

Evaluación de cepas fúngicas nativas del Valle del Cauca productoras de enzimas con actividad celulolítica y hemicelulolítica comparadas con *Trichoderma reesei*.

1 Camacho Daza Jenner Julian¹; Charry Hurtado Enrique¹, Caicedo Ortega Nelson H.¹, Álvarez
2 Vasco Carlos A.¹

3 ¹Universidad ICESI, Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería Bioquímica, Santiago de Cali,
4 Colombia

5 * Correspondencia:

6 Jenner Julian Camacho Daza

7 jejucada@gmail.com

8 Palabras Clave: Hongos endófitos, β -glucosidasas, Xilanasas, Exoglucanasas, *Trichoderma reesei*.

9 Abstract

10 Lignocellulolytic residues have become a major problem over the last decades, which has caused
11 researchers to turn their attention to fungi, since these microorganisms represent a great unexplored
12 cellulite potential. Despite this, there is still a long way to go for the characterization of all fungal
13 species, and that is why *Phlebia sp* and *Trichoderma lentiforme*, endophytic native species of fungi,
14 and *Xylaria sp*, native macrofungus, were analyzed and compared to a reference strain, *Trichoderma*
15 *reesei*. Results showed that *Phlebia sp*, *Xylaria sp* and *T. lentiforme* present a promising future
16 regarding β -glucosidase, xylanase and exoglucanase activity respectively, overpassing the activity
17 reported by *T. reesei*. Confirming the unexplored potential endophytic native species of fungi have.

18 1 Introducción

19 *Trichoderma reesei* es un hongo que tiene la capacidad de degradar la pared celular de las plantas,
20 mediante la acción enzimática de la amplia variedad de enzimas extracelulares que produce. Dichas
21 enzimas permiten a esta especie hidrolizar materias primas que contienen celulosa y hemicelulosa para
22 beneficiarse de estos compuestos. Lo que ha llevado a este hongo a convertirse en foco de
23 investigaciones para el aprovechamiento de residuos agroindustriales que contengan material
24 lignocelulósico. Sin embargo, se ha encontrado que *T. reesei* no tiene una completa efectividad para la
25 degradación de dicho material, debido a que tiene una baja producción de β -glucosidasas, además, el
26 principal desafío para la producción de celulasas a partir de *T. reesei* es que la expresión de los genes
27 de celulasa requiere inductores costosos como celulosa y lactosa, y están sujetas a una mayor inhibición
28 por producto comparada con otros hongos como *Aspergillus sp*. (Lynd et al., 2002).

29 Por lo cual, resulta clave realizar procesos de bioprospección en los que se identifiquen nuevas cepas
30 fúngicas con actividad celulolítica y hemicelulolítica, que tengan una alta producción de estas enzimas
31 y que puedan compensar por las deficiencias con las que *Trichoderma reesei* cuenta. Junto con esto,
32 en el mundo se estima que la diversidad de hongos está entre 2.2 y 3.8 millones de especies, de las
33 cuales solo conocemos 120 000 que han sido descritas previamente (Hawksworth and Lücking, 2017).
34 Pero, a pesar de que Colombia es el segundo país más biodiverso del mundo (MinAmbiente, 2019), se
35 desconoce el potencial biotecnológico con el que cuentan muchos de sus departamentos, entre ellos el
36 Valle del Cauca.

37 Previamente, se han logrado identificar muchas especies de microorganismos como hongos endófitos
38 y bacterias productores de enzimas con capacidad celulolítica, como la de (Sánchez Castelblanco et
39 al., 2020) donde se aislaron e identificaron las cepas amilolíticas y celulolíticas de suelos de humedales
40 en Bogotá, también la investigación extranjera de (Salgado Salazar and Cepero de García, 2005) donde
41 se identificaron *Acremonium* y *Cladosporium* extraídas de áreas urbanas de jardines de Bogotá y que
42 presentaron una buena producción de celulosas, o el estudio previo realizado por (Botina et al., 2021)
43 en el que se evaluó la actividad celulolítica de hongos endófitos nativos del Valle del Cauca.

44 Es por eso, que este proyecto busca identificar el potencial celulolítico y hemicelulolítico de cepas
45 fúngicas nativas del Valle del Cauca, comparándolas con la actividad enzimática homóloga de
46 *Trichoderma reesei*, Para ello se efectuó una fermentación en medio líquido suplementado con
47 celobiosa y xilano Birchwood, los cuales cumplen su función como inductores enzimáticos, para
48 posteriormente medir la actividad β - Glucosidasa, exoglucanasa y xilanasas y cuantificar la producción
49 de proteínas a través del método BCA.

50 **2 Materiales y métodos**

51 **2.1 Microorganismos**

52 Las cepas de hongos endófitos empleadas fueron *Phlebia sp* y *Trichoderma lentiforme*, ambas aisladas
53 de la planta *Otoba gracilipes*, y un macrohongo del género *Xylaria sp*, todas tomadas de la colección
54 del cepario del departamento de Ingeniería Bioquímica de la Universidad ICESI, Cali, Colombia. Las
55 cuales fueron previamente seleccionadas para estos estudios por la presencia de actividad
56 endoglucanasa a través de pruebas cualitativas (Caicedo Ortega et al., 2022). La cepa de referencia
57 para la comparación de las actividades enzimáticas evaluadas en los hongos nativos fue *Trichoderma*
58 *reesei* (ATCC® 24449™).

59 Estas cepas se conservan en agar papa dextrosa (PDA) a 10 °C. La activación de cada cepa se realizó
60 en medio PDA en caja Petri, a 28 °C de la siguiente manera: 7 días para *Trichoderma reesei* y *Phlebia*
61 *sp.*, 8 días para *Trichoderma lentiforme* y 10 días para el macro hongo *Xylaria sp*, hasta que se
62 generaran esporas o los filamentos del hongo crecieran.

