



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

**“ESCRUTINIO PARA LA OBTENCIÓN DE HONGOS PRODUCTORES DE
CELULASAS”**

Tesis que presenta:

IBQ. LUZ MARÍA LANDA ZVALETA

Para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Director de tesis:

D.C. MAURO MANUEL MARTÍNEZ PACHECO

Morelia, Michoacán, Noviembre 2011.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. PRINCIPALES ENZIMAS DE USO INDUSTRIAL	2
1.2. COMPLEJIDAD DE LA COMPOSICIÓN DE LA BIOMASA VEGETAL PARA SU UTILIZACIÓN	4
1.3. CELULASAS	7
1.3.1. Características principales de las celulasas	10
1.3.1.1. Endocelulasas; Endo-1,4- β glucanasas (EC 3.2.1.4)	10
1.3.1.2. Exocelulasas o Celobiohidrolasas; 1,4- β -D-glucan celobiohidrolasas (EC. 3.3.1.91)	10
1.3.1.3. β - glucosidasas	11
1.3.2. Características generales de las celulasas	12
1.3.2.1. Estructura	12
1.3.2.2. Mecanismo de hidrólisis de las celulasas	13
1.4. ORGANISMOS PRODUCTORES DE CELULASAS	14
1.5. FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE CELULASAS	17
1.6. ALCANCE TECNOLÓGICO EN LA OBTENCIÓN Y DESARROLLO DE NUEVAS ENZIMAS	19
2. JUSTIFICACIÓN	22
3. HIPÓTESIS	22
4. OBJETIVO GENERAL	22
4.1. Objetivos específicos	22
5. MATERIAL Y MÉTODOS	23
5.1. MATERIAL BIOLÓGICO	24

5.2. MEDIOS DE CULTIVO	25
5.2.1. Agar papa dextrosa (PDA)	25
5.2.2. Medio sólido con fuente de carbono carboximetilcelulosa (CMC) para la determinación de la actividad celulolítica .	25
5.2.3. Medio mínimo líquido	26
5.2.4. Medio mínimo sólido	26
5.3. ESCRUTINIO PARA LA SELECCIÓN DE AISLADOS FÚNGICOS CON MAYOR CAPACIDAD CELULOLÍTICA	27
5.3.1. Determinación de la actividad celulolítica mediante la técnica de tinción utilizando el colorante rojo congo	27
5.3.2. Crecimiento en medio líquido de aislados fúngicos	28
5.3.3. Análisis de correspondencia para la selección del aislado fúngico	28
5.4. CUANTIFICACIÓN ENZIMÁTICA	29
5.4.1. Determinación del contenido de proteína total por el método de Lowry	29
5.4.2. Cuantificación de la actividad específica de celulasas	30
5.4.2.1. β - Glucosidasas	30
5.4.2.2. Endocelulasas	31
5.4.2.3. Exocelulasas	32
5.4.2.4. Método para cuantificar glucosa utilizando el reactivo DNS	32
5.5. DETERMINACIÓN TAXONÓMICA DEL AISLADO FÚNGICO LPLM10	33
5.5.1. Aislamiento de DNA y amplificación de ITS del aislado fúngico LPLM10	33
5.5.2. Análisis filogenético del aislado fúngico LPLM10	34
5.6. SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA	35

PRODUCCIÓN DE CELULASAS	
5.6.1. Variación en las condiciones de crecimiento	35
5.6.2. Variación de las fuentes de Nitrógeno para la obtención de celulasas	35
5.6.3. Experimento ortogonal	36
5.7. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS DE CELULASAS	37
5.7.1. Determinación de temperatura óptima	37
5.7.2. Estabilidad térmica	38
5.7.3. Determinación de pH óptimo	38
5.7.4. Concentración de sustrato	38
5.7.5. Determinación de K_m y V_{max} aparentes	38
5.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
6. RESULTADOS	40
6.1. SELECCIÓN DEL AISLADO FÚNGICO CON MAYOR CAPACIDAD CELULOLÍTICA.	41
6.1.1. Protocolo de tinción; colorante rojo congo	41
6.1.2. Crecimiento en medio líquido de aislados fúngicos seleccionados	43
6.1.3. Análisis estadístico de correspondencia para la selección del aislado fúngico productor de celulasas	47
6.2. DETERMINACIÓN TAXONÓMICA DEL AISLADO FÚNGICO LPLM10	50
6.3. SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE PRODUCCIÓN DE CELULASAS DE <i>P. stromaticum</i>	55
6.3.1. Producción del complejo celulolítico de <i>P. stromaticum</i> en	55

medio líquido y medio sólido.	
6.3.2. Curso temporal de la producción enzimática del complejo celulolítico de <i>P. stromaticum</i>	57
6.3.3. Variación de la fuente de nitrógeno para la producción del complejo celulolítico de <i>P. stromaticum</i>	57
6.3.4. Experimento ortogonal para la optimización de las condiciones de obtención del complejo celulolítico de <i>P. stromaticum</i>	60
6.4. PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS DE LAS CELULASAS OBTENIDAS	62
6.4.1. Efecto del pH sobre la actividad del complejo celulolítico	62
6.4.2. Efecto de la temperatura sobre la actividad de celulasas obtenidas por <i>P. stromaticum</i>	65
6.4.3. Estabilidad térmica de las celulasas obtenidas por <i>P.</i> <i>stromaticum</i> .	65
6.4.4. Efecto de la concentración de sustrato en la cuantificación de celulasas de <i>P. stromaticum</i>	67
6.4.5. Determinación de las constantes cinéticas aparentes de las celulasas obtenidas de <i>P. stromaticum</i>	68
7. DISCUSIÓN	74
8. CONCLUSIÓN	86
9. REFERENCIAS	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Número de figura	Nombre	Página
Figura 1	Estructura de la lignocelulosa; componente principal de la pared celular de las plantas	6
Figura 2.	Arreglo de las fibras de celulosa y sus extremos asimétricos	8
Figura 3	Representación esquemática de la hidrólisis de celulosa cristalina mediante celulasas extracelulares	9
Figura 4	Modelo tridimensional de una celobiohidrolasa actuando sobre una cadena de celulosa	12
Figura 5	Mecanismo catalítico de hidrólisis que conduce a la inversión total del carbono anomérico	14
Figura 6	Mecanismo hidrolítico que conduce a la retención total de la configuración del carbono anomérico producto de la hidrolisis.	15
Figura 7	Determinación del índice celulolítico a partir de los resultados obtenidos mediante la tinción con el colorante rojo congo	28
Figura 8	Curva de calibración para la cuantificación de proteína mediante el método de Lowry	30
Figura 9	Curva de calibración de p -nitrofenilo utilizada para la cuantificación de β - glucosidasas	31
Figura 10	Curva de calibración de glucosa utilizada para la cuantificación endo y exocelulasas	33
Figura 11	Modificaciones experimentales realizadas al protocolo de tinción rojo congo	42
Figura 12	Tinciones de placas con medio minimo CMC inoculadas con diferentes aislados fúngicos.	42
Figura 13	Imágenes representativas de las tinciones con diferentes aislados fúngicos	44

Figura 14	Producción de los componentes enzimáticos del complejo celulolítico obtenido de los hongos fitopatógenos en medio líquido	46
Figura 15.	Producción de β -glucosidasas, endocelulasas y exocelulasas de 12 aislados fúngicos en medio líquido.	48
Figura 16.	Análisis estadístico de correspondencia de las variables analizadas en el escrutinio de 12 aislados fúngicos.	51
Figura 17	Muestras de DNA total del aislado fúngico LPLM10	52
Figura 18.	Productos de PCR obtenidos a partir del ADN total de LPLM10.	52
Figura 19	Árbol filogenético basado en la secuencias ITS de diferentes especies de <i>Pseudofusicoccum</i> .	53
Figura 20	Árbol filogenético basado en la secuencias ITS de diferentes cepas de <i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	53
Figura 21.	Morfología macroscópica y microscópica del aislado fúngico LPLM10	55
Figura 22.	Producción de celulasas por <i>P. stromaticum</i> en medio sólido y medio líquido.	56
Figura 23.	Curso temporal de la producción del complejo celulolítico de <i>P. stromaticum</i> en medio sólido.	57
Figura 24.	Efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de celulasas de <i>P. stromaticum</i> en medio de cultivo sólido.	59
Figura 25	Producción de celulasas obtenidas en las diferentes corridas o experimentos a partir del diseño ortogonal Taguchi	62
Figura 26	Relación S/N de los factores analizados en el diseño experimental Taguchi	63
Figura 27.	Efecto del pH en la actividad específica de celulasas obtenidas por <i>P.stromaticum</i> .	66

Figura 28	Efecto de la temperatura en la actividad específica de celulasas obtenidas por el asilado fúngico <i>P. stromaticum</i> .	69
Figura 29.	Estabilidad térmica de celulasas obtenidas por el asilado fúngico <i>P. stromaticum</i> .	70
Figura 30	Efecto de la concentración de sustrato de las celulasas obtenidas por el asilado fúngico <i>P. stromaticum</i> .	71
Figura 31.	Determinación de las constantes cinéticas aparentes de las celulasas obtenidas por el asilado fúngico <i>P. stromaticum</i> mediante el método de linelización Linewaver-Burck.	72
Figura 32.	Interacciones químicas (puentes de hidrógeno) generadas entre los grupos hidroxilo del polisacárido celulosa y los grupos amino del colorante rojo congo	76
Figura 33	<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	80

ÍNDICE DE CUADROS

Número de cuadro	Nombre	Página
Cuadro 1	Aplicaciones industriales de Glicósido hidrolasas	4
Cuadro 2.	Clasificación de las enzimas de acuerdo con la reacción que cataliza	5
Cuadro 3.	Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de residuos agrícolas y desechos	7
Cuadro 4.	Características estructurales y fisicoquímicas de celulasas extracelulares fúngicas.	11
Cuadro 5	Hongos productores de enzimas lignocelulolíticas	16
Cuadro 6.	Cepas de aislados fúngicos silvestres utilizadas para el escrutinio de la actividad celulolítica	24
Cuadro 7	Componentes del medio de cultivo utilizado para la realización del protocolo de tinción con rojo congo.	25
Cuadro 8	Componentes del medio de cultivo mínimo líquido	26
Cuadro 9	Condiciones de crecimiento en medio sólido	27
Cuadro 10	Matriz de datos utilizada para el análisis estadístico de correspondencia	29
Cuadro 11	Condiciones de PCR para llevar a cabo la amplificación de las secuencias de ITS	34
Cuadro 12	Condiciones del termociclador utilizadas para llevar a cabo la reacción de PCR	34
Cuadro 13	Tratamientos utilizados para determinar la condición de crecimiento óptima para la producción de celulasas	35
Cuadro 14	Fuentes de nitrógeno analizadas en medio de cultivo sólido para la producción de celulasas	36
Cuadro 15	Factores y niveles analizados en el experimento ortogonal Taguchi L9	37

Cuadro 16	Matriz de experimentos del diseño ortogonal Taguchi L9.	37
Cuadro 17	Actividad celulolítica de aislados fúngicos	45
Cuadro 18	Matriz de datos utilizada para llevar a cabo el análisis estadístico de correspondencia a partir de las variables obtenidas del 12 aislados fúngicos.	49
Cuadro 19.	Secuencias de nucleótidos de los ITS obtenidas a partir de la amplificación de ADN total del aislado fúngico LPLM10	54
Cuadro 20	Factores y niveles utilizados en el experimento ortogonal Taguchi.	60
Cuadro 21	Matriz de experimentos realizados en el diseño ortogonal Taguchi L9	61
Cuadro 22.	Parámetros óptimos obtenidos a partir del análisis ortogonal Taguchi L9 para la producción de celulasas por el aislado fúngico <i>P. stromaticum</i> .	64
Cuadro 23	Valores de Km y Vmax de celulasas obtenidos por diferentes aislados fúngicos	73

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la biotecnología, se fundamenta en la búsqueda de nuevas estrategias industriales con la finalidad de reemplazar a las tecnologías contaminantes actuales, por otras consideradas más limpias o amigables con el ambiente. La biotecnología, emplea organismos vivos y enzimas para obtener productos desarrollando procesos que requieran menos energía y que generen menos desechos durante su producción. En la actualidad las enzimas conforman una de las biotecnologías más útiles.

Las enzimas o biocatalizadores, presentan propiedades que los catalizadores inorgánicos no poseen como selectividad por sustrato, regio-enantioselectividad además de temperaturas y presiones de trabajo moderadas, lo cual disminuye los costos de operación de los procesos. También pueden catalizar una variedad de reacciones en intervalos amplios de pH y temperatura. Esto explica que en los últimos años hayan surgido un considerable número de procesos industriales que las utilizan como catalizadores.

1.1. PRINCIPALES ENZIMAS DE USO INDUSTRIAL

El uso de enzimas en procesos industriales, se ha manifestado en un aumento en los rendimientos y una disminución de los costos de producción, es por ello que el campo de investigación con respecto al desarrollo de nuevas estrategias de obtención de enzimas de importancia industrial y la búsqueda de nuevos microorganismos productores de éstas, es una excelente y basta opción de estudio. Considerando también que existe un gran número de enzimas reportadas, alrededor de 3000, sin embargo, únicamente 100 son comercializadas industrialmente (Eggleston 2007).

Actualmente una de las aplicaciones a nivel industrial que involucra la participación de enzimas y que ha tenido gran relevancia, se genera a partir de la creciente demanda energética, debido al agotamiento de los combustibles fósiles. Esto ha incrementado el interés en la utilización de fuentes alternativas de energía como son el uso de biocombustibles generados a partir de biomasa vegetal, como una fuente de materia prima orgánica renovable.

La biomasa vegetal se encuentra conformada principalmente por carbohidratos los cuales constituyen la clase principal de compuestos orgánicos que existen en la naturaleza. Estos compuestos representan la principal fuente de carbono orgánica en la biósfera y se encuentran involucrados en la nutrición de muchos organismos. Son clasificados dentro de tres grupos principales: monosacáridos (glucosa, fructosa, desoxirribosa, etc.), disacáridos (sacarosa, trelosa, lactosa, etc.) y polisacáridos (moléculas poliméricas constituidas a partir de cadenas cortas de oligosacáridos tales como celulosa y almidones) (Zoran, 2008). La diversidad estructural y funcional de los carbohidratos implica un amplio espectro de enzimas involucradas en su síntesis (glicosil transferasas), modificación (carbohidrato esterasa) y degradación (Glicósido hidrolasas).

Debido a la complejidad en la composición de la biomasa vegetal se requiere la utilización de procesos químicos y enzimáticos con la finalidad de reutilizar esta materia prima renovable y producir a partir de ella productos de interés comercial. Los procesos enzimáticos son los que presentan mayores ventajas con respecto a los procesos químicos (Saucedo Luna y col., 2011).

El conjunto de enzimas que llevan a cabo la degradación de la biomasa vegetal reciben el nombre de enzimas lignocelulolíticas y forman parte del grupo de las glicosido hidrolasas (GH) (EC 3.2.1.X), las cuales hidrolizan el enlace glicosídico entre dos o mas carbohidratos o entre moléculas constituidas por un carbohidrato y otro sustituyente. Actúan sobre los principales constituyentes de la pared celular de los tejidos vegetales tales como la celulosa (celulasas), xilana (xilanasas) y lignina (ligninasas) (Dashtban, 2009). Estas enzimas han sido aplicadas con éxito para facilitar el proceso tecnológico de bioconversión mediante la pre-digestión de la pared celular de los tejidos vegetales (Gamarra y col. 2010).

Otros usos que tienen estas enzimas se presentan en el cuadro 1 donde podemos observar aplicaciones industriales de algunas enzimas lignocelulolíticas. Por ejemplo, las xilanasas pueden ser utilizadas en la industria panificadora debido a que hidrolizan la hemicelulosa de la harina de trigo, lo que ayuda a la redistribución del agua dejando la masa suave, aumentando el volumen del pan y mejorando el proceso de fermentación (Maat y col., 1992; Harbak y Thygesen 2002; Camacho y Aguilar, 2003). Las xilanasas, al igual que las celulasas se utilizan también en la elaboración de alimento animal debido a que rompen los polisacáridos que constituyen la materia prima para la elaboración del alimento reduciendo su viscosidad (Twomey y col., 2003, Polizeli y col., 2005). Las celulasas por su parte, son utilizadas en la industria alimenticia en la obtención de jugos debido a que incrementan el porcentaje de extracción y mejoran las características organolépticas del mismo (Das y col. 1994; Ovando y Waliszewski 2005). Otro uso de las celulasas son los procesos de extracción de aceites, almidón y colorantes debido a que el pre-tratamiento de los tejidos vegetales utilizados como materia prima ayuda al ablandamiento del tejido mejorando el proceso de extracción (Sarker y col., 1999; Navarrete y col. 2005; Ovando y Waliszewski 2005). Así mismo, las celulasas son utilizadas en los procesos de elaboración de detergentes ya que las enzimas pueden ser añadidas al producto para mejorar la remoción de las microfibrillas, elevando la calidad del detergente (Eggleston 2007)

Las GH han sido clasificadas en base a su secuencia de aminoácidos y características estructurales en 128 familias (Henrissat y Bairoch, 1993). La base de datos CAZY cuenta con una amplia información en cuanto a esta clasificación y presentan características generales de estas enzimas (<http://www.cazy.org/>).

Cuadro 1. Aplicaciones industriales de Glicósido hidrolasas (Eggleston, 2007).

Tipo de Industria	Enzima Industrial	Polisacárido	Efecto Industrial
Detergente/ Textil	Celulasa	Celulosa	Aclarado de color/ Remoción de microfibrillas
Alimento Animal	Xilanasa	Xilana	Solubilidad de fibras
Pulpa y Papelera	Xilanasa	Xilana	Ayuda al blanqueamiento de la pulpa
Almidón	Amilasa	Almidón	Producción de glucosa
	Glucosa isomerasa	Glucosa	Producción de fructosa (para elaboración de jarabes de alta fructosa)
Jugo de Fruta	Pectinasa Celulasa Xilanasa	Pectina Celulosa Xilana	Clarificación del jugo Extracción del jugo Extracción del jugo
Panificadora	Xilanasa Alfa amilasa	Xilana Almidón	Acondicionamiento de la masa Mejoramiento del volumen del pan y tiempo de anaquel
	Glucosa oxidasa	Glucosa	Calidad de la masa
Lácteos	Lactasa	Lactosa	Hidrólisis de lactosa
Cervecera	Glucanasa	Glucana	Como un auxiliar en el filtrado

Los sustratos principales de las GH son los polisacáridos, que constituyen a la mayoría de las materias primas utilizadas a nivel industrial por lo tanto, estas enzimas son reconocidas debido a su valor comercial e importancia biotecnológica.

En el cuadro 2 se presenta una clasificación de las enzimas en cuanto a la reacción bioquímica que catalizan, de estos grupos destacan las hidrolasas que representan el 80 % de las enzimas industriales. De este porcentaje el 50 % tienen como sustratos polisacáridos, es decir, son glicósido hidrolasas.

En el año 2002 se estimó que la producción mundial de glicósido hidrolasas generó un volumen de ventas de 596 millones de dólares, de los cuales, aproximadamente el 24 % de éstas se encuentran destinadas a la fabricación de detergentes, 15% a la obtención de jarabes derivados del almidón, 14% en la elaboración de alimentos para animales, 10% en la industria textil, 12% en la industria papelera y 26% en otras (Eggleston, 2007)

1.2. COMPLEJIDAD DE LA COMPOSICIÓN DE LA BIOMASA VEGETAL PARA SU UTILIZACIÓN

La lignocelulosa es el principal componente de la pared celular de las plantas, esta biomasa producida por la fotosíntesis es la fuente de carbono renovable más importante. El principal impedimento tecnológico para la utilización de la biomasa vegetal es la ausencia de una tecnología de bajo costo dirigida a la recalcitrancia de la lignocelulosa (Cuervo y col., 2009)

Cuadro 2. Clasificación de las enzimas de acuerdo con la reacción que cataliza (Eggleston 2007).

Enzima	Reacción bioquímica que catalizan	Ejemplos
Oxidoreductasas	Oxidación o reducción de sustratos	Deshidrogenasas Oxidasas Peroxidasas Oxigenasas
Transferasas	Transferencia de un grupo de una molécula a otra	Metil-transferasas Glicosil-transferasas Acil-transferasas
Hidrolasas	Rompimiento hidrolítico de un enlace	Esterasas Glicósido hidrolasas Peptidasas
Liasas	Rompimiento no-hidrolítico de enlaces	Descarboxilasas
Isomerasas	Conversión de un isómero a otro (rearreglos intramoleculares)	Racemasas Epimerasas
Ligasas	Unión de dos moléculas	DNA ligasas

La pared celular de las plantas esta formada por lignocelulosa, la cual se encuentra conformada por polisacáridos como celulosa, hemicelulosa y lignina (Figura 1). La composición y porcentajes de los polímeros varían entre las especies de plantas incluso entre la edad y etapa de crecimiento (Jeffries, 1994).

El principal polisacárido que constituye la biomasa vegetal es la celulosa, cuya función es la de proporcionar soporte y protección, además de ser una fuente de carbono para diversos organismos y es uno de los compuestos orgánicos más abundantes que existen sobre la tierra. Es un biopolímero lineal compuesto por moléculas de glucosa unidas entre si por enlaces glucosídicos tipo β -(1-4), que se estructuran en largas cadenas lineales (microfibrillas) unidas por puentes de hidrógeno, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática (Béguin y Aubert, 1994; Ovando y Waliszewski, 2005). En menores proporciones es sintetizada también por otros organismos como bacterias del género *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium* y *Sarcina* (Ross y col., 1991; Czaja y col., 2007; Martinez y col., 2008).

La hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) que forman cadenas ramificadas y los ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico, los monosacáridos están unidos por enlaces β -(1,4) y ocasionalmente por enlaces β -(1,3) (Pérez y col., 2002).

La lignina es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado formado por alcoholes aromáticos que da soporte estructural, rigidez, impermeabilidad y

protección a los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa) y es resistente a la degradación química y biológica (Aro y col., 2005).

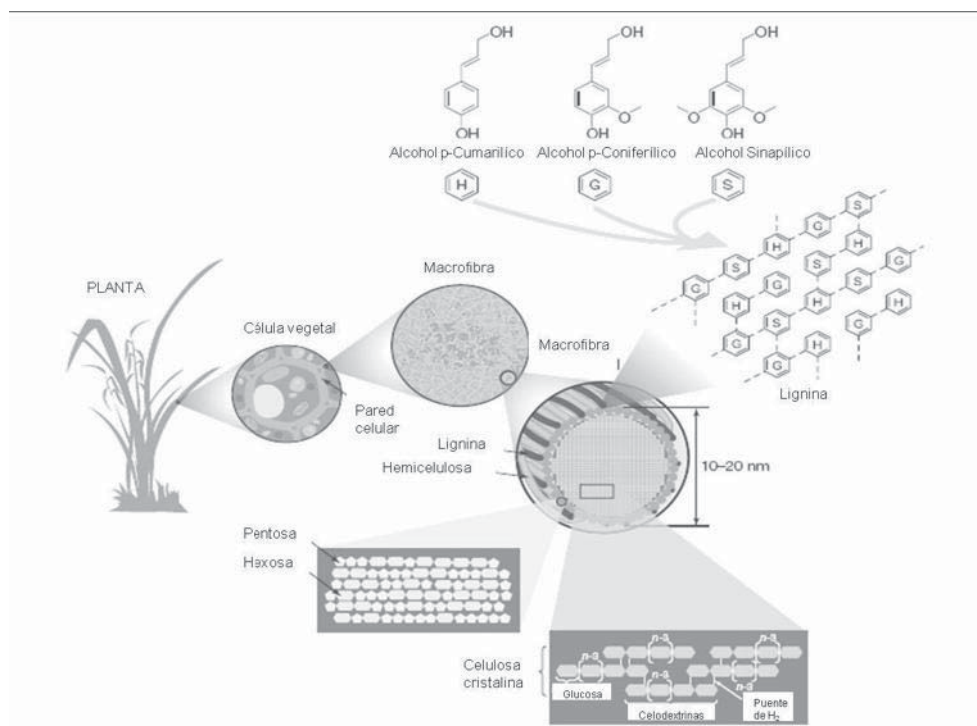


Figura 1. Estructura de la lignocelulosa; componente principal de la pared celular de las plantas (Modificada de Rubin, 2008)

En la biomasa vegetal existe una variación en el contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina como se muestra en el cuadro 3. Sin embargo, la celulosa destaca principalmente por ser el componente principal.

La celulosa es uno de los materiales mas utilizados desde tiempos remotos y en la actualidad es la fuente de combustibles orgánicos, compuestos químicos, fibras y materiales para cubrir las necesidades humanas tales como el papel, la pulpa, las maderas, etc. (Mejía y col., 2002). Se estima que alrededor de 180 billones de toneladas de celulosa son producidas por las plantas anualmente (Martínez, 2008).

Los extremos de este polímero son asimétricos, los que contienen el carbono anomérico (C₁) libre pueden reducir a un número de oxidantes como el cobre y se conocen como extremos reductores, mientras que el extremo donde el C₄ presenta un radical hidroxilo libre se le denomina como no reductor (Pettersen, 1984) (Figura 2).

Cuadro 3. Contenido de celulosa, hemicelulosa y lignina de residuos agrícolas y desechos (Cuervo y col., 2009).

