

## 26. Energía

**Secretomas fúngicos como pretratamiento biológico sobre biomasa lignocelulósica de *Panicum prionitis***Gauna, Albertina [gaunaalbertina@gmail.com](mailto:gaunaalbertina@gmail.com); Feldman, Susana R.; Larran, Alvaro S.;

Permingeat, Hugo R.; Perotti, Valeria E.

Universidad Nacional de Rosario

---

**Resumen**

Debido a la inminente necesidad de producir y utilizar fuentes de energía renovables, ciertos pastizales naturales como *Panicum prionitis*, ricos en polisacáridos y con baja eficiencia forrajera, representan una fuente de azúcares fermentables muy interesante para la producción de bioetanol de segunda generación. Sin embargo, la presencia de lignina en sus hojas hace que el proceso de producción requiera de un pretratamiento previo a la sacarificación. Los hongos de la podredumbre blanca de la madera son capaces de degradar los materiales lignocelulósicos, secretando al medio extracelular diversas enzimas involucradas en tal proceso. En base a este criterio, se evaluó la eficiencia de los secretomas de dos especies fúngicas (*Pycnoporus sanguineus* y *Ganoderma applanatum*) como agentes de pretratamiento sobre la biomasa de *P. prionitis*. Los resultados demuestran que el pretratamiento con secretomas fúngicos resulta más eficiente que los tradicionales (pretratamiento químico y con enzimas ligninolíticas comerciales), permitiendo hidrolizar hasta un 47,5% de la celulosa en el caso de *G. applanatum*. Ensayos de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas permitieron la identificación de una gran cantidad de proteínas en los secretomas, revelando que el 34% y el 42% de ellas se encuentran involucradas en los procesos de degradación de la biomasa lignocelulósica para *G. applanatum* y *P. sanguineus*, respectivamente

**Palabras clave:** bioetanol de segunda generación, biomasa lignocelulósica, pretratamiento, secretomas fúngicos.

## Introducción

La industria del bioetanol de segunda generación ofrece la posibilidad de desarrollar un mercado alternativo que enfrente la escasez de combustibles fósiles y los efectos de los mismos sobre el cambio climático. La biomasa lignocelulósica, de la cual puede obtenerse el bioetanol, posee un alto contenido de azúcares fermentables (celulosa y hemicelulosa); sin embargo, la matriz formada por la hemicelulosa y la lignina limita el acceso a los mismos, resultando ineludible la necesidad de aplicar un pretratamiento para sortear esta barrera (Lamsal et al., 2011). Este proceso es un paso fundamental y constituye el cuello de botella en la producción de bioetanol de segunda generación, siendo necesario para aumentar la hidrólisis enzimática (sacarificación) de los polímeros presentes en la pared celular que producirán los azúcares fermentables. Mediante este proceso, la celulosa queda expuesta a la acción hidrolítica de las enzimas, incrementando la eficiencia de la etapa de sacarificación posterior (Masran et al., 2016).

Los pretratamientos más utilizados se basan en el uso de ácidos o bases fuertes, siendo éstos altamente contaminantes. La utilización de hongos ligninolíticos como pretratamiento biológico no sólo constituye una forma medioambientalmente amigable y

económica, sino que posibilita una mayor eficiencia en la liberación de azúcares fermentables respecto a los pretratamientos convencionales (Larran et al., 2015). Estos organismos han desarrollado la habilidad de mineralizar completamente la lignina mediante mecanismos degradativos que involucran un proceso oxidativo regulado enzimáticamente. Muchas de estas enzimas son secretadas al medio extracelular, debido a que estos hongos degradan la celulosa y hemicelulosa, utilizando sus productos como fuente de carbono y energía (Singh and Singh, 2014; Sánchez, 2016). Las proteínas secretadas, que constituyen el secretoma, incluyen enzimas hidrolíticas, no hidrolíticas y sistemas enzimáticos ligninolíticos oxidativos (Kubicek and Kubicek, 2016).

