0,082158206
BETA	3	CON*SUS	6	0,604838	0,100806	5,139334	0,000851522

Effect	Dependent	CON	DF	SS	MS	FValue	ProbF
CON_SUS	BETA	TA1_TA2	1	0,000256	0,000256	0,013067	0,909704347
CON_SUS	BETA	B19TA2	1	0,324155	0,324155	16,52615	0,000291473
CON_SUS	BETA	B19_B11M	1	0,03949	0,03949	2,013287	0,165594522
CON_SUS	BETA	B19_TA1	1	0,057191	0,057191	2,915701	0,097407554
CON_SUS	BETA	B19_TA1_TA2	1	0,06059	0,06059	3,088996	0,08838761
CON_SUS	BETA	B19_Th	1	0,067163	0,067163	3,424102	0,073502685
CON_SUS	BETA	B19_B7	1	0,11917	0,11917	6,075547	0,019259568
CON_SUS	BETA		8	0,800129	0,100016	5,099043	0,000381862
CON_SUS	BETA		6	0,267645	0,044607	2,274188	0,061070295

Dependent	HypothesisType	Source	DF	SS	MS	FValue	ProbF
BETA	3	CON	8	3663,924	457,9905	11,63315	1,43233E-07
BETA	3	SUS	1	637,1599	637,1599	16,18413	0,000328347
BETA	3	CON*SUS	6	2954,391	492,3985	12,50712	3,21683E-07

Effect	Dependent	Method	Line1	Mean	N	Level
CON	BETA	Scheffe	A	26,38677	6	B19TA2
CON	BETA	Scheffe	B	2,051033	6	B19_TA1_TA2
CON	BETA	Scheffe	B	1,796114	3	B19
CON	BETA	Scheffe	B	1,236039	6	TA1_TA2
CON	BETA	Scheffe	B	0,687735	6	B19_TA1
CON	BETA	Scheffe	B	0,173366	6	B19_B7
CON	BETA	Scheffe	B	0,116622	6	B19_B11M
CON	BETA	Scheffe	B	0,100495	6	B19_Th
CON	BETA	Scheffe	B	0,008007	3	B19_B7_B11_B11M
SUS	BETA	T	A	6,646743	27	Cel
SUS	BETA	T	B	0,498222	21	Tusa

Effect	Dependent	CON	DF	SS	MS	FValue	ProbF
CON_SUS	BETA	TA1_TA2	1	3,755868	3,755868	0,095401	0,759422547
CON_SUS	BETA	B19TA2	1	3569,903	3569,903	90,67701	7,40271E-11
CON_SUS	BETA	B19_B11M	1	0,081605	0,081605	0,002073	0,963969464
CON_SUS	BETA	B19_TA1	1	2,248467	2,248467	0,057112	0,812644165
CON_SUS	BETA	B19_TA1_TA2	1	15,36354	15,36354	0,39024	0,536602257
CON_SUS	BETA	B19_Th	1	0,048834	0,048834	0,00124	0,972123479
CON_SUS	BETA	B19_B7	1	0,149267	0,149267	0,003791	0,951284484

Anexo 9. Análisis estadístico del efecto de consorcios de enzimas con diferente actividad sobre la actividad hidrolítica.

Dependent		Dependent	DF	SS	MS	FValue	ProbF
GLU	3	CON	23	12,0169717	0,52247703	137,268018	3,0762E-64
GLU	3	SUS	1	0,43184462	0,43184462	113,456576	4,6879E-18
GLU	3	CON*SUS	23	0,35298289	0,01534708	4,03206921	6,5492E-07

