

# Caracterización funcional de *Trichoderma harzianum* mediante ensayos enzimáticos

SOLER, G <sup>1</sup>; Mutti Stegmann, P <sup>1, 2</sup>; Rodríguez, F. M <sup>1, 2</sup>; Tubio, G <sup>1, 2</sup>.

<sup>1</sup> Laboratorio de Investigación y Desarrollos Biotecnológicos (FBioyF-UNR), Rosario, Santa Fe, Argentina.  
<sup>2</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CCT- Rosario.

Contacto: guadisoler@gmail.com

Palabras claves: hongos filamentosos; fermentación en estado sólido; enzimas hidrolíticas; β-1,3-glucanasa.

## INTRODUCCIÓN

Los **hongos filamentosos** constituyen una fuente relevante de **enzimas extracelulares** con potencial aplicación en procesos agroindustriales. Entre ellas, las enzimas hidrolíticas participan en la degradación de distintos polisacáridos mediante la ruptura de enlaces glicosídicos. ***Trichoderma harzianum*** se destaca por su capacidad de producir enzimas como celulasas, xilanasas y glucanasas, lo que lo convierte en un microorganismo de interés biotecnológico. En este contexto, el empleo de hongos filamentosos en procesos agroindustriales requiere métodos reproducibles que permitan caracterizar su funcionalidad. Por ello, se planteó la optimización de un **ensayo laminarina-DNS** para cuantificar actividad **β-1,3-glucanasa** y complementar el perfil de enzimas hidrolíticas de *T. harzianum*.

## OBJETIVO GENERAL

Estandarizar un **método reproducible** para determinar actividad β-1,3-glucanasa en extractos fúngicos, apto para su uso rutinario en el laboratorio.

## METODOLOGÍA / MATERIALES Y MÉTODOS

*Trichoderma harzianum* se cultivó durante 4 días a 30 °C mediante **fermentación en estado sólido** (FES), empleando afrechillo de trigo y cascarilla de arveja amarilla como sustratos lignocelulósicos. Las enzimas extracelulares se recuperaron del material fermentado mediante **lixiviación**, seguida de agitación y filtración, obteniéndose el extracto enzimático utilizado en los ensayos. Las actividades **celulasa**, **xilanasas** y **α-amilasa** se determinaron mediante el método colorimétrico **DNS**, empleando CMC, xilano y almidón como sustratos, respectivamente. La cuantificación de azúcares reductores se realizó a partir de una curva de calibración de glucosa y medición espectrofotométrica a 560 nm. La actividad **β-1,3-glucanasa** se determinó mediante un ensayo laminarina-DNS, utilizando **laminarina** como sustrato. Se evaluaron distintas condiciones experimentales para optimizar el protocolo, incluyendo volumen de sustrato, volumen y dilución del extracto enzimático, volumen total de reacción y tiempo de incubación.



**Figura 1.** Crecimiento de *T. harzianum* a los 4 días de incubación.

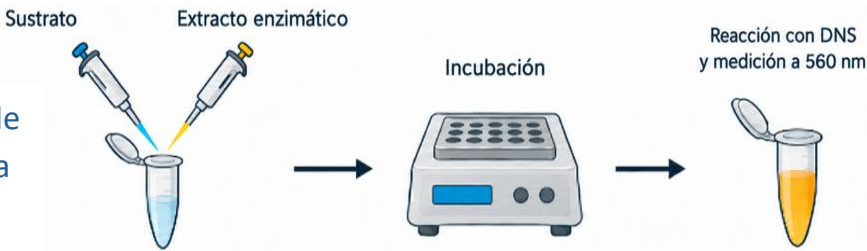


**Figura 2.** Protocolo del ensayo DNS.

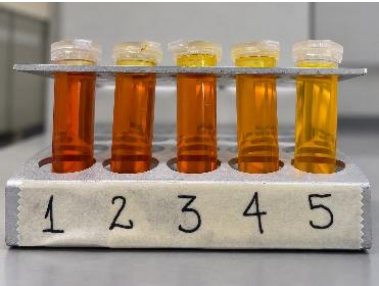


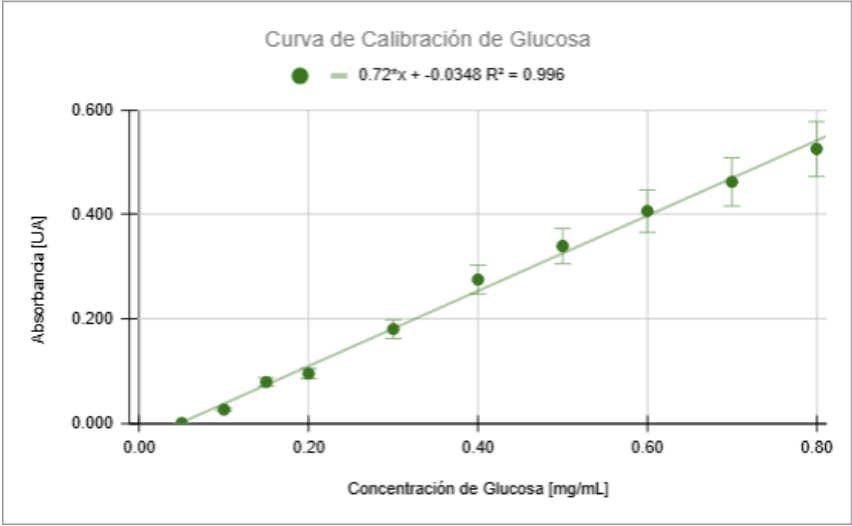
**Figura 3.** Reacciones a volúmenes decrecientes de laminarina.

## RESULTADOS y DISCUSIÓN

La **curva de calibración de glucosa** seleccionada presentó un buen ajuste lineal ( $R^2=0,996$ ), permitiendo la cuantificación de los azúcares reductores liberados en los ensayos enzimáticos. Se detectaron actividades de celulasa, xilanasas y α-amilasa en los extractos de *T. harzianum*, con predominio de la actividad xilanasas. La optimización del ensayo β-1,3-glucanasa permitió seleccionar como condiciones finales 250 μL de extracto enzimático diluido 1/50, 150 μL de laminarina y 30 min de incubación a 37 °C, reduciendo tanto el consumo de extracto como el de sustrato.

| Enzima hidrolítica | Actividad enzimática (U/g) |
|--------------------|----------------------------|
| Xilanasas          | 37,021                     |
| Celulasa           | 4,753                      |
| α-amilasa          | 0,547                      |
| β-1,3-glucanasa    | 6,165                      |

**Tabla 1.** Actividades enzimáticas obtenidas por ensayo DNS.



**Gráfica 1.** Curva de calibración de glucosa.

## CONCLUSIONES

La optimización del ensayo laminarina-DNS permitió establecer un método reproducible para determinar actividad β-1,3-glucanasa en extractos de *Trichoderma harzianum*, reduciendo el consumo de extracto y sustrato sin afectar la respuesta analítica.

## REFERENCIAS

Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428.

## AGRADECIMIENTOS y FINANCIAMIENTO

Proyecto PID-UNR 2023, código 80020220700308UR, y proyecto de la 10.ª Convocatoria de Vinculación Inclusiva 2025, código 80020250200032UR.