63 **2.2 Fermentación**

64 La composición del medio utilizado para todos los experimentos fue el propuesto por (Mandels and
65 Weber, 1969) modificado y suplementado con Xilano Birchwood y Celobiosa como inductores. El
66 medio consistió en 1.4 mg/ml de NH₄NO₂, 2 mg/ml de K₂HPO₄, 0.3 de mg/ml MgSO₄, 0.3 de mg/ml
67 CaCl₂, 0.0016 mg/ml de MnSO₄, 0.002 mg/ml de CoCL₂, 0.005 mg/ml de FeSO₄, 0.0014 de mg/ml
68 ZnSO₄, 0.5% p/v de Urea, 3% p/v de Glucosa, 0.01% p/v de Xilano Birchwood y 0.01% p/v de
69 Celobiosa. El pH final del medio fue ajustado a 5.5. Para los hongos esporulados, *T. reesei* y *T.*
70 *lentiforme*, se realizó una suspensión de esporas en Tween 80 al 0.01%, para inocular un total de 2 ml
71 de dicha solución en cada experimento. Para las cepas restantes, *Phlebia sp.* y el macrohongo *Xylaria*
72 *sp.*, el inóculo consistió en agregar cinco trozos del agar (0.5 x 0.5 cm) donde se encontraba la porción
73 miceliar de las cepas activas. Todos los experimentos contaron con 100 mL de medio en Erlenmeyers
74 de 250 mL y fueron incubados a 28 °C y con una velocidad de agitación de 90 rpm, estos se realizaron
75 por duplicado y durante 7 días de fermentación se llevó un registro del pH y se llevó a cabo un control
76 gravimétrico con el medio de cultivo. Se tomaron muestras, 1.5 mL, de los sobrenadantes cada 24 horas
77 a partir del cuarto día de fermentación, se centrifugaron en la centrifuga Hettich® Universal 320R a 4

78 500 rpm a 10 °C durante 5 minutos, la porción líquida se utilizó para realizar los ensayos enzimáticos
79 y cuantificación de proteínas.

80 **2.3 Ensayos Enzimáticos y Cuantificación de Proteínas**

81 Para las actividades β -glucosidasa y xilanasa se utilizaron los kits D-Glucosa formato GOPOD y D-
82 Xilosa respectivamente, ambos elaborados por Megazyme (Irlanda) para la cuantificación de glucosa
83 y xilosa respectivamente. Por otro lado, para la actividad exoglucanasa se realizó una cuantificación
84 de azúcares mediante el método del Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), en donde se restan los azúcares
85 medidos por los métodos anteriores (glucosa y xilosa). Las mediciones para todos los ensayos se
86 realizaron mediante métodos espectrofotométricos en el Thermo Scientific™ Varioskan™.

87 La actividad β -glucosidasa se determinó de acuerdo con el método propuesto por Zhang et. al (2009)
88 donde se midió la concentración de glucosa liberada usando celobiosa como sustrato. La reacción
89 consistió en la mezcla de 100 uL de sobrenadante y 100 uL de solución de sustrato (Solución de
90 celobiosa 15 mM disuelta en buffer fosfato 0.5M, pH 5.5). Se incubó a 50 °C durante 30 minutos. Las
91 concentraciones de glucosa se determinaron mediante el protocolo del kit D-Glucosa formato GOPOD
92 midiendo la absorbancia a 510 nm. Una unidad de actividad β -glucosidasa se definió como la
93 formación de 1 μ mol de glucosa por minuto.

94 Para la actividad xilanasa se siguió la metodología propuesta por Silva et. al (2015) donde se midió la
95 concentración de Xilosa liberada durante la degradación de Xilano Birchwood como sustrato. La
96 reacción consistió en la mezcla de 100 uL de sobrenadante y 100 uL de solución de sustrato (Solución
97 de Xilano Birchwood al 1% p/v disuelto en buffer fosfato 0.5M, pH 5.5). Se incubó a 50 °C durante 5
98 minutos. Las concentraciones de Xilosa se determinaron mediante el protocolo del kit de Xilosa
99 midiendo la absorbancia en dos ocasiones a 340 nm. Una unidad de actividad xilanasa se definió como
100 la formación de 1 μ mol de xilosa por minuto.

101 La actividad exoglucanasa se determinó de acuerdo con el método propuesto por Zhang et. al (2009)
102 donde se midió la concentración de celobiosa liberada usando celulosa microcristalina AVICEL® como
103 sustrato. La reacción consistió en la mezcla de 100 uL de sobrenadante y 100 uL de solución de sustrato
104 (Solución de celulosa microcristalina AVICEL® disuelta en buffer fosfato 0.5M, pH 5.5). Se incubó a
105 55°C durante 2 horas. Las concentraciones de celobiosa se determinaron mediante el método DNS
106 midiendo la absorbancia a 540nm. Una unidad de actividad exoglucanasa se definió como la formación
107 de 1 μ mol de celobiosa por minuto.

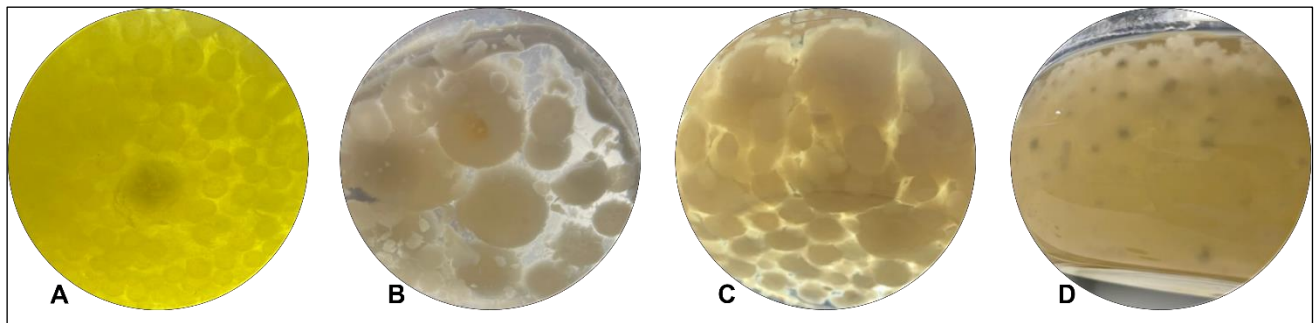
108 Por último, para la cuantificación de proteínas se implementó el kit de ensayos Pierce™ BCA. La
109 reacción consistió en la mezcla de 25 uL de sobrenadante y 200 uL de agente reaccionante del kit (50:1
110 reactivos A:B). Se incubó a 37 °C por 30 minutos. Las concentraciones de proteínas se determinaron
111 midiendo la absorbancia a 562 nm. (Smith et al., 1985).