Material lignocelulósico	Celulosa (%)	Hemicelulosa (%)	Lignina (%)
Madera dura	40-55	24-40	18-25
Madera suave	45-50	25-35	25-35
Cáscara de nuez	25-30	25-30	30-40
Olote de maíz	45	35	15
Desechos de pastos	25-40	35-40	18-30
Papel	85-99	0	0-15
Paja de trigo	30	50	15
Hojas	15-20	80-85	0
Algodón	80-95	0	0
Papel periódico	40-55	25-40	18-30
Desecho de papel de pulpeos químicos	60-70	10-20	5-10
Desechos sólidos de aguas residuales	8-15	ND ^b	24-29
Desechos animales (cerdos)	6	28	ND ^b
Desechos sólidos de ganado	1.6-4.7	1.4-3.3	2.7-5.7
Hierba Bermuda	25	35.7	64
Pastos de crecimiento rápido	45	31.4	12

La organización de la celulosa en la pared celular es compleja. La configuración tridimensional es estabilizada mediante puentes de hidrógeno, y consiste de 30 moléculas lineales, lo que representa alrededor de 10,000 y 14,000 moléculas de glucosa, que forman una estructura conocida como protofibrilla; ésta a su vez se asocia con otras protofibrillas para formar lo que se denomina como fibrilla de celulosa. Por último, las fibrillas se ensamblan entre ellas para formar las fibras de celulosa que son entrelazadas mediante interacciones no covalentes con la hemicelulosa y la lignina (Lynd y col., 2002). Dentro de las fibras de celulosa se distinguen diferentes regiones que van desde las más organizadas (región cristalina) y las desordenadas (región amorfa) (Figura 2).

La naturaleza estructural de la celulosa la vuelven insoluble en la mayoría de los solventes, incluyendo el agua. Es por esta razón que el material celulósico aunque es atractivo como una fuente de carbono y energía debido a su bajo costo y su gran abundancia, para su utilización requiere de complejos multienzimáticos denominados celulasas para llevar a cabo su degradación.

1.3. CELULASAS

La acción enzimática para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa es una operación secuencial y concertada de un grupo de enzimas denominadas celulasas, las cuales atacan hidrolíticamente en diferentes sitios de la molécula de celulosa (Yoon y col., 2008).

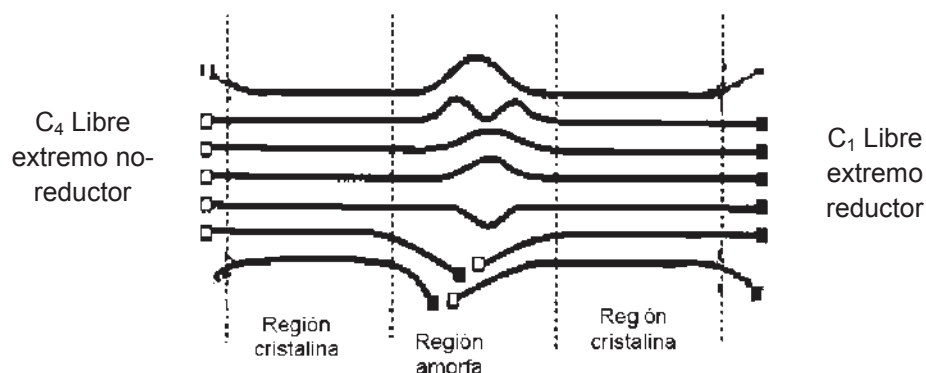


Figura 2. Arreglo de las fibras de celulosa y sus extremos asimétricos (Lynd y col. 2002; Martínez, 2008).

Las celulasas de acuerdo al sitio en el que cortan la fibrilla de celulosa se dividen en tres grupos; Endocelulasas, Exocelulasas y β -glucosidasas. El primer grupo incluye a las Endocelulasas; también denominadas endoglucanasas (1,4- β -D-glucanasas EC 3.2.1.4), las cuales actúan de forma azarosa sobre las regiones de celulosa amorfa en el interior del polisacárido. Generan oligosacáridos de diferentes tamaños y, por lo tanto, nuevas cadenas terminales. El segundo grupo se encuentra conformado por las Exocelulasas; son también conocidas como exoglucanasas, y actúan procesivamente en los extremos terminales del polímero liberando ya sea moléculas de glucosa, las glucohidrolasas (1,4- β -D-glucan glucohidrolasa, EC 3.2.1.74); o celobiosa, las celobiohidrolasas (1,4- β -D-glucan celobiohidrolasas, EC 3.2.1.91). El último grupo de celulasas agrupa a las β -D-glucosidasas (β -D-glucósido glucohidrolasas EC 3.2.1.21), y se encargan de degradar a la celobiosa producida por las exocelulasas hasta monómeros de glucosa (Henrissat y Bairoch, 1993; Lynd y col., 2002; Baldrian y Valaskova, 2008).

Los sistemas celulolíticos exhiben una gran actividad hidrolítica colectiva que es la suma de las actividades individuales de las enzimas, un proceso conocido como sinergismo (Saha y Bothast, 1996; Ilmen y col., 1997; Boisset y col., 2000). Tres formas de sinergismo han sido reportados; (1) sinergismo endo y exo entre las endocelulasas y las exocelulasas (Henriksson y col., 1999), en el cual la acción de las endocelulasas incrementa el número de extremos no-reductores y, por lo tanto, aumenta la acción de las exocelulasas, las cuales por si mismas parecen ser la clave en la digestión de la celulosa cristalina (Irwin y col., 1998). (2) sinergismo exo-exo que procesa la reducción de las cadenas de celulosa por los extremos del polímero. (3) sinergismo entre exocelulasas y β -glucosidasas, en el que se remueve la celulosa y la celobiosa como productos finales de las dos primeras enzimas. En la figura 3 se presenta el modo de acción de cada enzima, donde se puede observar la manera en que las endocelulasas hidrolizan primeramente las regiones amorfas de la celulosa, dando paso a las

exocelulasas, que liberan celobiosa, la cual es a su vez hidrolizada por la acción de las β -glucosidasas para obtener como producto final monómeros de glucosa.

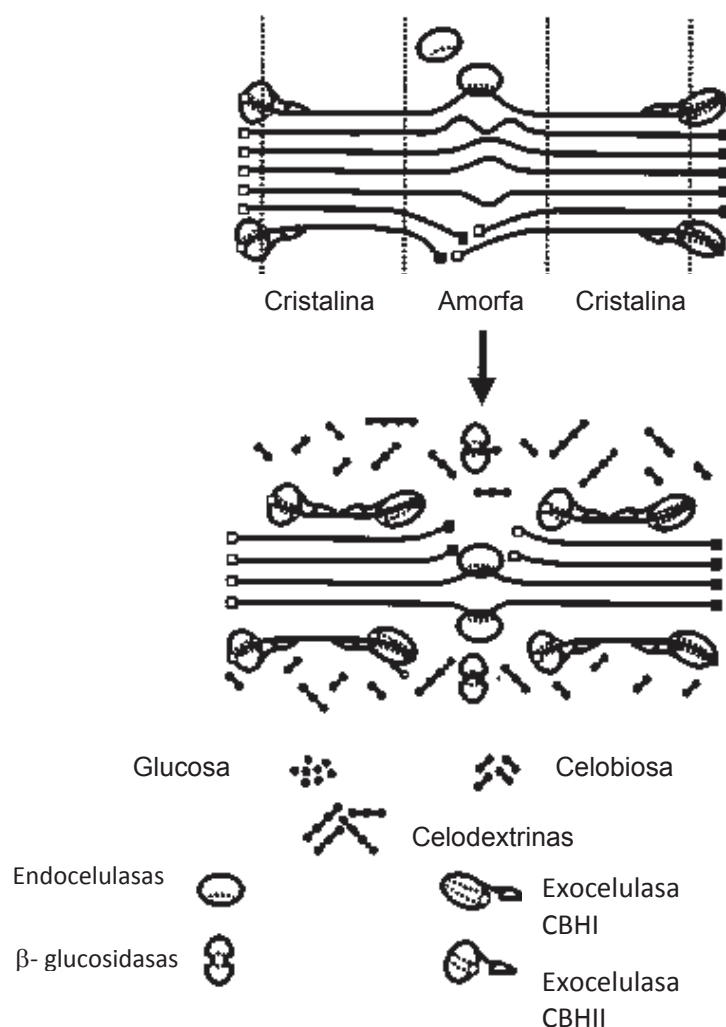


Figura 3. Representación esquemática de la hidrólisis de celulosa cristalina mediante celulasas extracelulares. Los cuadros negros representan extremos no reductores y los cuadros blancos extremos reductores (Lynd y col., 2002).

La regulación de la biosíntesis de celulasas se genera principalmente a partir del producto final de la hidrólisis, la glucosa. Este es un proceso regulatorio debido a que las células, al tener la glucosa disponible para metabolizarla no requieren de la producción de nuevas enzimas. A este tipo de regulación se le denomina como represión catabólica y este comportamiento ha sido observado por el principal productor de celulasas estudiado *T. reesei* (Kubicek, 1992).

1.3.1. Características principales de las celulasas

1.3.1.1. Endocelulasas; Endo-1,4- β glucanasas (EC 3.2.1.4)

Las endocelulasas o endoglucanasas (EGs) inician el rompimiento de la celulosa mediante el ataque de las regiones amorfas de la celulosa haciéndola accesible para las exoglucanasas y generando nuevos extremos de la cadena libres (Percival y col., 2006). Las endoglucanasas fúngicas son generalmente monómeros sin o con bajo nivel de glicosilación y presentan una “hendidura” abierta de unión al sustrato. Presentan un pH óptimo entre 4.0 y 5.0 y un intervalo de temperatura óptima de 50 a 70 °C. Se ha demostrado que muchos hongos producen múltiples EGs. Por ejemplo, *T. reesei* produce al menos 5 EGs (EGI/Cel7B, EGII/Cel5A, EGIII/Cel12A, EGIV/Cel61A y EGV/Cel45A) mientras que otras tres EGs fueron aisladas del hongo de la pudrición blanca de la madera *P. chrysosporium* (EG28, EG34 y EG44) (Foreman y col., 2003; Hao y col., 2006). Algunas EGs carecen de CBM mientras que otras EGs con CBM han sido descritas. Por ejemplo, 4 de las 5 EGs en *T. reesei* incluyendo EGI, EGII, EGIV y EGV presentan CBM mientras que EGIII no lo presenta en su estructura (Sandgren y col., 2005).

1.3.1.2. Exocelulasas o Celobiohidrolasas; 1,4- β -D-glucan celobiohidrolasas (EC. 3.3.1.91)

Las Exocelulasas o Celobiohidrolasas (CBHs) preferentemente hidrolizan enlaces glicosídicos β -(1,4) de los extremos de la cadena de celulosa, produciendo celobiosa como producto principal. Las CBHs son el modelo estructural de las enzimas celulolíticas debido a que presentan un túnel de unión al sustrato que rodea a la celulosa. Similar a las EGs, las CBHs son monómeros, con o sin bajo nivel de glicosilación con pH óptimo entre 4.0 y 5.0, el intervalo de temperatura óptima es más amplio, de 37 a 60 °C. Se ha demostrado que algunas CBHs pueden actuar en los extremos no reductores de las cadenas de celulosa y otras en los extremos reductores, lo que aumenta el sinergismo entre las enzimas que actúan de manera opuesta. Por ejemplo, se ha demostrado que *T. reesei* produce dos CBHs, una que actúa en el extremo no reductor (CBHII/Cel6A) y otra que actúa en el extremo reductor (CBHI/Cel7A), lo que resulta en una degradación celulolítica más eficiente. Además, tanto la CBHI y CBHII de *T. reesei* tienen CBM en el carboxilo terminal o en el amino terminal del módulo catalítico, respectivamente. La celobiosa, es el producto final de las CBHs, y actúa como un inhibidor competitivo, que puede limitar la capacidad de las enzimas para degradar las moléculas de celulosa en un sistema (Divne y col., 1998; Sandgren y col., 2005; Baldrian y Valskova, 2008)

Cuadro 4. Características estructurales y fisicoquímicas de celulasas extracelulares fúngicas (Dashtban, 2009).

Enzima	Sustrato óptimo	Masa molecular (kDa)	Familia de GH: correspondiente al plegamiento estructural	Temperatura óptima (°C)	pH óptimo	Glicosilación
Endo-1,4- β glucanasas (EG)	Celulosa (regiones amorfas)	Monomérica (22-45)	5: (β/α)8	50-70	Principalmente 4-5	Ninguna o muy baja
			6: Distorsionada (β/α)			
			7, 12: β enrollada			
			9, 48: (α/α)			
			45: β barril			
			61			
			74: 7: β propela			
Celobiohidrolasas (CBH)	Celulosa (regiones cristalinas)	Monomérica (50-65)	6: Distorsionada (β/α)	37-60	Principalmente 4-5	Ninguna o muy baja
			7: β enrollada			
			9,48: (α/α)6			
β -glucosidasas (BGL)	Celobiosa, celodextrinas	Monomérica, dimérica, trimérica (35-450)	1: (β/α)8	45-75	Variable	Usualmente muy alto

1.3.1.3. β - glucosidasas

Las β -glucosidasas (BGLs) han sido aisladas de muchas especies diferentes de hongos incluyendo Ascomicetos tales como *T. reesei*, y basidiomicetos tales como los hongos responsables de la pudrición blanca y café de la madera. Las β -glucosidasas hidrolizan celobiosa y celodextrinas. Las BGLs han sido clasificadas dentro de las familias 1 y 3 de las glicósido hidrolasas basándose en sus secuencias de aminoácidos (Henrissat, 1991). La familia 3 incluye β -glucosidasas de hongos, bacterias y plantas, mientras que la familia 1 incluye β -glucosidasas bacterianas, de plantas y de origen animal. Las BGLs de ambas familias hidrolizan enlaces glucosídicos β -1,4 utilizando el mecanismo de retención. Estas enzimas muestran la mayor variabilidad entre todas las enzimas celulolíticas debido a su estructura y localización. Si bien, algunas BGLs presentan una estructura monomérica simple con alrededor de 35 kDa de masa molecular (por ejemplo, la identificada de *Pleurotus ostreatus*) (Morais y col., 2002), algunas otras son diméricas (por ejemplo, la identificada del Basidiomiceto *Sporobolomyces* con una masa de 146 kDa) o incluso estructuras trimérica con más de 450 kDa (por ejemplo, la identificada de *Pisolithus tinctorius*) (Cao y Crawford, 1993). Además, la mayoría de BGLs son glicosiladas y en algunos

casos, tales como la BGL monomérica de *Trametes versicolor* de 300 kDa, presenta un grado de glicosilación de más del 90%. En cuanto a su localización, las BGLs pueden agruparse en tres tipos diferentes, que pueden ser; intracelulares, asociadas a la pared celular y extracelulares, por lo tanto, es explicable que el pH óptimo de estas enzimas varíe en función de su localización (Cai y col., 1999). El intervalo de temperaturas óptimas se encuentre entre los 45 a 75 °C. En *T. reesei*, por ejemplo, dos β -glucosidasas (BGLI/Cel3A y BGLII/Cel1A) se han aislado del sobrenadante del cultivo, pero en otros estudios las enzimas se encontraron principalmente asociadas a la pared de la célula (Kubicek y col., 1981). Por otra parte, la producción BGLs en *T. reesei* es muy baja en comparación con otros hongos celulolíticos tales como *A. niger*. Los intentos para mejorar la actividad β -glucosidasas en *T. reesei* se han alcanzado a través de la transformación del gen *bgl* de la BGL del hongo termófilo *Talaromyces emersonii*. (Murray y col., 2004; Rahman y col., 2009)

1.3.2. Características generales de las celulasas

1.3.2.1. Estructura

Las celulasas presentan una estructura modular. La cual se encuentra constituida por dos dominios principales, uno catalítico, el cual es responsable de llevar a cabo la reacción de hidrólisis y el segundo; un dominio de unión a celulosa (CBM por sus siglas en ingles cellulose-binding domain) el cual no presenta actividad catalítica, pero promueve la adsorción de la enzima en la macromolécula de celulosa (Henrissat, 1994). Ambos dominios se unen mediante una bisagra flexible de aminoácidos hidroxilados (Ser y Thr) con la finalidad de aproximar la enzima al sustrato y potenciar su acción (Figura 4).



Figura 4. Modelo tridimensional de una celobiohidrolasa actuando sobre una cadena de celulosa. Se muestra el módulo catalítico en forma de túnel (liberando una molécula de celobiosa), la bisagra flexible y el CBM unido a la cadena de celulosa (Martínez y col., 2008).

Los dominios catalíticos han sido usados para clasificar a las celulasas basándose en la comparación estructural y en la secuencia de aminoácidos. En

base a esta clasificación diversos tipos de estructuras han sido determinadas y han sido agrupadas en familias de dominios catalíticos (Rabinovich y col., 2002).

Los CBM se clasifican también, en familias según su secuencia de aminoácidos y contienen desde 30 hasta 200 aminoácidos, localizados hacia los extremos carboxilo o amino terminal, aunque ocasionalmente se encuentran posicionados en el centro de la cadena polipeptídica. Cada familia de CBM tiene características únicas, se sabe que su afinidad por la celulosa se debe en parte a su superficie plana compuesta de aminoácidos aromáticos que le proporcionan cualidades hidrofóbicas. Se sabe también que mediante un mecanismo no catalítico el CBM de la endoglucanasa III de *T. reesei* altera la estructura de la celulosa cristalina (Martínez y col., 2008).

1.3.2.2. Mecanismo de hidrólisis de las celulasas

Todas las celulasas hidrolizan enlaces glicosídicos y utilizan dos mecanismos de hidrólisis que generan dos posibles configuraciones estereoquímicas finales. Un tipo de enzimas llevan a cabo una reacción en la que el carbono anomérico mantiene su posición, ya sea alfa o beta; denominado mecanismo de retención y otro tipo en la que se pierde; llamado mecanismo de inversión (Henrissat, 1994).

Para una glicósido hidrolasa de inversión prevalece una catálisis general ácido-base y es necesaria una modulación del pK_a de los dos residuos de aminoácidos (normalmente ácido aspártico y glutámico) en el sitio activo de la enzima. El sitio activo de la enzima debe acoplarse para acomodar el sustrato y una molécula de agua, teniendo un ancho de 10 Å. En cambio en una glicósido hidrolasa de retención el sitio activo es mas pequeño, alrededor de 6 Å. (Stick, 2002)

La hidrólisis de un oligosacárido con una inversión neta de la configuración de su carbono anomérico generalmente se alcanza a través de un paso, un solo mecanismo de desplazamiento con la formación de un ión como estado de transición, como se muestra en la figura 5. La reacción se produce por la acción ácido/base de los dos residuos de aminoácidos, presentes en el sitio activo (Henrissat, 1994; Ketudat y Esen, 2010).

La hidrólisis con la retención neta de la configuración del carbono anomérico se lleva a cabo a través de dos pasos, un mecanismo de doble desplazamiento que genera la formación de un intermediario covalente glicosil-enzima (figura 6). En la primera etapa, un residuo desempeña la función de un nucleófilo, atacando al carbono anomérico para formar un intermediario glicosil-proteína (figura 6 inciso a). Al mismo tiempo el otro residuo de aminoácido actúa como un ácido y protona al oxígeno glicosídico generándose así el rompimiento del enlace. En el segundo paso, el intermediario glicosil-enzima es hidrolizado por una molécula de agua, con el otro residuo ahora actuando como una base desprotonando la molécula de agua (figura 6 inciso c).

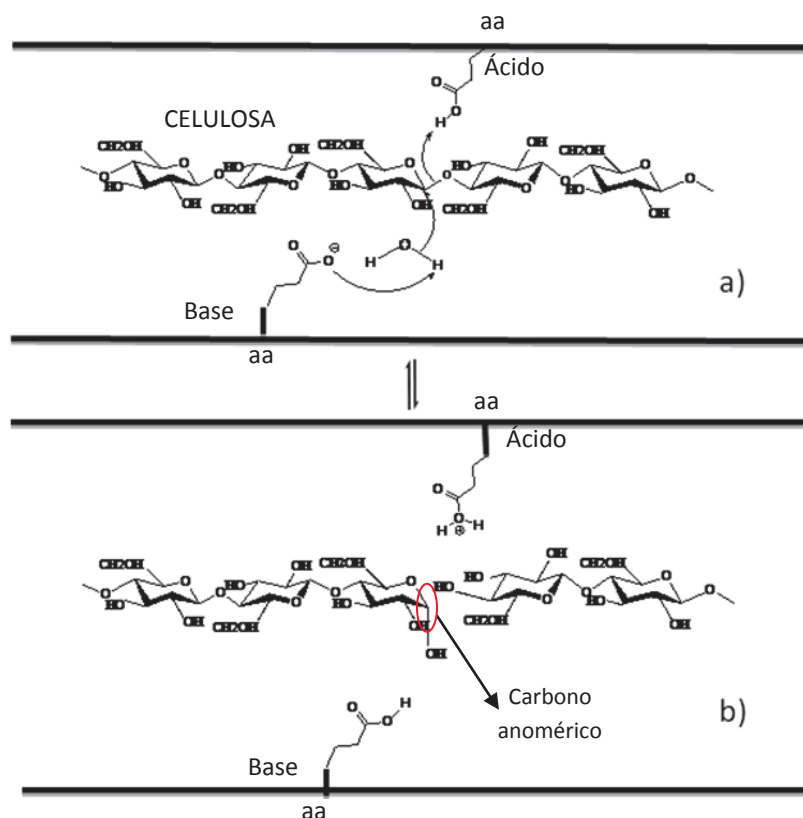


Figura 5. Mecanismo catalítico de hidrólisis que conduce a la inversión total del carbono anomérico.

1.4. ORGANISMOS PRODUCTORES DE CELULASAS

La búsqueda de fuentes de enzimas celulolíticas es de gran importancia para llevar a cabo una bioconversión exitosa de la biomasa vegetal. Aunque varios microorganismos, tanto bacterias como hongos, han sido evaluados por su capacidad para degradar sustratos celulósicos en monómeros de glucosa, relativamente pocos han sido seleccionados por su capacidad para la producción de celulasas (Das y col., 2007; Yu y col., 2007). Además, algunos microorganismos producen en proporciones diferentes los componentes del complejo celulolítico, algunos producen una gran cantidad de endocelulasas y exocelulasas o bien de β -glucosidasas (Kumar y col., 2008).

Dentro de los microorganismos que presentan capacidades celulolíticas se han identificado dos importantes grupos. El primero de ellos agrupa especies bacterianas y fúngicas anaerobias que habitan en aguas residuales, el rumen y tracto intestinal de los animales herbívoros y algunos insectos como escarabajos y termitas. Como ejemplos bacterianos pertenecientes a este grupo, se encuentran los géneros *Clostridium* y *Ruminococcus*.

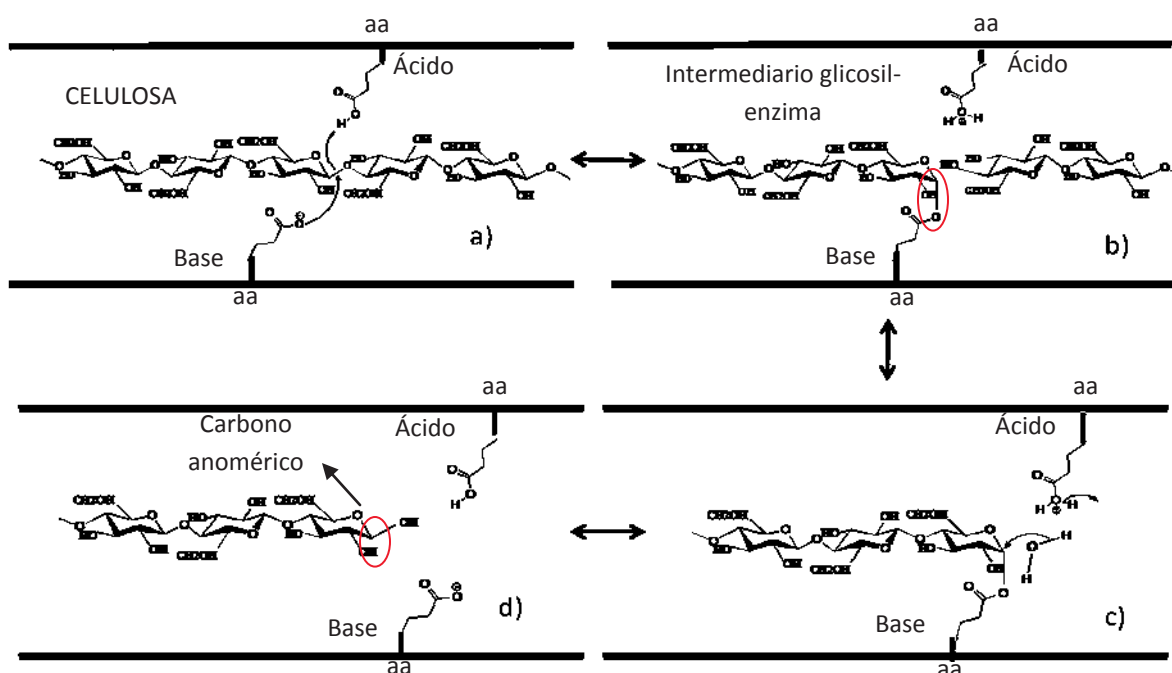


Figura 6. Mecanismo hidrolítico que conduce a la retención total de la configuración del carbono anomérico producto de la hidrólisis.

Mientras que algunos hongos anaerobios son *Anaeromyces mucronatus*, *Caecomyces communis*, *Cyllumyces aberensis*, *Neocallimastix frontalis*, *Orpinomyces* sp. y *Piromyces* sp. El segundo grupo incluye especies aerobias habitantes de los suelos, tales como las bacterias *Cellulomonas* y *Streptomyces*, y los hongos basidiomicetos responsables de la pudrición blanca y café de la madera (Martínez y col., 2008); como: *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium pinophilum*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Fusarium solani*, *Talaromyces emersonii* y *Trichoderma koningii*, (Ovando y Waliszewski, 2005). Otras cepas de hongos mesófilos también han sido estudiadas por ejemplo *Fusarium oxysporum*, *Piptoporus betulinus*, *Penicillium echinulatum*, *P. purpurogenum*, *Aspergillus niger* y *A. fumigatus* (Singh y col., 1988; Sharma y col., 2001; Szijarto y col., 2004; Baldrian y Valaskova, 2008; Martins y col., 2008). Actualmente algunos hongos termofílicos han recibido gran atención como *Sporotrichum thermophile*, *Scytalidium thermophilum*, *Clostridium straminisolvens* y *Thermonospora curvata* los cuales producen un complejo celulolítico y pueden degradar celulosa nativa (Hutnan y col., 2000; Kato y col., 2004; Kaur y col., 2004).

