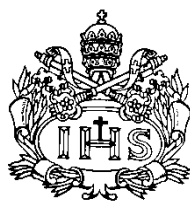


**Evaluación de la actividad y estabilidad de extractos enzimáticos obtenidos de hongos
celulolíticos en fermentación líquida**

Juan Luis Fuentes Rojas y Javier Fernando Garzón Castillo



Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de ciencias

Carrera de Microbiología Industrial

Bogotá D.C.

Diciembre 2013

**Evaluación de la actividad y estabilidad de extractos enzimáticos obtenidos de hongos
celulolíticos en fermentación líquida**

Juan Luis Fuentes Rojas y Javier Fernando Garzón Castillo

**Trabajo de grado Presentado como requisito parcial para optar al título de Microbiólogo
Industrial**



Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de ciencias

Carrera de Microbiología Industrial

Bogotá D.C.

Diciembre 2013

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD DE EXTRACTOS
ENZIMÁTICOS OBTENIDOS DE HONGOS CELULOLÍTICOS EN
FERMENTACIÓN LÍQUIDA**

JUAN LUIS FUENTES ROJAS Y JAVIER FERNANDO GARZÓN CASTILLO

INGRID SHULER

DECANA ACADEMICA

FACULTAD DE CIENCIAS BASICA

JANETH ARIAS PALACIOS

DIRECTORA DE CARRERA

MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD DE EXTRACTOS
ENZIMÁTICOS OBTENIDOS DE HONGOS CELULOLÍTICOS EN
FERMENTACIÓN LÍQUIDA**

JUAN LUIS FUENTES ROJAS Y JAVIER FERNANDO GARZÓN CASTILLO

BALKYS QUEVEDO HIDALGO
INGENIERA QUIMICA, Ph.D.
DIRECTORA

IVONNE GUTIERREZ ROJAS
BACTERIOLOGA, M.Sc., Ph.Dc.
CODIRECTORA

ADRIANA MATIZ VILLAMIL
BACTERIOLOGA, M.Sc.
JURADO

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución N° 13 de julio de 1946 “La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velara porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

AGRADECIMIENTOS

Javier Fernando Garzón Castillo

En primer lugar mi profundo agradecimientos a mi madre que con su cariño, apoyo y amor me da las fuerzas todos los días para seguir adelante, lograr mis metas y cumplir mis objetivos; a mi padre que con su apoyo me dio la oportunidad de cumplir este paso en mi vida. A mi familia por apoyar todas mis ideas.

Juan Luis Fuentes Rojas

Quisiera agradecer a mis padres que con mucho esfuerzo y dedicación me pudieron dar la oportunidad de cumplir esta meta, y quienes confiaron en mí todo este tiempo a pesar de cualquier inconveniente. A mi hermana por su compañía y amistad incondicional. También quisiera agradecer a Angie Luna por su comprensión y cariño en el largo camino de la Universidad.

General

A nuestra directora Balkys Quevedo por darnos la oportunidad de realizar este trabajo de grado y darnos todo su apoyo en la realización del mismo, por su disposición y amabilidad con cada una de nuestras dudas y contratiempos. Agradecemos también a nuestra codirectora Ivonne Gutiérrez por su tiempo para responder nuestras dudas, y su ayuda en el transcurso de este trabajo.

Agradecemos especialmente a Melissa Sánchez por ayudarnos en todos los aspectos de nuestro trabajo de grado, por ayudarnos durante todo este proceso y darnos las herramientas para realizarlo. De igual manera a todos los integrantes del laboratorio de Biotecnología aplicada por ser nuestros compañeros(as) y amigos(as) y estar ahí en todo momento.

Finalmente agradecemos a Dios por permitirnos realizar este objetivo en nuestras vidas y darnos tan grandes oportunidades.

RESUMEN

El cultivo de arroz en Colombia es uno de los principales cultivos que se realizan en el país, y la generación de residuos derivados del arroz, como lo es el tamo, comprende problemas medio ambientales y debido a su gran cantidad el manejo de estos residuos muchas veces no es el adecuado. Es por esta razón que se han estudiado distintos tratamientos biológicos que puedan dar respuesta y solución a la disposición final de estos residuos. En este trabajo se evaluó la actividad enzimática de extractos crudos obtenidos de fermentación líquida de dos hongos con potencial celulolítico: *Penicillium* sp. MF 3-64 y *Paecilomyces* sp. MF 4-71, cada uno fue puesto en fermentación líquida sobre tamo de arroz durante 10 días, obteniéndose al final del proceso que la mayor actividad enzimática se observó con la cepa de *Penicillium* sp. MF 3-64 en el día 10 con valores de 16829,09 U/L para xilanasas, 6438,26 U/L para β -glucosidasas; 896,94 U/L para endoglucanasa y 11049,3 U/L para celobiohidrolasa. De igual manera se evaluó el efecto de sulfato de amonio en la actividad enzimática de los hongos encontrando que este compuesto aumenta de manera significativa los valores de unidades enzimáticas para las 2 cepas de hongos estudiados. Se determinó la estabilidad frente a temperatura y pH de extractos la cepa *Penicillium* sp. MF 3-64, donde se encontró que la endoglucanasa tuvo mayor estabilidad a 30°C y a pH 7 con 106% y 96% de actividad residual respectivamente, la celobiohidrolasa fue más estable a 7°C y pH 3 con 112% y 11% respectivamente, la β -glucosidasa presentó mayor estabilidad a 7°C y pH 7 con porcentajes de actividad residual de 100% y 35% cada una, en el caso de las xilanasas fueron estables a 40°C y a pH 7 con 113% y 122% de actividad residual. Las pruebas de estabilidad frente a temperatura se realizaron por 1 hora a pH 5 y las pruebas de estabilidad frente a pH se realizaron por 24 h a 25°C.

Tras la hidrólisis enzimática realizada usando extractos de *Penicillium* sp. MF 3-64 sobre tamo de arroz se obtuvieron valores de pérdida de peso seco de 28% y rendimientos del 12%.

Se logró determinar la actividad enzimática para 4 enzimas hemicelulolíticas en fermentación líquida además de poder establecer las condiciones de temperatura y pH en las cuales las enzimas fueron más estables. Por último se logró determinar el porcentaje de degradación del residuo en términos de peso seco y rendimientos de azúcares reductores liberados.

Tabla de contenido

1. INTRODUCCION.....	13
2. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
3. PREGUNTA DE INVESTIGACION	16
4. MARCO TEORICO REFERENTES CONCEPTUALES	17
4.1 Complejo de celulasas.....	17
4.2 Complejo de xilanasas.....	18
5. OBJETIVOS.....	20
5.1Objetivo General	20
5.2Objetivos Específicos	20
6. METODOLOGIA	21
6.1 Fermentacion liquida.....	21
6.2Evaluación cuantitativa de la actividad enzimática	21
6.2.1 Endoglucanasa (1,4-β-D-endoglucanasa) (EC 3.2.1.4).....	21
6.2.2 β-Glucosidasa (1-4-β-glucosidasa) (EC 3.2.1.21)	22
6.2.3 Celobiohidrolasa (Exo β 1-4 glucanasa) (E.C. 3.2.1.91)	22
6.2.4 Xilanasas.	23
6.3 Evaluación de la estabilidad enzimática.....	23
6.3.1 Estabilidad enzimática frente a pH.....	23
6.3.2 Estabilidad de la actividad enzimática frente a temperatura.....	24
6.4 Evaluación del extracto enzimático sobre residuos de tamo de arroz	24
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
7.1 Cuantificación de actividad celulasas y xilanasas en fermentación líquida con y sin adición de sulfato de amonio	25
7.2 Estabilidad frente a temperatura.	30
7.3 Estabilidad frente a pH	33
7.4 Evaluación del extracto enzimático sobre residuos de tamo de arroz	36
8. CONCLUSIONES.....	39
9. RECOMENDACIONES.....	40
BIBLIOGRAFÍA.....	41
ANEXOS	47

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Actividades enzimáticas iniciales de la hidrólisis	37
Tabla 2. Pérdida de peso seco y azúcares reductores.....	¡Error! Marcador no definido.37
Tabla 3. Rendimiento de la hidrólisis enzimática	¡Error! Marcador no definido.37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Actividad enzimatica <i>Penicillium</i> sp. MF 3-64.	¡Error! Marcador no definido. 6
Figura 2. Actividad enzimatica <i>Paecilomyces</i> sp. MF 7-71.....	27
Figura 3. Productividad enzimatica.....	¡Error! Marcador no definido. 29
Figura 4. Estabilidad enzimatica frente a temperatura.....	¡Error! Marcador no definido. 32
Figura 5. Estabilidad enzimatica frente a pH.....	¡Error! Marcador no definido. 4

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Curvas de calibracion	47
Anexo 2. Análisis estadístico de datos obtenidos Anova	49

1. INTRODUCCION

Los residuos agrícolas que generan los cultivos de arroz, como la cascarilla y el tamo, son de gran interés ambiental ya que para su descarte no se cuenta con ningún tratamiento y una reducida cantidad es utilizada como alimento para animales rumiantes o como sustrato para compostaje (Melo 2010). Este problema radica en la composición del tamo y la cascarilla ya que principalmente se compone de lignocelulosa, lo que los convierte en residuos de lenta degradación.

Estos desechos agroindustriales son a menudo descartados sin tener en cuenta su impacto. Entre las técnicas utilizadas por los cultivadores de arroz se incluye la quema de estos residuos, lo que genera una contaminación con dióxido de carbono y monóxido de carbono; otras radican en la aplicación de estos en suelos, enterrando el sustrato o desechándolo en zonas que no tienen importancia agrícola, esta práctica genera erosión del suelo y producción de metano (Eriksson y Bermek 2009).

Para reducir el impacto ambiental que generan los residuos de arroz en las prácticas agrícolas, existen métodos físicos, químicos y biológicos que permiten la degradación de estos residuos y producen el mínimo de contaminantes y gases de efecto invernadero. Como una alternativa viable para la degradación de estos residuos se propone la biodegradación por métodos biológicos con hongos ligninolíticos como *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor* usados para degradar lignina, un polímero insoluble e irregular por acción de enzimas como lacasa, manganeso peroxidasa y ligninoperoxidasa (Sánchez 2009), (Feng *et al*, 2012) o celulolíticos como *Penicillium* spp. y *Paecilomyces* spp. Que utilizan enzimas como la endo β 1-4 glucanasa, exo β 1-4 glucanasa y β -glucosidasa, y xilanasas (Martins *et al* 2007).

Por otra parte las enzimas como la endo β 1-4 glucanasa, exo β 1-4 glucanasa, β -glucosidasa han sido utilizadas para la degradación de compuestos orgánicos de residuos vegetales por muchos autores (Kluczek *et al* 2007; Lee *et al* 2010; Ng *et al* 2010; Feng *et al* 2012), y tienen la particularidad de actuar conjuntamente como un complejo enzimático: la endoglucasa que actúa al azar produciendo glucosa y oligosacáridos además de los sitios de acción para la exoglucanasa. Las exoglucanasas o celobiohidrolasas cortan en los extremos del polímero liberando celobiosa, y por último la β -glucosidasa que actúa sobre la celobiosa y otros oligosacáridos produciendo glucosa (Martins *et al* 2008).

El tamo de arroz está compuesto por un 35,5 % de celulosa, 31,2 % de hemicelulosa y 3 % de lignina (Sánchez 2013), porcentajes que muestran que la celulosa es el componente en mayor proporción de las estructuras presentes en el tamo seguido por la hemicelulosa, por lo que el estudio de la actividad enzimática celulolítica y hemicelulolíticas es de gran importancia si se quiere lograr la degradación parcial o total de este residuo agrícola.

Teniendo en cuenta la cantidad de residuos que se generan en el cultivo de arroz, en el proyecto “Obtención de un extracto enzimático lignocelulolítico para la degradación de residuos agroindustriales” financiado por la Vicerrectoría Académica, se propuso como objetivo obtener y evaluar un complejo enzimático lignocelulolítico para la degradación de residuos agroindustriales. Dentro de este contexto en este trabajo el objetivo fue evaluar la actividad y estabilidad de celulasas, xilanasas y β -glucosidasas de extractos enzimáticos obtenidos de hongos celulolíticos en fermentación líquida.

