

# **PROYECTO FINAL DE BIOTECNOLOGÍA**

## **ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PRODUCIDA POR *TRICHODERMA SPP.* SOBRE FIBRAS DE BRÁCTEAS DE MAÍZ PARA EL AISLAMIENTO DE BIOPOLÍMEROS Y COMPUESTOS ACTIVOS**

**Simmons, Nicole – LU: 1066190**

Licenciatura en Biotecnología

Tutora:

**Dra. Bernhardt, Dana C.**

**Universidad de Buenos Aires, ITAPROQ**

Co-Tutora:

**Dra. Bergottini, Verónica M.**

**Universidad Argentina de la Empresa, INTEC**

**07/12/2022**

# **UADE**

**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA**

**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, principalmente a mis padres y hermano, quienes me apoyaron y me dieron su cariño eterno desde que comencé este camino, siempre me alentaron a seguir y nunca me dejaron sola. También a Hernán, quién es parte de mi familia y mi sostén incondicional hace ya tantos años, sin su incansable apoyo durante tantos días y noches nunca hubiera podido hoy estar escribiendo esto. Gracias.

A mis amigos del trabajo y de la facultad, en especial a Constanza y Vanina porque durante toda esta etapa me escucharon, aconsejaron y soportaron desde el más sincero lugar, tenerlas como amigas significa mucho para mí.

A la Dra. Dana Bernhardt, por ser más que mi tutora, con su vocación por la investigación me hizo acercarme a un mundo completamente desconocido. Se comprometió con este proyecto inclusive a la distancia, con diferencia de horario y distintas responsabilidades. Quiero agradecerle por apoyarme, enseñarme y también por comprenderme, fue un camino largo, pero que afortunadamente dio sus frutos y en parte es gracias a ella.

A los técnicos de UADE Labs, principalmente Carla y Pablo, quienes me dieron su apoyo durante todos los ensayos, a veces demasiado tarde los viernes estuvieron apoyándome y ayudándome en todo lo que pudieron. Esta tesina también es parte de ustedes, gracias.

## RESUMEN

La acumulación de residuos lignocelulósicos generados por la actividad productiva sin fines industriales provoca un impacto negativo para la economía y el medio ambiente. El rastrojo proveniente de la planta de maíz, específicamente sus brácteas, presentan compuestos poliméricos como celulosa, con gran importancia económica por su potencial aplicación dentro de la industria.

Con el objetivo de evaluar la actividad de las enzimas secretadas por el hongo filamentoso *Trichoderma harzianum*, el cual presenta un sistema enzimático completo posible de degradar en su totalidad o de forma parcial la celulosa, se emplearon como principal fuente de carbono fibras extraídas de las brácteas de maíz (*Zea mays*) PB, RIA y Cel-KOH. Este tipo de microorganismo favorece el rendimiento de la extracción de los principales biopolímeros y compuestos antioxidantes contenidos en dichas fibras.

Durante la realización del proyecto se fijaron las condiciones de incubación del microorganismo que permitiesen la mayor producción de esporas, considerando distintas variables en estudio como condiciones de iluminación, medios de cultivo, consistencia de los medios y concentración de fracción de fibra vegetal. Finalmente, a fin de comparar el uso de otro sustrato, se emplearon fibras de celulosa de origen bacteriano, incubándolas junto con el moho bajo las mismas condiciones definidas como óptimas para las fibras vegetales.

Los resultados obtenidos demostraron la potencialidad de emplear fracciones de fibra vegetal en su menor concentración estudiada (1,5% p/p), con un tiempo de incubación de 4 días, bajo luz artificial y con un medio de cultivo específico en su consistencia tipo caldo como Czapek, para promover la actividad celulolítica del microorganismo frente a condiciones controladas. Por otro lado, la aplicación de una fibra de celulosa de origen bacteriano resultaría con/EN un menor rendimiento frente a las mismas condiciones y parámetros propuestos.

*Palabras clave: residuos lignocelulósicos, brácteas, celulosa, enzimas.*

## ABSTRACT

### **Study of enzymatic activity produced by *Trichoderma harzianum* on maize fibers for isolation of biopolymers and active compounds**

Lignocellulosic waste stack generated by production activities without industrial objectives causes a negative impact on the economy and the environment. The stubble from maize plant, specifically its husks, present polymeric compounds such as cellulose, of vital economic importance due to the potential application within the industry.

In order to evaluate the activity of the enzymes secreted by the filamentous fungus *Trichoderma harzianum*, which presents an enzymatic system capable of a complete or partial cellulose degradation, vegetable fibers from maize husks (*Zea Mays*) HP, AIR and Cel-KOH have been used. This kind of microorganisms benefits the extraction of main biopolymers and antioxidant compounds contained in these fibers.

While the project was underway, the incubation conditions of microorganism that allowed the highest production of spores were reviewed, considering different variables under study such as the lighting conditions, culture medium, its consistency, and the concentration of parts of vegetable fibers. Finally, in order to compare the uses of a different substrate, cellulose fibers from bacteria were applied, inoculating them with the fungus under the same already defined conditions as optimal for the vegetable fibers.

The results obtained have shown the potential of using vegetable fibers in their lowest concentration (1,5% w/w), with an incubation time of 4 days, artificial lighting, and a specific culture medium in a consistency liquid as Czapek, to foster the cellulolytic activity of the microorganism under controlled conditions. On the other hand, the uses of a bacterial fiber would result in a poorer performance compared to same conditions and proposed parameters for vegetables fibers.

*Key words: lignocellulosic waste, maize husks, cellulose, enzymes*

## CONTENIDOS

1.	Introducción .....	9
1.1.	Residuos agroindustriales .....	9
1.2.	Maíz ( <i>Zea Mays</i> ) como desecho agroindustrial .....	10
1.2.1.	Problemática ambiental del residuo generado durante el cultivo de maíz.....	13
1.3.	Composición química general de las brácteas de maíz.....	14
1.3.1.	Biopolímeros presentes en las brácteas de maíz.....	15
1.3.1.1.	Celulosa.....	16
1.3.1.2.	Hemicelulosa.....	16
1.3.1.3.	Lignina .....	17
1.4.	Otras fuentes de celulosa no-vegetal.....	17
1.4.1.	Potenciales aplicaciones de la celulosa bacteriana en las industrias.....	19
1.4.2.	Obtención de celulosa bacteriana (CB): subproducto de la elaboración de Kombucha .....	19
1.4.2.1.	Producción de Kombucha en el mundo.....	20
1.5.	Enzimas celulasas .....	20
1.5.1.	Mercado mundial de enzimas .....	21
1.6.	Hidrólisis enzimáticas mediante microorganismos.....	22
1.6.1.	<i>Trichoderma spp.</i> : características y aplicaciones en la industria.....	23
2.	Antecedentes .....	26
3.	Objetivos .....	29
3.1.	Objetivos específicos .....	29
4.	Hipótesis .....	31
5.	Metodología de desarrollo.....	32
5.1.	Lugar de realización del proyecto.....	32
5.2.	Materiales y métodos.....	32
5.2.1.	Generalidades.....	32
5.2.2.	Recolección y acondicionamiento de las brácteas de maíz .....	33
5.2.3.	Obtención del residuo insoluble en alcohol (RIA) de las brácteas .....	33
5.2.4.	Preparación de las fibras enriquecidas en celulosa por tratamiento alcalino (Cel-KOH).....	34
5.2.5.	Esterilización de las fibras.....	34
5.2.6.	Cepas de <i>Trichoderma</i> y medios de cultivo empleados .....	34
5.2.6.1.	Preparación de los medios de cultivo con fracciones de fibras .....	37
5.2.7.	Stock de la cepa joven, estudio de viabilidad y recuento de esporas.....	37
5.2.7.1.	Producción de cultivos jóvenes esporulantes de <i>T. harzianum</i> .....	37
5.2.7.2.	Estudio de la viabilidad de las esporas extraídas y almacenadas.....	38
5.2.7.3.	Recuento de esporas en cámara de Neubauer.....	39
5.2.8.	Inoculación de <i>Trichoderma harzianum</i> en los medios seleccionados.....	40

5.2.8.1.	Determinación de cantidad de esporas en los medios de cultivo con fracciones de fibras .....	40
5.2.9.	Empleo de una fracción de fibra de origen bacteriano como sustrato para el desarrollo de <i>Trichoderma harzianum</i> .....	41
5.2.9.1.	Producción de la Kombucha.....	41
5.2.9.2.	Purificación de hidrogel .....	41
5.2.9.3.	Inoculación de las fibras de celulosa bacteriana con el mohó .....	42
5.2.10.	Evaluación de la acción enzimática de <i>T. harzianum</i> .....	42
5.2.10.1.	Estudio cualitativo de la actividad celulolítica.....	43
5.2.10.2.	Evaluación cuantitativa de la acción enzimática.....	44
5.2.10.2.1.	Determinación del contenido de azúcares reductores .....	45
5.2.10.2.2.	Determinación de biomasa.....	46
5.2.11.	Etapas para definir las condiciones óptimas de crecimiento y mayor esporulación de <i>Trichoderma harzianum</i> .....	47
5.2.12.	Análisis estadístico de los resultados .....	50
6.	Resultados .....	51
6.1.	Fracciones de fibras vegetales y composición química .....	51
6.2.	Incubación del mohó en condiciones de iluminación vs. Oscuridad, en medios PDA y Czapek agar.....	53
6.2.1.	Inoculación en medio PDA y observación macroscópica .....	53
6.2.2.	Inoculación del mohó en medio Czapek agar, con adición de fibras vegetales (1,5% p/p).....	54
6.2.3.	Comprobación del desarrollo y recuento de esporas .....	59
6.3.	Desarrollo de <i>T. harzianum</i> en los medios Czapek vs. Vogel's.....	60
6.3.1.	Recuento de esporas producidas en los medios Czapek vs. Vogel's agar .....	62
6.3.2.	Evaluación de la acción enzimática de <i>T. harzianum</i> .....	65
6.4.	Evaluación de la consistencia del medio de cultivo y el tiempo de incubación.....	68
6.4.1.	Recuento de esporas producidas por el mohó incubado en los caldos Czapek y Vogel's .....	70
6.4.2.	Evaluación de la acción enzimática.....	72
6.4.2.1.	Determinación del contenido de azúcares reductores.....	72
6.4.2.2.	Determinación de biomasa .....	74
6.5.	Determinación de la concentración óptima de fibra vegetal .....	75
6.5.1.1.	Evaluación de la acción enzimática de <i>T. harzianum</i> utilizando mayor cantidad de fibras como sustrato .....	77
6.5.1.2.	Recuento de esporas producidas por <i>T. harzianum</i> al aumentar el contenido de fibras al 2% (p/p) ....	78
6.5.1.3.	Determinación del contenido de azúcares reductores.....	80
6.5.1.4.	Determinación de biomasa .....	82
6.6.	Comparación del efecto sobre la síntesis enzimática del hongo, empleado fibra bacteriana .....	82
6.6.1.	Producción de la Kombucha.....	82
6.6.2.	Purificación del hidrogel .....	83
6.6.3.	Recuento de esporas producidas a partir del empleo de la CB como sustrato.....	86
6.6.4.	Determinación del contenido de azúcares reductores en medios con fibra de CB .....	87

---

7. Discusión y conclusiones .....	87
8. Referencias bibliográficas .....	96
9. Anexos .....	113

## ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de la Varianza

AR: azúcares reductores

AX: arabinoxilanos

CAGR: Tasa de crecimiento anual compuesto

CB: Celulosa Bacteriana

Cc: concentración

CDC: Coeficiente de Degradación de Celulosa

Cel-KOH: residuo enriquecido en celulosa mediante tratamiento alcalino

GEI: Gases de Efecto Invernadero

GRAS: Generalmente reconocido como seguro

MS: materia seca

PAHs: hidrocarburos aromáticos policíclicos

PB: polvo de brácteas

PDA: Agar Papa Dextrosa

RIA: residuo insoluble en alcohol

SCOPY: *Symbiotic Colony of Bacteria and Yeast*

## 1. Introducción

En la actualidad la biotecnología industrial, y como consecuencia del incremento en el interés popular por el cuidado del medio ambiente, se orienta en desarrollar productos innovadores, optimización de procesos y actividades industriales de bajo impacto ambiental. Los productos obtenidos mediante esta tecnología pueden ser utilizados en distintas industrias como química, farmacéutica, alimentaria, textil, cosmética, entre otras (Llamas, 2010).

En la antigüedad, la producción de combustibles como energía de bajo costo dio sustento a la fase larga de crecimiento de la economía mundial durante la postguerra. En la década del '70, las industrias químicas se vieron afectadas en su productividad, lo que resultó en una potencial implementación de la biotecnología industrial para otorgar materias primas alternativas a productos derivados de, por ejemplo, el petróleo.

Al presente, el enfoque de la industria química se amplió con el objetivo de mejorar la productividad. En ese sentido, las empresas de biotecnología relacionadas a la salud humana pudieron aprovechar el desarrollo industrial para el desarrollo de tratamientos terapéuticos y producción de nuevas moléculas. Asimismo, el empleo de enzimas dio lugar a la innovación de procesos que utilizan materia prima biotecnológica para la transformación alimentaria, desarrollo de sustitutos plásticos, terapias génicas, alimentos funcionales y otras producciones industriales.

Dentro de las áreas de mayor desarrollo de la biotecnología industrial, se encuentra la utilización de recursos renovables y sistemas biológicos como células o enzimas que reemplacen los métodos convencionales no biológicos, principalmente desarrollados por la industria química. Análogamente, dentro de la industria alimentaria, las áreas de mayor desarrollo son las de producción de insumos funcionales basados en la utilización de microorganismos y probióticos (Gutman y Lavarello, 2014).

### 1.1. Residuos agroindustriales

La acumulación e incremento de los residuos agroindustriales generados por la actividad productiva que no presentan fines industriales, provocan un impacto negativo en el medio ambiente y en la economía (Jaramillo-Rodriguez, 2020). La reutilización de los residuos, teniendo en cuenta la disponibilidad local, podría minimizar el impacto ambiental y mejorar el

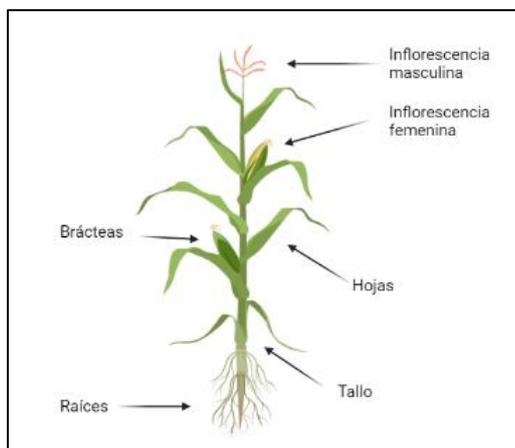
desarrollo sostenible. Esto conlleva a la importancia de la búsqueda de una alternativa para la recuperación de estos, la cual se incrementó en los últimos años permitiendo evaluar tecnologías como desarrollo de compostaje, biodigestión anaeróbica, valorización biológica y química, que permitiesen la generación, principalmente, de biocombustibles y aditivos alimenticios, gracias al aporte energético que brinda este tipo de biomasa (INTA Informa, 2014). La incorporación de este tipo de desechos dentro de los sistemas agrícolas podría generar beneficios de carácter sustentable y rentable para la industria y el ecosistema.

Los residuos agroindustriales de materia seca vegetal son conocidos como biomasa lignocelulósica. Esta biomasa es abundante en la naturaleza y presenta un contenido de materia orgánica constituido por celulosa, hemicelulosa y lignina, principales biopolímeros que forman parte de la pared celular de los vegetales (Ramos Sevilla, 2018). Estos desechos pueden aplicarse como aditivos o ingredientes funcionales en la industria de los alimentos, por su potencialidad como agentes de bajas calorías que pueden ser utilizados para mejorar, por ejemplo, la estabilidad oxidativa (Bernhardt *et al.*, 2019).

## 1.2. Maíz (*Zea Mays*) como desecho agroindustrial

El maíz (*Zea Mays*) forma parte de la familia de plantas herbáceas conocidas como gramíneas. Es una planta con inflorescencia monoica: masculina y femenina, donde la inflorescencia masculina, conocida como panoja, se ubica en la parte terminal de las hojas, responsables de producir polen. Mientras que la inflorescencia femenina, llamada *mazorca*, produce los óvulos que se convierten en las semillas, y se encuentra envuelta por un conjunto de brácteas u hojas.

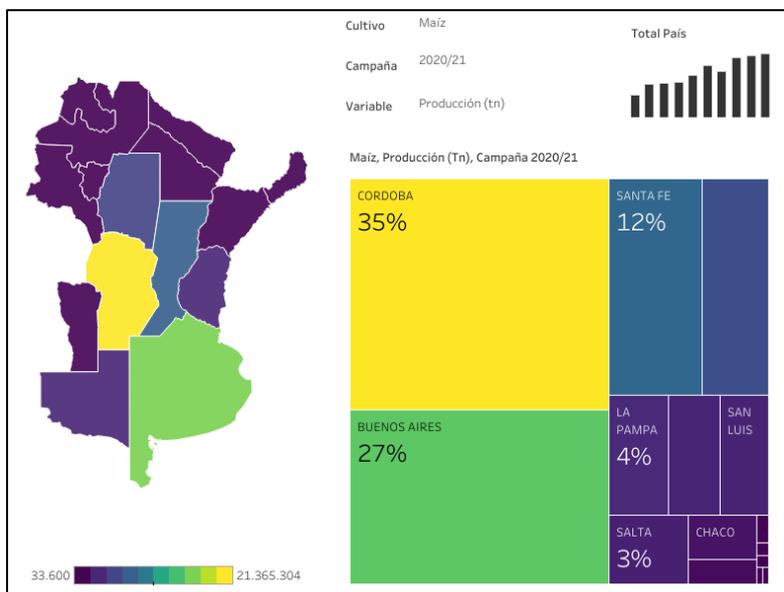
El maíz es una planta de cosecha anual caracterizada, principalmente, por tener tallos en forma de caña maciza con altura dependiente de la exposición al ambiente y aspectos genéticos. Presentan raíces que, supeditado a la etapa de desarrollo en la que se encuentre el vegetal, serán seminales, las cuales representan las primeras raíces en desarrollarse con la finalidad de absorber agua, o nodales o principales, las cuales cumplen un papel importante en el desarrollo final de la planta (Fig. 1) (Parera, 2017).



**Figura 1.** Estructura de la planta de maíz (*Zea Mays*).

En la Argentina, uno de los principales residuos agroindustriales en abundancia, también conocido como rastrojo, dado que quedan en el suelo después de la cosecha de los cultivos, es el proveniente de la planta de maíz. Esta planta originaria de Latinoamérica representa uno de los cereales con mayor volumen de producción mundial y simboliza el residuo agroindustrial del tipo lignocelulósico que más acumulación presenta en el campo luego de su cosecha. Según Carrasco *et al.*, (2018), la planta del maíz presenta un 50% de granos y el resto corresponde al rastrojo, el cual simboliza a las brácteas, cañas y mazorcas. Se estima que la cantidad producida de maíz por año viene acompañada de una cantidad similar de rastrojo (Sepúlveda *et al.*, 2018).

Durante la campaña de cultivo durante los años 2020 y 2021 se produjeron en Argentina alrededor de 60 millones de toneladas de maíz, superando ampliamente a la producción de soja. En la Fig. 2 se muestra el aporte de cada provincia productora de maíz para dicho período, siendo Córdoba y Buenos Aires las de mayor producción, principalmente relacionado al tamaño de la superficie disponible para el cultivo, utilización de agroquímicos que permiten mejorar la resistencia a enfermedades, la implementación de la siembra directa, entre otros aspectos a considerar (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2021).



**Figura 2.** Estimación agrícola en tablero de cultivo de maíz en la Argentina, campaña 2020-2021. Fuente: Argentina. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2021.

Principalmente y en el territorio de la Argentina, el maíz es industrializado en dos procesos: molienda húmeda y molienda seca. Lo que respecta a la molienda húmeda, es un proceso que comprende en una limpieza, maceración e incremento de la humedad en aproximadamente de un 15% al 45%. Tiene como objetivo final la obtención de almidón, germen, gluten feed y gluten meal, además, se puede adaptar lo obtenido para generar jarabe de glucosa y dextrosa. En contraparte, la molienda seca consiste principalmente en la reducción del tamaño del grano y posterior clasificación. A partir de este tipo de molienda se obtienen productos como cereales, harinas y sémolas (Franco, 2020).

En contra partida, el maíz se considera como una de las fuentes energéticas para la producción de bioetanol en auge de los últimos años (Storti, 2019). Debido a la cantidad de desechos que son depositados en el suelo y las características fisiológicas de este cultivo, se ha incursionado en el desarrollo de distintas aplicaciones para el aprovechamiento de estos.

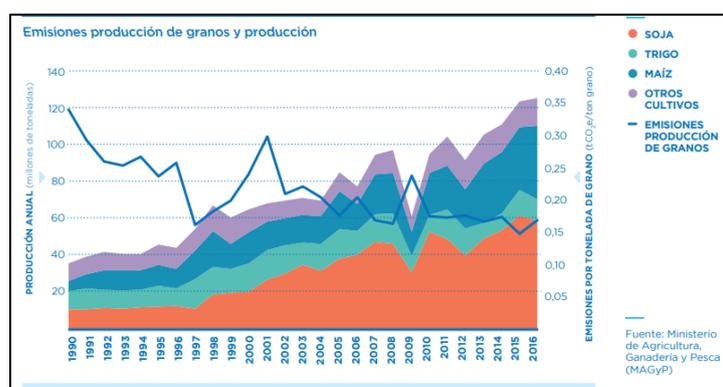
## 1.2.1. Problemática ambiental del residuo generado durante el cultivo de maíz

Actualmente, la técnica tradicional mayormente empleada para manejar los grandes volúmenes de rastrojos es la quema, si bien presenta algunas ventajas relacionadas al ser una técnica rápida que permite dejar al suelo disponible para tareas de labranzas y, adicionalmente, eliminar plagas y combatir enfermedades presentes en los cultivo, expone grandes desventajas dado que refiere uno de los factores contaminantes más importantes por su generación de volumen de gases y materiales particulados que afectan principalmente al medioambiente. La quema genera entre un 20-40% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), mientras que el resto corresponde a hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), material particulado y monóxido de carbono (CO), del total de gases emitidos (Kambis y Levine, 1996).

Asimismo, la quema de residuos de rastrojo de maíz, y como otros tipos de desechos agroindustriales, contribuyen notablemente en el aumento de la producción de Gases de Efecto Invernadero (GEI) el cual afecta la temperatura del planeta y modifica el clima generando sequías prolongadas y severas, aumento o disminución de precipitaciones, incremento de temperaturas, entre otros posibles eventos. El GEI según el *Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de Argentina* se define como un proceso natural donde los gases que están presentes en la atmósfera captan la radiación que la Tierra emite al espacio, producto del calentamiento de su superficie por la incidencia de la radiación solar. El cambio climático es una consecuencia directa del aumento de la concentración atmosférica de los GEI por encima de los niveles naturales. Como se mencionó anteriormente, la quema de combustibles fósiles, generación de residuos urbanos, la agricultura, ganadería y deforestación contribuyen a la proliferación de los GEI, causando el cambio climático (Moreira Muzio, 2020).

Frente a esta notable necesidad de reducir la cantidad de contaminantes que generan GEI, en la Argentina se tiene un inventario que contabiliza los gases emitidos y absorbidos de la atmósfera durante un periodo de tiempo y territorio determinado. Este inventario está dividido por sector, siendo el de nuestro interés por el foco del proyecto el de “agricultura, ganadería, silvicultura y otros usos de la tierra”. Dentro del sector se encuentra como subsector la agricultura, donde se detallan principalmente los residuos agroindustriales, incluyendo emisiones de óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), debido al alto contenido de nitrógeno que

presentan este tipo de desechos. Los residuos de cosecha representan el valor más alto de toneladas de dióxido de carbono equivalente (MtCO<sub>2</sub>e). Específicamente para los cultivos de grano, se puede visualizar en la Fig. 3. la cantidad de emisiones por toneladas de grano emitidas frente a la producción anual. Se aprecia que durante la década '90, existía una alta emisión, pero baja producción que se fue incrementando a lo largo de los años, generando una tendencia negativa para la emisión por tonelada de grano, y una tendencia positiva para la producción anual.



**Figura 3.** Emisiones de GEI por tonelada de grano y producción anual en el periodo del año 1990 al 2016. Fuente: Moreira Muzio, 2019 ; Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, 2019.

Los residuos agroindustriales además de generar un impacto negativo frente al ecosistema por su emisión de gases y afectar a la sociedad por su liberación de contaminantes potencialmente cancerígenos, perjudican notablemente las propiedades fisicoquímicas y biológicas del suelo, reduciendo la biomasa microbiana, contenido de materia orgánica y disminución de nutrientes y calidad (Sepúlveda *et al.*, 2018).

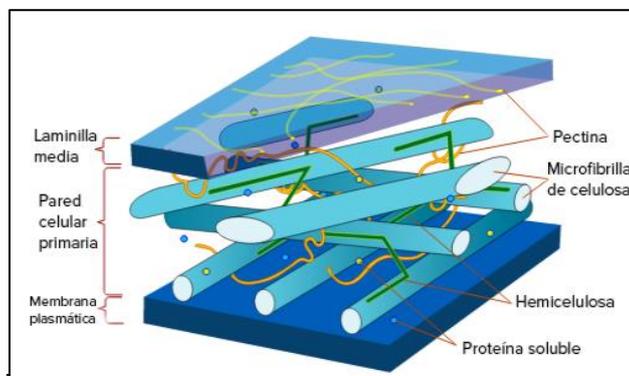
### 1.3. Composición química general de las brácteas de maíz

La materia vegetal extraída de la naturaleza y luego transformada en materiales, como plantas cultivadas, presentan componentes poliméricos. Si bien el rastrojo de maíz implica todas las partes de la planta que se desechan en el campo, como tallos, hojas y brácteas, en este proyecto el foco de interés será en las brácteas.

La composición química de estas se basa principalmente en la presencia de compuestos poliméricos como celulosa, hemicelulosa y lignina. La celulosa representa un 44% de la composición química total, mientras que la lignina un 15% y lo restante correspondiente a otros compuestos como pectinas (Bernhardt *et al.*, 2019). Adicionalmente, las brácteas del maíz presentan proteínas, monosacáridos, como fructosa y glucosa, sorbitol, junto con carotenos y fenoles, importantes dado que representan la capacidad oxidante de las brácteas. Dentro de la composición también se encuentran arabinoxilanos (AX), principales polisacáridos no celulósicos (Ademoh y Olabisi, 2015 ; Ciudad-Mulero, 2017).

### 1.3.1. Biopolímeros presentes en las brácteas de maíz

Las células presentes en las plantas y hongos presentan una pared rígida que le confiere resistencia y protección. Esta pared se encuentra compuesta principalmente por la celulosa, también conocida como microfibrilla de celulosa, la cual se encuentra unida a la matriz con proteínas y otros polisacáridos, como hemicelulosa y pectina (Fig. 4) (Cooper, 2020).



**Figura 4.** Diagrama ilustrativo de la pared celular vegetal. Fuente: Ruiz Villareal, 2014.

Las hemicelulosas se ensamblan mediante enlaces de hidrógeno a las microfibrillas de celulosa, aportando resistencia mecánica. Las células vegetales que se desarrollan y están en crecimiento forman parte de las paredes celulares primarias, las cuales por su estructura flexible permiten la expansión en tamaño. Una vez avanzado el crecimiento, las células se depositan en las paredes celulares secundarias ubicadas entre la pared celular primaria anteriormente mencionada y la membrana plasmática. Estas paredes secundarias son más rígidas y gruesas que las paredes primarias, además de presentar diferencias en su

composición, dado que las paredes celulares primarias presentan igual contenido de biopolímeros tales como celulosa, hemicelulosa y pectina, mientras que las secundarias carecen de pectinas, con un contenido mayor de entre el 50 y 80% de celulosa, junto a un complejo polimérico de residuos fenólicos y flavonoides, que constituyen la lignina (Cooper, 2020).

### 1.3.1.1. Celulosa

La celulosa es un polisacárido lineal natural compuesto principalmente por moléculas de  $\beta$ -glucosa mediante los enlaces 1,4- $\beta$ -glucosídicos, conformando una estructura semi-cristalina intrincada que impide el fácil acceso al carbono, lo que imposibilita su extracción y aislamiento. Representa el componente más abundante de la pared celular vegetal, dependiendo su contenido de la naturaleza de la planta. Por lo general, la celulosa constituye entre un 35% y 50% del peso seco, resultando el porcentaje restante hemicelulosa y lignina (Gutierrez-Rojas *et al.*, 2014).

Es un compuesto rígido, insoluble en agua y de peso molecular variable, que forma parte de los tejidos de sostén. Tiene una gran importancia económica, dado que es utilizado principalmente para la producción de papeles y fibras. Puede ser modificada químicamente para ser utilizada en la producción de plásticos, agentes espesantes de alimentos, adhesivos, entre otros (Gañán *et al.*, 2017).

### 1.3.1.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa es el segundo componente más abundante en las paredes celulares siendo un polímero complejo de heteropolisacáridos de fácil degradación, compuesto por monosacáridos unidos por enlaces  $-\beta$  (1-4) (Martinez y Lora, 2014). Existen diversos tipos de hemicelulosa que varían en la estructura de monosacáridos que la componen, tales como los pentanos, xilanos, arabinosa y hexanos como glucosa, manosa y galactosa, con potenciales aplicaciones para la industria de alimentos e industria química (Luo *et al.*, 2019). En este contexto, los AX son polisacáridos de xilosa ramificada con arabinosa, constituyentes de las hemicelulosas, que, dado a su estructura y complejidad, proporcionan resistencia a las paredes celulares vegetales frente a la degradación enzimática. Estos polisacáridos si bien pueden disolverse en agua, al encontrarse algunas fracciones unidas a la celulosa y lignina, el medio

alcalino resulta el más eficiente para su extracción (Schendel *et al.*, 2016). Los AX de ciertos orígenes como la fibra de maíz, presentan potencialmente un valor comercial en aplicaciones de la industria alimentaria como aditivos, espesantes, estabilizantes de soluciones, entre otros. Adicionalmente, los AX pueden presentar beneficios para la salud, por ejemplo, favoreciendo la absorción del calcio, magnesio y del colesterol en el hígado (Marquez-Escalante *et al.*, 2018). La capacidad prebiótica de los AX proporciona beneficios positivos para los consumidores, gracias a sus efectos nutricionales. Son fermentables por el microbiota intestinal y su capacidad antioxidante se encuentra relacionada con el contenido de fenoles en su estructura. Estos efectos prebióticos de los AX se encuentran relacionados a efectos benéficos sobre la salud (Ciudad-Mulero, 2017).

### 1.3.1.3. Lignina

La lignina es un hetero polímero compuesto por tres monómeros fenilpropanoides que presentan una estructura aromática con grupos funcionales oxigenados de alta complejidad, lo cual también impide su fácil aislamiento. Luego de la celulosa, la lignina representa la segunda fuente renovable más abundante de la naturaleza, caracterizada por diversas propiedades biológicas, químicas y físicas (Wang *et al.*, 2017; Álvarez-Castillo, 2012). A niveles energéticos, la lignina es más costosa que la celulosa y la hemicelulosa, ya que las plantas no suelen degradarla (Maceda *et al.*, 2021).

Asimismo, la lignina provee rigidez estructural, resistencia a la tensión, además de conferir sostén y almacenamiento. Se utiliza como fuente de biocombustibles, químicos y alimentos en las biorrefinerías, dado que presenta la ventaja de ser uno de los polímeros más abundantes de la naturaleza de origen aromático y alto contenido de grupos hidroxilos (Gutierrez Villanueva *et al.*, 2020).

## 1.4. Otras fuentes de celulosa no-vegetal

La celulosa es un componente que no solo se encuentra presente en la biomasa de las plantas, sino que también la producen organismos procariotas o algas marinas. La celulosa de origen bacteriano, producida por diversas especies aeróbicas, es un polímero extracelular insoluble, químicamente similar a la celulosa vegetal, cuyas propiedades físicas y

conformaciones estructurales, resultan promisorias para el avance biotecnológico (Bethke *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2015), dado que la misma posee ventajas como alta porosidad, alta pureza, fuerte capacidad de absorción de agua, fuerza mecánica, alto grado de cristalización y biocompatibilidad, entre otros (Pang *et al.*, 2020; Klemm *et al.*, 2005).

La celulosa bacteriana (CB) es un polisacárido extracelular nano fibrilar que es producido por diversas bacterias que crecen en condiciones estáticas (sin agitación), sumergidas en líquido o bien, mediante agitación. La eficiencia de la producción de la celulosa depende principalmente del sustrato de crecimiento, el cual suministra energía para la síntesis de este biopolímero.

Los organismos más utilizados son de género *Acetobacter xylinum* posteriormente clasificada a *Gluconoacteboacter xylinus* o *Komagataeibacter xylinus* pertenecientes a los grupos de bacterias del ácido acético (BAA), las cuales son gramnegativas estrictamente aeróbicas y consideradas no tóxicas, no patogénicas y que no producen antibióticos (GRAS) (Gorgieva y Trček, 2019).

La CB es sintetizada en la membrana bacteriana a partir de la glucosa activada por los nucleótidos, si bien suele ser muy estable cuando se cultiva en soluciones básicas, puede verse afectada su estructura y composición ante una hidrólisis alcalina (Santos *et al.*, 2015). Adicionalmente, la macroestructura puede verse afectada según las condiciones del cultivo en la que es producida, en la actualidad existen distintas técnicas de fermentación que permiten obtenerla.

El cultivo estático es una técnica simple que permite el crecimiento mediante la utilización de botellas o frascos de vidrio de gran tamaño que contienen el medio de cultivo líquido. Este tipo de cultivo presenta algunas limitaciones como baja productividad y mucho tiempo producción (Blanco Parte *et al.*, 2020). Por otro lado, el cultivo agitado permite la producción de CB por lotes o en continuo, esta técnica presenta grandes desventajas, dado que tiene un menor grado de agrupamiento lo que genera gránulos irregulares y la agitación favorece el crecimiento de otras células (Pineda *et al.*, 2012 ; Esa *et al.*, 2014).

## 1.4.1. Potenciales aplicaciones de la celulosa bacteriana en las industrias

La CB es estudiada para su utilización a nivel industrial, amplias investigaciones *in vivo* demostraron que no presenta genotoxicidad y además al ser ingerida es eficaz en la reducción de colesterol en comparación a la celulosa vegetal (Lin *et al.*, 2019). La CB podría ser utilizada como ingrediente en el desarrollo de nuevos alimentos funcionales ricos en fibra, para esto es necesario que la cepa bacteriana a utilizar sea eficiente y estable, con demandas de crecimientos no muy costosas, ya que su producción en líneas generales presenta valores elevados (Gorgieva y Trček, 2019 ; Lin *et al.*, 2019). Alternativamente, se pueden utilizar como fuente de carbono desechos agroindustriales como los de la caña de azúcar, mejorando también su rendimiento con el agregado de aditivos al medio de crecimiento (Naritomi *et al.*, 1998 ; Esa *et al.*, 2014).

## 1.4.2. Obtención de celulosa bacteriana (CB): subproducto de la elaboración de Kombucha

La Kombucha es una bebida fermentada con bajo contenido alcohólico y alto contenido de compuestos bioactivos (como antioxidantes), derivados del procesamiento de materia vegetal como té, jugos y extractos de hierbas. La bebida fermentada se elabora principalmente a base de un cultivo simbiótico de bacterias y levaduras conocido como *Symbiotic Colony of Bacteria and Yeast* (SCOBY). Este cultivo presenta una composición microbiológica muy variable con bacterias como *Acetobacter xylinum* o *Bacterium gluconicum* y levaduras como *Brettanomyces bruxellensis* o *Candida stellata*. Dicho SCOBY presenta múltiples características beneficiosas para diversos sectores de la industria de alimentos, procesos biotecnológicos y la biomedicina, entre otros, dado sus fuertes propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Torán-Pereg *et al.*, 2021).

Durante las etapas de fermentación para la producción de Kombucha, las enzimas de levaduras hidrolizan la sacarosa a glucosa y fructosa, produciendo etanol, mientras que las bacterias del ácido acético metabolizan a la glucosa en ácido glucónico, y a la fructosa

en 5-ceto-D-fructosa, generando como productos extracelulares primarios ácido acético y celulosa (Antolak, Piechota & Kucharska, 2021 ; Torán-Pereg *et al.*, 2021)

### 1.4.2.1. Producción de Kombucha en el mundo

En la actualidad el interés por el cuidado de la salud se ve reflejado en el consumo de alimentos y bebidas con características beneficiosas para el organismo. En este caso, Kombucha presenta algunos beneficios como recuperar niveles de hidratación, entre otros. Según lo mencionado en el artículo “*Kombucha, la bebida fermentada que apunta fuerte*”, (2022) se destaca que esta bebida inicialmente se elaboraba de manera artesanal, pero debido a su alto potencial en el mercado, refleja una tendencia como bebida fermentada y con posibilidad de una producción ambiciosa a gran escala en la industria. Si bien su proceso de elaboración industrial es similar a otras bebidas fermentadas, a partir de la intervención de bacterias y levaduras, su elemento diferenciador está en los ingredientes y su mínima generación alcohol.

Su consumo presenta múltiples beneficios, ya que a partir de la utilización de SCOBY está comprobado que mejora el estado del microbiota intestinal, es energizante, entre otros beneficios. No obstante, en sus inicios su fabricación generó algunas controversias, lo que se debió asegurar el cumplimiento de seguridad alimentaria y la información sobre sus ventajas y desventajas referidas a su consumo.

## 1.5. Enzimas celulasas

La hidrólisis enzimática de la celulosa tiene como responsable a las enzimas celulasas, pertenecientes a la familia de las glicosil hidrolasas. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de celulosa y otros polisacáridos en múltiples monómeros de glucosa. La celulólisis genera la descomposición de la celulosa en azúcares simples, oligosacáridos o polisacáridos. Estas enzimas conocidas como celulolíticas se pueden clasificar en tres grupos: endoglucanasas, exoglucanasas y celobiohidrolasas (Gutierrez-Rojas *et al.*, 2014). Las enzimas endoglucanasas hidrolizan en zonas amorfas los enlaces glucosídicos interiores de las cadenas de celulosa, análogamente, tienen como producto cadenas de celulosa con menor grado de polimerización. En cambio, las exoglucanasas, si bien continúan con la acción de las

endoglucanasas, liberan productos como la celobiosa (disacárido formado por dos glucosas unidas por su grupo hidroxilo). Por su parte, las celobiohidrolasas hidrolizan la celobiosa de los extremos reductores y no reductores, degradando la celulosa cristalina (Coniglio, 2017).

Existen diversas enzimas comerciales que se emplean para la extracción asistida de biopolímeros, por la industria del procesamiento de alimentos, agrícolas, textiles, entre otros. Esta alternativa de utilización de enzimas comerciales representa una ventaja tanto económica como experimental, dado la posibilidad de trabajo a bajas temperaturas, como entre 30 y 50°C, además de la estabilidad de un pH entre 4,0 y 5,5, permite diferenciarse positivamente frente a los procesos químicos convencionales (Bonilla Ospita, 2020). Estas enzimas comerciales dependiendo del tipo de biomasa a las que será aplicadas, tal como se mencionó, pueden ser celulasas, xilanasas (útil para la degradación de hemicelulosa, reducción de viscosidad de alimentos de difícil digestión, y mejora en la calidad de productos alimenticios) o pectinasas (Beg *et al.*, 2001). Otra enzima comercial muy utilizada de origen fúngico y bacteriano son las celulasas y hemicelulasas, con aplicaciones principalmente en la hidrólisis de pentosanos, y utilizadas como gelificante o espesante en la industria alimenticia (Idrovo Encalada *et al.*, 2019). En su mayoría se producen a partir de microorganismos, principalmente bacterias y mohos filamentosos, influyendo sobre la eficiencia hidrolítica y catalítica, sus pH y temperatura óptimas de acción; afectando también su proporción en la mezcla de compuestos a hidrolizar (Idrovo Escalada *et al.*, 2019 ; Gutierrez-Rojas *et al.*, 2014).