Los degradadores de celulosa, utilizan a este polisacárido como una fuente de carbono ya que en condiciones controladas de crecimiento, la celulosa funciona como un sustrato inductor, para que los microorganismos produzcan una cantidad considerable de enzimas extracelulares las cuales son recuperadas en el sobrenadante de los cultivos.

El sistema de síntesis y excreción de proteínas de los hongos no difiere del que poseen las levaduras o los eucariontes superiores. La diferencia importante radica en el tipo de crecimiento del micelio que resulta de la extensión polar de la

hifa. Esta forma de crecimiento no está presente en *Saccharomyces cerevisiae* o en eucariontes superiores (Bartnicki y Nickerson, 1962). Además, la capacidad para excretar proteínas es mayor en hongos filamentosos que en levaduras, por ejemplo, el rendimiento de proteína extracelular producido por ciertas cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* es alrededor de 30 g/l, comparado con 1 g/l producido por especies de levaduras como *Pichia* y *Hansenula* (Duran y Cooper, 1988). En el caso específico de producción de celulasas los hongos comparados con las bacterias celulolíticas producen altos rendimientos de proteína extracelular, por lo tanto son el grupo de microorganismos mayormente estudiados para producción de celulasas.

Cuadro 5. Hongos productores de enzimas lignocelulolíticas (Martínez Pacheco y col., 2009).

Hongos aerobios (Enzimas extracelulares)			
Grupo	Cepa fúngica	Enzimas	Sustrato
Ascomycetos	<i>Trichoderma reesei</i>	Celulasas (CMCasa, CBH, BGL), Hemicelulasas (xilanasas)	Trigo
	<i>Trichoderma harzianum</i>	Celulasas (CMCasa, CBH), β -1,3-glucanasas	Salvado de trigo, pajilla de trigo
	<i>Aspergillus niger</i>	Celulasas, Xilanasas	Bagazo de caña de azúcar
	<i>Pestalotopsis sp</i>	Celulasas (CMCasa, CBH), Lacasa	Residuos forestales de <i>Quercus variabilis</i>
Basidiomicetos	<i>P.hanarochaete chrysosporium</i>	Celulasas (CMCasa, CBH, BGL), CDH, LiP, MnP, Hemicelulasas (xilanasas)	Roble rojo, semillas de uva, cebada, viruta
	<i>Fomitopsis palustris</i>	Celulasas (CMCasa, CBH, BGL)	Celulosa microcristalina
Deuteromicetos	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Celulasas	Celulosa microcristalina
Hongos anaerobios (Celulosoma)			
Neocallimastigomicetos	<i>Anaeromyces mucronatus</i> 543	Celulasas (CMCasa), Hemicelulasas (xilanasas)	Alfalfa
	<i>Caecomyces communis</i>	Celulasas, Hemicelulasas (xilanasas, β -D-xilosidasa)	Tallos de maíz
	<i>Cyllamyces aberensis</i>	Celulasas y xilanasas	Forraje de césped
	<i>Neocallimastix frontalis</i>	Celulasas, Hemicelulasas (xilanasas, β -galactosidasa)	Fibra de algodón, pajilla de trigo
	<i>Orpinomyces</i> sp.	Celulasas (CMCasa, CBH, β -glucosidasa), Hemicelulasas (xilanasas, mannanasa)	Pajilla de Trigo
	<i>Piromyces</i> sp	Celulasas (CMCasa, CBH, β -glucosidasa), Hemicelulasas (xilanasas, mannanasas)	Tallos de maíz

CMCasa: Carboximetilcelulasas (endoglucanasas), CBH: Celobiohidrolasas, BGL: β -glucosidasas, CDH: Celobiosa deshidrogenasa, MnP: Manganeso peroxidasas, LiP: Lignina peroxidasas

Dentro de los hongos la especie más estudiada es *Trichoderma reesei* ya que produce un complejo de celulasas extracelulares que degradan celulosa nativa (Wojtczak y col., 1987), además sus enzimas son resistentes a inhibidores químicos y son estables en condiciones de reacción a 50 °C y pH de 4.8 durante

48 horas o más (Mandels y Reese, 1965). Todos los componentes del complejo celulolítico (endocelulasas, exocelulasas y β -glucosidasas) son esenciales para llevar a cabo la hidrólisis de celulosa. Sin embargo, las β -glucosidasas que catalizan la hidrólisis de celobiosa se encuentran en cantidades pequeñas o ausentes en los complejos celulolíticos extracelulares. Debido a ello se lleva a cabo una acumulación de celobiosa la cual inhibe la síntesis de endo y exocelulasas (Bisaria y Ghose, 1981). Las celulasas de *Aspergillus* usualmente presentan elevada actividad de β -glucosidasas, pero bajos niveles de endocelulasas, mientras que *Trichoderma* presenta altos niveles de endo y exocelulasas pero los niveles de β -glucosidasas se observan reducidos, esto repercute en una eficiencia limitada de la hidrólisis de celulosa. La relación de β -glucosidasas producidas con respecto a endo y exocelulasas debe ser de 2 para que se lleve a cabo un buen proceso de hidrólisis, sin embargo la relación obtenida por *T. reesei* es de 0.6 (Sternberg y col., 1977; Duff, 1985). Actualmente por esta razón la búsqueda de nuevas cepas que produzcan diferentes complejos celulolíticos sigue siendo de gran importancia actualmente.

1.5. FACTORES QUE AFECTAN LA PRODUCCIÓN DE CELULASAS

En la degradación de celulosa existen distintos factores los cuales afectan tanto en la hidrólisis como en el proceso de producción de enzimas. Estos factores pueden clasificarse en dos grupos; el primero de ellos corresponde a factores físicos como son el pH y la temperatura. El segundo agrupa a los factores químicos como por ejemplo; la fuente de carbono, fuente de nitrógeno y la concentración de algunos carbohidratos en el medio de cultivo. En proceso de fermentación algunos de estos factores presentan mayor importancia que otros dependiendo las características del microorganismo.

Los factores físicos influyen de una manera directa en los procesos de bioconversión de celulosa. El pH es un factor físico importante que afecta en la producción de celulasas ya que ha sido reportado que la producción y liberación de éstas depende del pH del medio. Este efecto ha sido analizado en cepas de *Aspergillus niger* donde fue observado que el pH 5.5 fue el óptimo para la producción máxima de celulasas. Por otra parte en *Neurospora crassa* un pH de 7 es el óptimo para la liberación al medio de las celulasas, sin embargo a un pH de 7.5 las enzimas son mantenidas dentro de la célula (Eberhart y col., 1997).

Otro de los factores físicos es la temperatura, los ensayos para determinar la actividad de celulasas se llevan a cabo en intervalos de temperatura entre 50-65°C para una variedad de cepas microbianas, por ejemplo *A. wentii*, *Penicillium rubrum*, *A. niger*, *A. ornatus* y *N. crassa* (Steiner y col., 1993; Menon y col., 1994;

Rajendran y col., 1994) Mientras que las temperaturas de crecimiento óptimo de estos microorganismos estuvo entre 25-30°C (Lykidis y col., 2007). La temperatura también ha mostrado influencia en el proceso de adsorción a la celulosa. A una temperatura de 60°C se ha observado una relación positiva entre la adsorción y la sacarificación del sustrato celulósico. Los procesos de adsorción por arriba de 60 °C disminuyen, posiblemente a la pérdida de la configuración de la enzima debida a la desnaturalización (Van-Wyk, 1997).

Dentro de los factores químicos la fuente de carbono, presenta gran importancia. Muchos sustratos tanto de origen natural como sintético han sido evaluados como fuentes de carbono para el proceso de producción de celulasas. Entre los principales sustratos celulósicos se encuentran el papel, bagazo de caña, paja de arroz, mazorca de maíz, algodón, celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa (Doppelbauer y col., 1987; Gunju y col., 1990). Por otra parte, estudios experimentales indican que la producción de celulasas incrementa proporcionalmente con el aumento en la concentración del sustrato. Esto fue observado durante las fermentaciones en estado sólido utilizando *Aspergillus niger* (Singh y col., 1990).

La fuente de nitrógeno añadida al medio de cultivo también es otro factor químico que afecta en los procesos de fermentación para la obtención de celulasas. Distintas fuentes de nitrógeno han sido analizadas como por ejemplo; sulfato de amonio, nitrato de amonio, cloruro de amonio y nitrato de potasio, todas ellas de origen inorgánico. Destaca la utilización de sulfato de amonio, el cual conduce a la producción máxima de celulasas (Singh y col., 1990) Sin embargo, otros autores reportan una disminución en la actividad de celulasas con la adición de sulfato de amonio como fuente de nitrógeno (Menon y col., 1994). Debido a ello en la optimización de las condiciones para la producción de celulasas es necesaria la exploración de distintas fuentes de nitrógeno con la finalidad de seleccionar la adecuada para el proceso de fermentación.

Otros requerimientos nutrimentales que han sido analizados son algunos carbohidratos. Por ejemplo, se ha observado mejoramiento en la producción enzimática con la adición de compuestos como glucosa, sacarosa, celobiosa y sorbosa. Cada uno en particular puede estar relacionado con procesos regulatorios en la hidrólisis de celulosa (Kumar y col., 2008) Otros nutrientes necesarios para la elaboración de los medios de cultivo fueron estudiados por Mandels en 1975, quien determinó que algunos cationes metálicos tales como Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+2} , Co^{+2} y Zn^{+2} son también necesarios para la producción de celulasas específicamente.

El modo de operación a través del cual se producen enzimas también es un parámetro específico a considerar; dos métodos son utilizados para la obtención de celulasas; la fermentación en estado líquido y la fermentación en estado sólido. El primero es el método más utilizado. En este tipo de fermentación el sustrato añadido es solubilizado o suspendido y el intervalo de concentraciones van del 0.5% al 6%, la agitación para este tipo de crecimiento es obligatoria, para

homogeneizar el medio de cultivo, lo cual incrementa los requerimientos energéticos. La fermentación en estado sólido presenta ventajas con respecto a la fermentación en estado líquido, la primera de ellas es que representa un tipo de crecimiento favorecido para hongos filamentosos ya que simula las condiciones originales en las cuales crecen los hongos. La agitación no es requerida y esto es conveniente debido a que la agitación rompe el micelio generando una disminución en la cantidad de enzima producida. Otra de las ventajas de la fermentación en estado sólido es que las concentraciones de sustrato añadidas al medio pueden ser mayores que las utilizadas en el medio líquido ($\geq 6\%$), lo cual repercute en un incremento en la producción de enzima, ya que entre mayor sea la concentración del sustrato, mayor es la producción de enzima. La recuperación del producto se lleva a cabo de una manera más fácil a diferencia del crecimiento en medio líquido. Sin embargo, cada microorganismo en particular requiere del análisis detallado de los distintos factores involucrados en la producción de enzima y los trabajos se centran principalmente en el análisis de aquellas condiciones que le sean óptimas para producirlas (Chahal, 1985; Fadel, 2001; Guerra y col., 2006; Adelin y col., 2011).

1.6. ALCANCE TECNOLÓGICO EN LA OBTENCIÓN Y DESARROLLO DE NUEVAS ENZIMAS.

En la industria de la transformación a nivel mundial se ha observado un interés creciente y una lenta tendencia positiva hacia el uso de las enzimas en los procesos químicos, como se detalló anteriormente (Peña y Gonzáles, 2008). Mas allá de argumentar que la producción de enzimas no cubre las demandas del sector, es importante comentar que, los actuales procesos industriales incluyen etapas extremas de transformación química y que en muchas ocasiones difícilmente estas se adaptan al medio y condiciones ambientales de las enzimas. Estos catalizadores debido a su naturaleza orgánica y complejidad molecular no son capaces de resistir la temperatura, acidez, oxidación, solventes orgánicos, surfactantes, iones y cofactores a los que pudieran estar expuestos y por tanto, su funcionalidad y selectividad disminuyen o se anulan ya que afectan a la estabilidad de la proteína y la actividad catalítica de la enzima, siendo este aspecto una limitante funcional y económica para su potencial uso industrial.

Por lo tanto, obtener enzimas con atributos fisicoquímicos que las hagan ser estables es una meta actual no alcanzada. Para ello se consideran al menos cuatro líneas de investigación que conduce a su obtención: 1) Diseño protéico clásico (mutagénesis); 2) Evolución dirigida (cambios nucleotídicos); 3) Modificación de las condiciones ambientales de la enzima (modificación química, soporte químico) y 4) Aislamiento de organismos y enzimas con propósitos específicos (exploración de nichos ecológicos en la búsqueda de nuevos organismos y enzimas). Los primeros tres abordajes requieren conocimiento

previo de la enzima como la estructura tridimensional, las fuerzas de interacción que afectan la estabilidad proteica, la cinética de la enzima, además de la construcción y búsqueda en banco de datos de genes y proteínas. Sin embargo, estos abordajes experimentales tienen como denominador común, que todos requieren como conocimiento básico el adquirido a través de estudiar nichos biológicos inexplorados para la obtención de nuevo organismos y de las enzimas que sintetizan.

El aislamiento de nuevas enzimas de organismos vivos que crecen y se reproducen en condiciones ambientales extremas (extremófilos), es el abordaje experimental primario en la obtención de enzimas estables. Una condición extrema ambiental de crecimiento y propagación para algunos hongos se presenta en la interacción con la planta. Muchos hongos degradan tejido vegetal, mediante la excreción de enzimas hidrolíticas, con la finalidad de obtener carbohidratos y utilizarlos para su crecimiento y reproducción. La planta, a su vez produce proteínas y metabolitos secundarios para inhibir las enzimas fúngicas como un mecanismo vegetal de defensa y resistencia. Esta presión selectiva puede conducir hacia la selección de hongos resistentes a los metabolitos secundarios de defensa vegetal y a la obtención de enzimas hidrolíticas de polisacáridos únicas.

El interés en aumentar el uso de enzimas en procesos industriales ha aumentado y motivado a investigar acerca de la estabilización de estos biocatalizadores y buscar otros nuevos con propiedades únicas tanto para incluirlos en los procesos de transformación como para aumentar la base de datos de biocatalizadores.

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN

Actualmente las celulasas tienen distintas aplicaciones a nivel industrial. La más importante es que se encuentran involucradas en procesos de bioconversión de la biomasa vegetal. Una gran variedad de hongos han sido estudiados por presentar actividad celulolítica, pero únicamente pocos son los que han producido enzimas con potencial biotecnológico. Por lo tanto, la búsqueda de microorganismos que produzcan estas enzimas es un área de oportunidad. Los hongos fitopatógenos tienen la capacidad de degradar el tejido vegetal, debido a ello son un grupo idóneo para realizar una búsqueda de cepas que produzcan celulasas.

3. HIPÓTESIS

Un aislado fúngico fitopatógeno en condiciones controladas produce celulasas.

4. OBJETIVO GENERAL

Obtener un hongo fitopatógeno que produzca celulasas.

4.1. Objetivos específicos

- 1.- Seleccionar una cepa de hongo fitopatógeno con mayor capacidad celulolítica.
- 2.-Determinar las condiciones óptimas para la obtención de celulasas del hongo seleccionado.
- 3.- Determinar parámetros fisicoquímicos de las celulasas obtenidas.

MATERIAL Y MÉTODOS

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Para la realización de este trabajo de investigación se utilizaron 26 cepas fúngicas patógenas las cuales fueron aisladas de cultivos de importancia comercial en el Estado de Michoacán, que presentaban signos de enfermedad, como son el aguacate, arándano, mango, limón persa y nuez de macadamia.

Diecinueve de estos aislados fúngicos presentados en el cuadro 6 fueron caracterizados taxonómicamente mediante pruebas bioquímicas y morfológicas. Sin embargo, siete cepas no contaban con esta caracterización por lo que se muestran únicamente sus siglas de aislamiento. Todos los aislados fúngicos fueron mantenidos en medio de cultivo papa dextrosa (PDA) a temperatura ambiente con resiembras periódicas cada 30 días.

Cuadro 6. Cepas de aislados fúngicos silvestres utilizadas para el escrutinio de la actividad celulolítica.

Cepas fúngicas caracterizadas taxonómicamente			Cepas fúngicas no caracterizadas
<i>Alternaria</i> sp.	<i>Diaporthe phascolorum</i>	<i>Pestalotia</i> sp.	ACRLM10
<i>Colletotrichum acutatum</i> 10	<i>Fusarium</i> RFMLM10	<i>Phoma</i> sp.	AOLM10
<i>Colletotrichum acutatum</i> 21	<i>Fusarium</i> CLM.01	<i>Phomopsis viticola</i> 5120	GLM 10
<i>Colletotrichum acutatum</i> 25	<i>Fusarium</i> RLM.01	<i>Phomopsis viticola</i> 5480	LPLM10
<i>Colletotrichum acutatum</i> 5446	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Rhizoctonia</i> sp.	MLM10
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Trichoderma</i> sp.	RMLM10
<i>Colletotrichum cepa</i> NLM.01	<i>Helminthosporium</i> sp.		

5.2. MEDIOS DE CULTIVO

5.2.1. Agar papa dextrosa (PDA)

Se utilizaron 39 g de medio agar papa dextrosa (bioxon) y se disolvieron en 1 litro de agua destilada, se calentó hasta alcanzar la ebullición y finalmente se esterilizó en autoclave.

5.2.2. Medio sólido con fuente de carbono carboximetilcelulosa (CMC) para la determinación de la actividad celulolítica (Mandels, 1975).

El medio de cultivo fue preparado con agua desionizada, la mitad del volumen de agua utilizada sirvió para disolver las cantidades correspondientes de agar y CMC colocándose directamente en el fuego y agitando vigorosamente hasta que se encuentran totalmente disueltos todos los componentes, posteriormente la mezcla se esterilizó en autoclave. La otra mitad del volumen fue utilizada para disolver todos los microelementos, vitaminas y triton X-100 presentados en el cuadro 7, el pH de esta disolución se ajustó a un valor de 5 y se esterilizó por filtración utilizando una membrana de nylon Millipore con un tamaño de poro de 0.2 μm . Cuando las dos preparaciones se encontraban esterilizadas, se colocaron juntas dentro de la campana de flujo laminar, agitando perfectamente para homogeneizar la preparación. Finalmente el medio se colocó en cajas petri.

Cuadro 7. Componentes del medio de cultivo utilizado para la realización del protocolo de tinción con rojo congo.

Reactivo	(g/l en agua desionizada)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.4
Urea	0.3
KH_2PO_4	2
CaCl_2	0.3
$\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.005
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.016
$\text{ZnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.014
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.002
Solución de vitaminas 100 X	25 $\mu\text{l/l}$
Tritón-X- 100	1ml/l
CMC	1g por cada 100 ml de medio
Agar	1.5 g por cada 100 de medio

5.2.3. Medio mínimo líquido

Este medio contiene todos los componentes del cuadro 7, a excepción de agar y triton x-100. Las fuentes de carbono añadidas para cada caso fueron celulosa microcristalina tipo 20, celulosa microcristalina tipo 101 y CMC.

Cuadro 8. Componentes del medio de cultivo mínimo líquido.

Reactivo	(g/l en agua desionizada)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.4
Urea	0.3
KH_2PO_4	2
CaCl_2	0.3
$\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.005
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.016
$\text{ZnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.014
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.002
Solución de vitaminas 100 X	25 $\mu\text{l/l}$
*Fuente de carbono	1g por cada 100 ml de medio

*Celulosa microcristalina
tipo 20

*Celulosa microcristalina
tipo 101

*CMC

Se prepara la mitad del volumen del medio de cultivo disolviendo los microelementos presentados en el cuadro anterior, (a excepción de la fuente de carbono) en agua desionizada y se esteriliza la disolución mediante filtración utilizando una membrana de nylon Millipore con un tamaño de poro de 0.2 μm . Posteriormente con la mitad restante del volumen de agua se disuelve la fuente de carbono, según sea el caso y se esteriliza en autoclave por 15 minutos. Cuando las dos preparaciones se encuentran esterilizadas, en un área estéril se homogenizan lentamente y el volumen necesario se vacía en matraces previamente estériles.

Los medios de cultivo fueron inoculados con un propágulo de micelio tomado a partir de cajas de cultivo con medio PDA de 7 días de crecimiento. Posteriormente a la inoculación fueron mantenidos en agitación continua a una velocidad de 120 rpm a temperatura ambiente.

5.2.4. Medio mínimo sólido

Este medio de cultivo fue utilizado para llevar a cabo las fermentaciones en estado sólido. Se utilizó como sustrato algodón comercial en una concentración de 1%. El algodón fue humectado con una solución salina constituida por los microelementos presentados en el cuadro 8 a excepción de la fuente de carbono, la cual fue sustituida por algodón.

Otros sustrato sólidos utilizados fueron la celulosa tipo 20 y tipo 101, para ambos casos la concentración utilizada fue de 1% y de la misma manera como se detalló anteriormente se humectó a la celulosa con solución nutritiva.

También se llevó a cabo una combinación de los sustratos sólidos, algodón y celulosa, como se presenta en el cuadro 9, donde se presentan todos los tratamientos realizados.

Cuadro 9. Condiciones de crecimiento en medio sólido

Tratamiento	Concentración %
Celulosa microcristalina tipo 20	1
Celulosa microcristalina tipo 101	1
Algodón	1
Celulosa microcristalina tipo 20 y Algodón.	Ambas al 1
Celulosa microcristalina tipo 101 y Algodón	Ambas al 1

Los cultivos fueron preparados en cajas de petri de vidrio donde se pesaron previamente las cantidades requeridas de sustrato sólido de cada tratamiento y de esta manera fueron esterilizadas en autoclave durante 15 minutos. De manera paralela se preparó la cantidad necesaria de solución nutritiva y se esterilizó mediante filtración utilizando un sistema de vacío y una membrana millipore de 0.2 μm de tamaño de poro. Cuando las cajas y la solución nutritiva se encontraban esterilizadas, en condiciones asépticas, se colocó el volumen necesario de solución nutritiva para humectar los sustratos sólidos y se homogeneizó perfectamente.

Los medios de cultivo preparados fueron inoculados con un propágulo de micelio tomado a partir de cultivos del hongo en medio PDA de 7 días de crecimiento. Los cultivos fueron incubados sin agitación y a temperatura ambiente.

5.3. ESCRUTINIO PARA LA SELECCIÓN DE AISLADOS FÚNGICOS CON MAYOR CAPACIDAD CELULOLÍTICA. (Sazci y col. 1986)

5.3.1 Determinación de la actividad celulolítica mediante la técnica de tinción utilizando el colorante rojo congo

Se inocularon cajas conteniendo medio CMC con un propágulo de micelio de aproximadamente 0.5 cm por lado, cada uno de los 26 aislados fúngicos fue sometido al mismo tratamiento. Las placas fueron mantenidas en incubación a temperatura ambiente y en oscuridad durante 2 y 5 días.

Después del tiempo de incubación (2 o 5 días), las placas conteniendo medio CMC fueron inundadas con 5 ml de una disolución de colorante rojo congo

a una concentración de 0.1% y agitadas a 50 rev/min durante 15 minutos. Posteriormente la disolución de rojo congo fue retirada, y se añadió a las placas una disolución 1M de NaCl y se agitaron nuevamente a la misma velocidad durante 15 minutos, la disolución fue retirada y por último para detener el crecimiento fúngico, fueron añadidos 5 ml de una solución 1M de HCl.

Los datos obtenidos fueron analizados de la siguiente manera; se tomó la medida, del diámetro de la colonia antes de llevar a cabo la tinción como se observa en la figura 7 inciso (a). Después de llevar a cabo la tinción fue reportado el diámetro de degradación como se detalla en la figura 7 inciso (b). Ambos diámetros fueron reportados en cm y se relacionaron mediante un cosciente al cual se denominó índice celulolítico, la fórmula utilizada se presenta en la figura 7.

5.3.2 Crecimiento en medio líquido de aislados fúngicos

Se prepararon 30 ml de medio líquido que contenía como fuente de carbono CMC en matraces erlenmeyer de 50 ml. Se inocularon con un propágulo de micelio y se dejaron incubar a temperatura ambiente y 120 rpm en un incubador durante 5 días, terminado el periodo de incubación cada cultivo fue filtrado con la ayuda de un sistema de filtración y papel filtro Wathman 42, el procedimiento se repitió 2 veces para eliminar biomasa y medio de cultivo, el filtrado obtenido fue almacenado a 0 °C y fue utilizado para determinar la actividad enzimática.

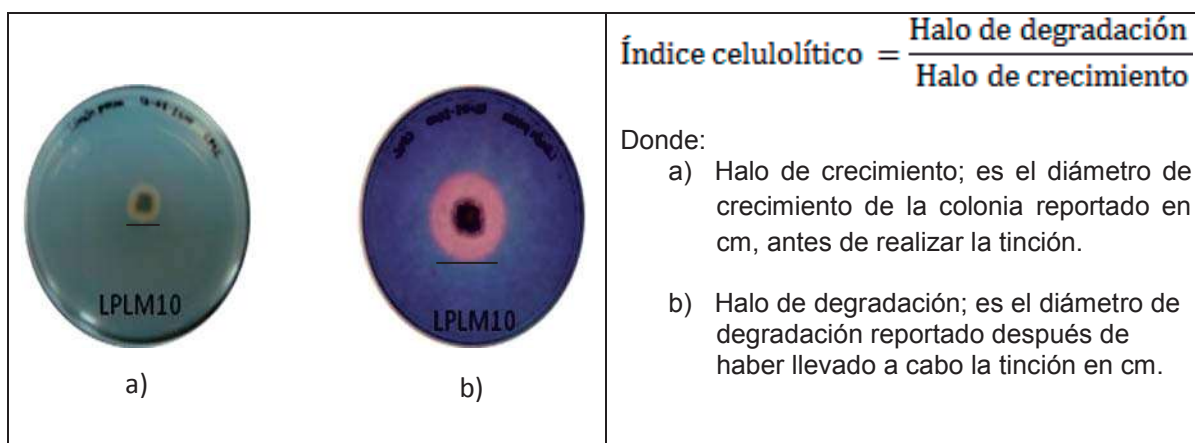


Figura 7. Determinación del índice celulolítico a partir de los resultados obtenidos mediante la tinción con el colorante rojo congo

5.3.3. Análisis de correspondencia para la selección del aislado fúngico

Para realiza el análisis de correspondencia la tabla de frecuencias utilizada se conforme de 6 columnas y 12 filas. Las columnas estuvieron conformadas por

los resultados obtenidos de las variables de respuesta medidas en crecimiento líquido. Las variables de respuesta analizadas fueron: 1) producción de β -glucosidasas; 2) producción de endocelulasas; 3) producción de exocelulasas; 4) proteína extracelular; 5) índice celulolítico y 6) crecimiento. Las filas estuvieron conformadas por los 12 aislados fúngicos analizados en el escrutinio (Cuadro 10). Esta matriz de datos posteriormente fue analizada utilizando el paquete estadístico Statistic versión 7.0, con la aplicación de análisis de multivariantes.