En el presente trabajo se utilizó una planta perenne dominante en las islas del delta del río Paraná, *Panicum prionitis*, como biomasa lignocelulósica para la potencial producción de etanol de segunda generación. Esta gramínea C4 crece en zonas deprimidas e inundables. Además, debido a su alto contenido de lignina, es utilizada ineficientemente como forrajera del ganado, siendo quemada con frecuencia en búsqueda de un rebrote más tierno (Masa et al., 2016). Utilizando dicha biomasa, se ensayó y comparó la eficiencia del empleo de secretomas de

dos especies fúngicas de la podredumbre blanca de la madera: *Pycnoporus sanguineus* y *Ganoderma applanatum*, con dos pretratamientos convencionales: un pretratamiento químico utilizando ácido fosfórico y un pretratamiento biológico con enzimas ligninolíticas comerciales.

Los avances recientes en tecnologías proteómicas permitieron estudiar el secretoma completo de cada especie en estudio en un único experimento, determinando que existe un gran porcentaje de proteínas secretadas relacionadas a los procesos de degradación de la lignocelulosa.

### Objetivos

- Determinar la composición sumaria de *Panicum prionitis*, con énfasis en el contenido de azúcares fermentables, hemicelulosa y lignina.
- Ensayar la eficiencia de digestión de la lignina de *Panicum prionitis* frente al tratamiento con enzimas ligninolíticas comerciales y frente a un pretratamiento químico utilizando ácido fosfórico.
- Evaluar la eficiencia en la digestión de la lignina de *Panicum prionitis* frente al tratamiento con sobrenadantes de hongos basidiomicetes causantes de podredumbre de la madera.
- Identificar las proteínas presentes en los sobrenadantes fúngicos que puedan haber participado en el proceso de ligninólisis y sacarificación de la biomasa.

### Materiales y Métodos

#### Biomasa lignocelulósica y enzimas comerciales

Las plantas de *Panicum prionitis* Ness fueron colectadas en su hábitat natural, dentro de la Estancia 'La Catalina' (32\_52'43.04"S, 60\_35'0.33"W; Victoria, Entre Ríos, Argentina) y trasplantadas a una parcela experimental en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario (Zavalla, Santa Fe). Las hojas verdes y senescentes fueron cosechadas, secadas hasta peso constante (60°C), molidas en piezas de 7 x 3 x 1 mm (molienda gruesa) o 3 x 2 x 1 mm (molienda fina), y almacenadas en bolsas de plástico hasta su posterior utilización.

Las enzimas y químicos utilizados fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Argentina. Las enzimas empleadas en este trabajo fueron: b-glucosidasa de almendras (49,290), hemicelulosa de *A.niger* (H2125), Celulasa de *A. niger* (C1184), Lignina Peroxidasa (LiP) (42,603), Manganese Peroxidasa (MnP) (93,014) y Laccase (Lac) de *T. versicolor* (51,639).

#### Composición química de la biomasa

La composición química (porcentaje de celulosa, hemicelulosa y lignina) de las hojas verdes y senescentes de *P. prionitis* fue determinada mediante la técnica de detergentes de Van Soest (Van Soest, 1967).

#### Especies fúngicas

Las especies fúngicas estudiadas: *Pycnoporus sanguineus* y *Ganoderma applanatum*, fueron colectadas de diferentes árboles en el campo experimental de la localidad de Zavalla. Los hongos fueron cultivados y aislados en placas de Petri conteniendo medio Agar Papa Glucosado (APG). Las placas fueron incubadas durante 7 días a 28°C en oscuridad y se conservaron a 4°C.

#### Pretratamiento y sacarificación de la biomasa de *P. prionitis*

Todos los pretratamientos fueron llevados a cabo en triplicados biológicos y fueron seguidos por el proceso de sacarificación. La glucosa liberada se midió después del proceso global (pretratamiento más sacarificación).

Se realizaron dos tipos de controles: los tubos blancos corresponden a las unidades experimentales que indican la cantidad de azúcar endógena de todos los componentes del medio de reacción. Los tubos control corresponden a las unidades experimentales sujetas sólo al proceso de sacarificación, con el objetivo de cuantificar fielmente la contribución de cada pretratamiento (mediante la sustracción de los controles al total de azúcar liberado) al proceso global. La preparación de los blancos y controles se detalla en las siguientes secciones.