### 1.5.1. Mercado mundial de enzimas

La creciente demanda de alimentos y bebidas relacionada al interés de los consumidores en el cuidado de la salud, frente a otros factores relevantes de la industria, como el avance en la tecnología, generó que, según lo informado en el artículo de *Grand View Research*, (2021), el mercado de las enzimas comerciales estuvo valuado en USD 11.47 billones, estimándose una tasa de crecimiento anual (CAGR, por sus siglas en inglés) del 6,5% del 2022 al 2030 (Market Analysis Report, 2020). Adicionalmente, el desarrollo del mercado se encuentra basado principalmente en la obtención de enzimas mediante microorganismos y a partir de plantas (Redding, 2022).

Las empresas reconocidas del mercado como productores presentan enzimas como las glucoamilasas utilizadas para degradar el almidón o pululanasa para mejorar el rendimiento de la glucosa. Adicionalmente, también se utilizan amilasas y celulasas para la industria textil mejorando la calidad de los tejidos, o como agregados en detergentes, entre otras múltiples aplicaciones dentro de la industria del papel, alimento para animales, biocombustible, químicas, etc. (Patel *et al.*, 2017 ; Spencer *et al.*, 2020). Dentro de estas compañías, como Novozymes y Danisco, fabrican enzimas celulasas que provienen de microorganismos como *Trichoderma spp.* o *Aspergillus spp.*, que presentan una actividad de 10 a 56 FPasas/ml (Unidades de papel de filtro determinadas de acuerdo con el método IUPAC: pH 5,0 y 50°C) (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2014).

## 1.6. Hidrólisis enzimáticas mediante microorganismos

Aquellos microorganismos que catabolizan la hidrólisis del material vegetal comúnmente presentes en el suelo, tejidos vegetales en descomposición y en abono, son considerados celulolíticos. Se caracterizan por ser hongos o bacterias mesófilas, termófilas, aerobias y anaerobias. Existen diversos hongos, como los filamentosos, que producen y secretan enzimas como la celulasa para satisfacer sus necesidades energéticas (Serrano *et al.*, 2018 ; Hernández Huertas, 2015). La degradación de la celulosa mediante celulasas fúngicas fue ampliamente estudiada en microorganismos como *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Trichoderma reesei* y *Penicillium chrysogenum*, entre otros. Se estima que el 70% de las proteínas que son secretadas por este tipo de microorganismos, corresponde a celobiohidrolasa, mientras que casi un 20% corresponde a enzimas celulasas y en una menor medida, un 1%, corresponde a las hemicelulasas (Coniglio, 2017).

La producción de la celulasa está relacionada a la estructura y morfología de cada tipo de hongo. Los hongos que intervienen en la descomposición de la madera son capaces de degradar todos los componentes de la biomasa, colonizándose directamente en el sustrato lignocelulósico. En cambio, los hongos de putrefacción parda degradan de manera eficiente la celulosa y parcialmente la hemicelulosa. Dentro de estos tipos de hongos, los que presentan mayor cantidad de producción de celulasa son *Aspergillus spp.* y *Trichoderma spp.* (Srivastava *et al.*, 2018).

En la actualidad, múltiples estudios demuestran la capacidad que presenta *Trichoderma spp.* de producir enzimas como las celulasas, quitinasas, hemicelulasas, xilanasas y glucanasas, frente a la utilización de diversos sustratos como por ejemplo almidón, salvado de trigo, cáscara de arroz, bagazo de caña de azúcar y harina de soja (Hernández-Melchor *et al.*, 2019).

### 1.6.1. *Trichoderma spp.*: características y aplicaciones en la industria

Se enfocará el interés en el género de hongos filamentosos *Trichoderma spp.*, por ser el empleado en este proyecto. *Trichoderma spp.* es un hongo aerobio ascomiceto de aspersión verde que presenta las siguientes características taxonómicas (Rifai, 1969 ; Argumedo-Delira *et al.*, 2009):

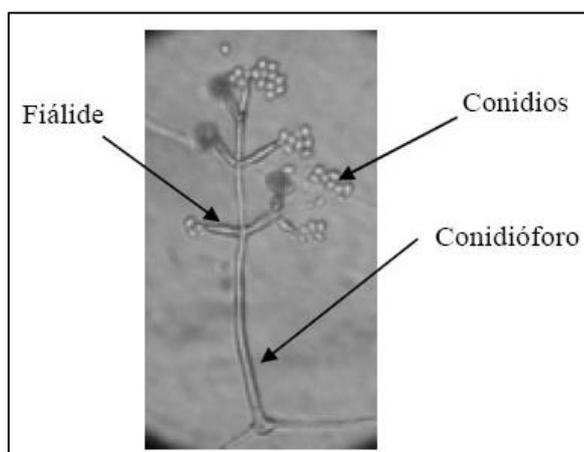
- Reino: Fungi (Mycetae)
- División: Eumycota
- Subdivisión: Ascomycotina
- Clase: Euascomycetes
- Orden: Hypocreales
- Familia: Hypocreaceae
- Género: *Trichoderma*
- Especie: *T. harzianum*

Puede crecer y desarrollarse en suelos, madera y hortalizas en descomposición, en diversas condiciones ambientales, presentando una gran capacidad de adaptación al interactuar sinérgicamente con otros hongos, plantas y animales (Acurio Vásconez y España Imbaquino, 2017; Mesa-Venegas *et al.*, 2019). *Trichoderma spp.* ha sido ampliamente estudiado como modelo de microorganismo celulolítico, dado que presenta un sistema enzimático completo competente de degradar en su totalidad o en forma parcial la celulosa principalmente en glucosa y celobiosa (Ovando y Waliszewski, 2005 ; Gutierrez-Rojas *et al.*, 2014).

Este moho, representa una de las especies con mayor bioactividad en la naturaleza, debido a la gran cantidad de metabolitos que produce con amplias actividades

biológicas que pueden resultar beneficiosas para la salud de las plantas (Li *et al.*, 2019; Nieto-Jacobo *et al.*, 2017).

Las cepas de *Trichoderma spp.* se identifican y caracterizan por ser mohos de rápida diseminación y presentar pigmentación conidial verde (Zin y Badaluddin, 2020). Desarrollan tres tipos de clamidosporas intercalares, terminales y propágulos: hifas, clamidosporas y conidios. La generación de las clamidosporas puede darse en zonas terminales, medias o intercalados del micelio. Desarrollan un micelio con conidióforos ramificados de manera repetida, conformando una cresta compactada en forma de anillo que finalizan en fiálides divergentes asimétricas, generalmente de forma cilíndrica. En ellas se producen las esporas asexuales o conidios que pueden emerger directamente del micelio, dichas estructuras de reproducción asexual se muestran en la Fig. 5 (Mesa-Venegas *et al.*, 2019).



**Figura 5.** Microscopía de conidios, conidióforos y fiálides de *Trichoderma spp.* Fuente: Infante *et al.*, (2009).

En relación con las características microbiológicas, *Trichoderma spp.*, puede desarrollarse en un amplio rango de temperatura desde 4°C hasta los 35°C. Diversos estudios demostraron que la temperatura óptima donde se obtiene un mayor desarrollo se encontró entre los 25°C a 30°C, además, la relación con el pH no es exigente, dado que el rango óptimo se encuentra entre los 5,5 y 6,5 (Ronnie-Gakegne, 2018). Algunas cepas de *Trichoderma spp.* se desarrollan durante un tiempo de incubación de 3 a 5 días, mientras que otras pueden evidenciar crecimiento óptimo por un tiempo de 7 a 14 días. Además, poseen capacidad de adaptación a

medios cuya humedad es de 20-90%, son fotosensibles y presentan un crecimiento variable frente a condiciones de diversas concentraciones de sales (Kim *et al.*, 2019 ; Vásquez, 2010).

En los últimos años, la utilización de *Trichoderma spp.* se incrementó por su importancia como potencial fungicida y fertilizante, presentando amplios beneficios sobre las plantas como aumento de la absorción de nutrientes, modificación de la rizosfera, entre otros. Siendo utilizado como mecanismo de control biológico, dado que contribuye a regular el crecimiento y la reproducción de aquellos microorganismos patógenos que afectan a las plantas mediante la liberación de compuestos similares a las hormonas que impulsan el desarrollo de raíces y potencian el crecimiento de las plantas. A su vez, actúa como agente de descomposición natural, dado que la inoculación de *Trichoderma spp.* en desechos agrícolas utilizados como sustratos aumentan considerablemente la velocidad de este proceso, es sustrato para biorremediación, promotor de crecimiento vegetal, entre otras aplicaciones, lo que demuestra un gran potencial para ser utilizado frente a desechos agroindustriales (Zin y Badaluddin, 2020 ; Walton *et al.*, 1994).

Por otro lado, el desarrollo de este hongo podría generar consecuencias no deseadas, ya que la secreción de enzimas que degradan la pared celular como la celulasa, xilanasa y glucanasas a partir de *Trichoderma spp.* puede llegar a afectar no solo a los organismos patógenos que se desarrollan en las plantas, sino que también a otros microorganismos benéficos (Walton *et al.*, 1994).

## 2. Antecedentes

La importancia del cuidado del medio ambiente y el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan brindarle un valor agregado a los residuos agroindustriales que provocan efectos negativos en el ecosistema, es una tendencia que se vive en la actualidad (Vera-Zambrano *et al.*, 2021). El valor económico que presentan los residuos lignocelulósicos, de interés por ser los que se encuentran en abundancia en los sectores agrícolas, aumenta a medida que la cantidad de azúcares reductores totales se incrementa.

El maíz (*Zea Mays*) es uno de los cereales con mayor nivel de azúcares reductores (Florián *et al.*, 2014). Principalmente, las brácteas de maíz son un recurso natural presente en grandes cantidades con importantes aplicaciones. Como fue mencionado anteriormente, una de sus aplicaciones es para la producción de bioetanol, aunque al ser un recurso renovable se pudo determinar que estos desechos presentan un gran potencial como principal fuente de carbono en la producción de biopolímeros, fibras, antioxidantes naturales y otros compuestos que presentan potencialmente una aplicación en la industria de los alimentos (Stepián-Warda, 2020; Ramos Sevilla, 2018).

A partir del aumento de los residuos lignocelulósicos, en los últimos tiempos se incrementó la cantidad de aplicaciones en escala industrial que involucran la utilización del principal biopolímero de la materia vegetal, la celulosa, como el biocombustible, medicina y alimentos (Mahfoudhi y Boufi, 2017). Se reportó la exitosa extracción de celulosa en residuos agroindustriales semejantes como cáscara de coco, cáscara de plátano, fibra de algodón, fibras duras, residuos de zanahoria, frutos, fibras de hierba, entre otros (Hernández-Melchor *et al.*, 2019 ; Koschny Castro, 2020). Entre las propiedades más destacables se encuentran las relacionadas al comportamiento reológico, la ausencia de propiedades de citotoxicidad y genotoxicidad, gran capacidad de absorción y adsorción de agua, entre otras, permitiendo su uso en aplicaciones como agentes estabilizantes, envasado de alimentos e ingredientes alimentarios funcionales (Bernhardt, 2018).

Por otra parte, los biopolímeros lignina junto con la hemicelulosa dificultan la acción enzimática de las celulasas, responsables de la obtención de celulosa. Por lo tanto, para la transformación de la biomasa celulósica hasta azúcar fermentables se requieren pretratamientos para eliminar dichas fracciones siendo importante tener en cuenta que durante

este proceso se pierde parte del contenido de celulosa. Adicionalmente, la lignina puede ser utilizada como aditivo para productos poliméricos y mediante su degradación controlada en la biomasa lignocelulósica se pueden aislar compuestos aromáticos como feniletano y fenilmetano (Álvarez-Castillo, 2012).

La producción de nano celulosa cristalina (término para hablar de materiales procesados celulósicos que presentan sus dimensiones estructurales definidas en nano escala) mediante hidrólisis ácida, inicialmente requiere la reducción de material vegetal a trozos pequeños, luego de una purificación y homogenización, lo cual tiene como objetivo eliminar otros compuestos de poco interés, como la lignina y hemicelulosa.

Los pretratamientos químicos a bajas temperaturas son útiles para remover la lignina, facilitando su solubilización, principalmente el tratamiento con hidróxido de potasio (KOH) el cual favorece la conversión de celulosa cristalina en amorfa y degradación de la lignina (Torres *et al.*, 2017). A partir de esto, la hidrólisis ácida es ampliamente utilizada para la obtención de azúcares reductores. Este proceso generalmente se realiza con soluciones concentradas o diluidas de ácidos a una determinada temperatura. El producto de este proceso es una fracción líquida, rica en azúcares y una sólida, constituida principalmente por celulosa y lignina. Se demostró que este tratamiento no es muy eficiente en la degradación de lignina, aunque si lo es para la hemicelulosa. Este proceso tiene como gran desventaja la acumulación de residuos que deben ser neutralizados, ya que son corrosivos, tóxicos y difíciles de reciclar por sus amplios costos asociados (Kumar *et al.*, 2009 ; Morales de la Rosa, 2015).

Por otra parte, la hidrólisis alcalina es útil para la eliminación de lignina y solubilización de hemicelulosa a través de, por ejemplo, la saponificación de los enlaces ésteres entre estos dos biopolímeros, lo que provoca el aumento de la porosidad y accesibilidad de la celulosa. Los reactivos que más se utilizan son, por ejemplo, hidróxido de sodio (NaOH) y amoníaco (NH<sub>3</sub>). Si bien no requieren de temperaturas tan elevadas, sí requieren tiempos prolongados de reacción y no degradan de manera efectiva a los azúcares (Balat, 2011). Este proceso presenta como desventaja la conversión de sales que no se pueden recuperar o que pueden incorporarse a la biomasa, perjudicando los posibles próximos tratamientos. Si bien los tratamientos alcalinos demostraron ser los más efectivos a la hora de lograr solubilizar y eliminar la hemicelulosa y lignina, es necesario que la extracción sea controlada, dado que en

condiciones atípicas la celulosa puede resultar también degradada (Rojas Vargas, 2017 ; Bernhardt, 2018).

En cuanto a la hidrólisis enzimática, que tiene como fundamento principal la utilización de microorganismos y enzimas específicas para la degradación del material lignocelulósico. Este proceso debe superar la complejidad de degradar la lignina por sus propiedades estructurales y los altos costos que con lleva la utilización de enzimas.

Como se detalló anteriormente, los costos elevados de los métodos enzimáticos vinculados al proceso de obtención de las enzimas, el elevado tiempo requerido para el proceso y los bajos rendimientos o falta de eficiencia llevaron a estudiar posibles alternativas que permitieran utilizar diversos cócteles enzimáticos producidos por microorganismos como hongos, bacterias y protozoos; en combinación con tratamientos alcalinos lo que disminuyen los costos de producción y el impacto ambiental (Bernhardt, 2019 ; Morales de la Rosa, 2015).

Principalmente, los hongos presentan una gran capacidad degradativa de los biopolímeros que forman parte de la biomasa lignocelulósica por sus propiedades hidrolíticas. En la actualidad, son los responsables de la mayor proporción de celulosis en la naturaleza, relacionado a sus capacidades de colonización de sustratos y remoción de los productos de hidrólisis (Vilches Paz, 2002), Adicionalmente, presentan un sistema único no-enzimático oxidativo que, en conjunto con las enzimas lignolíticas permiten la modificación y degradación de la lignina. La hidrólisis enzimática en comparación a la hidrólisis ácida no afecta significativamente al medio ambiente (Andlar *et al.*, 2018).

### 3. Objetivos

En este contexto, el presente Proyecto Final de Licenciatura en Biotecnología tiene como objetivo global evaluar la actividad de las enzimas secretadas por el hongo *Trichoderma spp.* sobre fibras extraídas de las brácteas del maíz (*Zea Mays*), residuo agroindustrial, para favorecer el rendimiento de la extracción de los principales biopolímeros y compuestos antioxidantes contenidos en dichas fibras. Este proyecto busca proponer una alternativa a los tratamientos químicos convencionales empleados para el aislamiento de estos compuestos antioxidantes y biopolímeros contenidos en matrices vegetales, minimizando así el impacto ambiental y costos de producción, a la vez de contribuir al concepto de economía circular al revalorizar un residuo agroindustrial. Adicionalmente, el método de aislamiento de los biopolímeros y compuestos bioactivos desarrollado podría ser utilizado como etapa previa y complementaria a la aplicación de métodos físicos, como los flujos turbulentos, en busca de nuevas funcionalidades como aditivos y/o ingredientes naturales de las macromoléculas, con importancia nutricional.

En contra parte, se utilizará el subproducto obtenido en la producción artesanal de Kombucha, como una fuente rica en celulosa bacteriana para realizar las experiencias. Se buscará comparar el efecto de esta matriz celulósica bacteriana frente a la utilización de fibras vegetales, al emplearla como sustrato para la producción de enzimas celulolíticas de *Trichoderma spp.*, conllevando a la posterior liberación de polisacáridos y otros bioactivos.

#### 3.1. Objetivos específicos

Los objetivos específicos del presente proyecto se enfocan en la optimización de parámetros y medios de cultivo para el desarrollo del hongo *Trichoderma spp.* utilizando como sustrato fracciones de fibras de brácteas del maíz (*Zea Mays*) a fin de permitir el aislamiento de los principales biopolímeros, como celulosa y hemicelulosa, junto con otros compuestos de interés en la industria alimentaria como los que presentan capacidad antioxidante. A continuación, se detallan los objetivos:

- Obtención y acondicionamiento de las principales fracciones de fibras de las brácteas del maíz (*Zea Mays*).

- Formulación de medios de cultivo en los que *Trichoderma spp.* pueda desarrollarse empleando como única fuente de carbono las fibras propuestas. Se evaluarán las alteraciones en la composición química de las fibras inoculadas con el hongo y se optimizarán los parámetros nutricionales y de operación.
  
- Evaluación del rendimiento de extracción de los principales biopolímeros junto con estudio comparativo de la actividad celulolítica del hongo al cultivarse empleado fibras de celulosa de origen bacteriano.
  
- Análisis del impacto ambiental de la utilización *in situ* del hongo para favorecer la extracción de compuestos bioactivos y biopolímeros de matrices complejas vegetales o de origen bacteriano.

#### 4. Hipótesis

La utilización de fracciones de fibra vegetal, provenientes de las brácteas de maíz (PB, RIA y Cel-KOH), como única fuente de carbono para el desarrollo de *Trichoderma harzianum* LMR1 favorecen la actividad celulolítica desarrollada por el mismo, con utilidad en la liberación de compuestos bioactivos y biopolímeros.

Para ello, se pondrá a prueba la utilización de las fibras del maíz, consideradas un residuo agroindustrial en una concentración de 1,5 y 2% (p/p) fijando condiciones de incubación de *Trichoderma harzianum* que permitan la mayor producción de esporas. Las variables en estudio serán condiciones de iluminación (luz vs. oscuridad), medios de cultivo Vogel's y Czapek, consistencia de los medios (caldo y agar).

Finalmente, a fin de comparar el uso de otro sustrato, se estudiará el empleo de fibras de celulosa de origen bacteriano, incubando al moho bajo las mismas condiciones definidas como óptimas para las fibras vegetales.

## 5. Metodología de desarrollo

### 5.1. Lugar de realización del proyecto

Las actividades desempeñadas a lo largo de todo el proyecto fueron realizadas en el Laboratorio de Biotecnología y Microbiología, y el Laboratorio de Química e Investigación (UADE Labs) en la Universidad Argentina de la Empresa. Los insumos utilizados fueron provistos por el Instituto de Tecnología de Alimentos y Procesos Químicos (ITAPROQ) de la Universidad de Buenos Aires (UBA), y el Instituto de Tecnología (INTEC) de UADE, dentro del marco del proyecto código ACyT P20T50 a cargo de la Dra. Dana Bernhardt.

### 5.2. Materiales y métodos

#### 5.2.1. Generalidades

Ambos laboratorios disponen del equipamiento necesario para desarrollar las actividades como flujo laminar vertical marca Nuaire™, incubadoras, microscopio óptico marca Arcano, espectrofotómetro de UV-Visible (PG Instrument®, modelo UV/VIS T60U c7), liofilizador (Rificor® modelo L-M10-A-E50-CRT), pHmetro (Altronix®), balanza analítica (Sartorius®), autoclave, centrífuga (Eppendorf®, modelo 5810R), agitadores y Ultrafreezer (Righi®, modelo 30-70LH). Adicionalmente, se utilizaron pipetas p10, p20 y p1000 (Eppendorf®).

Los materiales de vidrio utilizados fueron vasos de precipitados, buretas, espátula de Drigalsky, tubos de ensayo de 10ml y 20ml y pipetas. Por otro lado, se utilizaron materiales descartables como pipetas estériles, placas de Petri estériles, tubos centrífuga, tubos Falcon de 25ml y 50ml y tips. Además, otros insumos como cámara de Neubauer (Marienfeld®), asa de siembra y mecheros.

Adicionalmente, los laboratorios suministraron soluciones y reactivos como el agua bidestilada, hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de potasio (KOH), etanol al 85% y 95%, y reactivos como Rojo Congo. La Universidad de Buenos Aires (UBA) aportó los componentes necesarios para realizar las soluciones de Somogyi y de Nelson (sales inorgánicas)

y los estándares de D-glucosa, arabinosilosa y galactosa para las determinaciones colorimétricas.

Los reactivos empleados en este proyecto fueron de las marcas Sigma®, Aldrich®, Merck® y Biopack®.

### **5.2.2. Recolección y acondicionamiento de las brácteas de maíz**

Se realizó la recolección de brácteas de maíz (*Zea Mays*) provenientes de mercados, verdulerías y otros puntos de expendio locales. Luego de su correspondiente lavado con agua, se las secó a una temperatura de 65°C durante 4 horas en estufa de convección de aire controlado. Las brácteas secas se cortaron de manera transversal en un ancho de 1cm aproximadamente, se molieron en un molino de corte de celulosa (INTI, Celulosa y papel) obteniéndose la primera fracción llamada polvo de brácteas (PB). Finalmente, el PB fue tamizado y liofilizado para el desarrollo del presente trabajo en el cual se seleccionó la porción de PB. Una vez liofilizado el material correspondiente, fue almacenado previo envasado al vacío en bolsas tipo Cryovac® a temperatura ambiente y al resguardo de la luz (Bernhardt *et al.*, 2019; Harborne y Baxter, 1999).

### **5.2.3. Obtención del residuo insoluble en alcohol (RIA) de las brácteas**

Se dispersaron cantidades considerables de PB en una solución de etanol al 85% (v/v) (1:10) y se llevó a cabo la extracción de los principales biopolímeros de la pared celular de la matriz vegetal llevando el sistema a ebullición durante un tiempo de 30 minutos. Luego se filtró el sistema y sobre el mismo se realizaron tres lavados con etanol 95% (v/v) a temperatura ambiente. Se repitió el mismo proceso una vez más. Finalmente, se dejó evaporar el etanol bajo campana de extracción durante 12 horas y se procedió a liofilizar las fibras remanentes, obteniéndose así el residuo insoluble en alcohol (RIA). El RIA se almacenó al vacío en bolsas tipo Cryovac® a temperatura ambiente y al resguardo de la luz.

## 5.2.4. Preparación de las fibras enriquecidas en celulosa por tratamiento alcalino (Cel-KOH)

Se tomó una muestra de RIA y se dispersó en una solución acuosa de hidróxido de potasio (KOH) al 4% (p/v), en una proporción (3:10), dejándose en agitación magnética durante 24 horas a temperatura ambiente ( $\approx 20^\circ \text{C}$ ). El sistema se filtró y la fracción retenida en el filtro se lavó 3 veces con etanol 95% (v/v), luego se evaporó el etanol bajo campana para su posterior congelado y liofilización. De este modo se obtuvo la tercera fibra conocida como residuo enriquecido en celulosa (Cel-KOH), la cual se almacenó al vacío en bolsas tipo Cryovac®, como el resto de las fibras. A niveles químicos, el pretratamiento alcalino permitió la remoción de la hemicelulosa contenida en las fibras, la cual se solubilizó casi en su totalidad (Bernhardt *et al.*, 2019).

## 5.2.5. Esterilización de las fibras

Las tres fracciones de las fibras vegetales obtenidas: PB, RIA y Cel-KOH fueron colocadas en tubos cónicos tipo Falcon de 50 ml para ser esterilizados con el fin de eliminar la carga microbiana existente que pudiera inhibir el desarrollo de *Trichoderma spp.* en las consiguientes pruebas. La esterilización se realizó mediante aplicación de calor húmedo, en autoclave, a una temperatura de  $121^\circ \text{C}$  durante 15 minutos.

## 5.2.6. Cepas de *Trichoderma* y medios de cultivo empleados

Se utilizó la cepa del hongo *Trichoderma harzianum* LMR1 proveniente del cepario generado en el proyecto P18T05 “Inoculantes microbianos para la horticultura” de la Dra. Verónica Bergottini en INTEC-UADE. El hongo *Trichoderma harzianum* es ampliamente utilizado como agente de control biológico contra diversos patógenos vegetales (Yedidia *et al.*, 1999).

Los ensayos de inoculación de las fibras vegetales con *T. harzianum* se realizaron empleando dos medios de cultivo de composición mínima, Czapek y Vogel's. El primero es un medio adecuado para el crecimiento de microorganismos cuyo hábitat natural es

el suelo, y favorece la producción de enzimas (Diaz *et al.*, 2020). La formulación del medio Czapek sólido y líquido empleados, se muestra en la Tabla I.

**TABLA I.** Formulación de medio de cultivo Czapek para estado sólido y líquido.

Compuesto	Czapek sólido	Czapek líquido
	Cantidad	Cantidad
Sulfato Ferroso	0,01 g/l	0,01 g/l
Sulfato de Magnesio	0,5 g/l	0,5 g/l
Cloruro de potasio	0,5 g/l	0,5 g/l
Fosfato dipotásico	1 g/l	1 g/l
Nitrato de Sodio	2 g/l	2 g/l
Agar-agar	20 g/l	-
pH	7,3	

Fuente: Diaz *et al.*, 2020.

El segundo medio de cultivo aplicado es Vogel's el cual es selectivo para mohos de *Trichoderma spp.* (Rosales-Lopez *et al.*, 2017). La formulación de este medio se adaptó según lo detallado por Baskaran y Krishnan, 2020. Su composición puede verse en la Tabla II y III.

**TABLA II.** Formulación de medio de cultivo Vogel's para estado sólido y líquido.

Compuesto	Vogel's sólido	Vogel's líquido
	Cantidad	Cantidad
Fosfato dipotásico	5 g/l	5 g/l
Sulfato de Magnesio	0,2 g/l	0,2 g/l
Nitrato de Amonio	2 g/l	2 g/l
Cloruro de Calcio	0,1 g/l	0,1 g/l
Citrato de Sodio	2,5 g/l	2,5 g/l
Triptona	1 g/l	1 g/l
Trazas <sup>1</sup>	0,005 l/l	0,005 l/l
Agar – Agar	20 g/l	-

<sup>1</sup>Ver composición en la Tabla III.

Fuente: Vogel, 1956 ; Baskaran y Krishnan, 2020.

**TABLA III.** Formulación de las trazas para utilizar como componente del medio de cultivo Vogel's en estado sólido y líquido.

Compuesto	Cantidad
Ácido cítrico	0,500 g
Sulfato de Zinc	0,500 g
Sulfato de Hierro (II)	0,100 g
Sulfato de Cobre (II) penta hidratado	0,025 g
Manganeso Sulfato	0,050 g
Ácido Bórico	0,050 g
Molibdato de Sodio	0,050 g
Agua	100 ml

Fuente: Vogel, 1956.

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados mediante autoclave. Los medios en estado líquido fueron conservados en heladera a 5°C en tubos de vidrio estériles y los sólidos a temperatura ambiente bajo el resguardo de la luz para, luego, distribuir el volumen correspondiente en placas de Petri estériles y su posterior conservación en heladera a 5°C.

## 5.2.6.1. Preparación de los medios de cultivo con fracciones de fibras

Se trabajó con triplicado de muestras. Para el caso de las muestras control, se emplearon placas conteniendo medio de cultivo, sin adición de fibra e inoculada con el hongo *Trichoderma harzianum* LMR1 (ítem 5.2.6.).

Se colocó en cada placa de Petri la cantidad correspondiente según a la etapa desarrollada (ítem 5.2.11) de cada fracción de fibra vegetal. Luego de fundir los medios agar Czapek y Vogel's en microondas y posteriormente en baño termostático a 80°C, se procedió a distribuirlos colocando 20 ml aproximadamente en cada placa con las distintas fracciones de fibra vegetal y en las placas control. Se dejó solidificar al medio con la tapa semiabierta por alrededor de 10 minutos bajo flujo laminar.

Este proceso se realizó de esta manera para evitar que la fibra vegetal se adhiriera a la tapa de la placa una vez que se agregue el medio de cultivo, asegurando así que la fibra estará homogéneamente distribuida en el seno del medio una vez que solidifique.

En paralelo, se realizó la preparación de medios caldo Czapek y Vogel's donde se tomó un volumen de 10 ml de medio mediante la utilización de una pipeta descartable estéril, luego, se lo colocó en cada tubo de ensayo de vidrio y se adicionó la cantidad de fibra vegetal estéril correspondiente a cada etapa (ítem 5.2.11) manteniendo las condiciones asépticas. Se utilizó el vórtex para homogeneizar el medio de cultivo con las fibras.

## 5.2.7. Stock de la cepa joven, estudio de viabilidad y recuento de esporas

### 5.2.7.1. Producción de cultivos jóvenes esporulantes de *T.*

#### *harzianum*

Se trabajó con la cepa de *Trichoderma harzianum* en su fase reproductiva, es decir en su estadio de esporulación. Para garantizar el empleo de cultivos jóvenes, se utilizaron mohos repicados sobre el medio de cultivo general Agar Papa Dextrosa (PDA) marca Britania®, incubados por 7 días a 25°C, bajo iluminación constante. Este medio de cultivo brinda los nutrientes necesarios para el crecimiento de hongos y levaduras, y está formado principalmente por infusión de papa, glucosa y agar con un pH de  $5,6 \pm 0,2$ . Múltiples estudios

demonstraron el óptimo desarrollo del hongo *Trichoderma harzianum* inoculados en medio PDA en placas de Petri de 90 mm a una temperatura óptima de 25°C durante 7 días. El pH óptimo del medio para la cepa utilizada fue entre 6 y 9 (Sinha *et al.*, 2018 ; González-Perez *et al.*, 2018; Diaz *et al.*, 2020).

Luego del período de incubación en medio PDA, se verifica que *Trichoderma harzianum* haya alcanzado su fase reproductiva. A nivel macroscópico, se puede observar que el micelio reproductivo desarrolla una pigmentación de color verde/amarillenta con aspecto aterciopelado, textura granular y crecimiento concéntrico, esto indica el momento de esporulación densa, es decir que su fase reproductiva se ha alcanzado (Sivila y Alvarez, 2013). Microscópicamente se verifica que se ha alcanzado la fase reproductiva o estadio de esporulación, cuando se observan hifas hialinas septadas y conidios ovalados o redondos ramificados, además, se comprueba la producción de estructuras de reproducción asexual como fiálides (Mesa-Venegas *et al.*, 2019 ; Vega-Rodríguez y Hernández-Chaverri, 2020).

El repique para mantener el stock joven del microorganismo y disponibilidad a lo largo de todos los ensayos se realizó de manera semanal. Se tomó una porción del moho con agar mediante la utilización de un ansa y se repicó a una nueva placa de Petri con medio PDA para su posterior incubación (7 días, 25°C, luz). De este modo se puede asegurar que en todas las experiencias se empleó un cultivo de moho joven, de una semana máxima de desarrollo en la placa, sin signos de estrés por agotamiento de nutrientes.

### **5.2.7.2. Estudio de la viabilidad de las esporas extraídas y almacenadas**

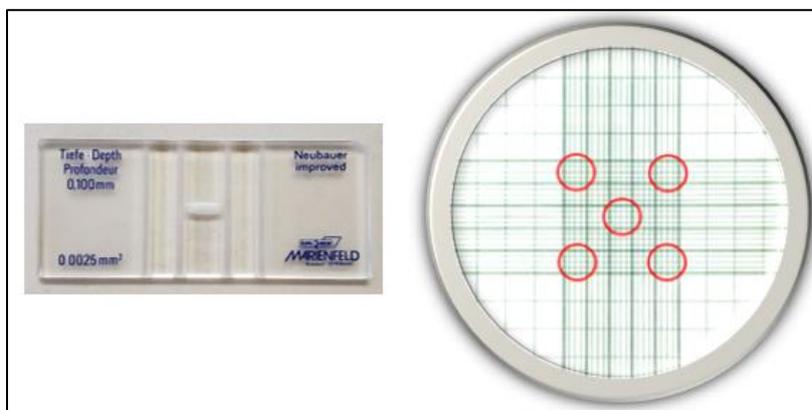
Durante esta etapa se comprobó la viabilidad de las esporas del microorganismo en estudio, luego de ser extraídas del medio de cultivo PDA y almacenadas a 5°C durante una semana. Para ello, se tomó una placa de PDA conteniendo el moho incubado y en fase de esporulación (micelio reproductivo color verde). Se desprendió suavemente el micelio vegetativo de la placa mediante el empleo de una espátula de Drigalsky y se adicionó 10 ml de agua bidestilada estéril. Luego, se trasladó la dispersión de esporas a un tubo Falcon de 50 ml estéril para su conservación en heladera a 5°C y posterior uso.

Luego de 7 días de refrigeración a 5°C, se comprobó la viabilidad de las esporas en suspensión, al tomar asépticamente 10 µl con micropipeta p20 y colocarlos en el centro de una placa con PDA. Se dejó incubar durante 7 días (25°C, luz) y se comprobó la viabilidad de las esporas almacenadas en refrigeración al apreciar efectivamente el crecimiento típico de *Trichoderma spp.*

### 5.2.7.3. Recuento de esporas en cámara de Neubauer

Se procedió con el recuento de esporas en cámara de Neubauer (marca Marienfeld, Alemania) (Fig. 6), para conocer la concentración de estas en el volumen extraído. La cámara de Neubauer es un instrumento ampliamente utilizado para contar células sanguíneas, y también conidios en una suspensión de esporas (Bustillo, 2010).

Se colocaron 10 µl de solución de esporas en cada una de las cámaras y se realizó el recuento en un microscopio óptico (marca Arcano®, modelo BN107), tal como se visualiza en la Fig. 6.



**Figura 6.** Cámara de Neubauer marca Marienfeld (izquierda) y el reglaje de la cámara vista al microscopio (derecha), donde se realiza el conteo de esporas. Fuente: Bustillo, (2010).

El resultado del recuento de esporas se obtuvo mediante la aplicación de la ecuación (Ec. 1), según *Bustillo, (2010)*:

$$C = N \times \text{Dilución} \times \text{Factor de Cámara} \quad (1)$$

Donde *C* corresponde a la concentración de esporas/ml, *N* al promedio de esporas por cuadrante, y el *Factor de la cámara* que corresponde a  $10^4$ .

Los recuentos de esporas se realizaron por duplicado y se expresa su resultado como el promedio del número de esporas calculado en ambas mediciones por ml de suspensión.

## **5.2.8. Inoculación de *Trichoderma harzianum* en los medios seleccionados**

Se procedió a inocular *Trichoderma harzianum* LMR1 en cada placa de Petri y tubo de ensayo. Para ello, se tomó el tubo estéril con la dispersión de esporas conservadas en heladera a 5°C, para asegurar una dispersión homogénea de las mismas, se re suspendieron las esporas mediante un vortex. A partir de esto, se adicionaron 10µl de la dispersión (con una concentración aproximada de  $2,39 \times 10^7$  esporas/ml), en cada placa de Petri conteniendo las distintas fibras vegetales, medios de cultivo y así como también en los respectivos controles. La alícuota de esporas se colocó en el centro de la placa, para permitir desarrollo radial del hongo. Paralelamente, se agregaron otros 10µl de la dispersión en cada tubo de ensayo de vidrio conteniendo a los medios líquidos Czapek o Vogel's.

A continuación, todas las muestras inoculadas en ambos medios (Czapek o Vogel's), tanto en agar como en caldo y los controles, se incubaron a una temperatura de 25°C durante 4 y 7 días bajo luminosidad constante.

### **5.2.8.1. Determinación de cantidad de esporas en los medios de cultivo con fracciones de fibras**

Al fin del período de incubación correspondiente (4 o 7 días) para cada medio de cultivo empleado (ítem 5.2.6), se realizaron los recuentos del número de esporas de acuerdo con lo detallado en el ítem 5.2.7.3.

Para los medios sólidos, la extracción de esporas se realizó según el ítem 5.2.7.2. En cambio, en el caso de los medios líquidos, se tomó de cada tubo incubado una alícuota de 10µl de caldo para realizar el recuento directamente sobre la cámara de Neubauer.

## **5.2.9. Empleo de una fracción de fibra de origen bacteriano como sustrato para el desarrollo de *Trichoderma harzianum***

### **5.2.9.1. Producción de la Kombucha**

La elaboración de Kombucha se caracteriza principalmente en transferir una parte del cultivo simbiótico de bacterias y levaduras conocido como SCOBY, el cual se encuentra conformando un hidrogel, al té con contenido de azúcares. Este hidrogel permite el inicio de la fermentación, dado que representa un entorno de interfase, donde los microbios tienen acceso al oxígeno del té (Harrison y Curtin, 2021).

Para este proceso de fermentación se llevaron a ebullición 12 litros de agua y luego se agregaron 1,080 gramos de sacarosa (90 g/L). Se adicionaron 48 saquitos de té negro (8 g/l) y se procedió a macerar por alrededor de 10 minutos. Pasado ese tiempo se removieron los saquitos de té y se midió el pH igual a 3,00 el cuál fue ajustado mediante solución de ácido acético. Se agregó un 3% (v/v) de caldo de Kombucha obtenido de otra bebida preparada con anterioridad, conteniendo el SCOBY que actuará como *starter* de la fermentación y se dejó en reposo estático para su cultivo durante 14 días a una temperatura de 25°C. El sistema se mantuvo a una temperatura controlada en incubadora y en oscuridad, hasta alcanzar un pH de 2,6 (Torán-Pereg *et al.*, 2021).

### **5.2.9.2. Purificación de hidrogel**

Una vez formado el hidrogel o membrana de celulosa durante la fermentación de Kombucha, se procedió a su purificación, esto corresponde a la eliminación de microorganismos y los metabolitos generados en su desarrollo, para obtener un hidrogel de celulosa apto para su utilización como fuente de carbono para el crecimiento de *Trichoderma spp.*

En primera instancia, se realizó un lavado vigoroso del hidrogel de celulosa bajo agua corriente hasta remoción parcial o total de los restos de microorganismos adheridos. En paralelo, se preparó una solución de NaOH 1M bajo campana de laboratorio. Se colocó la solución en un recipiente metálico y se lo expuso a temperatura de 90°C. Luego, se sumergió

el hidrogel de celulosa previamente pesado para mantenerlo a temperatura constante durante al menos una hora. La relación peso-volumen de la membrana y la solución fue mínimo 1:2.