112 **3 Resultados**

113 **3.1 Desarrollo de Fermentación**

114 Los hongos evidenciaron crecimiento de biomasa bajo las condiciones de operación suministradas
115 (**Figura 1**). Las morfologías de los micelios durante el crecimiento de las cepas presentan una
116 formación como agregados esféricos aislados o pellets, siendo estos más pequeños y cuantiosos para
117 *T. reesei* y *T. lentiforme*, mientras que para las cepas de *Phlebia sp.* y *Xylaria sp.* se evidencia un

118 crecimiento heterogéneo de pellets de un mayor tamaño. En cuanto a la velocidad de crecimiento, el
119 microorganismo de referencia, *T. reesei*, mostró un proceso acelerado respecto a las cepas nativas, ya
120 que en esta fermentación se evidenció la formación de pellets en menor tiempo y un cambio en la
121 coloración del medio, donde los primeros días tomó el color verde de las esporas y posteriormente
122 adquirió un intenso color amarillo. Con respecto al crecimiento de las cepas nativas, este fue liderado
123 por *Trichoderma lentiforme*, del mismo género que la cepa de referencia y precedido por *Xylaria sp.* y
124 *Phlebia sp.* respectivamente.

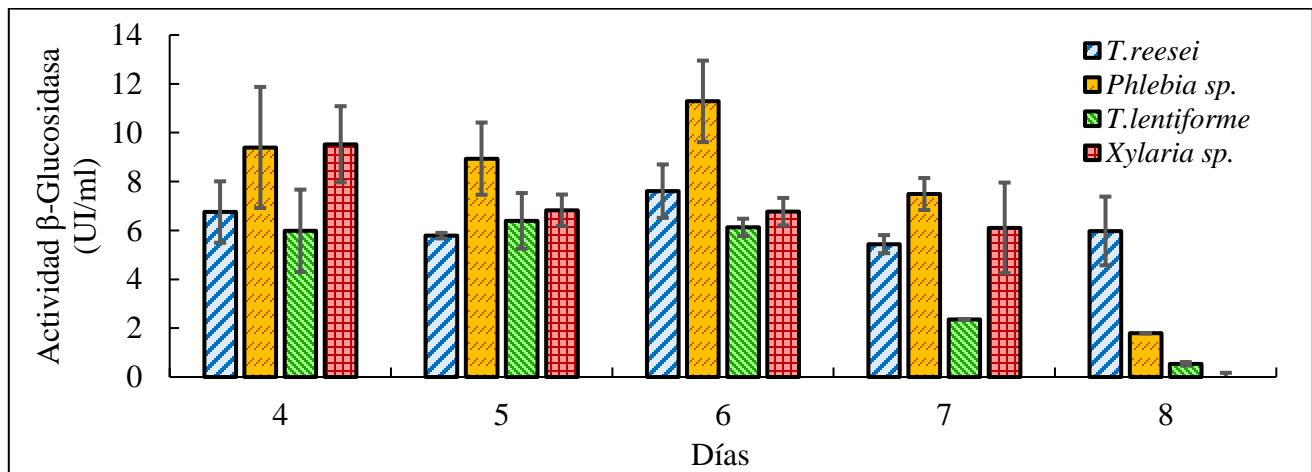


125
126 **Figura 1.** Formación de micelio finalizados los 8 días de cultivo. De izquierda a derecha: (A) *T. reesei*,
127 (B) *Phlebia sp.*, (C) *Xylaria sp.*, (D) *Trichoderma lentiforme*.

128 3.2 Actividades enzimáticas

129 3.2.1 Actividad β -glucosidasa

130 Los resultados de la actividad β -glucosidasa obtenidos a lo largo del tiempo se muestran en la **Figura**
131 **2.**

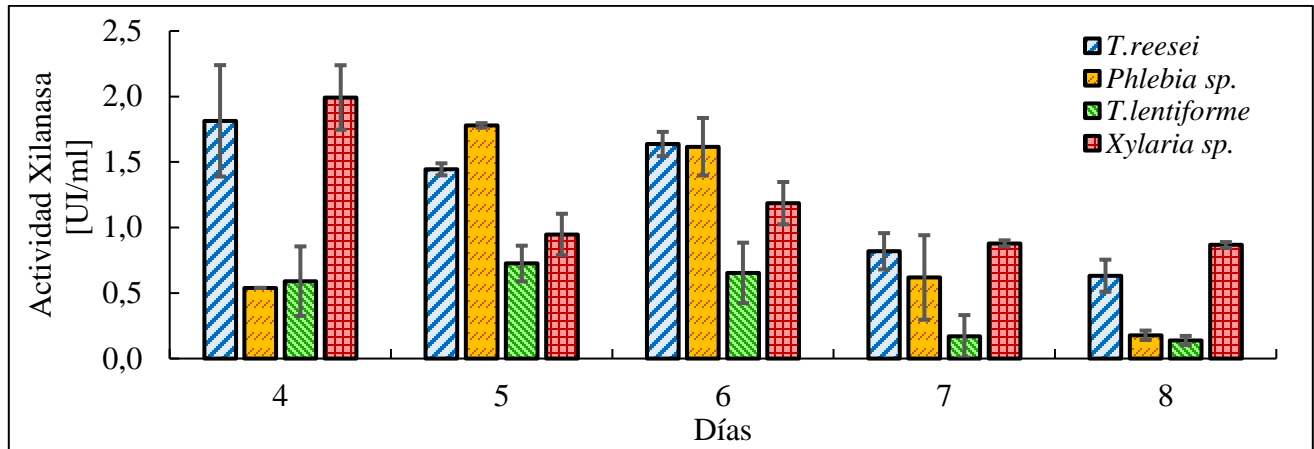


132
133 **Figura 2.** Evolución temporal de actividad β -glucosidasa de las cepas fúngicas. Las barras de error
134 corresponden al valor de desviación estándar (n=2).