Cuadro 10. Matriz de datos utilizada para el análisis estadístico de correspondencia. Las columnas están conformadas por las variables de respuesta y las filas corresponden a cada aislado fúngico analizado.

FILAS	COLUMNAS					
Aislados fúngicos (1 al 12)	β -glucosidasas	Endo-celulasas	Exo-celulasas	Proteína extracelular	Índice celulolítico	Crecimiento

5.4. CUANTIFICACIÓN ENZIMÁTICA

5.4.1 Determinación del contenido de proteína total por el método de Lowry

Para la determinación del contenido de proteína se utilizó el método descrito por Lowry y col., 1951 en el cual se utilizaron las siguientes disoluciones:

A	3% de Na_2CO_3 en NaOH 0.2 M en agua desionizada
B	4% de citrato de sodio en agua desionizada
C	2% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en agua desionizada

Se preparó una mezcla de las disoluciones anteriormente mencionadas a la que se le llamó disolución D, en una proporción de 48:1:1 con el siguiente orden de adición:

1.-0.5 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

2.-0.5 ml de Citrato de Sodio

3.- 24 ml de Na_2CO_3 en NaOH 0.2 M

La mezcla de reacción para cuantificar la cantidad de proteína se encontraba conformada de la siguiente forma: 100 μl de extracto enzimático y 900 μl de disolución D los cuales fueron incubados durante 10 minutos en oscuridad,

posteriormente se adicionaron 50 μ l del reactivo Folin-Ciocalteu's a cada una de las muestras y se incubó durante 25 minutos, al término del tiempo las muestras fueron leídas en espectrofotómetro a una longitud de onda de 640 nm.

Los datos obtenidos fueron correlacionados con una curva patrón de proteína realizada previamente en donde la ecuación de la recta obtenida fue utilizada para determinar el contenido de las muestras problema analizadas. Como estándar se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) en un intervalo de concentración de 1 a 100 μ g/ml (Figura 8).

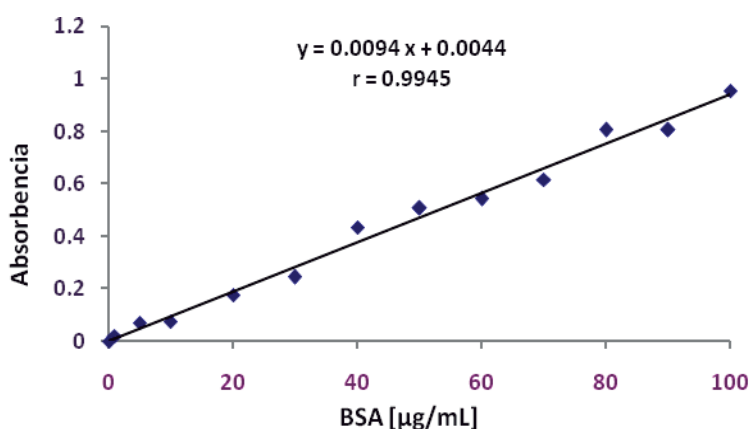


Figura 8. Curva de calibración para la cuantificación de proteína mediante el método de Lowry.

5.4.2. Cuantificación de la actividad específica de celulasas

5.4.2.1. β - Glucosidasas

Para determinar la actividad de β -glucosidasas se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 20 μ l de extracto enzimático, 100 μ l de p -nitrofenil β -D-glucopiranosido (PNPG de Sigma St. Louis Mo.) 5 mM en 890 μ l de buffer de acetato de sodio (0.2 M) a un pH de 4.5, se incubó durante 20 min en baño maría (Felisa) a 60°C y después de este tiempo se detuvo la reacción con la adición de 700 μ l de Na₂CO₃ 1M, finalmente se midió la absorbencia de la muestra en espectrofotómetro a una longitud de onda de 400 nm. Los datos obtenidos de absorbencia fueron correlacionados con una curva de calibración de p -nitrofenilo. La curva de calibración fue realizada en un intervalo de concentración de 100 a 600 μ g de p -nitrofenilo (Figura 9).

La actividad específica de β -glucosidasas fue reportado como U/ μ g de la siguiente manera:

$$\text{Actividad específica} = \frac{U}{\mu\text{g de proteína}} \quad \text{Donde} \quad U = \frac{\mu\text{g de } p\text{-nitrofenilo liberado}}{\text{minuto}}$$

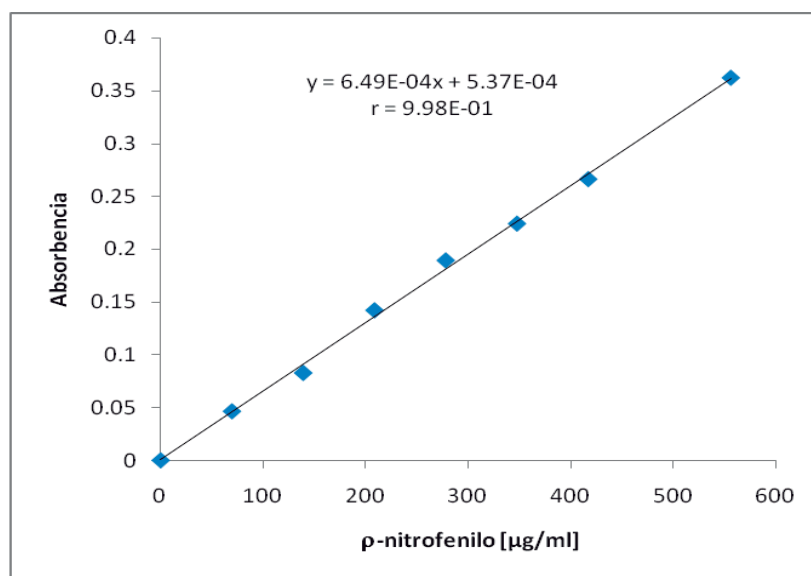


Figura 9. Curva de calibración de p -nitrofenilo utilizada para la cuantificación de β -glucosidasas

5.4.2.2. Endocelulasas

La mezcla de reacción estuvo compuesta por 40 μ l de extracto enzimático, 400 μ l de carboximetil celulosa (CMC) al 1% disuelta en buffer de acetatos a un pH de 5.0, se incubó por 2.5 h en un baño térmico (Felisa) a 45° C. Se adicionaron 600 μ l de reactivo ácido dinitrosalicílico (DNS de Sigma St. Louis Mo) y los tubos se incubaron en ebullición durante 15 min, se dejaron enfriar y la absorbencia fue medida a una longitud de onda de 640 nm (Habu y col. 1997).

Los datos obtenidos fueron correlacionados con una curva de calibración de glucosa realizada mediante el método de DNS. La actividad enzimática fue reportada como U/ μ g

$$\text{Actividad específica} = \frac{U}{\mu\text{g de proteína}} \quad \text{Donde} \quad U = \frac{\mu\text{g de glucosa producida}}{\text{minuto}}$$

5.4.2.3 Exocelulasas

Para la determinación de exocelulasas se utilizó la siguiente mezcla de reacción; 80 µl de extracto enzimático, 100 µl de Avicel (de Merck) al 3% con 260 µl de regulador de acetato de sodio 50 mM a un pH de 5.0. La mezcla de reacción fue incubada durante 6 h en un baño térmico (Felisa) a 50°C. Al término del periodo de incubación se adicionaron 600 µl de reactivo DNS (de Sigma St. Louis Mo), los tubos se incubaron en ebullición durante 15 min, se dejaron enfriar y la absorbencia fue determinada en espectrofotómetro a 640 nm. Los datos obtenidos fueron correlacionados con una curva de calibración de glucosa mediante la metodología DNS reportada por Habu y col. 1997. La actividad enzimática fue reportada como U/µg:

$$\text{Actividad específica} = \frac{U}{\mu\text{g de proteína}} \quad \text{Donde} \quad U = \frac{\mu\text{g de glucosa producida}}{\text{minuto}}$$

5.4.2.4 Método para cuantificar glucosa utilizando el reactivo DNS.

Para llevar a cabo la cuantificación de glucosa se utilizó el método de DNS el cual consiste en la preparación del reactivo compuesto de la siguiente manera:

Componente	Gramos por litro de agua
Tartrato de Sodio y potasio	200
Hidróxido de Sodio	20
Ácido dinitro-salicílico	10
Fenol	2
Sulfito de Sodio	0.5

Posteriormente se prepararon disoluciones estándar de glucosa en un intervalo de concentración de 1 a 5 mM (180 – 900 µg). De cada disolución se tomaron 100 µl los cuales fueron transferidos a tubos eppendorf que contenían 1 ml de reactivo DNS y fueron colocados en baño maría a 100°C durante 15 min, las muestras se dejaron enfriar y se realizó la lectura espectrofotométrica a 640 nm para obtener una curva de calibración de glucosa cuya ecuación de la recta fue utilizada para determinar la concentración de glucosa de las muestras problema (Figura 10). (Bernfeld, 1955; Miller, 1959).

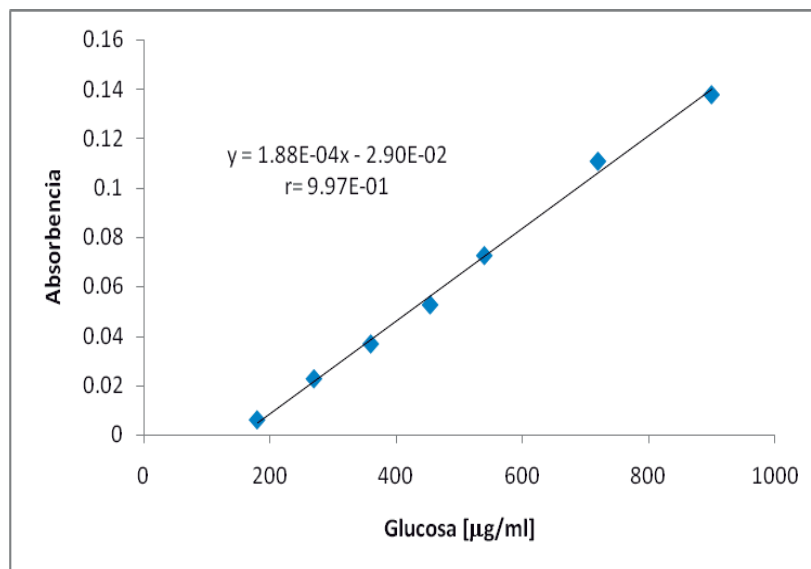


Figura 10. Curva de calibración de glucosa utilizada para la cuantificación endo y exocelulasas

5.5. DETERMINACIÓN TAXONÓMICA DEL AISLADO FÚNGICO LPLM10

5.5.1. Aislamiento de DNA y amplificación de ITS del aislado fúngico LPLM10

Para la determinación taxonómica del aislado fúngico se llevó a cabo el aislamiento del DNA total con la finalidad de amplificar y secuenciar las regiones ITS (espaciadores de transcripción interna) del aislado fúngico.

El aislado fúngico fue crecido en medio sólido PDA cubierto de un disco de papel celofán durante 5 días, se separó cuidadosamente el micelio, el cual fue utilizado para la extracción de DNA total utilizando el kit DNeasy Plant, siguiendo las especificaciones de los fabricantes.

Posteriormente se determinó la pureza del DNA obtenido mediante la elaboración de un gel de agarosa al 1 % utilizando una cámara de electroforesis de 100 volts durante 15 min.

La amplificación por PCR de los ITS a partir del DNA obtenido se realizó utilizando los oligonucleótidos universales *its4* (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e *its5* (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'), específicos para hongos. El volumen final de la mezcla de reacción de PCR fue de 25 µl y fue llevada a cabo con las condiciones presentadas en el cuadro 11 y 12.

Los amplificados obtenidos fueron corridos en un gel de agarosa al 1 % utilizado como control una mezcla de oligos sin DNA, marcador de 100 pares de

bases y la muestra problema. El amplificado obtenido fue escindido del gel de poliacrilamida y purificado para su posterior secuenciación.

Cuadro 11. Condiciones de PCR para llevar a cabo la amplificación de las secuencias de ITS

Reactivo	(μ l)
Volumen final 25 μl	
H ₂ O	14.7
Regulador 10X	2.5
MgCl ₂ 50 mM	2
dNTP's 10 μ M	0.5
Oligo 10 μ M Directo ITS5	2
Oligo 10 μ M Reverso ITS4	2
Taq Invitrogen 500 5U/ μ l	0.3
DNA de c/u muestra	1

Cuadro 12. Condiciones del termociclador utilizadas para llevar a cabo la reacción de PCR

Etapa	Temperatura °C	Tiempo (seg)	No. de ciclos
Desnaturalización	94	300	1
Desnaturalización	94	40	
Alineamiento	55	40	40
Extensión	72	40	
Extensión final	72	600	1

5.5.2. Análisis filogenético del aislado fúngico LPLM10

Las secuencias ITS obtenidas fueron comparadas con la base de datos NCBI con la finalidad de encontrar secuencias homólogas utilizando el programa de alineamiento BLAST. Se seleccionaron las secuencias de DNA que presentaron valores mayores al 97% de homología con respecto a LPLM10 y fueron alineadas utilizando el programa CLUSTAL X2. Este alineamiento fue utilizado para elaborar un árbol filogenético mediante el método neighbor-joining.

5.6. SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA PRODUCCIÓN DE CELULASAS

5.6.1. Variación en las condiciones de crecimiento

Para determinar las condiciones de crecimiento óptimas se llevaron a cabo dos formas distintas de crecimiento una en medio líquido y otra en medio sólido. Los medios de cultivo fueron preparados de acuerdo con los apartados anteriormente descritos para medio líquido (Sección 2.3) y medio sólido (Sección 2.4) y se utilizaron los tratamientos descritos en el cuadro 13.

Cuadro 13. Tratamientos utilizados para determinar la condición de crecimiento óptima para la producción de celulasas

Medio líquido	Medio sólido
-Celulosa tipo 20	-Celulosa tipo 20
- Celulosa tipo 101	-Celulosa tipo 101
	-Algodón
	- Algodón + Celulosa tipo 20
	-Algodón + Celulosa tipo 101

La toma de muestra en medio líquido fue realizada de la siguiente manera; cada 12 h fue tomada una alícuota de 1 ml la cual fue centrifugada durante 5 minutos a 3000 rpm, para separar los residuos de celulosa y biomasa, posteriormente el extracto fue colectado y congelado a 0 °C para sus posteriores análisis enzimáticos. Los datos obtenidos fueron utilizados para realizar curvas del curso temporal de las actividades enzimáticas.

Para el caso de crecimiento en medio sólido la muestra fue tomada de la siguiente forma; a partir de 10 días de incubación, cada dos días fue colectado un cultivo de crecimiento el cual fue filtrado como primer paso con un embudo de vidrio y papel filtro de poro amplio, el filtrado obtenido fue nuevamente filtrado utilizando un sistema de filtración con membrana millipore de poro de 0.2 µm. El extracto obtenido fue congelado a 0 °C para su posterior análisis enzimático.

5.6.2. Variación de las fuentes de Nitrógeno para la obtención de celulasas

Se seleccionó la condición de crecimiento sólido para la obtención de celulasas y a partir de esta forma de crecimiento se analizó la adición de diferentes fuentes de nitrógeno, las cuales se presentan en la cuadro 14, las

concentraciones añadida fueron determinadas en base a la cantidad de nitrógeno añadida inicialmente al medio de cultivo.

El medio de cultivo se preparó de acuerdo con las especificaciones de la sección 2.4, la diferencia radicó en que las fuentes de nitrógeno, urea y sulfato de amonio fueron sustituidas por cada una de las concentraciones del cuadro 14. Los cultivos fueron inoculados con un propágulo de micelio. Al día 18 de crecimiento se tomó muestra de cada uno de los cultivos para determinar la actividad de celulasas.

Cuadro 14. Fuentes de nitrógeno analizadas en medio de cultivo sólido para la producción de celulasas.

Fuente de Nitrógeno	Concentración (g/l)
Nitrato de amonio	1.098
Nitrato de potasio	3.131
Sulfato de amonio	2.04
Urea	0.93
Arginina	1.34

5.6.3. Experimento ortogonal

Para llevar a cabo la determinación de las condiciones óptimas de producción de celulasas se desarrolló un experimento ortogonal Taguchi L9, en éste estudio 4 factores fueron analizados en 3 distintos niveles como se muestra en el cuadro 15.

El número de corridas realizadas fueron 9 y la matriz utilizada para llevar a cabo el diseño experimental se presenta en el cuadro 16 conformado por 4 filas correspondientes a los factores y tres filas que corresponden a los niveles.

Todas las corridas fueron llevadas a cabo utilizando un medio de cultivo sólido y fueron incubados durante 18 días de crecimiento. Posteriormente al periodo de incubación los medios de cultivo fueron filtrados dos veces utilizando primero papel filtro de poro medio, posteriormente papel Wathman 42 y el extracto enzimático obtenido fue almacenado a 0°C.

Cuadro 15. Factores y niveles analizados en el experimento ortogonal Taguchi L9

Factores	Niveles		
	1	2	3
Algodón (%)	1	2	3
Celulosa tipo 20 (%)	1	2	3
Fuente de nitrógeno (%)	3.3	1.65	6.6
Inóculo	1	2	3

Cuadro 16. Matriz de experimentos del diseño ortogonal Taguchi L9.

Número de corrida	Niveles			
	Algodón	Celulosa tipo 20	Fuente de Nitrógeno	Inóculo
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

5.7. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DE CELULASAS

5.7.1. Determinación de temperatura óptima

Para la determinación de la temperatura óptima β -glucosidasa, endo y exocelulasas fueron analizadas en un intervalo de ocho diferentes temperaturas; 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80°C

5.7.2. Estabilidad térmica

Para el caso de β -glucosidasas el extracto enzimático fue ensayado en cuatro diferentes temperaturas; 50°C, 60°C, 70°C y 80°C durante 10 min. Al término del periodo de incubación fue determinada la actividad enzimática residual.

Para endo y exocelulasas el extracto enzimático fue sometido en tres diferentes temperaturas; 60°C, 70°C y 80°C durante 10 min. Posteriormente al periodo de incubación se cuantificó la actividad enzimática residual.

5.7.3. Determinación de pH óptimo

Para determinar el efecto del pH sobre la actividad de las β -glucosidasas se utilizó un buffer de acetatos 5 mM con los siguientes valores de pH de 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 y 6.0. Para la determinación del efecto del pH sobre la actividad de endo y exocelulasas se utilizó un buffer de acetatos 50 mM con los siguientes valores de pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 y 6.0.

5.7.4. Concentración de sustrato

Para determinar el efecto del sustrato sobre la actividad de β -glucosidasas, se ensayaron varias concentraciones del sustrato p -NPGP; 0.01, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 (mM).

Para determinar el efecto del sustrato sobre la actividad de endocelulasas, se ensayó un intervalo de concentración del sustrato CMC; las cuales fueron 0.01, 0.1, 1 y 10 %.

Para determinar el efecto del sustrato sobre la actividad de exocelulasas, se probaron distintas concentraciones de avicel; 0.1, 1, 2, 3, 4 y 5.

5.7.5. Determinación de K_m y V_{max} aparentes.

Para la determinación de las constantes cinéticas aparentes de las celulasas obtenidas se utilizaron los datos del análisis de diferentes concentraciones de sustrato descritas en el apartado anterior, y se graficaron los inversos de las concentraciones de sustrato contra el inverso de la actividad enzimática obtenida y las constantes cinéticas se obtuvieron mediante el método Lineweaver-Burk.

5.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se representan como la media $\pm$ desviación estándar, se realizó una prueba de comparación de medias Tukey ($p=0.01$) con el paquete

estadístico Statistic versión 7.0 para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1 SELECCIÓN DEL AISLADO FÚNGICO CON MAYOR CAPACIDAD CELULOLÍTICA.

6.1.1. Protocolo de tinción; rojo congo.

Para llevar a cabo la primera fase experimental del escrutinio se realizó la técnica de colorante rojo congo reportada por Sazci y col en 1987 para determinar actividad celulolítica de aislados fúngicos debido a que es una técnica de fácil manejo y que nos ayuda a trabajar con un número considerable de hongos.

El protocolo inicialmente reportaba las condiciones presentadas en la figura 11 (tratamiento a y c) para llevar a cabo la tinción. De acuerdo con las especificaciones iniciales de los autores llevamos a cabo modificaciones en la técnica para adecuarla con respecto a nuestras necesidades experimentales. Primero se ensayaron diferentes combinaciones de factores y modificamos las concentraciones de colorante añadidas, con la finalidad determinar el tratamiento idóneo para llevar a cabo la visualización de las zonas de hidrólisis. Los tratamientos llevados a cabo se presentan en la figura 11, donde claramente se observa que el mejor tratamiento donde se generaron halos de degradación más visibles fue en el tratamiento D utilizando una disolución de colorante al 0.1%, una concentración diez veces menor a la reportada por lo autores, además de la utilización de HCl con la finalidad hacer virar la tonalidad del colorante y observar de mejor manera las zonas de hidrólisis. Estas condiciones fueron utilizadas para llevar a cabo los tratamientos con los 26 aislados fúngicos utilizados en el escrutinio.

Un segundo aspecto analizado fue el tiempo de incubación de los aislados fúngicos, debido a que cada cepa utilizada tiene una velocidad de crecimiento diferente se llevó a cabo la tinción a dos periodos de incubación los cuales fueron 3 y 5 días. En la figura 12 se presentan imágenes representativas llevadas a cabo en los diferentes tiempos analizados. Claramente se puede observar que cada aislados fúngico presentó una velocidad de crecimiento diferente por lo tanto con la finalidad de establecer un tiempo en el cual todos alcanzaran al menos un crecimiento mínimo se seleccionó el día 5 para poder llevar a cabo la tinción.

Con la adecuación de las condiciones para llevar a cabo la visualización de las zonas de hidrólisis se procedió a analizar cada uno de los aislados fúngicos por separado como se muestra la figura 13. donde se presentan imágenes representativas de las tinciones llevadas a cabo de los 26 aislados fúngicos.

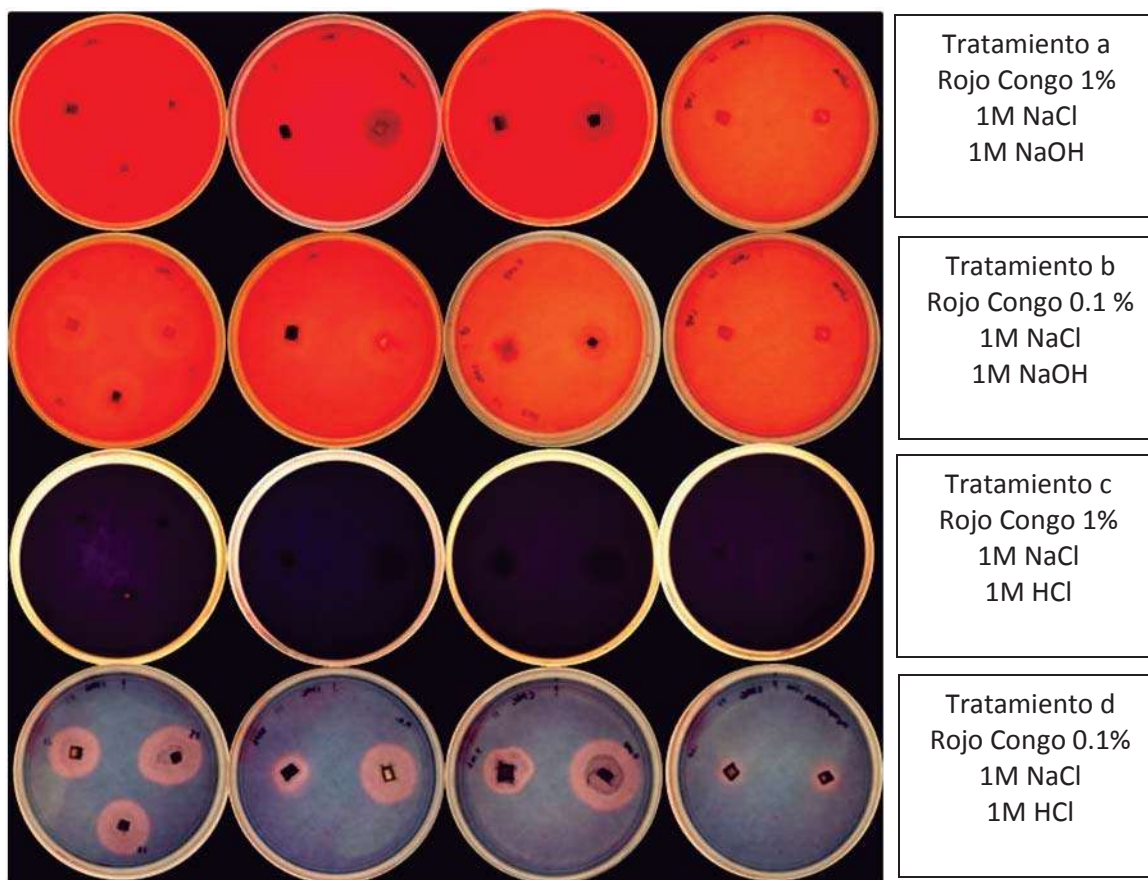


Figura 11. Modificaciones experimentales realizadas al protocolo de tinción rojo congo reportado por Saczi y col 1987. Las condiciones reportadas corresponden a los tratamientos A y C. Las modificaciones realizadas se presentan en los tratamientos B y D donde se redujo la concentración de colorante de 1% al 0.1%. Las tinciones fueron realizadas al quinto día de incubación.