Effect	Dependent	CON	Dependent	SS	MS	FValue	ProbF
CON_SUS	GLU	B11M_0_0	1	0,00461272	0,00461272	1,21187839	0,27365703
CON_SUS	GLU	11_0_0	1	0,00941371	0,00941371	2,47322121	0,11902347
CON_SUS	GLU	19_0_0	1	0,03537327	0,03537327	9,29345796	0,00295673
CON_SUS	GLU	19_B11M_0	1	0,02161755	0,02161755	5,67948176	0,01909234
CON_SUS	GLU	19_11_0	1	0,02794925	0,02794925	7,34297913	0,00794834
CON_SUS	GLU	19_11_B11M	1	0,00545939	0,00545939	1,43432195	0,23394908
CON_SUS	GLU	19_7_0	1	0,00374543	0,00374543	0,98402008	0,3236513
CON_SUS	GLU	19_TA1_0	1	0,02622971	0,02622971	6,89121381	0,01004998
CON_SUS	GLU	19_TA1_TA2	1	0,09686039	0,09686039	25,4476901	2,0901E-06
CON_SUS	GLU	19_TA2_0	1	0,0362205	0,0362205	9,51604786	0,00264706
CON_SUS	GLU	19_Th_0	1	0,08385666	0,08385666	22,0312789	8,7183E-06
CON_SUS	GLU	7_0_0	1	0,00788802	0,00788802	2,07238376	0,15317363
CON_SUS	GLU	TA1_0_0	1	0,00545939	0,00545939	1,43432195	0,23394908
CON_SUS	GLU	TA1_B11M_0	1	0,07219034	0,07219034	18,9662407	3,2752E-05
CON_SUS	GLU	TA1_11_0	1	0,05181718	0,05181718	13,6136925	0,00036893
CON_SUS	GLU	TA1_7_0	1	0,03707776	0,03707776	9,74127197	0,00236771
CON_SUS	GLU	TA1_TA2_0	1	0,09272448	0,09272448	24,3610825	3,2752E-06
CON_SUS	GLU	TA1_Th_0	1	0,07091364	0,07091364	18,6308192	3,7956E-05
CON_SUS	GLU	TA2_0_0	1	0,00829075	0,00829075	2,17819079	0,14318483
CON_SUS	GLU	TA2_B11M_0	1	0,00156468	0,00156468	0,41108156	0,52291767
CON_SUS	GLU	TA2_11_0	1	0,05703928	0,05703928	14,9856717	0,00019542
CON_SUS	GLU	TA2_7_0	1	0,00305026	0,00305026	0,80138221	0,37287393
CON_SUS	GLU	TA2_Th_0	1	0,00912629	0,00912629	2,39770747	0,12473663
CON_SUS	GLU	Th_0_0	1	0,02647202	0,02647202	6,95487364	0,00972179
CON_SUS	GLU		23	6,09606611	0,26504635	69,6344247	1,5436E-50
CON_SUS	GLU		23	6,27388848	0,27277776	71,6656623	4,157E-51

Anexo 10. Análisis estadístico del efecto de consorcios de enzimas con actividad similar sobre la actividad hidrolítica.

Dependent	HypothesisType	Source	DF	SS	MS	FValue	ProbF
ENDO	3	CEP	5	0,001625	0,000325	104,8382	1,7897E-09
EXO	3	CEP	5	0,002685	0,000537	132,8104	4,48173E-10
BETA	3	CEP	5	4,949155	0,989831	22,22733	1,10203E-05

Dependent	HypothesisType	Source	DF	SS	MS	FValue	ProbF
GLU	3	CON	18	9,325245	0,518069	76,41456	3,60507E-41
GLU	3	SUS	1	0,774281	0,774281	114,2055	8,46613E-17
GLU	3	CON*SUS	18	1,643125	0,091285	13,46439	7,20302E-17

Effect	Dependent	CON	DF	SS	MS	FValue	ProbF
CON_SUS	GLU	B11M	1	0,004613	0,004613	0,68037	0,412040743
CON_SUS	GLU	11_B11M_7	1	0,000109	0,000109	0,016103	0,899355235
CON_SUS	GLU	19_11	1	0,429401	0,429401	63,33613	1,32238E-11
CON_SUS	GLU	19_B11M	1	0,683839	0,683839	100,8653	1,37545E-15
CON_SUS	GLU	19_11_B11M_7	1	8,02E-05	8,02E-05	0,011831	0,913670925
CON_SUS	GLU	19_7	1	0,094552	0,094552	13,94623	0,000361455
CON_SUS	GLU	19_TA1	1	0,652122	0,652122	96,18714	3,84716E-15
CON_SUS	GLU	19_TA1_TA2	1	0,000125	0,000125	0,018486	0,892209593
CON_SUS	GLU	19_TA2	1	0,005682	0,005682	0,838118	0,362831238
CON_SUS	GLU	19_Th	1	0,504833	0,504833	74,46229	6,85493E-13
CON_SUS	GLU	TA1	1	0,005459	0,005459	0,805254	0,372361073
CON_SUS	GLU	TA1_11_B11M_7	1	0,00103	0,00103	0,151915	0,697802548
CON_SUS	GLU	TA1_TA2	1	2,01E-05	2,01E-05	0,002958	0,956770807
CON_SUS	GLU	TA2	1	0,008291	0,008291	1,222875	0,272285435
CON_SUS	GLU	TA2_11_B11M_7	1	0,00674	0,00674	0,994141	0,321896486
CON_SUS	GLU	C_11	1	0,009414	0,009414	1,388511	0,242333145
CON_SUS	GLU	C_19	1	0,000295	0,000295	0,043463	0,835413913
CON_SUS	GLU	C_7	1	0,007888	0,007888	1,163473	0,284157948
CON_SUS	GLU	Th	1	0,00824	0,00824	1,215316	0,273760585
CON_SUS	GLU		18	2,248682	0,124927	18,42654	9,985E-21
CON_SUS	GLU		18	8,857067	0,492059	72,57814	2,24922E-40