#### Pretratamiento químico

Se pesaron 15 mg de hojas verdes y senescentes de *P. prionitis*, se las colocó

en tubos eppendorf conteniendo 500 µL de ácido fosfórico concentrado (85% v/v) y se incubó durante 45 minutos a 50°C como se describe en Larran et al., 2015. Los blancos y controles fueron preparados con agua destilada en lugar de ácido.

#### Pretratamiento biológico con enzimas comerciales

Se pesaron 15 mg de hojas verdes y senescentes de *P. prionitis* y se colocaron en tubos Eppendorf, añadiendo 0.0025 U de las enzimas ligninolíticas comerciales (LiP, MnP, o Lacasa) disueltas en 250 µL de buffer acetato de sodio 50 mM pH 4. Los blancos y controles se prepararon con el buffer de dilución en ausencia de enzimas. Los tubos se incubaron a 37°C durante 48 hs.

#### Pretratamiento Biológico con secretomas fúngicos

A partir de una colonia de los hongos a ensayar, *P. sanguineus*, y *G. applanatum* crecida en medio sólido APG, se tomó una fracción de micelio de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> desde la región periférica de la placa con crecimiento activo, y se inoculó en tubos falcon conteniendo 20 mL de medio líquido Papa Glucosado. Los tubos se incubaron durante 7 días a 28°C en un agitador orbital. Una vez cumplido dicho lapso, se centrifugaron a 5.600 g durante 10 minutos para precipitar la mayor cantidad de masa fúngica y luego se filtró el sobrenadante con papel de filtro estéril,

con el fin de obtener un secretoma limpio de micelio.

Se pesaron 50 mg de hojas verdes y senescentes de *P. prionitis* y se colocaron en Erlenmeyers de 50 mL. Se realizaron los mismos ensayos para dos tipos de molienda: gruesa y fina. A cada frasco se agregaron 500 µL del sobrenadante del hongo a ensayar disuelto en 4,5 mL de buffer Acetato de Sodio 50 mM pH 4 (Volumen final: 5 mL). Los blancos de reacción consistieron en el mismo volumen tanto de sobrenadante como de buffer previamente autoclavado. Se incubaron los Erlenmeyes a 37°C durante 48 hs.

#### Sacarificación

La etapa de sacarificación fue la misma para todos los pretratamientos, para poder comparar fielmente las eficiencias de los primeros. Las hojas verdes o senescentes fueron incubadas con una mezcla de enzimas Celulasas, Hemicelulasas y b-glucosidasa, previamente filtradas para remover los azúcares estabilizantes de las mismas (Larran et al., 2015). Se disolvieron 0.4 U de cada enzima en 500 mL de buffer Acetato de Sodio 100 mM. Los blancos consistieron en la mezcla enzimática previamente hervida para desnaturalizar las enzimas.

Después de 48 hs de incubación a 50°C se tomaron alícuotas de 20 µL para determinar la concentración de glucosa

liberada, utilizando el kit enzimático de glicemia (Wiener Lab, Rosario, Argentina). Los valores de glucosa liberados de los tubos blancos fueron sustraídos de las unidades experimentales tratadas con el objetivo de obtener la concentración de glucosa liberada en el proceso total. Simultáneamente, los valores de glucosa de los tubos control se sustrajeron a los valores de los tratados, con el objetivo de calcular la contribución de cada pretratamiento al total de glucosa liberada. Los resultados fueron expresados en miligramos de glucosa liberados por gramo de *P. prionitis*.

El porcentaje de celulosa hidrolizada en cada uno de los ensayos fue calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{Celulosa hidrolizada} = \frac{\text{mg glucosa liberados/ g } P. \text{ prionitis} \times 0,9^*}{\text{mg celulosa/ g } P. \text{ prionitis}} \times 100$$

\*0,9 es un factor de corrección que considera que cada residuo de glucosa dentro de una cadena de celulosa pesa 162 Da, mientras que en su estado libre pesa 180 Da. Cabe aclarar que se consideró despreciable el aporte de glucosa proveniente de la hidrólisis de hemicelulosa (Larran et al., 2015).