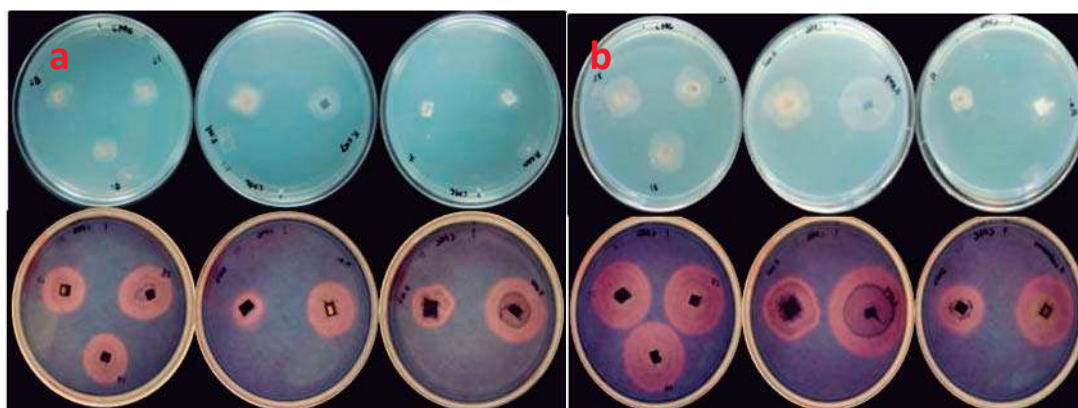


Figura 12. Tinciones de placas con medio mínimo CMC inoculadas con diferentes aislados fúngicos. En la parte superior se presenta el crecimiento observado antes de llevar a cabo la tinción y en la parte inferior se presentan los halos de degradación observados después de llevar a cabo la tinción; (a) tres días de incubación; (b) 5 días de incubación

Posteriormente con los datos obtenidos se determinó el índice celulolítico y los resultados se presentan en la cuadro 17. Todos los aislados fúngicos estudiados presentaron la condición de un índice celulolítico mayor a 1 lo que indica que hidrolizan el polisacárido y en consecuencia excretan enzimas celulolíticas. Debido a que todos presentaron IC mayor a uno se seleccionaron aquellos que presentaran un índice celulolítico mayor a 1.5, lo cual, indica que el halo de degradación es 50 % mayor comparado con el halo de crecimiento.

Otra consideración para llevar a cabo la selección de aislados fúngicos es que fueran de diferentes especies para tener un panorama amplio en este estudio e incluir a distintas especies para enriquecer el escrutinio. Un ejemplo fue las diferentes cepas de *Colletotrichum acutatum* analizadas en este estudio en orden decreciente cada una de las especies presentaron los siguientes resultados; *C. acutatum* 10 IC = 1.815 ± 0.161 , *C. acutatum* 21 IC = 1.711 ± 0.239 , *C. acutatum* 5446 IC = 1.711 ± 0.088 y por último *C. acutatum* 25 IC = 1.692 ± 0.191 . Como se puede observar las 4 especies analizadas presentan resultados estadísticamente similares por lo tanto para incluir una sola especie se optó por seleccionar la que tuviera el IC numéricamente mayor, el cual fue *C. acutatum* 10. De igual manera se realizó la selección para especies de *Fusarium* las cuales presentaron los siguientes valores de IC en manera descendente *F. oxysporum* IC = 1.771 ± 0.246 , *Fusarium* RMLM10 IC = 1.714 ± 0.099 , *Fusarium* RLM01 IC = 1.512 ± 0.061 , *F. solani* IC = 1.327 ± 0.180 , *Fusarium* CLM01 IC = 1.285 ± 0.202 de igual manera que el caso anterior se seleccionó el que tuviera el valor numérico mayor el cual fue *F. oxysporum*.

De acuerdo con los dos parámetros de selección anteriormente mencionados en el cuadro 17, indicados por un asterisco se presentan las cepas fúngicas seleccionadas. De un total de 26 aislados fúngicos iniciales se seleccionaron únicamente 15, los cuales fueron sometidos a un segundo parámetro de selección el cual fue el crecimiento generado en medio líquido, el cual se detalla en el siguiente apartado.

6.1.2. Crecimiento en medio líquido de aislados fúngicos

De los 15 aislados fúngicos seleccionados tres de ellos no presentaron un buen crecimiento en medio líquido por lo tanto fueron excluidos dentro del análisis de actividad celulolítica en medio líquido, estos aislados fúngicos fueron; *Helminthosporium* sp., *Phomopsis viticola* 5480 y MLM10, por lo tanto el grupo de aislados seleccionados se redujo a 12.

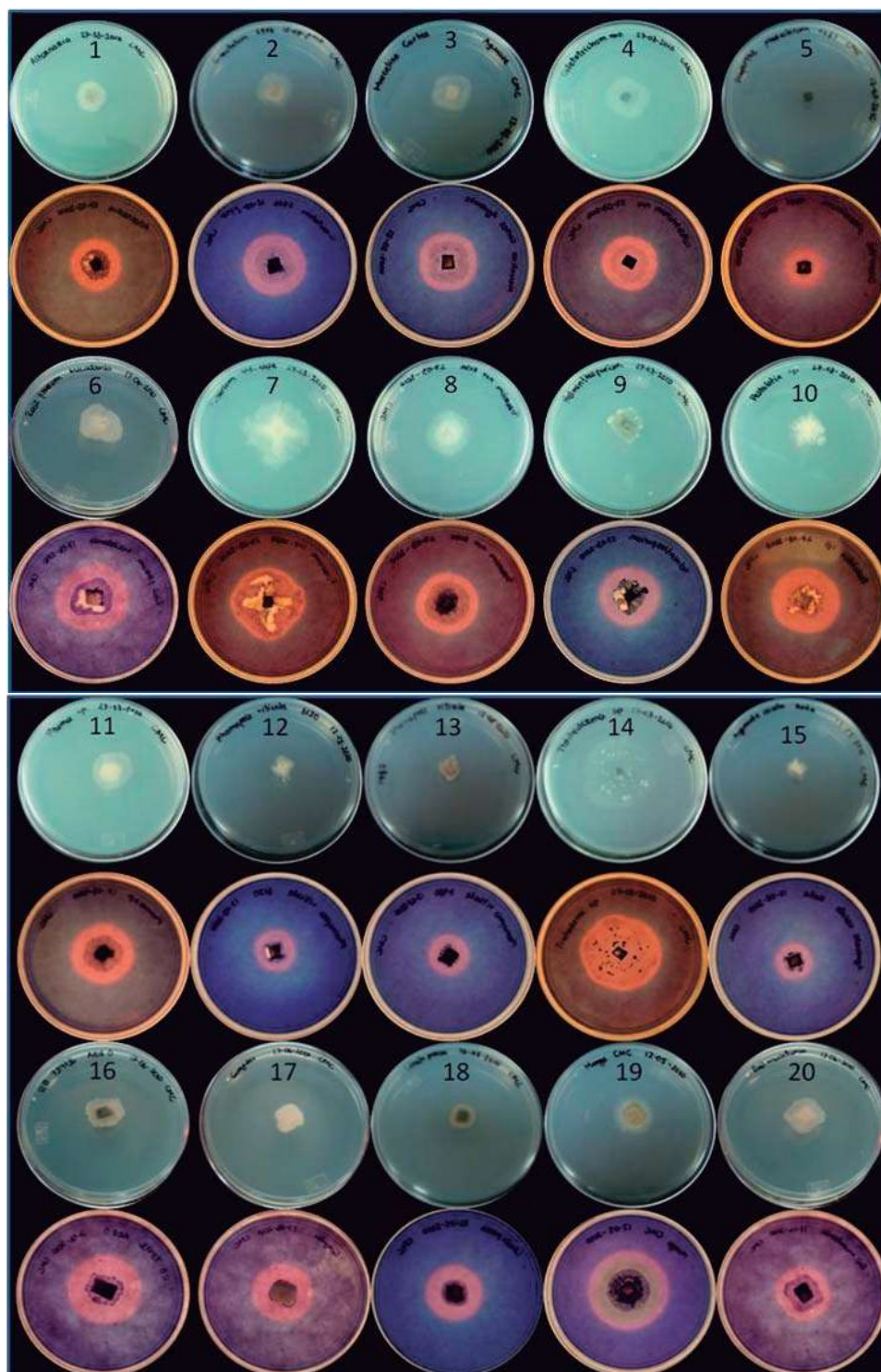


Figura 13. Imágenes representativas de las tinciones con diferentes aislados fúngicos; (1) *Alternaria* sp.; (2) *C. acutatum* 5446; (3) *C. gloeosporioides*; (4) *Colletotrichum* cepa NLM.01; (5) *Diaporthe phascolorum*; (6) *Fusarium* RFMLM10; (7) *Fusarium* CLM.01; (8) *Fusarium* RLM.01; (9) *Helminthosporium* sp.; (10) *Pestalotia* sp.; (11) *Phoma* sp.; (12) *P. viticola* 5120; (13) *P. viticola* 5480; (14) *Trichoderma* sp.; (15) ACRLM10; (16) AOLM10; (17) GLM 10; (18) LPLM10; (19) MLM10; (20) RMLM10.

Cuadro 17. Actividad celulolítica de aislados fúngicos. Valores de los índices celulolíticos obtenidos a partir de la tinción con el colorante rojo congo. Los resultados son el promedio de tres repeticiones $\pm$ desviación estándar.

Aislado fúngico patógeno	Índice celulolítico	Aislado fúngico patógeno	Índice celulolítico
GLM10 *	2.556 $\pm$ 0.123	<i>Fusarium</i> RMLM10	1.714 $\pm$ 0.099
AOLM10 *	2.520 $\pm$ 0.171	<i>Phoma</i> sp. *	1.713 $\pm$ 0.053
<i>Helminthosporium</i> sp. *	2.410 $\pm$ 1.306	<i>Colletotrichum acutatum</i> 21	1.711 $\pm$ 0.239
<i>Phomopsis viticola</i> 5480 *	2.078 $\pm$ 0.200	<i>Colletotrichum acutatum</i> 5446	1.711 $\pm$ 0.088
LPLM10 *	2.024 $\pm$ 0.191	<i>Colletotrichum acutatum</i> 25	1.692 $\pm$ 0.191
ACRLM10 *	2.014 $\pm$ 0.138	<i>Pestalotia</i> sp. *	1.673 $\pm$ 0.302
<i>Phomopsis viticola</i> 5120 *	2.012 $\pm$ 0.047	<i>Colletotrichum</i> NLM01	1.613 $\pm$ 0.071
<i>Rhizoctonia</i> sp. *	2.007 $\pm$ 0.137	<i>Fusarium</i> RLM01	1.512 $\pm$ 0.061
MLM10 *	1.958 $\pm$ 0.125	<i>Colletotrichum gloeosporoides</i>	1.482 $\pm$ 0.043
<i>Alternaria</i> sp. *	1.822 $\pm$ 0.096	<i>Diaporthe phascolorum</i> 4661	1.330 $\pm$ 0.133
<i>Colletotrichum acutatum</i> 10 *	1.815 $\pm$ 0.161	<i>Fusarium solani</i>	1.327 $\pm$ 0.180
RMLM10 *	1.813 $\pm$ 0.052	<i>Fusarium</i> CLM01	1.285 $\pm$ 0.202
<i>Fusarium oxysporum</i> *	1.771 $\pm$ 0.246	<i>Trichoderma</i> sp.	1.186 $\pm$ 0.065

*Los asteriscos corresponden a los aislados fúngicos seleccionados por este primer criterio.

Los perfiles de producción enzimática generados por los aislados fúngicos se presentan la figura 14. Los complejos celulolíticos obtenidos presentaron dos comportamientos diferentes; el primero de ellos, donde la producción enzimática de β - glucosidasas fue mayor comparada con la producción de endo y exocelulasas y el segundo comportamiento, donde la producción de endo y exocelulasas fue mayor comparada con la obtenida para β -glucosidasas. Para el primer caso las cepas que presentaron este perfil fueron *Phoma* sp., *Pestalotia* sp., LPLM10 y AOLM10. El aislado LPLM10 destacó por la producción elevada que presentó de β -glucosidasas en comparación con los demás aislados fúngicos. El segundo comportamiento observado fue presentado por el aislado fúngico *P. viticola* 5120 y ACRLM 10. Casos particulares fueron los observados para el aislado fúngico *F. oxysporum* en el cual no fue detectada la presencia de endocelulasas, únicamente la actividad de β -glucosidasas y exocelulasas, para el caso de *Rhizoctonia* sp., GLM10, RMLM10 y *C. acutatum* 10 la producción

enzimática fue similar para los tres casos de las enzimas del complejo celulolítico. Para *Alternaria* sp. se observó una elevada producción de endocelulasas con respecto a los valores obtenidos de β -glucosidasas y exocelulasas.

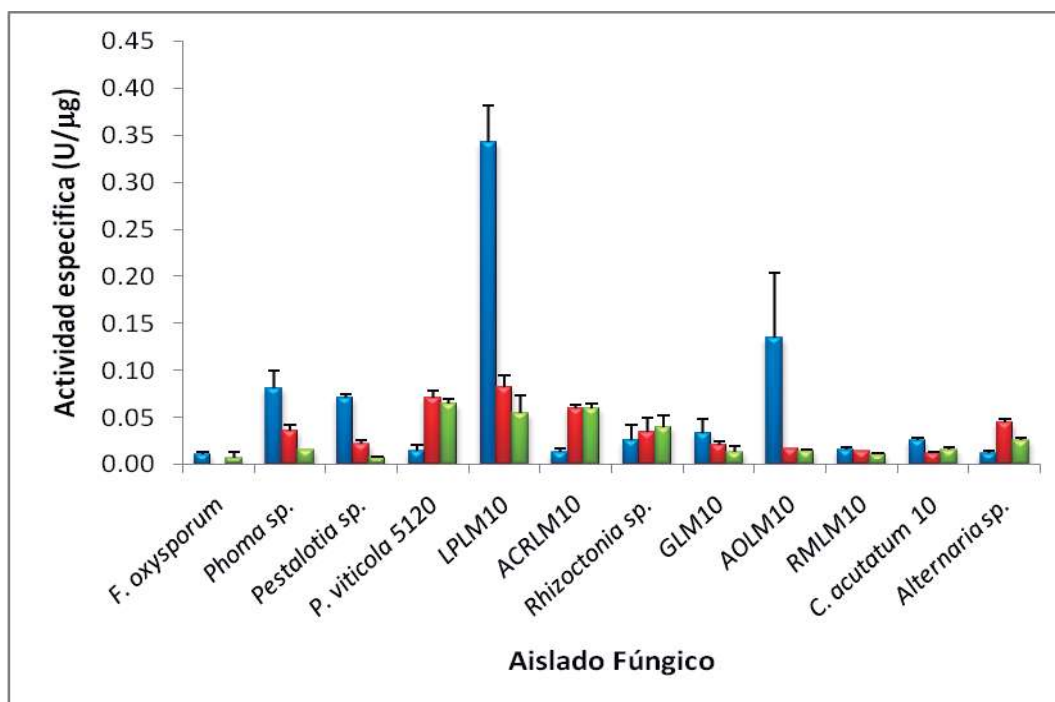


Figura 14. Producción de los componentes enzimáticos del complejo celulolítico obtenido de los hongos fitopatógenos en medio líquido. Los cultivos fueron incubados durante 5 días. Barras azules β -glucosidasas; barras rojas endocelulasas; barras verdes exocelulasas. Los resultados son promedio de tres repeticiones independientes. Prueba de Tukey $p < 0.01$.

Con la finalidad de observar de una manera detallada se presentan por separado los resultados obtenidos para cada una de las enzimas. Primero se presentan los resultados en cuanto a la producción de β -glucosidasas los cuales se muestran en la figura 15 inciso (a). Claramente destaca por su alta producción el aislado LPLM10, el cual fue estadísticamente diferente con respecto a los demás aislados analizados y numéricamente presentó la mayor producción de esta enzima seguido por AOLM10, *Phoma* sp. y *Pestalotia* sp., de manera decreciente. Los 8 aislados fúngicos restantes presentaron una producción menor y estadísticamente los resultados obtenidos para esos casos fueron iguales y numéricamente menores.

En cuanto a la producción obtenida para las endocelulasas los resultados se presentan en la figura 15 inciso (b). El aislado LPLM10 y *Phomopsis viticola* 5120 presentaron la mayor producción de estas enzimas y estadísticamente los

resultados obtenidos no presentaron diferencias significativas. A diferencia de los perfiles obtenidos de β -glucosidasas, para este caso la producción fue homogénea, con un número mayor de aislados fúngicos que produjeron estas enzimas.

Con respecto a la cantidad de exocelulasas producidas observamos en la figura 15 inciso (c) que LPLM10, *Phomopsis viticola* 5120 y ACRLM10 conforman el grupo de aislados fúngicos que presentó la mayor producción. Cabe destacar que los perfiles obtenidos para los casos de endo y exocelulasas son similares lo cual sugiere que ambas enzimas se encuentran relacionadas directamente. Sin embargo el perfil obtenido de β -glucosidasas fue diferente indicando que la producción enzimática se encuentra regida por otros factores a diferencia de lo observado por endo y exocelulasas.

6.1.3. Análisis estadístico de correspondencia para la selección del aislado fúngico productor de celulasas.

Los datos de crecimiento en medio líquido mostraron que el aislado fúngico LPLM10 es el mejor productor de celulasas, debido a que el complejo celulolítico obtenido presentó una producción elevada de β -glucosidasa, endocelulasas y exocelulasas. Sin embargo, con la finalidad de demostrar mediante una técnica estadística la selección llevamos a cabo un análisis correspondencia, el cual determina la forma en la que se encuentran involucradas las distintas variables involucradas en la selección.

El análisis estadístico por columnas de la matriz de datos (cuadro 18) generó el gráfico presentado en la figura 16, la disposición de las variables analizadas formó tres grupos definidos, el primero de ellos conformado por la variable β -glucosidasas, el segundo conformado por las variables endo y exocelulasas, y el tercero integrado por el crecimiento del aislado fúngico, el contenido de proteína extracelular y el índice celulolítico.

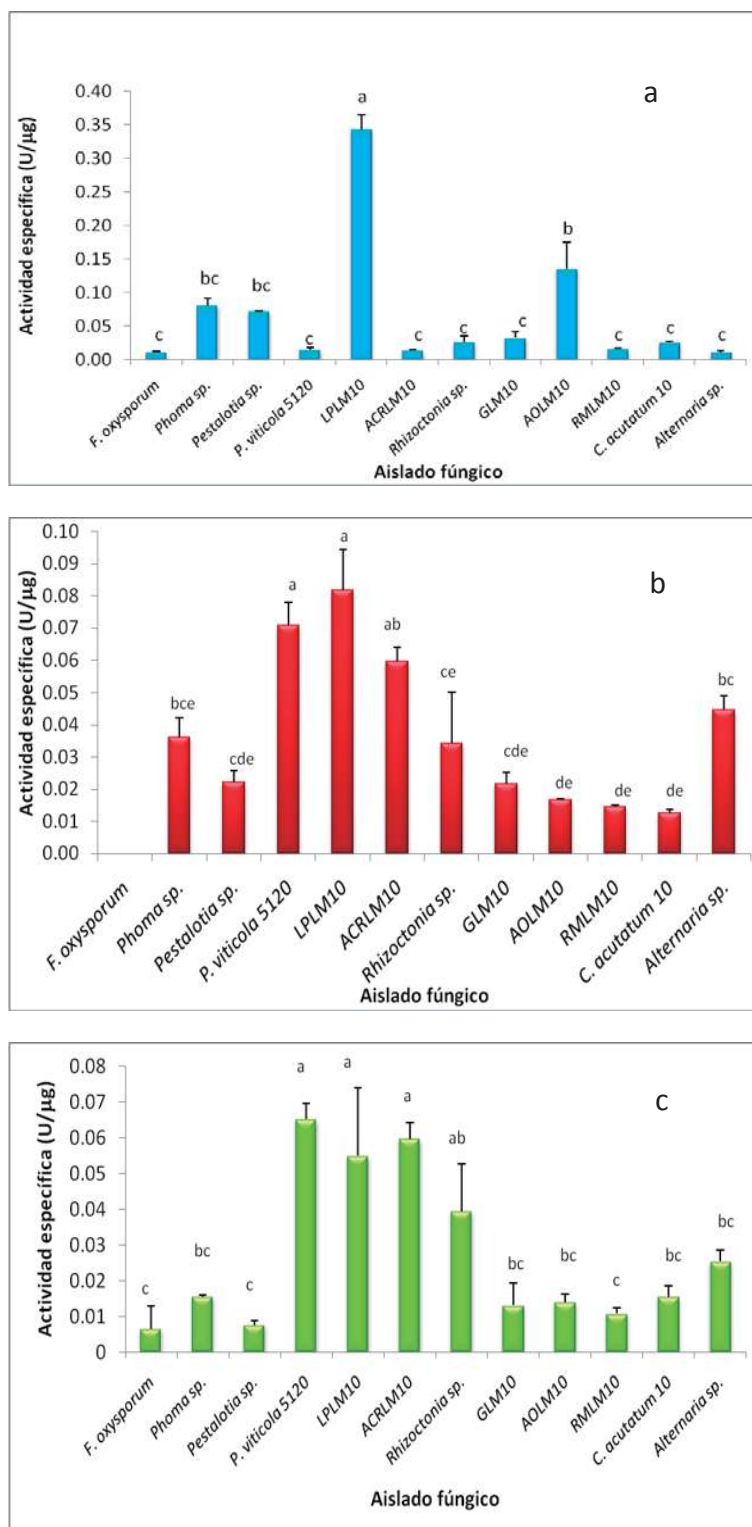


Figura 15. Producción de β -glucosidasas, endocelulasas y exocelulasas de 12 aislados fúngicos en medio líquido. Los cultivos fueron incubados durante 5 días. Inciso (a) β -glucosidasas; (b) endocelulasas; (c) exocelulasas. Los promedios son resultado de tres repeticiones independientes. Prueba de Tukey $p < 0.01$.

Cuadro 18. Matriz de datos utilizada para llevar a cabo el análisis estadístico de correspondencia a partir de las variables obtenidas del 12 aislados fúngicos.

Aislado fúngico	β -glucosidasas (U/ μ g)	Endo celulasas (U/ μ g)	Exo celulasas (U/ μ g)	Proteína extracelular (μ g/ml)	Índice celulolítico	Crecimiento (μ g/ml)
<i>F. oxysporum</i>	0.011	0	0.006	64.468	1.771	577.517
<i>Phoma</i> sp.	0.081	0.036	0.015	81.347	1.713	518.865
<i>Pestalotia</i> sp.	0.071	0.022	0.007	119.6451	1.673	177.234
<i>P. viticola</i> 5120	0.014	0.070	0.065	66.737	2.012	152.340
LPLM10	0.342	0.081	0.054	80.248	2.024	336.666
ACRLM10	0.013	0.059	0.059	77.234	2.014	137.588
<i>Rhizoctonia</i> sp.	0.026	0.034	0.039	89.858	2.007	41.985
GLM10	0.032	0.021	0.013	116.950	2.556	101.418
AOLM10	0.135	0.016	0.014	108.971	2.52	391.404
RMLM10	0.015	0.014	0.010	85.673	1.813	337.163
<i>C. acutatum</i> 10	0.025	0.012	0.015	87.801	1.815	353.546
<i>Alternaria</i> sp.	0.011	0.044	0.025	115.070	1.822	434.964

La interpretación de este gráfico con respecto a la disposición generada por las variables nos indica que la producción de β -glucosidasas es una variable importante debido a que su disposición dentro del plano cartesiano la coloca como una variable separada de las demás. Para el caso de endo y exocelulasas la disposición en el plano cartesiano es similar indicando que se encuentran estrechamente relacionadas. Este comportamiento también fue presentado la figura 15 donde se observó que los perfiles de producción de ambas enzimas son similares. Con respecto a la disposición del tercer grupo de variables asociadas podemos analizar que tanto el índice celulolítico, contenido de proteína extracelular y el crecimiento se encuentran ampliamente relacionadas. Cabe destacar que la disposición generada por las variables crecimiento y proteína extracelular fue igual, lo que nos indica que el contenido de proteína excretado en el medio de cultivo tiene una relación directa con el crecimiento del aislado fúngico.

El análisis estadístico por filas, se presenta en la figura 16 inciso b. Un solo aislado fúngico LPLM10 formó un grupo independiente y se encontró distribuido de la misma manera que las β -glucosidasas presentado en el inciso a lo que indica que es el único que presentó una influencia directa de esta variable. Los aislados fúngicos *P. viticola* 5120 y ACRLM10 se encontraron directamente influenciados por las variables endo y exocelulasas al igual que lo observado en la figura 15

donde estos aislados fúngicos presentaron la mayor producción de estas enzimas. Los aislados fúngicos *F. oxysporum*, *Phoma* sp., *Rhizoctonia* sp., GLM10, AOLM10, RMLM10, *C. acutatum* 1 y, *Alternaria* sp. se colocaron en una disposición similar con respecto a las variables IC, proteína extracelular y crecimiento. Sin embargo, su disposición en cuanto a la producción de β -glucosidasas, endocelulasas y exocelulasas fue menor debido a que estas variables se encontraron distribuidas en cuadrantes opuestos, lo cual indica que la producción de celulasas por estos aislados fúngicos no fue representativa.