A continuación, se retiró el NaOH y se lavó vigorosamente con abundante agua corriente. Se repitió el paso de sumergir el hidrogel bajo una nueva solución de NaOH 1M a 90°C durante al menos una hora más y se volvió a realizar su lavado con agua corriente.

Luego se procedió a lavar el hidrogel de celulosa con agua destilada hasta verificar que la última agua de lavado llegase a pH igual a 6.

Se procedió a la trituración y homogenización del hidrogel purificado, empleando una batidora a velocidad (marca Minipimer), hasta obtener una pulpa del hidrogel. Se registró el peso de la pulpa y se llevó a congelación en Ultrafreezer a -80°C por lo menos una hora. A partir de esto, se la sometió a liofilización. Finalmente, se procedió a esterilizar por autoclave al material obtenido para garantizar las mismas condiciones estériles de las fibras vegetales utilizadas en los ensayos previos.

### **5.2.9.3. Inoculación de las fibras de celulosa bacteriana con el moho**

Tal como se detalla en los ítems 5.2.8, se utilizaron por triplicado tubos de ensayo con medio líquido Czapek y Vogel's, para evaluar el crecimiento de *T. harzianum*, utilizando como única fuente de carbono la celulosa bacteriana obtenida en el punto anterior. Se incubaron durante 4 y 7 días a una temperatura de 25°C bajo iluminación constante, para luego proceder con el recuento de esporas y posterior determinación de azúcares reductores mediante la técnica de Somogyi-Nelson, según detallado en los ítems 5.2.7.3.y 5.2.10.2.1. respectivamente.

### **5.2.10. Evaluación de la acción enzimática de *T. harzianum***

Una vez incubado el moho con las distintas fibras (vegetales o bien de origen bacteriano), se procedió a comprobar que *Trichoderma harzianum* haya liberado al medio enzimas capaces de degradar la celulosa (endoglucanasas, exoglucanasas, y/o  $\beta$ -glucosidasas), mediante el método cualitativo de tinción de Rojo Congo.

A su vez, se evaluó la liberación de azúcares reductores provenientes de la degradación de la celulosa, mediante la técnica colorimétrica de Somogyi-Nelson, a fin de medir el efecto enzimático sobre las fibras empleadas como sustrato. Se infiere así, que el aumento de los azúcares reductores se deberá a la degradación de celulosa dada por la acción enzimática del moho sobre las fibras (vegetales o bacterianas).

### 5.2.10.1. Estudio cualitativo de la actividad celulolítica

La tinción de Rojo Congo es el método comúnmente utilizado para medir la actividad celulolítica de microorganismos que degradan celulosa. Esta técnica sirve como un indicador rápido, sensible y efectivo para realizar un análisis cualitativo (Gomez-Martinez *et al.*, 2019). El colorante Rojo Congo forma un complejo con las cadenas de la celulosa debido a su alta afinidad por polisacáridos, lo que permite que su coloración se desvanezca producto de la actividad despolimerizante de la enzima endoglucanasa (Ortiz Moreno y Uribe-Velez, 2011). De esta manera, mediante la decoloración del agar teñido con Rojo Congo, se pone en evidencia la acción enzimática del microorganismo inoculado, en este caso *Trichoderma harzianum*.

Para este ensayo se preparó un volumen de 250 ml solución de Rojo Congo 0,1% (p/v), 250 ml de acetato de sodio 50 mM a pH  $4,8 \pm 0,2$ , y 250 ml de cloruro de sodio 1M). Se tomaron muestras por duplicado, previamente incubadas según lo mencionado en el ítem 5.2.6.1., conteniendo las distintas fracciones de fibras (vegetales) en concentración de 1,5% o 2% (p/p), en ambos medios de cultivo Czapek y Vogel's y sus respectivos controles.

Se incubaron las placas con aproximadamente 10 ml de la solución de acetato de sodio 50 mM, durante 60 minutos a una temperatura de 50°C. Posteriormente, se le agregó a cada placa un volumen suficiente de solución de Rojo Congo que cubra la totalidad de la placa, y se lo llevó a agitación (80 rpm) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron las placas con agua destilada y se adicionó solución de cloruro de sodio (1M), y se dejaron las placas reposar para favorecer el revelado (visualización de la zona de degradación del colorante).

Con los resultados obtenidos se midió el halo de degradación y se calculó el Coeficiente de Degradación de Celulosa (CDC) (Ec. 2).

$$CDC = \left(\frac{d_h}{d_c}\right) \quad (2)$$

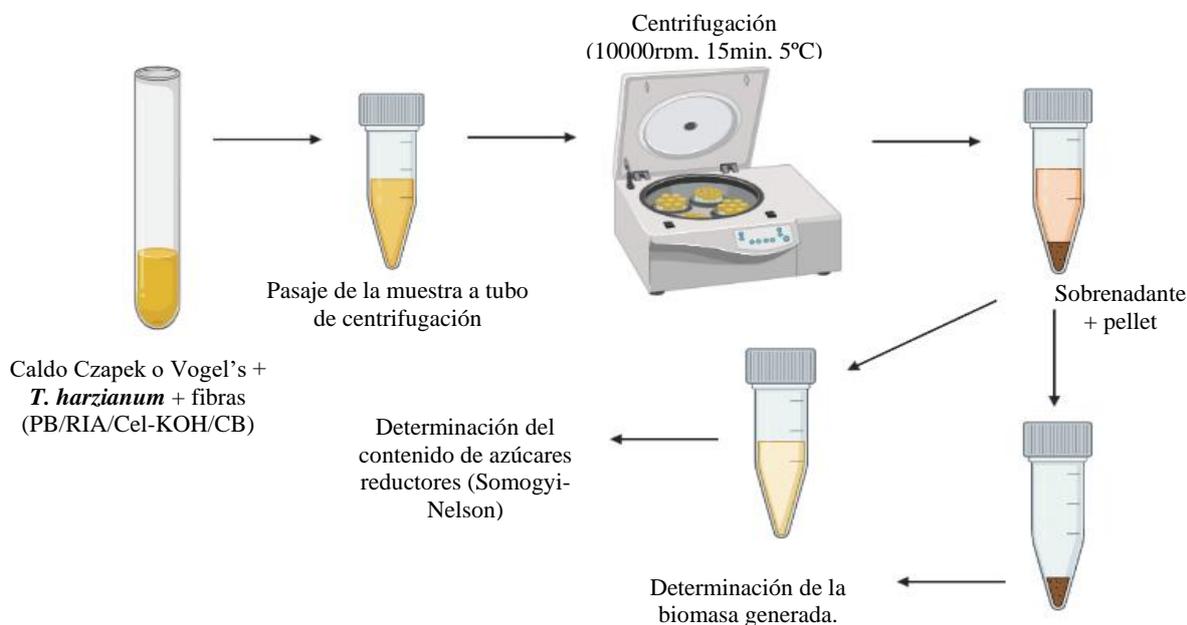
Donde  $d_h$  corresponde al halo de degradación luego del revelado y  $d_c$  es el diámetro de la colonia. Este parámetro es útil para evaluar la producción de celulasa por microorganismos en medios sólidos, dado que existe una correlación entre el diámetro degradativo y la capacidad de degradación (Díaz *et al.*, 2020 ; Coniglio *et al.*, 2017).

### 5.2.10.2. Evaluación cuantitativa de la acción enzimática

Los sistemas incubados (muestras inoculadas con las fibras y sus controles) fueron sometidos a centrifugación a 1000 rpm, por 15 minutos a 5°C, obteniéndose así una fase líquida, o sobrenadante, y el pellet conformado por las fibras, hifas y esporas, que precipitaron en el fondo del tubo.

El sobrenadante está constituido principalmente por el caldo de cultivo y los azúcares reductores liberados al medio, gracias a la acción de las celulasas -secretadas por el moho- sobre las fibras. Por lo tanto, fue separado mediante el empleo de una pipeta, con cuidado de no arrastrar parte del pellet, para luego cuantificar mediante la técnica de Somogyi-Nelson su contenido en azúcares reductores. En cuanto al pellet remanente, se determinó su peso para así estimar indirectamente el contenido de biomasa generado por el crecimiento del moho.

Para facilitar la comprensión, se puede ver diagramado en la Fig. 7 el proceso de centrifugación y las subsiguientes determinaciones.



**Figura 7.** Diagrama de flujo de trabajo para los análisis cuantitativos. Fuente: propia.

### 5.2.10.2.1. Determinación del contenido de azúcares reductores

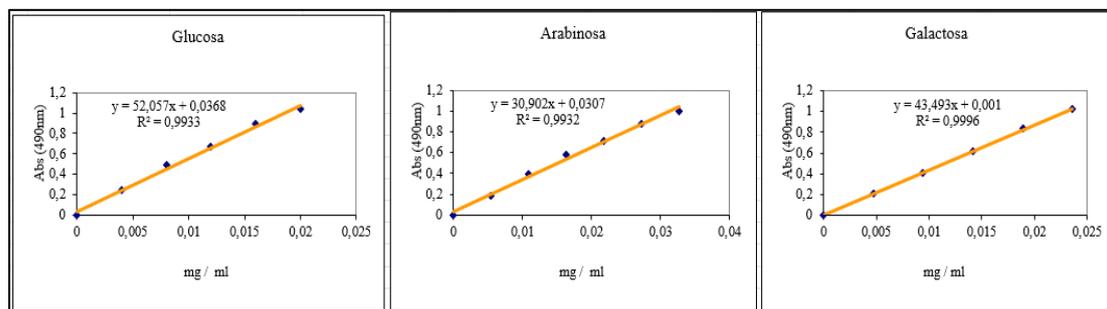
Los azúcares reductores (AR) son aquellos que poseen de manera intacta a su grupo funcional carbonilo y pueden ser glucosa, lactosa, fructosa, maltosa, entre otros. Estos azúcares pueden reaccionar como reductores a través del grupo funcional con otras moléculas que actúan como oxidantes (Lehninger, 1988). Son ampliamente utilizados en la industria formando parte de bioprocesos y fuentes principales en procesos de fermentación (Abbaszadeh y Hejazi, 2019).

Mediante el método de Somogyi-Nelson se determinaron los azúcares reductores de las distintas fracciones de fibras inoculadas con el caldo. Este método utiliza el potencial de reducción de la glucosa u otros monosacáridos para reducir el cobre contenido en el reactivo alcalino de Somogyi, el cual representa un complejo de óxido molibdeno ( $\text{MoO}_3$ ) con coloración azul que estará relacionado de manera proporcional con la cantidad de azúcar reductor que contiene la solución. Este método permite determinar azúcares reductores y no reductores en concentraciones bajas entre 20 a 180 mg/L, representando una técnica eficaz,

pero no específica de la concentración, dado que sus resultados son una medida aproximada (Nelson, 1994).

El procedimiento para esta etapa fue tomar 500 µl de muestra y se le agregó 500 µl de reactivo Somogyi. Luego, se llevaron los tubos a baño termostático a una temperatura constante de 100°C durante 15 minutos y, posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente para proceder con el agregado de 500 µl del reactivo de Nelson más 6 ml de agua bidestilada. Se procedió a agitación por vortex y posteriormente se pasó la solución a cubetas aptas para espectrofotometría de UV-Visible. Se midió la absorbancia de las muestras y sus controles, a una longitud de onda de 540 nm.

Cada muestra se midió por triplicado y para la realización de los cálculos se comparó el resultado de absorbancia contra curvas estándar de glucosa, arabinosa y galactosa (Fig. 8). Los resultados se expresan como mg de azúcar reductor/g de muestra.



**Figura 8.** Curvas estándar de glucosa, arabinosa y galactosa a partir de soluciones estándar.

Paralelamente, además de los controles usados como blanco de reactivos, se trabajó con controles de las fibras (medio más fibra), sin el agregado de *T. harzianum* LMR1. Estos controles se utilizarán para contemplar en los cálculos las posibles interferencias que puedan aportar las fibras al incubarse en el medio sin el moho. De este modo se podrá minimizar posibles errores por exceso al medir la absorbancia de las muestras.

### 5.2.10.2.2. Determinación de biomasa

Para la determinación de la biomasa seca se utilizaron los pellets, obtenidos en el ítem 5.2.10.2. y se procedió de acuerdo con lo detallado por *Ahamed y Vermette, (2009)* con algunas adaptaciones. Cada pellet formado por biomasa del moho más las fibras, se lavó con

agua destilada y se centrifugó (15 minutos, 5°C a 1000 rpm), se eliminó mediante una pipeta el agua de lavado y se repitió el proceso dos veces más.

En paralelo, se tomaron papeles de filtro y cristalizadores, los cuales fueron secados durante 30 minutos en estufa de convección a 105°C, y dejados enfriar hasta temperatura ambiente en desecadores. De este modo, se obtuvo el peso inicial del cristalizador y el papel de filtro seco (tara). A continuación, se colocaron en éstos los pellets lavados, y tras registrar su peso húmedo se introdujeron en la estufa de convección a 40°C. Se realizaron pesajes de las muestras (pellet más cristalizador con filtro), hasta llegar a peso constante. De acuerdo con lo mencionado en *Ahamed y Vermette, (2009)* se realizó el cálculo de la biomasa de forma indirecta empleando la Ec. 3.

$$\text{Peso micelio} = \text{Peso total de los sólidos} - \text{Peso total de fibra} \quad (3)$$

El peso de la biomasa fue calculado mediante la diferencia entre el peso seco total de los sólidos, comprendido por la biomasa desarrollada y las fibras (micelio y celulosa); y la masa conocida de fibra contenida en cada tubo.

### **5.2.11. Etapas para definir las condiciones óptimas de crecimiento y mayor esporulación de *Trichoderma harzianum***

Se detallan las distintas etapas del proyecto para elucidar las condiciones de desarrollo del moho y generación de enzimas, a partir de la inoculación de *Trichoderma harzianum* en los medios de cultivo propuestos utilizando las distintas fracciones de fibras vegetales y de origen bacteriano. Para ello, se tuvieron en cuenta distintos parámetros como la formulación del medio de cultivo, su consistencia, la concentración de fibra vegetal, tiempo de incubación y condiciones de luminosidad.

- I. Incubación del moho en condiciones de iluminación vs. oscuridad, en medios de cultivo PDA y Czapek agar: se utilizó el medio de cultivo PDA para evidenciar el desarrollo de *T. harzianum* LMR1 macroscópicamente. Para esto se incubó durante un tiempo de 7 y 14 días en condición de luminosidad y oscuridad. Basándose en los resultados, se comprobó lo obtenido con uno de los medios seleccionados:

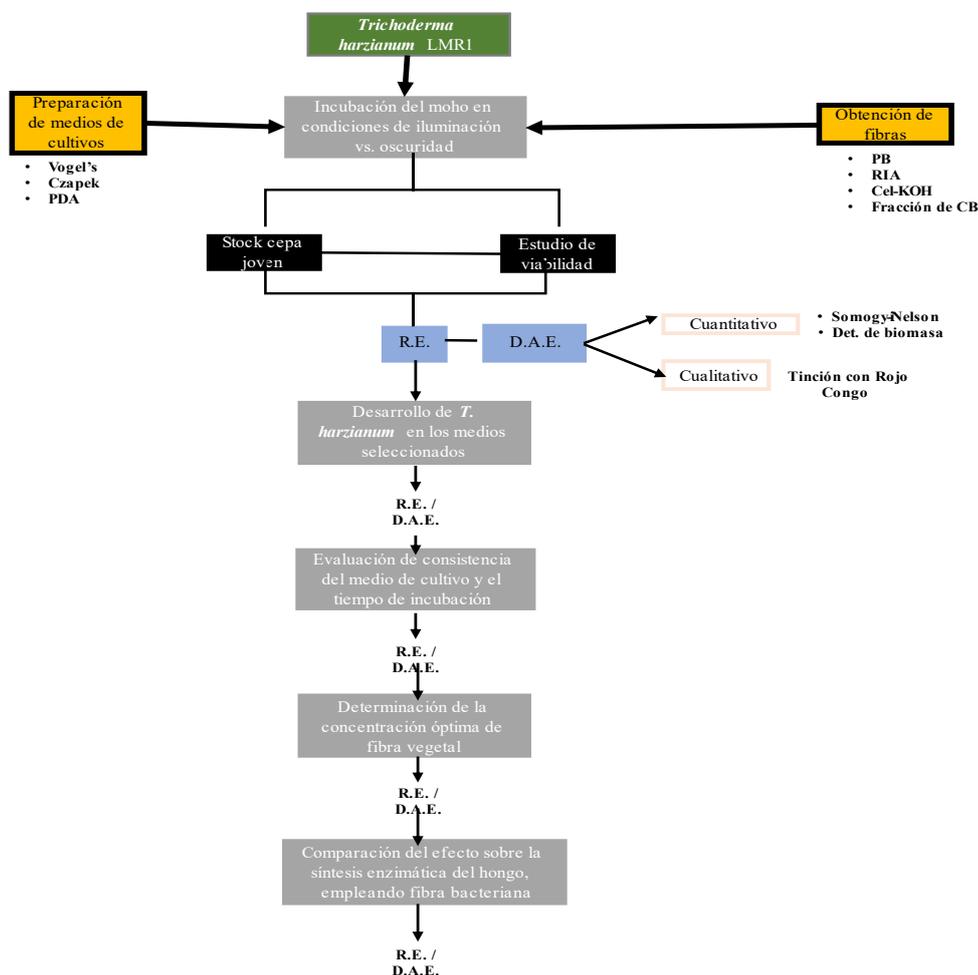
Czapek, frente a los mismos parámetros, pero utilizando como sustrato las fracciones de fibras vegetales propuestas (PB, RIA y Cel-KOH) en una concentración de 1,5% (p/p). Posteriormente se realizó el recuento de esporas correspondiente (ítem 5.2.7.3).

- II. Desarrollo de *T. harzianum* en los medios seleccionados: se evaluaron las condiciones de desarrollo del cultivo utilizando como única fuente de carbono las fracciones de fibras vegetales. Se emplearon los medios de cultivo agar Czapek y Vogel's inoculados con el hongo *Trichoderma harzianum* LMR1 a 25°C durante 7 días bajo luminosidad constante, con una concentración de cada fracción de fibra vegetal del 1,5% (p/p). Se realizaron análisis macroscópicos y cualitativos (ítem 5.2.10.1) para visualizar el desarrollo del hongo y determinar su actividad enzimática junto con el recuento de esporas (5.2.7.3).
  
- III. Evaluación de la consistencia del medio de cultivo y el tiempo de incubación: durante esta etapa y consecuente a los resultados obtenidos en la etapa anterior, las variables de estudio fueron el tiempo de incubación (4 y 7 días) y el medio de cultivo (Czapek y Vogel's), en consistencia líquida, con una concentración de fibra vegetal de 1,5% (p/p). Se realizaron análisis cualitativos para evaluar el desarrollo enzimático (ítem 5.2.10.1) y cuantitativos (5.2.10.2) para determinar la cantidad de esporas y azúcares reductores, resultantes de la acción de las enzimas sobre las fibras.
  
- IV. Determinación de la concentración óptima de fibra vegetal: La variable en estudio de esta etapa fue la concentración de fibra y el tiempo de incubación. Para esto se utilizó el medio de cultivo líquido tipo caldo Vogel's y Czapek incubados junto con el hongo a 25°C durante 4 y 7 días con una concentración de cada fracción de fibra vegetal del 2% (p/p). Se realizó el recuento de esporas y se determinó la cantidad de azúcares reductores como índices de seguimiento del desarrollo y generación de enzimas de *T. harzianum*. Para poder realizar una conclusión parcial sobre una de

las fracciones de las fibras empleadas, se prepararon placas con medio agar Vogel's con una concentración de fracción de fibra de 2% (p/p). Luego de incubar tanto las placas de Petri como los tubos de ensayo con los medios y a temperatura correspondiente se repitieron los análisis cualitativos (ítem 5.2.10.1), cuantitativos (5.2.10.2) y recuento de esporas (5.2.7.3).

- V. Comparación del efecto sobre la síntesis enzimática del hongo, empleado fibra bacteriana: a fines de comparar el efecto de una fibra de origen bacteriana respecto de la fibra vegetal sobre la síntesis de enzimas por parte de *T. harzianum*, durante esta etapa se utilizó la fibra bacteriana (CB) mencionada en el ítem 5.2.9 como sustrato. Se utilizaron los medios de cultivo líquidos Vogel's y Czapek incubados junto con el hongo a 25°C, bajo luminosidad, durante 4 y 7 días con una concentración de CB del 2% (p/p). De acuerdo con las condiciones óptimas establecidas en los ensayos anteriores.

Por último, para facilitar la comprensión, en el siguiente diagrama se muestra la ruta de trabajo llevada a cabo en este proyecto y detallada en esta sección (Fig. 9).



**Referencias:**

R.E. : Recuento de esporas en cámara de Neubauer  
D.A.E.: Determinación de la Actividad Enzimática

**Figura 9.** Diagrama completo de flujo de trabajo por etapas.

### 5.2.12. Análisis estadístico de los resultados

Se realizó un análisis estadístico para los resultados obtenidos del recuento de esporas, determinación de masa y azúcares reductores (Anexo A-B). Todos los análisis fueron efectuados utilizando el software estadístico *Infostat*, *FCA*, *Universidad de Córdoba*. A partir

de los resultados, se realizó un Análisis de la Varianza (ANOVA) y posterior Prueba Tukey en los casos que se estudiaron los supuestos y los mismos se cumplían, y ANOVA no paramétrico (Kruskal Wallis) y comparación de a pares en aquellos casos que los supuestos no se cumplían y así comprobar las diferencias significativas entre los parámetros a optimizar: los medios de cultivo empleados, las fracciones de fibra vegetal, concentración y tiempos de incubación. A continuación, se detallan los supuestos necesarios de la prueba:

- La escala de la variable debe ser al menos de un intervalo.
- Las muestras deben ser aleatorias.
- Se debe cumplir el supuesto de normalidad en todos los grupos.
- Se debe cumplir el supuesto de homocedasticidad en todos los grupos.

Se debe mencionar que a lo largo de este análisis se empleó un nivel de significancia de 0,05% y un intervalo de confianza del 95% ( $p_v < 0,05$ ).

## 6. Resultados

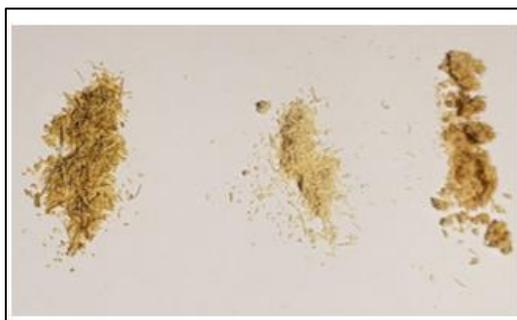
### 6.1. Fracciones de fibras vegetales y composición química

En primera instancia y como se mencionó en la sección de Materiales y Métodos (ítem 5.2), la primera fracción de fibra vegetal obtenida es la correspondiente al polvo de brácteas (PB) que presenta un tamaño de partícula promedio de 210 $\mu$ m y una coloración marrón claro. Según los resultados obtenidos en *Bernhardt et al., (2019)*, el 31% del PB es hidrosoluble, mientras que el 69% restante está constituido, principalmente, por un 85% de carbohidratos reductores y un 10,8% de proteínas. A su vez, de los carbohidratos reductores, un 29% corresponde a fructosa, un 48% a glucosa libre y el resto a sorbitol.

Como se mencionó anteriormente, a partir del PB mediante extracción alcohólica se obtuvo la fracción de fibra RIA la cual presenta un 57% de polisacáridos no celulósicos, un 26% de celulosa, un 7% de lignina y un 5% de ácidos úricos (*Bernhardt et al., 2019*). Con respecto a su color y textura, el RIA es más blanquecino en comparación con el PB y presentó un tamaño de partícula promedio similar ( $\approx 210\mu$ m).

La última fracción de fibra fue obtenida a partir del RIA mediante un pretratamiento con hidróxido de potasio (KOH) 24% (p/v), el cual permitió a remoción casi en su totalidad de la fracción de hemicelulosa quedando remanente el residuo enriquecido en celulosa, llamado Cel-KOH. Este último presenta contenido en hidratados de carbono no-celulósicos del 51,45%, de celulosa un 40,68% y lignina 7,87% (Bernhardt *et al.*, 2019). Esta fracción presenta un aspecto distinto a las anteriores dado que tiene un color marrón oscuro y su textura se encuentra apelmazada y compactada con un tamaño de partícula promedio mayor a 210  $\mu\text{m}$ .

Por lo tanto, se trabajará con las tres fracciones de fibras vegetales de las brácteas del maíz descritas. Donde PB corresponde al polvo de brácteas de maíz molidas, y contienen tanto compuestos solubles en agua (polisacáridos libres: glucosa, fructosa), como también los principales biopolímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina. El RIA, resultado de la extracción alcohólica en caliente, se haya libre de solutos solubles y enriquecido por lo tanto en los biopolímeros de pared celular. Mientras que Cel-KOH, presenta un mayor contenido de celulosa, ya que la hemicelulosa se ha eliminado en el tratamiento alcalino aplicado sobre el RIA. A fines didácticos, en la siguiente Fig. 10 se pueden visualizar las diferencias de color y textura entre las fracciones de fibras vegetales.



**Figura 10.** Fracciones de fibras obtenidas, corresponde de izquierda a derecha PB, RIA y Cel-KOH.

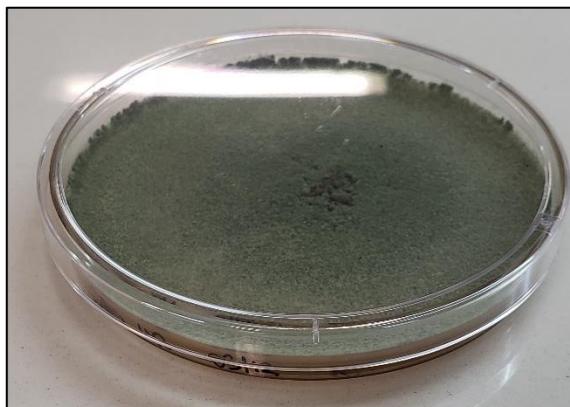
## 6.2. Incubación del moho en condiciones de iluminación vs. Oscuridad, en medios PDA y Czapek agar

### 6.2.1. Inoculación en medio PDA y observación macroscópica

Luego de la inocular al hongo *Trichoderma harzianum* LMR1 en medio general PDA durante 7 días, 25°C y en oscuridad, se observó el desarrollo de un micelio vegetativo color blancuzco y de baja densidad. Al no apreciarse un micelio reproductivo, el cual se podría visualizar con coloración verde, esto indica que el moho no llegó a su fase de esporulación, reflejado por su poca densidad y su coloración blanquecina, vinculada a estructuras resistentes (Ramos Guizado, 2022). Al final del periodo de incubación (14 días en total), en las placas de PDA no se observó crecimiento.

A continuación, se repitieron las condiciones de incubación en medio PDA, a 25°C, pero en este caso bajo iluminación artificial constante (durante las 24hs.).

Tal como se informa en *Mesa-Venegas et al., (2019)* durante el principio de desarrollo del hongo en medio PDA se pueden observar pigmentos blanquecinos, que luego se tornarán a verde o amarillento con esporulación densa, con insertos de conidios en tonalidades verdosas y una textura pulvurenta. Por lo tanto, luego de la incubación del hongo en medio PDA durante 7 días, bajo iluminación constante, a 25°C, se pudo confirmar que el moho alcanzó su fase reproductiva al observarse la placa cubierta en su totalidad por micelio color verde (Fig. 11).



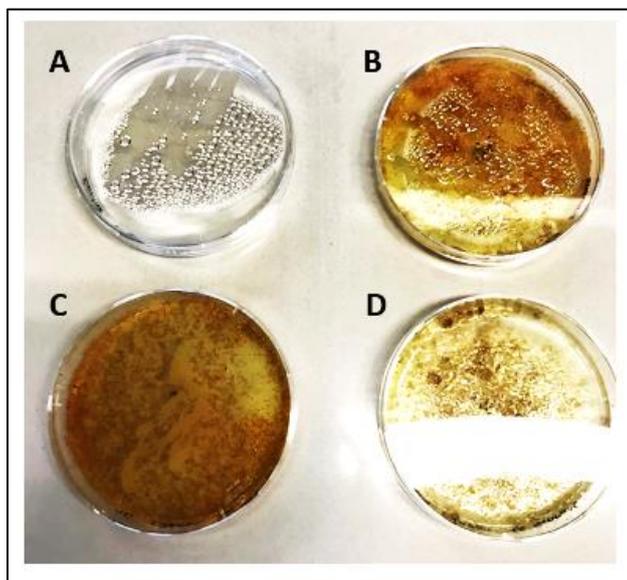
**Figura 11.** *Trichoderma harzianum* crecido en placa de Petri con medio de cultivo PDA, incubado 7 días, a 25°C e iluminación constante.

En este caso, no fue necesario continuar incubando hasta alcanzar los 14 días, ya que el moho alcanzó su fase de esporulación, necesaria para el desarrollo de este trabajo.

## 6.2.2. Inoculación del moho en medio Czapek agar, con adición de fibras vegetales (1,5% p/p)

A partir de lo observado en el punto anterior, se repite la experiencia bajo las mismas condiciones de incubación (25°C, 7 y 14 días, con y sin iluminación), pero empleando el medio de cultivo sólido Czapek, con la adición de las fibras vegetales como única fuente de carbono, en una proporción de 1,5g fibra cada 100g de agar (1,5% p/p). El medio de cultivo Czapek sólido fue preparado tal como se describe en el ítem 5.2.6.1, con un pH igual a 7,3.

Luego de inocular al microorganismo y de transcurrido el tiempo de incubación de 7 días (25°C, en oscuridad), se pudo observar un desarrollo del hongo poco significativo en el control y en las muestras de PB, RIA y Cel-KOH. Se aprecia que predomina en todas las muestras exceptuando el control, la coloración marrón perteneciente al medio y con las fibras utilizadas. Además, no se aprecian pigmentos verdes ni esporulación densa (Fig. 12).



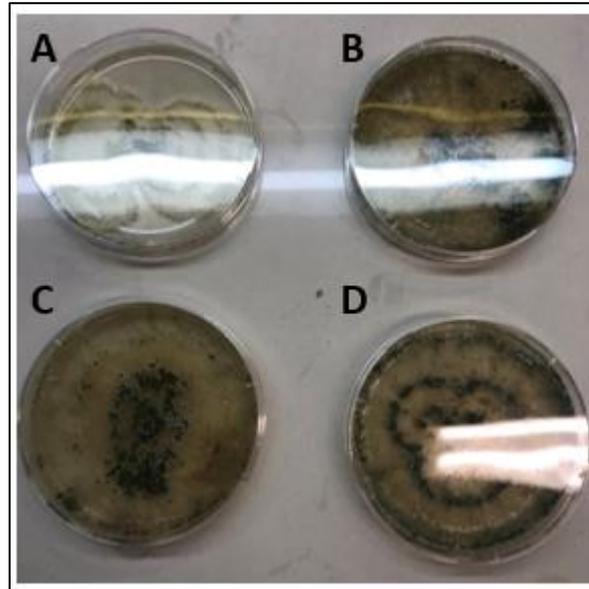
**Figura 12.** Placas de Petri con medio Czapek agar, inoculadas con *Trichoderma harzianum* LMR1 y las distintas fracciones de fibras (B-D). Se incubó por 7 días a 25°C en oscuridad. A) Control; B) PB; C) RIA; D) Cel-KOH.

Para brindar un mayor detalle se puede visualizar en la Fig. 13, que las únicas muestras que presentaron un desarrollo, aunque poco notable, son aquellas de la fracción de fibra vegetal PB inoculadas con el hongo. El crecimiento del moho se produce de forma radial a lo largo de la placa, y se observa un leve crecimiento de pigmentación blanquecina.



**Figura 13.** Placa de Petri con medio Czapek agar inoculada con hongo *Trichoderma harzianum* LMR1 y fibra PB por 7 días a 25°C, en condición de oscuridad. Corresponde a PB anverso (izquierda) y reverso (derecha).

Como se puede observar en la Fig. 14, el tiempo de incubación de 14 días permitió un desarrollo apreciable de *Trichoderma harzianum*, si bien puede visualizarse una baja densidad de micelio reproductivo (color verde), tanto los controles como las muestras de PB, RIA y Cel-KOH mostraron un crecimiento del micelio vegetativo mayor a las muestras incubadas durante 7 días, aunque la cantidad no logra cubrirse la superficie de la placa en su totalidad.



**Figura 14.** Placas de Petri con medio Czapek inoculadas con hongo *Trichoderma harzianum* LMR1 y fibras (14 días, 25°C, en oscuridad). A) Control; B) PB; C) RIA y D) Cel-KOH.

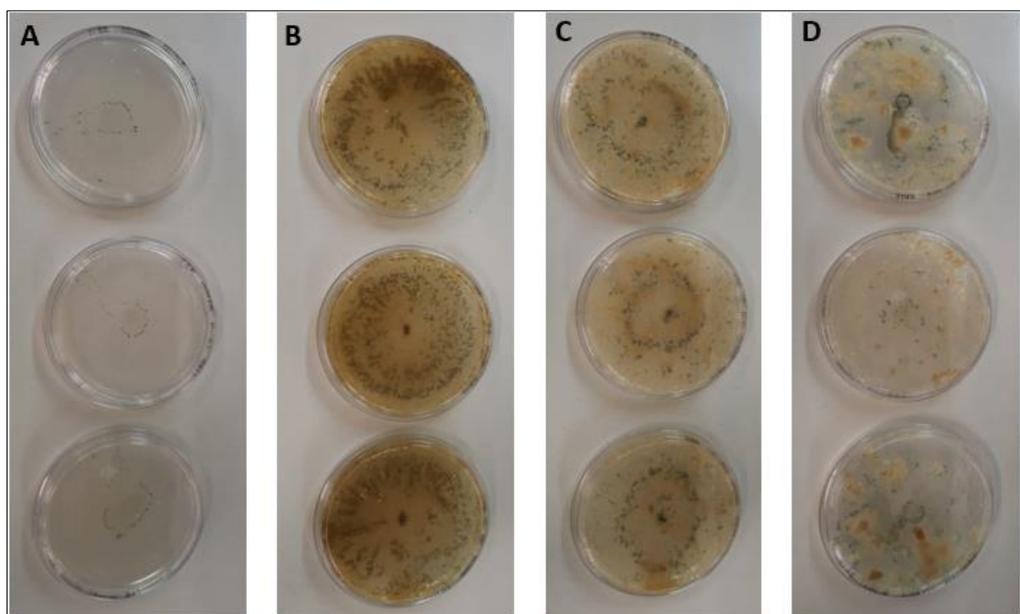
En la Fig. 14B, el hongo cubre aproximadamente la mitad de la superficie, presentando un color verde oscuro. En cambio, se visualiza en la Fig. 14C, que el microorganismo crece de forma radial, con un color verde oscuro ocupando un tercio de la superficie. Mientras que, en la Fig. 14D, el desarrollo también se produce radialmente. Pueden apreciarse tres colonias superpuestas en el centro, lo cual puede atribuirse al método de siembra utilizado.

Puntualmente, en la muestra control de medio de cultivo sólido Czapek incubada durante 14 días puede percibirse un crecimiento radial del hongo, pero en muy baja proporción (Fig. 15).



**Figura 15.** Placa de Petri control con medio Czapek inoculada con hongo *Trichoderma harzianum* LMR1 por 14 días a 25°C bajo oscuridad.

Tal como se realizó bajo oscuridad, se repitió lo ensayado con medio de cultivo sólido Czapek, pero bajo exposición de luz constante. En términos generales, se visualizó un aumento en la concentración de *Trichoderma harzianum* en las muestras. En este sentido, las placas con Czapek agar, visibles en la Fig. 16, como el control (Fig. 16A) no presenta crecimiento, aunque se puede observar un desarrollo radial con pigmentación verdosa en las muestras de PB y RIA (Fig. 16B y 16C). Contrariamente, las muestras de fibra vegetal Cel-KOH presentan un menor crecimiento e irregular (Fig. 16D).



**Figura 16.** Placas de Petri con medio Czapek inoculadas con *T. harzianum* LMR1 (7 días, 25°C, con luz artificial). A) Control; B) PB; C) RIA; D) Cel-KOH.

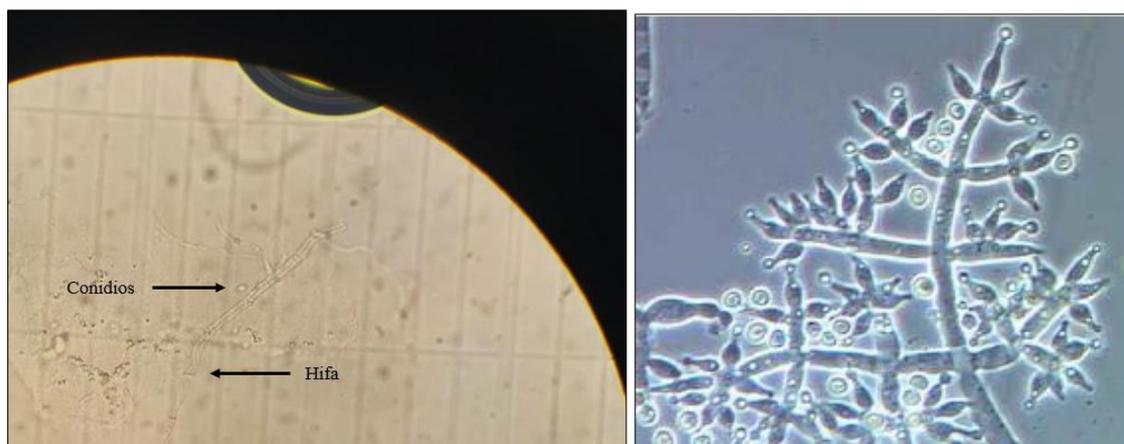
Para facilitar la interpretación, en la Tabla IV se describen los resultados obtenidos durante esta etapa exploratoria mediante el análisis macroscópico de las muestras incubadas.

**TABLA IV.** Resultados obtenidos durante la etapa exploratoria luego de la incubación de *Trichoderma harzianum* en los medios PDA y Czapek agar, a 25°C.

Condiciones de incubación		Medio de cultivo	Desarrollo de micelio vegetativo
Oscuridad	7 días	PDA	No se observa.
	14 días	PDA	No se observa.
	7 días	Czapek	No se observa.
	14 días	Czapek	Se observa un leve desarrollo.
Iluminación constante		PDA	Se observa un desarrollo abundante.
7 días		Czapek	Se observa un leve desarrollo.

### 6.2.3. Comprobación del desarrollo y recuento de esporas

Empleando un microscopio óptico, se investigó la presencia de conidióforos, fiálides y conidios, en todas las muestras incubadas, confirmando así que el moho haya alcanzado su etapa reproductiva asexual (esporulación), tal como se muestra en la Fig. 17.



**Figura 17.** *T. harzianum* bajo microscopio óptico donde se evidencia el crecimiento temprano de conidióforos ramificados que desarrollan conidios (izquierda, fuente: propia y derecha fuente: Ipiáides-Juma *et al.*, 2021).

En las placas donde macroscópicamente se pudo notar un desarrollo de micelio reproductivo de color verde, se procedió a realizar el recuento de esporas mediante cámara de Neubauer, de acuerdo con lo descrito en el ítem 5.2.7.3. Se cuantificó la producción de esporas en las placas de PDA inoculadas e incubadas bajo iluminación constante, así como también, en las placas de Czapek, dado que se apreció un desarrollo del moho considerable para realizar el recuento.