135 Se evidencian valores de las cepas nativas, *Phlebia sp.* y *Xylaria sp.*, mayores a la cepa de referencia
136 en la mayoría de los días, alcanzado valores máximos de $11,28 \pm 1,67$ UI/ml y $9,53 \pm 1,56$ UI/ml
137 respectivamente.

138 **3.2.2 Actividad Xilanasa**

139 Los resultados de la actividad xilanasa obtenidos a lo largo del tiempo se muestran en la **Figura 3**.



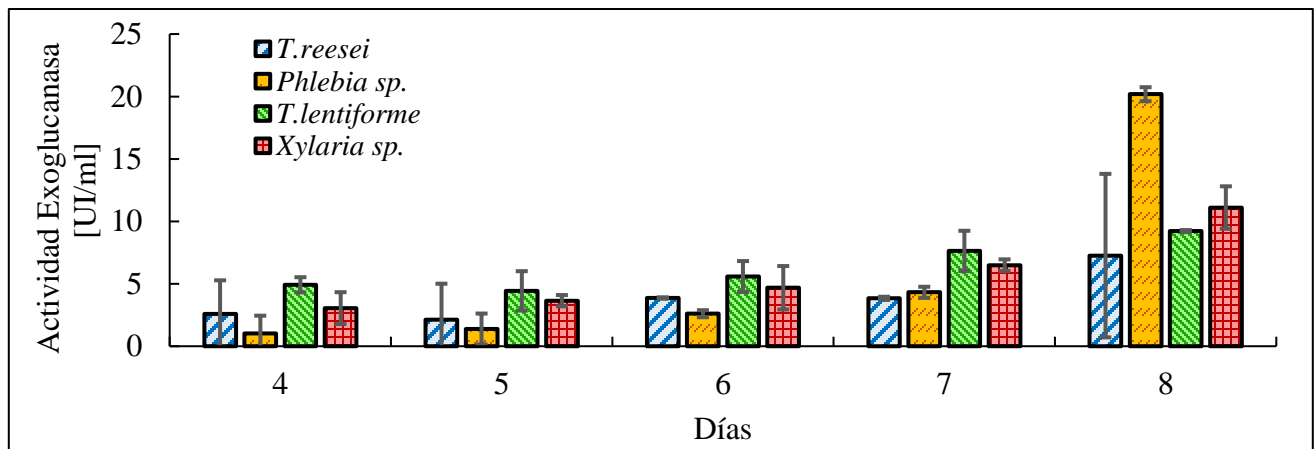
140

141 **Figura 3.** Evolución temporal de actividad xilanasa de las cepas fúngicas. Las barras de error
142 corresponden al valor de desviación estándar (n=2).

143 Para la actividad xilanasa los valores reportados por *Xylaria sp.*, son mayores a la cepa de referencia
144 en la mayoría de los días, alcanzado valores máximos de $1,99 \pm 0,25$ UI/ml. Por otro lado, *Phlebia sp.*
145 presentó una actividad más alta que *Trichoderma reesei* en el quinto día de cultivo alcanzando $1,78 \pm$
146 $0,02$ UI/ml.

147 **3.2.3 Actividad Exoglucanasa**

148 Los resultados de la actividad exoglucanasa obtenidos a lo largo del tiempo se muestran en la **Figura**
149 **4**.



150

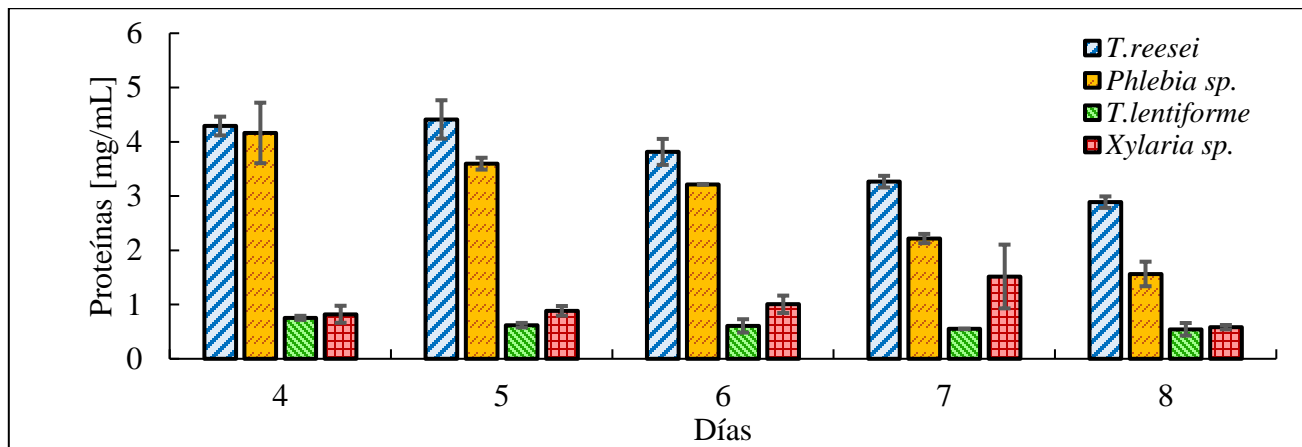
151 **Figura 4.** Evolución temporal de actividad exoglucanasa de las cepas fúngicas. Las barras de error
152 corresponden al valor de desviación estándar (n=2).

153 La cepa con la actividad exoglucanasa más alta reportada fue *Phlebia sp* en el último día de cultivo
154 con un valor de $20,61 \pm 6,55$ UI/ml. Sin embargo, la que predominó durante la mayoría de los días de

155 cultivo fue *Trichoderma lentiforme*, alcanzando su actividad más alta en el octavo día con $9,22 \pm 0,08$
156 UI/ml.

157 3.3 Cuantificación de proteínas

158 Los resultados de la cuantificación de proteínas mediante el método BCA obtenidos a lo largo del
159 tiempo se muestran en **Figura 5**.