Con el análisis de correspondencia se logró determinar las relaciones existentes entre las variables analizadas, se determinó que las β -glucosidasas son la variable más importante para llevar a cabo la selección, debido a que su disposición dentro de la gráfica las coloca de manera separada con respecto a las demás variables. El único hongo que presentó una influencia directa por las β -glucosidasas fue LPLM10. De manera paralela en el análisis de la figura 15, se observó que la producción de endo y exocelulasas por este aislado también presentó los valores mas altos por lo cual en conclusión este aislado fue seleccionado para estudiar la obtención de su complejo celulolítico.

6.2. DETERMINACIÓN TAXONÓMICA DEL AISLADOS FÚNGICO LPLM10

Para el aislamiento del ADN total se utilizó micelio del aislado fúngico crecido sobre cajas de petri con medio PDA y el protocolo de extracción fue desarrollado bajo las especificaciones de los fabricantes del kit comercial miniplant kit. Para determinar la pureza del ADN extraído se llevó a cabo el corrimiento de la muestra sobre un gel de agarosa al 1 % y los resultados obtenidos se presentan en la figura 17.

Las muestras de ADN total obtenidas fueron utilizadas para llevar a cabo la amplificación mediante PCR con oligonucleótidos universales ITS 4 e ITS 5. Los productos de PCR obtenidos se presenta en la figura 18 donde se observó una señal electroforética de 600 pares de bases la cual fue recuperada del gel y re-suspendida para poder determinar su secuencia nucleotídica.

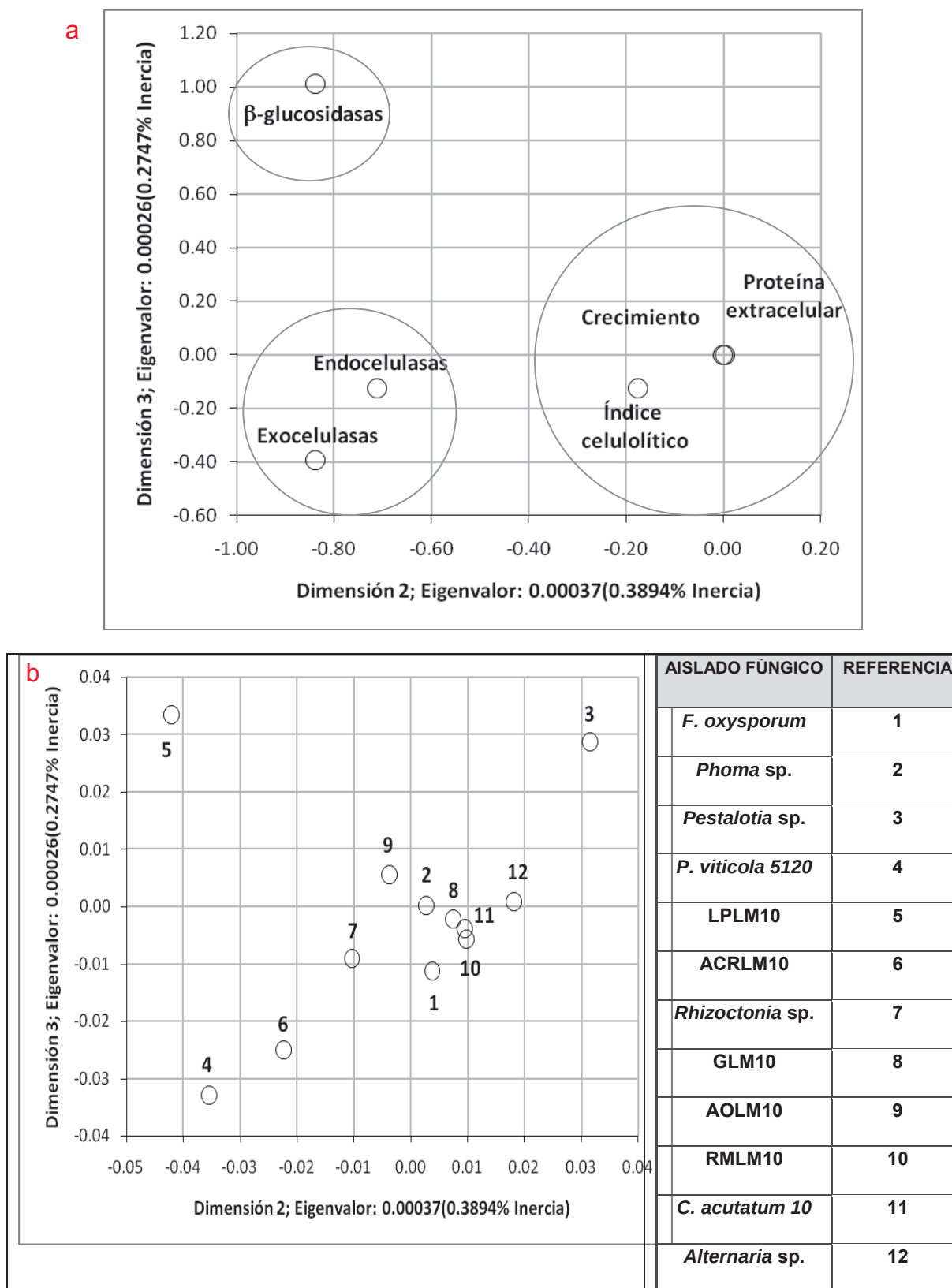


Figura 16. Análisis estadístico de correspondencia de las variables analizadas en el escrutinio de 12 aislados fúngicos. Los datos presentados fueron obtenidos a partir de la matriz de datos del cuadro 3. Inciso (a) análisis por columnas; inciso (b) análisis por filas.

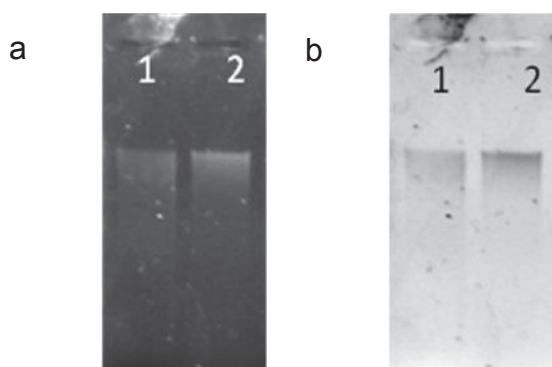


Figura 17. Muestras de DNA total del aislado fúngico LPLM10. Revelado negativo (a) y revelado positivo (b).

Las secuencias obtenidas a partir de los amplificados se presentan en el cuadro 19. Las secuencias fueron utilizadas para llevar a cabo un alineamiento de tipo BLAST con la finalidad de determinar secuencias homólogas.

El análisis de homología y el árbol filogenético obtenido identificaron a LPLM10 como *Pseudofusicoccum stromaticum* con un 99% (Figura 19)

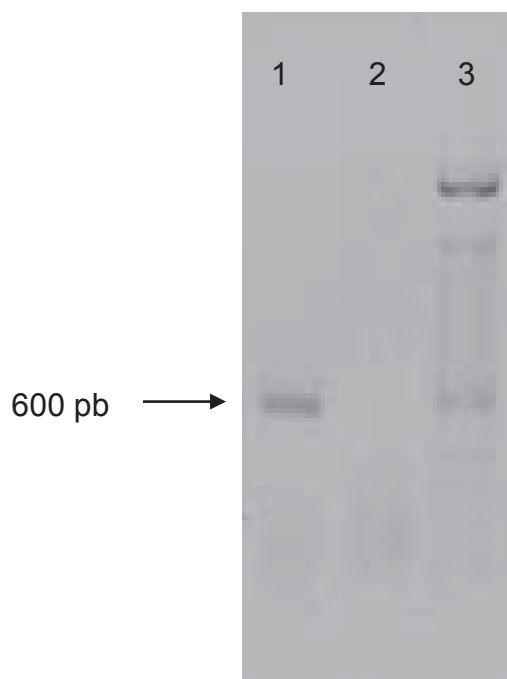


Figura 18. Productos de PCR obtenidos a partir del ADN total de LPLM10. Carril 1 Producto de PCR 600 pb. Carril 2. Control con oligonucleótidos its4 e its5 sin DNA. Carril 3. Marcador de peso 100 pb

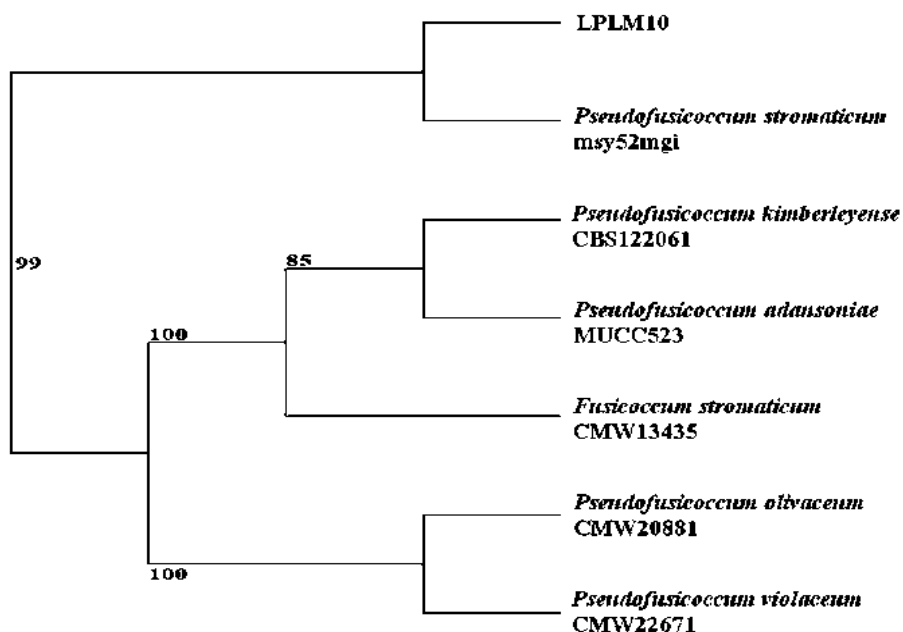


Figura 19. Árbol filogenético basado en la secuencias ITS de diferentes especies de *Pseudofusicoccum*. El árbol filogenético fue construido mediante el método neighbor-joining. Los niveles de bootstraps (%; n=1000) se indican en los nodos.

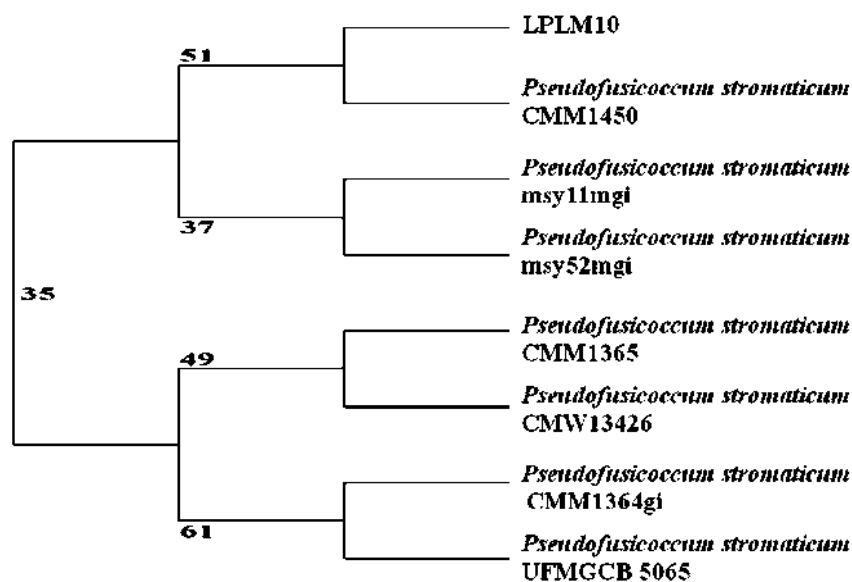


Figura 20. Árbol filogenético basado en la secuencias ITS de diferentes cepas de *Pseudofusicoccum stromaticum*. El árbol filogenético fue construido mediante el método neighbor-joining. Los niveles de bootstraps (%; n=1000) se indican en los nodos.

Cuadro 19. Secuencias de nucleótidos de los ITS obtenidas a partir de la amplificación de ADN total del aislado fúngico LPLM10

Secuencia ITS5 para el aislado LPLM10
TTTITAGCGGAGGAAGGAAGTATATTCGGAGGATGTGAGTCTCCTCGCGAAG CAACACTCCAACACTTTGAGTAAGTACCTCTGTTGCTTTGGCGGGGCCGCGGTT CTCCGCGGGCCGGCCCCCTGACCGGGGCTGGCCTGCGCCCGCCAGAGGACC ACAAAACCTCCAGTCAGTGAACCTTTGCTGTCTGATTTAAATTCAATAAACTAAAA CTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA CATTGCGCCCTTTGGTATTCCGAAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTACAC CCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGTTGGGCGGCGTCC
Secuencia ITS4 para el aislado fúngico LPLM10
TTACTACTTCTTCATCCTCCGCTTATTGATATGACCTGCTCTATATTGAGGTTC CATCGGGCGAGTGTTCTTCCATCCTCCAAAGCGAGGTGTTTTCTACTACGCT TGAGGCAAGACGCCACCGCCGAGGTCTTTGAGGCGCGTCCGGGAGGACGCC GCCCAACACCAAGCAGAGCTTGAGGGGTGTAATGACGCTCGAACAGGCATG CCCTTCGGAATACCAAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCACT GAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTGCTGCGTTCTTCATCGATGCC AGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAGTTTATTGAATTTAAATCAGACA GCAAAGTTCACTGACTGGAGTTTTGTGGTCCTCTGGCGGGGCGCAGGCCAGCC CCGGTCAGGGGGCCGGCCGCGGAGAACCGCGGCCCGCCAAAGCAACAGAG GTAGGTACACAAAGGGTTGGAGAGTGGGCTCGATGAGGAGACCCAAAACCTC GGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTTTTAC TTACATCCCGGACGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTTGCCTCAAGC GTAGTAGAAAACACCTCGCTTTGGAGGACGGGACGACCGCTCGCCGGACGA ACCTTTGAATTCATTTTCCTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCT AACTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAA

También se llevó a cabo un análisis entre secuencias de diferentes cepas de *P. stromaticum* y el árbol filogenético obtenido se presenta en la figura 20. Donde se observan diferentes porcentajes de homología entre las cepas de esta especie, indicando un amplio porcentaje de variación intraespecie.

En cuanto a la morfología presentada por el aislado fúngico LPLM10 en la figura 21 se presentan las características macroscópicas y la morfología microscópica. No fueron observadas estructuras reproductivas, únicamente fue observado micelio septado. Se emplearon dos tipos de tinción, utilizando dos

colorantes, azul de lactofenol y safranina, para los dos casos la misma morfología fue observada.

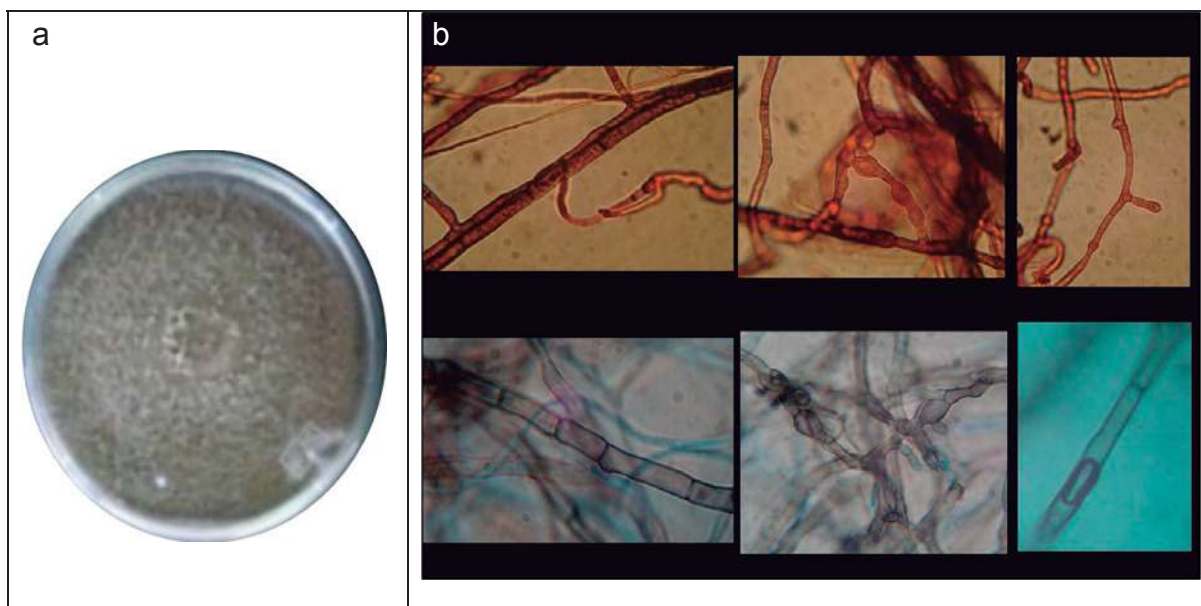


Figura 21. Morfología macroscópica (a) y microscópica (b) del aislado fúngico LPLM10. Se utilizaron dos tipos de colorantes safranina (inciso b parte superior) y azul de lactofenol (inciso b parte inferior). Las observaciones fueron realizadas en un objetivo de 40X.

6.3. SELECCIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA PRODUCCIÓN DE CELULASAS DE *P. stromaticum*.

6.3.1 Producción del complejo celulolítico de *P. stromaticum* en medio líquido y medio sólido.

Con la finalidad de determinar las condiciones óptimas de producción de enzimas, fueron comparadas dos formas de crecimiento diferentes, una en medio líquido y la otra en medio sólido. Los datos obtenidos de la producción máxima de enzima se presentan en la figura 22. De acuerdo con los resultados observamos que la condición de crecimiento es determinante para la producción de celulasas por este aislado fúngico.

Para el caso de crecimiento en medio sólido se presentó una mayor producción de β -glucosidasas con respecto a la producción de endo y exocelulasas. La mayor producción de β -glucosidasas se obtuvo en los tratamientos 3, 4 y 5 con valores máximos de 0.386, 0.303 y 0.397 U/ μ g respectivamente. Para el caso de endocelulasas el mejor tratamiento analizado fue el 3 con un valor máximo de actividad enzimática de 0.150 U/ U/ μ g, este mismo tratamiento fue el mejor analizado para la producción de exocelulasas con

un valor máximo de 0.024 U/ μ g. Como podemos observar los valores mayores de producción de enzima para los tres casos fueron obtenidos por el tratamiento 3 en medio sólido que corresponde a la combinación de celulosa tipo 20 y algodón.

El crecimiento en medio líquido originó un perfil diferente al observado por el medio sólido. Se presentó una elevada producción de endo y exocelulasas. Sin embargo, la cantidad de β -glucosidasas producidas disminuyó drásticamente. Los valores de endo y exocelulasas fueron de 0.456 y 0.405 U/ μ g respectivamente y que corresponden al tratamiento 6 y 7, estos valores comparados con los observados en medio líquido fueron mayores. Las β -glucosidasas alcanzaron un valor máximo 0.057 U/ μ g generado por el tratamiento 6. Para esta forma de crecimiento el mejor tratamiento analizado fue el 6 en el cual se utilizó celulosa tipo 101 como sustrato.

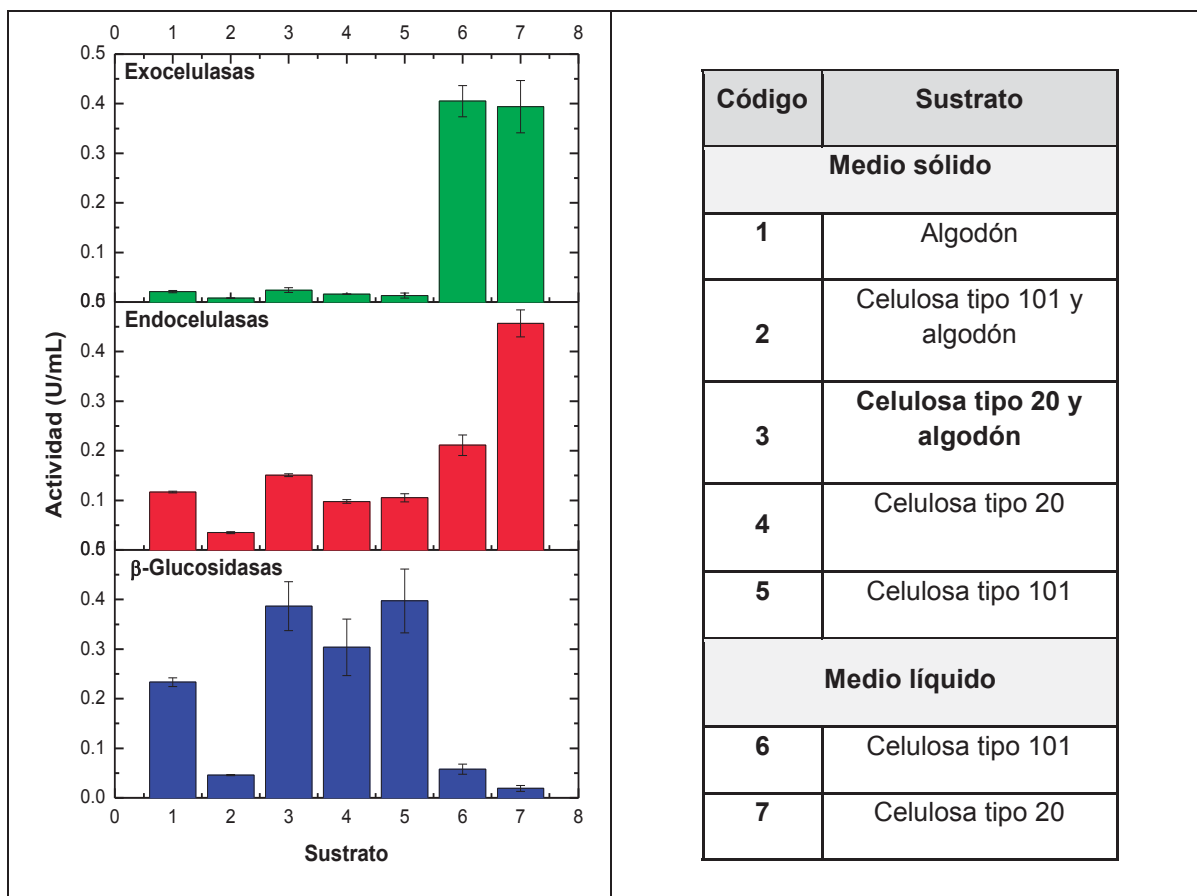


Figura 22. Producción de celulasas por *P. stromaticum* en medio sólido y medio líquido. Los resultados son promedio de tres repeticiones independientes. Prueba de Tukey $p < 0.01$.

De acuerdo con el análisis de correspondencia realizado para la selección del aislado fúngico se determinó que las β -glucosidasas son enzimas importantes dentro del complejo celulolítico, debido a ello se decidió seleccionar aquella condición en la que se produjera la mayor cantidad de β -glucosidasas por esta razón se seleccionó el crecimiento en medio sólido, específicamente el tratamiento 3, para llevar a cabo el estudio del complejo celulolítico de *P. stromaticum*.

6.3.2 Curso temporal de la producción enzimática del complejo celulolítico de *P. stromaticum*.

Se determinó el curso temporal de la producción de enzimas con la finalidad de obtener el tiempo indicado para llevar a cabo la cuantificación enzimática y los datos generados se presentan en la figura 23. Los experimentos fueron llevados a cabo en medio sólido utilizando como sustrato algodón y celulosa tipo 20. Observamos que a partir del día 18 de incubación se presentó la mayor producción de la enzima para los tres casos, por lo tanto a este tiempo se llevó a cabo la medición del complejo celulolítico.

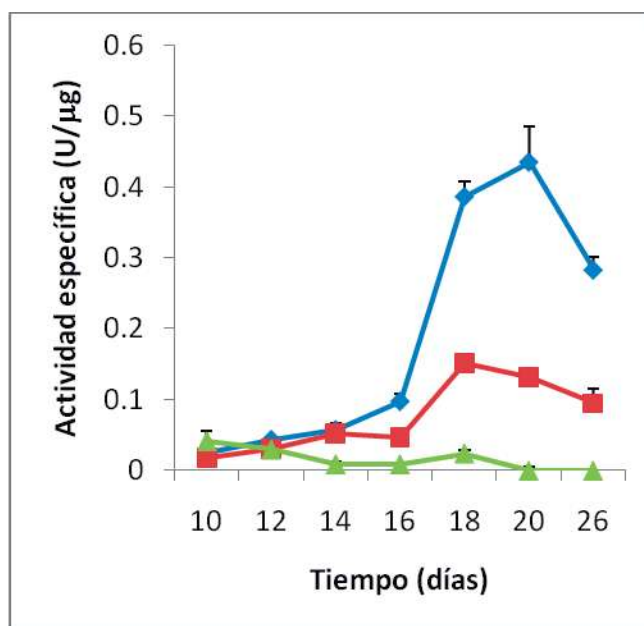


Figura 23. Curso temporal de la producción del complejo celulolítico de *P. stromaticum* en medio sólido. β -glucosidasas (—●—) Endocelulasas (—■—) y Exocelulasas (—▲—). Los resultados son promedio de tres repeticiones independientes. Prueba de Tukey $p < 0.01$.

6.3.3 Variación de la fuente de nitrógeno para la producción del complejo celulolítico de *P. stromaticum*.

Después de llevar a cabo la selección de las condiciones óptimas de crecimiento para la producción de celulasas y determinar el tiempo óptimo para la

medición del complejo celulolítico el siguiente paso fue determinar el efecto que ejercían la utilización de diferentes fuentes de nitrógeno en la producción de celulasas.

Las fuentes de nitrógeno seleccionadas fueron; nitrato de amonio NH_4NO_3 , nitrato de potasio KNO_3 , urea $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$, sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y el aminoácido L-arginina $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$. El medio de cultivo utilizado inicialmente contenía una combinación de sulfato de amonio y urea, estas concentraciones fueron sustituidas por las diferentes fuentes de nitrógeno anteriormente mencionadas y comparadas con la combinación original para poder determinar si se presentaban diferencias significativas con respecto a la producción de enzima (figura 12).