#### Aislamiento y enriquecimiento de proteínas secretadas

Para analizar el secretoma de los hongos *P. sanguineus* y *G. applanatum*, se inoculó una cantidad inicial de  $5 \times 10^5$



conidios fúngicos en un medio estéril, conteniendo 1,5 g de un mix de hojas verdes y senescentes de *P. prionitis* en 20 mL de buffer Acetato de Sodio 50 mM pH 6, y se permitió el crecimiento durante cuatro semanas a 28 °C en un agitador orbital. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 5.600 g durante 10 minutos en centrifuga refrigerada a 4°C para recolectar la biomasa fúngica. Se separó el sobrenadante y se lo filtró con papel de filtro estéril para eliminar posibles restos de micelio. Las proteínas extraídas fueron concentradas en un tubo falcon concentrador con un filtro de corte de 10.000 Da, centrifugando a 1.100 g a una temperatura de 4 °C hasta alcanzar un volumen final de 300 µL, que fueron transferidos a un tubo Eppendorf. Inmediatamente, se realizó una precipitación del extracto proteico con ácido tricloroacético (ATC) con el propósito de eliminar impurezas de la muestra: se agregó 1 V de ATC 20% y se incubó a -20°C durante toda la noche. Los tubos se descongelaron y centrifugaron a máxima velocidad durante 10 minutos (4°C), se descartó el sobrenadante, y se realizaron tres lavados con 500 µL de etanol 70%, centrifugando durante tres minutos y descartando el sobrenadante en cada paso. Finalmente, se realizó un lavado con 1 mL de acetona, se centrifugó en las mismas condiciones anteriores, se descartó el sobrenadante y el pellet se

dejó secar a temperatura ambiente por 30 minutos.

#### [Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas \(CL-EM\)](#)

Las muestras de los secretomas fúngicos a evaluar (*P. sanguineus* y *G. applanatum*) fueron enviadas al Centro de Estudios Químicos y Biológicos en Espectrometría de Masa (CEQUIBIEM), donde fueron resuspendidas en buffer Bicarbonato de Amonio 50 mM pH=8 y digeridas con tripsina. Luego, se les realizó una limpieza con Zip-Tip C18 para extraer las sales. Las muestras fueron liofilizadas por Speed Vac y resuspendidas en 10 µL de Ácido Fórmico 0,1%. La primera separación proteica se realizó mediante nano HPLC, utilizando una columna de fase reversa (C18, 2,6 µm, 150°, 75 µm x 150 mm, Thermo Scientific). El volumen de inyección fue de 2 µl y la elución se realizó en gradiente, con dos soluciones: Solución A: Agua con 0,1% de Ácido Fórmico, Solución B: Acetonitrilo con 0,1% de Ácido Fórmico.

Todos los solventes y reactivos utilizados fueron de calidad CL-EM.

Las muestras fueron ionizadas por electrospray y separadas en una segunda dimensión por espectrometría de masas.

Los espectros obtenidos fueron analizados con el programa "Proteome Discoverer", utilizando las bases de datos UniProt (<http://www.uniprot.org/>) para *P. sanguineus* y una base de datos de

*Ganoderma lucidum* para las búsquedas de *G. applanatum* (<http://www.medfungi.org/20141010/galu/analyzer/download>).

## Resultados y Discusión

### Composición química de *P. prionitis*

De acuerdo a los análisis de Van Soest, la biomasa de *P. prionitis* posee un potencial interesante para la producción de bioetanol de segunda generación. El total de polisacáridos (celulosa +hemicelulosa) es de alrededor del 70% del peso seco en ambos tipos de biomasa. Como puede observarse en la tabla I, existen diferencias significativas en la composición de la biomasa verde y senescente para los tres polímeros en estudio. Los valores de celulosa y lignina son más elevados en muestras de hojas senescentes, mientras que el porcentaje de hemicelulosa presenta un valor mayor en hojas verdes.

Este fenómeno fue previamente observado en estudios realizados en nuestro laboratorio sobre la biomasa lignocelulósica de *Spartina argentinensis* (Larran et al., 2015), demostrando un cambio significativo en la composición de la pared celular vegetal en estados fenológicos avanzados. La cantidad de lignina puede variar debido a múltiples factores, que incluyen el tejido celular, la fase del desarrollo de la célula, la especie

vegetal y las condiciones ambientales (Turumtay, 2015).