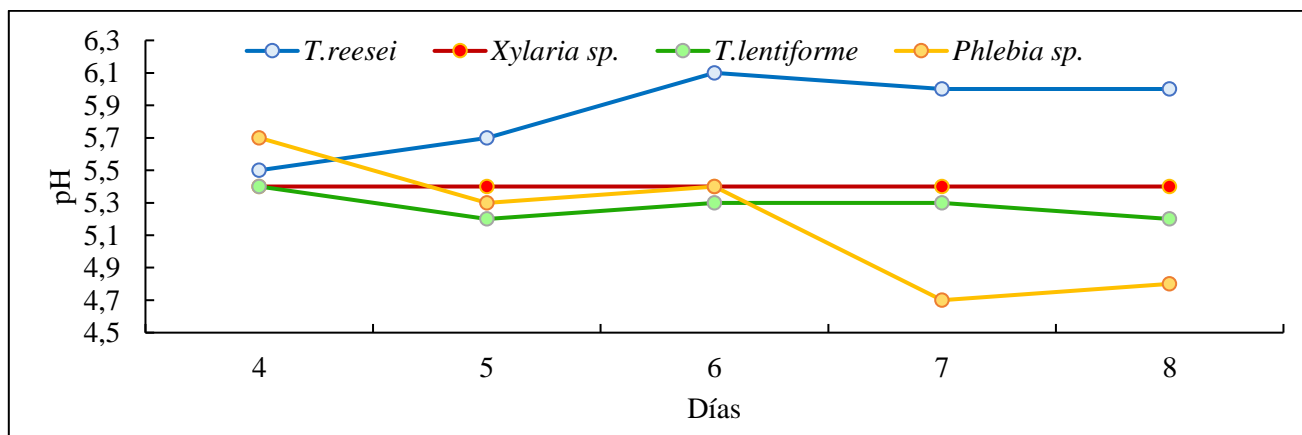
160

161 **Figura 5.** Evolución temporal de la cuantificación de proteínas de las cuatro cepas. Las barras de error
162 corresponden al valor de desviación estándar (n=2).

163 Se evidencia un decrecimiento en la cantidad de proteínas cuantificadas con el paso del tiempo. En esta
164 ocasión la cepa de referencia es la que presenta las concentraciones de proteínas más altas durante
165 todos los días del cultivo, siendo $4,41 \pm 0,35$ mg/ml el valor más alto reportado durante el quinto día.

166 3.4 Perfil de valores de pH del medio de cultivo de las fermentaciones

167 La variación del pH a lo largo del tiempo de cultivo se presenta en la **Figura 6**.



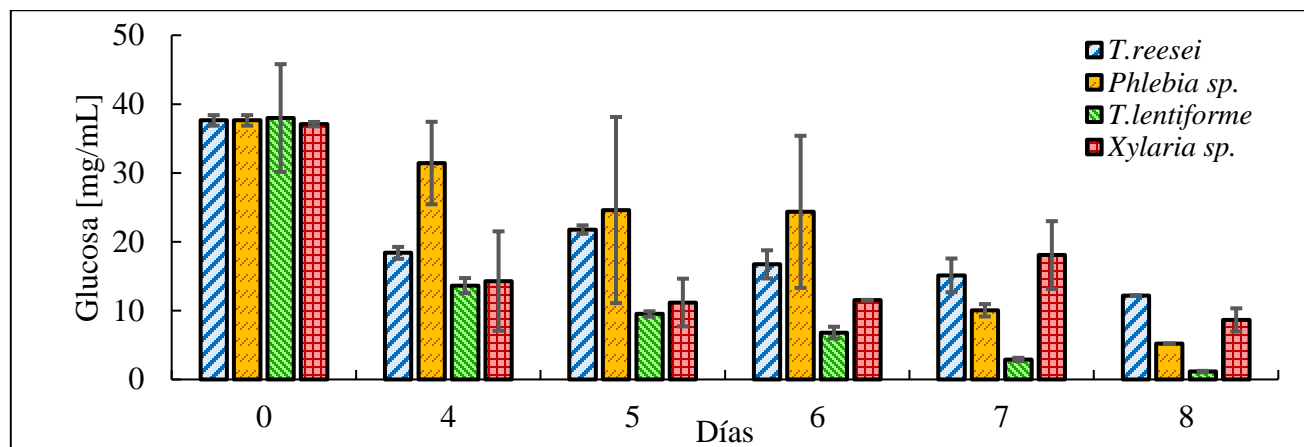
168

169 **Figura 6.** Perfil de pH en los medios de cultivo de las cepas fúngicas. Las barras de error corresponden
170 al valor de desviación estándar (n=2).

171 Se puede apreciar que para los casos de los hongos nativos *Xylaria sp.* y *T. lentiforme* no hay cambios
172 significativos en el pH, en comparación con la cepa de referencia *T. reesei* y *Phlebia sp.* que
173 presentaron variaciones de 0.6 y 1.0 grados en la escala de pH respectivamente.

174 3.5 Concentración de glucosa

175 El perfil de la concentración de glucosa de los cultivos se presenta en la **Figura 7**.



176

177 **Figura 7.** Perfil de concentración de glucosa. Las barras de error corresponden al valor de desviación
178 estándar (n=2).

179 Se observa con el pasar de los días una disminución en la concentración de glucosa para las cuatro
180 cepas evaluadas. Indicando un consumo de azúcares por parte de los microorganismos para la
181 formación de biomasa y producción de metabolitos. Además, se puede apreciar que *T. lentiforme*
182 presentó el mayor consumo de azúcar agotando el 97.0% de glucosa disponible, a diferencia de *T.*
183 *reesei*, *Phlebia sp.* y *Xylaria sp.* que agotaron el 35.1%, 86.2% y 76.7% respectivamente.

184 4 Discusión

185 Para la actividad β -glucosidasa se identifica que la cepa de *Phlebia sp.* alcanza la mayor actividad
186 celulolítica dentro de las cepas evaluadas (**Figura 2**). Esta alta capacidad celulolítica se pudo dar por
187 la presencia de múltiples genes codificadores de enzimas como celobiohidrolasas, endoglucanasas y β -
188 glucosidasas. Ya que, dentro del género *Phlebia*, se han encontrado al menos dos genes que codifican
189 β -glucosidasas de la familia GH1 y, además, se han identificado siete o más genes que codifican β -
190 glucosidasa de la familia GH3 (Mäkinen et al., 2019). La mayoría de las GH3 β -glucosidasas son
191 fuertemente inhibidas por bajas concentraciones de glucosa, mientras que las β -glucosidasas
192 pertenecientes a la familia GH1 son tolerantes a la glucosa (Salgado et al., 2018), de este modo, es
193 justificable que la actividad β -glucosidasa sea mayor durante los primeros días de la fermentación,
194 debido a que la concentración de glucosa era mayor a 20 g/L hasta el sexto día.

