

**INSTITUTO TECNOLOGICO DE COSTA RICA**

**ESCUELA DE BIOLOGIA**

**INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA**

**INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN**

**AISLAMIENTO, SELECCION Y EVALUACION DE LA ACTIVIDAD  
CELULOLITICA DE CUATRO CEPAS DE HONGOS NATIVOS DE COSTA RICA**

**Héctor Morales Lara**



**CARTAGO, 2006**

# **AISLAMIENTO, SELECCION Y EVALUACION DE LA ACTIVIDAD CELULOLITICA DE CUATRO CEPAS DE HONGOS NATIVOS DE COSTA RICA**

**Héctor Morales Lara**

## **RESUMEN**

Los procesos eficientes para degradar por vía enzimática los desechos lignocelulósicos posibilitan nuevas aplicaciones industriales con un impacto ambiental, económico y social muy positivo y cuya viabilidad depende en gran medida de la actividad de las enzimas celulasas empleadas. La presente investigación se realizó para determinar mediante pruebas cualitativas y cuantitativas la actividad de las enzimas celulolíticas de cuatro cepas de hongos nativos de Costa Rica.

La actividad enzimática relativa (U/mg) de tres de los hongos mostró una tendencia decreciente durante seis días de cultivo en medio líquido con celulosa microcristalina como única fuente de carbono. Lo anterior se debe probablemente a limitaciones del método de cuantificación de enzima más que a un descenso de la actividad enzimática absoluta. La actividad relativa más alta registrada fue de 1,024 U/mg, un resultado prometedor que justifica la necesidad de realizar estudios posteriores, dirigidos en especial a la optimización de condiciones de cultivo y el crecimiento en sustratos lignocelulósicos, para lograr descubrir el verdadero potencial del hongo.

**Descriptor:** Celulasas, lignocelulósicos, hidrólisis, actividad enzimática, medio Mandels, proteína soluble

- INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Ingeniería en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2006.

**AISLAMIENTO, SELECCION Y EVALUACION DE LA ACTIVIDAD  
CELULOLITICA DE CUATRO CEPAS DE HONGOS NATIVOS DE COSTA RICA**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del  
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial  
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

**Miembros del Tribunal**

---

**Virginia Montero Campos, MQC  
Profesora Asesora ITCR**

---

**Lic. Luis R. Villegas Peñaranda  
Asesor Externo**

---

**Ph.D. Miguel Rojas Chávez  
Lector**

## **DEDICATORIA**

A mis padres por el excelente ejemplo y sobretodo por el constante apoyo durante mis años de estudio.

A J.E. Acuña, por guiarme para encontrar lo mejor de mí mismo.

Héctor

## **AGRADECIMIENTOS**

El autor hace constar su agradecimiento a las siguientes personas e instituciones por la colaboración brindada durante la realización del presente trabajo:

Al Lic. Luis Roberto Villegas por su amable disposición y valiosa asesoría durante estos cuatro meses.

A Ana Francis Carballo y Roy Mena, por su colaboración y amistad diaria.

A la Escuela de Química de la Universidad Nacional por la posibilidad de realizar este trabajo en sus laboratorios, en especial a su director, MSc. Marco Calvo P.

A la Dra. Virginia Montero por su paciencia y apoyo.

## INDICE GENERAL

	<b>Pág.</b>
RESUMEN.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	ii
INDICE GENERAL.....	iii
INDICE DE CUADROS.....	iv
INDICE DE FIGURAS.....	v
INDICE DE ANEXOS.....	vi
INTRODUCCION.....	1
REVISION DE LITERATURA.....	3
Características de la celulosa.....	3
Degradación enzimática de celulosa en la naturaleza.....	4
Aplicaciones industriales de la hidrólisis y sus productos.....	5
OBJETIVOS: GENERAL Y ESPECIFICOS.....	8
MATERIALES Y METODOS.....	9
Obtención y preparación de muestras.....	9
Evaluación y purificación de crecimientos.....	9
Cultivo en medio líquido con agitación.....	9
Separación del sobrenadante y el micelio.....	10
Análisis del contenido de proteína soluble e insoluble.....	10
Prueba de papel filtro y cuantificación de azúcares reductores.....	11
RESULTADOS.....	12
DISCUSION DE RESULTADOS.....	22
CONCLUSIONES.....	25
RECOMENDACIONES.....	26
BIBLIOGRAFIA.....	27
ANEXOS.....	29

## INDICE DE CUADROS

<b>Núm.</b>	<b>Título</b>	<b>Pág</b>
1	Crecimiento de los hongos en medio Mandels semisólido luego de 9 días de incubación a 22° C y en oscuridad	13
2	Grado de aclaración del medio Mandels semisólido luego de 9 días de incubación a 22° C y en oscuridad	13
3	Crecimiento de los hongos y aclaración del medio líquido luego de seis días de cultivo con agitación, a una temperatura no controlada cercana a 22° C y exposición a la luz	14
4	Crecimiento y aclaración del medio líquido por los cuatro mejores degradadores, luego de seis días de cultivo con agitación, a una temperatura no controlada cercana a los 22° C y exposición a la luz	15

## INDICE DE FIGURAS

<b>Núm.</b>	<b>Título</b>	<b>Pág</b>
1	Comparación de las concentraciones de proteína soluble y de azúcares reductores producidos por el hongo "4.2" en cultivo líquido (A). Actividad enzimática relativa durante el cultivo (B)	16
2	Comparación de las concentraciones de proteína soluble y de azúcares reductores producidos por el hongo "12.1" en cultivo líquido (A). Actividad enzimática relativa durante el cultivo (B)	17
3	Comparación de las concentraciones de proteína soluble y de azúcares reductores producidos por el hongo "12.2" en cultivo líquido (A). Actividad enzimática relativa durante el cultivo (B)	18
4	Comparación de las concentraciones de proteína soluble y de azúcares reductores producidos por el hongo "C 2.1" en cultivo líquido (A). Actividad enzimática relativa durante el cultivo (B)	19
5	Comparación de las actividades enzimáticas relativas de los cuatro hongos durante el cultivo en medio líquido con agitación	20
6	Comparación de las concentraciones de proteína insoluble de los cuatro hongos en luego de 6 días de fermentación en cultivo líquido	21

## INDICE DE ANEXOS

<b>Núm.</b>	<b>Título</b>	<b>Pág</b>
1	Composición de 1L de medio de cultivo Mandels (Mandels, 1974)	28
2	Asa micológica modificada empleada para tomar los inóculos usados en los cultivos en medio Mandels semisólido y medio Mandels líquido	30
3	Comparación de hongos con excelente (A), notable (B) y pobre (C) crecimiento en medio Mandels semisólido luego de 9 días. En los tres casos aparece a la izquierda la placa control	31
4	Comparación de hongos con excelente (A), notable (B) y pobre (C) aclaración del medio Mandels semisólido luego de 9 días. A la izquierda aparece la placa control	32
5	Comparación de la turbidez del medio líquido luego de 2, 4 y 6 días de cultivo con agitación de los hongos "4.2" (A), "12.1" (B), "12.2" (C) y "C 2.1" (D).	33
6	Curvas de calibración para la determinación de la concentración de proteína soluble (A) y azúcares reductores (B), realizadas con diluciones de caseína soluble en NaOH 0,33M y glucosa, respectivamente	34
7	Resultados de medidas de absorbancia y de los cálculos para determinar la concentración de proteína solubles, insoluble y azúcares reductores	33
8	Cálculo de la actividad enzimática absoluta y relativa (IUPAC)	36



## INTRODUCCION

A la tasa actual de consumo de los recursos naturales, y en vista de la demanda creciente de alimentos y energía, la necesidad de utilizar fuentes alternativas de energía se convierte en una urgencia. Si estos recursos son renovables, las ventajas son superiores pues su utilización no condiciona la disponibilidad de los recursos empleados en el futuro. Entre las alternativas más destacadas, se encuentran la energía solar, eólica y geotérmica, junto con el hidrógeno, las células de combustible y la biomasa (NREL, 2006). Con respecto a la biomasa, esta constituye una fuente renovable cuya esencia es la fotosíntesis, mediante la cual se produce materia vegetal constantemente. La celulosa, el componente principal de esta materia, es el polímero más abundante de la biosfera. Cada año, las plantas, hongos, algas y algunas animales, sintetizan  $70 \times 10^9$  toneladas (Herr et al, 1978). Es considerada la fuente orgánica más abundante de alimento, combustible y químicos y la mayoría de su potencial depende de ser hidrolizada a glucosa.

En la naturaleza, la degradación de la celulosa ocurre por acción de las celulasas, un conjunto de enzimas que actúan sinérgicamente para desorganizar y romper el extenso polímero. Son pocos los organismos que poseen estas enzimas y la capacidad de metabolizar la celulosa y usarla para alimentarse. Entre ellos, los hongos se destacan por la rápida colonización de sustratos, la secreción de las enzimas al medio, la eficiente remoción de productos de hidrólisis y la diversidad de sus sistemas celulolíticos. Sobre los hongos se han realizado variedad de estudios para comprender mejor su proceso de hidrólisis enzimática de celulosa e intentar usarlo para fines industriales.