Este proyecto se basó en investigaciones previas realizadas dentro del grupo de investigación (GBAI) involucrado en el desarrollo del macroproyecto mencionado anteriormente. Estas investigaciones fueron de gran importancia en cuanto a que los hongos evaluados al igual que ciertas condiciones de la fermentación, fueron empleadas en la presente investigación. Dentro del grupo de investigación se realizaron aislamientos de suelos rizosféricos de cultivos de arroz provenientes de los departamentos del Meta y Tolima, de donde se realizó un screening obteniendo 25 aislamientos fúngicos y que posteriormente se seleccionaron 16 de los cuales se optó por *Pencillium* sp. MF 3-64 y *Paecilomyces* sp. MF 4-71 debido a su potencial celulolítico observado en pruebas cualitativas.

2. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El destino ambiental de los residuos agrícolas muchas veces no es el adecuado y su disposición como desecho no se realiza de una forma ecológicamente responsable. En la producción de arroz se obtienen 1'885.000 toneladas por año de tamo de arroz (paja de arroz), el cual es el principal residuo obtenido del procesamiento del arroz, según lo reportado por Fedearroz para el 2011 (Fedearroz 2013). Una de las formas en que el tamo de arroz puede ser utilizado es la de su reincorporación en los suelos para cumplir la función de abono orgánico y suplir las necesidades nutricionales de las plantas, y aunque esta opción contribuye positivamente al ciclaje de nutrientes, puede tener efectos adversos en cuanto a los cultivos de arroz ya que estos se hacen en suelos inundados lo que lleva a condiciones anaeróbicas y producción de gas metano el cual se considera un gas de efecto invernadero (Devevre *et al* 2000).

La otra forma de manejo del tamo es la quema a cielo abierto, lo cual también implica la producción de dióxido de carbono, gas de efecto invernadero, lo cual tiene gran impacto ambiental y aunque es regulado por la ley Colombiana, se opta preferiblemente por reducir este tipo de manejo.

Es importante desarrollar procesos biotecnológicos que lleven a la degradación de este tipo de residuos agrícolas ya que además de disminuir el impacto ambiental producido por el inadecuado manejo, pueden resultar en productos de interés comercial para la industria arrocera colombiana, obteniéndose bioinoculantes que sirvan como medio para obtener carbohidratos simples fácilmente asimilables para ser usados en procesos industriales. De igual forma es importante la caracterización de las enzimas involucradas en la degradación de estos residuos en cuanto a su actividad y estabilidad.

La ejecución y desarrollo de este proyecto de investigación se encuentra en el marco de un proyecto denominado: **Obtención de un extracto enzimático lignocelulolítico para la degradación de residuos agroindustriales**, el cual es financiado por la Vicerrectoría Académica de la Pontificia Universidad Javeriana.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACION

Cuál es la actividad enzimática celulolítica de los extractos enzimáticos obtenidos a partir de la fermentación líquida con *Penicillium* sp y *Paecilomyces* sp. y en qué intervalo de pH y temperatura dicha actividad enzimática es estable

4. MARCO TEORICO

Los cultivos de arroz en Colombia tanto tecnificados como manuales abarcan aproximadamente un área de 462.174 hectáreas, estableciendo a la producción de arroz como una de las prácticas agrícolas nacionales más importantes que generan 2.172.217,8 toneladas de arroz con un rendimiento de 5,87 toneladas de arroz por hectárea, esto según las estadísticas reportadas por fedearroz para el 2011 (Fedearroz, 2013). La producción de tal cantidad de arroz en Colombia genera una cantidad de residuos agroindustriales que pueden ser reutilizados en actividades industriales que utilizan microorganismos, para obtener productos derivados de estos como biocombustibles, ácidos orgánicos, biomasa microbiana y otros productos en donde la fuente de carbono otorgada para la degradación de los residuos genera azúcares como glucosa, xilosa y celobiosa que pueden ser usados fácilmente por muchos microorganismos, convirtiendo al producto de la degradación en una materia prima para generar mediante procesos biotecnológicos los productos mencionados anteriormente (García et 2004; Quevedo 2011; Hernández 2003).

En la degradación de los residuos ligninolíticos mencionados anteriormente se involucra un complejo de enzimas como lacasas, manganeso peroxidasas y ligninoperoxidasas, sobre la lignina, como también Endoglucanasa, Celobiohidrolasas y β -glucosidasas, en la celulosa, y xilanasas, en la hemicelulosa; generando azúcares fácilmente asimilables como glucosa y xilosa que pueden ser reincorporados en el suelo o utilizados en procedimientos biotecnológicos (Castillo et 2005; Martins 2008; Díaz *et al* 2011)

4.1 Complejo de celulasas

La degradación de la celulosa por hongos es conocida por la actividad conjunta de un complejo enzimático que contiene 3 enzimas identificadas: Endoglucanasa o endo-1,4- β -D-glucanasa (EC 3.2.1.4), celobiohidrolasas o exo-1,4- β -d-glucanasa (EC 3.2.1.91), y β -glucosidasas o 1,4- β -d-glucosidasa (EC 3.2.1.21). La actividad sinérgica de estas enzimas está descrita y ampliamente definida de la siguiente forma: La endoglucanasa actúa al azar sobre los enlaces glucosídicos β -1,4 de la celulosa liberando glucosa, oligosacáridos y nuevos extremos de la cadena de celulosa. La celobiohidrolasa actúa sobre los extremos reductores y no reductores de la celulosa liberando celobiosa, y por último la β -glucosidasa que hidroliza la celobiosa y otros oligosacáridos liberando finalmente glucosa (Martins *et al* 2008; Ng *et al* 2009, Balat 2011).

El uso de celulasas a nivel industrial es extensamente estudiado y ofrece gran diversidad de usos en donde industrias tales como la de textiles, papeles, aditivos para comida animal, clarificación de jugos de frutas, entre otras han aplicado este tipo de enzimas a sus procesos. De manera reciente y expansiva el uso de celulasas para la producción de biocombustibles como el bioetanol ha sido estudiada y ha cobrado gran interés debido a la búsqueda de nuevas fuentes de energía no fósil. Las celulasas al degradar residuos agrícolas pueden producir azúcares fermentables como la glucosa que en procesos posteriores puede ser transformada a etanol. (Sun *et al* 2008; Balat 2011; Maeda *et al* 2013)

4.2 Complejo xilanasas

La degradación enzimática del xilano, el mayor componente de la hemicelulosa, consta de la acción sinérgica de un complejo enzimático que comprende varias enzimas, dentro de estas están las exohidrolasas como: acetil xilano esterasa, α -L-arabinosidasa, β -xilosidasa y β -glucoronidasa, y una endoxilanasas. Esta última ha sido ampliamente estudiada debido a que su función es la de hidrolizar de forma aleatoria la estructura base del xilano produciendo varios oligómeros (Melo 2010).

La producción de xilanasas por varias especies de *Penicillium* ha sido investigada y evaluada, en donde se han obtenido extractos con actividades enzimáticas positivas por diversos métodos. La obtención de esta enzima según los estudios realizados por Lee *et al* (2012) puede ser inducida por fuentes de carbono de diversas fuentes como tamo de arroz entre otros. Este estudio presenta además que la actividad celulolítica en estos hongos es relativamente baja en comparación con la producción de xilanasas, las cuales tienen un potencial biotecnológico en la industria del blanqueamiento del papel.

Por parte de *Paecilomyces*, algunas especies como *Paecilomyces varioti* producen enzimas como xilanasas y β -xilosidasa que interactúan con los enlaces β 1-4 del xilano liberando β -D-xilopiranosas (Okolo *et al* 1998), por tanto este microorganismo es de interés biotecnológico para la producción y el estudio de enzimas xilanasas.

Estudios previos han descrito y estudiado la actividad y estabilidad de enzimas celulolíticas en varias especies de *Penicillium*. En la investigación de Lee *et al* (2010) se evaluó la producción de la enzima endo- β -1,4-glucanasa por *Penicillium purpurogenum*, la cual mostró actividad enzimática

significativa a altas temperaturas (70° C y 60°C) y pH 5. A su vez la evaluación de la fuente de carbono mostró que la mayor actividad endoglucanasa se obtuvo con paja de arroz. En cuanto a la β -glucosidasa, Ng *et al* (2009) reportó la producción y actividad de esta enzima por *Penicillium citrinum* en fermentación sólida sobre salvado de arroz, la actividad enzimática óptima igualmente fue a 70° C y pH 5, a su vez se evaluó la estabilidad observándose que se mantuvo durante 4 semanas temperatura ambiente.

En la investigación de Liao *et al* (2012) se describió la actividad enzimática y estabilidad de xilanasas producidas por *Penicillium oxalicum* sobre diferentes sustratos lignocelulósicos incluyendo paja de arroz, se observó que la actividad enzimática se mantuvo estable (80% de actividad) en un rango de pH entre 3-5 y una temperatura entre 50° y 55°C.

En lo referente a la producción de enzimas celulolíticas por parte del género *Paecilomyces*, Kluczek *et al* (2007) evaluó la producción de endoglucanasa, xilanasas y lacasa por *Paecilomycesinflatus* sobre varios sustratos como salvado de trigo, maderas blandas y duras.

Uno de los microorganismos más estudiados en cuanto a la producción de celulasas es *Trichoderma reesei* el cual ha sido estudiado por su alta producción de celulasas sobre varios sustratos lignocelulósicos dentro de los cuales se encuentra el tamo o paja de arroz (Sun *et al* 2008).

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Evaluar la actividad y estabilidad de celulasas, xilanasas y β -glucosidasas de extractos enzimáticos obtenidos de hongos celulolíticos en fermentación líquida.

5.2 Objetivos específicos

- Determinar la actividad de celulasas, xilanasas y β -glucosidasas de *Penicillium* sp.MF 3-64 y *Paecilomyces* sp. MF 4-71 en fermentación líquida.
- Evaluar la estabilidad frente al pH y a la temperatura del extracto enzimático que presente mayor actividad de cada una de las enzimas.

6. METODOLOGIA

Cuantificación de actividad celulasas y xilanasas en fermentación líquida con y sin adición de sulfato de amonio

6.1 Fermentación líquida

Los dos hongos a estudiar fueron *Paecilomyces* sp. MF 4-71 *Penicillium* sp. MF 3-64 que fueron aislados de cultivos de arroz y están almacenados en el cepario del Laboratorio de Biotecnología Aplicada.

Para iniciar la fermentación líquida las cepas se obtuvieron a partir de un banco de trabajo, y se sembraron en agar papa dextrosa (PDA) por 8 días a 28°C, después de la incubación se agregaron 10 mL de tween 80 al 1% a cada caja sembrada para separar las conidios y obtener una suspensión de 10^6 conidios/mL que se logró por medio de un recuento de conidios en cámara Neubauer. A partir de esta suspensión se inocularon 12 mL en 9 matraces de 250 mL que contenían 120 mL de medio compuesto por: KH_2PO_4 0,3 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,83 g/L; CaCl_2 0,3 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005 g/L; MnSO_4 1,56 mg/L; ZnSO_4 1,4 mg/L; tween 80 0,2 mL/L; tamo de arroz 10 g/L. La distribución de los 9 matraces fue dispuesta de la siguiente manera: 3 como control abiótico, 3 con fuente de nitrógeno, 5 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, y 3 sin fuente de nitrógeno. El objetivo de adicionar fuente de nitrógeno fue evaluar si se favorece la producción de enzimas por parte de los hongos en medio líquido, lo cual se estudió en el trabajo de Sánchez (2013).

La fermentación se llevó a cabo en condiciones aeróbicas, a 28°C por 10 días a 120 rpm; tomando alicuotas en los días 4, 6, 8 y 10. Estas muestras se centrifugaron a 10000 g a 4°C por 15 minutos para separar el sobrenadante, que posteriormente se analizó para cuantificar actividades enzimáticas.

6.2 Evaluación cuantitativa de la actividad enzimática

Todos los ensayos para medir actividades enzimáticas se realizaron por triplicado.