195 A su vez, en el cuarto día *Xylaria sp.* mostró una actividad β -glucosidasa similar a *Phlebia sp.* (**Figura**
196 **2**), sin embargo, el macrohongo presentó un consumo de azúcar tres veces mayor al del endófito
197 (**Figura 7**), indicando que hubo un gran consumo de azúcares durante los primeros días de
198 fermentación, por ende, es posible que por inhibición de sustrato, la producción y actividad β -
199 glucosidasa no se haya alcanzado a ver en su máxima expresión. De forma similar, esta tendencia se

200 presenta con *T. lentiforme*, a pesar de que en este caso la actividad β -glucosidasa exhibida es menor en
201 comparación con las demás cepas nativas evaluadas, obtuvo resultados semejantes a los obtenidos por
202 *T. reesei* durante los días cuatro a seis, lo que puede indicar que los hongos del género *Trichoderma*
203 comparten algunos genes codificadores de β -glucosidasas (Kubicek and Penttila, 1998), ya que se ha
204 encontrado en investigaciones anteriores que los hongos de este género producen al menos dos tipos
205 de dichas enzimas que pueden facilitar las hidrólisis de celobiosa (Lynd et al., 2002). Sin embargo, una
206 gran parte de estas enzimas permanece unida a la pared celular (Messner et al., 1990; Usami et al.,
207 1990), lo cual puede interferir con una adecuada toma de la muestra y correcta medición de la actividad
208 β -glucosidasa para estos microorganismos. Por consiguiente, resulta interesante solucionar este
209 problema al implementar diferentes formas de cultivo, como también se podría modificar la técnica de
210 muestreo para garantizar la correcta obtención de las β -glucosidasas.

211 Por otra parte, *Xylaria sp.* fue la cepa que demostró mayor actividad xilanasa, seguida de *T. reesei*,
212 *Phlebia sp.* y *T. lentiforme* respectivamente (**Figura 3**). En el caso de *Xylaria sp.* su actividad xilanasa
213 fue similar a la obtenida por (Wei and Lin, 1996; Adnan Mohd, 2018), donde también se hizo uso de
214 xilano Birchwood como inductor. En cuanto a la producción de estas enzimas por parte de *Phlebia sp.*
215 se aprecia una alta actividad enzimática entre el quinto y sexto día de fermentación. Para cepas del
216 género *Phlebia* y *Trichoderma* se han identificado xilanasas de las familias GH10 y GH11 (Mäkinen
217 et al., 2019), las cuales pueden realizar un trabajo sinérgico en la degradación de xilano cuando la
218 reacción ocurre cerca de celulosa microcristalina (Zhang et al., 2021). A pesar de lo anterior, *T.*
219 *lentiforme* exhibió una actividad reducida en comparación con las demás cepas evaluadas, aunque
220 siguió su mismo comportamiento. No obstante, este hecho puede verse correlacionado negativamente
221 con la producción de exoglucanasas (**Figura 3 y 4**).

222 En cuanto a las variaciones de pH en el medio, la **Figura 6** evidenció que durante el crecimiento de
223 *Xylaria sp.* y *T. lentiforme*, no hubo un intercambio significativo de hidrogeniones que haya podido
224 verse reflejado en la medición de pH en el medio. Mientras tanto, para la cepa de referencia
225 *Trichoderma reesei*, se tiene conocimiento que las condiciones de pH en el medio influyen
226 directamente en la producción de celulasas y xilanasas (J. S. Knapp and M. Legg, 1986), por un lado,
227 a pH más bajos se ha reportado una expresión mayor de celulasas, lo que explica los valores de
228 actividad β -glucosidasa más altos obtenidos por esta cepa en los primeros días de cultivo (**Figura 2**),
229 mismos días en los que contaba con su valor de pH más bajo (Häkkinen et al., 2015), por el otro lado,
230 a pH más altos se ha reportado una mejor producción de xilanasas (Bailey et al., 1993), sin embargo,
231 aunque en la **Figura 2** no se ve reflejada la más alta actividad cuando se presentó el valor de pH más
232 alta, esto puede ser debido a que durante estos últimos días se evidenció una disminución considerable
233 de la fuente de carbono en el medio de cultivo (**Figura 7**). También podría atribuirse, las bajas
234 actividades alcanzadas, a la represión catabólica de la fuente de carbono mediada por el gen CRE1, el
235 cual es un mecanismo que suele adoptar *Trichoderma reesei* para adaptarse a nuevos ambientes y que
236 en presencia de compuestos de carbono ya disponibles opta por inhibir la producción de los complejos
237 enzimáticos celulolíticos para ahorrar energía (Cristina Campos Antoniêto et al., 2017).

238 En lo que respecta a la cepa nativa *Phlebia sp.*, el pH del medio presentó un comportamiento opuesto
239 al de la cepa de referencia (**Figura 6**), ya que ésta en el transcurso de los días de cultivo tendió a
240 acidificar el medio. Al ser una cepa que se encuentra bajo un proceso de bioprospección no se cuenta
241 con la información necesaria para explicar este fenómeno, sin embargo, en otros estudios donde se han
242 evaluado cepas del mismo género, como la investigación de (Niku-Paavola et al., 1988), se demostró
243 que las enzimas celulolíticas del hongo de podredumbre blanca *Phlebia radiata*, muestran su actividad
244 óptima a un pH entre 3 – 4.5. Esto puede relacionarse al analizar la **Figura 4**, donde se muestra que en

245 lo que respecta *Phlebia sp* ésta presentó la actividad más alta de exoglucanasa en el octavo día, mismo
246 día en que se encontraba en su rango de pH más bajo.