Actualmente las enzimas celulolíticas se utilizan en las industrias de alimentos, papel y textiles en procesos donde degradan sustratos purificados o pretratados. Existe un marcado interés por el desarrollo de procesos que permitan emplearlas para la degradación de materiales y desechos lignocelulósicos, con el fin de obtener glucosa y otros azúcares fermentables. La hidrólisis enzimática de la celulosa presente en los tallos, hojas y variedad de residuos agrícolas presenta enormes

ventajas y oportunidades. Actualmente, debido en gran parte al elevado precio del barril de crudo, una de las principales aplicaciones de la glucosa que se produciría es la fermentación para producir etanol, cuyo principal uso sería como aditivo a la gasolina o biocombustible por sí mismo. La hidrólisis enzimática aplicada a la producción de biocombustible permitiría reemplazar el maíz o la remolacha que se utilizan actualmente como materia prima por desechos agrícolas o plantas sin valor nutritivo ni comercial. De esta forma, los residuos agrícolas pasarían de ser un desecho que se acumula y provoca problemas de contaminación a ser una materia prima para un producto con alto valor agregado.

Para lograr que los procesos de hidrólisis enzimática de celulosa y las aplicaciones subsecuentes sean alternativas viables, se requiere, entre otras cosas, de hongos con complejos celulolíticos de elevada actividad. Gracias a la enorme biodiversidad y el clima tropical, Costa Rica constituye una fuente potencial de estos organismos. Este proyecto de investigación pretende evaluar la capacidad celulolítica de varios hongos nativos de Costa Rica con el objetivo de encontrar aquellos microorganismos que constituyen la esencia de proyectos industriales viables.

## REVISION DE LITERATURA

### *Características de la celulosa*

La celulosa es un componente esencial de la materia vegetal. Constituye el componente principal de la pared celular y provee fuerza mecánica y resistencia a la degradación química y biológica. En la pared también están presentes otros compuestos en menor proporción como hemicelulosas, compuestos pécticos, proteínas y lignina. La celulosa es un polímero no ramificado, formado por moléculas de D-glucosa, unidas entre sí por enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,4 para formar unidades repetitivas de celobiosa. Las unidades de celobiosa, al enrollarse, forman las microfibrillas que constituyen una red impregnada por una matriz de hemicelulosa. Las cadenas de celulosa pueden tener entre 2000 y 2500 residuos de glucosa, sin embargo la longitud, así como el número y organización de las cadenas, es muy variable según el tipo de organismo (Flores, 1999).

La celulosa puede encontrarse en forma de cadenas totalmente extendidas, de tal manera que cada residuo de glucosa presenta un giro de  $180^\circ$  con respecto al residuo de al lado en la cadena. En la forma extendida las cadenas pueden formar cintas que se empaquetan lado a lado con una red de enlaces de hidrógeno dentro y entre ellas. (Mathews et al, 2002).

Debido a los enlaces  $\beta$ -1,4, la celulosa es un polímero de muy alta estabilidad química y biológica. Las enzimas que degradan fácilmente las uniones  $\alpha$ -1,6 del almidón son ineficaces contra la celulosa. Así, la celulosa constituye una fuente generosa de glucosa que muy pocos seres vivos logran aprovechar. Sin embargo, existe un conjunto de diversos organismos capaces de degradarla. Los rumiantes logran aprovechar la glucosa presente en la celulosa de los pastos gracias a las bacterias simbiotas que habitan sus aparatos digestivos; las termitas, debido a que sus intestinos albergan protozoos capaces de degradar la celulosa; las setas que crecen en troncos caídos, en función de sus propias enzimas que secretan al exterior (Mathews et al, 2002).

### *Degradación enzimática de celulosa*

Los microorganismos generalmente degradan la celulosa cristalina a celodextrinas y finalmente a glucosa por medio de un complejo celulolítico. El complejo, conocido de forma simplista como celulasa, en realidad está compuesto por tres tipos de enzimas: endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas. Las endoglucanasas, también conocidas como endo-  $\beta$ -1,4-glucan glucohidrolasas (EC 3.2.1.4) son glucanasas de acción aleatoria que dividen las cadenas de celulosa de las secciones menos ordenadas de las fibras para producir secciones susceptibles al ataque de las exoglucanasas. Al actuar sobre derivados solubles de la celulosa los principales productos de su acción son la celobiosa y la celotriosa. Estos compuestos son hidrolizados en un grado superior hasta glucosa por ciertas endoglucanasas.

Las exoglucanasas hidrolizan las celodextrinas comenzando en su extremo. Una de estas enzimas, la exo-  $\beta$ -1,4-glucan glucohidrolasa, va desprendiendo unidades de glucosa del extremo no reductor de los glucanos. Esta acción es especialmente pronunciada en las pequeñas cadenas que resultan de la acción del ataque de las endoglucanasas. Otro tipo de exoglucanasas, las exo- $\beta$ -glucan celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) remueven unidades de celobiosa de los extremos no reductores de las cadenas, incluyendo aquellas de mayor longitud todavía adheridas a la matriz de celulosa cristalina.

Las  $\beta$ -glucosidasas (EC 3.2.1.21) actúan sobre la celobiosa y en menor grado sobre otros oligosacáridos  $\beta$ -1,4 para producir glucosa. Su acción parece limitada a sustratos solubles. (Trimiño, 1982)

La celulosa y hemicelulosa pueden ser hidrolizadas a carbohidratos simples ya sea por tratamientos ácidos a variadas temperaturas y presiones o por procesos enzimáticos. Los tratamientos ácidos que degradan la celulosa son demasiado fuertes para la hemicelulosa, por lo que la degradación generalmente es secuencial e inicia con un tratamiento más suave primero para convertir la hemicelulosa en xilosa. La celulosa residual puede luego ser convertida en glucosa. La neutralización

o recuperación del ácido contribuye a los otros costos significativos en tales operaciones (Johannesen, 1991).

La vía enzimática es técnicamente factible y muy prometedora, pero actualmente no lo suficientemente eficiente como para que la producción de grandes cantidades de glucosa sea económicamente viable. Desde hace varios años y hoy en día se lleva a cabo investigación significativa sobre la estructura y función de las enzimas para lograr mejorar su actividad, así como intentos de manipulación genética diseñados para producir copiosas cantidades de la enzima

#### *Aplicaciones industriales de la hidrólisis de celulosa y sus productos*

Desde las investigaciones tempranas sobre la hidrólisis enzimática de celulosa, llevadas a cabo en los años setenta, varios investigadores han señalado las principales dificultades técnicas y económicas que implica el proceso. Una investigación llevada a cabo por Mandels y Andreotti para explorar las principales limitaciones y problemas de la fermentación para producir celulasas en gran cantidad señala como las principales dificultades la disponibilidad limitada de sustratos apropiados, la necesidad de pretratamientos costosos y los altos costos de la enzima (Mandels y Andreotti, 1978). En los casi treinta años que han transcurrido desde entonces, las primeras dos limitaciones han sido las mejor superadas.

El alto costo de la producción de enzimas continúa siendo un factor limitante para su aplicación industrial en la producción de azúcares solubles. Un caso concreto, el de los hongos del género *Trichoderma*, ejemplifica adecuadamente las dificultades. Debido a que su sistema de celulasas es deficiente en celobioasa, se produce la acumulación del disacárido celobiosa, el cual produce represión e inhibición de las enzimas por producto final y la consecuente limitante sobre la síntesis y actividad de las enzimas (Zaldívar et al, 2001).

Para lograr que la producción de glucosa a partir de celulosa mediante hidrólisis enzimática sea un proceso económicamente viable, se han definido líneas prioritarias de investigación y acción. Con respecto al mejoramiento de la actividad enzimática, se estima que la influencia sobre ciertos factores clave puede contribuir

a un aumento de la actividad enzimática de cinco a 15 veces el nivel actual. Para alcanzar esta meta se propone:

1. Mejorar la termoestabilidad del complejo enzimático: a una temperatura elevada ocurre un aumento exponencial de la actividad enzimática, por lo que este factor posee el mayor potencial para mejorar el proceso.
2. Disminuir las uniones enzima-sustrato no productivas (unión a lignina, por ejemplo) para evitar que la concentración efectiva de las enzimas se vea disminuida por estas interacciones, en las cuales no ocurre hidrólisis de celulosa.
3. Aumentar la constante catalítica de la celulasa, mediante una mejor sinergia entre los componentes del complejo celulolítico.
4. Minimizar la inhibición por retroalimentación, lo que permitiría mayor flexibilidad en el diseño de procesos y el uso de materia prima más barata para producir celulasas. Los mayores inhibidores de la celulasa son la celobiosa, la glucosa y subproductos del pretratamiento de los sustratos.

Con respecto al proceso de producción, las variables sobre las cuales se puede influir para disminuir el costo de producción de la enzima son el volumen del fermentador y el factor de llenado, el tipo de materia prima, la tasa de expresión de la proteína y el tiempo de fermentación (Hettenhaus, Glassner; 1997).

Así como los principales problemas y limitaciones de la conversión enzimática de celulosa fueron detectados desde hace más de 30 años, también se sugirieron las pautas para obtener cepas fúngicas celulolíticas con una mayor actividad. En las etapas más tempranas de esta búsqueda de cepas fúngicas que logren mayor rendimiento y una tasa de degradación más rápida, Herr y colaboradores (Herr et al, 1958) sugirieron en un estudio dos vías principales: la mutación y manipulación genética directa y la bioprospección. Estas opciones se mantienen hoy en día como las principales vertientes en la búsqueda de mejores hongos degradadores.

Los azúcares fermentables que se produzcan mediante la hidrólisis de celulosa pueden ser aprovechados en variedad de aplicaciones. Una de las más atractivas, en gran parte debido a los altos precios de la gasolina, es la fermentación de los carbohidratos simples para producir etanol y usarlo como combustible. Desde las primeras décadas del siglo IX se conoce que cuando los desechos maderables eran tratados con un ácido fuerte se podía obtener una solución de azúcares fermentables. Este principio se aplicó comercialmente en 1900, cuando también se descubrió que el ácido sulfúrico convertía la celulosa de la madera en dextrosa. Desde entonces varios procesos han producido rendimientos de 16 a 40 galones de etanol 100% por tonelada de madera seca (Johannesen, 1991).