6.2.1 Endoglucanasa (1,4- β -D-endoglucanasa) (EC 3.2.1.4)

La actividad se midió usando como sustrato carboximetilcelulosa (CMC) de baja viscosidad. La mezcla de la reacción estaba compuesta de 500 μL de sustrato 2 % (p/v) en solución tampón

citrato de sodio 50 mM, pH 5.0 y de 500 μ l muestra apropiadamente diluida. La reacción fue incubada a 40°C durante 60 minutos y posteriormente se puso 5 minutos en hielo para detener la reacción. Se centrifugó a 4°C y 8000 g por 15 minutos. El sobrenadante fue analizado por el método del ácido-3,5-dinitrosalisílico (DNS) (Miller 1959) con el fin de determinar la concentración de azúcares reductores liberados luego de la reacción. Una unidad de endoglucanasa se define como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μ mol de azúcares reductores equivalentes a glucosa por minuto bajo las condiciones del ensayo. Para todas las reacciones se usó un blanco que estaba compuesto de 500 μ l de tampón y 500 μ l de sustrato, de igual forma se realizó otro blanco con 500 μ l de tampón y 500 μ l de muestra para restar los azúcares presentes que no son resultado de la reacción enzimática. La actividad enzimática fue calculada usando una curva de calibración de glucosa y el intervalo de las concentraciones con DNS (**Anexo 1**).

6.2.2 β -Glucosidasa (1-4- β -glucosidasa) (EC 3.2.1.21)

La actividad se midió usando como sustrato p-nitrofenil- β -D glucósido (PNPG). Adicionando 400 μ L de sustrato PNPG 5 mM en solución tampón acetato de sodio 50 mM pH 5.0 y 100 μ L de muestra. Esta mezcla se incubó durante 60 minutos a 40°C. La reacción se detuvo con la adición de 250 μ L de carbonato de sodio 0.5 M y la absorbancia se midió a 400 nm. La actividad enzimática fue calculada usando una curva de calibración de p-nitrofenol (Quevedo, 2011). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto (Morais *et al* 2002; Baldrian *et al* 2006). El blanco estaba compuesto de 400 μ L de sustrato PNPC y 100 μ L de tampón. Y el blanco muestra también se realizó con 400 μ L de tampón y 100 μ L de muestra para verificar interferentes de la muestra.

6.2.3 Celobiohidrolasa (Exo β 1-4 glucanasa) (E.C. 3.2.1.91)

La actividad se midió usando como sustrato p-nitrofenil- β -D celobiosido (PNPC). Adicionando 400 μ L de sustrato PNPC 5 mM en solución tampón acetato de sodio 50 mM pH 5.0 y 100 μ L de muestra. Esta mezcla se incubó durante 60 minutos a 40°C. La reacción se detuvo con la adición de 250 μ L de carbonato de sodio 0.5 M y la absorbancia se midió a 400 nm. La actividad enzimática fue calculada usando una curva de calibración de p-nitrofenol (Quevedo, 2011). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima

capaz de liberar 1 μmol de p-nitrofenol por minuto (Baldrian *et al* 2006). El blanco estaba compuesto de 400 μL de sustrato PNPC y 100 μL de tampón. Y el blanco muestra también se realizó con 400 μL de tampón y 100 μL de muestra para verificar interferentes de la muestra.

6.2.4 Xilanasa

La actividad xilanasa se midió usando como sustrato xilano de madera de haya. La mezcla de la reacción estaba compuesta de 500 μl de sustrato 2 % (p/v) en solución tampón citrato de sodio 50 mM, pH 5.0 y de 500 μl muestra apropiadamente diluida. La reacción fue incubada a 40°C durante 60 minutos y posteriormente se puso 5 minutos en hielo para detener la reacción. Se centrifugó a 4°C y 8000g por 15 minutos. El sobrenadante fue analizado por el método del ácido-3,5-dinitrosalisílico (DNS) (Miller 1959) con el fin de determinar la concentración de azúcares reductores liberados luego de la reacción. Una unidad de xilanasa se define como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μmol de azúcares reductores equivalentes a xilosa por minuto bajo las condiciones del ensayo. Para todas las reacciones se usó un blanco que estaba compuesto de 500 μl de tampón y 500 μl de sustrato, de igual forma se realizó otro blanco con 500 μl de tampón y 500 μl de muestra para restar los azúcares presentes que no son resultado de la reacción enzimática (D'Souza *et al* 1999). La actividad enzimática fue calculada usando una curva de calibración de xilosa con DNS (**Anexo 1**).

6.3 Evaluación de la estabilidad enzimática

6.3.1 Estabilidad enzimática frente a pH

La estabilidad frente a pH se evaluó sometiendo el extracto a un cambio de pH, utilizando soluciones tampón que varían en un intervalo de pH 3-11, durante 24 horas a 25°C. Posteriormente utilizando NaOH 0,5 N o con HCl 0,5 N se llevaron todas las muestras a el pH correspondiente a la medición de la técnica enzimática (pH 5) (Quevedo 1999). Para pH 3, 5 y 7 se usó tampón citrato, para el pH 9 y 10,6 se usó tampón glicina (Quevedo 2009). Posteriormente se comparó la actividad enzimática con la actividad analizada antes de someter el extracto a los rangos de pH y se evaluó la actividad residual con las técnicas respectivas.

6.3.2 Estabilidad de la actividad enzimática frente a temperatura

El efecto de la estabilidad térmica de las enzimas se evaluó incubando los extractos a pH 5 a diferentes temperaturas (7, 15, 25, 30, 40 y 50°C) por 60 minutos; luego del periodo de incubación se pasaron a un baño de hielo por 5 minutos (Quevedo 2011). Pasado este periodo se evaluó la actividad enzimática de acuerdo con la metodología mencionada anteriormente y se compararon con la actividad obtenida antes de la incubación a diferentes temperaturas.

6.4 Evaluación del extracto enzimático sobre residuos de tamo de arroz

Los ensayos de la hidrólisis enzimática se llevaron a cabo en matraces de 100 ml los cuales contenían: extractos enzimáticos obtenidos previamente de fermentación líquida durante 10 y 25 días sobre tamo de arroz para *Penicillium* sp. y *Pleurotus ostreatus* respectivamente, diluidos en buffer acetato 50 mM y pH 5. Para cada réplica se adicionaron 0,4 g de tamo de arroz cortado en aproximadamente 2mm y seco, además de tween 80 y azida de sodio 10mM. A cada extracto se le realizaron actividades enzimáticas y azúcares reductores iniciales. La hidrólisis se realizó durante 168 h a 30 °C y 150 rpm, pasadas las 168 h se separó el extracto enzimático del tamo de arroz por filtración, este se puso a secar a 80°C por 24 horas y se pesó el tamo de arroz. Para el cálculo de peso seco se restó el peso inicial del tamo de arroz sometido a hidrólisis al peso final de tamo de arroz.

A partir de los extractos enzimáticos se analizaron los azúcares reductores iniciales y los liberados después de la hidrólisis por la técnica de DNS (Miller 1959) para calcular los azúcares reductores producidos.

Se calculó el Rendimiento en términos de porcentaje basados en la siguiente fórmula (Singh et al. 2012):

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{g Azúcares reductores liberados} * 0,9}{\text{g celulosa en tamo de arroz}} * 100$$

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 Cuantificación de actividad celulasas y xilanasas en fermentación líquida con y sin adición de sulfato de amonio

La producción de enzimas a través del tiempo corresponde al hongo *Penicillium* sp. MF 3-64 en fermentación líquida (**Figura 1**), se determinó que el tratamiento con sulfato de amonio influye en la producción enzimática, ya que otorga al microorganismo una forma de nitrógeno fácilmente asimilable. En estudios realizados por Lockington *et al* (2002) demuestran que la producción de enzimas se favorece significativamente bajo el efecto de una fuente de carbono de naturaleza celulolítica, que activa genes que se involucran en las vías de catabolismo del carbono, pero explican que las fuentes de nitrógeno, y sobre todo las fuentes inorgánicas de nitrógeno como el sulfato de amonio tienen un importante papel en la activación de los genes que codifican para la producción de enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas (Lockington *et al* 2002).

En estudios anteriores realizados por Sánchez, en el 2013; donde se evaluaron diferentes fuentes de nitrógeno para evaluar la producción de enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas, y así determinar cuál de estas influía en la mayor producción de dichas enzimas, se determinó que el sulfato de amonio fue la fuente de nitrógeno que mejor influía para una mayor producción enzimática.

La actividad enzimática de celulasas y xilanasas demostraron un incremento a partir del día 6 y obteniendo el pico más alto de actividad enzimática a los 10 días de fermentación llegando a la máxima actividad enzimática de todas las enzimas con 11049 U/L, 896 U/L, 6438 U/L y 16892 U/L para exoglucanasa, endoglucanasa, β -glucosidasas y xilanasas; esto demuestra una producción rápida por parte de *Penicillium* sp. MF 3-64, con respecto a otros estudios realizados por Zampieri *et al*(2013), en donde exponen que la actividad enzimática producida por *Penicillium* empieza en días superiores a 24 días para endoglucanasas, usando carboximetilcelulosa como sustrato, y superiores a 96 días para β -glucosidasa, usando celulosa como sustrato; sin embargo las unidades enzimáticas al cabo de este tiempo fueron 35000 y 2500 U/L respectivamente, mayores a las demostradas en el presente trabajo (**Figura 1**). En otro estudio realizado por Reis *et al* (2013) presenta la misma disposición en donde la

producción enzimática comienza a partir de los 24 días con respecto a xilanasas, β -glucosidasas y endoglucanasas, y los valores enzimáticos más altos se presentan a los 120, 120 y 168 días respectivamente y dichos valores son superiores a 30000 U/L para endoglucanasas y xilanasas y superiores a 5000 β -glucosidasas, en el presente trabajo, si bien en las endoglucanasas no hay una buena producción por parte de *Penicillium* sp. MF 3-64, las xilanasas y las β -glucosidasas presentan un rango mayor respectivamente y en un tiempo de producción mucho menor.

De acuerdo con lo anterior se llevó a cabo el análisis de la producción enzimática en los días 12 y 15 solo para el tratamiento de *Penicillium* sp. MF 3-64 con adición de nitrógeno para observar si en estos días se presentaba un incremento en la producción enzimática, sin embargo estos resultados no arrojaron un valor mayor al producido en el día 10 con valores de 1286 U/L y 175 U/L para las xilanasas y endoglucanasas al día 15 respectivamente, siendo el día 10 el pico máximo de producción enzimática para este microorganismo.

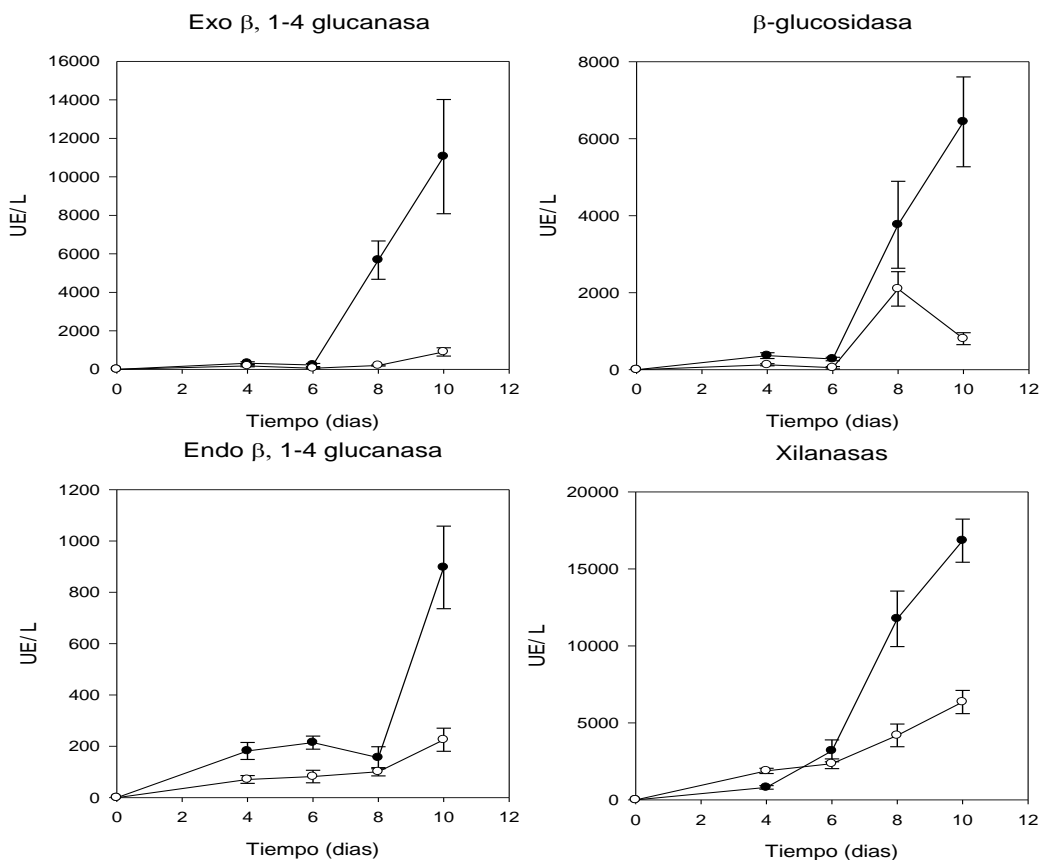


Figura 1. Actividad enzimática a través del tiempo correspondiente a *Penicillium* sp. MF 3-64 en fermentación líquida en tamo de arroz. El círculo negro representa

tratamiento con sulfato de amonio y el círculo blanco el tratamiento sin sulfato de amonio. Cada dato es la media de tres réplicas.