En la producción de β -glucosidasas se observó que la combinación original de nitrógeno denominada como control (0.284 U/ μg) fue estadísticamente igual con respecto a la adición de nitrato de potasio (0.294 U/ μg), urea (0.273 U/ μg) y L-arginina (0.266 U/ μg). Los valores obtenidos que generaron una disminución en la producción de β -glucosidasas se obtuvieron utilizando nitrato de amonio (0.096 U/ μg), seguida de sulfato de amonio (0.002 U/ μg) de manera decreciente.

Para el caso de endocelulasas, la utilización de nitrato de potasio con respecto a las demás fuentes de nitrógeno analizadas presentó diferencias significativas y el valor máximo de actividad enzimática (0.097 U/ μg), seguido por el nitrato de amonio (0.075 U/ μg), urea (0.069 U/ μg), control (0.075 U/ μg), L-arginina (0.036 U/ μg) y por último sulfato de amonio (0.011 U/ μg) de manera descendiente.

Para la producción de exocelulasas, aunque no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos existió una tendencia numérica mayor presentada por la utilización de nitrato de potasio (0.004 U/ μg), seguido por el control (0.003 U/ μg), L-arginina (0.002 U/ μg), nitrato de amonio (0.001 U/ μg) y sulfato de amonio (0.0007 U/ μg). En la utilización de urea la actividad de exocelulasas no fue detectada.

Analizando los resultados obtenidos en la figura 24, se concluyó que la sustitución de las concentraciones iniciales de nitrógeno (control), por nitrato de potasio aumentó la producción para los tres casos de las enzimas debido a ello se seleccionó al nitrato de potasio como la fuente de nitrógeno utilizada para producir el complejo celulolítico.

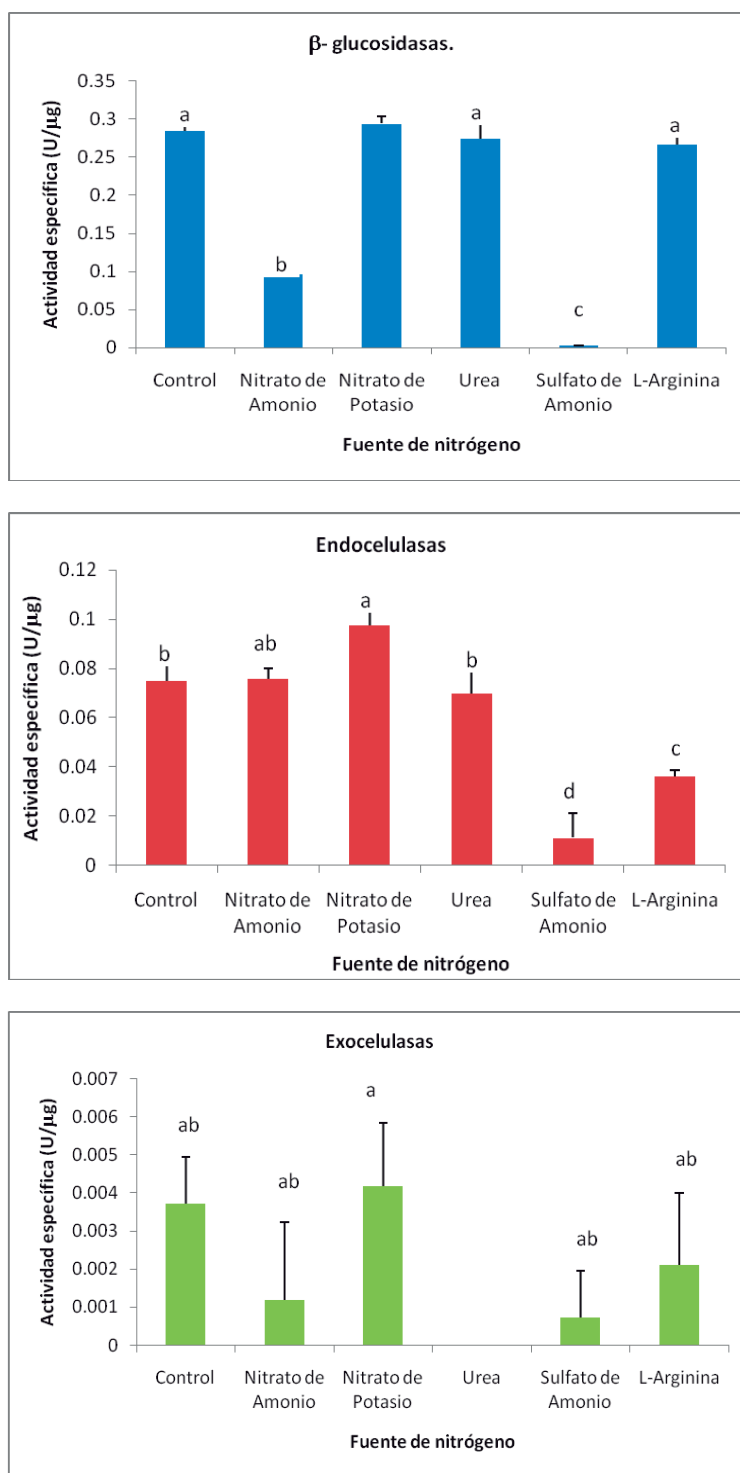


Figura 24. Efecto de la fuente de nitrógeno en la producción de celulasas de *P. stromaticum* en medio de cultivo sólido. Los promedios son resultado de tres repeticiones independientes. Prueba de Tukey $p < 0.01$

6.3.4 Experimento ortogonal para la optimización de las condiciones de obtención del complejo celulolítico de *P. stromaticum*.

Para la optimización de las condiciones de producción de celulasas fue utilizado un diseño experimental mediante el método Taguchi. Cuatro factores fueron analizados en tres niveles como se muestra en el cuadro 20. La matriz del diseño experimental se presenta en el cuadro 21, la cual se encuentra constituida por 9 experimentos o corridas. En esta matriz, las columnas son ortogonales entre sí, es decir, para cualquier par de columnas, todas las combinaciones de los niveles del factor pueden ocurrir, y se llevan a cabo el mismo número de veces.

De acuerdo con la disposición de la matriz presentada en el cuadro 21 se prepararon las 9 corridas utilizando un medio de cultivo sólido y fueron incubadas durante 18 días de crecimiento y al término de este periodo fueron colectadas y los extractos obtenidos se utilizaron para llevar a cabo la cuantificación enzimática de celulasas.

Cuadro 20. Factores y niveles utilizados en el experimento ortogonal Taguchi

Factores	Niveles		
	1	2	3
1- Algodón	1*	2*	3*
2.- Celulosa	1*	2*	3*
3.- Fuente de Nitrógeno Nitrato de Potasio	3.3°	1.65°	6.6°
4.- Inóculo	1+	2+	3+

* Concentraciones porcentuales (%)

° Concentraciones en (g/l)

+ Propágulo por cada 30 ml de medio de cultivo

Los datos obtenidos de cada una de las corridas se presentan en la figura 25 posteriormente fueron analizados por separado utilizando el programa Statistic 7 para determinar el efecto generado en cada variable de respuesta, la relación señal-ruido, o el número S/N, fue calculado para cada experimento de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$S/N = -10 * \log_{10} [(1/n) * S(1/y_i^2)]$$

Cuadro 21. Matriz de experimentos realizados en el diseño ortogonal Taguchi L9

Experimento	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

El efecto de los factores en los distintos niveles analizados para la producción de β -glucosidasa, endocelulasas y exocelulasas se presentan en la figura 26 donde se muestran los valores S/N individuales ejercidos por cada nivel.

Para la determinación de β -glucosidasas (figura 26 inciso a) observamos que para el primer factor (algodón), el nivel 2 tuvo el mayor efecto, para el segundo factor (celulosa) el nivel que obtuvo el mejor efecto fue el 1, para la concentración de nitrógeno el nivel 3 fue determinante y para la concentración de inóculo el segundo nivel fue el mejor.

En el caso de endocelulasas el perfil de los diferentes factores se presenta en la figura 26 inciso (b), donde se observa que para el factor algodón el nivel que ejerció un mayor efecto fue el nivel 2, para el factor celulosa el mejor nivel fue el 1, para la concentración de nitrógeno fue el 3 y por último para la concentración de inóculo fue el nivel 3.

Los mejores niveles para el caso de las exocelulasa (figura 26 inciso c) fueron los siguientes; algodón nivel 2, celulosa nivel 2, concentración de la fuente de nitrógeno, nivel 1 y en la concentración de inóculo el nivel 3.

Los niveles en los cuales los factores obtuvieron el mejor efecto fueron seleccionados como las condiciones óptimas para llevar a cabo la producción de enzima los cuales se presentan en el cuadro 22.

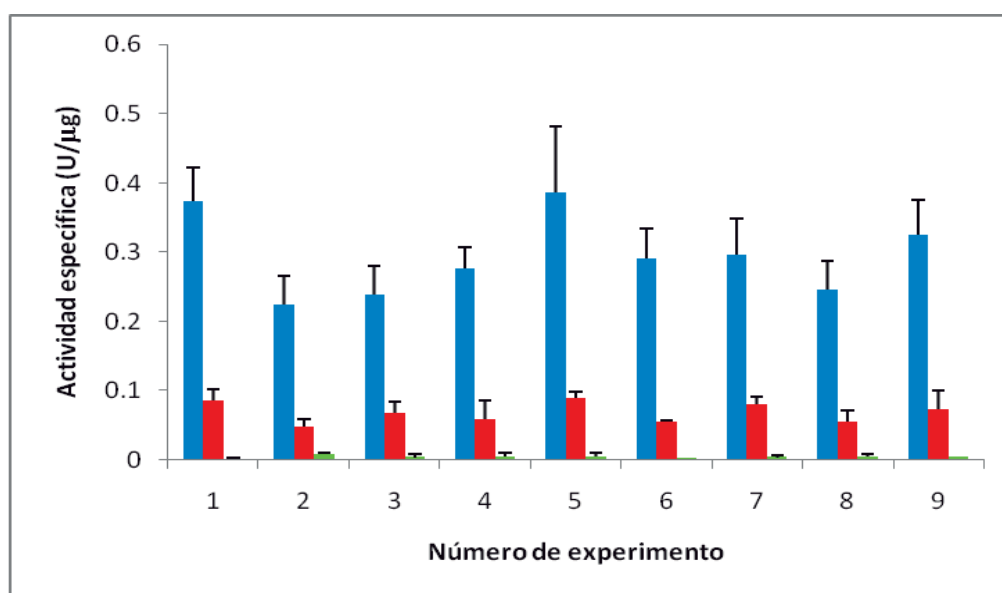


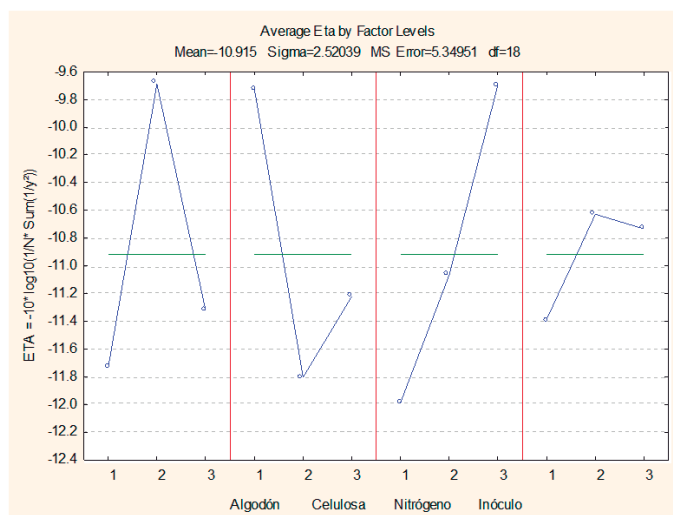
Figura 25. Producción de celulasas obtenidas en las diferentes corridas o experimentos a partir del diseño ortogonal Taguchi. Barras azules (β -glucosidasas); barras rojas (Endocelulasas); barras verdes (Exocelulasas).

6.4. PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DE LAS CELULASAS

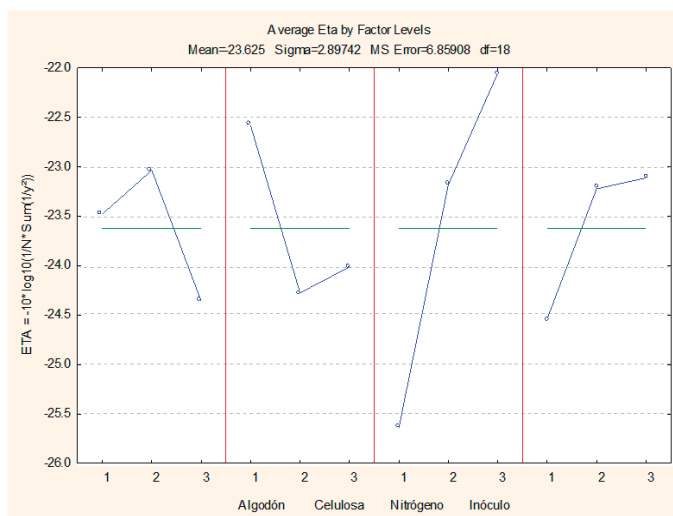
6.4.1 Efecto del pH sobre la actividad de celulasas obtenidas por *P. stromaticum*.

Para determinar el pH óptimo de la actividad específica de celulasas se utilizaron extractos enzimáticos obtenidos a partir de cultivos de 18 días de crecimiento en medio sólido. Los extractos fueron sometidos al análisis en un intervalo de pH entre 3 y 6, los resultados se presentan en la figura 27.

a



b



c

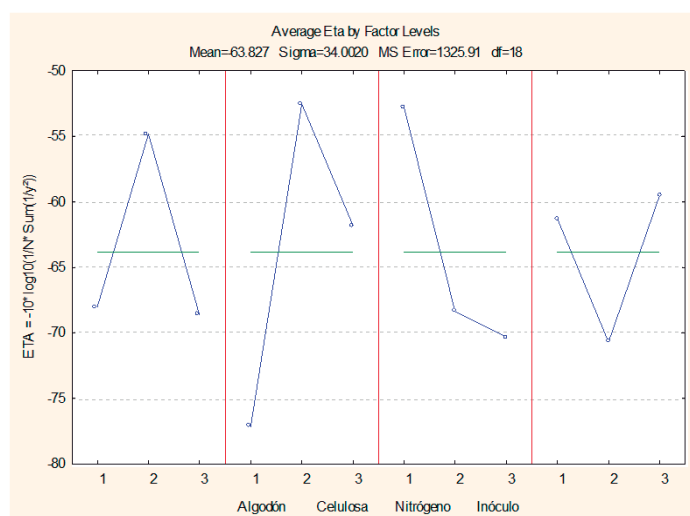


Figura 26. Relación S/N de los factores analizados en el diseño experimental Taguchi. β -glucosidasa (a), endocelulasas (b) y exocelulasas (c).

Cuadro 22. Parámetros óptimos obtenidos a partir del análisis ortogonal Taguchi L9 para la producción de celulasas por el aislado fúngico *P. stromaticum*.

Enzima	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Actividad específica (U/μg)
β- glucosidasas	2	1	3	2	0.3098 ± 0.0114
Endocelulasas	2	1	3	3	0.0926 ± 0.0049
Exocelulasas	2	2	1	3	0.67 ± 0.0029

Se observó que en el intervalo de pH analizado la actividad específica de β-glucosidasas no disminuyó drásticamente. Sin embargo, de acuerdo con el análisis estadístico la mayor actividad enzimática fue obtenida entre los valores de pH de 4 y 4.5 con valores de 0.38 y 0.40 U/μg, respectivamente. Estos dos datos entre si no presentaron diferencias significativas y numéricamente generaron los valores máximos de actividad enzimática por lo tanto se consideró este intervalo como el pH óptimo al cual se presenta la mayor actividad específica de β-glucosidasas.

Para el caso de endocelulasas, los resultados obtenidos se presentan en la figura 27 inciso (b) donde observamos que al igual que las β-glucosidasas la actividad obtenida no fue inhibida en su totalidad. Sin embargo, de acuerdo con el análisis estadístico realizado se presentó la mayor actividad enzimática en el intervalo de pH entre 4.5 y 5.0 con valores de actividad enzimática de 0.127 y 0.113 U/μg respectivamente, por lo tanto el pH 4 fue considerado como el óptimo para determinar la actividad enzimática de endocelulasas.

En el inciso (c) de la figura 27 se presentan los resultados para el caso de exocelulasas donde se observó que en el intervalo de 3.5- 5 no se presentaron diferencias significativas y se obtuvieron los valores mayores de actividad

específica de exocelulasas. Sin embargo, numéricamente el valor máximo fue obtenido en el pH de 4 por lo tanto se consideró como el óptimo.

6.4.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad de celulasas obtenidas por *P. stromaticum*.

Los extractos enzimáticos obtenidos fueron sometidos a análisis en un intervalo de temperaturas entre 10 y 80 °C los resultados se presentan en la figura 28.

En el inciso (a) se observó un comportamiento de campana debido a la pérdida de la actividad enzimática generado por β -glucosidasas. Se presenta claramente en la gráfica que a valores de temperatura menores a 30 y mayores de 70°C la actividad enzimática disminuyó notablemente. Los valores máximos de actividad se presentaron en el intervalo entre 40 y 60°C los datos no presentaron diferencias significativas; sin embargo, numéricamente el valor máximo se obtuvo a los 50 °C con una actividad de 0.34 (U/ μ g) por lo tanto fue considerada como la temperatura óptima para determinar la actividad de β -glucosidasas.

Por otra parte el perfil observado por las actividades específicas de endocelulasas en intervalo de 10 y 50 °C se mantuvo constante y a valores mayores a los 70 °C la actividad disminuyó drásticamente. En la temperatura de 60°C se obtuvo el valor mayor de actividad; 0.12 (U/ μ g), por lo tanto esta temperatura fue considerada como la óptima.

Para el caso de exocelulasas pudimos observar que se generó un comportamiento de campana donde en temperaturas menores a los 40 y mayores a 70 °C las actividades enzimáticas disminuyeron. En el intervalo entre 50 y 60°C se observó un aumento en la actividad enzimática obteniéndose un valor máximo de 0.0149 U/ μ g para 60 °C de temperatura la cual fue considerada como la óptima para llevar a cabo la cuantificación.

6.4.3 Estabilidad térmica de las celulasas obtenidas por *P. stromaticum*.

La temperatura óptima determinada para β -glucosidasas fue de 50 °C debido a esto se decidió llevar a cabo el experimento de estabilidad térmica a temperaturas mayores a la óptima. El intervalo analizado fue entre 50 y 80 °C. Los extractos obtenidos fueron sometidos a incubación en diferentes temperaturas en intervalos de tiempo de 10 minutos, posteriormente a la incubación la enzima residual fue cuantificada y los datos obtenidos se presentan en la figura 29.

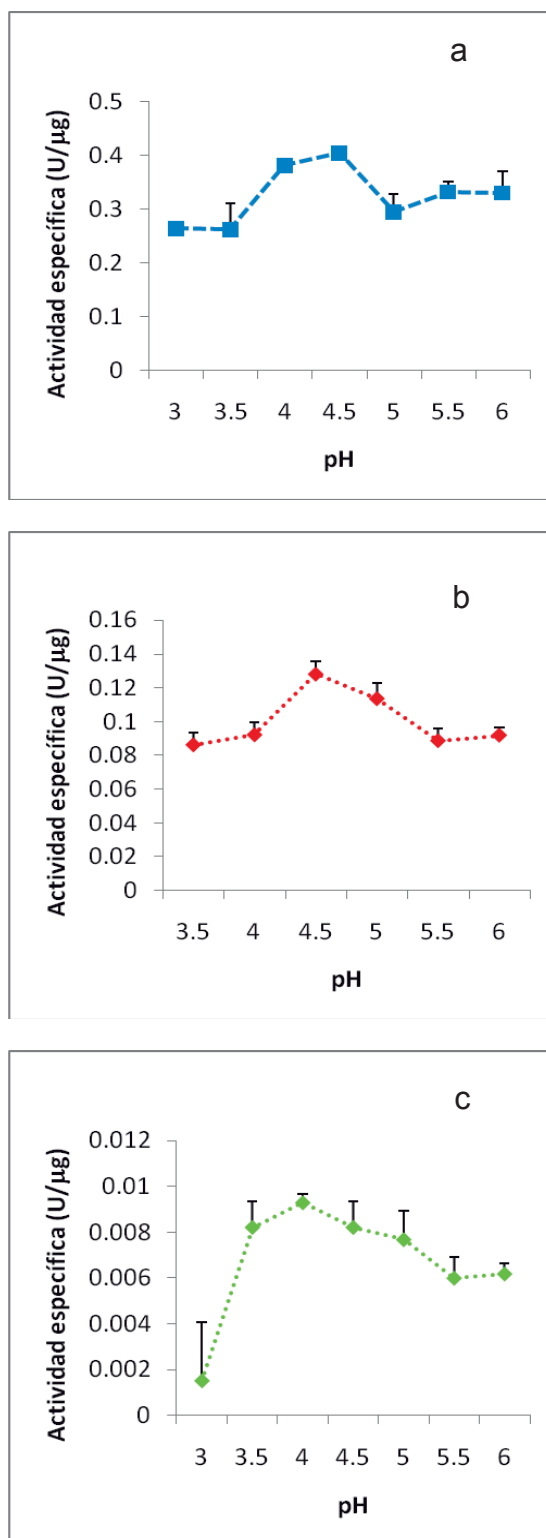


Figura 27. Efecto del pH en la actividad específica de celulasas obtenidas por *P. stromaticum*. (a) β-glucosidasas, (b) endocelulasas y (c) exocelulasas.

Para el caso de β -glucosidasas se observó que a las temperaturas de 50 y 60°C la actividad de la enzima se mantuvo hasta los 30 minutos de incubación. Sin embargo al aumentar la temperatura por arriba de los 70 °C se generó una disminución drástica de la actividad enzimática en los primeros 10 minutos de incubación. Estos resultados nos indican que las β -glucosidasas de este complejo son enzimas termo estables dentro de sus temperaturas óptimas.

La temperatura óptima de las endocelulasas obtenidas fue de 60 °C debido a ello se analizó esta temperatura y también 70 y 80°C en el ensayo de estabilidad térmica. La enzima se incubó durante intervalos de tiempo de 10 minutos hasta completar 30 minutos. Los datos se presentan en la figura 29 inciso (b), donde observamos que a diferencia de las β -glucosidasas el comportamiento de endocelulasas fue diferente es decir la exposición a 10 minutos disminuyó considerablemente la actividad enzimática lo cual indica que son enzimas termo sensibles a diferencia de lo observado por las β -glicosidasas.

Para el caso de exocelulasas (figura 29 inciso c) se observó el mismo comportamiento presentado por endocelulasas. Se observó una disminución considerable de la actividad enzimática tanto a la temperatura óptima 60 °C, como en temperaturas mayores a ésta, por lo tanto se concluyó que estas enzimas no presentan termoestabilidad.

6.4.4 Efecto de la concentración de sustrato en la cuantificación de celulasas de *P. stromaticum*.

Con la finalidad de observar el comportamiento de las β -glucosidasas obtenidas con respecto a diferentes concentraciones de sustrato se llevó a cabo el análisis en un intervalo de concentraciones de 0.01 a 6 mM. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 30 inciso (a) donde se observó el siguiente comportamiento; a concentraciones bajas de sustrato en el intervalo de 0.01 y 0.1 mM la actividad enzimática observada fue mínima. Sin embargo, en el intervalo comprendido entre 0.5 a 2 mM la actividad enzimática presentó un incremento de manera exponencial llegando a su valor máximo de actividad a la concentración 2 mM, a partir de ésta concentración la actividad enzimática obtenida se mantuvo constante, sin observarse una disminución a concentraciones mayores lo que sugiere que estas enzimas no presentaron inhibición por el sustrato análogo p -NPGP.

Para el caso de las endocelulasas se analizaron las concentraciones de sustrato CMC en el intervalo entre 0.01 a 10 %. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 30 inciso (b). El perfil observado es similar al presentado por las β -glucosidasas anteriormente analizadas, en el intervalo de 0.01 a 0.1

comenzó un aumento en la actividad enzimática, incrementándose considerablemente a partir de la concentración al 1 %. El incremento máximo se obtuvo al adicionar 10 % de sustrato sin observarse inhibición.

Las exocelulasas fueron analizadas en diferentes concentraciones de sustrato Avicel, en el intervalo entre 0.1 y 5 %. La figura 30 en el inciso (c) se muestra el perfil generado, el cual corresponde al de una campana donde en condiciones menores al 2 % y mayores a ésta se observó una disminución en la actividad enzimática. Este comportamiento indica que estas enzimas presentan una clara inhibición por sustrato, a diferencia de endocelulasas y β -glucosidasas. De acuerdo con el análisis estadístico realizado la actividad específica obtenida a la concentración del 2% fue diferente con respecto a los demás tratamientos, por lo tanto fue considerada como la concentración óptima para cuantificar la actividad específica de exocelulasas

6.4.5 Determinación de las constantes cinéticas aparentes de las celulasas obtenidas de *P. stromaticum*.

Los datos obtenidos a partir del análisis del efecto de la concentración de sustrato fueron utilizados para determinar las constantes cinéticas aparentes de las celulasas. Para obtener las constantes cinéticas se utilizó el método de linealización de Lineweaver-Burk se determinó el inverso tanto de la actividad específica como de la concentración de sustrato y los datos obtenidos se presentan en la figura 31.

De acuerdo con la ecuación de la recta obtenida se llevó a cabo la determinación de las constantes de Michaelis. Menten. Los valores obtenidos fueron 109.72 U/mg y 0.11 mM correspondientes a V_{max} y K_m respectivamente.

Los datos obtenidos para el caso de las endocelulasas fueron los siguientes; 61.88 (U/mg) para V_{max} y 0.048 mM para el caso de K_m .