Una vez que los azúcares se encuentran en solución se posibilita el crecimiento de los microorganismos que llevan a cabo la fermentación. Los azúcares de cinco carbonos como la xilosa son fermentados por las levaduras *Pachysolen tannophilus* o *Pichia stipitis*, pero a niveles que no alientan su conversión a etanol. La glucosa es fermentada mayoritariamente por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la bacteria *Xymomonas mobilis*, en un proceso conocido exhaustivamente y aplicado a gran escala en la industria de las bebidas alcohólicas. Los procesos de fermentación ocurren de forma separada por lo que dificultan el aprovechamiento de todos los materiales biomásicos. Debido a que la celulosa es la fuente de azúcares más barata, la capacidad de usar este material influiría significativamente en los costos de producción del etanol. (Johannesen, 1991)

La primera aplicación de las enzimas a la hidrólisis de material lignocelulósico en un proceso para producir etanol fue simplemente para reemplazar el paso de hidrólisis ácida. Esto se conoce como hidrólisis y fermentación separadas (HFS). Una modificación importante al proceso de hidrólisis enzimática de biomasa fue la introducción de la sacarificación y fermentación simultánea (SFS), la cual ha sido mejorada recientemente para incluir la cofermentación de múltiples azúcares. En el proceso de SFS se combinan la celulasa y los microorganismos fermentadores; al irse produciendo los azúcares simples estos la convierten en etanol (DOE, 2003)

## **OBJETIVOS**

### **General**

- Determinar mediante pruebas cualitativas y cuantitativas la actividad de las enzimas celulolíticas producidas por cuatro cepas de hongos nativos de Costa Rica.

### **Específicos**

- Realizar una gira de campo para obtener muestras de hongos que se encuentren creciendo sobre sustratos lignocelulósicos.
- Evaluar cualitativamente la capacidad de crecimiento de las cepas en un medio mínimo con celulosa como única fuente de carbono, según la aclaración del medio y el desarrollo de micelio.
- Medir la actividad enzimática de las cepas que presenten mayor degradación de celulosa en medio líquido, mediante pruebas para cuantificación de proteína soluble e insoluble y de degradación de carbohidratos complejos.



## MATERIALES Y METODOS

### *Obtención y preparación de muestras*

Se realizó una visita al Bosque de la Hoja, en San Rafael de Heredia, para recolectar muestras de crecimientos fúngicos en sustratos lignocelulósicos. Se recolectaron 15 muestras de fragmentos de madera en descomposición y de tierra con hojarasca. Las muestras se colocaron en bolsas plásticas numeradas desde BH-1 hasta BH-15 y se guardaron en el congelador durante dos días. Posteriormente se pulverizaron y homogenizaron con un procesador de alimentos. Aquellas con alto contenido de humedad se colocaron en la estufa a 50° C para desecar y poder ser pulverizadas. También se usaron como muestras algunos crecimientos fúngicos que crecieron como contaminación en las placas sin inocular (identificados con una "C", en lugar de "BH".)

### *Purificación de crecimientos y primera evaluación cualitativa*

Se agregó 1g de muestra procesada a placas Petri con medio Mandels semisólido (Anexo 1). Las placas, sin sellar, se colocaron en una incubadora a la temperatura ambiente del cuarto limpio (22° C promedio), en oscuridad. Durante dos semanas se realizaron evaluaciones periódicas y se identificaron 25 morfotipos, los cuales se repicaron en placas de agar papa dextrosa (APD) pH 5,5 para ser purificados. Se identificaron con el número de la muestra seguido por el número de morfotipo (ej. 5.1, 12.2, C 3.1) Posteriormente se seleccionaron 13 morfotipos, claramente distinguibles unos de otros, para evaluar cualitativamente su capacidad de metabolizar la celulosa. Usando un asa micológica modificada (Anexo 2), se tomó una sección de micelio y se inoculó en placas con medio Mandels semisólido. Se realizaron evaluaciones periódicas de crecimiento y aclaración del medio durante 9 días. Se seleccionaron 10 hongos para evaluar cuantitativamente su actividad enzimática.

**Comentario [HM1]:** pongo composición? menciono q solo tiene celulosa fuente carbono?

### *Cultivo en medio líquido con agitación y segunda evaluación cualitativa*

En Erlenmeyers de 125ml se colocó 70ml de medio Mandels líquido con 10% de celulosa microcristalina. Usando el asa micológica modificada se tomó el fragmento de micelio no esporulado que sirvió de inóculo. Los recipientes se taparon con

algodón y se colocaron en un agitador orbital, carente de regulación de temperatura, durante 6 días, a una velocidad aproximada de 130 rpm, expuestos a la luz y a una temperatura ambiental promedio de 20°. Se realizó un primer cultivo con 10 hongos y otro posterior con los cuatro hongos que presentaron mayor crecimiento y degradación de la celulosa. Este segundo cultivo se llevó a cabo por triplicado; de los tres frascos de cada crecimiento, uno se tomó a los dos días para separar y almacenar su contenido, otro a los cuatro días y otro al final del cultivo a los 6 días.

#### *Separación del sobrenadante y el micelio*

El contenido de los Erlenmeyers se trasvasó a recipientes cónicos y se centrifugó durante 30 minutos a 5300 rpm y 20° C en una centrifuga IEM Multi RF. Posteriormente se filtró el sobrenadante a través de prefiltros de fibra de vidrio Schleichen & Schnell con ayuda de una bomba de vacío. El sobrenadante se trasvasó en tubos Falcon de 50ml y se mantuvo en refrigeración a -20° C. El micelio con los residuos de celulosa se mantuvo en los recipientes cónicos y se colocó en la estufa a 45° C durante 18 horas.

#### *Análisis del contenido de proteína soluble*

Se utilizó la variante “micro” del método de Bradford para el análisis de proteínas solubles. En tubos de ensayo se colocó una alícuota de 0,5ml de solución enzimática y se adicionó 5ml de reactivo cromogénico. El contenido del tubo se mezcló brevemente en un mezclador Vortex y se dejó reposar por dos minutos. Para medir la absorbancia de la mezcla se usó un espectrofotómetro digital Spectronic 20; se leyó a 595nm contra un blanco reactivo que contenía 0,5ml de NaOH 0,33M en vez de proteína.

#### *Análisis del contenido de proteína insoluble*

Para lograr extraer la proteína del micelio sólido se siguió el procedimiento de triple extracción de Peitersen. Se pesó 100ml de micelio seco y macerado, se colocó en un tubo de ensayo y se agregó 10ml de NaOH 1M. El tubo se tapó y se colocó en baño maría por 10 minutos a 100° C, para luego centrifugar por cinco minutos a temperatura ambiente y máxima velocidad en una centrifuga clínica. El sobrenadante se colocó en una probeta y al sólido remanente se le agregó 5ml de

NaOH 1ml. Se repitió el ciclo de calentamiento y centrifugación y el sobrenadante se agregó junto con el del primer ciclo. La última repetición se llevó a cabo usando 5ml de agua destilada y el sobrenadante se agrega a los dos anteriores.

De la mezcla de sobrenadantes se tomó una alícuota de 0,5ml para cuantificar la proteína soluble por el método de Bradford, de la misma forma que se indicó anteriormente.

#### *Prueba de papel de filtro y cuantificación de azúcares reductores mediante DNS*

El procedimiento utilizado fue el descrito por Ghose. En un tubo de ensayo de 16x100 se colocó una tira de papel filtro Whatman N°1 de 6cm x 1cm enrollada y se agregó 1ml de amortiguador de citrato 0,05M pH 4.8, y 0,5ml de solución enzimática. Cada tubo se tapó con una bolincha de vidrio y se colocaron en baño maría a 50° C durante 1 hora. Transcurrido el período de incubación, se agregó 3ml de ácido dinitrosalicílico (DNS) y 1ml de solución de glucosa 40µg/ml y se incubó a 100° C durante 5 minutos. Para determinar la concentración de azúcares reductores (considerados como glucosa), se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro digital Spectronic 20 a 550nm contra un blanco con agua en vez de solución enzimática.

## **RESULTADOS**

### **Evaluación y purificación de crecimientos**

De las 15 muestras de tierra y hojarazca recolectadas, se identificaron 21 crecimientos fúngicos. Debido a que las muestras pulverizadas se inocularon en medio Mandels, con celulosa microcristalina como única fuente de carbono, existe la certeza de que estos 20 crecimientos poseen capacidad celulolítica. También se seleccionaron 4 hongos que crecieron como contaminación en las placas de medio Mandels almacenadas en refrigeración.

Luego de dos semanas de incubación, se procedió a aislar cada crecimiento fúngico en agar papa dextrosa (APD) pH 5,5. Se seleccionaron 13 crecimientos para llevar a cabo las primeras pruebas, según el criterio de escoger aquellos que representaran una morfología definida y distinta a las demás.

Los 13 hongos seleccionados se inocularon en placas con medio Mandels semisólido. Durante 9 días se observó su crecimiento micelial y el grado de degradación de celulosa, interpretado como la aclaración del medio de cultivo. En los Cuadros 1 y 2 aparecen los hongos ordenados en categorías según sus resultados en las pruebas cualitativas (ver también Anexos 2 y 3).

**Cuadro 1.** Crecimiento de los hongos en medio Mandels semisólido luego de 9 días de incubación a 22° C y en oscuridad.