La producción de enzimas a través del tiempo correspondiente a *Paecilomyces* sp. MF 4-71 está representada en la **Figura 2**, donde se observa que la adición de sulfato de amonio en la fermentación líquida corresponde con una mayor producción enzimática en todos los casos. La máxima actividad enzimática fue variable según la enzima, se puede observar que la β -glucosidasa tuvo un pico máximo al día 8 con 3237 U/L a diferencia de la celobiohidrolasa y las endoglucanasas cuyo máximo de actividad enzimático fue a los 4 días con 65 y 94 U/L respectivamente, y las xilanasas con un pico máximo a los 6 días con 26 U/L. En el día 10 no presentó actividad enzimática.

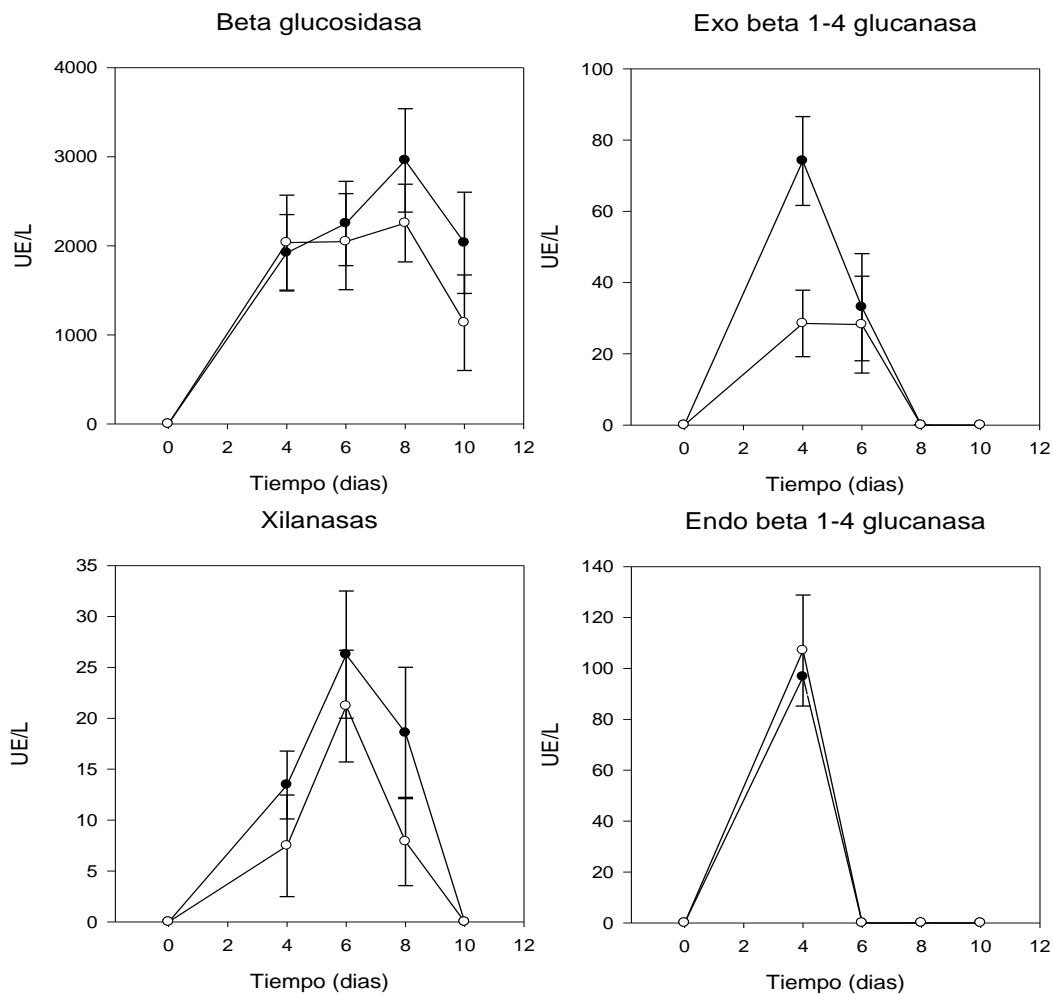


Figura 2. Actividad enzimática correspondiente a *Paecilomyces* sp. MF 4-71 en fermentación líquida en tamo de arroz por 10 días donde el círculo negro representa

tratamiento con sulfato de amonio y el círculo blanco el tratamiento sin sulfato de amonio. Cada dato es la media de tres réplicas.

Con respecto a la producción de xilanasas producida por *Paecilomyces* sp. MF 4-71 se esperaba una alta actividad enzimática, ya que análisis cualitativos realizados por Sánchez (2013) demostraron que este microorganismo era productor de xilanasas, al igual que en la investigación realizada por Li *et al* (2006) donde demuestran que *Paecilomyces thermophyla* demuestra ser productor de xilanasas con 3600 U/L. Sin embargo los resultados no fueron los esperados, puesto que *Paecilomyces* sp. MF 4-71 no demostró ser mejor que *Penicillium* sp. MF 3-64 con un $P < 0,05$ (**anexo 2**). La producción de celulasas por parte de *Paecilomyces* sp. MF 4-71 fue muy reducida en comparación con las producidas por *Penicillium* sp. MF 3-64 con un $p < 0,05$ (**anexo 2**) lo que es corroborado con estudios donde *Paecilomyces* se encuentra en desventaja para la producción de celulasas en comparación con otros microorganismos como *Aspergillus* o *Penicillium* (Li *et al* 2006; Dos Reis *et al* 2013; Ng *et al* 2010), la producción de enzimas celulolíticas de *Paecilomyces* spp. es muy limitada según lo reporta Turpeinen *et al* (2007) ya que evaluó la actividad enzimática de *P. inflatus* en diferentes sustratos, Turpeinen *et al* (2007) y demostró que *P. inflatus* presenta una baja capacidad para degradar sustratos ligninolíticos. Esto puede ser debido a que este género no se desarrolla en medios ricos en lignocelulosa por lo que no necesita altas cantidades de enzimas como celulasas y xilanasas.

Para identificar el tratamiento y el microorganismo en el cual se presentó una mayor actividad enzimática se compararon dichas actividades producidas en la fermentación líquida. En la **Figura 3** se observan las actividades enzimáticas obtenidas representadas en términos de productividad. En todos los tratamientos se observa que *Penicillium* sp. MF 3-64 con fuente de nitrógeno es el tratamiento de mayor actividad para todas las enzimas evaluadas en comparación con los demás tratamientos evaluados.

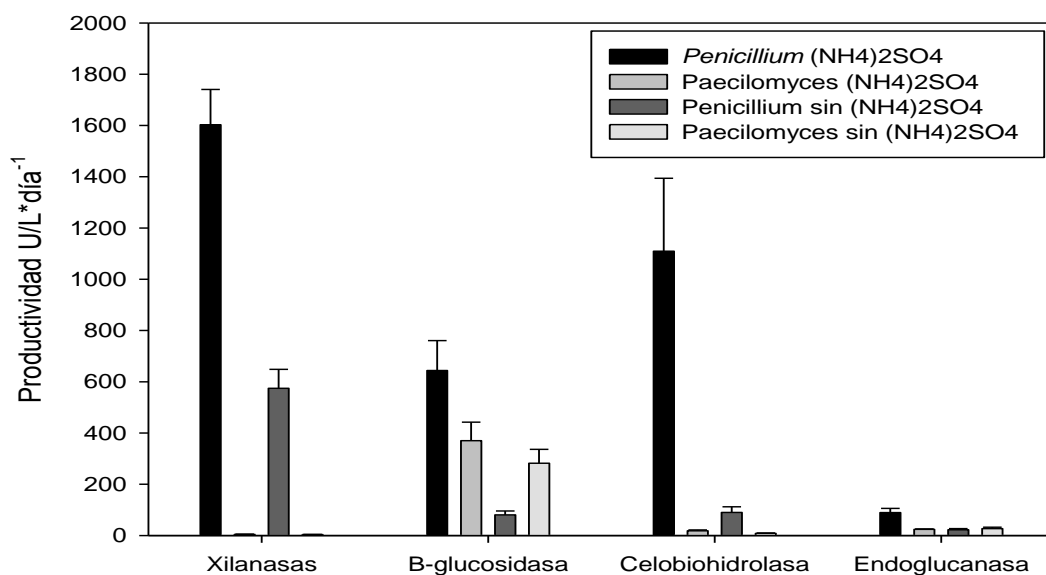


Figura3. Productividad enzimática ($UL^{-1}dia^{-1}$), basada en el tiempo de mayor producción de cada una de las enzimas, por *Penicillium* sp. MF 3-64 y *Paecilomyces* sp. MF 4-71 en fermentación líquida en tamo de arroz.

En el presente estudio se relacionaron las actividades enzimáticas producidas por *Penicillium* sp. MF 3-64 y *Paecilomyces* sp. MF 4-71 con y sin influencia de nitrógeno, los análisis de Anova para cada enzima demostraron con una $p < 0,05$ (anexo 2) que el tratamiento con *Penicillium* sp. MF 3-64 con adición de sulfato de amonio presentó mayor influencia en la producción enzimática, llegando a valores de $16829,09 \pm 2965,64$; $6438,26 \pm 1166,91$; $896,94 \pm 160,84$; $11049,3 \pm 2965,64$ para Xilanasas, β -glucosidasas, Endoglucanasas y Celobiohidrolasas respectivamente, por esto se decidió seguir el estudio de estabilidad enzimática con este extracto enzimático para cumplir con el segundo objetivo.

El extracto enzimático producido por *Penicillium* sp. MF 3-64 en fermentación líquida, puede ser un producto microbiano con un potencial degradante para el tamo de arroz muy efectivo teniendo en cuenta la producción de enzimas celulolíticas como celobiohidrolasas o β -glucosidasas que crean una reacción en cadena que permite obtener monosacáridos fácilmente asimilables para las plantas en un cultivo de arroz, también es importante resaltar la alta producción de enzimas xilanasas haciendo que la celulosa sea más disponible para enzimas celulasas ya que la hemicelulosa recubre la celulosa en la pared celular de las plantas, esto genera una degradación más rápida y completa. En la **Figura 3** se puede observar que la

producción enzimática por día de fermentación es favorable para una posterior producción en masa del extracto enzimático, se puede determinar que las enzimas que más producción presentaron son las xilanasas lo que hace que la acción en el momento de suministrar el extracto sea más rápida ya que primero se degrada la hemicelulosa, dando paso a la degradación de la celulosa que ahora estaría libre de compuestos que lo recubran. Por otro lado la endoglucanasa no tienen una alta producción por día, esto puede interrumpir el proceso de la cascada enzimática en el momento de la degradación de la celulosa, haciendo que este sea más lenta, sin embargo la producción de celobiohidrolasa puede dar paso a una efectiva degradación de la celulosa permitiéndole a la β - glucosidasa terminar el proceso de degradación.