De acuerdo a la composición química de las hojas de *P. prionitis*, se estima que se podrían obtener 9830 L/ha de bioetanol (Feldman, 2016), lo que representa un alto rendimiento, considerando los valores reportados para otras biomásas lignocelulósicas (Cardona et al, 2012).

Composición química de la pared celular de <i>P. prionitis</i>	Biomasa Verde	Biomasa Senescente
% Celulosa	33.06	35.46
% Hemicelulosa	35.45	32.6
% Lignina	6.28	7.4

**Tabla I: Composición de la pared celular de hojas de *Panicum prionitis*.** Los valores se expresan en porcentajes. Existen diferencias estadísticamente significativas entre tipos de biomasa para los tres polímeros en estudio (Prueba T,  $p < 0,05$ ).

### Pretratamientos

El objetivo del presente estudio fue comparar la efectividad de tres pretratamientos sobre la biomasa de *P. prionitis*, dos biológicos (con enzimas ligninolíticas comerciales y con secretomas de hongos ligninolíticos) y uno químico (con ácido fosfórico concentrado), y la prospectiva utilización de dicha biomasa como sustrato en la producción de bioetanol de segunda generación.

### Pretratamiento con ácido fosfórico y enzimas ligninolíticas comerciales

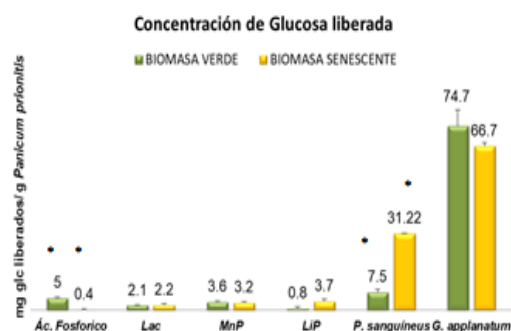
La cantidad de glucosa liberada mediante el uso de ácido fosfórico como agente de pretratamiento fue de  $5.0 \pm 0.3$  and  $0.4 \pm 0.2$  mg por gramo de hojas de *P. prionitis* verdes y senescentes, respectivamente

(Figura 1). A pesar de que el pretratamiento químico utilizando ácidos minerales se reporta como uno de los más eficientes entre los tratamientos convencionales, los valores obtenidos en las condiciones ensayadas sobre hojas de *P. prionitis* no muestran una gran eficiencia de liberación de glucosa. Sin embargo, la adición del pretratamiento aumenta los niveles de glucosa liberados en ambos tipos de biomasa en referencia a los tubos a los cuáles sólo se aplicó el proceso de sacarificación.

Con respecto a la utilización de enzimas comerciales como agentes de pretratamiento, no se observan diferencias significativas de liberación de glucosa entre biomasa verde y senescente para ninguna de las tres enzimas en estudio (Lacasa, LiP y MnP) demostrando una especificidad similar de las mismas hacia ambos tipos de biomasa (Figura 1). En cualquiera de los tres ensayos realizados, la presencia del pretratamiento aumenta los niveles de glucosa liberados entre un 13 y un 37%, dependiendo de la enzima utilizada, respecto a los tubos sometidos sólo al proceso de sacarificación (no se muestra en la Figura 1). Estos resultados demuestran que la exposición a los polisacáridos es aumentada en presencia de estas enzimas, generando un mayor acceso a las enzimas celulósicas del paso posterior.

#### Pretratamiento con secretomas fúngicos

Como se muestra en la Figura 1, los valores de glucosa liberada obtenidos mediante el uso de secretomas fúngicos como agentes de pretratamiento superan ampliamente a los alcanzados con el pretratamiento químico o con enzimas ligninolíticas comerciales. Mediante la utilización del secretoma de *G. applanatum* se consiguió una eficiencia hasta 15 veces superior a la alcanzada por los pretratamientos mencionados. Sólo se observan diferencias significativas respecto al tipo de biomasa utilizando el secretoma de *P. sanguineus*.



**Figura 1: Glucosa liberada después de la hidrólisis enzimática, utilizando diferentes pretratamientos.** Se muestran los valores de glucosa liberada por el proceso total. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (Prueba T,  $p < 0,05$ ) entre tipos de biomasa.