Hongo	Grado de crecimiento	Descripción del criterio
C 2.1 5.1 4.2 3.1 12.1	Excelente	Placa totalmente cubierta por micelio o esporas, desarrollo de estructuras notables, micelio denso
C 3.1 8.1 10.1 11.3 C 4.2	Notable	Placa parcialmente cubierta, micelios poco densos
12.2 C 4.1 C 1.3	Pobre	Crecimiento limitado a la periferia del inóculo

Fuente: Laboratorio de Investigación en Bioquímica, 2006

**Cuadro 2.** Grado de aclaración del medio Mandels semisólido luego de 9 días de incubación a 22° C y en oscuridad.

Hongo	Grado de aclaración	Descripción del criterio
5.1	Excelente	Medio totalmente traslúcido
C 4.2 C 4.1 11.3 8.1	Notable	Al colocar las placas sobre una manta azul se aprecia este color, a diferencia del caso de la placa control.
12.2 C 1.3 4.2 C 3.1 C 2.1 12.1 10.1 3.1	Pobre	Diferencia de opacidad con respecto a la placa control casi imperceptible

Fuente: Laboratorio de Investigación en Bioquímica, 2006

### Cultivo en medio líquido con agitación

Para el primer cultivo en medio líquido se incluyeron 10 hongos, los cuales fueron analizados a los dos, cuatro y seis días para observar el crecimiento de micelio y el grado de degradación de celulosa. En el Cuadro 3 se presentan las observaciones realizadas durante el transcurso del cultivo.

**Cuadro 3.** Crecimiento de los hongos y aclaración del medio líquido luego de seis días de cultivo con agitación, a una temperatura no controlada cercana a 22° C y exposición a la luz.

Hongo	Día	Crecimiento	Aclaración	Hongo	Día	Crecimiento	Aclaración
3.1	2			12.2	2		
	4				4	+	X
	6	+			6	++	XX
4.2	2			C 1.3	2	+	
	4	+	X		4	+	X
	6	++	X		6	++	X
5.1	2			C 2.1	2	+	X
	4				4	++	XX
	6	+	X		6	++	XX
8.1	2	+		C 3.1	2		
	4	++	X		4		
	6	++	X		6	+	X
12.1	2	+	X	C 4.2	2		
	4	++	XX		4	+	
	6	++	XX		6	+	X

	Pobre: micelio muy escaso
+	Notable: se observa pequeña bolita de micelio o algunas separadas
++	Excelente: presencia de gran masa de micelio o muchas bolitas separadas

	Pobre: diferencia con frasco control apenas perceptible
X	Notable: se observa descenso en turbidez
XX	Excelente: medio translúcido como el agua

Se resalta en sombreado los resultados de los hongos escogidos por su buen desempeño

Fuente: Laboratorio de Investigación en Bioquímica, 2006

El segundo cultivo se realizó con los cuatro mejores crecimientos: “4.2”, “12.1”, “12.2” y “C 2.1”. A los dos, cuatro y seis días se separó uno de los tres frascos de cada crecimiento para analizar el desarrollo de micelio, la aclaración del medio líquido y posteriormente centrifugar su contenido y separar el sobrenadante. El Cuadro 4 presenta el orden relativo de los hongos, cada día que se analizaron, según su crecimiento y grado de aclaración del medio líquido (ver Anexo 4 con fotografías de los cuatro frascos en los diferentes períodos de muestreo).

**Cuadro 4.** Crecimiento y aclaración del medio de los cuatro mejores degradadores, luego de seis días de cultivo en medio líquido con agitación, a una temperatura no controlada cercana a los 22° C y exposición a la luz.

Hongo	Día	Crecimiento <sup>1</sup>	Aclaración <sup>2</sup>
4.2	2	D	C
	4	B	B
	6	C	D
12.1	2	B	A
	4	C	C
	6	A	A
12.2	2	C	D
	4	D	D
	6	B	C
C 2.1	2	A	B
	4	A	A
	6	C	B

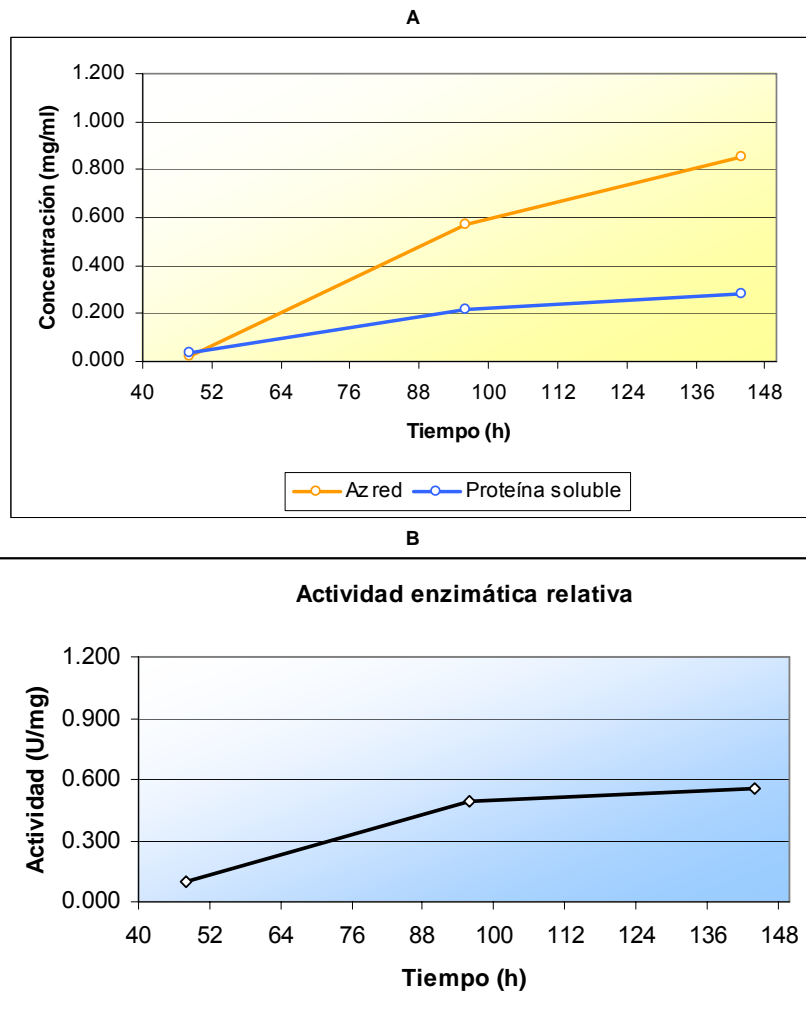
<sup>1,2</sup> A, B, C y D indican el orden decreciente de crecimiento y aclaración

Fuente: Laboratorio de Investigación en Bioquímica, 2006

### Pruebas cuantitativas

Los sobrenadantes de los cultivos se utilizaron como solución enzimática para realizar pruebas cuantitativas que permitieran medir y relacionar la concentración de proteína soluble, insoluble y azúcares reductores liberados de papel filtro. Con los datos obtenidos de estas pruebas (Anexos 5 y 6) se procedió a calcular la actividad enzimática de cada uno de los cuatro hongos escogidos (Anexo 7).

“4.2” es el único hongo cuya actividad enzimática presenta una tendencia únicamente creciente, a pesar de que en su punto máximo, a las 144 horas, la actividad es la tercera menor de las actividades medidas. A partir de las 96 horas su actividad se estabiliza cerca de las 0,6 U/mg. La Figura 1 muestra como a partir de este mismo momento el aumento de la degradación de papel filtro es levemente mayor al aumento en la cantidad de proteína soluble.

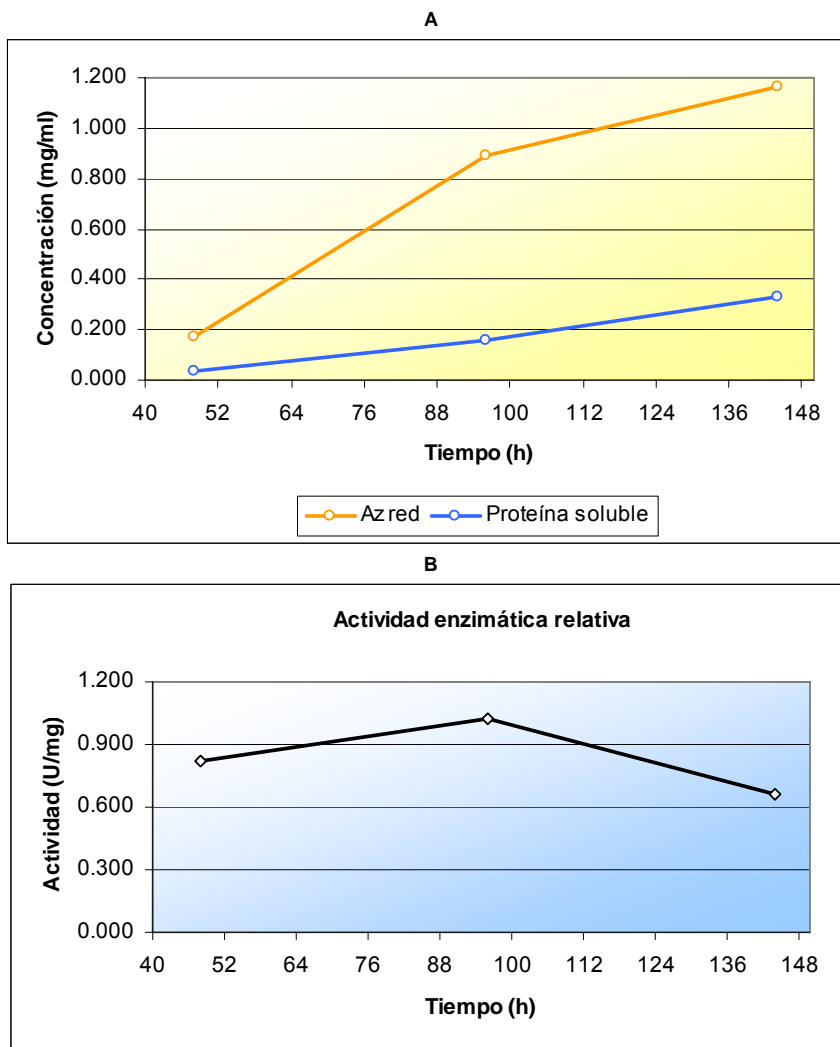


**Figura 1.** Comparación de las concentraciones de proteína soluble y de azúcares reductores producidos por el hongo “4.2” en cultivo líquido (A). Actividad enzimática relativa durante el cultivo (B).