7.2 Estabilidad frente a temperatura

Según los datos obtenidos, la estabilidad frente a temperatura varía según la enzima evaluada. En el caso de la enzima endoglucanasa a los 25°C y 30°C se mantuvo un porcentaje de actividad residual del 96% y 110% respectivamente (**Figura 4**), frente a la actividad inicial sin tratamiento, lo que indica que la estabilidad de la enzima se ve favorecida a estas temperaturas. En lo reportado en la literatura, la estabilidad frente a temperatura de la endoglucanasa obtenida de hongos del género *Penicillium*, muestra que es estable a temperaturas entre 50°C y 70°C en largos periodos de tiempo (Picart *et al* 2007; Dutta *et al* 2008; Lee *et al* 2010; Lui *et al* 2013), en estos estudios las condiciones del ensayo variaban y en general la enzima era purificada, sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que la actividad enzimática permanece estable a temperaturas mesofílicas, lo cual puede asemejarse a lo obtenido por Castro *et al.* (2010) en donde se observó que el extracto crudo de *Penicillium funiculosum* era estable a 37°C por un periodo de 23 horas perdiendo menos del 15% de su actividad inicial. Por otra parte en lo reportado por Chulkin *et al* (2009) se observa que a una temperatura de 50°C por una hora, la estabilidad de la enzima purificada desciende por debajo del 50% de la actividad inicial, lo cual se explica debido a que a temperaturas superiores a 50°C se pierde la estructura terciaria de la enzima, y al perder esta estructura la proteína deja de tener su conformación activa y funcional. A pesar de esto y como se observa en la **Figura 4** a la temperatura de 50°C se mantiene un 75% de la actividad inicial lo cual concuerda con lo reportado

En cuanto a la celobiohidrolasa y la β -glucosidasa (**Figura 4**) se observa una tendencia en la cual la actividad enzimática desciende hasta un 47% y 25% respectivamente a 50°C. Se observa que la estabilidad de estas dos enzimas se ve afectada con el aumento de temperatura. Lo que es contrario a lo observado en la enzima xilanasas la cual mantuvo su estabilidad en más del 100% conforme se aumentaba la temperatura hasta los 50°. En lo reportado en literatura, la termoestabilidad de la enzima β -glucosidasa producida por una cepa de *Penicillium pinophilum* cultivado en medio líquido con tamo de arroz, se mantiene a temperaturas mayores a 30°C y específicamente a 40°C en donde la enzima mantiene cerca del 100% de actividad por más de 20 horas (Joo *et al* 2010). En otro estudio realizado por Ng *et al* (2010) la estabilidad frente a temperatura de la β -glucosidasa producida por una cepa de *Penicillium citrinum*, es similar a lo visto en los resultados obtenidos en la presente investigación donde la actividad residual de la enzima disminuye a medida que la temperatura aumenta, sin embargo observando lo obtenido por dicho autor, a temperaturas de 30 y 40°C la actividad residual se mantiene mayor al 80%, lo cual no es compatible con los resultados observados en la **Figura 4** ya que en estas temperaturas la actividad residual se encuentra por debajo del 50%.

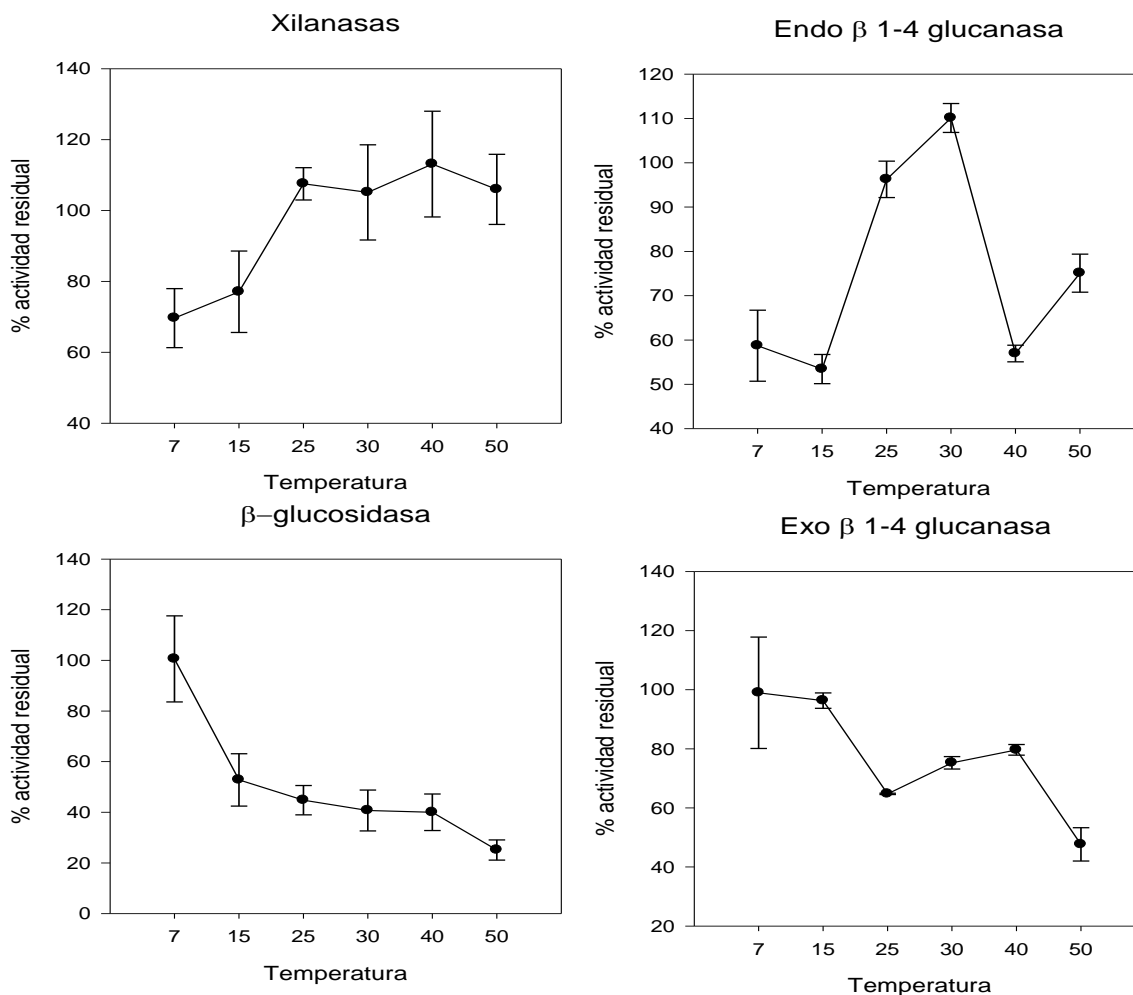


Figura 4. Efecto de la estabilidad frente a la temperatura, utilizando el extracto enzimático de *Penicillium* sp. MF 3-64 en fermentación líquida en tamo de arroz.

Acerca de la estabilidad frente a temperatura de la xilanasas, los resultados obtenidos son similares a los obtenidos por Liao *et al* (2012), en donde esta enzima obtenida de *Penicillium oxalicum* en fermentación líquida sobre cascarilla de trigo, es estable a temperaturas de 50°C por una hora manteniendo más del 80% de actividad residual, sin embargo, y como se observa en la **Figura 4** a actividad residual de esta enzima supera el 100% lo que sugiere que a temperaturas mayores de 40°C se favorece su estabilidad lo cual es ideal en procesos industriales en donde se utilicen temperaturas en este rango.

Los resultados obtenidos para la celobiohidrolasa son comparables a los obtenidos por Limam *et al.* (1995) en donde se observa que la estabilidad frente a temperatura de esta enzima obtenida de una cepa mutante de *Penicillium occitanis* se mantiene mayor al 50% por debajo de los 50°C, por otro lado Gao *et al* (2011) reporta que esta enzima obtenida de una especie

mutante de *Penicillium decumbens* es estable a 50 °C por 2 horas manteniendo cerca del 90% de su actividad inicial, de igual forma Lee *et al* (2011) reporta la estabilidad de esta enzima obtenida de *Penicillium pupurogenum* a una temperatura de 60°C por 4 horas, lo cual difiere con los resultados obtenidos en donde a 50°C la actividad residual desciende en un 50%, sugiriendo que esta enzima bajo las condiciones del ensayo se ve afectada a medida que se aumenta la temperatura.

La adición de ciertas sustancias como carbohidratos pueden ser usadas para obtener una mejor estabilidad ya que estos compuestos protegen a la enzima de factores externos, y de esta forma mantener su actividad (Shi *et al* 2011).

La estabilidad de las enzimas endoglucanasa y xilanasa fue mayor de 25°C a 30°C y de 25°C a 50°C respectivamente, mientras que para la exoglucanasa y β -glucosidasa fue mayor a 7°C para las dos, debido a que no se pueden unificar rangos de temperaturas en las que todas las enzimas son estables, es posible indicar que el complejo enzimático no actuó con eficacia. Para la posterior evaluación de estabilidad frente a pH se escogió la temperatura de 25° debido en primera medida, a la estabilidad presentada por la endoglucanasa y xilanasa a esta temperatura, y segundo por la estabilidad observada por (Muñoz 2012) de las enzimas lacasa y manganeso peroxidasa obtenidas de extractos de *Pleurotus ostreatus* las cuales fueron estables a esta temperatura de esta forma se obtendría, si realizara una mezcla de extractos, un extracto altamente estable para estas enzimas.

7.3 Estabilidad frente a pH

En lo referente a la estabilidad frente a pH se evaluó un amplio rango de pH en los que hubo diferentes tendencias según la enzima analizada. Para la mayoría de las enzimas se observó que la actividad se mantuvo estable a pH 7 (**Figura5**), este resultado es semejante a lo obtenido por Anwar *et al.* (2011) en donde se observa que la enzima analizada (endoglucanasa) de dos especies de hongos filamentosos a partir de una fermentación sobre tamo de arroz es estable a un pH de 7 bajo distintas condiciones manteniendo más del 80% de actividad

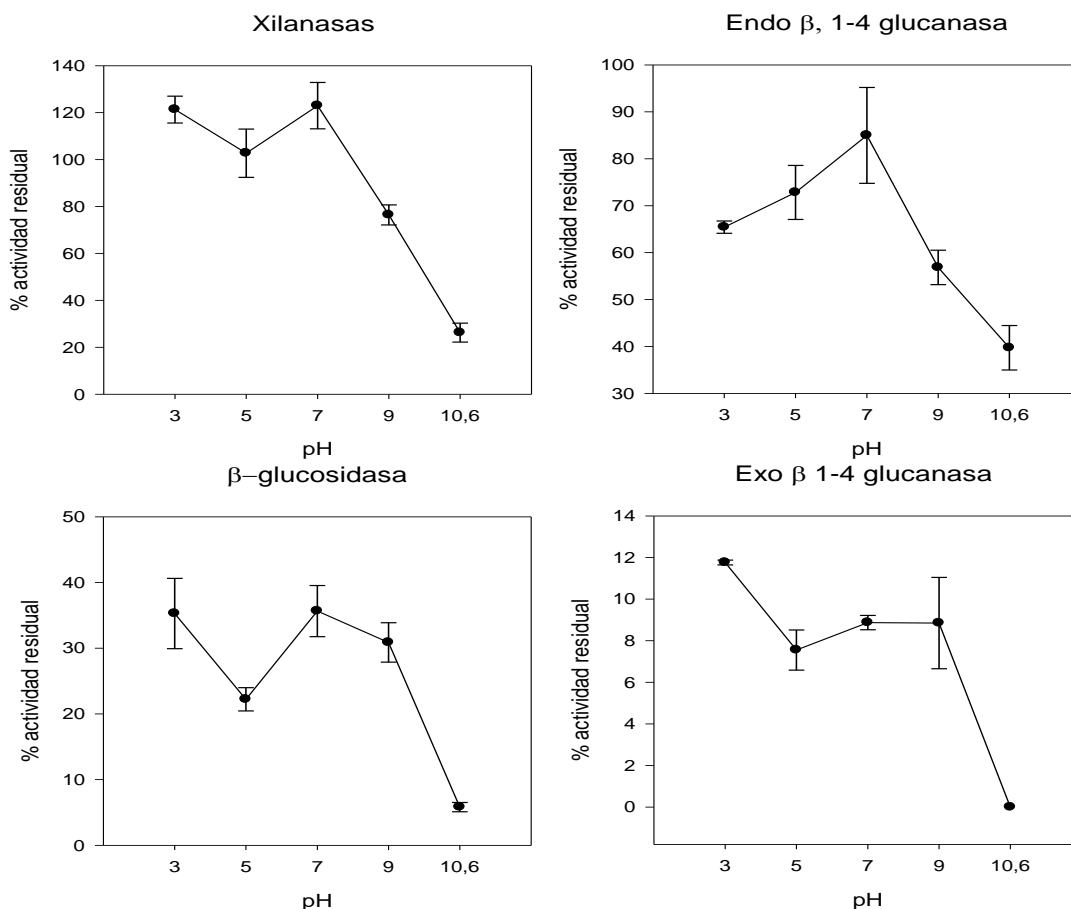


Figura 5. Efecto de la estabilidad frente al pH, utilizando el extracto enzimático de *Penicillium* sp. MF 3-64 en fermentación líquida en tamo de arroz

En la actividad enzimática de la celobiohidrolasa, se puede observar que el mayor porcentaje de actividad residual obtenido fue a pH 3 con un 11,6%, y a medida que el pH aumentaba la este porcentaje disminuía. De esta manera, la enzima se vio afectada en todos los pH evaluados ya que a pH 3 se perdió el 88,4% de la actividad inicial, además que en pH 10,6 la actividad enzimática no fue detectada por la técnica (**Figura 5**). Estos resultados no son similares a los obtenidos por Gao *et al* (2011) y Limam *et al* (1995), en donde se reporta que la estabilidad frente a pH de esta enzima obtenida de dos especies de *Penicillium*, fue estable en un amplio rango de pH comprendido entre 2 y 9.