Consecuente, se cuantificó un promedio de  $2,28(\pm 0,95) \times 10^7$  esporas/ml luego de incubar *Trichoderma harzianum* en medio PDA bajo iluminación constante (7 días, 25°C). Cabe resaltar que no se realizó esta cuantificación en las placas con PDA incubadas en oscuridad (7 y 14 días), ya que no se apreció desarrollo de un micelio reproductivo verde, ni se detectó desarrollo de esporas en las mismas.

Por otro lado, se realizó un recuento de esporas sobre el control y las muestras de fibras en Czapek (7 días, 25°C, en oscuridad), donde se obtuvo una media de  $4,40(\pm 0,28) \times 10^6$

esporas/ml para el control,  $4,80(\pm 1,98) \times 10^6$  esporas/ml para PB,  $1,08(\pm 0,23) \times 10^7$  esporas/ml para RIA y  $1,53(\pm 1,20) \times 10^6$  esporas/ml para Cel-KOH. Concluyendo, las muestras de PB y RIA fueron las más influyentes sobre la generación de esporas, ya que las muestras de Cel-KOH arrojaron valores muy similares al control ( $p_v > 0,05$ ).

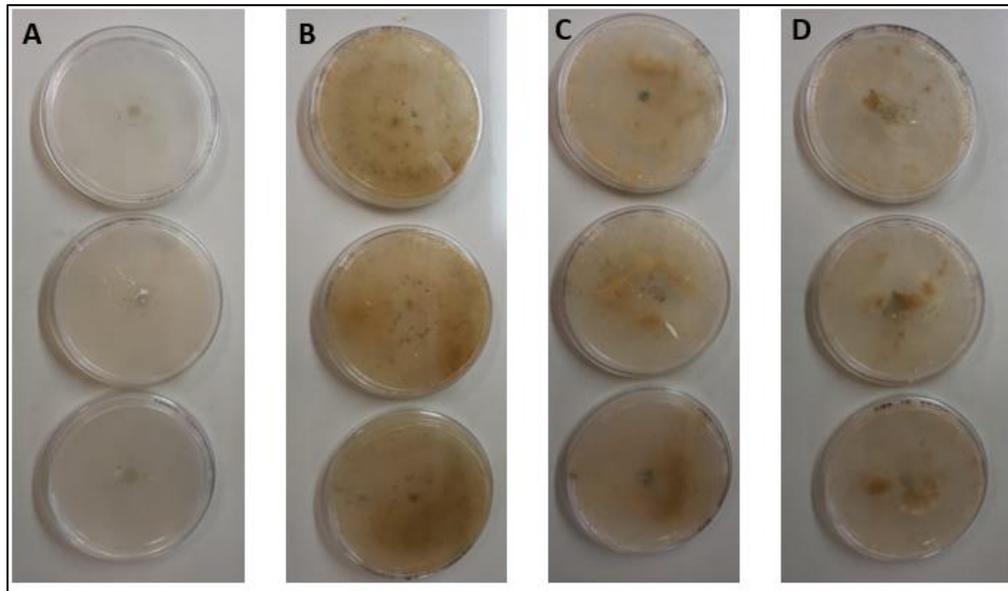
En cuanto a las muestras incubadas en medio Czapek bajo iluminación constante (7 días, 25°C), se determinó un promedio de  $5,86(\pm 3,25) \times 10^4$  esporas/ml para el control,  $2,75(\pm 0,30) \times 10^6$  esporas/ml para las muestras de PB,  $1,37(\pm 0,63) \times 10^6$  esporas/ml para RIA y  $3,46(\pm 0,29) \times 10^5$  esporas/ml para las muestras de Cel-KOH. En este caso, se puede apreciar que las fibras PB fueron las que mayor producción de esporas generaron, seguidas por RIA. Los resultados obtenidos en Czapek, al incubar tanto en oscuridad como bajo iluminación constante, muestran un número de esporas menor a lo obtenido con medio PDA.

Consecuentemente, se decidió continuar las siguientes experiencias con los parámetros de 4 y 7 días de incubación, y la condición de exposición a la luz artificial de manera constante.

### 6.3. Desarrollo de *T. harzianum* en los medios Czapek vs. Vogel's

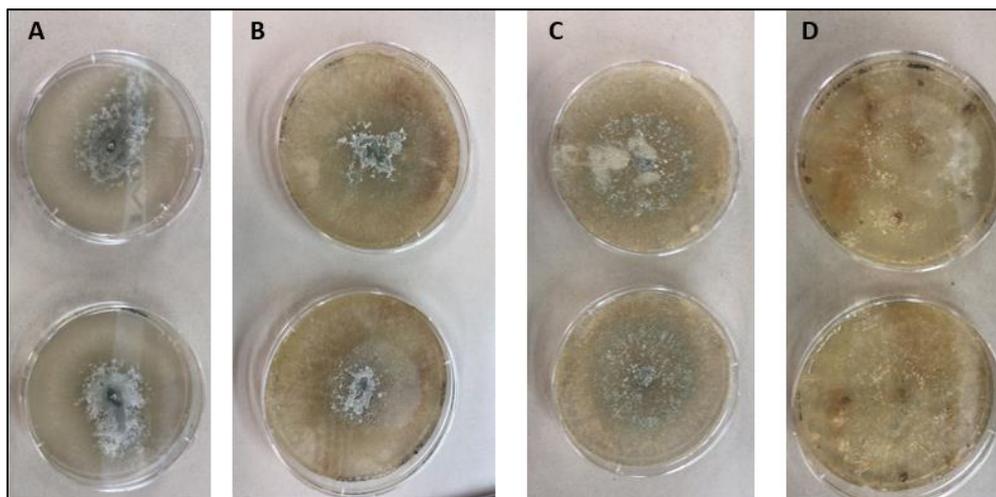
La importancia de esta etapa radicó en la evaluación de *Trichoderma harzianum* a partir de una estimación macroscópica del crecimiento y desarrollo del micelio vegetativo, mejorando parámetros de incubación e inoculando al hongo con las fracciones de fibras vegetales en una concentración de 1,5% (p/p) utilizando los medios de cultivo Czapek y Vogel's.

Se comenzó por incubar *T. harzianum* en medio Czapek agar durante un período de 4 días a una temperatura de 25°C y bajo condición de luz artificial constante. En la Fig. 18 (A-D) puede apreciarse que tanto en las muestras control, como las que corresponden a las fracciones de fibras vegetal PB, RIA y Cel-KOH (1,5% p/p) no hubo un desarrollo considerable del hongo. En ninguna de las muestras incubadas pudo notarse la coloración verde-amarillenta relacionada al desarrollo óptimo del moho vegetativo.



**Figura 18.** Placas de Petri con medio Czapek inoculadas con hongo *T. harzianum* LMR1 por 4 días a 25°C con luz artificial. A) Control; B) PB; C) RIA; D) Cel-KOH

Entre tanto, las muestras con medio de cultivo Vogel's agar se desarrollaron tal como demuestra la Fig. 19 (A-D). Se aprecia su crecimiento micelial de color verde-blanquecino con una textura algodonosa.



**Figura 19.** Placas de Petri con medio Vogel's inoculadas con hongo *Trichoderma harzianum* LMR1 y fibras (4 días, 25°C, luz artificial). A) Control; B) PB; C) RIA; D) Cel-KOH.

Al comparar el desarrollo del moho en placas entre las muestras control, junto con las inoculadas con las fracciones de fibras PB y RIA, no se observa ninguna diferencia notoria. Sin embargo, y tal como se visualiza en Fig. 19D, el desarrollo de *Trichoderma harzianum* es prácticamente nulo en las placas con fibras Cel-KOH. Es posible apreciar un mayor desarrollo en aquellas muestras con fracción de fibra PB (Fig. 19B), en comparación con las muestras de RIA (Fig. 19C).

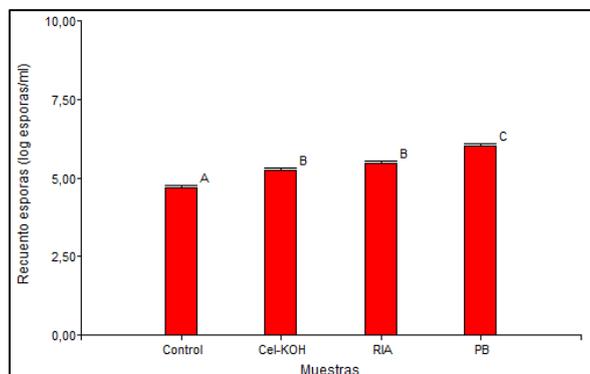
Adicionalmente, se repitió esta experiencia empleando ambos medios, para un tiempo de incubación de 7 días (25°C, con luz). Lo que respecta a las muestras con medio de cultivo Czapek, los resultados están detallados en el ítem 6.2.2. En cuanto a las muestras correspondientes al medio de cultivo Vogel's, se apreció una esporulación densa y micelio vegetativo de color verde en todas sus muestras (control, PB, RIA), exceptuando a las de las fibras de Cel-KOH que el desarrollo es menor.

### 6.3.1. Recuento de esporas producidas en los medios Czapek vs. Vogel's agar

Luego de obtener los resultados macroscópicos de las placas de Petri, se procedió a realizar el recuento de esporas tal como se describe en el ítem 5.2.7.3, la totalidad de los resultados se pueden visualizar en el Anexo A.

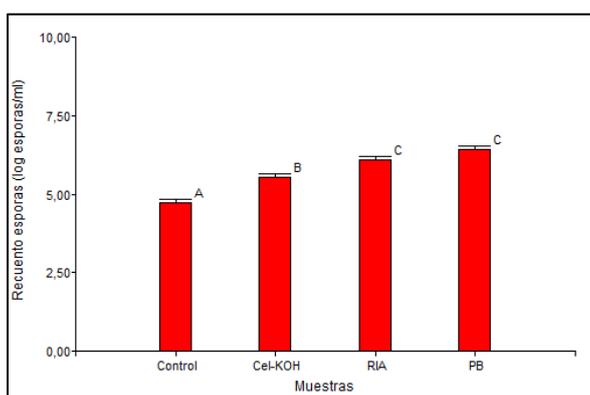
El recuento de esporas/ml más elevado en agar Czapek es el de las muestras de PB, siendo de  $2,75(\pm 0,29) \times 10^6$  esporas/ml luego de un tiempo de 7 días. Mientras que para las muestras con medio de cultivo Vogel's la mayor cantidad de esporas es la muestra del control a los 7 días, con un número de  $3,58(\pm 0,77) \times 10^7$  esporas/ml (Anexo A, Tabla IX).

Dentro este análisis, el periodo de incubación de 4 días presenta el menor número de esporas/ml de todas las muestras. De acuerdo con las fracciones de fibras de Cel-KOH y RIA, sus recuentos de esporas no son significativamente distintos ( $p_v > 0,05$ ), siendo mayor el recuento de esporas correspondiente a las fibras de PB. Estos resultados se pueden visualizar en la Fig. 20.



**Figura 20.** Recuento de esporas de las placas con Czapek agar, incubadas durante 4 días con una concentración de fibras vegetales (PB, RIA y Cel-KOH) de 1,5% (p/p). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p_v < 0,05$ ) entre las muestras de fibras.

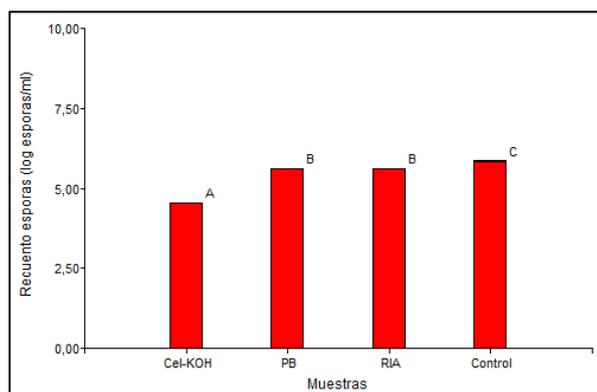
Para un periodo de incubación de 7 días, la muestra de PB no presenta diferencias significativas ( $p_v > 0,05$ ) con la muestra de RIA, aunque sí con el control y Cel-KOH. Por otro lado, el número más bajo fue el del control, ya que mostraron el menor impacto sobre el desarrollo del moho, ya que incubando durante más días el aumento de generación de esporas es mínimo (Fig. 21).



**Figura 21.** Recuento de esporas de las placas con Czapek agar, incubadas durante 7 días con una concentración de fibras vegetales (PB, RIA y Cel-KOH) de 1,5% (p/p). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p_v < 0,05$ ) entre las muestras de fibras.

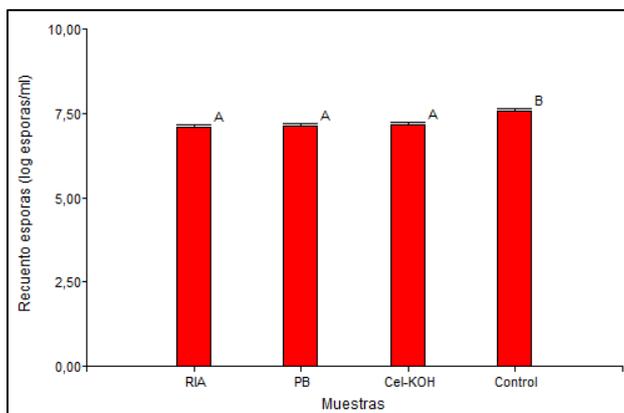
En cuanto a las placas incubadas en medio agar Vogel's, los resultados del recuento de esporas/ml obtenidos luego de incubar 4 y 7 días se muestran en el Anexo A, Tabla IX.

En este caso la influencia del período de incubación sobre el crecimiento de *T. harzianum* fue más notoria. El número de esporas aumenta significativamente con un tiempo de 7 días. Realizando una comparación entre muestras incubadas por 4 días, el control presenta el mayor desarrollo de esporas, seguido por PB y RIA ( $p_v > 0,05$ ) y, por último, la fracción de Cel-KOH. Este resultado se encuentra asociado al desarrollo del hongo en el medio agar Vogel's, el cual frente a la no-utilización de un sustrato adicional, como las fracciones de fibra vegetal, permite un crecimiento del microorganismo en mayor proporción (Fig. 22).



**Figura 22.** Recuento de esporas de las placas con Vogel's agar, incubadas durante 4 días con una concentración de fibras vegetales (PB, RIA y Cel-KOH) de 1,5% (p/p). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p_v < 0,05$ ) entre las muestras de fibras

Los resultados obtenidos luego de incubar las muestras en agar Vogel's durante 7 días se muestran en la Fig. 23. Se puede ver que el control presenta el número de esporas significativamente distinto a los obtenidos para PB, RIA y Cel-KOH, las cuales arrojaron valores similares entre sí. Las muestras de Cel-KOH presentan un valor similar a las de PB y RIA.



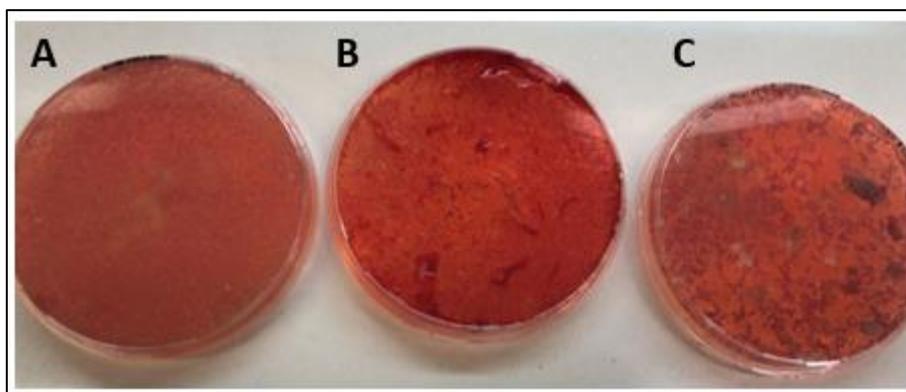
**Figura 23.** Recuento de esporas de las placas con Vogel's agar, incubadas durante 7 días con una concentración de fibras vegetales (PB, RIA y Cel-KOH) de 1,5% (p/p). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p_v < 0,05$ ) entre las muestras de fibras

Realizando una comparación entre muestras incubadas por 4 días, el control presenta el mayor desarrollo de esporas, seguido por PB y RIA y, por último, la fracción de Cel-KOH. Se apreció que el número de esporas calculado para las muestras en ambos medios de cultivo aumentó notablemente cuando se cambió el tiempo de incubación de 4 a 7 días.

### 6.3.2. Evaluación de la acción enzimática de *T. harzianum*

Aquellas muestras incubadas expuestas a la luz artificial en un tiempo de 4 y 7 días con medio de cultivo Czapek agar fueron sometidas a la técnica de tinción de Rojo Congo según lo que se describe en el ítem 5.2.10.1

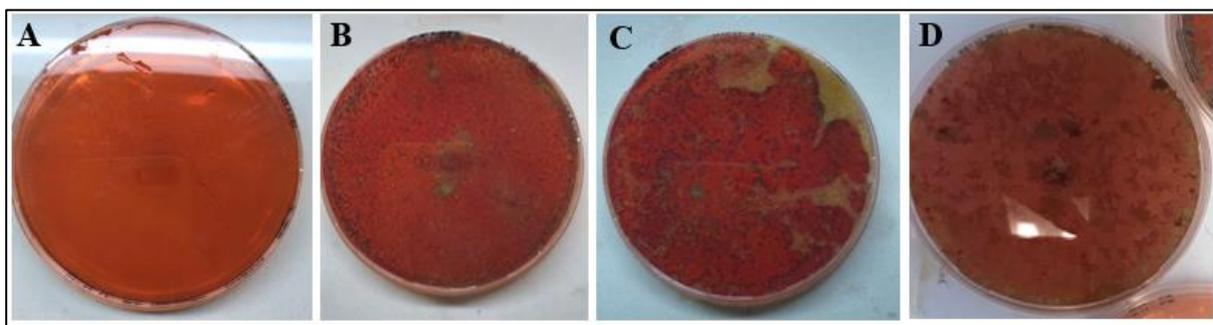
Las muestras fueron incubadas durante 4 días (Fig. 24). Como no fue posible visualizar el halo de degradación enzimática, no se realizó el cálculo del Coeficiente de Degradación de Celulosa (CDC) (3). La muestra correspondiente al control no es reportada en imágenes dado que no hubo crecimiento del hongo.



**Figura 24.** Placas de Petri con medio Czapek agar inoculadas con hongo *Trichoderma harzianum* LMR1 y fracciones de fibras, incubadas por 4 días (25°C con luz artificial), teñidas con Rojo Congo. A) PB, B) RIA y C) Cel-KOH.

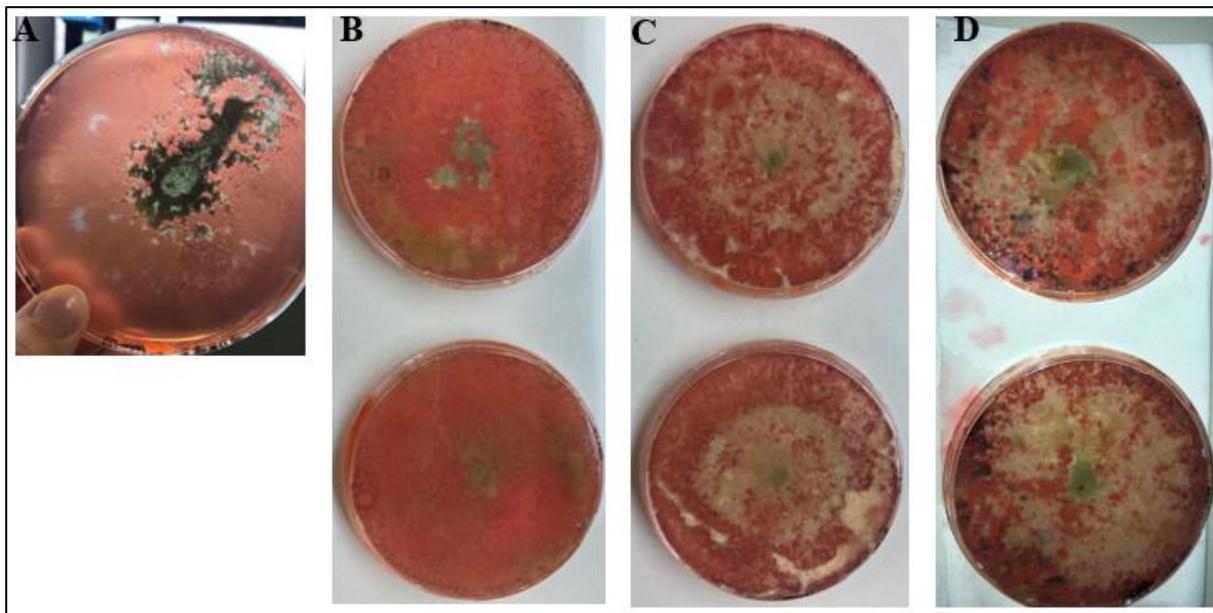
Por lo tanto, al no apreciarse un halo de degradación, no puede afirmarse que a los 4 días de incubación el moho haya secretado enzimas celulolíticas.

Por otra parte, en las muestras incubadas durante 7 días tampoco se pudo calcular el CDC ya que no es posible visualizar un halo de degradación bien definido (Fig. 25).



**Figura 25.** Placas de Petri con medio Czapek agar inoculadas con hongo *Trichoderma harzianum* LMR1 y fracciones de fibras, incubadas por 7 días (25°C con luz artificial), teñidas con Rojo Congo. A) Control, B) PB, C) RIA y D) Cel-KOH

Sin embargo, a los 7 días de incubación se puede apreciar la degradación del colorante Rojo Congo, al diferenciarse algunas zonas decoloradas. Por otro lado, para las muestras de Vogel's agar se obtuvieron resultados frente a la incubación de un tiempo de 4 días (Fig. 26).



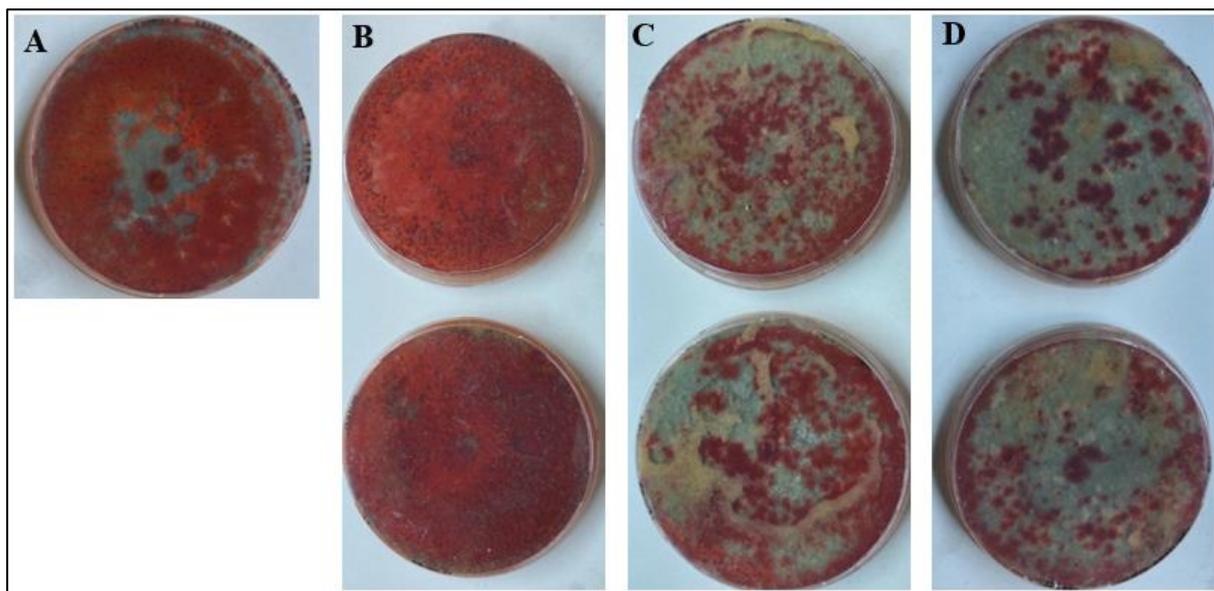
**Figura 26.** Placas de Petri con medio Vogel's agar inoculadas con hongo *Trichoderma harzianum* LMR1 y fracciones de fibras, incubadas por 4 días (25°C con luz artificial), teñidas con Rojo Congo. A) Control, B) PB, C) RIA y D) Cel-KOH.

Se logró obtener un halo de degradación vinculado a la actividad enzimática del hongo. El aspecto de este halo es de color blanquecino, destacado frente al color rojizo adoptado por el medio de cultivo luego de aplicar la técnica y relacionado al color característico del reactivo Rojo Congo. Adicionalmente, se mantiene el color verde-amarillento de la colonia de *Trichoderma harzianum*. Dado que en estas se logró visualizar el halo de degradación, se realizó el cálculo del CDC, cuyos resultados se muestran en la (ver Tabla V).

**TABLA V.** Resultados para CDC de las muestras con medio Vogel's agar incubadas 4 y 7 días con exposición a la luz (25°C).

Muestra	CDC para Vogel's (4 días)	CDC para Vogel's (7 días)
Control	0	0
PB	1,15	1,29
RIA	1,20	1,25
Cel-KOH	1,33	1,33

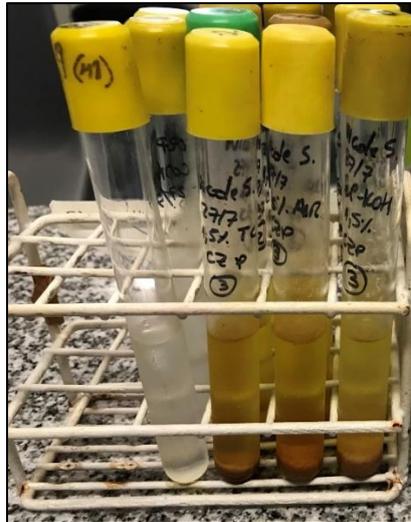
Las placas que contienen medio de cultivo Vogel's incubadas por 4 y 7 días permitieron el cálculo de CDC, donde el número más elevado lo presenta la fracción de fibra Cel-KOH en ambos tiempos (ver Tabla V). Con respecto a las muestras incubadas por 7 días, se observa un halo de degradación mucho más acentuado en las muestras de RIA y Cel-KOH (Fig. 27C-D), no así para aquellas que tenían la fracción de fibra PB (Fig. 27B).



**Figura 27.** Placas de Petri con medio Vogel's agar inoculadas con hongo *Trichoderma harzianum* LMR1 y fracciones de fibras, incubadas por 7 días (25°C con luz artificial), teñidas con Rojo Congo. A) Control, B) PB, C) RIA y D) Cel-KOH.

#### 6.4. Evaluación de la consistencia del medio de cultivo y el tiempo de incubación

Para continuar con las pruebas de esta etapa, se trabajó con los medios de cultivo en estado líquido Czapek y Vogel's. A simple vista, no se aprecia desarrollo del hongo *Trichoderma harzianum* dentro de los tubos control, ni en aquellos que contienen las fracciones de fibra vegetal (Fig. 28-29). La turbidez del medio de cultivo puede deberse a su formulación, los compuestos solubles que aportan las fibras y al posible crecimiento del moho, que conlleva a la formación de hifas, conidióforos y conidios. Por otro lado, las muestras incubadas por 7 días en caldo Czapek, no difieren al tiempo de 4 días, tampoco se aprecia desarrollo del micelio vegetativo.



**Figura 28.** Medio Czapek caldo, inoculado con *T. harzianum*, conteniendo las fracciones de fibra vegetal, e incubado durante 4 días (25°C, luz constante). De izquierda a derecha corresponde: control, PB, RIA y Cel-KOH.



**Figura 29.** Medio Vogel's caldo, inoculado con *T. harzianum*, conteniendo las fracciones de fibra vegetal, e incubado durante 4 días (25°C, luz constante) (izquierda) y medio Vogel's caldo para muestra de fracción de fibra vegetal RIA (derecha).

Adicionalmente, en la Fig. 29, se puede observar detalladamente la adherencia del hongo a la fibra vegetal en la parte superior del medio. El moho desarrollado presenta en su superficie expuesta al aire, una pigmentación de color verde-blanquecino, correspondiente a la

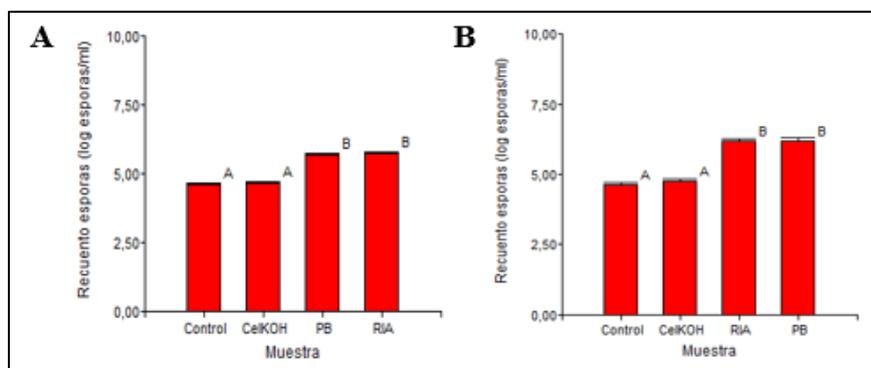
formación de conidios, con una apariencia aterciopelada y coincidente con lo observado anteriormente en las muestras con medio de cultivo agar Vogel's. Asimismo, las muestras de PB mostraron un desarrollo del moho similar, apreciándose menor densidad en las muestras con Cel-KOH y control (imágenes no reportadas).

En aquellas muestras con caldo de Vogel's (7 días, 25°C, luz), si bien se pudo apreciar el crecimiento del hongo, los resultados no presentan diferencias con respecto al tiempo de incubación de 4 días, apreciables a simple vista.

### 6.4.1. Recuento de esporas producidas por el moho incubado en los caldos Czapek y Vogel's

Se aprecia que la mayor concentración de esporas corresponde a las fracciones de PB y RIA, con valores similares que rondaron los  $\approx 1,60 \times 10^6$  esporas/ml para el tiempo de incubación de 4 días. Mientras que Cel-KOH arrojó valores de tres órdenes de magnitud menor (Anexo A, ver Tabla VIII). Por otro lado, pudo apreciarse una disminución en la producción de esporas, conforme aumentaba el tiempo de incubación.

En la Fig. 30A se puede ver que no hubo diferencias significativas ( $p_v < 0,05$ ) entre las muestras PB y RIA, con la mayor concentración de esporas, mientras que Cel-KOH no mostró un desarrollo de esporas significativo, siendo similar al obtenido para el control. Estas diferencias encontradas entre RIA y PB respecto al control y Cel-KOH, no fueron apercibidas al observar con el ojo desnudo los caldos incubados.



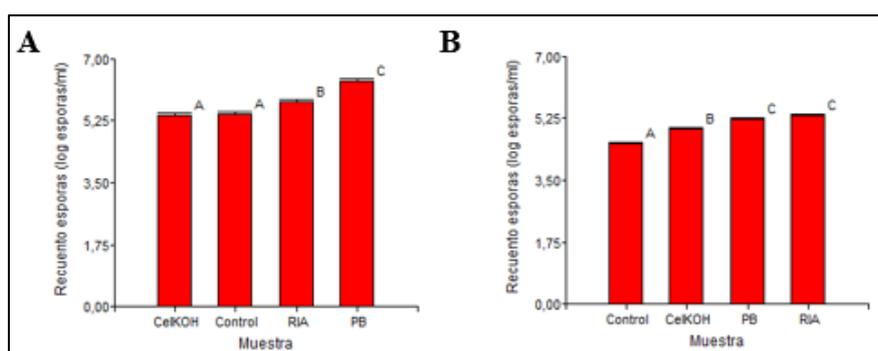
**Figura 30.** Recuento de esporas de los tubos con caldo Czapek, con una concentración de fibras vegetales (PB, RIA y Cel-KOH) de 1,5% (p/p), incubadas por A) 4 días y B) 7 días.

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p_v < 0,05$ ) entre las muestras de fracciones de fibras vegetales.

Para el tiempo de incubación de 7 días, los resultados se muestran en la Fig. 30B. En este caso, nuevamente las muestras de PB y RIA arrojaron el mayor número de esporas/ml cercano a  $5 \times 10^5$ , mientras que el control y la muestra de Cel-KOH generaron una cantidad más baja y similar ( $\approx 4 \times 10^4$  esporas/ml).

Finalmente, comparando ambos tiempos de incubación, se puede evidenciar que las fracciones de fibra vegetal de PB y RIA desarrollan mayor cantidad de esporas en dispersión en un periodo de 4 y 7 días, siendo para este último tiempo el cual el moho vegetativo pudo esporular en mayor cantidad de esporas.

En cuanto a las muestras en medio Vogel's caldo, se exponen los resultados obtenidos en el gráfico de la Fig. 31. Donde puede apreciarse que el mayor número de esporas/ml corresponde a las muestras PB, a un tiempo de incubación de 4 días, la cual arrojó un valor de  $2,39(\pm 0,40) \times 10^6$  esporas/ml. Si bien el valor determinado para el tiempo de 7 días de incubación pareciera haber disminuido siendo de  $1,70(\pm 0,93) \times 10^5$  esporas/ml, esta muestra se mantuvo entre las que generaron mayor cantidad de esporas, junto con el RIA ( $2,15(\pm 0,50) \times 10^5$  esporas/ml).



**Figura 31.** Recuento de esporas de los tubos con caldo Vogel's, con una concentración de fibras vegetales (PB, RIA y Cel-KOH) de 1,5% (p/p), incubadas por A) 4 días y B) 7 días. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p_v < 0,05$ ) entre las muestras de fracciones de fibras vegetales.

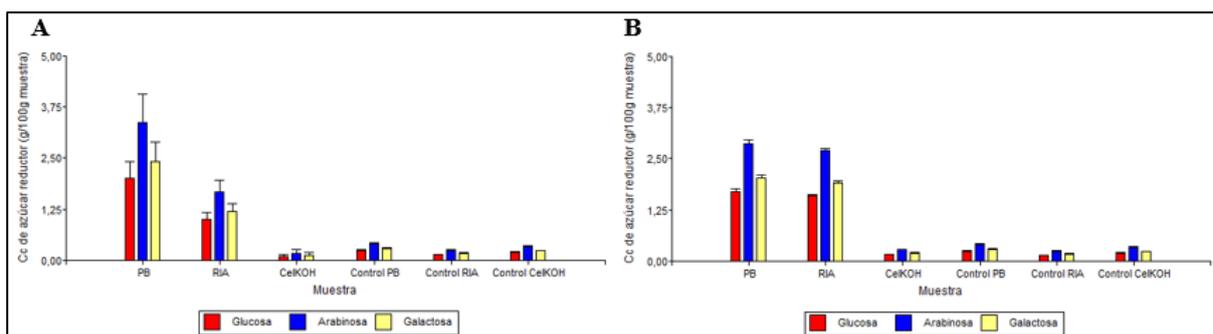
Asimismo, se puede observar que el número de esporas tiende a disminuir a un mayor tiempo de incubación en todas las muestras (Fig. 31B), siendo Cel-KOH el que menor producción de esporas demostró para ambos tiempos de incubación junto con el control. Las muestras de PB y RIA demuestran un menor número de esporas, sin embargo, es mayor en un tiempo de 4 días (Fig. 31A).

## 6.4.2. Evaluación de la acción enzimática

### 6.4.2.1. Determinación del contenido de azúcares reductores

Se determinó el contenido de azúcares reductores en las muestras incubadas en los caldos de cultivo Czapek y Vogel's, mediante la técnica de Somogyi-Nelson, según lo detallado en el ítem 5.2.10.2.1.

Para las muestras incubadas durante un tiempo de 4 días (Fig. 32A) se visualiza que la fibra PB presenta concentraciones elevadas de glucosa (2,01g/100g de PB), galactosa (2,40g/100g de PB) y arabinosa (3,38g/100g de PB). Realizando una comparación entre las fibras, RIA presenta una menor cantidad de los tres azúcares que PB. Con respecto a Cel-KOH, se obtuvo una menor liberación de AR, similar a las muestras controles de las fibras (Anexo B, ver Tabla XXXIX y Tabla XL).



**Figura 32.** Contenido de azúcares reductores determinados en las muestras en caldo Czapek con 1,5% (p/p) fibras vegetales (PB, RIA y Cel-KOH) (25°C, luz). A) 4 días; B) 7 días.

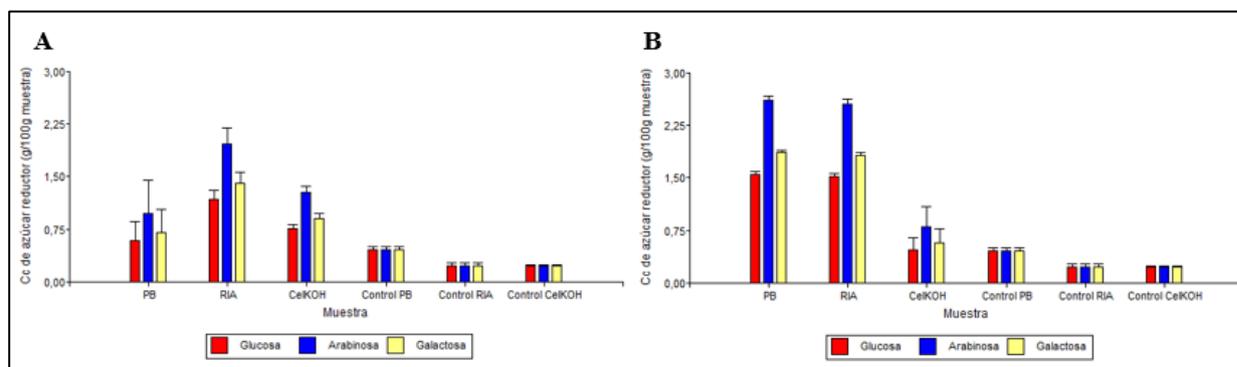
Las muestras de controles de fibra a un tiempo igual a cero tienen una cantidad de AR pequeña, lo cual indica que los polisacáridos contenidos en las tres fracciones de fibras

no se descomponen en oligosacáridos reductores, al incubarse en el medio sin la acción del hongo (Anexo B).

Por otro lado, para un tiempo de incubación de 7 días (Fig. 32B) se observa una disminución en la cantidad de glucosa y galactosa en todas las muestras, sin embargo, la cantidad de arabinosa aumenta para la fibra RIA (2,69g/100 g de RIA). La fracción de Cel-KOH se mantiene en valores más bajos, siendo significativamente similar a los controles de las fracciones de fibra (Anexo B, Tabla XXXIX y XL).

Para reflejar los resultados se puede describir una comparación entre lo obtenido ambos tiempos de incubación (4 y 7 días) para todos los AR estudiados, se determinó que respecto a la glucosa y galactosa no hay diferencias en las concentraciones obtenidas en las muestras (principalmente PB y RIA). En cambio, arabinosa a un tiempo de incubación de 4 días presenta una cantidad elevada para las muestras de PB, aunque en un tiempo de 7 días este valor disminuye, sin embargo, no ocurre lo mismo en RIA, el cual presenta valores mayores para arabinosa. Adicionalmente, la muestra de fracción Cel-KOH a un tiempo de 7 días presenta una mayor cantidad azúcares comparándolo con un tiempo de 4 días, pero resulta poco significativo, dado que se mantiene similar a los controles de las fibras.

Lo que respecta a aquellas muestras con medio de cultivo caldo Vogel's (4 y 7 días, 25°C), se obtuvieron los resultados descriptos en la Fig. 33A-B.