Fuente: Laboratorio de Investigación Bioquímica, 2006.



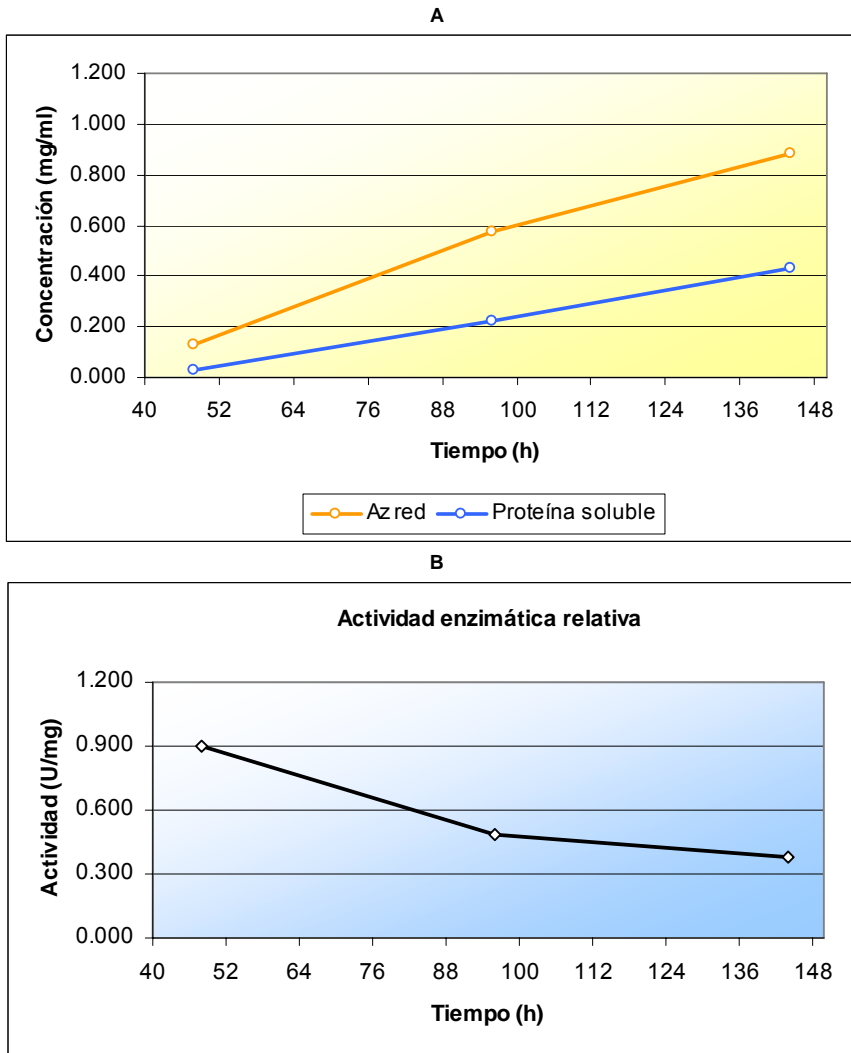
Los resultados de las pruebas de proteína y actividad en papel filtro de “12.1” (Fig. 2) corroboran el buen desarrollo y rápida aclaración del medio que se observó en el cultivo en medio líquido: a las 96 horas el medio se encontraba casi tan traslúcido como el agua y se observaba una gran masa de micelio. Es el hongo que alcanza la máxima actividad enzimática relativa (1,024 U/mg) y además el mayor promedio de actividad en los tres muestreos.



**Figura 2.** Comparación de las concentraciones de proteína soluble y de azúcares reductores producidos por el hongo “12.1” en cultivo líquido (A). Actividad enzimática relativa durante el cultivo (B).

Fuente: Laboratorio de Investigación Bioquímica, 2006.

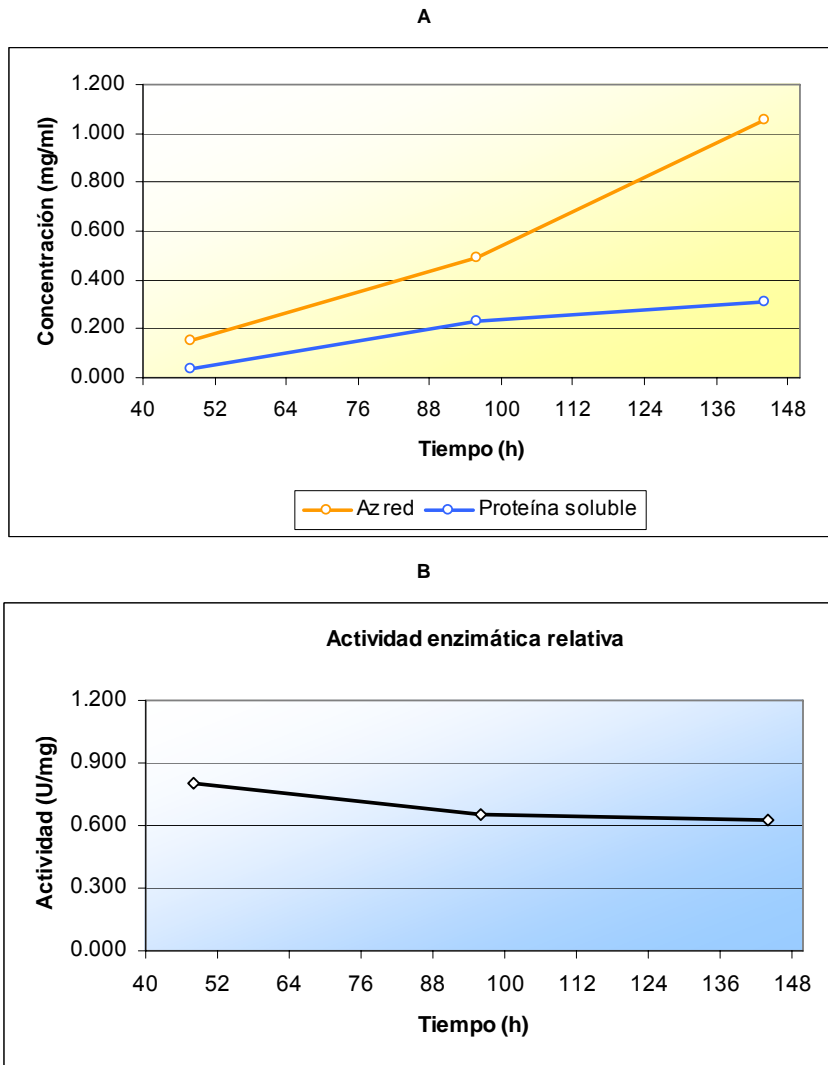
De los tres hongos que presentan una tendencia decreciente en su actividad relativa, "12.2" muestra el descenso más pronunciado. De cerca de 0,900 U/mg a las 48 horas pasa a poco más de 0,350 luego de 144 horas (Fig. 3). También fue el hongo que liberó al medio la mayor cantidad de proteína soluble, lo cual incide en los resultados de actividad enzimática relativa.



**Figura 3.** Comparación de las concentraciones de proteína soluble y de azúcares reductores producidos por el hongo "12.2" en cultivo líquido (A). Actividad enzimática relativa durante el cultivo (B).

Fuente: Laboratorio de Investigación Bioquímica, 2006.

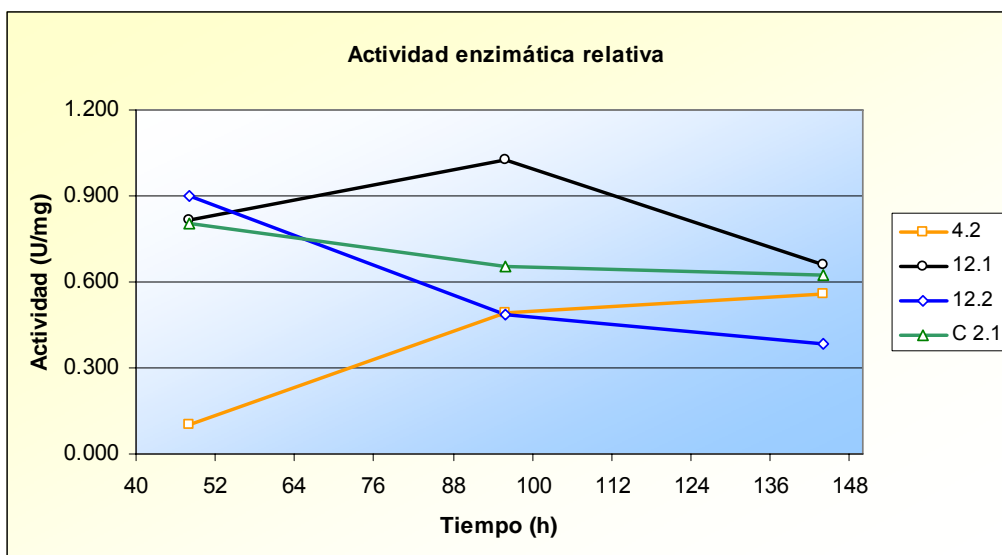
En el caso de “C 2.1”, se observa la tendencia decreciente menos pronunciada, con una actividad que se mantiene entre las 0,800 y los 0,600 U/mg (Fig. 4). Al igual que “12.1”, fue uno de los hongos que a las 96 horas de cultivo en medio líquido había degradado la celulosa casi en su totalidad. Su actividad enzimática relativa es la segunda mayor de todas las medidas.