Debido a los altos valores de glucosa liberada mediante el empleo de secretomas como agentes de pretratamiento, se analizó la contribución de cada paso del proceso en la obtención final de glucosa (tabla II).

Puede notarse que, el efecto del pretratamiento sobre la liberación de glucosa varía según la especie fúngica y



la composición de la biomasa lignocelulósica.

Contribución de cada paso del proceso a la obtención final de glucosa		Biomasa Verde	Biomasa Senescente
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	%glucosa liberada por pretratamiento	34.3	59.0
	%glucosa liberada por sacarificación	65.7	41.0
<i>Ganoderma applanatum</i>	%glucosa liberada por pretratamiento	31.3	16.3
	%glucosa liberada por sacarificación	68.7	83.7

**Tabla II:** Contribución de cada paso del proceso a la obtención final de glucosa.

Como se muestra en la tabla II, el pretratamiento con mayor contribución fue alcanzado mediante el empleo del secretoma de *P. sanguineus* en ambos estados de la biomasa (34% para hojas verdes y 59% para hojas senescentes). Sin embargo, los mayores valores de glucosa liberados en el proceso total (pretratamiento más sacarificación) se observaron utilizando el secretoma de *G. applanatum* (74.7 y 66.7 mg glucosa liberados/g *P. prionitis*, para hojas verdes y senescentes, respectivamente).

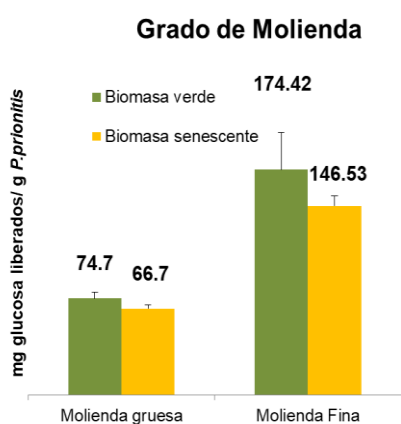
Los hongos de la podredumbre blanca de la madera son conocidos por degradar la celulosa, hemicelulosa y la lignina simultáneamente (Singh and Singh, 2014; Sánchez, 2016). Las diferencias observadas en este trabajo pueden deberse a la secreción de un consorcio enzimático específico de cada hongo, que podría contribuir en mayor o menor medida a cada una de las etapas del proceso. Es decir, se puede inferir que las enzimas secretadas por *P. sanguineus*

contribuyen en mayor medida al proceso de pretratamiento, mientras que el secretoma de *G. applanatum* muestra una mayor actividad durante la etapa de sacarificación. Además, se observó que cuando los secretomas fúngicos se utilizan como agentes de pretratamiento y sacarificación, esto es, sin la intervención de enzimas celulósicas comerciales, los valores de glucosa liberados fueron más elevados para *G. applanatum* que para *P. sanguineus*. Sin embargo, en ambos casos, los valores totales de glucosa liberados fueron significativamente menores a los alcanzados utilizando enzimas comerciales durante el proceso de sacarificación (no se muestran resultados).

Considerando que *G. applanatum* crece naturalmente en arboles vivos, es razonable que el porcentaje de contribución al pretratamiento sobre hojas senescentes sea menor que sobre hojas verdes. De manera contraria, *P. sanguineus*, que crece sobre biomasa en descomposición, presenta un porcentaje mayor de contribución al pretratamiento sobre biomasa senescente.

Cuando se ensayó el efecto del grado de molienda sobre las hojas de *P. prionitis* utilizando el secretoma de *G. applanatum* como agente de pretratamiento, se observó que se produce un incremento en los valores de glucosa liberados, del 148% sobre hojas verdes y 140% sobre hojas

senescentes (figura 2). Esto puede deberse al aumento en la superficie de exposición a las enzimas lignocelulósicas. Además, es importante resaltar que la producción de bioetanol puede llevarse a cabo tanto en hojas verdes como senescentes con la misma eficiencia, permitiendo cosechar la biomasa en cualquier estado.