**Figura 33.** Contenido de azúcares reductores determinados en las muestras en caldo Vogel's con 1,5% (p/p) fibras vegetales (PB, RIA y Cel-KOH) (25°C, luz). A) 4 días; B) 7 días.

Para un tiempo de 4 días (Fig. 33A) la muestra correspondiente a la fracción RIA presenta la mayor cantidad de glucosa (1,17g/100g de RIA), galactosa (1,40g/100g de RIA) y arabinosa (1,97g/100g de RIA), mientras que las muestras de PB y Cel-KOH exhiben concentraciones inferiores. Puntualmente, el PB está representado con una menor cantidad de los tres azúcares que Cel-KOH (Anexo B, Tabla XXXIX).

Con respecto a un tiempo de 7 días (Fig. 33B), las concentraciones de los tres AR más representativas corresponden a las muestras de PB y RIA, siendo de menor medida Cel-KOH y los controles de fibras. Adicionalmente, se puede observar que durante este tiempo arabinosa aumenta en las muestras de PB (2,61g/100g de PB) y RIA (2,55g/100g de RIA), siendo el azúcar reductor con mayor cantidad frente a la comparación con glucosa y galactosa. Se observa, además, que aumentando el tiempo (7 días) la concentración de azúcares en las muestras de Cel-KOH disminuye notablemente realizando una comparación con el tiempo anterior (4 días). En cambio, las demás muestras (PB y RIA) presentan un aumento en la concentración de azúcares.

#### **6.4.2.2. Determinación de biomasa**

A partir de lo descrito en el ítem 5.2.10.2.2 se obtienen los siguientes resultados, considerando al peso de micelio tal como se describe en la Ec. 3.

No se evidencian grandes diferencias entre las muestras de las fibras con Vogel's y Czapek, ya que el peso de micelio resulta con valores promedio de 0,12g en las muestras con Czapek (4 y 7 días), mientras que para Vogel's el promedio en las muestras es de 0,10g de micelio para 4 días de incubación y 0,18g de micelio para 7 días de incubación. No se consideran los controles porque no presentan biomasa (ver Tabla VI).

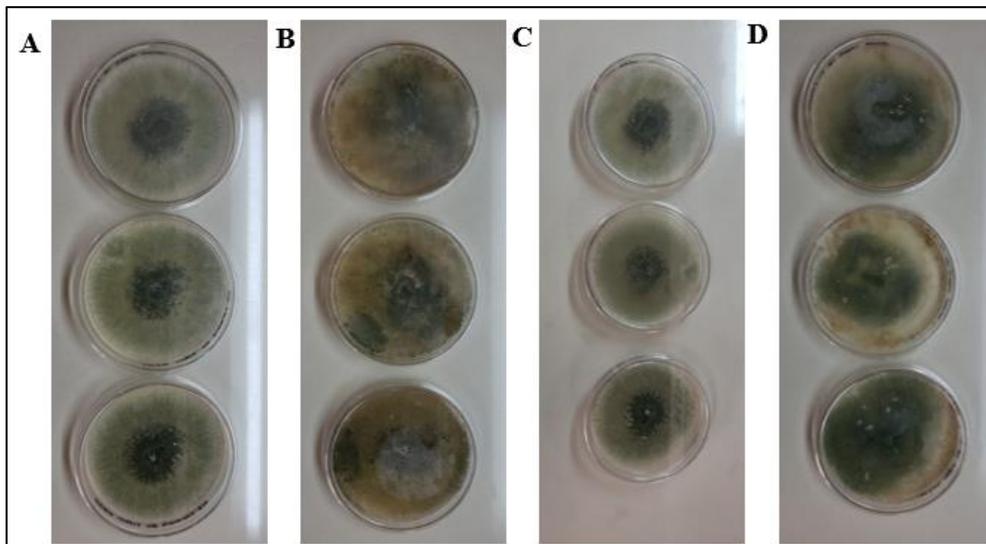
**TABLA VI.** Resultados correspondientes a la determinación de biomasa de las muestras en medios de cultivo caldo Czapek y Vogel's (4 y 7 días, 25°C).

Medio	Tiempo de incubación	Muestra	Peso de micelio (g)
Czapek	4 días	Control	0,00(±0,00)
		PB	0,15(±0,05)
		RIA	0,13(±0,01)
		Cel-KOH	0,12(±0,01)
Czapek	7 días	Control	0,00(±0,00)
		PB	0,10(±0,01)
		RIA	0,10(±0,04)
		Cel-KOH	0,13(±0,01)
Vogel's	4 días	Control	0,00(±0,00)
		PB	0,12(±0,02)
		RIA	0,12(±0,01)
		Cel-KOH	0,13(±0,01)
Vogel's	7 días	Control	0,00(±0,00)
		PB	0,23(±0,02)
		RIA	0,19(±0,06)
		Cel-KOH	0,11(±0,13)

## 6.5. Determinación de la concentración óptima de fibra vegetal

Durante esta etapa la concentración de fibra vegetal empleada fue de 2% (p/p) (2g de fibra cada 100g de caldo) inoculando con *T. harzianum* en medio de cultivo caldo Vogel's y Czapek, a un tiempo de incubación de 4 y 7 días bajo luz artificial constante a 25°C.

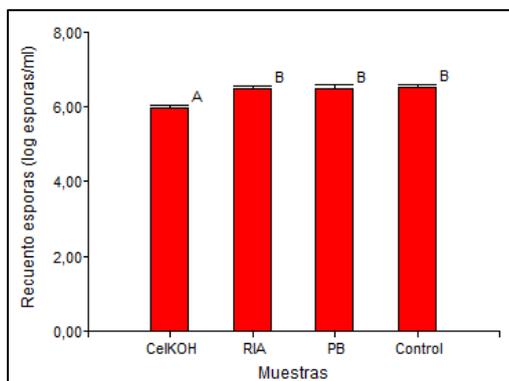
Adicionalmente, se inoculó la muestra en medio Vogel's agar, a un tiempo de incubación de 4 días. La reproducción del hongo frente a estas condiciones es positiva, dado que se visualiza el moho vegetativo característico de este hongo, color verde blanquecino (Fig. 34).



**Figura 34.** Placas de Petri con medio Vogel's agar inoculado con las fracciones de fibras vegetal en una concentración de 2% (p/p) inoculada con *Trichoderma harzianum* durante un tiempo de 4 días (25°C) en condición de luminosidad. A) Control; B) PB; C) RIA; D) Cel-KOH.

Si bien se puede visualizar que en todas las muestras (Fig. 34A-D) hay desarrollo del micelio vegetativo, se evidencia macroscópicamente que la muestra con mayor densidad es la de PB (Fig. 34B). Asimismo, las placas de RIA y Cel-KOH presentan una menor densidad de esporulación.

Por otro lado, la concentración de esporas de estas muestras está descrita en Fig. 35. No existe una cantidad de esporas diferente para las muestras de RIA, PB y control, pero sí para la muestra de Cel-KOH, que presenta un menor número de esporas.

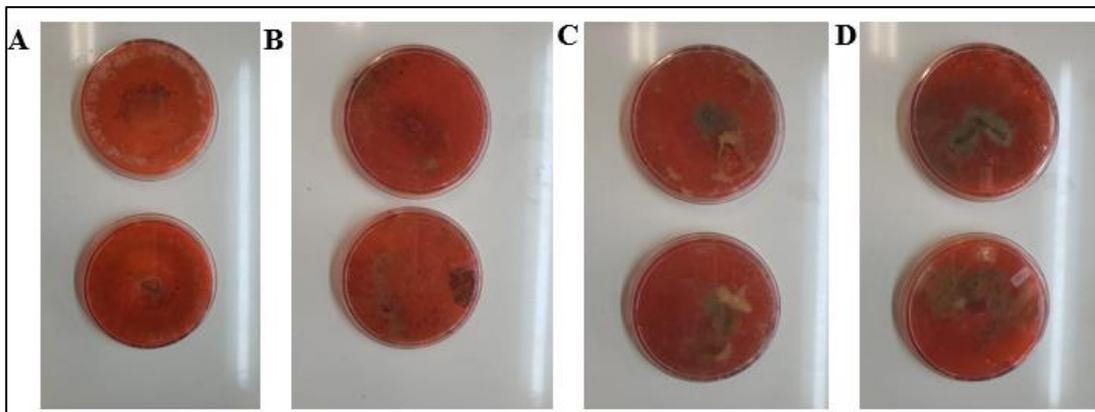


**Figura 35.** Recuento de esporas realizado a partir de las placas con Vogel's, con muestras incubadas durante 4 días con una concentración de fibras vegetales (PB, RIA y Cel-KOH) de 2% (p/p). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p_v < 0,5$ ) entre las muestras de fracciones de fibras vegetales.

La razón por la cual no se decide realizar esta prueba en un tiempo de incubación de 7 días está sujeto a que no es posible visualizar el efecto de desarrollo del hongo frente a la utilización de un medio agar Vogel's, ya que el control presenta un desarrollo inclusive mayor a las muestras de PB, RIA y Cel-KOH. Dicho esto, se decide utilizar como metodología principal el medio de cultivo en estado líquido tanto para Czapek como para Vogel's, lo que permitirá realizar un análisis cuantitativo (ítem 5.2.10.2) y posterior determinación de azúcares reductores (ítem 5.2.10.2.1).

### 6.5.1.1. Evaluación de la acción enzimática de *T. harzianum* utilizando mayor cantidad de fibras como sustrato

Siguiendo con lo descrito en el ítem 5.2.10.1 las muestras con una concentración de 2% (p/p) de fracción de fibra vegetal con medio de cultivo agar Vogel's fueron expuestas a tinción de Rojo Congo. Partiendo de la técnica, las muestras no permiten apreciar el desarrollo enzimático, dado que no se visualiza macroscópicamente el halo de degradación característico (Fig. 36). Si bien en la Fig. 36A, apreciamos levemente un halo, se considera que por el diámetro de la colonia inicial no hubo crecimiento, ya que la diferencia es nula y no fue posible realizar el cálculo del CDC.



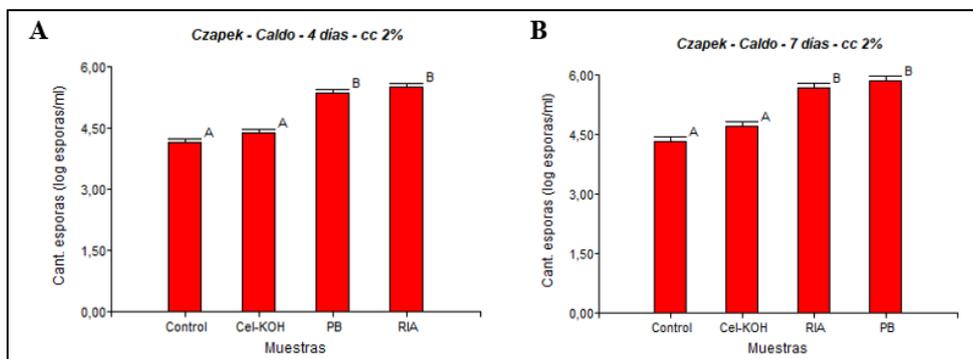
**Figura 36.** Placas de Petri con medio Vogel's inoculado con las fracciones de fibras vegetal en una concentración de 2% (p/p) y *Trichoderma harzianum* durante 4 días de incubación (25°C, luz artificial), teñidas con Rojo Congo. A) Control; B) PB; C) RIA; D) Cel-KOH.

### 6.5.1.2. Recuento de esporas producidas por *T. harzianum* al aumentar el contenido de fibras al 2% (p/p)

Al igual que lo realizado en el ítem 6.4.1. Las muestras incubadas con medio de cultivo caldo Czapek durante 4 y 7 días fueron sometidas al recuento de esporas, cuyos resultados se pueden visualizar en Anexo A, Tabla X.

El número mayor de esporas corresponde a las muestras de RIA y PB en ambos tiempos (4 y 7 días), pero siendo las muestras de PB las cuales presentan mayor cantidad a los 7 días (Fig. 37B). Durante este análisis se destaca que el tiempo es un parámetro importante, ya que el crecimiento es notable a una mayor cantidad de días en todas las muestras.

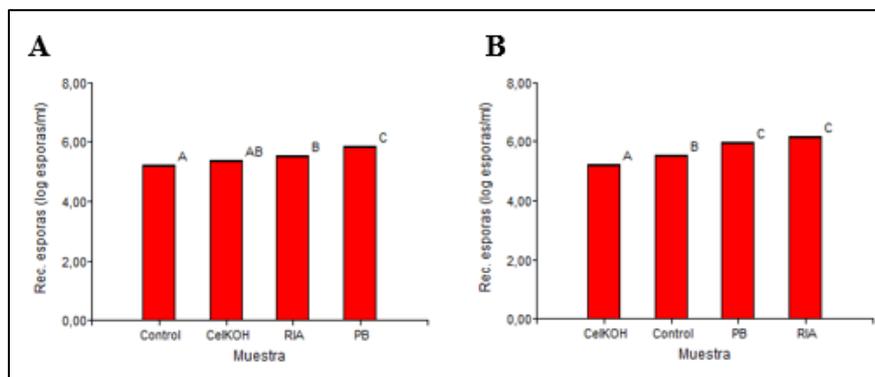
En relación con las muestras incubadas durante 4 días, Fig. 37A, no se obtuvieron diferencias entre los resultados de las muestras del conjunto control y Cel-KOH, ambas con una cantidad de esporas considerablemente menor, comparándolas con el conjunto de muestras de PB y RIA, las cuales entre sí no presentas discrepancias.



**Figura 37.** Recuento de esporas de los tubos con caldo Czapek, con una concentración de fibras vegetales (PB, RIA y Cel-KOH) de 2% (p/p), incubadas por A) 4 días y B) 7 días. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p_v < 0,05$ ) entre las muestras de fracciones de fibras vegetales.

Si se realiza una comparación con el tiempo de incubación de 4 días, las muestras incubadas durante 7 días presentan número de esporas más elevado y sin diferencias significativas para PB y RIA. Por otra parte, el conjunto de control y Cel-KOH se mantiene similar, de acuerdo con lo que se representa en la Fig. 37B.

Para aquellas muestras incubadas durante 4 y 7 días a una concentración de 2% (p/p) de fracción de fibra vegetal con medio de cultivo caldo Vogel's (Fig. 38A-B) se realizó el recuento de esporas mediante cámara de Neubauer, los datos obtenidos se visualizan en el Anexo A, ver Tabla X. Durante una mayor cantidad de días incubando las muestras se aprecia un aumento el número de esporas. Las muestras de PB,  $6,30(\pm 0,30) \times 10^5$  esporas/ml, y RIA,  $3,42(\pm 0,20) \times 10^5$  esporas/ml, se mantienen con un número elevado y no sufren disminución en el desarrollo, así como ocurre en la muestra de Cel-KOH,  $1,96(\pm 0,11) \times 10^5$  esporas/ml.



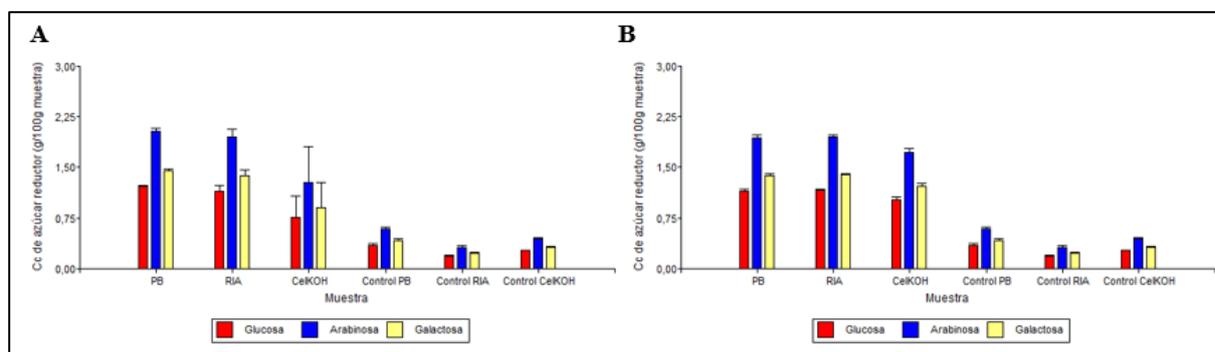
**Figura 38.** Recuento de esporas de los tubos con caldo Vogel's, con una concentración de fibras vegetales (PB, RIA y Cel-KOH) de 2% (p/p), incubadas por A) 4 días y B) 7 días. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p_v < 0,05$ ) entre las muestras de fracciones de fibras vegetales.

En cambio, y tal como se lo visualiza en la Fig. 38B, para lo incubado durante 7 días, las muestras de PB y RIA no representan discrepancias relevantes, sin embargo, la muestra de RIA presenta  $1,26(\pm 0,08) \times 10^6$  esporas/ml, mientras que PB  $8,77(\pm 2,50) \times 10^5$  esporas/ml. Con respecto a la muestra de Cel-KOH y el control, el número de esporas aumenta levemente en este tiempo de incubación.

### 6.5.1.3. Determinación del contenido de azúcares reductores

Las muestras con medio de cultivo caldo Czapek fueron sometidas a la técnica de Somogyi-Nelson para determinación de azúcares (ítem 5.2.10.2.1).

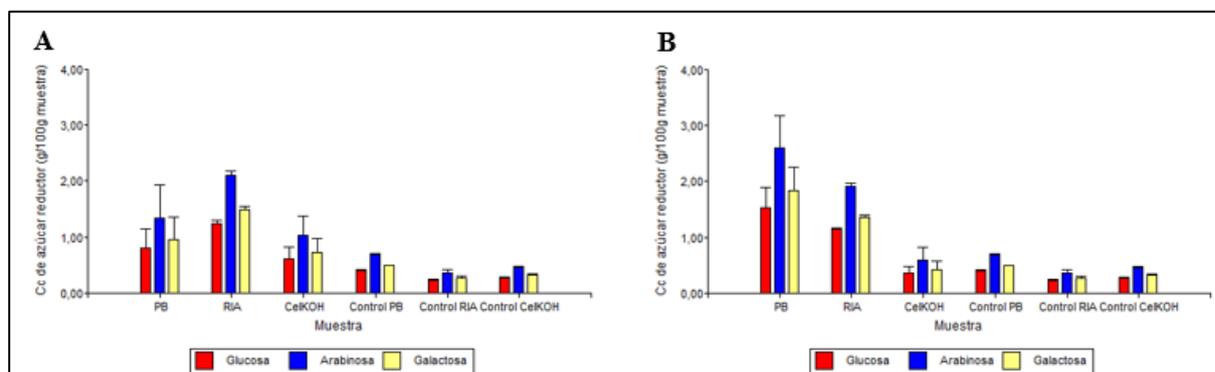
Aquellas muestras de incubadas durante un tiempo de 4 días se visualizan en la Fig. 39A. Se observa que el azúcar arabinosa es el que se encuentra en mayor concentración en todas las muestras, pero con un número más elevado en PB (2,05g de arabinosa/100g de PB) y RIA (1,96g de arabinosa/100g de RIA), mientras que no así para Cel-KOH (1,27g de arabinosa/100g de Cel-KOH). Los controles de las fibras se mantienen en un número bajo de azúcares sintetizados (Anexos B, ver Tabla XXXIX y XL).



**Figura 39.** Contenido de azúcares reductores determinados en las muestras en caldo Czapek con 2% (p/p) fibras vegetales (PB, RIA y Cel-KOH) (25°C, luz). A) 4 días; B) 7 días.

Siguiendo con los ensayos, las muestras fueron incubadas a un tiempo de 7 días (Fig. 39B), los controles de las fibras no desarrollan una cantidad considerable de azúcares, comparándolo con lo obtenidos para las muestras de PB, RIA y Cel-KOH. La concentración de azúcares presenta, en general, valores levemente mayores en este tiempo, aunque es importante destacar que las muestras de Cel-KOH se ven favorecidas aumentando la concentración de azúcares. El azúcar arabinosa es sintetizado en mayor cantidad para todas las muestras, seguida por galactosa y, por último, glucosa.

Por otro lado, las pruebas consiguientes utilizando medio de cultivo Vogel's con una concentración de fibra de 2% (p/p) con un tiempo de incubación de 4 y 7 días se visualizan en la Fig. 40A-B.



**Figura 40.** Contenido de azúcares reductores determinados en las muestras en caldo Vogel's con 2% (p/p) fibras vegetales (PB, RIA y Cel-KOH) (25°C, luz). A) 4 días; B) 7 días.

Durante un tiempo de 4 días (Fig. 40A) se observa que arabinosa presenta una concentración elevada para todas las muestras, principalmente RIA, con un valor de 2,10g/100g de RIA. Los controles de las fibras se mantienen en concentraciones bajas de los azúcares, así como también la muestra de Cel-KOH (Anexos B, ver Tabla XXXIX y XL)

Con respecto al tiempo de 7 días (Fig. 40B) se observa un incremento en la cantidad de azúcares sintetizados en las muestras de fracción PB, con resultados de 2,59g de arabinosa/100g de PB, 1,54g de glucosa/100g de PB y 1,85g de galactosa/100g de PB (Anexo B, ver Tabla XXXIX). Este resultado es comparable con lo ocurrido durante el uso de una concentración de 1,5% (p/p) (ítem 6.4.2.1), donde transcurrido un tiempo mayor de incubación la concentración de azúcares aumenta. Por otra parte, arabinosa se mantiene como el azúcar con mayor proporción frente a galactosa y glucosa. Las muestras de fracción RIA y Cel-KOH permiten un desarrollo menos favorable comparándolo con lo ocurrido para PB.

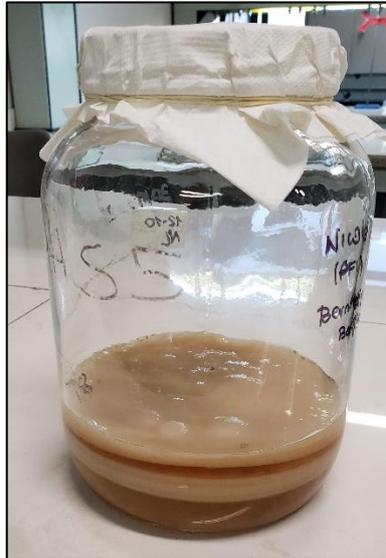
#### **6.5.1.4. Determinación de biomasa**

Teniendo en consideración los resultados obtenidos sobre la esporulación (ítem 6.5.1.2) y la determinación de azúcares (ítem 6.5.1.3) empleando una concentración de fracciones de fibra vegetal de 2% (p/p), no fue relevante realizar la determinación de biomasa correspondiente a este ítem, dado que se demostró una disminución en la cantidad de esporas tanto para caldo Vogel's como caldo Czapek, y así también en la concentración de azúcares reductores, utilizando un tiempo de incubación de 4 y 7 días.

### **6.6. Comparación del efecto sobre la síntesis enzimática del hongo, empleado fibra bacteriana**

#### **6.6.1. Producción de la Kombucha**

A partir del proceso de fermentación y almacenamiento del hidrogel en frasco de vidrio cerrado (Fig. 41), se visualizaron características específicas en el tipo de técnica empleada para el cultivado (cultivo estático) (ítem 1.4.2), principalmente en su estructura de hidrogel. El hidrogel presenta un color marrón claro, atribuido al té utilizado y los restos de levadura adheridos.

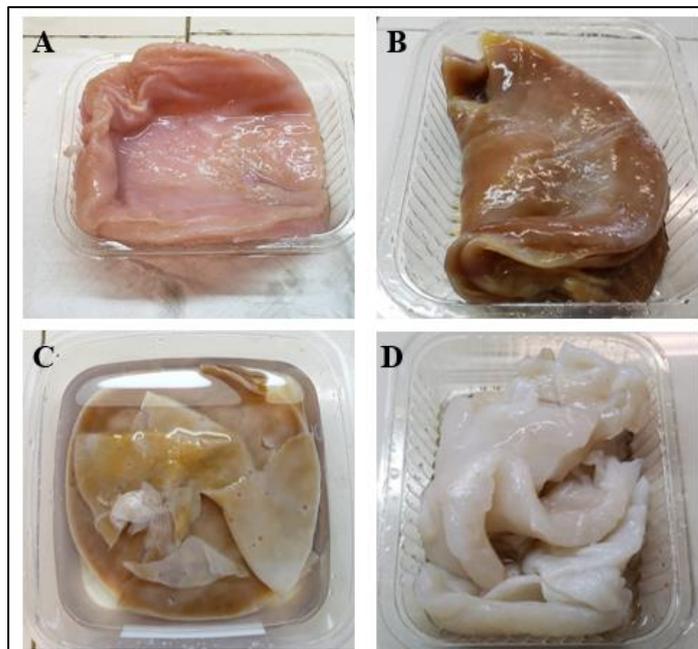


**Figura 41.** Hidrogel de celulosa (CB), generado por el SCOBY durante la fermentación de té y elaboración de la bebida Kombucha.

Durante este proceso de fermentación, el SCOBY duplica su tamaño por la disponibilidad de oxígeno disuelto que es otorgado por el medio de cultivo, resultando en la síntesis de celulosa (Pineda *et al.*, 2012).

### 6.6.2. Purificación del hidrogel

Luego del lavado vigoroso del hidrogel bajo agua corriente y el primer tratamiento con una solución de NaOH 1M, el mismo cambió notablemente de color (Fig. 42B).



**Figura 42.** Hidrogel -CB- obtenido luego del proceso de fermentación. A) Hidrogel previo al tratamiento con NaOH, B) hidrogel luego del primer tratamiento con NaOH y posterior lavado con agua bidestilada, C) hidrogel luego del segundo tratamiento con NaOH y lavado con agua bidestilada, D) hidrogel purificado.

Durante el segundo tratamiento con NaOH 1M, se pudo observar una pérdida de la coloración característica y restos de levadura, tal como se observa en Fig. 42C. Por último, y luego de medir la última agua de lavado y que llegase a un pH igual a 6,00, el hidrogel perdió coloración y restos de levadura (Fig. 42D). El hidrogel fue pesado en las distintas etapas, para llevar un control del rendimiento de este frente a cada tratamiento y lavado. Los resultados se describen en la Tabla VII.

**TABLA VII.** Peso del hidrogel en cada etapa de purificación.

Hidrogel	Peso (g)
Sin tratamiento con NaOH	430,00
Luego del primer tratamiento con NaOH	458,90
Luego del segundo tratamiento con NaOH	454,70
Pulpa	430,64
Luego de congelar	421,20

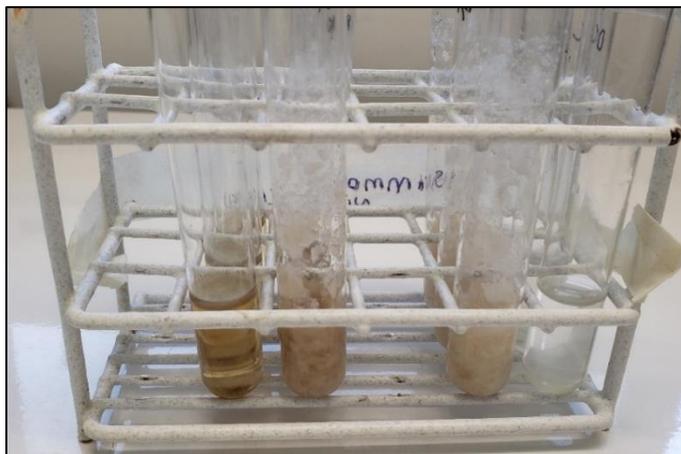
La disminución del peso del hidrogel frente a cada etapa se encuentra relacionada a los tratamientos realizados, ya que luego del segundo tratamiento con NaOH, se perdió parte de la muestra al ser manipulado para convertirlo en pulpa. A partir de lo obtenido, se procedió a realizar la liofilización (Fig. 43).



**Figura 43.** CB liofilizada.

Luego de la liofilización, la membrana resultó con una textura similar al papel, de color blanco y emplástico. Debido a su textura el mismo fue procesado con una ultra procesadora, que permitió obtenerlo en un tamaño similar de polvo para ser luego almacenado en frasco de vidrio y posteriormente esterilizado por calor húmedo.

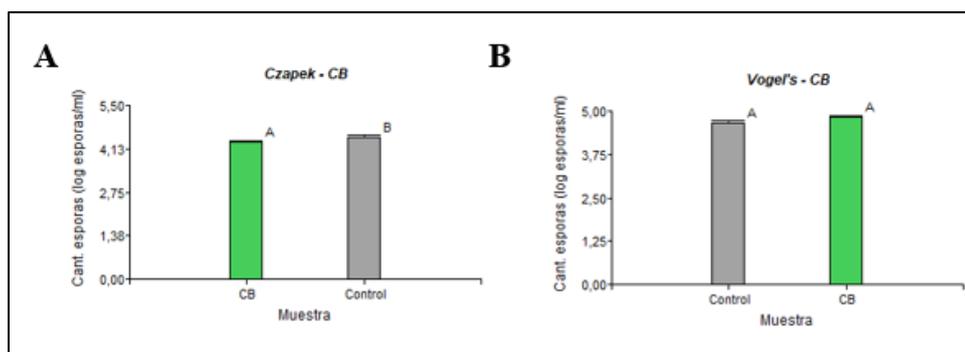
A partir de los parámetros fijados para las etapas (ítem 5.2.11), se prepararon los tubos con medio de cultivo caldo Vogel's y Czapek con concentración de 2% (p/p) de celulosa bacteriana (Fig. 44). Realizando un análisis macroscópico de estos tubos, se puede ver que la textura de la CB absorbe parte del medio líquido, debido a la textura que presenta.



**Figura 44.** Medio de cultivo caldo Vogel's y Czapek con CB inoculados con *T. harzianum*.

### 6.6.3. Recuento de esporas producidas a partir del empleo de la CB como sustrato

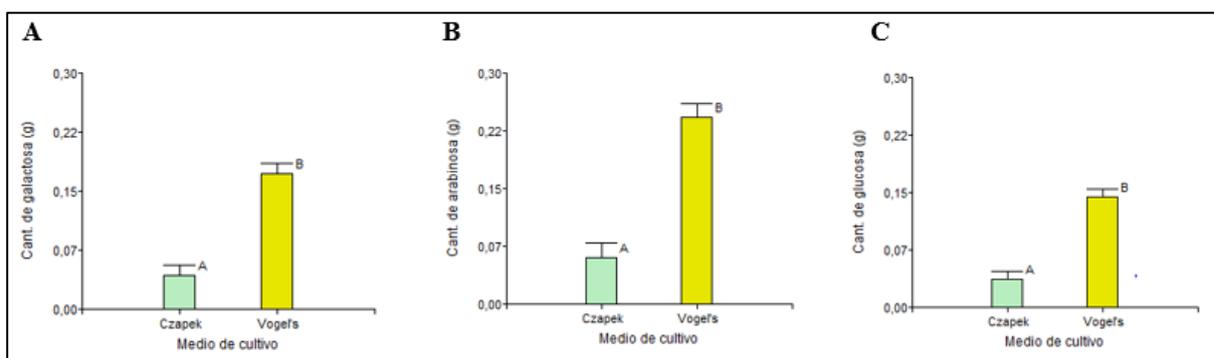
Los datos obtenidos para la CB incubada durante 7 días con caldo Czapek se pueden ver descriptos en la Fig. 45A. El control (medio y hongo) y la CB presentan diferencias significativas entre sí, siendo la cantidad de esporas desarrolladas levemente mayor para el control  $(3,23(\pm 0,35) \times 10^4$  esporas/ml), que para la muestra de CB  $(2,20(\pm 0,46) \times 10^4$  esporas/ml). En cambio, utilizando el medio de cultivo Vogel's (Fig. 45B), la media mayor es la correspondiente a CB, y no así la del control.



**Figura 45.** Recuento de esporas de los tubos con caldo A) Czapek y B) Vogel's, con una concentración de CB de 2% (p/p), incubadas por 7 días. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p_v < 0,05$ ) entre las muestras.

## 6.6.4. Determinación del contenido de azúcares reductores en medios con fibra de CB

Partiendo de una comparación entre ambos medios de cultivo se puede observar en la Fig. 46A-B-C que en los tres azúcares empleados en el medio de cultivo Vogel's caldo presenta una mayor proporción que en medio Czapek.



**Figura 46.** Contenido de azúcares reductores determinados en las muestras en caldo Vogel's y Czapek con una concentración de 2% (p/p) de CB (25°C, 7 días). A) Concentración de galactosa; B) Concentración de arabinosa; C) Concentración de glucosa. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p_v < 0,05$ ) entre las muestras.

Si bien el medio de cultivo Vogel's presenta un mayor desarrollo de azúcares, arabinosa presenta una concentración más elevada (0,12(±0,02)g de arabinosa/100 g de CB), mientras que para galactosa se obtuvo 0,08(±0,01)g de galactosa/100g de CB y, por último, una cantidad de 0,07(±0,01)g de glucosa/100g de CB. Mientras tanto, los azúcares con medio de cultivo Czapek caldo presentan resultados de 0,03(±0,02)g de arabinosa/100 g de CB, 0,02(±0,01)g de galactosa/100 g de CB y 0,02(±0,01)g de glucosa/100 g de CB (Anexo B, ver Tabla XXXIX).

## 7. Discusión y conclusiones

En primera instancia, a partir de la etapa de inoculación del hongo en medio de PDA y Czapek en condiciones de incubación bajo oscuridad vs iluminación constante (ítem 6.2), se evidencia que en oscuridad *Trichoderma harzianum* LMR1 en las placas de PDA no

creció, por lo que se decidió incubar con iluminación constante (24hs.) durante de 7 días, 25°C, lo que permitió visualizar desarrollo. Luego, se procedió a realizar las pruebas con medio de cultivo Czapek y al obtener crecimiento del microorganismo bajo exposición de luz artificial, se decide fijar este parámetro para los próximos ensayos. El crecimiento está determinado dado que el moho alcanzó su fase reproductiva al observarse la placa cubierta en su totalidad por micelio color verde. Si bien la luminiscencia no tiene efecto en la germinación y crecimiento, sí lo tiene sobre la etapa reproductiva asexual de esporulación. *Trichoderma spp.* durante la exposición a la luz produce conidios de manera constante y más resistentes, ya que la oscuridad inhibe la conidiogénesis (Vasquez-Cárdenas, 2010). Adicionalmente, se realizó un análisis de la viabilidad de las esporas que permitió asegurarse que puedan germinar y desarrollarse durante la incubación en un medio de cultivo durante un tiempo y temperatura determinada.

En cuanto al desarrollo de *T. harzianum* en los medios de cultivo seleccionados (ítem 6.3), se observó que utilizando una concentración de fibra vegetal de 1,5% (p/p) existe crecimiento en las placas con agar Vogel's y Czapek. Con respecto a Vogel's agar se puede destacar que las muestras de fibras PB, RIA y Cel-KOH presentan el mayor número de esporas, además de evidenciarse que a mayor tiempo de incubación (7 días), mayor es la esporulación (1,32x10<sup>7</sup>, 1,35x10<sup>7</sup> y 1,48x10<sup>7</sup> esporas/ml, respectivamente) (Fig. 23). Posteriormente, se realizó la tinción con el reactivo Rojo Congo, este método es utilizado para medir la actividad celulolítica de microorganismos, mediante un análisis cualitativo. Fue posible visualizar un halo de degradación, determinado por una disminución en la coloración, producto de la actividad despolimerizante de la enzima endoglucanasa y provocado por la formación de un complejo que se produce entre el colorante Rojo Congo con las cadenas de celulosa, para las muestras de PB, RIA y Cel-KOH. Este resultado evidenció la acción enzimática del microorganismo inoculado. Además, permitió realizar el posterior cálculo del CDC, parámetro utilizado para evaluar la producción de celulosa por microorganismos en medios sólidos (ver Tabla V).

Por otro lado, el medio Czapek agar reflejó un crecimiento de *T. harzianum*, aunque en menor concentración de esporulación que agar Vogel's. Considerando los resultados del PB (2,75x10<sup>6</sup> esporas/ml) y RIA (1,37x10<sup>6</sup> esporas/ml) (7 días, 25°C) (Fig. 21), se puede inferir que en esta consistencia de medio de cultivo el hongo presenta un menor desarrollo.

Adicionalmente, empleando agar Czapek no fue posible medir el CDC, ya que si bien se visualizaron zonas decoloradas (producto de la degradación), no se estableció una correlación entre el diámetro degradativo y el diámetro inicial de la colonia (Fig. 24-25). No obstante, esta técnica es un parámetro útil para la determinación de la actividad de celulasa de microorganismos en medio sólido, ya que resulta una alternativa sencilla y eficaz para detectar la actividad enzimática del microorganismo de estudio (Coniglio *et al.*, 2017 ; Diaz *et al.*, 2020).

Por los resultados hasta aquí obtenidos con relación a la esporulación y la actividad enzimática medida por el método cualitativo directo (tinción con Rojo Congo), Vogel's agar sería el medio más adecuado para favorecer el desarrollo de *Trichoderma harzianum* y su actividad enzimática. Sin embargo, algunas evidencias descriptas en Rodriguez y Piñeros, (2007), mencionan que aquellos medios que presentan dentro de su composición química nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ), como en la formulación del medio Czapek, benefician el crecimiento de *Trichoderma spp.* Esto se debe a que la gran mayor parte de los hongos filamentosos utilizan a los nitratos para producir amonio. En cambio, medios con fosfato no favorecen la actividad de las celulasas causando inhibición. El medio Vogel's presenta en su composición fosfato dipotásico, el cual debe estar en bajas concentraciones (trazas) para producir conidios (Osorio-Concepción *et al.*, 2013).

Consecuentemente, se realizaron pruebas con los medios de cultivo en su consistencia líquida, donde las muestras de PB y RIA presentan el mayor número de esporas tanto en Czapek ( $1,55 \times 10^6$  -  $1,67 \times 10^6$  esporas/ml a los 4 días y  $4,99 \times 10^6$  -  $5,36 \times 10^6$  esporas/ml a los 7 días, respectivamente) como para Vogel's ( $2,39 \times 10^6$  -  $6,60 \times 10^5$  esporas/ml a los 4 días y  $1,70 \times 10^6$  -  $2,15 \times 10^6$  esporas/ml a los 7 días, respectivamente) evidenciando que no hubo grandes diferencias ( $p_v > 0,05$ ) entre los valores del número de esporas para ambos medios, en ambos tiempos (4 y 7 días) (Anexo A, ver Tabla VIII).

Mediante la determinación del contenido de azúcares reductores, se pudo apreciar en ambos medios de cultivo la liberación de monómeros de glucosa, galactosa y arabinosa en todas las muestras (Fig. 32-33). El azúcar reductor (AR) que se encontró en mayor concentración fue la arabinosa seguido por galactosa y glucosa, en proporciones muy similares tanto en la fibra de PB (1,46g de glucosa/100 g PB, 2,46g de arabinosa/100g de PB, 1,75g de

galactosa/100g de PB) como RIA (1,32g de glucosa/100 g RIA, 2,25g de arabinosa/100g de RIA, 1,58g de galactosa/100g de RIA). Por otro lado, y en menor medida, se liberaron AR en las muestras de Cel-KOH y en los controles de las fracciones de fibra, con valores cercanos a los 0,37g de glucosa, 0,45g de galactosa y 0,63g de arabinosa/100 g de fibras respectivamente (ítem 6.4.2.1). Las muestras controles permitieron evaluar si la fibra es degradada liberando azúcares reductores mediante algún otro mecanismo que no sea el accionar del hongo. Se pudo determinar en estas muestras una cantidad mínima de AR, presentándose en mayor proporción el control de PB en medio Vogel's y Czapek, ya que esta fibra presenta en su composición química un 31% hidrosoluble, mientras que el 69% restante está constituido, principalmente, por un 85% de carbohidratos reductores y un 10,8% de proteínas. A su vez, de los carbohidratos reductores, un 29% corresponde a fructosa, un 48% a glucosa libre y el resto a sorbitol (ítem 6.1).