**Figura 4.** Comparación de las concentraciones de proteína soluble y de azúcares reductores producidos por el hongo “C 2.1” en cultivo líquido (A). Actividad enzimática relativa durante el cultivo (B).

Fuente: Laboratorio de Investigación Bioquímica, 2006.

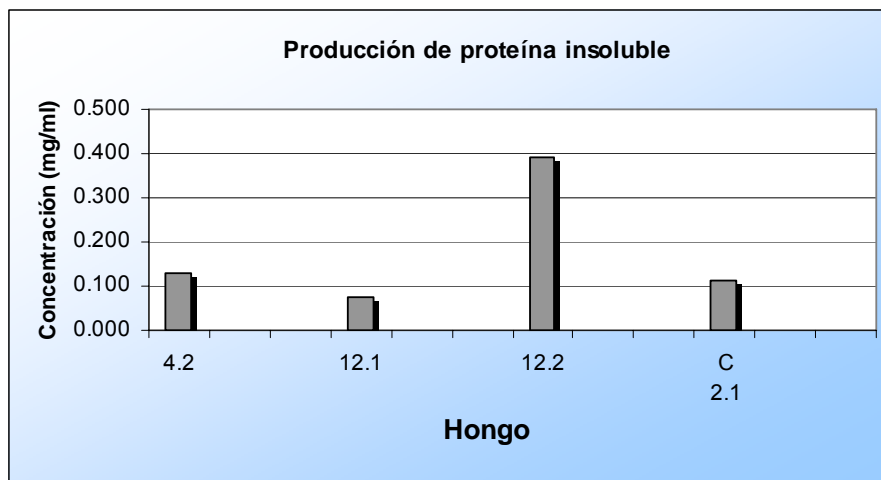
La Figura 5 presenta las actividades enzimáticas relativas comparadas de los cuatro hongos en el transcurso del cultivo en medio líquido con agitación. Las actividades iniciales y finales son similares para tres de los hongos; es en el período cercano a las 96 horas en el que se observan las mayores diferencias de actividad.



**Figura 5.** Comparación de las actividades enzimáticas relativas de los cuatro hongos durante el cultivo en medio líquido con agitación.

Fuente: Laboratorio de Investigación Bioquímica, 2006.

La concentración de proteína insoluble se midió únicamente al final del cultivo (196 horas) y sirve como una medida cuantitativa del crecimiento de cada hongo. Los valores demuestran que aquellos hongos que visualmente presentaron mayor crecimiento (“12.1” y “C 2.1”) no son los que produjeron la mayor cantidad de proteína (Figura 6).



**Figura 6.** Comparación de las concentraciones de proteína insoluble de los cuatro hongos luego de seis días de cultivo en medio líquido.

Fuente: Laboratorio de Investigación Bioquímica, 2006.

## DISCUSION DE RESULTADOS

Al comparar los resultados de las pruebas cualitativas con las pruebas cuantitativas destaca el hecho que algunos hongos que son los mejores aclaradores en placa no son los mejores aclaradores en medio líquido. El caso del hongo “5.1” ilustra claramente lo anterior: presenta excelente crecimiento y aclaración del medio Mandels sólido, sin embargo apenas mostró crecimiento en los frascos con medio líquido y la turbidez del medio al cabo de seis días se mantuvo muy similar a la del frasco control. Otro hongo que presentó una tendencia similar es “3.1”, el cual creció rápidamente en medio sólido pero fue solo hasta el sexto día de cultivo en medio líquido que se logró observar un rastro de micelio. También cabe resaltar que de los cuatro hongos escogidos para el análisis de actividad enzimática, todos se situaron en la categoría de aclaramiento pobre en placa. Al respecto se debe hacer la salvedad de que en algunos casos, como el de los hongos “C 2.1” y “8.1”, el propio micelio o los pigmentos liberados impidieron observar adecuadamente que tan traslúcido se encontraba el medio sólido, por lo que la aclaración pudo haber sido mayor que la observada.

De los cuatro mejores degradadores de celulosa en medio líquido, tres no secretaron pigmentos al medio. A pesar de que no se analizaron dichas sustancias, se puede suponer que si fueron producidas en respuesta a estrés ambiental, los tres hongos que no las liberaron se adaptaron mejor a las condiciones de cultivo.

Los cultivos en medio líquido, colocados en un agitador orbital sin control de temperatura, estuvieron expuestos a las variaciones diarias naturales de luz y de temperatura, dos factores que sin duda alguna ejercen gran influencia sobre el crecimiento y metabolismo de los hongos. La atmósfera dentro de los frascos sin aireación y la velocidad de agitación también se unen a la lista de causas que determinó cuáles hongos presentaron el mejor desempeño y por qué otros que crecieron bien en placas no lo hicieron de igual forma en medio líquido.

Los resultados de los análisis del contenido de proteínas y la liberación de azúcares reductores a partir de papel filtro permiten tener una idea general de la dinámica de

crecimiento y metabolismo de cada hongo. Con base en la naturaleza de los crecimientos fúngicos, se asume que una fracción considerable de la proteína extracelular presente en el medio de cultivo corresponde a las enzimas que llevan a cabo la degradación del sustrato, en este caso el complejo celulasa.

La celulosa microcristalina, a diferencia de la carboximetil celulosa o el nitrofenilglucósido, es un sustrato no selectivo para la producción de alguno de los tres grupos de enzimas principales del complejo celulasa. Para metabolizarla, cada hongo debió expresar en conjunto endoglucanasas, exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasas. Cada una de estas enzimas cumple una labor importante dentro del complejo sinérgico. La capacidad de producir y liberar las enzimas del complejo en las proporciones adecuadas es un factor preponderante para una buena capacidad celulolítica. En algunos hongos, el complejo enzimático es deficiente en la cantidad o actividad de alguno de los tres tipos de enzima, lo cual provoca una hidrólisis de celulosa deficiente o una rápida hidrólisis acompañada de la acumulación de subproductos que pueden ser inhibidores pasada cierta concentración. *Trichoderma viride*, uno de los mejores hongos celulolíticos, produce baja actividad de  $\beta$ -glucosidasa, lo cual contribuye a la acumulación de la celobiosa que inhibe la actividad de todo el complejo degradador. (Zaldívar et al, 2001).

Los cuatro hongos analizados presentan una tendencia creciente tanto de la concentración de proteína soluble como de los azúcares reductores liberados de la celulosa presente en el papel filtro. No obstante, a pesar de que ambas concentraciones aumentan, la actividad enzimática relativa de tres hongos ("12.1", "12.2" y "C 2.1") disminuye con respecto a la magnitud inicial. El papel filtro utilizado (Whatman N°1) está compuesto por fibra de algodón con un contenido mínimo de alfa celulosa del 98% (Whatman, 2006). Se infiere que el aumento de la actividad sobre papel filtro (producción de azúcares reductores) es menor que el aumento de la concentración de proteína soluble, esto es, que el hongo utiliza cada vez más proteína para hidrolizar la misma cantidad de celulosa. Lo anterior puede deberse a dos factores principales: una disminución de la actividad del complejo celulolítico, debido causas como la inhibición por parte de algún metabolito, por ejemplo; o bien, que no toda la proteína que se cuantifica como proteína soluble corresponde a

enzimas hidrolíticas, lo cual alteraría el cálculo de la actividad enzimática (Mandels y Andreotti, 1978).

Los tres hongos anteriormente mencionados, además de la disminución de actividad, también se destacan por haber consumido totalmente la celulosa del medio líquido antes del final del período del cultivo. Este hecho permite suponer que sus enzimas no sufrieron inhibición por los subproductos del metabolismo de celulosa. Si no fue por inhibición, la disminución de actividad enzimática se debe entonces a la presencia de otras proteínas solubles diferentes a enzimas hidrolíticas. Al no haber agregado glucosa al medio para ayudar al crecimiento inicial de los hongos, estos dependieron exclusivamente de la hidrólisis de celulosa para poder crecer. Pasado cierto nivel de desarrollo, los hongos se encuentran en capacidad de producir otros tipos de proteínas necesarias para su metabolismo y crecimiento, algunas de las cuales son secretadas al medio (Vílchez, 2002).

El hongo "4.2" fue el único cuya actividad enzimática final fue mayor que la inicial. Además, en los cultivos de muestra de tierra en placas con Mandels fue sobresaliente por las estructuras formadas. Sin embargo, entre las 96 y las 144 horas se observa una estabilización de la actividad. Adicionalmente, según las observaciones, el hongo no consumió toda la celulosa durante el cultivo. Es posible que "4.2" no haya alcanzado la etapa de madurez en la cual sintetiza y libera al medio proteínas diferentes a las enzimas celulólicas, con lo cual su actividad relativa calculada decrecería. Para conocer mejor el comportamiento del hongo es necesario cultivarlo durante un período mayor a seis días, de manera que se pueda comprobar si su actividad relativa continúa aumentando y se trata de un muy buen degradador de celulosa.