247 Continuando con la actividad exoglucanasa, se puede resaltar que, las cepas nativas cuentan con el
248 potencial celulolítico esperado, en esta ocasión *Trichoderma lentiforme* presentó una actividad más
249 alta predominante que la cepa de su mismo género, *Trichoderma reesei* (**Figura 4**). La actividad más
250 alta alcanzada por *T. lentiforme* obtenida en el octavo día, no solo va acorde con lo reportado en
251 estudios previos, como el de (Botina et al., 2021), sino que además reafirma la capacidad de las especies
252 de *Trichoderma* para producir enzimas celulolíticas (Strakowska et al., 2014). En cuanto a *Phlebia sp*
253 y *Xylaria sp*, presentaron su actividad más alta en el último día de muestreo, indicando que dichas
254 cepas presentan una menor productividad de síntesis de estas enzimas.

255 Además, puede evidenciarse al comparar las **Figuras 2 y 4** una correlación negativa en cuanto a la
256 actividad β -glucosidasa y exoglucanasa de las cepas, esto puede ser debido a un efecto por inhibición
257 de producto, debido a que en la preparación del medio de cultivo se agregó celobiosa como inductor
258 para la actividad β -glucosidasa, que a pesar de que induce la formación de estas enzimas capaces de
259 degradarla, inhibe a su vez la formación de exoglucanasas, las cuales se encargan de convertir la
260 celulosa en más celobiosa y estudios previos indican, que al menos, en lo que respecta a *T. reesei*, la
261 acumulación de celobiosa es un potente inhibidor para las celobiohidrolasas (Jourdiar et al., 2013).

262 Por último, en la **Figura 5** se evidencia la formación de proteínas en todas las cepas evaluadas, al
263 comparar la formación de estas con el consumo de glucosa (**Figura 6**) se puede ver que sostienen una
264 correlación positiva, es decir que a medida que el sustrato se va agotando, también decrece la
265 concentración de proteínas en el medio. Esto puede indicar que en las cuatro fermentaciones hay un
266 consumo de dichas proteínas por parte de los microorganismos, posiblemente para aprovecharlas como
267 una fuente alternativa de carbono o nitrógeno.

268 **5 Conclusiones**

269 Los resultados reportados en este artículo confirman el potencial celulolítico con el que cuentan los
270 hongos nativos colombianos, pues estos fueron capaces de alcanzar y sobrepasar la actividad β -
271 glucosidasa, xilanasas y exoglucanasa que obtuvo el hongo de referencia, *Trichoderma reesei*, el cual
272 se conoce que cuenta con buenas capacidades celulolíticas y hemicelulolíticas. Por un lado, *Phlebia*
273 *sp.* presentó un gran potencial celulolítico, pues reportó las más altas actividades de β - glucosidasa y
274 exoglucanasa. Esta misma cepa, junto con *Xylaria sp.* presentaron gran potencial hemicelulolítico, al
275 reportar las más altas actividades de xilanasas.

276 Por lo tanto, este artículo incita al desarrollo de nuevas investigaciones donde se busque optimizar la
277 producción de enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas a partir de estas cepas nativas para la
278 degradación de material lignocelulósico.

279 **6 Agradecimientos**

280 Agradecemos a las asistentes de laboratorio de Ingeniería Bioquímica. A Anna I. Castellanos por su
281 valiosa asistencia en la práctica experimental. A Cristian Vargas por su generosa ayuda y consejos. Y
282 por último a nuestros familiares y amigos por su motivación y aliento.

283 **7 Bibliografía**

- 284 Adnan Mohd (2018). Xylanase Production By *Xylaria Primorskensis* In Static And Submerged
285 Fermentation Conditions. *Paripex - Indian Journal Of Research* 7.
- 286 Bailey, M. J., Buchert, J., and Viikari, L. (1993). Effect of pH on production of xylanase by
287 *Trichoderma reesei* on xylan- and cellulose-based media. *Applied Microbiology and*
288 *Biotechnology* 40, 224–229. doi: 10.1007/BF00170371.
- 289 Botina, D., Vargas, C., Caicedo, N., and Alvarez, C. (2021a). Potencial celulolítico de hongos
290 endófitos nativos del valle del Cauca: Una comparación de su actividad Exoglucanasa, B-
291 glucosidasa y xilanasa frente a la homóloga por *Trichoderma reesei*.
- 292 Botina, D., Vargas, C., Caicedo, N., and Alvarez, C. (2021b). Potencial celulolítico de hongos
293 endófitos nativos del valle del Cauca: Una comparación de su actividad Exoglucanasa, B-
294 glucosidasa y xilanasa frente a la homóloga por *Trichoderma reesei*.
- 295 Caicedo Ortega, N. H., Chaves, A., Grandezz, D., Medina, A., Correa, J., Castellanos, A. I., et al.
296 (2022). Evaluation of Lignocellulolytic Enzymatic Activities of Endophytic Fungi, Isolated
297 from *Otoba Gracilipes* Using a Systematic Multilevel Screening Test. *SSRN Electronic Journal*.
298 doi: 10.2139/SSRN.4022909.
- 299 Chahal, D. S. (1985). Solid-State Fermentation with *Trichoderma reesei* for Cellulase Production.
300 *Applied and Environmental Microbiology* 49, 205. doi: 10.1128/AEM.49.1.205-210.1985.
- 301 Cristina Campos Antoniêto, A., Graciano de Paula, R., dos Santos Castro, L., Silva-Rocha, R., Felix
302 Persinoti, G., and Nascimento Silva, R. (2017). Send Orders for Reprints to
303 reprints@benthamscience.ae *Trichoderma reesei* CRE1-mediated Carbon Catabolite Repression
304 in Re-sponse to Sophorose Through RNA Sequencing Analysis.
- 305 Häkkinen, M., Sivasiddharthan, D., Aro, N., Saloheimo, M., and Pakula, T. M. (2015). The effects of
306 extracellular pH and of the transcriptional regulator PACI on the transcriptome of *Trichoderma*
307 *reesei*. *Microbial Cell Factories* 14, 1–15. doi: 10.1186/S12934-015-0247-Z/FIGURES/5.
- 308 Hawksworth, D. L., and Lücking, R. (2017). Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species.
309 *Microbiology spectrum* 5. doi: 10.1128/MICROBIOLSPEC.FUNK-0052-2016.
- 310 J. S. Knapp, and M. Legg (1986). The effect of different cellulosic growth substrates and pH on the
311 production of cellulolytic enzymes by *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology*.
- 312 Jourdir, E., Cohen, C., Poughon, L., Larroche, C., Monot, F., and Chaabane, F. ben (2013).
313 Cellulase activity mapping of *Trichoderma reesei* cultivated in sugar mixtures under fed-batch
314 conditions. doi: 10.1186/1754-6834-6-79.
- 315 Kubicek, C., and Penttila, M. (1998). “Regulation of production of plant polysaccharide degrading
316 enzymes by *Trichoderma*,” in *Trichoderma And Gliocladium*, eds. G. E. Harman and C. P.
317 Kubicek, 49–72. doi: 10.2/JQUERY.MIN.JS.
- 318 Lynd, L., PJ, W., WH, van Z., and IS, P. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and
319 biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 66, 506–577. doi:
320 10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002.