De igual modo, resulta importante destacar que la concentración de glucosa, galactosa y arabinosa es mayor utilizando el medio Czapek caldo en un tiempo de 4 días. No obstante, para el tiempo de incubación de 7 días pudo observarse una disminución en la concentración de glucosa y galactosa, lo que estaría indicando que el hongo posiblemente utiliza como sustrato a estos monómeros, a medida que son liberados al medio, para continuar su desarrollo. Por lo tanto, si el tiempo de incubación se extiende de 4 a 7 días, *Trichoderma spp.* seguirá consumiendo los AR, por lo que las concentraciones de estos disminuirán con el tiempo.

Por otro lado, durante la determinación de biomasa se destaca que si bien las muestras no muestran diferencias significativas ( $p_v > 0,05$ ), el PB presenta un peso de micelio mayor que las demás fracciones (promedio de 0,125g de micelio para Czapek, 4 y 7 días; promedio de 0,175g de micelio para Vogel's, 4 y 7 días) (ítem 6.4.2.2) cuyos resultados se condicen con lo obtenido en el recuento de esporas y determinación de AR.

Hasta aquí, es posible concluir que para el desarrollo de *Trichoderma harzianum*, utilizando las fracciones de fibra vegetal como sustrato en una concentración de 1,5% (p/p), los parámetros de incubación que favorecen la generación de enzimas celulolíticas son: el empleo de luz artificial, temperatura de 25°C, durante un tiempo de 4 días, empleando el medio de cultivo Czapek en su consistencia líquida.

Adicionalmente, se estudió el empleo de una mayor concentración de fracción de fibra vegetal (2% p/p) bajo las mismas condiciones de incubación mencionadas (ítem 5.2.11). Se pudo visualizar que utilizando Vogel's caldo el mayor número de esporas se obtuvo a los 7 días de incubación (en promedio para todas las fracciones de fibras vegetal:  $6,54 \times 10^5$  esporas/ml). Sin embargo, comparando con la concentración de 1,5% (p/p), se observó que el hongo presenta una menor esporulación dado que se obtuvo a menor concentración. Es decir que, al emplear una mayor concentración de fibra vegetal, se obtuvo menor concentración de esporas. Se pudo ver que lo mismo ocurre utilizando Czapek caldo. Si bien el PB y RIA presentaron el mayor número de esporas, se obtuvo la mayor esporulación en la menor concentración de fibra vegetal (ítem 6.5.1.2).

Lo mencionado con respecto a la esporulación, se condice con lo obtenido durante la determinación de azúcares reductores. Donde se presenta una disminución en las concentraciones de los AR utilizando la concentración del 2% (p/p) a los 4 días de incubación (ítem 6.5.1.3).

Por lo tanto, para lo que respecta a las distintas fracciones de fibra de las brácteas de maíz (*Zea Mays*) PB, RIA y Cel-KOH, se destaca que el PB no presenta ningún tratamiento químico que podría estar interfiriendo en el desarrollo del microorganismo y posterior liberación de azúcares reductores. La composición química del PB presenta azúcares libres como glucosa, sorbitol, fructosa y proteínas (ítem 6.1) que son aprovechados por *Trichoderma harzianum* para su crecimiento (Maciel Pérez, 2015; Garay Hernández y Peña, 2018). Esto se ve reflejado en la cantidad de esporas obtenidas utilizando los medios de cultivo propuestos, y, además, la secreción de enzimas fue elevada, reflejado en la concentración de AR liberados, al degradar los biopolímeros contenidos en las fibras.

En contra parte, la fracción de fibra vegetal RIA, la cual presenta una tendencia a favorecer la acción enzimática sin grandes diferencias con el PB ( $p_v > 0,05$ ), su composición química es de principalmente polisacáridos de hemicelulosa (xilosa ramificada con arabinosa), y en menor proporción celulosa y lignina. Lo que sugiere ser un buen sustrato a la hora de favorecer el desarrollo de *Trichoderma harzianum* y liberar enzimas (Garay Hernández y Peña,

2018). Sin embargo, al presentar un tratamiento con etanol presenta costos y tiempos requeridos adicionales para su obtención.

Por último, la fracción de fibra vegetal Cel-KOH presentó una baja esporulación, lo que se condice con una baja eficiencia de secreción de enzimas que presenta. Si bien los tratamientos alcalinos demostraron ser la forma más efectiva para eliminar y solubilizar, hemicelulosa y pectina, la fracción de fibra vegetal Cel-KOH presenta una problemática frente al desarrollo de esporas y obtención de azúcares reductores. Los tratamientos químicos, como en este caso con KOH, podrían inhibir el desarrollo de *Trichoderma harzianum* y, por lo tanto, tener un efecto negativo sobre la producción enzimática. Elevadas concentraciones de iones de potasio inhiben la esporulación disminuyendo la presión osmótica de la célula lo que conlleva a una disminución de la esporulación fúngica (Rodríguez y Piñeros, 2007 ; Simkovic *et al.*, 2008).

Esta problemática podría utilizarse como objeto de nuevas investigaciones, donde se propondría utilizar otro tratamiento químico para la fracción de fibra vegetal logrando la extracción eficiente de hemicelulosa, como con hidróxido de sodio (NaOH), el cual ha sido ampliamente aplicado en desacoplar la pared celular vegetal disolviendo los distintos biopolímeros y componentes de poco interés. Se deberá tener en cuenta que algunos autores como Hartmann *et al.*, (2005) detallan que un tratamiento con una solución de hidróxido de sodio podría disminuir la cantidad disponible de hemicelulosa, como AX (Simkovic *et al.*, 2008 ; Bernhardt, 2014), aunque esta solución podría generar un aumento significativo en el desarrollo del hongo (Trd *et al.*, 2019 ; Rodríguez y Piñeros, 2007).

Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos y considerando los tiempos y costos del procesamiento, la fracción de fibra vegetal molida (PB) sería el sustrato más apropiado. No presenta ningún tratamiento químico adicional, y es la fracción de fibra a partir de la cual *T. harzianum* generó la mayor esporulación y actividad enzimática. Adicionalmente, arabinosa representa el monómero con mayor concentración, consecuencia del alto contenido de hemicelulosa que presenta esta fracción de fibra y a que *T. harzianum* utiliza a la glucosa y galactosa como nutriente para su desarrollo.

En cuanto a los resultados obtenidos durante la etapa comparativa del efecto sobre la síntesis enzimática del hongo, empleado fibra bacteriana (CB), se evidenció un número de esporas mayor en las muestras con el medio de cultivo Vogel's que Czapek (ítem 6.6.3). No obstante, el recuento para ambos medios es aún menor que lo obtenido para las muestras de fibras vegetales. Asimismo, la concentración de AR determinada fue menor que utilizando cualquiera de los sustratos de fibra vegetal. Esto implicaría que la celulosa de origen bacteriano no permite una síntesis enzimática favorable, siendo preferente entonces la fibra de origen vegetal.

Cabe mencionar que, durante la incubación en los medios líquidos, el hidrogel de CB absorbió el volumen del caldo, inhibiendo el desarrollo de *Trichoderma harzianum*, posiblemente mediante la inmovilización de los nutrientes, simulando una situación análoga a la incubación en un medio sólido tipo agar. De todos modos, el hongo pudo desarrollarse y crecer, dado que se evidenció esto en el recuento de esporas, por lo que no se descarta la utilización de este tipo de fibra como sustrato para la síntesis enzimática, para lo que se deberá profundizar el estudio empleando una proporción mayor de medio líquido con relación a la CB.

Además de los resultados obtenidos, se puede destacar que, si bien la CB presenta un gran potencial como uso alternativo a la celulosa vegetal, se debe tener en cuenta que sus elevados costos y problemáticas de escalado en procesos de fabricación resultaría poco útil frente a la utilización en la industria (Carreño Pineda *et al.*, 2012).

A modo de resumen, se puede afirmar que la mayor esporulación, peso de micelio obtenido y concentración de AR se da en aquellas muestras con una concentración de fibra vegetal de 1,5% (p/p), principalmente el PB, inoculadas con *Trichoderma harzianum* LMR1, en medio de cultivo caldo Czapek a una temperatura de 25°C durante 4 días de incubación bajo luz artificial constante.

A partir de esta investigación, es posible profundizar alternativas que podrían generar resultados prometedores para la hipótesis propuesta que postula optimizar los parámetros para la manipulación del hongo *T. harzianum* y así lograr una mayor generación de enzimas. Si bien *T. harzianum* presenta la capacidad de colonizar y adaptarse a varios tipos

de sustratos en condiciones controladas y producir elevadas cantidades de enzimas (Hernández-Melchor *et al.*, 2019), puede suplantarse por otros hongos como *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei* y *Trichoderma viride* que presentan características similares permitiendo aplicar los parámetros optimizados y así extraer biopolímeros a partir de dichas fracciones de fibras vegetales. El potencial celulolítico que presentan estos microorganismos y los múltiples estudios que existen actualmente evidencian lo eficiente que son como productores de enzimas, principalmente de celulasa (Diaz *et al.*, 2020).

Por otra parte, si bien Czapek permite obtener resultados elevados de esporulación y concentración de azúcares, se propone realizar distintas pruebas con otros medios de cultivo en estado líquido como aquellos que contienen celulosa y extractos de levadura o medios minerales como el Mandel's. Es importante destacar que se debe estudiar la posible presencia de compuestos químicos inhibidores que podrían llegar a afectar la producción de enzimas (Hernandez-Menchor *et al.*, 2019).

Realizando una breve mención a las técnicas aplicadas a lo largo del proyecto, como la tinción con Rojo Congo, si bien el método cualitativo directo es sencillo y eficaz, se propone utilizar como método posterior el correspondiente a agar carboximetilcelulosa (CMC), el cual es semicuantitativo y permite, a partir de los resultados de las placas obtenidas luego de ser teñidas con Rojo Congo, reactivarlas con agar CMC, potenciando el halo de degradación a partir de la capacidad que tiene el reactivo en adherirse a la carboximetilcelulosa (Rodriguez y Llenque, 2016 ; Alma *et al.*, 2010).

Por otra parte, se destaca que la determinación de biomasa presenta algunas limitaciones vinculadas a la relación física entre la biomasa del hongo y el sustrato empleado, a pesar de ello, se podría favorecer este proceso empleado técnicas gravimétricas (Pérez *et al.*, 2016).

Planteando un beneficio frente a la economía circular, que representa un modelo de producción y consumo que implica, entre otras cosas, reutilizar, reparar y reciclar materiales y/o productos existentes dentro de un ciclo de utilización para darle valor agregado y

extendiendo la vida de estos, se propone reducir la presión sobre el medio ambiente utilizando biomasa vegetal, como residuos lignocelulósicos. Se destaca que en primera instancia se deberá realizar la producción de la biomasa, su cosecha y recolección, y posteriores tratamientos para obtener los componentes de interés como la celulosa y la hemicelulosa (Tinoco y Serrano, 2021). Asimismo, será necesario profundizar la utilización de tratamientos alcalinos a fin de minimizar la utilización de químicos agresivos para el medio ambiente y, adicionalmente, desarrollar nuevas metodologías que pueden resultar rentables a escala industrial.

A partir de esto, se puede concluir que las fracciones de fibra vegetal utilizadas como sustrato para generar enzimas celulolíticas de *Trichoderma harzianum* con la utilidad de extraer biopolímeros y compuestos bioactivos, son una alternativa a los métodos enzimáticos convencionales que pueden resultar costosos, dado a los tratamientos y largos tiempos de proceso. El objetivo de obtener un desarrollo del moho para generar la mayor actividad enzimática, relacionada a la cantidad de esporas producidas y la medición de la cantidad de azúcares reductores liberados, permite revalorizar este residuo con gran importancia por ser fuente de biopolímeros de interés en la industria alimenticia. La reducción del volumen de residuos lignocelulósicos que se propone tiene como consecuencia la disminución de problemáticas comunes de gestión de desechos y elección de medidas para protección del medio ambiente con la finalidad de contrarrestar efectos negativos como los GEI (Bernhardt, 2014 ; Salvador-Pinos *et al.*, 2018).

## 8. Referencias bibliográficas

- Abbaszadeh, M. & Hejazi, P. (2019). Metal affinity immobilization of cellulase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles with copper as ligand for biocatalytic applications. *Food Chemistry*, 290, 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.117>
- Acurio Vásquez, R. D., & España Imbaquingo, C. K. (2017). Aislamiento, caracterización y evaluación de *Trichoderma spp.* como promotor de crecimiento vegetal en pasturas de raygrass (*lolium perenne*) y trébol blanco (*trifolium repens*). *LA GRANJA, Revista de Ciencias de la Vida*, 25(1), 53-61. <https://doi.org/10.17163/lgr.n25.2017.05>
- Ademoh, N. A., & Olabisi, A. I. (2015). Development and evaluation of maize husks (asbestos-free) based brake pad. *Development*, 5(2), 67-80. Disponible en: <https://www.iiste.org/Journals/index.php/IEL/article/view/19677> Consultado el 3 de diciembre del 2022.
- Ahamed, A. & Vermette, P. (2009). Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production. *Bioresource Technology*, 100(23), 5979-5987. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.070>
- Alvarez-Castillo, A., Salgado Delgado, R., García Hernández, E., Domínguez, M., Domínguez, J.M., Granados Baeza, A., ... Mendoza Martínez, A. M. (2011). Aprovechamiento integral de los materiales lignocelulósicos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 13(4), 140-150. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7902986>
- Alma, K., Blanca, N., & Maritza, P. (2010). *Determinación de la actividad enzimática de lacasas y lignina peroxidasas de hongos degradadores de colorantes seleccionados para el tratamiento de aguas residuales de la industria textil. Laboratorio de microbiología, Escuela politécnica del ejército, México.* [archivo pdf]. Recuperado de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/5269/1/AC-BIO-ESPE-033267.pdf>
- Andlar, M., Rezić, T., Marđetko, N., Kracher, D., Ludwig, R. & Šantek, B. (2018). Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in

lignocellulose degradation. *Engineering in Life Sciences*, 18(11), 768-778. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800039>

- Antolak, H., Piechota, D. & Kucharska, A. (2021). Kombucha Tea—A Double Power of Bioactive Compounds from Tea and Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts (SCOBY). *Antioxidants*, 10(10), 1541. <https://doi.org/10.3390/antiox10101541>
- Argumedo-Delira, R., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., & Peña-Cabriales, J. (2009). El género fúngico *Trichoderma* y su relación con los contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 25(4), 257-269. Recuperado de: <https://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v25n4/v25n4a6.pdf>
- Balat, M. (2011). Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, 52(2), 858-875. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2010.08.013>
- Baskaran, R. & Krishnan, C. (2020). Enhanced production of cellulase from a novel strain *Trichoderma gamsii* M501 through response surface methodology and its application in biomass saccharification. *Process Biochemistry*, 99, 48-60. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.08.006>
- Bäumler, E. R., Carrín, M. E. & Carelli, A. A. (2016). Extraction of sunflower oil using ethanol as solvent. *Journal of Food Engineering*, 178, 190-197. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.01.020>
- Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L. & Hoondal, G. S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(3-4), 326-338. <https://doi.org/10.1007/s002530100704>
- Bernhardt, D. C. (2018). Aislamiento de componentes poliméricos de la pared celular de las fibras de brácteas de maíz mediante tratamientos químicos y enzimático [Tesis doctoral].
- Bernhardt, D. C., Ponce, N. M., Basanta, M. F., Stortz, C. A. & Rojas, A. M. (2019). Husks of *Zea mays* as a potential source of biopolymers for food additives and

materials' development. *Heliyon*, 5(3), e01313.  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01313>

- Bernhardt, D. C., Castelli, M. V., Arqueros, V., Gerschenson, L. N., Fissore, E. N. & Rojas, A. M. (2022). Effect of fibers from bracts of maize (*Zea mays*) as natural additives in wheat bread-making: a technological approach. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16(5), 4036-4049. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01490-3>
- Bethke, K., Palantöken, S., Andrei, V., Roß, M., Raghuwanshi, V. S., Kettemann, F.,... Rademann, K. (2018). Functionalized Cellulose for Water Purification, Antimicrobial Applications, and Sensors. *Advanced Functional Materials*, 28(23), 1800409. <https://doi.org/10.1002/adfm.201800409>
- Blanco Parte, F. G., Santoso, S. P., Chou, C. C., Verma, V., Wang, H. T., Ismadji, S. & Cheng, K. C. (2020). Current progress on the production, modification, and applications of bacterial cellulose. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(3), 397-414. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1713721>
- Bonilla Ospina, N. (2020). *Optimización de la producción de celulasa a partir de Fusarium spp* [Tesis de maestría]. Universidad Nacional de Colombia, Colombia. Disponible en: <http://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/81428> Consultado 20 de marzo del 2022.
- Brutti, L. N., Beltran, M. J., & García de Salamone, I. (2018). *Biorremediación de los recursos naturales*. Ediciones INTA. [archivo pdf]. Recuperado de: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/libro\\_biorremediacion\\_de\\_los\\_recursos\\_naturales\\_2.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/libro_biorremediacion_de_los_recursos_naturales_2.pdf)
- Bustillo, A. (2010). Método para cuantificar suspensiones de esporas de hongos y otros organismos. *Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia*. DOI:10.13140/RG.2.1.3594.5128
- *Buy Enzymes and Direct-Fed Microbials*. (2022). American Biosystems. Disponible en: <https://www.americanbiosystems.com/> . Consultado 15 de Junio de 2022

- 
- Carrasco J., & Aguirre A., (2018) *Rastrojos del cultivo del Maíz: elementos a considerar para su manejo* [en línea]. Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias. no. 385. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/6735> Consultado el 28 de noviembre del 2022
  - Carreño Pineda, L. D., Caicedo Mesa, L. A. C. M. & Martínez Riascos, C. A. (2012). Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. *Ingeniería y Ciencia*, 8(16), 307-335. <https://doi.org/10.17230/ingciencia.8.16.12>
  - Ciudad-Mulero, M. (2017). Arabinosilanos y su importancia en la salud. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 11(1). <https://doi.org/10.5209/rccv.55224>
  - Coniglio, R. (2017). *Aspectos bioquímicos y moleculares de celobiohidrolasas fúngicas con potencial aplicación en el proceso de sacarificación*. [Tesis doctoral]. Universidad Nacional de Misiones. Disponible en: <https://rid.unam.edu.ar/handle/20.500.12219/2380> Consultado el 4 de noviembre del 2022
  - Cooper, G. M. (2000). *La célula: un enfoque molecular*. 2ª edición. Sunderland (MA): Sinauer Associates. Paredes celulares y matriz extracelular. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9874/> Consultado el 4 de marzo del 2022
  - Díaz, G. V., Coniglio, R. O., Chungara, C. I., Zapata, P. D., Villalba, L. L. & Fonseca, M. I. (2020). *Aspergillus niger* LBM 134 isolated from rotten wood and its potential cellulolytic ability. *Mycology*, 12(3), 160-173. <https://doi.org/10.1080/21501203.2020.1823509>
  - Esa, F., Tasirin, S. M. & Rahman, N. A. (2014). Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 113-119. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2014.11.017>
  - Florián Chamache, P., Torres, C. L., Villanueva Polo, F. & Bardales Vásquez, C. B. (2015). Valor económico de los residuos lignocelulósicos de los principales cultivos agrícolas del Valle Virú, La Libertad, Perú. *Arnaldoa*, 22(1), 233-242. <https://doi.org/10.22497/192>

- 
- Franco, D. (2006). Productos de Maíz. Análisis de la cadena alimentaria. *Alimentos Argentinos*, (32). Disponible en: [https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/contenido/revista/ediciones/32/cadenas/farinaceos\\_maiz.htm](https://alimentosargentinos.magyp.gob.ar/contenido/revista/ediciones/32/cadenas/farinaceos_maiz.htm) Consultado el 5 de agosto del 2022
  - Garay Hernández, C. A., & Peña Peña, N. (2018). *Obtención de azúcares reductores por medio de fermentación sólida a partir de cáscaras de piña*. [Tesis] Fundación Universidad de América, Bogotá [archivo pdf] Recuperado de: <https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/6928/1/6132095-2018-2-IQ.pdf>
  - Gañán, P., Zuluaga, R., Castro, C., Restrepo-Osorio, A., Cock, J. V., Osorio, M., ... & Molina, C. (2017). Celulosa: un polímero de siempre con mucho futuro. *Revista Colombiana de Materiales*, (11), 1-4. Disponible en: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/materiales/article/view/328779> Consultado el 24 de junio del 2022
  - Gómez-Martínez, C., Láinez-González, M., & Martínez-Hernández, S. (2019). Aislamiento de microorganismos celulolíticos del sistema digestivo de *Ptichopus angulatus* Leach, 1815 (Coleoptera: Passalidae) con potencial aplicación para biocombustibles. *Entomología Mexicana*, 6, 396-400.
  - Gorgieva & Trček. (2019a). Bacterial Cellulose: Production, Modification and Perspectives in Biomedical Applications. *Nanomaterials*, 9(10), 1352. <https://doi.org/10.3390/nano9101352>
  - Gutman, G. E., & Lavarello, P. J. (2014). Biotecnología industrial. *Estrategias empresariales frente al nuevo paradigma, CEUR-CONICET y Letra Prima*. Disponible en: <https://www.ceur-conicet.gov.ar/> Consultado 16 de mayo del 2022
  - Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N. & Montoya, D. (2015). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.10.009>

- 
- Gutiérrez Villanueva, A. R., Guirola Céspedes, C., de Armas Martínez, A. C., Albernas Carvajal, Y., & Villanueva Ramos, G. (2020). Valorización de la lignina en el concepto de biorrefinería (I). *Centro azúcar*, 47(3), 95-105. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2223-48612020000300095&lng=es&tlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2223-48612020000300095&lng=es&tlng=pt) Consultado el 8 de noviembre del 2022
  - Harborne, J. B., & Baxter, H. (1999). *The handbook of natural flavonoids. Volume 1 and Volume 2*. John Wiley and Sons. Disponible en: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=GB1999011368> Consultado el 3 de diciembre del 2022
  - Hartmann, G., Piber, M., & Koehler, P. (2005). Isolation and chemical characterisation of water-extractable arabinoxylans from wheat and rye during breadmaking. *European Food Research and Technology*, 221(3), 487-492. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-1154-z>
  - Harrison, K. & Curtin, C. (2021). Microbial Composition of SCOBY Starter Cultures Used by Commercial Kombucha Brewers in North America. *Microorganisms*, 9(5), 1060. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051060>
  - Hernández Huertas, E. D. (2015). Microorganismos celulolíticos presentes en la rizosfera del cultivo del olivo (*Olea europaea*) bajo las condiciones edafoclimáticas de alto ricasurte en Bocayá. *Fundación Universitaria Juan de Castellanos, Facultad de Ciencias Agrarias, Tunja*. Disponible en: [https://issuu.com/ingenieriaagropecuariajdc/docs/microorganismos\\_celulol\\_\\_ticos](https://issuu.com/ingenieriaagropecuariajdc/docs/microorganismos_celulol__ticos) Consultado el 11 de septiembre del 2022
  - Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R. & Alarcón, A. (2019). Trichoderma: Importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 35(1), 98-112. <https://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>
  - Idrovo Encalada, A. M., Pérez, C. D., Gerschenson, L. N., Rojas, A. M. & Fissore, E. N. (2019). Gelling pectins from carrot leftovers extracted by industrial-enzymes with ultrasound pretreatment. *LWT*, 111, 640-646. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.085>

- 
- Ipiiales Juma, J. P. I., Insuasti, J. A. P., Revelo, D. A. B., Puetate, F. A. M., & Soto, C. A. P. (2021). Producción del hongo-moho (*Trichoderma harzianum*): una revisión. *Revista Biorrefinería* Vol, 4(4). [archivo pdf] Recuperado de:  
<https://www.cebaecuador.org/wp-content/uploads/2022/01/14.pdf>
  - Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Trichoderma mechanisms of action against phytopathogen fungi. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1), 14-21. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522009000100002](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522009000100002) Consultado el 20 de abril del 2022
  - INTA Informa. El tratamiento de residuos clave en la gestión ambiental [en línea], Argentina. Disponible en: [www.intainforma.inta.gob.ar](http://www.intainforma.inta.gob.ar) Consultado el 25 de mayo del 2021
  - Jaramillo Rodríguez, M. A (2020). Diseño y optimización de un proceso de fermentación para la obtención de enzimas hemicelulolíticas y celulolíticas a partir de *Trichoderma koningiopsis* Th003. Disponible en:  
<https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/78989> Consultado el 25 de octubre del 2022
  - Kambis, A. D. & Levine, J. S. (1996). Biomass burning and the production of carbon dioxide: a numerical study. *Biomass Burning and Global Change: Remote sensing, modeling and inventory development, and biomass burning in Africa*, 1, 170.
  - *Kombucha, la bebida fermentada que apunta fuerte*. (2022, 7 de abril). Brew & Hub. Disponible en: <https://brewandhub.es/kombucha-la-bebida-fermentada-que-apunta-fuerte/> Consultado el 15 de noviembre del 2022
  - Kim, J. Y., Kwon, H. W., Lee, D. H., Ko, H. K. & Kim, S. H. (2019). Isolation and Characterization of Airborne Mushroom Damaging *Trichoderma spp.* from Indoor Air of Cultivation Houses Used for Oak Wood Mushroom Production Using Sawdust Media. *The Plant Pathology Journal*, 35(6), 674-683. <https://doi.org/10.5423/ppj.ft.10.2019.0261>

- 
- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. P. & Bohn, A. (2005). Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(22), 3358-3393. <https://doi.org/10.1002/anie.200460587>
  - Koschny Castro, M. E. (2020). *Evaluación de la producción de celulasas mediante un proceso de fermentación en medio sólido, empleando como sustrato residuos de zanahoria (Daucus Carota) y de maíz (Zea Mays)*. [Tesis de Licenciatura], Universidad de Costa Rica. Disponible en: <https://www.kerwa.ucr.ac.cr/handle/10669/86190> Consultado el 24 de febrero del 2022
  - Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J. & Stroeve, P. (2009). Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48(8), 3713-3729. <https://doi.org/10.1021/ie801542g>
  - Lehninger, A. L. (1976). *Bioquímica (Vol. 1)*. Edgard Blücher.
  - Li, M. F., Li, G. H. & Zhang, K. Q. (2019). Non-Volatile Metabolites from *Trichoderma spp.* *Metabolites*, 9(3), 58. <https://doi.org/10.3390/metabo9030058>
  - Lin, D., Liu, Z., Shen, R., Chen, S. & Yang, X. (2020). Bacterial cellulose in food industry: Current research and future prospects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 158, 1007-1019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.230>
  - Llamas, J. Biotecnología industrial. [en línea] Disponible en: <https://Economipedia.com> Consultado el 24 de septiembre del 2021
  - Luo, Y., Li, Z., Li, X., Liu, X., Fan, J., Clark, J. H. & Hu, C. (2019). The production of furfural directly from hemicellulose in lignocellulosic biomass: A review. *Catalysis Today*, 319, 14-24. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2018.06.042>
  - Maceda, A., Soto-Hernández, M., Peña-Valdivia, C. B., Trejo, C. & Terrazas, T. (2021). Lignina: composición, síntesis y evolución. *Madera y Bosques*, 27(2), e2722137. <https://doi.org/10.21829/myb.2021.2722137>

- 
- Maciel Pérez, R. (2015). Efecto de *Trichoderma spp* sobre los componentes del rendimiento de campo de la caña de azúcar (*Saccharum spp.* Híbrido) en el ingenio San Cristobal, Veracruz, México. Universidad Veracruzana, Mexico [Tesis Maestría] Disponible en: <http://cdigital.uv.mx/handle/1944/50348> Consultado el 5 de diciembre del 2022
  - Mahfoudhi, N. & Boufi, S. (2017). Nanocellulose as a novel nanostructured adsorbent for environmental remediation: a review. *Cellulose*, 24(3), 1171-1197. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1194-0>
  - Marquez-Escalante, J., Carvajal-Millan, E., López-Franco, Y. L., Valenzuela-Soto, E. M., & Rascón-Chu, A. (2018). Efecto prebiótico de los Arabinosilanos y los Arabinosilo-Oligosacáridos y su relación con la promoción de la buena salud. *CienciaUAT*, 13(1), 146-164. Disponible en: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-78582018000200146&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-78582018000200146&script=sci_arttext) Consultado el 5 de Junio del 2022
  - Martínez, J. M. R., & Lora, E. E. S. (Eds.). (2015). *Bioenergía: Fuentes, conversión y sustentabilidad*. José María Rincón Martínez, Electo Eduardo Silva Lora.
  - Mesa Vanegas, A. M., Marín Pavas, D. A. & Calle Osorno, J. (2020). Metabolitos secundarios en *Trichoderma spp.* y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. *Actualidades Biológicas*, 41(111), 1-13. <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v41n111a02>
  - Morales de la Rosa, S. (2015). Hidrólisis ácida de celulosa y biomasa lignocelulósica asistida con líquidos iónicos. [Tesis doctoral]. *Universidad Autónoma de Madrid, España*. Disponible en: [https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/667856/morales\\_de\\_la\\_rosa\\_silvia.pdf?sequence=1](https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/667856/morales_de_la_rosa_silvia.pdf?sequence=1) Consultado el 16 de mayo del 2021
  - Moreira Muzio, M., Gaioli, F., y Galbusera, S. (2019). Inventario nacional de gases de efecto invernadero: Argentina, 2019. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación [archivo pdf] Recuperado de:

[https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/inventario\\_de\\_gei\\_de\\_2019\\_de\\_la\\_república\\_argentina.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/inventario_de_gei_de_2019_de_la_república_argentina.pdf)

- Nelson, N. (1943). A photometric adaptation of the Somogyi method of determination of glucose. *Journal of Chemistry*, 153, 375-381. Disponible en: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10015339069> Consultado el 19 de agosto del 2021
- Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H. & Yoshinaga, F. (1998). Effect of ethanol on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85(6), 598-603. [https://doi.org/10.1016/s0922-338x\(98\)80012-3](https://doi.org/10.1016/s0922-338x(98)80012-3)
- Nieto-Jacobo, M. F., Steyaert, J. M., Salazar-Badillo, F. B., Nguyen, D. V., Rostás, M., Braithwaite, M., ... Mendoza-Mendoza, A. (2017). Environmental Growth Conditions of *Trichoderma spp.* Affects Indole Acetic Acid Derivatives, Volatile Organic Compounds, and Plant Growth Promotion. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00102>
- Ortiz Moreno, M. L. & Uribe-Vélez, D. (2011). Nuevo método para la cuantificación de la actividad endoglucanasa basado en el complejo celulosa-rojo congo. *Orinoquia*, 15(1), 7. <https://doi.org/10.22579/20112629.32>
- Osorio-Concepción, M., Casas-Flores, S., & Cortés-Penagos, C. (2013). Efecto de la limitación de fosfato sobre la conidiación de *Trichoderma atroviride* y mutantes ciegas a la luz. *Revista mexicana de micología*, 37, 41-50. Recuperado el 26 de noviembre de 2022, en [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-31802013000100006&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802013000100006&lng=es&tlng=es)
- Ovando-Chacón, S. L. & Waliszewsk, K. N. (2004). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 21(42), 113-122. <https://doi.org/10.19136/era.a21n42.337>
- Pang, M., Huang, Y., Meng, F., Zhuang, Y., Liu, H., Du, ... Cai, Y. (2020). Application of bacterial cellulose in skin and bone tissue engineering. *European Polymer Journal*, 122, 109365. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109365>

- Parera, C. A. (2017). Producción de maíz dulce. *INTA Ediciones*. [archivo pdf]  
Recuperado de: [https://www.researchgate.net/profile/Carlos-Parera/publication/326649587\\_Produccion\\_de\\_Maiz\\_Dulce/links/5b5b0440458515c4b24abbe2/Produccion-de-Maiz-Dulce.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Carlos-Parera/publication/326649587_Produccion_de_Maiz_Dulce/links/5b5b0440458515c4b24abbe2/Produccion-de-Maiz-Dulce.pdf)
- Patel, A. K., Singhanian, R. R. & Pandey, A. (2017). Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes. *Biotechnology of Microbial Enzymes*, 13-41.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803725-6.00002-9>
- Pérez, S. R., Arone, M. C., Calzadillo, J. S., Rodríguez, I. A., & Díaz, M. S. (2017). Determinación de biomasa fúngica y su utilidad en procesos biotecnológicos. *Afinidad*, 74(577). Disponible en: <https://raco.cat/index.php/afinidad/article/view/320783> Consultado el 4 de mayo del 2022
- *Pioneer® Seeds | Global*. (s. f.). Disponible en: <https://www.pioneer.com/landing> Consultado el 15 de julio del 2022
- Ramos Guizado, W. (2022). Evaluación de Trichoderma (*Trichoderma harzianum*) y microorganismos eficientes como antagonistas del fusarium (*Fusarium spp.*) En la fase vegetativa del cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) variedad Canario, distrito de Abancay–Apurímac. *Universidad Tecnológica de los Andes*. [Tesis] [archivo pdf]  
Recuperado de: <https://repositorio.utea.edu.pe/bitstream/utea/361/1/Evaluaci%c3%b3n%20de%20Trichoderma%20%28Trichoderma%20harzianum%29%20y%20microorganismos%20eficientes%20como%20antagonistas%20del%20fusarium%20%28Fusarium%20spp.%29.pdf>
- Ramos Sevilla, I. (2018). Caracterización química de tres residuos lignocelulósicos generados en la región del Cantón Alausí. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica*, 20(40), 80-85 [archivo pdf]  
Recuperado de: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/iigeo/article/view/14393/12728>

- REDDING (2022) Enzymes Market Size, Share & Trends Analysis Report By Product (Lipases, Polymerases & Nucleases, Carbohydrase), By Type (Industrial, Specialty), By Source (Plants, Animals), By Region, And Segment Forecasts, 2022 – 2030. *Grand view Research* [en línea]. Disponible en: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry> Consulta el 5 de octubre del 2022
- Rifai, M. A. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological papers*, 116, 1-56.
- Rodriguez, I., & Piñeros, Y. (2007). Producción de complejos enzimáticos celulolíticos mediante el cultivo en fase sólida de *Trichoderma spp.* sobre los racimos vacíos de palma de aceite como sustrato. *Vitae*, 14(2), 35-42. [archivo pdf] Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/1698/169815389004.pdf>
- Rojas Vargas, J. A. (2020). Impacto del tratamiento químico alcalino en el cisco del café para su uso como biofuerzo. *Universidad de Manizales, Colombia*. [Tesis de maestría] [archivo pdf] Recuperado de: <https://ridum.umanizales.edu.co/bitstream/handle/20.500.12746/4077/67201618093-2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ronnie-Gakegne, E. & Martínez-Coca, E. (2018). Antibiosis y efecto de pH-temperatura sobre el antagonismo de cepas de *Trichoderma asperellum* frente a *Alternaria solani*. *Revista de Protección Vegetal*, 33(2). [archivo pdf]. Recuperado de: <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v33n2/2224-4697-rpv-33-02-e08.pdf>
- Rosales-López, C., Valerín-Berrocal, K. & Jiménez-Bonilla, V. (2018). Crecimiento dimórfico y caracterización molecular de *Candida guilliermondii* aislado de *Panicum maximum*. *Revista Tecnología en Marcha*, 31(1), 121. <https://doi.org/10.18845/tm.v31i1.3502>
- Salvador Pinos, C. A., González Suárez, E., & Concepción Toledo, D. N. (2018). Evaluar sustituir enzimas comerciales por nativas desde la Universidad: un intangible para el desarrollo local. *Revista Universidad y Sociedad*, 10(4), 69-74. Disponible en:

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2218-](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2218-)

36202018000400069&lng=es&nrm=iso Consultado el 19 de octubre del 2022

- Santos, S. M., Carbajo, J. M., & Villar, J. C. (2015). Celulosa Bacteriana. [archivo pdf]. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/profile/Juan-Villar-7/publication/283354874\\_Celulosa\\_Bacteriana/links/56373d9a08ae7588411521d7/Celulosa-Bacteriana.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Juan-Villar-7/publication/283354874_Celulosa_Bacteriana/links/56373d9a08ae7588411521d7/Celulosa-Bacteriana.pdf)
- Schendel, R. R., Meyer, M. R. & Bunzel, M. (2016). Quantitative Profiling of Feruloylated Arabinoxylan Side-Chains from Gramineous Cell Walls. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01249>
- Sepúlveda, A. V., Jiménez, J. C., Aguirre, C. A. (FECHA) Manejo de Rastrojos de Maíz. Capítulo 1. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Ministerio de Agricultura [en línea]. Disponible en: <https://biblioteca.inia.cl/> Consultado el 21 de agosto del 2022
- Serrano, S., & Charris, I. (2018). El papel de los hongos degradadores de celulosa presente en el bagazo de caña de azúcar como alternativa industrial en la producción de bioetanol de segunda generación. *Microciencia*, 7, 45-55. [archivo pdf] Recuperado de: <https://revistas.unilibre.edu.co/index.php/microciencia/article/view/5617/5187>
- Silva, L. A. R., & Díaz, L. L. (2016). Aislamiento y selección de bacterias celulolíticas a partir de compost de residuos orgánicos. *Rebiol*, 36(1), 19-28. [archivo pdf] Recuperado de: <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/faccbiol/article/view/1310/1274>
- Sivila, N., & Alvarez, S. (2013). Producción artesanal de Trichoderma. *Tecnologías para la agricultura familiar. Tecnologías agroecológicas para la agricultura familiar*. Ed. Universitaria de Jujuy, Jujuy.
- Šimkovič, M., Ditte, P., Kurucova, A., Lakatoš, B., & Varečka, L. U. (2008). Ca<sup>2+</sup>-dependent induction of conidiation in submerged cultures of *Trichoderma viride*. *Canadian journal of microbiology*, 54(4), 291-298. <https://doi.org/10.1139/W08-001>
- Sinha, A., Harshita, D., Singh, R., Rao, S. G., & Verma, A. (2018). Comprehensive evaluation of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* on different culture

media & at different temperature and pH. *Pharma Innov. J*, 7, 193-195. Recuperado de:  
<https://www.thepharmajournal.com/>

- Spencer, P. V. D., Costa, T. P., Souza, M. J., Pinto, N. A. V. D., Nelson, D. L. & Benassi, V. M. (2020). Analysis of the Lipolytic Potential of Filamentous Fungi Isolated from Some Plants and Soil Samples in Minas Gerais, Brazil. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 11(11), 475-487. <https://doi.org/10.4236/abb.2020.1111032>
- Srivastava, N., Srivastava, M., Manikanta, A., Ramteke, P. W., Singh, R. L., Mishra, P. K., & Upadhyay, S. N. (2018). Fungal cellulases production for biodegradation of agriculture waste. In *Microorganisms for Green Revolution* (pp. 75-89). Springer, Singapore. DOI: 10.1007/978-981-10-7146-1\_4
- Stępień-Warda, A. (2020). Effect of soil cultivation system on the efficiency of the photosynthetic apparatus in maize leaves (*Zea mays L.*). *Polish Journal of Agronomy*, 43, 57-62. DOI: 10.26114/pja.iung.445.2020.43.05
- Storti, L. (2019). Informe de cadena de valor, cereales: maíz. *Ministerio de Hacienda Presidencia de la Nación* [en línea]. ISSN: 2525-0221. Disponible en: [www.argentina.gob.ar](http://www.argentina.gob.ar) Consultado el 25 de enero del 2022
- Torán-Pereg, P., del Noval, B., Valenzuela, S., Martínez, J., Prado, D., Perisé, R. & Arbolea, J. C. (2021). Microbiological and sensory characterization of kombucha SCOBY for culinary applications. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 23, 100314. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2021.100314>
- Torres Jaramillo, D., Morales Vélez, S. P. & Quintero Díaz, J. C. (2017). Evaluación de pretratamientos químicos sobre materiales lignocelulósicos. *Ingeniare. Revista chilena de ingeniería*, 25(4), 733-743. <https://doi.org/10.4067/s0718-33052017000400733>
- Trd Larasati, N. M., Dadang Sudrajat, S. H., SR, H. & Arief A. (2018). The effectiveness of *Trichoderma viride* fungal to hydrolise rice straw and elephant grass stems using NaOH pretreatment and gamma rays. *Jurnal Ilmiah Aplikasi Isotop dan Radiasi*, 15(2), 107-115. Disponible en:

[https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig\\_q=RN:51037309](https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:51037309) Consultado el 4 de julio del 2022

- Vásquez-Cárdenas, J. (2010). Caracterización microbiológica y producción de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* en cultivo artesanal. *Pontificia Universidad Javeriana*, 18-19. [Trabajo de grado]. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10554/8662>
- Vega Rodríguez, M. C. & Hernández-Chaverri, R. A. (2020). Crecimiento de *Trichoderma* en rastrojo de piña para obtener esporas para uso agrícola. *Agronomía Mesoamericana*, 597-608. <https://doi.org/10.15517/am.v31i3.40275>
- Vera-Zambrano, R. A. & Torres-Rodríguez, R. (2021). Pautas de un programa de mantenimiento y su importancia en el proceso agroindustria. *Revista Científica INGENIAR: Ingeniería, Tecnología e Investigación*, 4(8), 96-113. <https://doi.org/10.46296/ig.v4i8.0025>
- Vilches Paz, L. (2002). Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú*. Disponible en: [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/1406/Vilchez\\_pl.pdf?sequence=1](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/1406/Vilchez_pl.pdf?sequence=1) Consultado el 26 de marzo del 2022
- Vogel, H. J. (1956). A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. *Microbial Genetics Bull.* Disponible en: <https://www.fgsc.net//methods/vogels.html#:~:text=Vogels,volume%20is%20about%201.00%20liter> Consultado el 15 de junio del 2022
- Walton, B. T., Hoylman, A. M., Perez, M. M., Anderson, T. A., Johnson, T. R., Guthrie, E. A., & Christman, R. F. (1994). Rhizosphere microbial communities as a plant defense against toxic substances in soils. DOI: 10.1021/bk-1994-0563.ch007
- Wang, X., Yao, C., Wang, F. & Li, Z. (2017). Cellulose-Based Nanomaterials for Energy Applications. *Small*, 13(42), 1702240. <https://doi.org/10.1002/sml.201702240>

- Yedidia, I., Benhamou, N. & Chet, I. (1999). Induction of Defense Responses in Cucumber Plants (*Cucumis sativus* L.) by the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 1061-1070. <https://doi.org/10.1128/aem.65.3.1061-1070.1999>
- Zin, N. A. & Badaluddin, N. A. (2020). Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications. *Annals of Agricultural Sciences*, 65(2), 168-178. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2020.09.003>

## ANEXOS

## 9. Anexos

### A. Recuento de esporas en las etapas desarrolladas

**TABLA VIII.** Resultados correspondientes al recuento de esporas sobre el control y las muestras de fibras vegetales PB, RIA y Cel-KOH (1,5% p/p), en caldo Czapek y Vogel's (4 y 7 días, 25°C, luz).