## **CONCLUSIONES**

1. El aislamiento de hongos celulolíticos mediante el crecimiento en sustratos celulósicos insolubles es un método directo y adecuado para trabajar muestras provenientes de zonas con altos niveles de degradación natural de la celulosa.
2. Los métodos cualitativos y cuantitativos no mostraron una relación estrecha entre sus resultados, lo que fue apreciable en las cuatro cepas seleccionadas.
3. La disminución de la actividad enzimática relativa de tres de los hongos analizados se debe más a la producción de proteínas solubles no celulolíticas que a una inhibición del complejo enzimático debido a metabolitos primarios.
4. Mediante bioprospección en un solo sitio se logró encontrar tres cepas que logran una muy buena degradación de celulosa microcristalina (con actividades relativas entre 0,3 y 0,8 U/mg) en condiciones que pueden ser ampliamente optimizadas.
5. La necesidad de complejos enzimáticos celulolíticos más eficientes que permitan aplicaciones industriales económicamente viables puede ser satisfecha mediante la búsqueda de organismos que crecen en ambientes tropicales sobre material lignocelulósico, especialmente los hongos.

## **RECOMENDACIONES**

1. Variar las condiciones del cultivo en medio líquido, por ejemplo en condiciones de oscuridad y a una temperatura controlada de 30° C.
2. Realizar pruebas que permitan determinar la actividad de cada tipo de enzima del complejo celulolítico, como crecimiento en carboximetilcelulosa y nitrofenilglucósido, así como análisis detallado de los metabolitos presentes en el sobrenadante mediante HPLC.
3. Evaluar las cepas seleccionadas en cultivos con otras fuentes de carbono y en diferente concentración para lograr hallar el sustrato y la concentración más adecuado para cada cepa que le permita la mejor producción enzimática
4. Hacer muestreos en otras zonas del país con diferentes condiciones de humedad y temperatura y en otra época del año.
5. Para conservar las cepas que se han elegido y estudiado, sembrar los hongos en tubos con agar papa dextrosa, cubiertos por aceite mineral y repicar cada 4 meses.

## BIBLIOGRAFÍA

- AGUIAR, C.L. Biodegradation of the cellulose from sugarcane bagasse by fungal cellulase. 2001. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 3(2): 117-121.
- BIOFUELS FOR SUSTAINABLE TRANSPORTATION*. [en línea] U.S. Department of Energy (DOE). Office of Energy Efficiency and Renewable Energy. 2003 <<http://permanent.access.gpo.gov/websites/www.ott.doe.gov/biofuel/enzymatic.htm>> [Consulta: 10 de noviembre, 2006]
- BIOMASS RESEARCH*. [en línea] National Renewable Energy Laboratory (NREL). 2006. <<http://www.nrel.gov/biomass/>> [Consulta: 10 de noviembre, 2006]
- CELLULOSE FILTERS*. [en línea]. Whatman. 2006 <<http://www.whatman.com/products/?pageID=7.25.5/>> [Consulta: 21 de diciembre, 2006]
- FLORES-VINDAS, E. 1999. *La Planta; estructura y función*. Cartago, CR. Editorial Tecnológica de Costa Rica.
- HERR, D.; LUCK, G.; DELLWEG, H. 1978. Formation of cellulases and degradation of cellulose by several fungi. *Fermentation Biotechnology* 56(4).
- HETTENHAUS, J.; GLASSNER, D. 1997. Cellulase assessment for biomass hydrolysis. A report for the DOE Office of Energy Efficiency and Renewable Energy Ethanol Program. <<http://www.ceassist.com/assessment.htm>>
- HIMMEL, M. E.; RUTH, M.F.; WYMAN, C.E. 1999. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. *Current Opinion in Biotechnology* 10:358-364. <<http://biomednet.com/eleceref/0958166901000358>>
- JOHANNESSEN, R. 1991. *Energy Efficiency & Environmental News: Alcohol Production from biomass*. Cooperative Extension Service. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida.

- MANDELS, M. 1974. Production and applications of cellulase. Laboratory Procedures Handbook. U.S. Army Materials Laboratories.
- MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.E. 1978. Problems and challenges in the cellulose to cellulase fermentation. *Process Biochemistry* 13(5).
- MATHEWS, C.; HOLDE, K.E.; AHERN, K. 2002. Bioquímica. 3ra edición. Madrid, Pearson Educación. p 44, 593, 650.
- TRIMIÑO, H. 1982. The Major  $\beta$ -Glucosidase of *Trichoderma reesei* QM6A: Synthesis, Purification and Kinetics. Tesis Ph.D. Nueva Jersey, EUA. Universidad estatal de Nueva Jersey en Rutgers. p. 1-10
- VÍLCHEZ, L. 2002. Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz. Tesis Lic. Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. p. 6-12 <[http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/Tesis/Basic/Vilches\\_P\\_L/T\\_completo.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/Tesis/Basic/Vilches_P_L/T_completo.pdf) >
- VILLEGAS, L.R. 2002. Cuantificación y comparación de la actividad celulolítica del hongo *Trichoderma viride* con hongos nativos de Costa Rica. Anteproyecto Tesis Lic. Heredia, CR. Universidad Nacional. p. 3
- ZALDIVAR, M.; VELASQUEZ, J.C.; CONTRERAS, I.; PEREZ, L.M. 2001. *Trichoderma aureoviride* 7-121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontrol. *Environmental Biotechnology* (en línea). 4(3). <<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol4/issue3/full/7/index.html>>

## ANEXOS

### 1. Composición de 1L de medio de cultivo Mandels (Mandels, 1974).

1,40g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

2,03g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  15ml

2,10g  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$

0,30g  $\text{CaCl}_2$

0,30g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Solución de metales traza 1ml

10g celulosa microcristalina

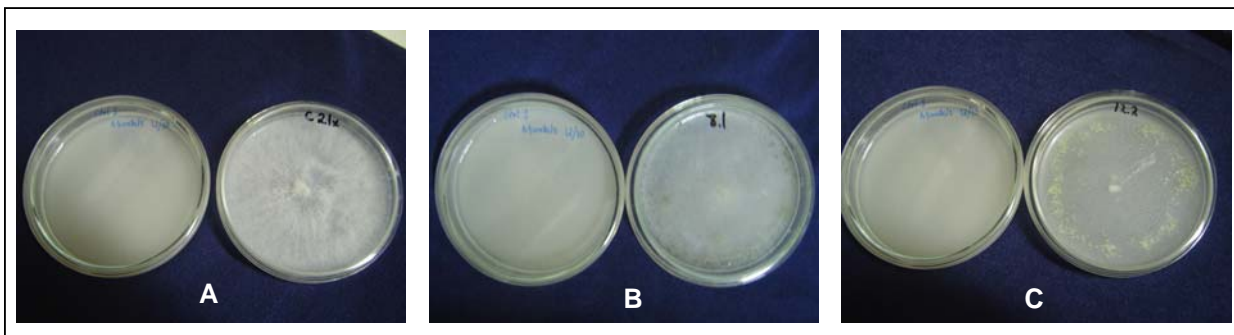
1g peptona

2. Asa micrológica modificada empleada para tomar los inóculos usados en los cultivos en medio Mandels semisólido y medio Mandels líquido.



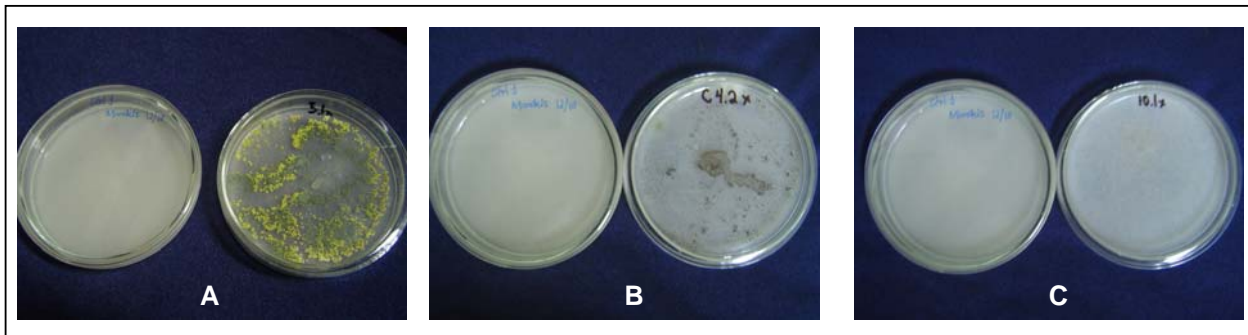
**Fuente:** Laboratorio de Investigación Bioquímica, 2006

3. Comparación de hongos con excelente (A), notable (B) y pobre (C) crecimiento en medio Mandels semisólido luego de 9 días. En los tres casos se muestra a la izquierda la placa control.