**Figura 2: Glucosa liberada después de la hidrólisis enzimática según el grado de molienda de la biomasa.** Se utilizó el secretoma de *G. applanatum* como agente de pretratamiento. Se muestran los valores de glucosa liberada por el proceso total. No existen diferencias estadísticamente significativas (Prueba T,  $p < 0,05$ ) entre tipos de biomasa. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

### Porcentaje de Celulosa hidrolizada

Como puede observarse en la tabla III, ninguno de los pretratamientos utilizados convencionalmente en los procesos de obtención de etanol lignocelulósico consigue degradar una cantidad sustancial de celulosa.

Como se detalló anteriormente, la biomasa pretratada con los secretomas fúngicos resulta más eficiente que los pretratamientos convencionales,

alcanzando valores de hidrólisis de la celulosa presente en la pared celular de alrededor del 50%, cuando se utiliza el secretoma de *G. applanatum* sobre la biomasa finamente molida de *P. prionitis*.

% Celulosa hidrolizada		
	Biomasa Verde	Biomasa senescente
Ácido fosfórico	1.4	0.1
Lignina Peroxidasa	0.2	0.9
Manganeso Peroxidasa	1	0.8
Lacasa	0.6	0.6
<i>P. sanguineus</i>	2	7.9
<i>G. applanatum</i>	20.3	16.9
<i>G. applanatum</i> (molienda fina)	47.5	37.2

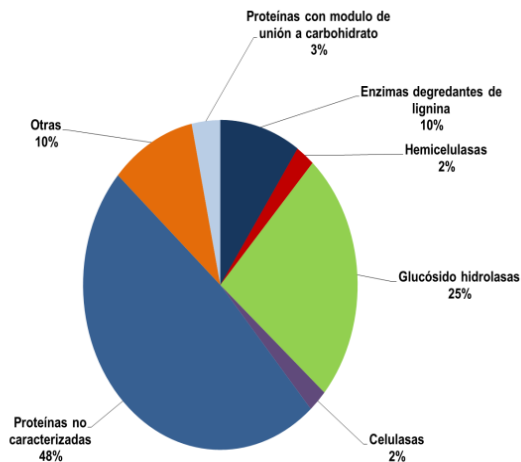
**Tabla III: Porcentaje de celulosa hidrolizada.** Se muestran los porcentajes de celulosa hidrolizada en cada pretratamiento ensayado. Los cálculos fueron realizados utilizando los valores de glucosa liberada por el proceso total. Se consideró despreciable el aporte de glucosa proveniente de la hemicelulosa.

### Análisis de Secretomas fúngicos

Las proteínas presentes en el secretoma de *P. sanguineus* y de *G. applanatum* fueron clasificadas funcionalmente de acuerdo a su rol biológico como se indica en las Figuras 3 y 4, respectivamente. Las 179 proteínas caracterizadas en el secretoma de *P. sanguineus* se agruparon en: enzimas degradantes de lignina (10%), hemicelulasas (2%), celulasas (2%), glucósido hidrolasas (25%), proteínas no caracterizadas (48%), proteínas con módulo de unión a carbohidratos (3%) y otras (10%). En referencia al secretoma de *G. applanatum*, los 73 polipéptidos identificados se clasificaron en: enzimas degradantes de lignina (7%), hemicelulasas (13%),

celulasas (3%), glucósido hidrolasas (11%), proteínas no caracterizadas (22%), y otras (44%).

Clasificación funcional de proteínas encontradas en el secretoma de *P.sanguineus*



Clasificación funcional de proteínas encontradas en el secretoma de *G.applanatum*

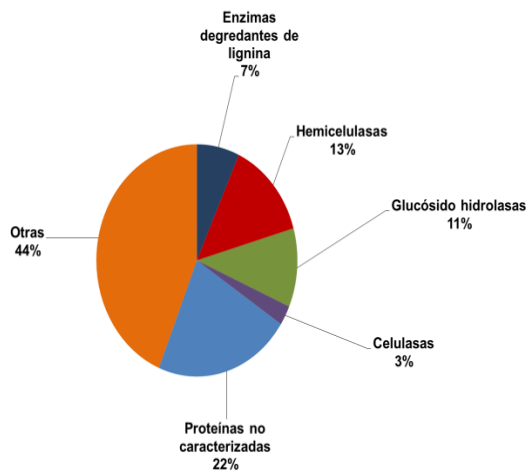


Figura 3 y 4: Clasificación funcional de proteínas del secretoma de *P. sanguineus* y *G. applanatum*, respectivamente.