En la estabilidad frente a pH de la enzima xilanasas se puede observar (**Figura 5**) que a medida en que el pH aumenta la actividad residual disminuye indicando que a pH ácido la enzima fue altamente estable mostrando más del 100% de actividad residual al igual que a pH 7 en donde también la actividad es estable en más del 100%. Estos resultados son similares a los

reportados por Liao *et al* (2012), ya que en dicha investigación la enzima fue estable en un rango de pH de 4 a 9, sin embargo se debe tener en cuenta que los ensayos de estabilidad frente a pH en dicho estudio se realizaron en diferentes condiciones tales como temperatura y tiempo de incubación.

En lo referente a la estabilidad frente a pH de la β -glucosidasa, se observa en la **Figura 5** que la actividad residual de la enzima se ve afectada a todos los pH evaluados obteniendo actividades por debajo del 50%, y en mayor proporción a pH 10.6 en el cual la actividad residual de la enzima desciende por debajo del 10%. La enzima fue más estable a pH 3 y pH 5 con un porcentaje de actividad residual de 35% cada una. Estos resultados no son similares a los obtenidos por Ng *et al* (2010) en donde esta enzima se mantuvo estable en un amplio rango de pH (1-10) obteniendo más del 80% de actividad residual para todos los pH evaluados. De igual forma los resultados obtenidos difieren a los obtenidos por Chen *et al* (2010) en donde esta enzima purificada fue altamente estable a pH 5 manteniendo más del 90% de su actividad inicial, sin embargo estos ensayos fueron realizados por 18 horas y en otras condiciones de temperatura.

En general la mayoría de las enzimas evaluadas fueron altamente estables en pH ácidos y neutros, a excepción de la celobiohidrolasa. Esta característica de estabilidad en pH ácido las hace deseables para procesos industriales en los que se usen este tipo de enzimas los cuales sean realizados en condiciones de pH ácido. Otra característica que se observó fue que el aumento de pH afecta en gran medida la estabilidad y actividad enzimática para todas las enzimas evaluadas.

La pérdida de la estabilidad, en términos generales, tanto para efectos de temperatura como de pH, puede deberse a que la funcionalidad de la proteína depende de su estructura terciaria, si esta estructura es modificada por cambios químicos como por ejemplo el pH, los enlaces que conforman la estructura terciaria de la enzima (puentes de hidrogeno, enlaces iónicos, enlaces disulfuro entre otros.) se alteren y lleven a que la proteína no cumpla con su función catalítica de manera eficiente (Illanes 2008). Esto puede explicar lo observado en la Figura 5 para la celobiohidrolasa la cual perdió en gran porcentaje su actividad inicial en pH 10.6, otra posible causa de la pérdida de actividad es que a este pH el punto isoeléctrico de la enzima afecte la adsorción de la enzima al sustrato debido a las cargas iónicas de los aminoácidos. (Talbert

2012) la pérdida de la actividad de esta enzima puede conllevar a que el sinergismo del complejo se altere.

7.4 Evaluación del extracto enzimático sobre residuos de tamo de arroz

Para el desarrollo de la hidrólisis enzimática se utilizaron dos extractos enzimáticos, el primero, extraído a partir de el microorganismo utilizado en el presente estudio elegido como mejor productor enzimático *Penicillium* sp. MF 3-64 mezclado con buffer acetato para mantener el pH adecuado para la acción de las enzimas; el segundo, proporcionado por un trabajo previo desarrollado por Sánchez (2013), extraído y filtrado desde una fermentación sólida sobre tamo de arroz con *Pleurotus ostreatus*, mezclado con buffer acetato, esto teniendo en cuenta que este extracto aporta ligninasas.

La elección de las condiciones como pH, temperatura, agitación, tiempo de hidrólisis entre otras, se realizó bajo criterios y observaciones obtenidas de resultados previos, además de revisiones de trabajos relacionados a la hidrolisis enzimática de residuos lignocelulosicos. La temperatura (30°C) de trabajo fue escogida, según los experimentos realizados en las pruebas de estabilidad, en donde la mayoría enzimas mantuvieron mejor actividad enzimática, de igual forma el pH (5) trabajado fue el óptimo para celulasas según literatura, al igual que la agitación y el tiempo de hidrolisis(Shiet *al* 2011).

Esta hidrólisis se realizó con el fin de evaluar la capacidad de hidrolizar el tamo de arroz y evaluar la degradación de este en términos de pérdida de peso seco y liberación de azúcares reductores con cada tratamiento, para una posterior evaluación mezclando dichos extractos enzimáticos.

Los valores de las actividades enzimáticas de las enzimas xilanasas, β -glucosidasas, celobiohidrolasas, endoglucanasas, lacasas y manganeso peroxidadas (MnP) obtenidos a partir de los extractos filtrados obtenidos de *Penicillium* sp. MF 3-64 en fermentación líquida con adición de sulfato de amonio y tamo de arroz (T1), y el proporcionado por trabajos realizados por Sánchez (2013) utilizando *Pleurotus ostreatus* en caldo salvado de trigo (T2) se encuentran en la **Tabla 1** con su respectivo control negativo utilizando buffer acetato 50 mM pH 5.

Tabla 1. Actividades enzimáticas iniciales (U/L) obtenidas del extracto enzimático de *Penicillium* sp. M-F 364 usado para la hidrólisis del tamo de arroz con T1 (Extracto enzimático: *Penicillium* sp. MF 3-64 + buffer acetato); T2 (Extracto enzimático: *Pleurotus ostreatus* + buffer acetato).

Enzima	T1	T2	buffer
Xilanasas	6385,97 ± 478,62	518,67 ± 74,1	ND
β-glucosidasa	8193,282 ± 297,85	ND	ND
Celobiohidrolasa	5660,54 ± 596,78	3739,54 ± 614,26	ND
Endoglucanasa	176 ± 16,13	51,58 ± 7,01	ND
Lacasa	1,621 ± 0,36	84,224 ± 1,22	ND
MnP	1,336 ± 0,11	9,882 ± 0,28	ND

ND: no detectable

Después de la hidrólisis enzimática del tamo de arroz, utilizando los extractos T1 y T2, se determinó la pérdida de peso seco del tamo de arroz como variable indirecta de la degradación de este, así como los azúcares reductores producidos durante este proceso enzimático. Los datos de esta actividad están plasmados a continuación en la **Tabla 2**. Y el rendimiento enzimático correspondiente a cada tratamiento en la **Tabla 3** como resumen cuantitativo de la hidrólisis enzimática utilizando los extractos enzimáticos y comparándolos.

Tabla 2. Pérdida de peso seco(%) y azúcares reductores liberados después de la hidrólisis enzimática con T1 (Extracto enzimático *Penicillium* sp. MF 3-64 + buffer acetato); T2 (Extracto enzimático *Pleurotus ostreatus* + buffer acetato)

	T1	T2	Buffer
% pps	28,03 ± 1,76	8,38 ± 1,41	7,67 ± 1,93
ARP (g/L)	0,893 ± 0,181	0,312 ± 0,069	0 ± 0,003

pps: pérdida peso seco; ARP: azúcares reductores producidos

Tabla 3. Rendimientos de la hidrólisis enzimática

Tratamiento	T1	T2
Rendimiento %	12,04	4,20

Lo observado tras la hidrólisis enzimática del tamo de arroz, muestra que hubo una reducción en peso seco del 28,03% para el extracto usado de *Penicillium* sp. y 8,38% para el segundo tratamiento realizado con extractos de *Pleurotus ostreatus*, estos porcentajes difieren en gran medida con lo obtenido en azúcares reductores en los cuales se obtuvieron rendimientos relativamente bajos (**Tabla 3**) en comparación con lo reportado por Singh *et al* (2012) en donde se estudia la hidrólisis del tamo de arroz con dos hongos filamentosos conocidos por su producción de celulasas como lo son los géneros *Trichoderma* y *Aspergillus*, en este estudio los rendimientos alcanzados llegan al 84%, de igual forma en Maeda *et al* (2013) se obtienen rendimientos del 88% en la hidrólisis enzimática de bagazo de caña con enzimas de un co-cultivo de *Penicillium funiculosum* y *Trichoderma harzianum*. Los altos rendimientos de estos estudios pueden explicarse debido a que en los procedimientos empleados para la hidrólisis enzimática generalmente se llevan a cabo procesos de purificación de las enzimas celulolíticas, pre tratamientos del material lignocelulósico además de la optimización de las condiciones para la hidrólisis. Debido a que en el presente estudio no se realizaron los procedimientos anteriormente nombrados, la degradación enzimática del tamo de arroz puede verse afectada produciendo bajos rendimientos y bajas concentraciones de azúcares reductores liberados.

8. CONCLUSIONES

La fermentación líquida sobre tamo de arroz indujo la producción de celulasas y xilanasas, observándose para *Penicillium* sp MF 3-64 su mayor producción al día 10 de la fermentación para todas las 4 enzimas evaluadas. Para la cepa de *Paecilomyces* sp. MF 4-71, la producción de celulasas fue menor en comparación con la cepa de *Penicillium* sp., además la mayor actividad enzimática difiere en el tiempo ya que cada una de las 4 enzimas tuvo picos de actividad en distintos días de la fermentación.

La adición de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno mostró tener un efecto sobre la producción de celulasas de tal manera que aumenta la actividad enzimática de los tratamientos que fueron sometidos a este compuesto. Esto se vio tanto para *Penicillium* sp. MF 3-64 como para *Paecilomyces* sp. MF 4-71.

En cuanto a la estabilidad frente a temperatura de las 4 enzimas evaluadas, se puede concluir que para la mayoría de las enzimas excepto para la β -glucosidasa, el rango de temperatura que favorece la estabilidad de las enzimas está entre 25 y 30°C, temperaturas que facilitan los procesos industriales y su aplicación agrícola, ya que al ser un rango de temperatura ambiente no es necesario la implementación de energía adicional. En lo referente a la estabilidad frente a pH se concluye que para todas las enzimas los pH ácidos y neutros favorecen la estabilidad de estas lo cual es idóneo en la aplicación de procesos industriales en los cuales las condiciones de trabajo sean ácidas.

La degradación del tamo de arroz en cuanto a azúcares reductores liberados y pérdida de peso seco, no fue satisfactoria ya que los resultados son menores en comparación a lo reportado en la literatura citada, lo cual indica que este proceso debe ser optimizado o bien la hidrólisis se podrá realizar por mas días para evaluar la degradación durante el tiempo.

9. RECOMENDACIONES

Se recomienda para el avance en el conocimiento de la producción enzimática y fermentación líquida sobre el tamo de arroz que se evalúen otras variables enzimáticas como la actividad específica para cada enzima estudiada.

De igual forma se puede sugerir que la fermentación líquida se realice bajo las condiciones de un biorreactor con el cual se puedan estudiar y evaluar distintas condiciones de oxigenación y agitación y de esta forma analizar si la producción y actividad enzimática aumentan cuando el hongo es sometido a la fermentación del tamo de arroz bajo estas condiciones.