Selección de cepas fúngicas nativas del Valle del
Cauca productoras de enzimas con alta actividad celulolítica y hemicelulolítica comparadas con
Trichoderma reesei

- 321 Mäkinen, M., Kuuskeri, J., Laine, P., Smolander, O. P., Kovalchuk, A., Zeng, Z., et al. (2019).
322 Genome description of *Phlebia radiata* 79 with comparative genomics analysis on lignocellulose
323 decomposition machinery of phlebioid fungi. *BMC Genomics* 20, 1–22. doi: 10.1186/S12864-
324 019-5817-8/FIGURES/5.
- 325 Mandels, M., and Weber, J. (1969). The Production of Cellulases. *Cellulases and Their Applications*,
326 391–414. doi: 10.1021/BA-1969-0095.CH023.
- 327 Messner, R., Hagspiel, K., and Kubicek, C. P. (1990). Isolation of a β -glucosidase binding and
328 activating polysaccharide from cell walls of *Trichoderma reesei*. *Archives of Microbiology* 1990
329 154:2 154, 150–155. doi: 10.1007/BF00423325.
- 330 MinAmbiente (2019). Colombia, el segundo país más biodiverso del mundo, celebra el Día Mundial
331 de la Biodiversidad. Available at: [https://www.minambiente.gov.co/index.php/noticias/4317-](https://www.minambiente.gov.co/index.php/noticias/4317-colombia-el-segundo-pais-mas-biodiverso-del-mundo-celebra-el-dia-mundial-de-la-biodiversidad)
332 [colombia-el-segundo-pais-mas-biodiverso-del-mundo-celebra-el-dia-mundial-de-la-](https://www.minambiente.gov.co/index.php/noticias/4317-colombia-el-segundo-pais-mas-biodiverso-del-mundo-celebra-el-dia-mundial-de-la-biodiversidad)
333 [biodiversidad](https://www.minambiente.gov.co/index.php/noticias/4317-colombia-el-segundo-pais-mas-biodiverso-del-mundo-celebra-el-dia-mundial-de-la-biodiversidad) [Accessed October 8, 2021].
- 334 Niku-Paavola, M.-L., Karhunen, E., Salola, P., and Rauniot, V. (1988). Ligninolytic enzymes of the
335 white-rot fungus *Phlebia radiata*.
- 336 Salgado, J. C. S., Meleiro, L. P., Carli, S., and Ward, R. J. (2018). Glucose tolerant and glucose
337 stimulated β -glucosidases – A review. *Bioresource Technology* 267, 704–713. doi:
338 10.1016/J.BIORTECH.2018.07.137.
- 339 Salgado Salazar, C., and Cepero de García, M. C. (2005). Aislamiento de hongos endofitos en rosa
340 (*Rosa hybrida*) en Bogotá, Colombia Aislamiento de hongos endofitos en rosa (*Rosa hybrida*) en
341 Bogotá, Colombia.
- 342 Sánchez Castelblanco, E. M., Heredia Martín, J. P., Buitrago Morales, S. M., and Medina Rodríguez,
343 J. P. (2020). Aislamiento e identificación de microorganismos potencialmente amilolíticos y
344 celulolíticos de suelos de humedales de Bogotá. *Revista Colombiana de Biotecnología*.
- 345 Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., et al.
346 (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry* 150, 76–85.
347 doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- 348 Strakowska, J., Błaszczyk, L., and Chełkowski, J. (2014). The significance of cellulolytic enzymes
349 produced by *Trichoderma* in opportunistic lifestyle of this fungus. *Journal of Basic*
350 *Microbiology* 54. doi: 10.1002/jobm.201300821.
- 351 Usami, S., Kirimura, K., Imura, M., and Morikawa, S. (1990). Cellular localization of the constitutive
352 β -glucosidase in *Trichoderma viride*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 70, 185–187.
353 doi: 10.1016/0922-338X(90)90183-W.
- 354 Wattanakitjanukul, N., Sukkasem, C., Chiersilp, B., and Boonsawang, P. (2020). Use of Palm Empty
355 Fruit Bunches for the Production of Ligninolytic Enzymes by *Xylaria* sp. in Solid State
356 Fermentation. *Waste and Biomass Valorization* 11, 3953–3964. doi: 10.1007/S12649-019-
357 00710-0/FIGURES/7.

Evaluación de cepas fúngicas nativas del Valle
del Cauca productoras de enzimas con alta actividad celulolítica y hemicelulolítica comparadas con
Trichoderma reesei

- 358 Wei, D.-L., and Lin, S.-Y. (1996). Xylanase and β -xylosidase production By *Xylaria* spp. *Fungal*
359 *Science* 11, 107–112.
- 360 Zhang, S., Zhao, S., Shang, W., Yan, Z., Wu, X., Li, Y., et al. (2021). Synergistic mechanism of
361 GH11 xylanases with different action modes from *Aspergillus niger* An76. *Biotechnology for*
362 *Biofuels* 14, 1–13. doi: 10.1186/S13068-021-01967-1/FIGURES/6.
- 363