## Conclusiones

El presente trabajo demuestra que la biomasa de *P. prionitis* puede ser considerada como una potencial fuente de bioetanol de segunda generación, pudiendo contribuir a la generación de

nuevas actividades económicas en las áreas marginales donde se desarrolla.

El uso de secretomas fúngicos como agentes de pretratamiento biológico permitió hidrolizar cerca del 50% de la celulosa presente en la pared celular de dicha biomasa. El estudio de los secretomas de las especies fúngicas utilizadas indica que el 34 y 42% de las enzimas secretadas por *G. applanatum* y *P. sanguineus*, respectivamente, se encuentran asociadas a los procesos de degradación de materiales lignocelulósicos.

Este es el primer estudio que muestra la potencialidad de utilización de *P. prionitis* como fuente potencial de bioetanol, mediante la utilización de secretomas fúngicos como agentes de pretratamiento. Es necesaria la conducción de nuevas investigaciones que permitan optimizar el proceso de sacarificación y desarrollar procesos rentables para la obtención de las principales proteínas lignocelulósicas a gran escala.

## Bibliografía

- Lamsal, B. P., Madl, R., & Tsakpunidis, K. (2011). Comparison of feedstock pretreatment performance and its effect on soluble sugar availability. *Bioenergy Research*, 4(3), 193-200.
- Masran, R., Zanirun, Z., Bahrin, E. K., Ibrahim, M. F., Yee, P. L., & Abd-Aziz, S. (2016). Harnessing the potential of ligninolytic enzymes for lignocellulosic

biomass pretreatment. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(12), 5231-5246.

Larran, A., Jozami, E., Vicario, L., Feldman, S. R., Podestá, F. E., & Permingeat, H. R. (2015). Evaluation of biological pretreatments to increase the efficiency of the saccharification process using *Spartina argentinensis* as a biomass resource. *Bioresource technology*, 194, 320-325.

Singh, A. P., & Singh, T. (2014). Biotechnological applications of wood-rotting fungi: A review. *Biomass and Bioenergy*, 62, 198-206.

Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology advances*, 27(2), 185-194.

Kubicek, C. P., & Kubicek, E. M. (2016). Enzymatic deconstruction of plant biomass by fungal enzymes. *Current opinion in chemical biology*, 35, 51-57.

Massa, E. S., Oakley, L. J., Prado, D. E., & Feldman, S. R. (2016). Resiliencia de un pajonal de *Panicum prionitis* Nees bajo distintas alternativas de manejo. *Ecología austral*, 26(3), 236-245.

Van Soest, P. U. (1967). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *Journal of Association Officials of Animal Chemistry*, 50, 50-55.

Turumtay, H. (2015). Cell wall engineering by heterologous expression of cell wall-

degrading enzymes for better conversion of lignocellulosic biomass into biofuels. *BioEnergy Research*, 8(4), 1574-1588.

Feldman SR. Perennial rangeland grasses for bioenergy. In: Iwaasa A, Lardner HA, Willms W, Schellenberg M, Larson K, editors. The future management of grazing and wild lands in a high-tech world. Saskatoon, Canada: Proc. 10th Int. Rangeland Congr; 2016. p. 596-599.

Cardona, E. M., Rios, L. A., & Peña, J. D. (2012). Disponibilidad de variedades de pastos y forrajes como potenciales materiales lignocelulósicos para la producción de bioetanol en Colombia. *Información tecnológica*, 23(6), 87-96.

#### **Agradecimientos**

Agradecemos al Ingeniero Emiliano Jozami por proveernos las especies fúngicas utilizadas en este estudio.

#### **Financiamiento**

Este trabajo fue financiado por el Proyecto de Vinculación tecnológica Ingeniero Enrique Mosconi (Ministerio de Educación Nacional), la Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación da la Provincia de Santa Fe, D-TEC0001/13 (ANPCYT/MINCYT) y el Proyecto de Vinculación Tecnológica (UNR, CS-131/15).