Para continuar con la investigación en relación a la estabilidad de las celulasas y xilanasas de *Penicillium* sp., es conveniente evaluar el efecto de aditivos o sustancias tales como glicerol, sorbitol, glicina, gelatina, y polietilenglicol que permitan incrementar y mejorar la estabilidad frente a diferentes rangos de temperaturas y pH (Shi *et al* 2011), además de este también se deberían evaluar temperaturas superiores a 50°C ya que en la mayoría de reportes científicos los estudios de termo estabilidad se evalúan temperaturas mayores a las evaluadas en este trabajo.

Para mejorar la degradación del tamo de arroz con los extractos enzimáticos sería importante evaluar e implementar procesos que involucren el uso de co cultivos y consorcios de microorganismo lignocelulolíticos con los que se puedan obtener aumentos significativos en la degradación. Igualmente importante evaluar los diferentes pre tratamientos químicos, físicos o biológicos que se le puedan hacer al tamo de arroz, lo cual ayudaría a aumentar la disponibilidad de la celulosa y hemicelulosa y de esta forma aumentarían los rendimientos y la reducción en peso seco del residuo. La evaluación enzimática posterior a la hidrólisis debe ser realizada con el fin de estudiar la estabilidad del extracto.

10. Bibliografia

- Anwar N, Widjaja A, Winardi S (2011) Study of the enzymatic hydrolysis of alkaline-pretreated rice straw using cellulase of various sources and compositions. *International Review of Chemical Engineering - Rapid Communications* 3(2): 272-278.
- Baldrian P, Valásková (2008) Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS, Microbiology Reviews* 32(3): 501-21
- Balat M (2011), Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*. 52 : 858–875
- Castillo F, Roldan M, Blasco R, Huertas M, Caballero F, Moreno C, Martinez M (2005) *Biotecnología ambiental*. Editorial Tebar S. L Madrid, España. 1: 406-408
- Castro A M, Albuquerque C, Marcelle L, Leite S G, Ferreira, Pereira N (2010) Cellulases from *Penicillium funiculosum*: Production, properties and application to cellulose hydrolysis. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 37(2): 151-8.
- Chen M, Qin Y, Liu Z, Liu K, Wang F, Qu Y. (2010). Isolation and characterization of a β -glucosidase from *Penicillium decumbens* and improving hydrolysis of corncob residue by using it as cellulase supplementation. *Enzyme and Microbial Technology* 46(6): 444-449.
- Chen X, Meng K, Shi P, Bai Y, Luo H, Huang H, Yao B (2012) High-level expression of a novel *Penicillium* endo-1,3(4)- β -D-glucanase with high specific activity in *Pichia pastoris*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 39(6): 869-876.
- Chulkin A, Loginov D, Vavilova E, Abyanova A, Zorov I, Kurzeev S, Koroleva O, Benevolenskii S (2009) Enzymological Properties of Endo-(1–4)- β -Glucanase Egl2p of *Penicillium canescens* and Characteristics of Structural Gene *egl2*. *Biochemistry* 74(6): 805-813
- D'Souza T, Merrit C, Reddy A (1999) *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5307-5313

- Dos Reis L, Fontana RC ; da Silva Delabona P, Da Silva Lima D, Camassola M, Da Cruz Pradella J, Dillon A, (2013) Increased production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum* S1M29 in batch and fed batch culture. *Biosource technology* 146 : 597-603
- Devevre C, Horwáth W (2000) Decomposition of rice straw and microbial carbon use efficiency under different soil temperatures and moistures. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 1773-1785
- Díaz R, Alonso S, Sanchez C, Araceli T, Bibbins M, Díaz G (2011) Characterization of the growth and laccase activity of strains of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. *Bio Resources* 6(1): 282-290.
- Dutta T, Sahoo R, Sengupta R, Ray SS, Bhattacharjee A, Ghosh S (2008) Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: Production and characterization. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 35(4): 275-82.
- Eriksson K, Bermek H (2009) Applied Microbiology: Industrial Lignin, Lignocellulose, Ligninase. *Encyclopedia of Microbiology* 3: 373 – 384.
- Fedearroz (2013). <http://www.fedearroz.com.co/new/index.php> consultado el 21 de junio de 2013.
- Feng C, Zeng G, Huang D, Hu S, Zhao M, Lai C, Huang C, Wei Z, Li N (2012) Effect of ligninolytic enzymes on lignin degradation and carbon utilization during lignocellulosic waste composting. *Process of Biochemistry* 46: 1515–1520.
- Gao L, Wang F, Gao F, Wang L, Zhao J, Qu Y (2011) Purification and characterization of a novel cellobiohydrolase (PdCel6A) from *Penicillium decumbens* JU-A10 for bioethanol production. *Bioresource Technology* 102(17): 8339-8342.
- García G, Quintero R, López M (2004) *Biología alimentaria*. Editorial limusa, Mexico D.F, Mexico 1: 553.
- Hernández A, (2003), *Microbiología industrial*, Universidad Estatal a Distancia, San José, Costa Rica. 1: 134.

- Joo A, Jeya M, Lee K, Lee K, Moon H, Kim Y, Lee J (2010) Production and characterization of β -1,4-glucosidase from a strain of *Penicillium pinophilum*. *Process Biochemistry* 45(6): 851-858.
- Kluczek T, Majjala P, Tuomela M, Hofrichter M, Hatakka A (2005) Endoglucanase activity of compost-dwelling fungus *Paecilomyces inflatus* is stimulated by humic acids and other low molecular mass aromatics. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21: 1603–1609.
- Kluczek T, Majjalaa P, Hofrichter M, Hatakka A (2007) Degradation and enzymatic activities of three *Paecilomyces inflatus* strains grown on diverse lignocellulosic substrates Beata. *International Biodeterioration & Biodegradation* 59: 283–291
- Lee J, Jang Y, Lee H, Lee S, Kim G, Kim J (2012) Screening for xylanase and β -xylosidase production from wood-inhabiting *Penicillium* strains for potential use in biotechnological applications. *Holzforschung: International Journal of the Biology, Chemistry, Physics, & Technology of Wood* 66(2): 267-271.
- Lee K, Jeya M, Joo A, Singh R, Kim I, Lee J (2010) Purification and characterization of a thermostable endo- β -1,4-glucanase from a novel strain of *Penicillium purpurogenum*. *Enzyme and Microbial Technology* 46(3-4): 206-211.
- Lee K, Joo A, Jeya M, Lee K, Moon H, Lee J (2011) Production and characterization of cellobiohydrolase from a novel strain of *Penicillium purpurogenum* KJS506. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 163(1): 25-39.
- Li L, Tian H, Cheng Y, Jiang Z, Yang S (2006) Purification and characterization of a thermostable cellulase-free xylanase from the newly isolated *Paecilomyces thermophila*. *Enzyme and Microbial Technology* 38(6): 780-787
- Liao H, Xu C, Tan S, Wei Z, Ling N, Yu G, Xu Y (2012) Production and characterization of acidophilic xylanolytic enzymes from *Penicillium oxalicum* GZ-2. *Bioresource Technology*, 123(0): 117-124.
- Limam F, Chaabouni S E, Ghrir R, Marzouki N (1995) Two cellobiohydrolases of *Penicillium occitanis* mutant pol 6: Purification and properties. *Enzyme and Microbial Technology* 17(4): 340-346.

- Liu G, Qin Y, Hu Y, Gao M, Peng S, Qu Y (2013) An endo-1,4- β -glucanase PdCel5C from cellulolytic fungus *Penicillium decumbens* with distinctive domain composition and hydrolysis product profile. *Enzyme and Microbial Technology* 52(3): 190-195.
- Lockington RA, Rodbourn L, Barnett S, Carter CJ, Kelly JM (2002) Regulation by carbon and nitrogen sources of a family of cellulases in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* 37(2): 190-196
- Maeda R, Barcelos C A, Anna L M M S, Pereira Jr N (2013) Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. *Journal of Biotechnology* 163(1): 38-44.
- Martins L F, Kolling D, Camassola M, Dillon A J P, Ramos LP (2008) Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Bioresource Technology* 99(5): 1417-1424
- Melo PS (2010) Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais. Trabalho de Grado de Maestría. *Escuela Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidad de São Paulo, Piracicaba*, p98.
- Miller G (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31:426-428.
- Morais H, Ramos C, Matos N, Forgács E, Cserhádi T, Almeida V, Oliveira J (2002) Liquid chromatographic and electrophoretic characterisation of extracellular beta-glucosidase of *Pleurotus ostreatus* grown in organic waste. *Journal of chromatography. Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 770(1-2): 111-9.
- Muñoz L, (2012) Evaluación de enzimas degradadoras de lignina producidas por aislamientos fúngicos de cultivos de arroz. Tesis de pregrado. Pontificia Universidad Javeriana.
- Ng I, Li C, Chan S, Chir J, Chen P T, Tong C, Ho T D (2010) High-level production of a thermoacidophilic β -glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. *Bioresource Technology* 101(4): 1310-1317.
- Okolo JC, Obi SKC, Odibo FJC (1998) Purification and characterization of two distinct carboxymethylcellulases of *Paecilomyces* sp. *Bioresource Technology* 66(3): 231-234

- Picart P, Diaz P, Pastor F I J (2007) Cellulases from two *Penicillium* sp. strains isolated from subtropical forest soil: Production and characterization. *Letters in Applied Microbiology* 45(1): 108-113.
- Quevedo B (1999) Purificación y determinación de algunas características de la enzima fosfolipasa en el veneno de *Bothrops atrox* proveniente de Chiriguana, Cesar. Trabajo de maestría. *Universidad Nacional de Colombia*. Ingeniería Química. Bogotá D.C.
- Quevedo B (2011) Evaluación de la degradación de residuos de floricultura para la obtención de azúcares con el uso de tres hongos lignocelulolíticos. Trabajo de doctorado. *Universidad Nacional de Colombia*. Ingeniería Química. Bogotá D.C.
- Reis L, Fontana R, Da Silva P, Da Silva D, Camassola M, Da Cruz J, Pinheiro A (2013) Increased production of cellulases and xylanases by *Penicillium mechinulatum* S1M29 in batch and fed-batch culture. *Bioresour Technol* 146: 597–603
- Sánchez C (2009) Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 27(2): 185-194.
- Sánchez M (2013) Evaluación de la degradación del tamo por microorganismos celulolíticos aislados de suelos de cultivo de arroz. Tesis de Maestría Instituto de biotecnología. *Universidad nacional de Colombia*. Maestría en ciencias-Microbiología. Bogotá D.C.
- Shi Q, Sun J, Yu H, Li C, Bao J, Xu J (2011) Catalytic performance of corn stover hydrolysis by a new isolate *Penicillium* sp. ECU0913 producing both cellulase and xylanase. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 164(6): 819-30.
- Singh A, Bishnoi N, (2012). Optimization of enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw and ethanol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(4), 1785-93
- Sun W, Cheng C, Chien L (2008) Protein expression and enzymatic activity of cellulases produced by *Trichoderma reesei* Rut C-30 on rice straw. *Process Biochemistry* 43: 1083–1087.
- Sun X, Liu Z, Zheng K, Song X, Qu Y (2008) The composition of basal and induced cellulase systems in *Penicillium decumbens* under induction or repression conditions. *Enzyme and Microbial Technology* 42(7): 560-567.

Talbert J, Goddard J (2012) Enzymes on material surfaces. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 93 : 8

Turpeinen B, Maijala P, Hofrichter M, Hatakka A (2007) Degradation and enzymatic activities of three *Paecilomyces inflatus* strains grown on diverse lignocellulosic substrates. *International Biodeterioration & Biodegradation* 59(4): 283-291

Zampieri D, Guerra L, Camassola M, Dillon A J P (2013) Secretion of endoglucanases and β -glucosidases by *Penicillium echinulatum* 9A02S1 in presence of different carbon sources. *Industrial Crops and Products* 50(0): 882-886

Anexo 1

1. Curvas de calibración de DNS

Las curvas de calibración de DNS se elaboran de la siguiente manera:

Utilizando las concentraciones 0,3; 0,5; 0,7; 1; 1,3; 1,5; 1,7 y 2 g/L de glucosa o xilosa a partir de una solución stock respectiva de 2 g/L. se realizó la técnica de DNS a cada concentración según (Miller 1959) por triplicado y se leyeron las absorbancias a 540 nm,

Las curvas de calibración de cada DNS elaborado en el laboratorio se encuentran plasmadas en la **Tabla 4**.