Medio	Tipo de Medio	Tiempo de incubación	Muestra	Número total de esporas (esporas/ml)
Czapek	Caldo	4 días	Control	$4,47(\pm 2,11) \times 10^4$
			PB	$1,55(\pm 0,26) \times 10^6$
			RIA	$1,67(\pm 0,92) \times 10^6$
			Cel-KOH	$5,73(\pm 1,60) \times 10^4$
		7 días	Control	$4,10(\pm 0,95) \times 10^4$
			PB	$4,99(\pm 1,02) \times 10^5$
			RIA	$5,36(\pm 4,00) \times 10^5$
			Cel-KOH	$4,57(\pm 1,14) \times 10^4$
Vogel's	Caldo	4 días	Control	$2,80(\pm 0,54) \times 10^5$
			PB	$2,39(\pm 0,40) \times 10^6$
			RIA	$6,60(\pm 3,05) \times 10^5$
			Cel-KOH	$2,64(\pm 0,34) \times 10^5$
		7 días	Control	$3,47(\pm 0,83) \times 10^4$
			PB	$1,70(\pm 0,93) \times 10^5$
			RIA	$2,15(\pm 0,50) \times 10^5$
			Cel-KOH	$9,03(\pm 1,52) \times 10^4$

**TABLA IX.** Resultados correspondientes al recuento de esporas sobre el control y las muestras de fibras vegetales PB, RIA y Cel-KOH (1,5% p/p), en agar Czapek y Vogel's (4 y 7 días, 25°C, luz).

Medio	Tipo de medio	Tiempo de incubación	Muestra	Número de esporas (esporas/ml)
Czapek	Agar	4 días	Control	$4,97(\pm 1,70) \times 10^4$
			PB	$1,02(\pm 0,15) \times 10^6$
			RIA	$2,87(\pm 0,85) \times 10^5$
			Cel-KOH	$1,75(\pm 0,58) \times 10^5$
		7 días	Control	$5,86(\pm 3,25) \times 10^4$
			PB	$2,75(\pm 0,29) \times 10^6$
			RIA	$1,37(\pm 0,64) \times 10^6$
			Cel-KOH	$3,46(\pm 0,28) \times 10^5$
Vogel's		4 días	Control	$6,70(\pm 0,17) \times 10^5$
			PB	$3,93(\pm 0,12) \times 10^5$
			RIA	$3,97(\pm 0,05) \times 10^5$

	Agar	7 días	Cel-KOH	$3,37(\pm 0,71) \times 10^4$
			Control	$3,58(\pm 0,77) \times 10^7$
			PB	$1,32(\pm 0,36) \times 10^7$
			RIA	$1,35(\pm 0,63) \times 10^7$
			Cel-KOH	$1,48(\pm 0,09) \times 10^7$

**TABLA X.** Resultados correspondientes al recuento de esporas sobre el control y las muestras de fibras vegetales PB, RIA y Cel-KOH (2% p/p), en caldo Czapek y Vogel's (4 y 7 días, 25°C, luz).

Medio de cultivo	Tipo de Medio	Tiempo de incubación	Muestra	Número de esporas (esporas/ml)
Czapek	Caldo	4 días	Control	$1,50(\pm 0,79) \times 10^4$
			PB	$2,39(\pm 0,85) \times 10^5$
			RIA	$3,15(\pm 0,73) \times 10^5$
			Cel-KOH	$2,43(\pm 0,13) \times 10^4$
		7 días	Control	$2,13(\pm 0,42) \times 10^4$
			PB	$8,07(\pm 3,78) \times 10^5$
			RIA	$5,53(\pm 3,53) \times 10^5$
			Cel-KOH	$5,30(\pm 1,49) \times 10^4$
Vogel's	Caldo	4 días	Control	$1,64(\pm 0,29) \times 10^5$
			PB	$6,30(\pm 0,30) \times 10^5$
			RIA	$3,42(\pm 0,20) \times 10^5$
			Cel-KOH	$1,96(\pm 0,11) \times 10^5$
		7 días	Control	$3,19(\pm 0,56) \times 10^5$
			PB	$8,77(\pm 2,49) \times 10^5$
			RIA	$1,26(\pm 0,89) \times 10^6$
			Cel-KOH	$1,56(\pm 0,30) \times 10^5$

## I. Análisis estadístico de los resultados

Con los datos obtenidos a partir del recuento, se procedió a realizar la evaluación de los supuestos del análisis estadístico ANOVA, considerando muestras aleatorias y escala de la variable de al menos un intervalo.

**TABLA XI.** Evaluación del supuesto de normalidad y homocedasticidad para las muestras incubadas en medio de cultivo agar Czapek con una cc de fibra vegetal de 1,5% (p/p) (4 días, 25°C, luz).

Shapiro-Wilks (modificado)						Análisis de la varianza						
						Variable N R <sup>2</sup> R <sup>2</sup> Aj CV						
						RABS Recuento log esporas 12 0,22 0,00 69,07						
Muestras Variable n Media D.E. W* p(Unilateral D)						Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
Cel-KOH	Recuento log esporas	3	5,23	0,14	0,99	0,7845	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Control	Recuento log esporas	3	4,68	0,16	0,97	0,7020	Modelo	0,01	3	2,8E-03	0,76	0,5475
PB	Recuento log esporas	3	6,01	0,06	0,99	0,8585	Muestras	0,01	3	2,8E-03	0,76	0,5475
RIA	Recuento log esporas	3	5,45	0,12	0,95	0,5543	Error	0,03	8	3,6E-03		
						Total 0,04 11						

**TABLA XII.** Resultados luego de ANOVA paramétrica para las muestras incubadas con medio agar Czapek con una cc de fibra vegetal de 1,5% (p/p) (4 días, 25°C).

Análisis de la varianza					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
Recuento	12	0,95	0,94	2,38	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2,72	3	0,91	56,02	<0,0001
Muestras	2,72	3	0,91	56,02	<0,0001
Error	0,13	8	0,02		
Total	2,85	11			
Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,33243					
Error: 0,0162 gl: 8					
Muestras	Medias	n	E.E.		
Control	4,68	3	0,07	A	
Cel-KOH	5,23	3	0,07	B	
RIA	5,45	3	0,07	B	
PB	6,01	3	0,07	C	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)					

**TABLA XIII.** Evaluación del supuesto de normalidad y homocedasticidad para las muestras incubadas en medio de cultivo caldo Czapek con una cc de fibra vegetal de 1,5% (p/p) (4 días, 25°C).

Shapiro-Wilks (modificado)						Análisis de la varianza						
						Variable N R <sup>2</sup> R <sup>2</sup> Aj CV						
						RABS Recuento log esporas 12 0,35 0,10 69,88						
Muestras Variable n Media D.E. W* p(Unilateral D)						Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
Cel-KOH	Recuento log esporas	3	4,75	0,13	0,99	0,7775	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Control	Recuento log esporas	3	4,62	0,19	0,84	0,2025	Modelo	0,03	3	0,01	1,42	0,3056
PB	Recuento log esporas	3	6,19	0,07	0,93	0,4969	Muestras	0,03	3	0,01	1,42	0,3056
RIA	Recuento log esporas	3	6,17	0,26	0,99	0,8231	Error	0,05	8	0,01		
						Total 0,08 11						

**TABLA XIV.** Resultados luego de ANOVA paramétrica para las muestras incubadas con medio caldo Czapek con una cc de fibra vegetal de 1,5% (p/p) (4 días, 25°C).

Análisis de la varianza					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
Recuento log esporas	12	0,96	0,95	3,27	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	6,74	3	2,25	71,32	<0,0001
Muestras	6,74	3	2,25	71,32	<0,0001
Error	0,25	8	0,03		
Total	6,99	11			
Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,46409					
Error: 0,0315 gl: 8					
Muestras	Medias	n	E.E.		
Control	4,62	3	0,10	A	
Cel-KOH	4,75	3	0,10	A	
RIA	6,17	3	0,10	B	
PB	6,19	3	0,10	B	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)					

**TABLA XV.** Evaluación del supuesto de normalidad y homocedasticidad para las muestras incubadas en medio de cultivo agar Czapek con una cc de fibra vegetal de 1,5% (p/p) (7 días, 25°C).

Shapiro-Wilks (modificado)						Variable						
						RBS	Recuento	log esporas	12	0,62	0,47	67,55
Muestras	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)						
Cel-KOH	Recuento log esporas	3	5,54	0,04	0,77	0,0410						
Control	Recuento log esporas	3	4,72	0,23	0,97	0,6897						
PB	Recuento log esporas	3	6,44	0,05	0,89	0,3552						
RIA	Recuento log esporas	3	6,10	0,25	0,85	0,2327						

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	0,06	3	0,02	4,26	0,0449	
Muestras	0,06	3	0,02	4,26	0,0449	
Error	0,04	8	0,01			
Total	0,11	11				

**TABLA XVI.** Resultados luego de ANOVA paramétrica para las muestras incubadas con medio agar Czapek con una cc de fibra vegetal de 1,5% (p/p) (7 días, 25°C).

Variable					
Recuento log esporas	12	0,95	0,94	3,03	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5,04	3	1,68	56,21	<0,0001
Muestras	5,04	3	1,68	56,21	<0,0001
Error	0,24	8	0,03		
Total	5,28	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,45191  
 Error: 0,0299 gl: 8  
 Muestras Medias n E.E.

Control	4,72	3	0,10	A
Cel-KOH	5,54	3	0,10	B
RIA	6,10	3	0,10	C
PB	6,44	3	0,10	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

**TABLA XVII.** Evaluación del supuesto de normalidad y homocedasticidad para las muestras incubadas en medio de cultivo caldo Czapek con una cc de fibra vegetal de 1,5% (p/p) (7 días, 25°C).

Shapiro-Wilks (modificado)						Análisis de la varianza					
						RBS	Recuento	12	0,67	0,54	62,29
Muestras	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)					
Cel-KOH	Recuento	3	4,65	0,12	0,91	0,4134					
Control	Recuento	3	4,60	0,10	0,82	0,1617					
PB	Recuento	3	6,70	0,01	0,94	0,5408					
RIA	Recuento	3	6,73	0,03	1,00	0,9564					

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	0,01	3	4,7E-03	5,30	0,0265	
Muestras	0,01	3	4,7E-03	5,30	0,0265	
Error	0,01	8	8,8E-04			
Total	0,02	11				

**TABLA XVIII.** Resultados luego de ANOVA paramétrica para las muestras incubadas con medio caldo Czapek con una cc de fibra vegetal de 1,5% (p/p) (7 días, 25°C).

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup>	Aj	CV
Recuento	12	1,00	0,99	1,37	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	13,06	3	4,35	721,94	<0,0001
Muestras	13,06	3	4,35	721,94	<0,0001
Error	0,05	8	0,01		
Total	13,11	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,20307  
 Error: 0,0060 gl: 8  
 Muestras Medias n E.E.

Control	4,60	3	0,04	A
Cel-KOH	4,65	3	0,04	A
PB	6,70	3	0,04	B
RIA	6,73	3	0,04	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

**TABLA XIX.** Evaluación del supuesto de normalidad y homocedasticidad para las muestras incubadas en medio de cultivo agar Vogel's con una cc de fibra vegetal de 1,5% (p/p) (4 días, 25°C).

Shapiro-Wilks (modificado)						Análisis de la varianza						
Muestras	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
Cel-KOH	Recuento log esporas	3	4,52	0,10	0,95	0,5856	RABS Recuento log esporas	12	0,71	0,60	91,13	
Control	Recuento log esporas	3	5,83	0,01	0,84	0,2245	<b>Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)</b>					
PB	Recuento log esporas	3	5,59	0,01	0,75	<0,0001	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
RIA	Recuento log esporas	3	5,60	0,01	0,75	<0,0001	Modelo	0,01	3	3,0E-03	6,55	0,0151
							Muestras	0,01	3	3,0E-03	6,55	0,0151
							Error	3,6E-03	8	4,5E-04		
							Total	0,01	11			

**TABLA XX.** Resultados luego de ANOVA paramétrica para las muestras incubadas con medio agar Vogel's con una cc de fibra vegetal de 1,5% (p/p) (4 días, 25°C).

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Recuento log esporas	12	0,99	0,99	0,90

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3,09	3	1,03	434,44	<0,0001
Muestras	3,09	3	1,03	434,44	<0,0001
Error	0,02	8	2,4E-03		
Total	3,11	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,12737  
 Error: 0,0024 gl: 8  
 Muestras Medias n E.E.

Muestras	Medias	n	E.E.
Cel-KOH	4,52	3	0,03 A
PB	5,59	3	0,03 B
RIA	5,60	3	0,03 B
Control	5,83	3	0,03 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

**TABLA XXI.** Evaluación del supuesto de normalidad y homocedasticidad para las muestras incubadas en medio de cultivo caldo Vogel's con una cc de fibra vegetal de 1,5% (p/p) (4 días, 25°C).

Shapiro-Wilks (modificado)						Análisis de la varianza						
Muestras	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
Cel-KOH	Recuento	3	5,42	0,05	0,85	0,2416	RABS Recuento	12	0,57	0,41	56,18	
Control	Recuento	3	5,44	0,09	0,93	0,4748	<b>Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)</b>					
PB	Recuento	3	6,37	0,08	0,90	0,3988	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
RIA	Recuento	3	5,79	0,19	0,88	0,3191	Modelo	0,02	3	0,01	3,51	0,0691
							Muestras	0,02	3	0,01	3,51	0,0691
							Error	0,01	8	1,8E-03		
							Total	0,03	11			

**TABLA XXII.** Resultados luego de ANOVA paramétrica para las muestras incubadas con medio agar Vogel's con una cc de fibra vegetal de 1,5% (p/p) (4 días, 25°C).

Análisis de la varianza				
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Recuento	12	0,95	0,93	1,96

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,78	3	0,59	46,68	<0,0001
Muestras	1,78	3	0,59	46,68	<0,0001
Error	0,10	8	0,01		
Total	1,89	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,29509  
 Error: 0,0127 gl: 8  
 Muestras Medias n E.E.

Muestras	Medias	n	E.E.
Cel-KOH	5,42	3	0,07 A
Control	5,44	3	0,07 A
RIA	5,79	3	0,07 B
PB	6,37	3	0,07 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

**TABLA XXIII.** Evaluación del supuesto de normalidad y homocedasticidad para las muestras incubadas en medio de cultivo agar Vogel's con una cc de fibra vegetal de 1,5% (p/p) (7 días, 25°C).

Shapiro-Wilks (modificado)							Análisis de la varianza					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV			Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
RABS Recuento	12	0,37	0,13	83,88			F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Muestras	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)	Modelo	0,02	3	0,01	1,56	0,2736
Cel-KOH	Recuento	3	7,17	0,03	0,97	0,6667	Muestras	0,02	3	0,01	1,56	0,2736
Control	Recuento	3	7,55	0,10	0,82	0,1621	Error	0,04	8	4,7E-03		
PB	Recuento	3	7,11	0,13	0,98	0,6990	Total	0,06	11			
RIA	Recuento	3	7,10	0,21	1,00	0,9689						

**TABLA XXIV.** Resultados luego de ANOVA paramétrica para las muestras incubadas con medio agar Vogel's con una cc de fibra vegetal de 1,5% (p/p) (7 días, 25°C).

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Recuento	12	0,75	0,65	1,82

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	0,41	3	0,14	7,87	0,0090	
Muestras	0,41	3	0,14	7,87	0,0090	
Error	0,14	8	0,02			
Total	0,55	11				

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,34398  
 Error: 0,0173 gl: 8  
 Muestras Medias n E.E.

Muestras	Medias	n	E.E.
RIA	7,10	3	0,08 A
PB	7,11	3	0,08 A
Cel-KOH	7,17	3	0,08 A
Control	7,55	3	0,08 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

**TABLA XXV.** Evaluación del supuesto de normalidad y homocedasticidad para las muestras incubadas en medio de cultivo caldo Vogel's con una cc de fibra vegetal de 1,5% (p/p) (7 días, 25°C).

Shapiro-Wilks (modificado)							Análisis de la varianza					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV			Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
RABS Recuento	12	0,58	0,43	73,55			F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Muestras	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)	Modelo	0,01	3	2,9E-03	3,72	0,0611
Cel-KOH	Recuento	3	4,95	0,08	0,96	0,6247	Muestras	0,01	3	2,9E-03	3,72	0,0611
Control	Recuento	3	4,53	0,10	0,95	0,5667	Error	0,01	8	7,8E-04		
PB	Recuento	3	6,23	0,02	0,94	0,5415	Total	0,01	11			
RIA	Recuento	3	6,33	0,01	1,00	0,9849						

**TABLA XXVI.** Resultados luego de ANOVA paramétrica para las muestras incubadas con medio caldo Vogel's con una cc de fibra vegetal de 1,5% (p/p) (7 días, 25°C).

Análisis de la varianza				
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Recuento	12	1,00	0,89	1,15

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	7,39	3	2,46	611,48	<0,0001	
Muestras	7,39	3	2,46	611,48	<0,0001	
Error	0,03	8	4,0E-03			
Total	7,42	11				

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,16598  
 Error: 0,0040 gl: 8  
 Muestras Medias n E.E.

Muestras	Medias	n	E.E.
Control	4,53	3	0,04 A
Cel-KOH	4,95	3	0,04 B
PB	6,23	3	0,04 C
RIA	6,33	3	0,04 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

**TABLA XXVII.** Evaluación del supuesto de normalidad y homocedasticidad para las muestras incubadas en medio de cultivo caldo Czapek con una cc de fibra vegetal de 2% (p/p) (4 días, 25°C).

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS Esporas	12	0,49	0,30	71,62

Shapiro-Wilks (modificado)

Muestra	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Cel-KOH	Esporas	3	4,39	0,03	0,96	0,6394
Control	Esporas	3	4,14	0,22	0,95	0,5704
PB	Esporas	3	5,36	0,17	0,95	0,5713
RIA	Esporas	3	5,49	0,10	1,00	>0,9999

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,03	3	0,01	2,54	0,1299
Muestra	0,03	3	0,01	2,54	0,1299
Error	0,04	8	4,5E-03		
Total	0,07	11			

**TABLA XXVIII.** Resultados luego de ANOVA paramétrica para las muestras incubadas con medio caldo Czapek con una cc de fibra vegetal de 2% (p/p) (4 días, 25°C).

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Esporas	12	0,96	0,94	3,07

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4,17	3	1,39	63,02	<0,0001
Muestra	4,17	3	1,39	63,02	<0,0001
Error	0,18	8	0,02		
Total	4,35	11			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,38826  
 Error: 0,0221 gl: 8  
 Muestra Medias n E.E.  
 Control 4,14 3 0,09 A  
 Cel-KOH 4,39 3 0,09 A  
 PB 5,36 3 0,09 B  
 RIA 5,49 3 0,09 B  
 Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

**TABLA XXIX.** Evaluación del supuesto de normalidad y homocedasticidad para las muestras incubadas en medio de cultivo caldo Czapek con una cc de fibra vegetal de 2% (p/p) (7 días, 25°C).

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS Log. esporas	12	0,55	0,38	49,68

Shapiro-Wilks (modificado)

Muestra	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Cel-KOH	Log. esporas	3	4,71	0,12	0,90	0,3962
Control	Log. esporas	3	4,33	0,08	0,92	0,4628
PB	Log. esporas	3	5,86	0,26	0,75	<0,0001
RIA	Log. esporas	3	5,69	0,25	0,83	0,1907

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,04	3	0,01	3,22	0,0827
Muestra	0,04	3	0,01	3,22	0,0827
Error	0,04	8	4,6E-03		
Total	0,08	11			

**TABLA XXX.** Resultados luego de ANOVA paramétrica para las muestras incubadas con medio caldo Czapek con una cc de fibra vegetal de 2% (p/p) (7 días, 25°C).

Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Log. esporas	12	0,84	0,82	3,80

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4,99	3	1,66	43,58	<0,0001
Muestra	4,99	3	1,66	43,58	<0,0001
Error	0,31	8	0,04		
Total	5,30	11			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,51098  
 Error: 0,0382 gl: 8  
 Muestra Medias n E.E.  
 Control 4,33 3 0,11 A  
 Cel-KOH 4,71 3 0,11 A  
 RIA 5,69 3 0,11 B  
 PB 5,86 3 0,11 B  
 Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

**TABLA XXXI.** Evaluación del supuesto de normalidad y homocedasticidad para las muestras incubadas en medio de cultivo caldo Vogel's con una cc de fibra vegetal de 2% (p/p) (4 días, 25°C).

Análisis de la varianza

		Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Shapiro-Wilks (modificado)		RABS Rec. esporas (log esp...	12	0,16	0,00	60,36

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
Muestra	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
CelKOH	Rec. esporas (log esporas/..	3	5,33	0,06	0,97	0,6677
Control	Rec. esporas (log esporas/..	3	5,19	0,09	0,88	0,3231
PB	Rec. esporas (log esporas/..	3	5,83	0,06	0,97	0,6574
RIA	Rec. esporas (log esporas/..	3	5,50	0,06	0,99	0,7706

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,5E-03	3	5,0E-04	0,51	0,6886
Muestra	1,5E-03	3	5,0E-04	0,51	0,6886
Error	0,01	8	9,9E-04		
Total	0,01	11			

**TABLA XXXII.** Resultados luego de ANOVA paramétrica para las muestras incubadas con medio caldo Vogel's con una cc de fibra vegetal de 2% (p/p) (4 días, 25°C).

Análisis de la varianza

		Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
		Rec. esporas (log esporas/..	12	0,94	0,92	1,33

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	0,69	3	0,23	43,74	<0,0001	
Muestra	0,69	3	0,23	43,74	<0,0001	
Error	0,04	8	0,01			
Total	0,73	11				

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,18967  
 Error: 0,0053 gl: 8  
 Muestra Medias n E.E.

Control	5,19	3	0,04	A
CelKOH	5,33	3	0,04	A B
RIA	5,50	3	0,04	B
PB	5,83	3	0,04	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

**TABLA XXXIII.** Evaluación del supuesto de normalidad y homocedasticidad para las muestras incubadas en medio de cultivo caldo Vogel's con una cc de fibra vegetal de 2% (p/p) (7 días, 25°C).

Análisis de la varianza

		Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Shapiro-Wilks (modificado)		RABS Rec. esporas (log esp...	12	0,12	0,00	66,74

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
Muestra	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
CelKOH	Rec. esporas (log esporas/..	3	5,19	0,09	0,78	0,0743
Control	Rec. esporas (log esporas/..	3	5,50	0,08	1,00	0,9766
PB	Rec. esporas (log esporas/..	3	5,93	0,12	0,99	0,7663
RIA	Rec. esporas (log esporas/..	3	6,13	0,08	0,97	0,6494

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2,1E-03	3	7,0E-04	0,36	0,7843
Muestra	2,1E-03	3	7,0E-04	0,36	0,7843
Error	0,02	8	1,9E-03		
Total	0,02	11			

**TABLA XXXIV.** Resultados luego de ANOVA paramétrica para las muestras incubadas con medio caldo Vogel's con una cc de fibra vegetal de 2% (p/p) (7 días, 25°C).

Análisis de la varianza

		Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
		Rec. esporas (log esporas/..	12	0,96	0,94	1,65

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	1,63	3	0,54	62,13	<0,0001	
Muestra	1,63	3	0,54	62,13	<0,0001	
Error	0,07	8	0,01			
Total	1,70	11				

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,24479  
 Error: 0,0088 gl: 8  
 Muestra Medias n E.E.

CelKOH	5,19	3	0,06	A
Control	5,50	3	0,05	B
PB	5,93	3	0,05	C
RIA	6,13	3	0,05	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

**TABLA XXXV.** Evaluación del supuesto de normalidad y homocedasticidad para las muestras incubadas en medio de cultivo caldo Vogel's con una cc de celulosa bacteriana de 2% (p/p) (7 días, 25°C).

Shapiro-Wilks (modificado)						Análisis de la varianza						
Muestra	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
CB	Recuento de esporas (log e..)	3	4,82	0,12	0,99	0,7933	RABS Recuento de es (log ..	6	0,18	0,00	68,09	
Control	Recuento de esporas (log e..)	3	4,66	0,06	0,75	<0,0001	Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
							F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
							Modelo	1,8E-03	1	1,8E-03	0,90	0,3956
							Muestra	1,8E-03	1	1,8E-03	0,90	0,3956
							Error	0,01	4	2,0E-03		
							Total	0,01	5			

**TABLA XXXVI.** Resultados luego de ANOVA paramétrica para las muestras incubadas con medio caldo Vogel's con cc de celulosa bacteriana de 2% (p/p) (7 días, 25°C).

Análisis de la varianza					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
Recuento de esporas (log e..)	6	0,53	0,41	2,00	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,04	1	0,04	4,51	0,1009
Muestra	0,04	1	0,04	4,51	0,1009
Error	0,04	4	0,01		
Total	0,08	5			
Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,21508					
Error: 0,0090 gl: 4					
Muestra Medias n E.E.					
Control	4,66	3	0,05	A	
CB	4,82	3	0,05	A	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)					

**TABLA XXXVII.** Evaluación del supuesto de normalidad y homocedasticidad para las muestras incubadas en medio de cultivo caldo Czapek con una cc de celulosa bacteriana de 2% (p/p) (7 días, 25°C).

Shapiro-Wilks (modificado)						Análisis de la varianza						
Muestra	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
CB	Recuento de esporas (log e..)	3	4,34	0,09	0,98	0,7357	RABS Recuento de es (log ..	6	0,22	0,03	74,28	
Control	Recuento de esporas (log e..)	3	4,51	0,05	1,00	0,8998	Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
							F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
							Modelo	1,8E-03	1	1,8E-03	1,15	0,3432
							Muestra	1,8E-03	1	1,8E-03	1,15	0,3432
							Error	0,01	4	1,3E-03		
							Total	0,01	5			

**TABLA XXXVIII.** Resultados luego de ANOVA paramétrica para las muestras incubadas con medio caldo Czapek con cc de celulosa bacteriana de 2% (p/p) (7 días, 25°C).

Análisis de la varianza					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
Recuento de esporas (log e..)	6	0,69	0,61	1,61	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,04	1	0,04	8,74	0,0417
Muestra	0,04	1	0,04	8,74	0,0417
Error	0,02	4	0,01		
Total	0,06	5			
Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,16120					
Error: 0,0061 gl: 4					
Muestra Medias n E.E.					
CB	4,34	3	0,04	A	
Control	4,51	3	0,04	B	
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)					

## B. Determinación de azúcares reductores

### I. Resultados obtenidos para los parámetros propuestos

**TABLA XXXIX.** Cc de azúcares reductores obtenidas en fracciones de fibra vegetal con cc de 1,5% y 2% (p/p) y CB (2% p/p) en medio de cultivo caldo Vogel's y Czapek a un tiempo de incubación de 4 y 7 días.

Medio	Tiempo incubación	Cc de fibra	Muestra	Glucosa (g/100g muestra)	Arabinosa (g/100g muestra)	Galactosa (g/100g muestra)
Czapek	4 días	0,15	PB	2,01 (±0,71)	3,38 (±1,19)	2,40 (±0,85)
		0,15	RIA	0,99 (±0,30)	1,67 (±0,51)	1,19 (±0,36)
		0,15	Cel-KOH	0,10 (±0,09)	0,17 (±0,16)	0,12 (±0,11)
Czapek	7 días	0,15	PB	1,71 (±0,11)	2,87 (±0,09)	2,04 (±0,13)
		0,15	RIA	1,60 (±0,05)	2,70 (±0,01)	1,92 (±0,07)
		0,15	Cel-KOH	0,17 (±0,00)	0,28 (±0,01)	0,20 (±0,01)
Vogel's	4 días	0,15	PB	0,58 (±0,48)	0,98 (±0,81)	0,70 (±0,58)
		0,15	RIA	1,17 (±0,23)	1,97 (±0,40)	1,40 (±0,28)
		0,15	Cel-KOH	0,76 (±0,09)	1,28 (±0,15)	0,91 (±0,11)
Vogel's	7 días	0,15	PB	1,55 (±0,05)	2,62 (±0,09)	1,86 (±0,07)
		0,15	RIA	1,52 (±0,08)	2,56 (±0,13)	1,82 (±0,09)
		0,15	Cel-KOH	0,47 (±0,30)	0,80 (±0,51)	0,57 (±0,36)
Czapek	4 días	0,2	PB	1,21 (±0,04)	2,04 (±0,07)	1,45 (±0,05)
		0,2	RIA	1,16 (±0,13)	1,95 (±0,21)	1,38 (±0,15)
		0,2	Cel-KOH	0,76 (±0,54)	1,28 (±0,91)	0,91 (±0,65)
Czapek	7 días	0,2	PB	1,15 (±0,04)	1,93 (±0,07)	1,37 (±0,05)
		0,2	RIA	1,16 (±0,02)	1,96 (±0,04)	1,39 (±0,03)
		0,2	Cel-KOH	1,02 (±0,06)	1,72 (±0,09)	1,22 (±0,07)
Vogel's	4 días	0,2	PB	0,80 (±0,60)	1,35 (±1,00)	0,96 (±0,71)
		0,2	RIA	1,25 (±0,09)	2,10 (±0,15)	1,49 (±0,11)
		0,2	Cel-KOH	0,61 (±0,36)	1,03 (±0,61)	0,73 (±0,44)
Vogel's	7 días	0,2	PB	1,54 (±0,61)	2,59 (±1,02)	1,84 (±0,73)
		0,2	RIA	1,14 (±0,06)	1,92 (±0,09)	1,36 (±0,07)
		0,2	Cel-KOH	0,36 (±0,23)	0,60 (±0,38)	0,43 (±0,27)
Czapek	7 días	0,2	CB	0,04 (±0,02)	0,07 (±0,03)	0,04 (±0,02)
Vogel's	7 días	0,2	CB	0,14 (±0,02)	0,24 (±0,03)	0,17 (±0,02)

**TABLA XL.** Cc de azúcares reductores obtenidas en control de fracciones de fibra vegetal (PB, RIA y Cel-KOH) con cc de 1,5% y 2% (p/p) en medio de cultivo caldo Vogel's y Czapek a un tiempo de incubación de 0 días.

Medio	Tiempo incubación	Cc de fibra	Muestra	Glucosa (g/100g muestra)	Arabinosa (g/100g muestra)	Galactosa (g/100g muestra)
Vogel's	0 días	0,15	Control PB	0,46 (±0,06)	0,77 (±0,11)	0,55 (±0,08)
			Control RIA	0,23 (±0,06)	0,40 (±0,11)	0,28 (±0,08)
			Control Cel-KOH	0,23 (±0,02)	0,39 (±0,04)	0,27 (±0,03)
Vogel's	0 días	0,2	Control PB	0,41 (±0,01)	0,69 (±0,02)	0,49 (±0,01)
			Control RIA	0,22 (±0,05)	0,37 (±0,08)	0,26 (±0,06)
			Control Cel-KOH	0,28 (±0,02)	0,46 (±0,03)	0,33 (±0,02)
Czapek	0 días	0,15	Control PB	0,25 (±0,01)	0,42 (±0,02)	0,30 (±0,02)
			Control RIA	0,15 (±0,01)	0,25 (±0,01)	0,18 (±0,01)
			Control Cel-KOH	0,20 (±0,01)	0,34 (±0,02)	0,24 (±0,02)
Czapek	0 días	0,2	Control PB	0,35 (±0,04)	0,59 (±0,06)	0,42 (±0,04)
			Control RIA	0,19 (±0,03)	0,31 (±0,04)	0,22 (±0,03)
			Control Cel-KOH	0,27 (±0,01)	0,45 (±0,02)	0,32 (±0,01)

## II. Análisis estadísticos de los resultados

Con los datos obtenidos a partir del recuento, se procedió a realizar la evaluación de los supuestos del análisis estadístico ANOVA, considerando muestras aleatorias y escala de la variable de al menos un intervalo.

**TABLA XLI.** Evaluación del supuesto de normalidad y homocedasticidad para las muestras incubadas en medio de cultivo caldo Czapek con una cc de fibras vegetales de 1,5% (p/p) (4 días, 25°C).

Shapiro-Wilks (modificado)						RABS Glucosa						
Muestra	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
CelKOH	Glucosa	3	0,10	0,09	0,93	0,5007	Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
CelKOH	Arabinosa	3	0,17	0,16	0,93	0,5029	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
CelKOH	Galactosa	3	0,12	0,11	0,93	0,5014	Modelo	0,68	5	0,14	11,05	0,0004
Control CelKOH	Glucosa	3	0,20	0,01	0,92	0,4367	Muestra	0,68	5	0,14	11,05	0,0004
Control CelKOH	Arabinosa	3	0,34	0,02	0,91	0,4310	Error	0,15	12	0,01		
Control CelKOH	Galactosa	3	0,24	0,02	0,91	0,4315	Total	0,83	17			
Control PB	Glucosa	3	0,25	0,01	0,92	0,4367	RABS Arabinosa					
Control PB	Arabinosa	3	0,42	0,02	0,91	0,4315	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
Control PB	Galactosa	3	0,30	0,02	0,91	0,4315	RABS Arabinosa	18	0,82	0,75	77,47	
Control RIA	Glucosa	3	0,15	0,01	0,97	0,6405	Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
Control RIA	Arabinosa	3	0,25	0,01	0,97	0,6411	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Control RIA	Galactosa	3	0,18	0,01	0,96	0,6394	Modelo	1,93	5	0,39	11,05	0,0004
PB	Glucosa	3	2,01	0,71	0,76	0,0162	Muestra	1,93	5	0,39	11,05	0,0004
PB	Arabinosa	3	3,38	1,19	0,76	0,0162	Error	0,42	12	0,03		
PB	Galactosa	3	2,40	0,85	0,76	0,0162	Total	2,35	17			
RIA	Glucosa	3	0,99	0,30	0,95	0,5650	RABS Galactosa					
RIA	Arabinosa	3	1,67	0,50	0,95	0,5649	Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
RIA	Galactosa	3	1,19	0,36	0,95	0,5651	RABS Galactosa	18	0,82	0,75	77,48	

**TABLA XLII.** Resultados luego de ANOVA no paramétrica para las muestras incubadas con medio caldo Czapek con cc de fibra vegetal de 1,5% (p/p) (4 días, 25°C).

Variable	Muestra	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
g Glu/ 100g muestra	CelKOH	3	0,10	0,09	0,07	15,83	0,0073
g Glu/ 100g muestra	Control CelKOH	3	0,20	0,01	0,21		
g Glu/ 100g muestra	Control PB	3	0,25	0,01	0,24		
g Glu/ 100g muestra	Control RIA	3	0,15	0,01	0,15		
g Glu/ 100g muestra	PB	3	2,01	0,71	1,61		
g Glu/ 100g muestra	RIA	3	0,99	0,30	0,92		

Trat.	Medias	Ranks
CelKOH	0,10	3,33 A
Control RIA	0,15	4,00 A
Control CelKOH	0,20	7,67 A B
Control PB	0,25	11,00 A B C
RIA	0,99	14,00 B C
PB	2,01	17,00 C

Variable	Muestra	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
g Ara/ 100g muestra	CelKOH	3	1,7E-03	1,6E-03	1,2E-03	16,58	0,0054
g Ara/ 100g muestra	Control CelKOH	3	0,34	0,02	0,35		
g Ara/ 100g muestra	Control PB	3	0,42	0,02	0,41		
g Ara/ 100g muestra	Control RIA	3	0,25	0,01	0,25		
g Ara/ 100g muestra	PB	3	0,03	1,9E-03	0,03		
g Ara/ 100g muestra	RIA	3	0,02	0,01	0,02		

Trat.	Medias	Ranks
CelKOH	1,7E-03	2,00 A
RIA	0,02	5,00 A B
PB	0,03	8,00 A B C
Control RIA	0,25	11,00 B C D
Control CelKOH	0,34	14,00 C D
Control PB	0,42	17,00 D

Variable	Muestra	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
g Gal/ 100g muestra	CelKOH	3	0,12	0,11	0,09	15,83	0,0073
g Gal/ 100g muestra	Control CelKOH	3	0,24	0,02	0,25		
g Gal/ 100g muestra	Control PB	3	0,30	0,02	0,29		
g Gal/ 100g muestra	Control RIA	3	0,18	0,01	0,18		
g Gal/ 100g muestra	PB	3	2,40	0,85	1,92		
g Gal/ 100g muestra	RIA	3	1,19	0,36	1,10		

Trat.	Medias	Ranks
CelKOH	0,12	3,33 A
Control RIA	0,18	4,00 A
Control CelKOH	0,24	7,67 A B
Control PB	0,30	11,00 A B C
RIA	1,19	14,00 B C
PB	2,40	17,00 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

**TABLA XLIII.** Evaluación del supuesto de normalidad y homocedasticidad para las muestras incubadas en medio de cultivo caldo Czapek con una cc de fibras vegetales de 1,5% (p/p) (7 días, 25°C).