Fuente: Laboratorio de Investigación Bioquímica, 2006

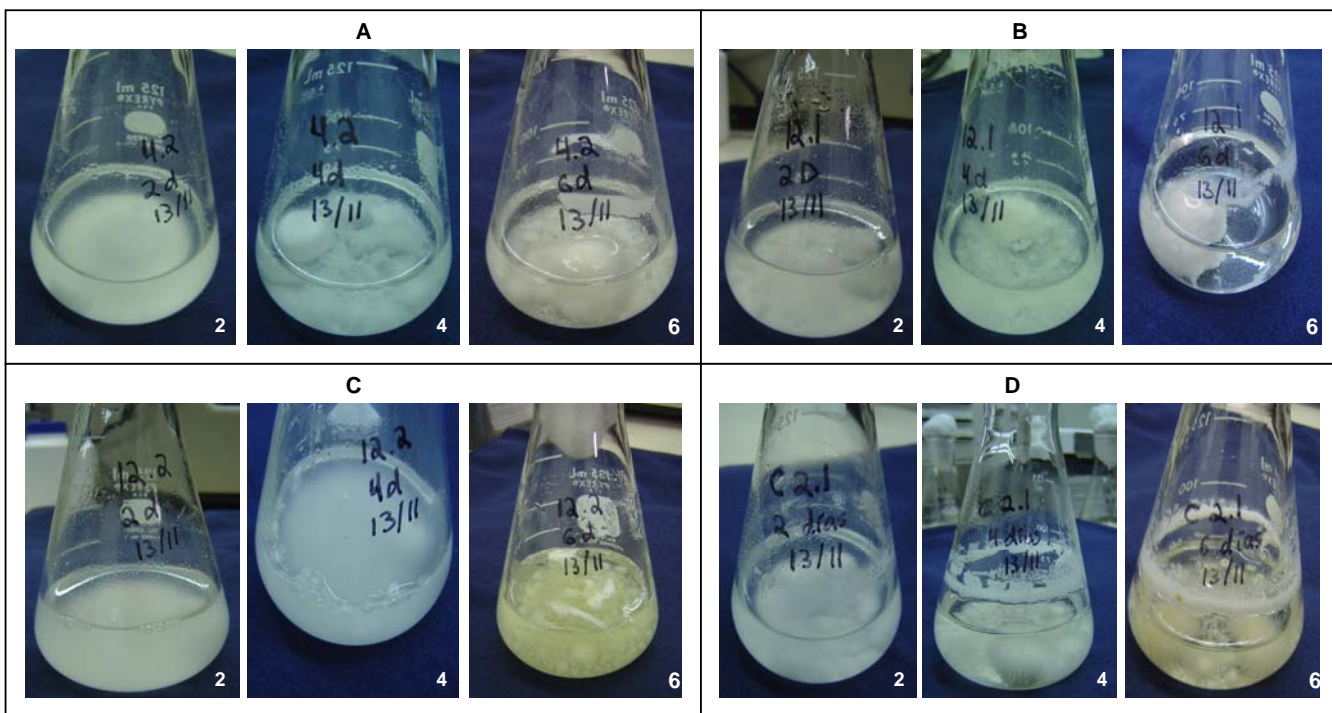
4. Comparación de hongos con excelente (A), notable (B) y pobre (C) aclaración del medio Mandels semisólido luego de 9 días. En los tres casos se muestra a la izquierda la placa control.



Fuente: Laboratorio de Investigación Bioquímica, 2006



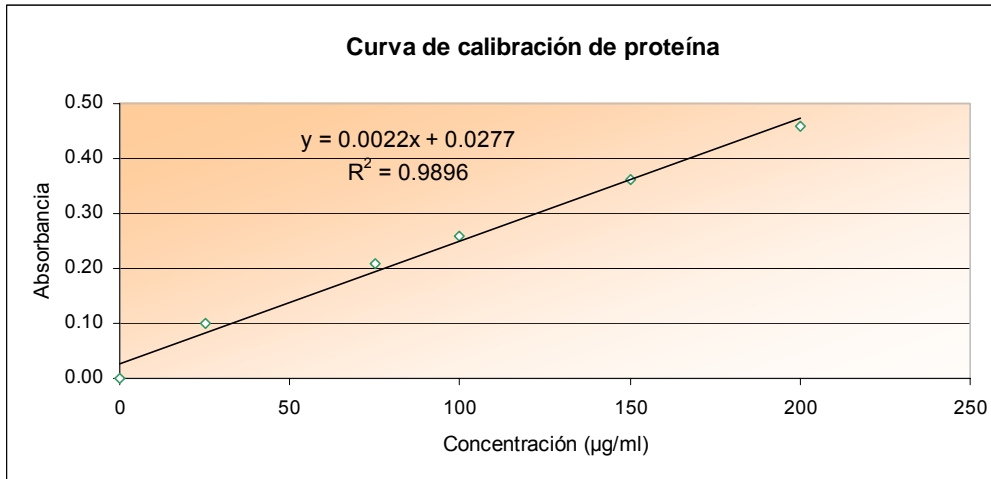
5. Comparación de la turbidez del medio líquido luego de 2, 4 y 6 días de cultivo con agitación de los hongos "4.2" (A), "12.1" (B), "12.2" (C) y "C 2.1" (D).



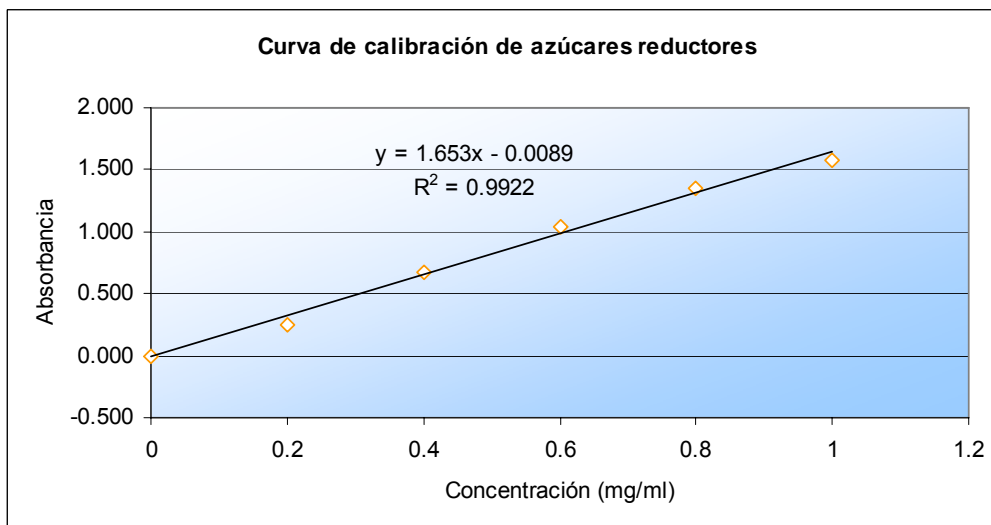
Fuente: Laboratorio de Investigación Bioquímica, 2006

6. Curvas de calibración para la determinación de la concentración de proteína soluble (A) y azúcares reductores (B), realizadas con diluciones de caseína soluble en NaOH 0,33M y glucosa, respectivamente.

A



B



Fuente: Laboratorio de Investigación Bioquímica, 2006

7. Resultados de mediciones de absorbancia y de los cálculos para determinar la concentración de proteína solubles, insoluble y azúcares reductores.

Muestra	Día	Proteína soluble		Proteína insoluble			Azúcares reductores		Actividad enzimática	
		A <sup>1</sup> <sub>595</sub>	Concentración (mg/ml)	A <sub>595</sub> <sup>3</sup>	A promedio	Concentración (mg/ml)	A <sub>550</sub>	Concentración (mg/ml)	APF <sup>4</sup> (U/ml)	Act específica (U/mg)
4.2	2	0.105	0.035	0.448			0.023	0.019	0.004	0.102
	4	0.503	0.216	0.648	0.547	0.236	0.937	0.572	0.106	0.490
	6	0.653	0.284	0.546			1.402	0.854	0.158	0.556
12.1	2	0.112	0.038	0.235			0.271	0.169	0.031	0.818
	4	0.383	0.162	0.364	0.330	0.137	1.469	0.894	0.165	1.024
	6	0.747	0.327	0.392			1.920	1.167	0.216	0.660
12.2	2	0.087	0.027	1.302			0.208	0.131	0.024	0.901
	4	0.510	0.219	1.568	1.563	0.698	0.940	0.574	0.106	0.484
	6	0.970	0.428	1.820			1.456	0.886	0.164	0.383
C 2.1	2	0.106	0.036	0.483			0.247	0.155	0.029	0.805
	4	0.516	0.222	0.487	0.480	0.205	1.289	0.785	0.145	0.654
	6	0.713	0.312	0.469			1.734	1.054	0.195	0.626
Control <sup>1</sup>	1	0.055	0.024	0.048			0.005	0.008	0.002	0.066
	2	0.052	0.022	0.034	0.045	0.008	0.005	0.008	0.002	0.070
	3	0.056	0.024	0.053			0.006	0.009	0.002	0.069

<sup>1</sup> Todas las muestras Control tomadas el día 6; número corresponde a repetición

<sup>2</sup> Absorbancia, valor indica la longitud de onda en nm

<sup>3</sup> Valores en esta columna son repeticiones de muestras del día 6

<sup>4</sup> Actividad sobre papel filtro

Fuente: Laboratorio de Investigación Bioquímica, 2006

### 8. Cálculo de la actividad enzimática absoluta y relativa (IUPAC)

La actividad enzimática se reportó en unidades de papel de filtro (UPF). Esta unidad está basada en la Unidad Internacional (UI).

1 UI =  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$  de sustrato convertido

=  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$  de azúcares reductores liberados en la reacción de hidrólisis

=  $0,18 \text{mg} \cdot \text{min}^{-1}$  (considerados como glucosa todos los azúcares reductores)

1 UPF =  $1 \mu\text{mol} \text{ glucosa} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml enzima}^{-1}$

$$\text{UPF} = \frac{\text{x mg glucosa}}{(0,5 \text{ ml enzima} \cdot 60 \text{ min})} \cdot \frac{1 \text{ mg glucosa}}{0,18 \mu\text{mol glucosa}} = \text{x mg glucosa} \cdot 0,185$$

La actividad enzimática absoluta corresponde a las unidades de papel filtro por mililitro (UPF/ml). El resultado de dividir el valor de la actividad enzimática absoluta entre la concentración de proteína soluble (expresada en mg/ml), es la actividad enzimática relativa (UPF/mg).