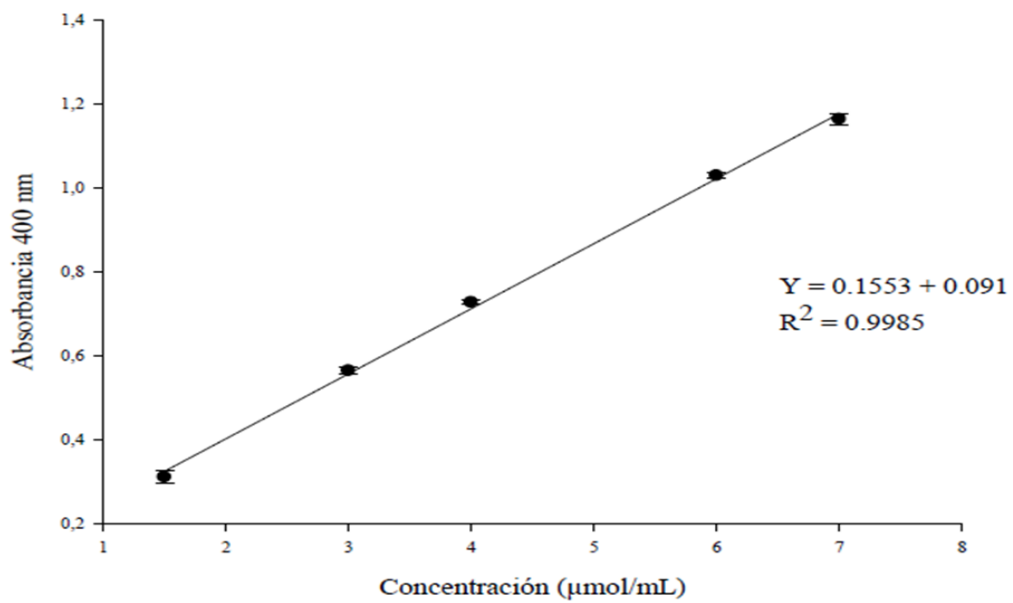
Tabla 4. Curva de calibración por fecha de DNS para glucosa y xilosa

Fecha			Glucosa	Xilosa
Día	Mes	Año		
8	12	2012	$y=0,5385x+0,0105$	$y=0,5457x-0,017$
27	4	2013	$y=0,4954x+0,0118$	$y=0,5764x+0,0346$
14	8	2013	$y=0,5729x+0,0039$	$y=0,6191x+0,0059$
16	10	2013	$y=0,5981x-0,0498$	$y=0,6713x-0,019$

2. Curva de calibración *p*-nitrofenol

La curva de calibración de *p*-nitrofenol fue extraída del trabajo realizado por Quevedo (2011) ya que se usa el mismo sustrato y la misma técnica para evaluación de las enzimas β -glucosidasa y endoglucanasas

Figura 7. Curva de calibración *p*-nitrofenol usado para evaluación de β -glucosidasa y endoglucanasas



Anexo 2

Análisis estadístico de datos obtenidos Anova

ANOVA PRODUCCION ENZIMATICA PENICILLIUM Y PAECILOMYCES					
XILANASAS					
Normality Test:		Failed (P < 0,050)			
Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun					
Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks			martes, noviembre 19, 2013, 21:30:00		
Data source: xila in Notebook1					
Group	N	Missing	Median	25%	75%
Pcn d4	3	0	806,802	719,506	894,099
Pcn d6	3	0	3181,257	2647,790	3714,724
Pcn d8	3	0	11756,750	10402,955	13110,545
Pcn d10	3	0	16829,086	15778,748	17879,424
Psn d4	3	0	1881,448	1753,795	2009,101
Psn d6	3	0	2344,369	2106,361	2582,377
Psn d8	3	0	4187,041	3636,720	4737,362
Psn d10	3	0	6355,606	5789,189	6922,024
PAcn d4	3	0	13,450	10,952	15,947
PAcn d6	3	0	28,757	21,787	35,727
PAcn d8	3	0	18,562	13,726	23,398
PAcn d10	3	0	0,000	0,000	0,000
PAsn d4	3	0	7,471	3,731	11,212
PAsn d6	3	0	22,354	17,094	27,614
PAsn d8	3	0	7,894	4,641	11,146
PAsn d10	3	0	0,000	0,000	0,000
H = 46,131 with 15 degrees of freedom. (P = <0,001)					
The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001)					
To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.					
ENDOGLUCANASA					
Normality Test:		Failed (P < 0,050)			
Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun					
Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks			martes, noviembre 19, 2013, 21:10:23		
Data source: endo in Notebook1					

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Pcn d4	3	0	181,848	157,005	206,691
Pcn d6	3	0	214,234	195,267	233,201
Pcn d8	3	0	155,594	123,410	187,777
Pcn d10	3	0	896,943	776,311	1017,576
Psn d4	3	0	70,683	59,323	82,044
Psn d6	3	0	82,030	63,738	100,323
Psn d8	3	0	100,895	88,818	112,973
Psn d10	3	0	225,537	191,601	259,473
PAcn d4	3	0	96,677	91,399	101,956
PAcn d6	3	0	0,000	0,000	0,000
PAcn d8	3	0	0,000	0,000	0,000
PAcn d10	3	0	0,000	0,000	0,000
PAsn d4	3	0	107,034	90,683	123,385
PAsn d6	3	0	0,000	0,000	0,000
PAsn d8	3	0	0,00810	0,00203	0,0372
PAsn d10	3	0	0,000	0,000	0,000

H = 45,186 with 15 degrees of freedom. (P = <0,001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

B-GLUCOSIDASA

Normality Test: Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks martes, noviembre 19, 2013, 20:59:37

Data source: beta in Notebook1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Pcn d4	3	0	363,470	306,705	420,235
Pcn d6	3	0	275,837	242,731	308,944
Pcn d8	3	0	3762,637	2915,486	4609,787
Pcn d10	3	0	6438,265	5563,082	7313,447
Psn d4	3	0	126,932	105,918	147,945
Psn d6	3	0	49,662	27,228	72,095
Psn d8	3	0	2097,211	1762,442	2431,980
Psn d10	3	0	803,405	687,129	919,681
PAcn d4	3	0	1921,308	1599,886	2242,731
PAcn d6	3	0	2250,644	1895,793	2605,495
PAcn d8	3	0	3237,757	2542,671	3932,843
PAcn d10	3	0	2032,741	1606,632	2458,851
PAsn d4	3	0	2036,039	1636,549	2435,530
PAsn d6	3	0	2046,905	1642,358	2451,453
PAsn d8	3	0	2559,666	2101,543	3017,788
PAsn d10	3	0	1136,626	734,617	1538,635

H = 41,684 with 15 degrees of freedom. (P = <0,001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

CELOBIOHIDROLASA

Normality Test: Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks martes, noviembre 19, 2013, 20:42:13

Data source: exo in Notebook1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
Pcn d4	3	0	317,692	263,325	372,058
Pcn d6	3	0	222,714	161,638	283,790
Pcn d8	3	0	5672,811	4925,279	6420,342
Pcn d10	3	0	11049,300	8825,067	13273,533
Psn d4	3	0	175,628	142,597	208,659
Psn d6	3	0	54,169	37,296	71,043
Psn d8	3	0	199,193	178,044	220,343
Psn d10	3	0	902,205	739,966	1064,445
PACn d4	3	0	65,357	47,200	83,515
PACn d6	3	0	33,081	21,807	44,355
PACn d8	3	0	0,0268	0,00670	0,0761
PACn d10	3	0	0,000	0,000	0,000
PAsn d4	3	0	24,549	15,531	33,568
PAsn d6	3	0	28,198	17,999	38,398
PAsn d8	3	0	0,000	0,000	0,000
PAsn d10	3	0	0,000	0,000	0,000

H = 45,786 with 15 degrees of freedom. (P = <0,001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

ESTABILIDAD EXTRACTO A TEMPERATURA PENICILLIUM

XILANASAS

Normality Test: Passed (P = 0,323)

Equal Variance Test: Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks martes, noviembre 19, 2013, 22:04:04

Data source: xila in Notebook1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
7	3	0	69,650	63,395	75,904
15	3	0	77,074	68,454	85,694
25	3	0	107,527	104,106	110,948
30	3	0	105,123	95,060	115,187
40	3	0	113,093	101,908	124,279
50	3	0	105,955	98,534	113,377

H = 11,760 with 5 degrees of freedom. (P = 0,038)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0,038)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

B-GLUCOSIDASA

Normality Test: Passed (P = 0,929)

Equal Variance Test: Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

martes, noviembre 19, 2013, 22:13:37

Data source: beta in Notebook1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
7	3	0	100,580	87,819	113,342
15	3	0	52,787	45,047	60,527
25	3	0	44,769	40,423	49,114
30	3	0	40,707	34,651	46,762
40	3	0	40,014	34,599	45,429
50	3	0	25,101	22,110	28,092

H = 13,491 with 5 degrees of freedom. (P = 0,019)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0,019)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

ENDOGLUCANASA

Normality Test: Passed (P = 0,788)

Equal Variance Test: Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

martes, noviembre 19, 2013, 22:15:01

Data source: endo in Notebook1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
7	3	0	58,701	52,689	64,713
15	3	0	53,435	50,966	55,905
25	3	0	96,247	93,170	99,323
30	3	0	110,099	107,649	112,549
40	3	0	56,949	55,539	58,358
50	3	0	75,084	71,859	78,309

H = 15,316 with 5 degrees of freedom. (P = 0,009)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0,009)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

CELOBIOHIDROLASA

Normality Test: Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks martes, noviembre 19, 2013, 22:17:41

Data source: exo in Notebook1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
7	3	0	98,962	84,834	113,091
15	3	0	96,314	94,357	98,272
25	3	0	64,730	64,560	64,900
30	3	0	75,242	73,653	76,831
40	3	0	79,650	78,288	81,012
50	3	0	47,633	43,406	51,860

H = 15,830 with 5 degrees of freedom. (P = 0,007)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0,007)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

ESTABILIDAD FRENTE A pH PENICILLIUM

XILANASAS

Normality Test: Passed (P = 0,526)

Equal Variance Test: Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks martes, noviembre 19, 2013, 22:28:43

Data source: XILA in Notebook2

Group	N	Missing	Median	25%	75%
3	3	0	121,314	117,016	125,611
5	3	0	102,731	95,019	110,442
7	3	0	122,968	115,558	130,378
9	3	0	76,426	73,239	79,613
10,6	3	0	26,255	23,224	29,286

H = 12,833 with 4 degrees of freedom. (P = 0,012)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0,012)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

B-GLUCOSIDASA

Normality Test: Passed (P = 0,789)

Equal Variance Test: Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

martes, noviembre 19, 2013, 22:29:07

Data source: BETA in Notebook2

Group	N	Missing	Median	25%	75%
3	3	0	35,276	31,261	39,291
5	3	0	22,223	20,899	23,547
7	3	0	35,651	32,732	38,570
9	3	0	30,875	28,628	33,123
10,6	3	0	5,821	5,288	6,353

H = 11,733 with 4 degrees of freedom. (P = 0,019)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0,019)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

ENDOGLUCANASA

Normality Test: Passed (P = 0,845)

Equal Variance Test: Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

martes, noviembre 19, 2013, 22:29:31

Data source: ENDO in Notebook2

Group	N	Missing	Median	25%	75%
3	3	0	65,425	64,447	66,402
5	3	0	72,820	68,506	77,134
7	3	0	84,975	77,323	92,627
9	3	0	56,842	54,087	59,598
10,6	3	0	39,722	36,167	43,276

H = 13,233 with 4 degrees of freedom. (P = 0,010)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0,010)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

CELOBIOHIDROLASA

Normality Test: Failed (P < 0,050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

martes, noviembre 19, 2013, 22:29:55

Data source: EXO in Notebook2

Group	N	Missing	Median	25%	75%
3	3	0	11,761	11,675	11,846
5	3	0	7,551	6,828	8,274
7	3	0	8,870	8,612	9,129
9	3	0	8,851	7,204	10,498
10,6	3	0	0,000	0,000	0,000

H = 12,187 with 4 degrees of freedom. (P = 0,016)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0,016)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.