Muestra	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
CeIKOH	g Glu/ 100g muestra	3	0,17	3,9E-03	1,00	0,9830
CeIKOH	g Ara/ 100g muestra	3	0,28	0,01	1,00	0,9905
CeIKOH	g Gal/ 100g muestra	3	0,20	4,6E-03	1,00	>0,9999
Control CeIKOH	g Glu/ 100g muestra	3	0,20	0,01	0,92	0,4367
Control CeIKOH	g Ara/ 100g muestra	3	0,34	0,02	0,91	0,4310
Control CeIKOH	g Gal/ 100g muestra	3	0,24	0,02	0,91	0,4315
Control FB	g Glu/ 100g muestra	3	0,25	0,01	0,92	0,4367
Control FB	g Ara/ 100g muestra	3	0,42	0,02	0,91	0,4315
Control FB	g Gal/ 100g muestra	3	0,30	0,02	0,91	0,4315
Control RIA	g Glu/ 100g muestra	3	0,15	0,01	0,57	0,6405
Control RIA	g Ara/ 100g muestra	3	0,25	0,01	0,97	0,6411
Control RIA	g Gal/ 100g muestra	3	0,18	0,01	0,96	0,6394
FB	g Glu/ 100g muestra	3	1,71	0,11	0,88	0,3151
FB	g Ara/ 100g muestra	3	2,87	0,18	0,88	0,3119
FB	g Gal/ 100g muestra	3	2,04	0,13	0,88	0,3151
RIA	g Glu/ 100g muestra	3	1,60	0,05	0,98	0,7611
RIA	g Ara/ 100g muestra	3	2,70	0,09	0,98	0,7623
RIA	g Gal/ 100g muestra	3	1,92	0,06	0,99	0,7770

**RABS g Glu/ 100g muestra**

Variable	N	R²	R² Aj	CV
RABS g Glu/ 100g muestra	18	0,75	0,64	80,01

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,01	5	2,7E-03	7,13	0,0026
Muestra	0,01	5	2,7E-03	7,13	0,0026
Error	4,6E-03	12	3,8E-04		
Total	0,02	17			

**RABS g Ara/ 100g muestra**

Variable	N	R²	R² Aj	CV
RABS g Ara/ 100g muestra	18	0,75	0,64	80,02

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,04	5	0,01	7,12	0,0026
Muestra	0,04	5	0,01	7,12	0,0026
Error	0,01	12	1,1E-03		
Total	0,05	17			

**RABS g Gal/ 100g muestra**

Variable	N	R²	R² Aj	CV
RABS g Gal/ 100g muestra	18	0,75	0,64	80,05

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,02	5	3,9E-03	7,12	0,0026
Muestra	0,02	5	3,9E-03	7,12	0,0026
Error	0,01	12	5,5E-04		
Total	0,03	17			

**TABLA XLIV.** Resultados luego de ANOVA no paramétrica para las muestras incubadas con medio caldo Czapek con cc de fibra vegetal de 1,5% (p/p) (7 días, 25°C).

Variable	Muestra	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
g Glu/ 100g muestra	CeIKOH	3	0,17	3,9E-03	0,17	16,25	0,0062
g Glu/ 100g muestra	Control CeIKOH	3	0,20	0,01	0,21		
g Glu/ 100g muestra	Control FB	3	0,25	0,01	0,24		
g Glu/ 100g muestra	Control RIA	3	0,15	0,01	0,15		
g Glu/ 100g muestra	FB	3	1,71	0,11	1,75		
g Glu/ 100g muestra	RIA	3	1,60	0,05	1,61		

Trat.	Medias	Ranks
Control RIA	0,15	2,00 A
CeIKOH	0,17	5,00 A B
Control CeIKOH	0,20	8,00 A B C
Control FB	0,25	11,00 B C
RIA	1,60	14,67 C
FB	1,71	16,33 C

Variable	Muestra	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
g Ara/ 100g muestra	CeIKOH	3	0,28	0,01	0,28	16,25	0,0062
g Ara/ 100g muestra	Control CeIKOH	3	0,34	0,02	0,35		
g Ara/ 100g muestra	Control FB	3	0,42	0,02	0,41		
g Ara/ 100g muestra	Control RIA	3	0,25	0,01	0,25		
g Ara/ 100g muestra	FB	3	2,87	0,18	2,94		
g Ara/ 100g muestra	RIA	3	2,70	0,09	2,71		

Trat.	Medias	Ranks
Control RIA	0,25	2,00 A
CeIKOH	0,28	5,00 A B
Control CeIKOH	0,34	8,00 A B C
Control FB	0,42	11,00 B C
RIA	2,70	14,67 C
FB	2,87	16,33 C

Variable	Muestra	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
g Gal/ 100g muestra	CeIKOH	3	0,20	4,6E-03	0,20	16,25	0,0062
g Gal/ 100g muestra	Control CeIKOH	3	0,24	0,02	0,25		
g Gal/ 100g muestra	Control FB	3	0,30	0,02	0,29		
g Gal/ 100g muestra	Control RIA	3	0,18	0,01	0,18		
g Gal/ 100g muestra	FB	3	2,04	0,13	2,09		
g Gal/ 100g muestra	RIA	3	1,92	0,06	1,92		

Trat.	Medias	Ranks
Control RIA	0,18	2,00 A
CeIKOH	0,20	5,00 A B
Control CeIKOH	0,24	8,00 A B C
Control FB	0,30	11,00 B C
RIA	1,92	14,67 C
FB	2,04	16,33 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

**TABLA XLV.** Evaluación del supuesto de normalidad y homocedasticidad para las muestras incubadas en medio de cultivo caldo Vogel's con una cc de fibras vegetales de 1,5% (p/p) (4 días, 25°C).

Muestra	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
CeIKOH	g Glu/ 100g muestra	3	0,76	0,09	0,92	0,4685
CeIKOH	g Ara/ 100g muestra	3	1,28	0,15	0,92	0,4682
CeIKOH	g Gal/ 100g muestra	3	0,91	0,11	0,92	0,4683
Control CeIKOH	g Glu/ 100g muestra	3	0,23	0,02	0,99	0,7913
Control CeIKOH	g Ara/ 100g muestra	3	0,23	0,02	0,99	0,7913
Control CeIKOH	g Gal/ 100g muestra	3	0,23	0,02	0,99	0,7913
Control FB	g Glu/ 100g muestra	3	0,46	0,06	0,87	0,3053
Control FB	g Ara/ 100g muestra	3	0,46	0,06	0,87	0,3053
Control FB	g Gal/ 100g muestra	3	0,46	0,06	0,87	0,3053
Control RIA	g Glu/ 100g muestra	3	0,23	0,06	0,98	0,7510
Control RIA	g Ara/ 100g muestra	3	0,23	0,06	0,98	0,7510
Control RIA	g Gal/ 100g muestra	3	0,23	0,06	0,98	0,7510
FB	g Glu/ 100g muestra	3	0,58	0,48	0,88	0,3123
FB	g Ara/ 100g muestra	3	0,98	0,81	0,88	0,3152
FB	g Gal/ 100g muestra	3	0,70	0,58	0,88	0,3124
RIA	g Glu/ 100g muestra	3	1,17	0,23	0,88	0,3133
RIA	g Ara/ 100g muestra	3	1,97	0,39	0,88	0,3135
RIA	g Gal/ 100g muestra	3	1,40	0,28	0,88	0,3136

### RABS g Glu/ 100g muestra

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS g Glu/ 100g muestra	18	0,76	0,66	69,35

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,26	5	0,05	7,60	0,0020
Muestra	0,26	5	0,05	7,60	0,0020
Error	0,08	12	0,01		
Total	0,35	17			

### RABS g Ara/ 100g muestra

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS g Ara/ 100g muestra	18	0,78	0,69	72,98

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,81	5	0,16	8,45	0,0013
Muestra	0,81	5	0,16	8,45	0,0013
Error	0,23	12	0,02		
Total	1,04	17			

### RABS g Gal/ 100g muestra

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS g Gal/ 100g muestra	18	0,77	0,67	70,71

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,39	5	0,08	7,94	0,0016
Muestra	0,39	5	0,08	7,94	0,0016
Error	0,12	12	0,01		
Total	0,51	17			

**TABLA XLVI.** Resultados luego de ANOVA no paramétrica para las muestras incubadas con medio caldo Czapek con cc de fibras vegetales de 1,5% (p/p) (4 días, 25°C).

Variable	Muestra	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
g Glu/ 100g muestra CelKOH		3	0,76	0,09	0,79	13,02	0,0232
g Glu/ 100g muestra Control CelKOH		3	0,23	0,02	0,23		
g Glu/ 100g muestra Control PB		3	0,46	0,06	0,43		
g Glu/ 100g muestra Control RIA		3	0,23	0,06	0,22		
g Glu/ 100g muestra PB		3	0,58	0,48	0,39		
g Glu/ 100g muestra RIA		3	1,17	0,23	1,08		

Trat.	Medias	Ranks
Control RIA	0,23	3,67 A
Control CelKOH	0,23	4,00 A
PB	0,58	10,00 A B
Control PB	0,46	10,00 A B
CelKOH	0,76	13,00 B
RIA	1,17	16,33 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Variable	Muestra	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
g Gal/ 100g muestra CelKOH		3	0,91	0,11	0,94	13,61	0,0183
g Gal/ 100g muestra Control CelKOH		3	0,23	0,02	0,23		
g Gal/ 100g muestra Control PB		3	0,46	0,06	0,43		
g Gal/ 100g muestra Control RIA		3	0,23	0,06	0,22		
g Gal/ 100g muestra PB		3	0,70	0,58	0,46		
g Gal/ 100g muestra RIA		3	1,40	0,28	1,29		

### Trat. Medias Ranks

Control RIA	0,23	3,67 A
Control CelKOH	0,23	3,67 A
Control PB	0,46	5,33 A B
PB	0,70	11,00 A B
CelKOH	0,91	13,00 B
RIA	1,40	16,33 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Variable	Muestra	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
g Ara/ 100g muestra CelKOH		3	1,23	0,15	1,33	14,31	0,0138
g Ara/ 100g muestra Control CelKOH		3	0,23	0,02	0,23		
g Ara/ 100g muestra Control PB		3	0,46	0,06	0,43		
g Ara/ 100g muestra Control RIA		3	0,23	0,06	0,22		
g Ara/ 100g muestra PB		3	0,98	0,81	0,65		
g Ara/ 100g muestra RIA		3	1,87	0,39	1,81		

**TABLA XLVII.** Evaluación del supuesto de normalidad y homocedasticidad para las muestras incubadas en medio de cultivo caldo Vogel's con una cc de fibras vegetales de 1,5% (p/p) (7 días, 25°C).

Muestra	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
CelKOH	g Glu/ 100g muestra	3	0,47	0,30	0,92	0,4556
CelKOH	g Ara/ 100g muestra	3	0,80	0,51	0,92	0,4575
CelKOH	g Gal/ 100g muestra	3	0,57	0,36	0,92	0,4575
Control CelKOH	g Glu/ 100g muestra	3	0,23	0,02	0,99	0,7913
Control CelKOH	g Ara/ 100g muestra	3	0,23	0,02	0,99	0,7913
Control CelKOH	g Gal/ 100g muestra	3	0,23	0,02	0,99	0,7913
Control PB	g Glu/ 100g muestra	3	0,46	0,06	0,87	0,3053
Control PB	g Ara/ 100g muestra	3	0,46	0,06	0,87	0,3053
Control PB	g Gal/ 100g muestra	3	0,46	0,06	0,87	0,3053
Control RIA	g Glu/ 100g muestra	3	0,23	0,06	0,98	0,7510
Control RIA	g Ara/ 100g muestra	3	0,23	0,06	0,98	0,7510
Control RIA	g Gal/ 100g muestra	3	0,23	0,06	0,98	0,7510
PB	g Glu/ 100g muestra	3	1,55	0,05	0,94	0,5122
PB	g Ara/ 100g muestra	3	2,62	0,09	0,94	0,5092
PB	g Gal/ 100g muestra	3	1,86	0,07	0,94	0,5122
RIA	g Glu/ 100g muestra	3	1,52	0,08	1,00	0,9564
RIA	g Ara/ 100g muestra	3	2,56	0,13	1,00	0,9564
RIA	g Gal/ 100g muestra	3	1,82	0,09	1,00	0,9563

### RABS g Glu/ 100g muestra

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS g Glu/ 100g muestra	18	0,70	0,58	78,45

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,09	5	0,02	5,70	0,0064
Muestra	0,09	5	0,02	5,70	0,0064
Error	0,04	12	3,1E-03		
Total	0,13	17			

### RABS g Ara/ 100g muestra

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS g Ara/ 100g muestra	18	0,73	0,62	85,07

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,28	5	0,06	6,65	0,0035
Muestra	0,28	5	0,06	6,65	0,0035
Error	0,10	12	0,01		
Total	0,38	17			

### RABS g Gal/ 100g muestra

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS g Gal/ 100g muestra	18	0,72	0,60	80,81

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,13	5	0,03	6,07	0,0050
Muestra	0,13	5	0,03	6,07	0,0050
Error	0,05	12	4,4E-03		
Total	0,19	17			

**TABLA XLVIII.** Resultados luego de ANOVA no paramétrica para las muestras incubadas con medio caldo Vogel's con cc de fibras vegetales de 1,5% (p/p) (7 días, 25°C)

Variable	Muestra	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
g Glu/ 100g muestra	CelKOH	3	0,47	0,30	0,57	13,16	0,0219
g Glu/ 100g muestra	Control CelKOH	3	0,23	0,02	0,23		
g Glu/ 100g muestra	Control PB	3	0,46	0,06	0,43		
g Glu/ 100g muestra	Control RIA	3	0,23	0,06	0,22		
g Glu/ 100g muestra	PB	3	1,85	0,05	1,87		
g Glu/ 100g muestra	RIA	3	1,52	0,08	1,52		

Trat.	Medias Ranks
Control RIA	0,23 4,33 A
Control CelKOH	0,23 4,67 A
CelKOH	0,47 5,00 A B
Control PB	0,46 5,00 A B
RIA	1,52 15,00 B
PB	1,55 16,00 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Variable	Muestra	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
g Gal/ 100g muestra	CelKOH	3	0,57	0,36	0,68	13,16	0,0219
g Gal/ 100g muestra	Control CelKOH	3	0,23	0,02	0,23		
g Gal/ 100g muestra	Control PB	3	0,46	0,06	0,43		
g Gal/ 100g muestra	Control RIA	3	0,23	0,06	0,22		
g Gal/ 100g muestra	PB	3	1,86	0,07	1,88		
g Gal/ 100g muestra	RIA	3	1,82	0,09	1,82		

Trat.	Medias Ranks
Control RIA	0,23 4,33 A
Control CelKOH	0,23 4,67 A
CelKOH	0,57 5,00 A B
Control PB	0,46 5,00 A B
RIA	1,82 15,00 B
PB	1,86 16,00 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Variable	Muestra	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
g Ara/ 100g muestra	CelKOH	3	0,80	0,51	0,96	14,08	0,0151
g Ara/ 100g muestra	Control CelKOH	3	0,23	0,02	0,23		
g Ara/ 100g muestra	Control PB	3	0,46	0,06	0,43		
g Ara/ 100g muestra	Control RIA	3	0,23	0,06	0,22		
g Ara/ 100g muestra	PB	3	2,62	0,09	2,65		
g Ara/ 100g muestra	RIA	3	2,56	0,13	2,56		

Trat.	Medias Ranks
Control RIA	0,23 4,33 A
Control CelKOH	0,23 4,67 A
CelKOH	0,80 5,00 A B
Control PB	0,46 5,00 A B
RIA	1,82 15,00 B
PB	1,86 16,00 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

**TABLA XLIX.** Evaluación del supuesto de normalidad y homocedasticidad para las muestras incubadas en medio de cultivo caldo Czapek con una cc de fibras vegetales de 2% (p/p) (4 días, 25°C).

Muestra	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
CelKOH	g Glu/ 100g muestra	3	0,76	0,54	0,88	0,3139
CelKOH	g Ara/ 100g muestra	3	1,28	0,91	0,88	0,3139
CelKOH	g Gal/ 100g muestra	3	0,91	0,65	0,88	0,3139
Control CelKOH	g Glu/ 100g muestra	3	0,27	0,01	0,86	0,2720
Control CelKOH	g Ara/ 100g muestra	3	0,45	0,02	0,86	0,2734
Control CelKOH	g Gal/ 100g muestra	3	0,32	0,01	0,86	0,2749
Control PB	g Glu/ 100g muestra	3	0,35	0,04	0,94	0,5250
Control PB	g Ara/ 100g muestra	3	0,59	0,06	0,94	0,5244
Control PB	g Gal/ 100g muestra	3	0,42	0,04	0,94	0,5230
Control RIA	g Glu/ 100g muestra	3	0,19	0,03	0,99	0,7776
Control RIA	g Ara/ 100g muestra	3	0,31	0,04	0,99	0,7792
Control RIA	g Gal/ 100g muestra	3	0,22	0,03	0,99	0,7817
PB	g Glu/ 100g muestra	3	1,21	0,04	0,97	0,6770
PB	g Ara/ 100g muestra	3	2,04	0,07	0,97	0,6597
PB	g Gal/ 100g muestra	3	1,45	0,05	0,97	0,6601
RIA	g Glu/ 100g muestra	3	1,16	0,12	0,94	0,5231
RIA	g Ara/ 100g muestra	3	1,95	0,21	0,94	0,5234
RIA	g Gal/ 100g muestra	3	1,38	0,15	0,94	0,5230

**RABS g Glu/ 100g muestra**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS g Glu/ 100g muestra	18	0,81	0,73	86,61

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,36	5	0,07	10,24	0,0005
Muestra	0,36	5	0,07	10,24	0,0005
Error	0,09	12	0,01		
Total	0,45	17			

**RABS g Gal/ 100g muestra**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS g Gal/ 100g muestra	18	0,81	0,73	86,60

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,52	5	0,10	10,24	0,0005
Muestra	0,52	5	0,10	10,24	0,0005
Error	0,12	12	0,01		
Total	0,64	17			

**RABS g Ara/ 100g muestra**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS g Ara/ 100g muestra	18	0,81	0,73	86,61

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,03	5	0,21	10,24	0,0005
Muestra	1,03	5	0,21	10,24	0,0005
Error	0,24	12	0,02		
Total	1,28	17			

**TABLA L.** Resultados luego de ANOVA no paramétrica para las muestras incubadas con medio caldo Czapek con cc de fibras vegetales de 2% (p/p) (4 días, 25°C)

Variable	Muestra	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
g Glu/ 100g muestra	CelKOH	3	0,76	0,54	0,98	12,74	0,0259
g Glu/ 100g muestra	Control CelKOH	3	0,27	0,01	0,27		
g Glu/ 100g muestra	Control PB	3	0,35	0,04	0,36		
g Glu/ 100g muestra	Control RIA	3	0,19	0,03	0,19		
g Glu/ 100g muestra	PB	3	1,21	0,04	1,20		
g Glu/ 100g muestra	RIA	3	1,16	0,12	1,12		

Trat.	Medias	Ranks
Control RIA	0,19	3,00 A
Control CelKOH	0,27	6,00 A B
CelKOH	0,76	8,67 A B C
Control PB	0,35	9,00 A B C
RIA	1,16	14,33 B C
PB	1,21	16,00 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Variable	Muestra	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
g Ara/ 100g muestra	CelKOH	3	1,28	0,91	1,65	12,74	0,0259
g Ara/ 100g muestra	Control CelKOH	3	0,45	0,02	0,46		
g Ara/ 100g muestra	Control PB	3	0,59	0,06	0,60		
g Ara/ 100g muestra	Control RIA	3	0,31	0,04	0,32		
g Ara/ 100g muestra	PB	3	2,04	0,07	2,03		
g Ara/ 100g muestra	RIA	3	1,95	0,21	1,99		

Trat.	Medias	Ranks
Control RIA	0,31	3,00 A
Control CelKOH	0,45	6,00 A B
CelKOH	1,28	8,67 A B C
Control PB	0,59	9,00 A B C
RIA	1,95	14,33 B C
PB	2,04	16,00 C

Variable	Muestra	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
g Gal/ 100g muestra	CelKOH	3	0,91	0,65	1,17	12,74	0,0259
g Gal/ 100g muestra	Control CelKOH	3	0,32	0,01	0,33		
g Gal/ 100g muestra	Control PB	3	0,42	0,04	0,43		
g Gal/ 100g muestra	Control RIA	3	0,22	0,03	0,23		
g Gal/ 100g muestra	PB	3	1,45	0,05	1,44		
g Gal/ 100g muestra	RIA	3	1,38	0,15	1,34		

Trat.	Medias	Ranks
Control RIA	0,22	3,00 A
Control CelKOH	0,32	6,00 A B
CelKOH	0,91	8,67 A B C
Control PB	0,42	9,00 A B C
RIA	1,38	14,33 B C
PB	1,45	16,00 C

**TABLA LI.** Evaluación del supuesto de normalidad y homocedasticidad para las muestras incubadas en medio de cultivo caldo Czapek con una cc de fibras vegetales de 2% (p/p) (7 días, 25°C).

Muestra	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
CelKOH	g Glu/ 100g muestra	3	1,02	0,06	0,89	0,3380
CelKOH	g Ara/ 100g muestra	3	1,72	0,10	0,89	0,3384
CelKOH	g Gal/ 100g muestra	3	1,22	0,07	0,89	0,3384
Control CelKOH	g Glu/ 100g muestra	3	0,27	0,01	0,86	0,2720
Control CelKOH	g Ara/ 100g muestra	3	0,45	0,02	0,86	0,2734
Control CelKOH	g Gal/ 100g muestra	3	0,32	0,01	0,86	0,2749
Control PB	g Glu/ 100g muestra	3	0,35	0,04	0,94	0,5250
Control PB	g Ara/ 100g muestra	3	0,59	0,06	0,94	0,5244
Control PB	g Gal/ 100g muestra	3	0,42	0,04	0,94	0,5230
Control RIA	g Glu/ 100g muestra	3	0,19	0,03	0,99	0,7776
Control RIA	g Ara/ 100g muestra	3	0,31	0,04	0,99	0,7792
Control RIA	g Gal/ 100g muestra	3	0,22	0,03	0,99	0,7817
PB	g Glu/ 100g muestra	3	1,15	0,04	0,81	0,1311
PB	g Ara/ 100g muestra	3	1,93	0,07	0,81	0,1302
PB	g Gal/ 100g muestra	3	1,37	0,05	0,81	0,1304
RIA	g Glu/ 100g muestra	3	1,16	0,02	1,00	0,9298
RIA	g Ara/ 100g muestra	3	1,96	0,04	1,00	0,9308
RIA	g Gal/ 100g muestra	3	1,39	0,03	1,00	0,9293

**RABS g Glu/ 100g muestra**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS g Glu/ 100g muestra	18	0,50	0,29	59,63

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2,4E-03	5	4,9E-04	2,38	0,1017
Muestra	2,4E-03	5	4,9E-04	2,38	0,1017
Error	2,5E-03	12	2,1E-04		
Total	4,9E-03	17			

**RABS g Ara/ 100g muestra**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS g Ara/ 100g muestra	18	0,50	0,29	59,66

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,01	5	1,4E-03	2,38	0,1017
Muestra	0,01	5	1,4E-03	2,38	0,1017
Error	0,01	12	5,8E-04		
Total	0,01	17			

**RABS g Gal/ 100g muestra**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS g Gal/ 100g muestra	18	0,50	0,29	59,64

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3,5E-03	5	7,0E-04	2,38	0,1017
Muestra	3,5E-03	5	7,0E-04	2,38	0,1017
Error	3,5E-03	12	3,0E-04		
Total	0,01	17			

**TABLA LII.** Resultados luego de ANOVA paramétrica para las muestras incubadas con medio caldo Czapek con cc de fibras vegetales de 2% (p/p) (7 días, 25°C)

g Glu/ 100g muestra						g Ara/ 100g muestra					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV		Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
g Glu/ 100g muestra 18 1,00 0,99 5,19						g Ara/ 100g muestra 18 1,00 0,99 5,19					
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3,27	5	0,65	511,23	<0,0001	Modelo	9,28	5	1,86	511,47	<0,0001
Muestra	3,27	5	0,65	511,23	<0,0001	Muestra	9,28	5	1,86	511,47	<0,0001
Error	0,02	12	1,3E-03			Error	0,04	12	3,6E-03		
Total	3,29	17				Total	9,32	17			
Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,09809						Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,16519					
Error: 0,0013 gl: 12						Error: 0,0036 gl: 12					
Muestra	Medias	n	E.E.			Muestra	Medias	n	E.E.		
Control RIA	0,19	3	0,02	A		Control RIA	0,31	3	0,03	A	
Control CelKOH	0,27	3	0,02	A B		Control CelKOH	0,45	3	0,03	A B	
Control PB	0,35	3	0,02	B		Control PB	0,59	3	0,03	B	
CelKOH	1,02	3	0,02	C		CelKOH	1,72	3	0,03	C	
PB	1,15	3	0,02	D		PB	1,93	3	0,03	D	
RIA	1,16	3	0,02	D		RIA	1,96	3	0,03	D	
g Gal/ 100g muestra						g Gal/ 100g muestra					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV		Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
g Gal/ 100g muestra 18 1,00 0,99 5,19						g Gal/ 100g muestra 18 1,00 0,99 5,19					
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4,68	5	0,94	511,22	<0,0001	Modelo	4,68	5	0,94	511,22	<0,0001
Muestra	4,68	5	0,94	511,22	<0,0001	Muestra	4,68	5	0,94	511,22	<0,0001
Error	0,02	12	1,8E-03			Error	0,02	12	1,8E-03		
Total	4,71	17				Total	4,71	17			
Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,11740						Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,11740					
Error: 0,0018 gl: 12						Error: 0,0018 gl: 12					
Muestra	Medias	n	E.E.			Muestra	Medias	n	E.E.		
Control RIA	0,22	3	0,02	A		Control RIA	0,22	3	0,02	A	
Control CelKOH	0,32	3	0,02	A B		Control CelKOH	0,32	3	0,02	A B	
Control PB	0,42	3	0,02	B		Control PB	0,42	3	0,02	B	
CelKOH	1,22	3	0,02	C		CelKOH	1,22	3	0,02	C	
PB	1,37	3	0,02	D		PB	1,37	3	0,02	D	
RIA	1,39	3	0,02	D		RIA	1,39	3	0,02	D	

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

**TABLA LIII.** Evaluación del supuesto de normalidad y homocedasticidad para las muestras incubadas en medio de cultivo caldo Vogel's con una cc de fibras vegetales de 2% (p/p) (4 días, 25°C).

Muestra	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
CelKOH	g Glu/ 100g muestra	3	0,61	0,36	0,77	0,0338
CelKOH	g Ara/ 100g muestra	3	1,03	0,61	0,77	0,0338
CelKOH	g Gal/ 100g muestra	3	0,73	0,44	0,77	0,0340
Control CelKOH	g Glu/ 100g muestra	3	0,26	0,02	1,00	>0,9999
Control CelKOH	g Ara/ 100g muestra	3	0,46	0,03	1,00	>0,9999
Control CelKOH	g Gal/ 100g muestra	3	0,33	0,02	1,00	>0,9999
Control PB	g Glu/ 100g muestra	3	0,41	0,01	0,92	0,4646
Control PB	g Ara/ 100g muestra	3	0,69	0,02	0,92	0,4607
Control PB	g Gal/ 100g muestra	3	0,49	0,01	0,92	0,4628
Control RIA	g Glu/ 100g muestra	3	0,22	0,05	0,97	0,6466
Control RIA	g Ara/ 100g muestra	3	0,37	0,08	0,97	0,6472
Control RIA	g Gal/ 100g muestra	3	0,26	0,06	0,97	0,6473
PB	g Glu/ 100g muestra	3	0,80	0,59	1,00	0,9640
PB	g Ara/ 100g muestra	3	1,35	1,00	1,00	0,9657
PB	g Gal/ 100g muestra	3	0,96	0,71	1,00	0,9640
RIA	g Glu/ 100g muestra	3	1,25	0,09	0,89	0,3360
RIA	g Ara/ 100g muestra	3	2,10	0,15	0,89	0,3368
RIA	g Gal/ 100g muestra	3	1,49	0,11	0,89	0,3373

RABS g Glu/ 100g muestra						RABS g Gal/ 100g muestra					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV		Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
RABS g Glu/ 100g muestra 18 0,61 0,45 109,63						RABS g Gal/ 100g muestra 18 0,61 0,45 109,63					
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,41	5	0,08	3,81	0,0267	Modelo	0,59	5	0,12	3,81	0,0267
Muestra	0,41	5	0,08	3,81	0,0267	Muestra	0,59	5	0,12	3,81	0,0267
Error	0,26	12	0,02			Error	0,37	12	0,03		
Total	0,67	17				Total	0,96	17			

**TABLA LIV.** Resultados luego de ANOVA no paramétrica para las muestras incubadas con medio caldo Vogel's con cc de fibras vegetales de 2% (p/p) (4 días, 25°C)

Variable	Muestra	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Glucosa	CelKOH	3	0,61	0,36	0,81	9,19	0,1013
Glucosa	Control CelKOH	3	0,28	0,02	0,28		
Glucosa	Control PB	3	0,41	0,01	0,41		
Glucosa	Control RIA	3	0,22	0,05	0,21		
Glucosa	PB	3	0,80	0,59	0,81		
Glucosa	RIA	3	1,25	0,09	1,21		

Variable	Muestra	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Arabinosa	CelKOH	3	1,03	0,61	1,37	9,19	0,1013
Arabinosa	Control CelKOH	3	0,46	0,03	0,46		
Arabinosa	Control PB	3	0,69	0,02	0,70		
Arabinosa	Control RIA	3	0,37	0,08	0,35		
Arabinosa	PB	3	1,35	1,00	1,37		
Arabinosa	RIA	3	2,10	0,15	2,04		

Variable	Muestra	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
Galactosa	CelKOH	3	0,73	0,44	0,97	9,19	0,1013
Galactosa	Control CelKOH	3	0,33	0,02	0,33		
Galactosa	Control PB	3	0,49	0,01	0,49		
Galactosa	Control RIA	3	0,26	0,06	0,25		
Galactosa	PB	3	0,96	0,71	0,97		
Galactosa	RIA	3	1,49	0,11	1,45		

**TABLA LV.** Evaluación del supuesto de normalidad y homocedasticidad para las muestras incubadas en medio de cultivo caldo Vogel's con una cc de fibras vegetales de 2% (p/p) (7 días, 25°C).

Muestra	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
CelKOH	g Glu/ 100g muestra	3	0,36	0,23	0,92	0,4575
CelKOH	g Ara/ 100g muestra	3	0,60	0,38	0,92	0,4558
CelKOH	g Gal/ 100g muestra	3	0,43	0,27	0,92	0,4575
Control CelKOH	g Glu/ 100g muestra	3	0,28	0,02	1,00	>0,9999
Control CelKOH	g Ara/ 100g muestra	3	0,46	0,03	1,00	>0,9999
Control CelKOH	g Gal/ 100g muestra	3	0,33	0,02	1,00	>0,9999
Control PB	g Glu/ 100g muestra	3	0,41	0,01	0,92	0,4646
Control PB	g Ara/ 100g muestra	3	0,69	0,02	0,92	0,4607
Control PB	g Gal/ 100g muestra	3	0,49	0,01	0,92	0,4628
Control RIA	g Glu/ 100g muestra	3	0,22	0,05	0,97	0,6466
Control RIA	g Ara/ 100g muestra	3	0,37	0,08	0,97	0,6472
Control RIA	g Gal/ 100g muestra	3	0,26	0,06	0,97	0,6473
PB	g Glu/ 100g muestra	3	1,54	0,61	0,77	0,0340
PB	g Ara/ 100g muestra	3	2,59	1,02	0,77	0,0340
PB	g Gal/ 100g muestra	3	1,84	0,73	0,77	0,0336
RIA	g Glu/ 100g muestra	3	1,14	0,06	1,00	0,9564
RIA	g Ara/ 100g muestra	3	1,92	0,10	1,00	0,9567
RIA	g Gal/ 100g muestra	3	1,36	0,07	1,00	0,9574

RABS g Glu/ 100g muestra

Variable	N	R²	R² Aj	CV
RABS g Glu/ 100g muestra	18	0,83	0,75	75,71

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,48	5	0,10	11,37	0,0003
Muestra	0,48	5	0,10	11,37	0,0003
Error	0,10	12	0,01		
Total	0,59	17			

RABS g Ara/ 100g muestra

Variable	N	R²	R² Aj	CV
RABS g Ara/ 100g muestra	18	0,83	0,75	75,71

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,37	5	0,27	11,37	0,0003
Muestra	1,37	5	0,27	11,37	0,0003
Error	0,29	12	0,02		
Total	1,66	17			

RABS g Gal/ 100g muestra

Variable	N	R²	R² Aj	CV
RABS g Gal/ 100g muestra	18	0,83	0,75	75,72

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,69	5	0,14	11,37	0,0003
Muestra	0,69	5	0,14	11,37	0,0003
Error	0,15	12	0,01		
Total	0,84	17			

**TABLA LVI.** Resultados luego de ANOVA no paramétrica para las muestras incubadas con medio caldo Czapek con cc de fibras vegetales de 2% (p/p) (7 días, 25°C)

Variable	Muestra	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
g Glu/ 100g muestra	CelKOH	3	0,36	0,23	0,43	13,68	0,0178
g Glu/ 100g muestra	Control CelKOH	3	0,28	0,02	0,28		
g Glu/ 100g muestra	Control PB	3	0,41	0,01	0,41		
g Glu/ 100g muestra	Control RIA	3	0,22	0,05	0,21		
g Glu/ 100g muestra	PB	3	1,54	0,61	1,20		
g Glu/ 100g muestra	RIA	3	1,14	0,06	1,14		

Trat.	Medias	Ranks
Control RIA	0,22	3,33 A
Control CelKOH	0,28	5,67 A
CelKOH	0,36	8,00 A B
Control PB	0,41	9,00 A B C
RIA	1,14	14,33 B C
PB	1,54	16,67 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Variable	Muestra	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
g Ara/ 100g muestra	CelKOH	3	0,60	0,38	0,72	13,68	0,0178
g Ara/ 100g muestra	Control CelKOH	3	0,46	0,03	0,46		
g Ara/ 100g muestra	Control PB	3	0,69	0,02	0,70		
g Ara/ 100g muestra	Control RIA	3	0,37	0,08	0,35		
g Ara/ 100g muestra	PB	3	2,59	1,02	2,02		
g Ara/ 100g muestra	RIA	3	1,92	0,10	1,92		

Trat.	Medias	Ranks
Control RIA	0,37	3,33 A
Control CelKOH	0,46	5,67 A
CelKOH	0,60	8,00 A B
Control PB	0,69	9,00 A B C
RIA	1,92	14,33 B C
PB	2,59	16,67 C

Variable	Muestra	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
g Gal/ 100g muestra	CelKOH	3	0,43	0,27	0,51	13,68	0,0178
g Gal/ 100g muestra	Control CelKOH	3	0,33	0,02	0,33		
g Gal/ 100g muestra	Control PB	3	0,49	0,01	0,49		
g Gal/ 100g muestra	Control RIA	3	0,26	0,06	0,25		
g Gal/ 100g muestra	PB	3	1,84	0,73	1,44		
g Gal/ 100g muestra	RIA	3	1,36	0,07	1,36		

Trat.	Medias	Ranks
Control RIA	0,26	3,33 A
Control CelKOH	0,33	5,67 A
CelKOH	0,43	8,00 A B
Control PB	0,49	9,00 A B C
RIA	1,36	14,33 B C
PB	1,84	16,67 C

**TABLA LVII.** Evaluación del supuesto de normalidad y homocedasticidad para las muestras incubadas en medio de cultivo caldo Vogel's y Czapek con una cc de CB de 2% (p/p) (7 días, 25°C).

Shapiro-Wilks (modificado)

Medio de cultivo	Variable	n	Medias	D.E.	W*	p(Unilateral D)
Czapek	Glucosa	3	0,04	0,02	0,96	0,6049
Czapek	Arabinosa	3	0,06	0,03	0,96	0,6051
Czapek	Galactosa	3	0,04	0,02	0,96	0,6049
Vogel's	Glucosa	3	0,14	0,02	0,98	0,7455
Vogel's	Arabinosa	3	0,24	0,03	0,98	0,7442
Vogel's	Galactosa	3	0,17	0,02	0,98	0,7432

RABS Glucosa

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS Glucosa	6	2,4E-06	0,00	64,96

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	7,4E-10	1	7,4E-10	9,7E-06	0,9977
Medio de cultivo	7,4E-10	1	7,4E-10	9,7E-06	0,9977
Error	3,1E-04	4	7,6E-05		
Total	3,1E-04	5			

RABS Galactosa

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS Galactosa	6	6,9E-06	0,00	64,94

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3,0E-09	1	3,0E-09	2,7E-05	0,9961
Medio de cultivo	3,0E-09	1	3,0E-09	2,7E-05	0,9961
Error	4,4E-04	4	1,1E-04		
Total	4,4E-04	5			

RABS Arabinosa

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RABS Arabinosa	6	0,00	0,00	64,93

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,00	1	0,00	0,00	>0,9999
Medio de cultivo	0,00	1	0,00	0,00	>0,9999
Error	8,7E-04	4	2,2E-04		
Total	8,7E-04	5			

**TABLA LVIII.** Resultados luego de ANOVA paramétrica para las muestras incubadas con medio caldo Vogel's y Czapek con una cc de CB de 2% (p/p) (7 días, 25°C).

**Arabinosa**

Variable N R<sup>2</sup> R<sup>2</sup> A<sub>j</sub> CV  
 Arabinosa 6 0,93 0,91 20,71

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,05	1	0,05	50,33	0,0021
Medio de cultivo	0,05	1	0,05	50,33	0,0021
Error	3,9E-03	4	9,9E-04		
Total	0,05	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,07123  
 Error: 0,0010 gl: 4  
 Medio de cultivo Medias n E.E.  
 Czapek 0,06 3 0,02 A  
 Vogel's 0,24 3 0,02 B

**Glucosa**

Variable N R<sup>2</sup> R<sup>2</sup> A<sub>j</sub> CV  
 Glucosa 6 0,93 0,91 20,71

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,02	1	0,02	50,34	0,0021
Medio de cultivo	0,02	1	0,02	50,34	0,0021
Error	1,4E-03	4	3,5E-04		
Total	0,02	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,04229  
 Error: 0,0003 gl: 4  
 Medio de cultivo Medias n E.E.  
 Czapek 0,04 3 0,01 A  
 Vogel's 0,14 3 0,01 B

**Galactosa**

Variable N R<sup>2</sup> R<sup>2</sup> A<sub>j</sub> CV  
 Galactosa 6 0,93 0,91 20,72

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,03	1	0,03	50,30	0,0021
Medio de cultivo	0,03	1	0,03	50,30	0,0021
Error	2,0E-03	4	5,0E-04		
Total	0,03	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,05063  
 Error: 0,0005 gl: 4  
 Medio de cultivo Medias n E.E.  
 Czapek 0,04 3 0,01 A  
 Vogel's 0,17 3 0,01 B  
 Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)