Por último para el caso de exocelulasas se obtuvo un valor de 18.535 U/mg para V_{max} y 0.123 mM para el valor de la constante K_m .

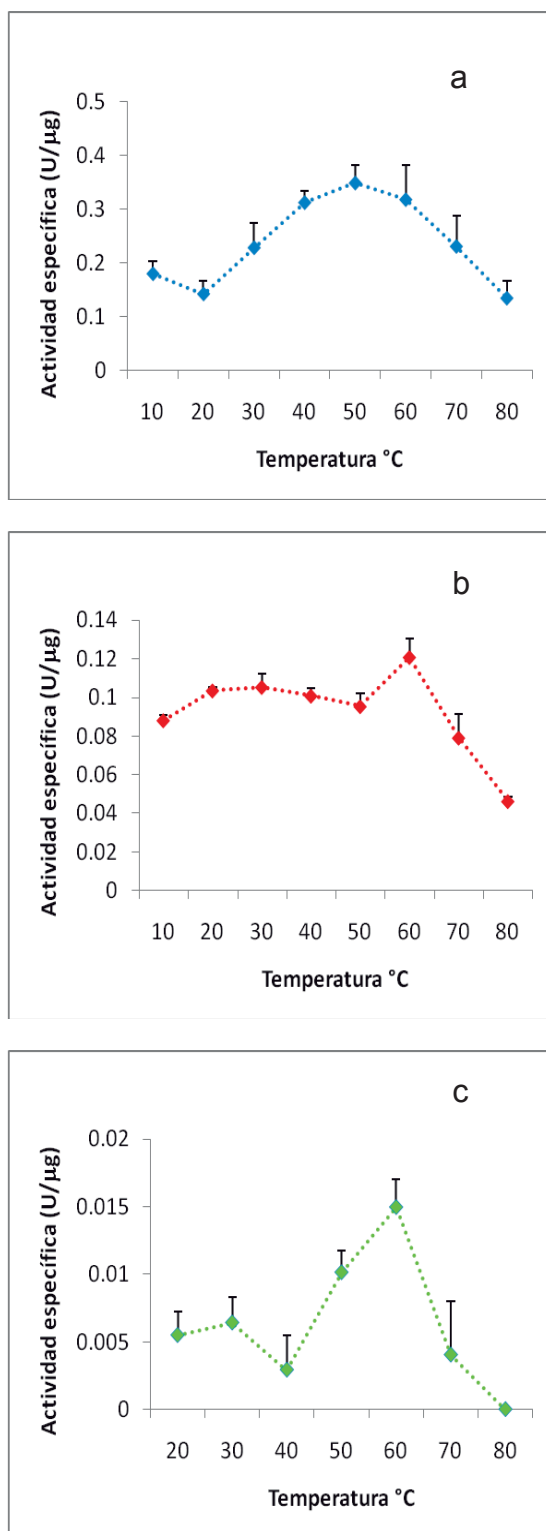


Figura 28. Efecto de la temperatura en la actividad específica de celulasas obtenidas por el asilado fúngico *P. stromaticum*. (a) β-glucosidasas, (b) endocelulasas y (c) exocelulasas

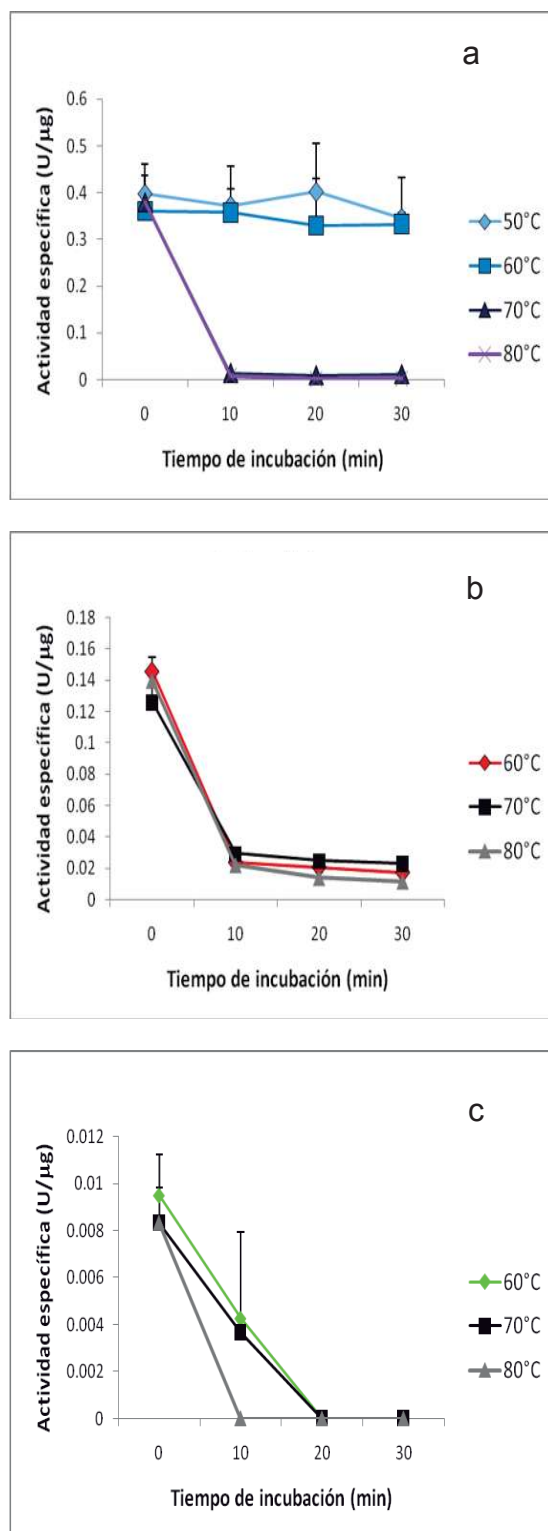


Figura 29. Estabilidad térmica de celulasas obtenidas por el asilado fúngico *P. stromaticum*. (a) β-glucosidasas, (b) endocelulasas y (c) exocelulasas

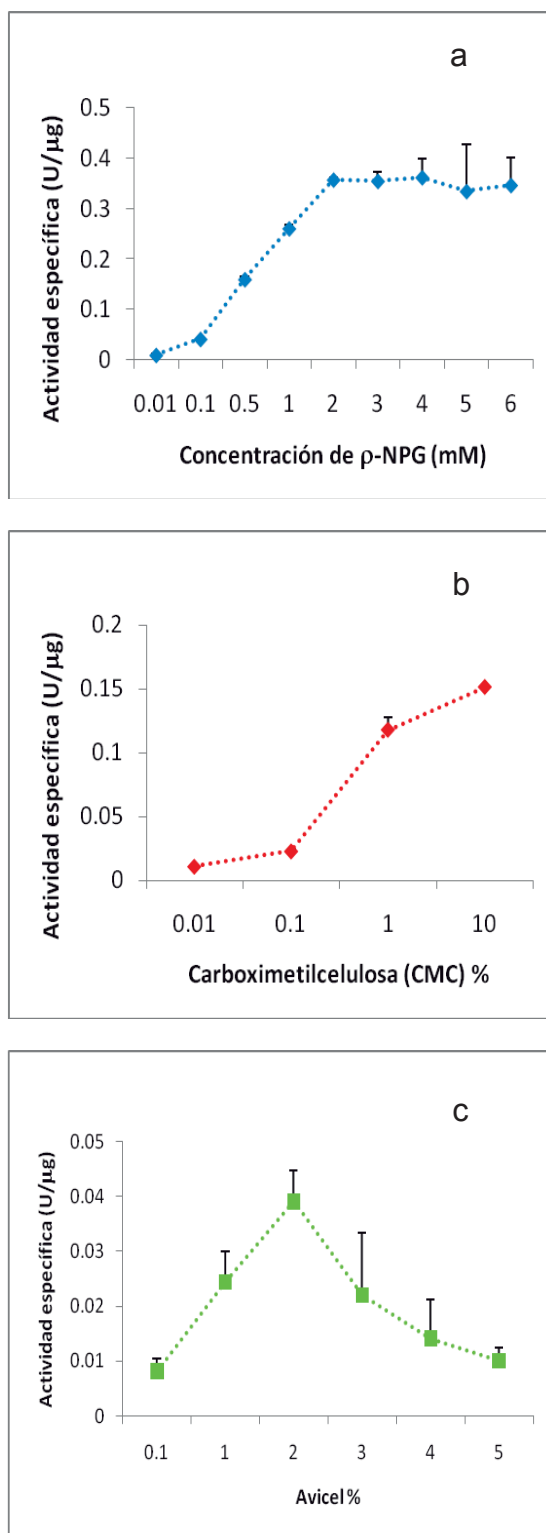


Figura 30. Efecto de la concentración de sustrato de las celulasas obtenidas por el asilado fúngico *P. stromaticum*. (a) β -glucosidasas, (b) endocelulasas y (c) exocelulasas

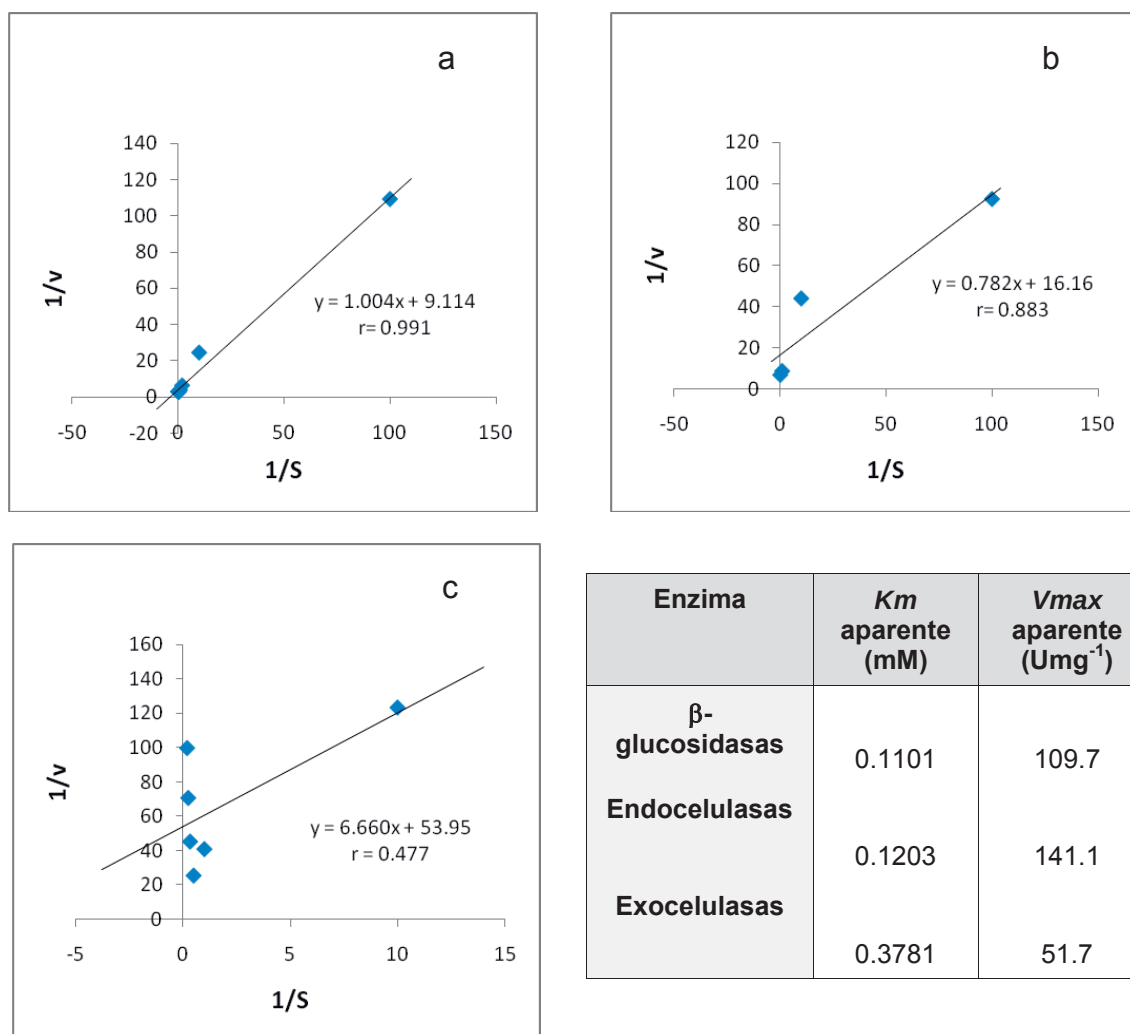


Figura 31. Determinación de las constantes cinéticas aparentes de las celulasas obtenidas por el asilado fúngico *P. stromaticum* mediante el método de linelización Linewaver-Burck. (a) β-glucosidasas, (b) endocelulasas y (c) exocelulasas.

Los datos obtenidos de K_m y V_{max} de las celulasas obtenidas por *P. stromaticum* fueron comparadas con las de otros hongos reportados como productores de celulasas y los resultados se presentan en el cuadro 23. Claramente se observa que los valores de los parámetros cinéticos obtenidos en este trabajo son menores a los de otras celulasas reportadas.

Cuadro 23. Valores de Km y Vmax de celulasas obtenidos por diferentes aislados fúngicos

Hongo	Km (Mm)	Vmax (U/mg)	Referencia
β-glucosidasas			
<i>Aspergillus niger</i>	21	199	Yan y Lin, 1996.
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	1.1	33	Lymar y col., 1995
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	11.87	1.86	Flores, 2004.
<i>Penicillium purpurogenum</i>	5.1	934	Jeya y col., 2010
<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	0.11	109.7	Este trabajo
Endocelulasas			
<i>Sclerotium rolfsii</i>	2.5	N/R	Sadana y col., 1984.
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	0.93	333.3	Flores, 2004.
<i>Polyporus arcularius</i>	0.35	N/R	Ishihara y col., 2005
<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	0.048	61.88	Este trabajo
Exocelulasas			
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	2.1	N/R	Uzcategui y col., 1991
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	0.28	9.95	Flores, 2004.
<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	0.123	18.535	Este trabajo

DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

Actualmente la obtención de enzimas con atributos fisicoquímicos que las hagan más estables es una meta no alcanzada. Debido a ello cuatro líneas de investigación han sido desarrolladas para completar este objetivo. Estas cuatro líneas son encaminadas hacia el diseño proteico, la modificación de la enzima, la variación de las condiciones del medio enzimático de trabajo y por último la evolución dirigida. Estas aproximaciones experimentales presentan un denominador común, requieren como conocimiento básico el adquirido a través de estudiar nichos ecológicos inexplorados con la finalidad de obtener nuevos organismos que produzcan enzimas.

El aislamiento de nuevas enzimas de organismos vivos que se desarrollan en condiciones ambientales extremas (extremófilos), es la estrategia experimental primaria en la obtención de enzimas más estables. Una de las condiciones extremas de crecimiento ambiental que presentan algunos hongos se genera en la interacción con la planta. Muchos hongos tienen la capacidad de degradar el tejido vegetal con la finalidad de obtener carbohidratos que son utilizados en su crecimiento y desarrollo. Esta interacción se da de la siguiente manera; la planta produce proteínas y metabolitos secundarios como un mecanismo de defensa para abatir a las enzimas degradadoras que produce el hongo. Esta condición selectiva puede conducir hacia la selección de hongos resistentes a los metabolitos secundarios de defensa vegetal y a la obtención de enzimas líticas únicas.

Utilizando este enfoque, inicialmente se realizó una búsqueda en un grupo de hongos fitopatógenos aislados de cultivos vegetales económicamente importantes en la región, de aquel o aquellos que tuviesen una actividad celulolítica notable y en cuyos componentes enzimáticos la β -glucosidasa fuese la más activa. Se utilizó un ensayo cualitativo confiable que permitió manejar un gran número de aislados fúngicos en un tiempo relativamente corto. Este ensayo utiliza al colorante rojo congo (Sazci y col. 1987), el cual debido a su estructura química conformada por la presencia de grupos amino es capaz de interaccionar con los grupos hidroxilo del polisacárido formando puentes de hidrógeno como se observa en la figura 32. Las zonas donde el aislado fúngico haya tenido la capacidad de degradar la carboximetilcelulosa, el colorante no podrá unirse provocando de esta manera zonas decoloradas las cuales pueden ser observadas directamente.

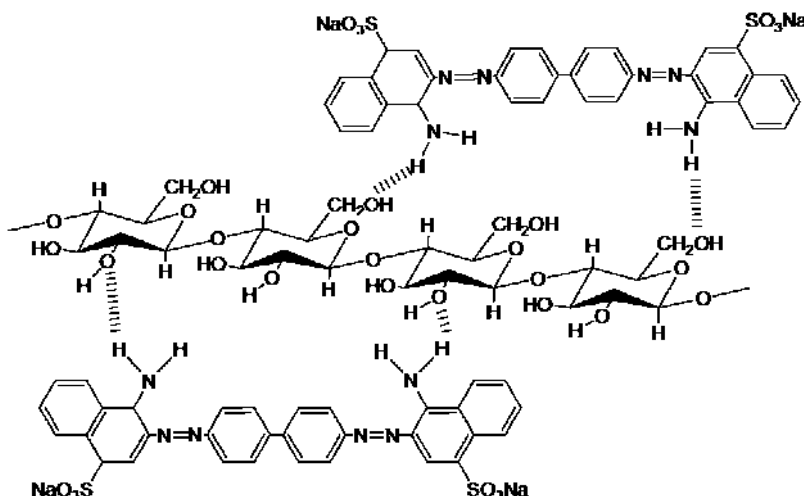


Figura 32. Interacciones químicas (puentes de hidrógeno) generadas entre los grupos hidroxilo del polisacárido celulosa y entre los grupos amino del colorante rojo congo (Samiey y Rafidargahi, 2010)

..

Los resultados obtenidos a partir de las tinciones realizadas fueron utilizadas para llevar a cabo la determinación de un índice celulolítico. El halo de crecimiento se determinó antes de llevar a cabo la tinción y el halo de degradación fue determinado después de llevar a cabo la tinción. Los resultados obtenidos presentaron dos valores posibles, el primero donde el índice celulolítico fuera igual a 1 y el segundo donde se obtuviera un valor mayor a 1.

Para el primer caso ($IC=1$) indica que ambos halos son iguales, es decir que el aislado fúngico crece a la misma velocidad que degrada el polisacárido. El segundo escenario ($IC>1$) indica que el aislado fúngico degrada con mayor facilidad el polisacárido con respecto al crecimiento que presenta, condición que es la esperada para seleccionar una cepa que produzca enzimas degradadoras de celulosa. Con los resultados de IC obtenidos se llevó a cabo la selección de un conjunto de microorganismos los cuales presentaron los valores mayores de IC . En la mayoría de los casos no se observaron diferencias estadísticas entre los 26 aislados fúngicos, sin embargo se determinó seleccionar a aquellos que numéricamente presentaran un índice celulolítico mayor a 1.5, lo cual indica que el halo de degradación es 50% mayor comparado con el halo de crecimiento. Un valor mayor de halo de degradación indica que el aislado fúngico excretó enzimas que degradaron al polisacárido. Con el procedimiento de la tinción con rojo congo se lograron seleccionar un conjunto de hongos iniciales los cuales podrían ser candidatos potenciales para producir celulasas, sin embargo, debido a que éste primer parámetro de selección es una apreciación semi-cualitativa de la producción de celulasas se llevó a cabo un segundo criterio de selección.

Como siguiente parámetro se llevó a cabo el crecimiento en medio líquido de los 15 aislados fúngicos seleccionados a partir del IC. Este experimento consistió en la preparación de un medio líquido Mandels (1975) modificado, que contenía los mismos elementos que el medio sólido utilizado para llevar a cabo la tinción a excepción del agar bacteriológico para evitar la solidificación. Los cultivos se inocularon de la misma manera, con un propágulo de micelio, y se dejaron incubar durante el mismo período que fueron 5 días. Las muestras obtenidas fueron utilizadas para cuantificar espectrofotométricamente la actividad específica de celulasas: β -glucosidasas, endocelulasas y exocelulasas. Con esta apreciación cuantitativa de la producción de enzimas de los aislados fúngicos pudimos observar que diferentes perfiles de producción enzimática fueron producidos por los distintos aislados fúngicos analizados, sin embargo destacó el hongo LPLM10 el cual para los tres casos de producción enzimática presentó los valores mayores de enzima obtenidos.

Con la finalidad de llevar a cabo un proceso de selección detallado y observar las relaciones generadas por el conjunto de variables, se realizó un análisis de correspondencia, el cual es una técnica estadística cuya finalidad es poner de manifiesto gráficamente las relaciones de dependencia existentes entre dos o más variables categóricas a partir de la información proporcionada por sus tablas de frecuencias cruzadas.

Para esta investigación se llevó a cabo el análisis entre las variables generadas a partir de los resultados obtenidos del escrutinio de aislados fúngicos. Las variables analizadas fueron; la producción de β -glucosidasas, endocelulasas, exocelulasas, índice celulolítico, crecimiento del aislado fúngico (proteína intracelular) y el contenido de proteína extracelular en el medio de cultivo. El índice celulolítico fue obtenido a partir del primer criterio de selección con el colorante rojo congo al quinto día de crecimiento, por otra parte, la producción de las enzimas, el crecimiento y el contenido de proteína extracelular fueron determinadas en medio de cultivo líquido al quinto día de incubación.

La matriz de datos analizada estuvo conformada por las 6 variables anteriormente descritas y cada uno de los aislado fúngicos fue considerado como un tratamiento independiente.

De acuerdo con el análisis de las gráficas obtenidas se observó que las β -glucosidasas conformaron un grupo totalmente aislado con respecto a las demás variables analizadas, por lo tanto fueron consideradas como la variable determinante para llevar a cabo la selección. Con respecto a la distribución generada de los aislados fúngicos analizados, se obtuvo que LPLM10 presentó una influencia directa de la variable β -glucosidasas. Con estas dos observaciones

llegamos a la conclusión de que LPLM10 es un buen candidato para llevar a cabo la caracterización de su complejo celulolítico debido a que presentó un mayor efecto de la variable β -glucosidasas en el análisis realizado.

Encontrar cepas que produzcan complejos celulolíticos con elevada producción de β -glucosidas tiene una gran importancia debido a que estas enzimas son un factor determinante para llevar a cabo la hidrólisis de la celulosa. La especie fúngica mayormente utilizada para la obtención de celulasas es *Trichoderma reesei*, su complejo celulolítico esta conformado por una gran cantidad tanto de endo y exocelulasas, sin embargo las β -glucosidasas son inhibidas por el producto final de la hidrólisis, la glucosa (Kumar, 2008). Sin embargo, el complejo obtenido por LPLM10 no presentó inhibición de estas enzimas y los valores de producción sobrepasaron los obtenidos por los demás aislados fúngicos, por lo tanto fue seleccionado para caracterizar sus celulasas.

En la selección, no se contaba con la caracterización taxonómica del aislado fúngico LPLM10 por lo que se procedió a determinarla mediante técnicas de biología molecular secuenciando sus regiones de transcripción interna, ITS (debido a sus siglas en inglés).

Las regiones ITS del ADN ribosomal nuclear son altamente conservadas dentro de especies y por lo tanto son consideradas como marcadores genéticos para la identificación de las mismas (Baldwing y col., 1955; Qin y col., 2010). Actualmente son las regiones de ADN mayormente secuenciadas en hongos (<http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>). Para llevar a cabo la secuenciación fueron utilizados oligonucleótidos universales ITS4 e ITS5.

Con las secuencias obtenidas se realizó un análisis filogenético a partir de secuencias homólogas de la base de datos NCBI mediante un alineamiento tipo BLAST. Primeramente se realizó el cladograma con diferentes especies del género *Pseudofusicoccum* donde encontramos un 99% de homología de la secuencia problema LPLM10 con la especie *Pseudofusicoccum stromaticum* msy52mgi. Cabe destacar que el 1% restante fue atribuido a las diferencias generadas en el cladograma que se llevó a cabo intra especies donde observamos una alta variabilidad entre diferentes secuencias reportadas de *P. stromaticum*.

Esta especie pertenece a la familia *Botryosphaeriaceae*, la cual presenta una distribución cosmopolita y sus especies infectan hospederos de diferentes géneros de plantas monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas. Las especies pertenecientes a la familia *Botryosphaeriaceae* infectan principalmente los tallos, ramas y hojas de plantas leñosas. Estos hongos incluyen patógenos oportunistas que dan lugar a síntomas tales necrosis de tallo y raíz.

Los miembros de la familia *Botryosphaeriaceae* producen ascas y ascosporas en pseudotecios (teleomorfo) o bien conidios que son producidos en conidiomas, los cuales son generalmente pigmentados, como los presentes en especies de *Diplodia* o bien de forma como hialino en especies de *Fusicoccum* (anamorfo).

Esta familia de hongos ha tenido una clasificación taxonómica confusa, debido a que los nombres propuestos fueron vinculados inicialmente a sus hospederos y su clasificación realizada en base a sus características morfológicas.

La aparición del análisis filogenético basado en la obtención de las secuencias de ADN, ha permitido una mejora en la clasificación taxonómica de las *Botryosphaeriaceae* (Slippers y col., 2004; Crous y col. 2006).

Los teleomorfos de esta familia rara vez se observan en la naturaleza o en condiciones de laboratorio, por tanto, no son una buena opción para llevar a cabo una clasificación taxonómica (Slippers y col. 2004). La morfología de los anamorfos, es usualmente utilizada para identificar a las especies de *Botryosphaeriaceae*, sin embargo no pueden ser utilizadas para clasificar especies estrechamente relacionadas (Denman y col. 2000; Slippers y col. 2004); por esta razón las comparaciones en base a las secuencias de ADN han llevado a una re-evaluación de la familia *Botryosphaeriaceae*, y numerosas especies nuevas han sido propuestas (Denman y col. 2000; Pavlic y col. 2004; Slippers y col. 2004; Phillips y col., 2005; Crous y col., 2006).

Diferentes especies de *Botryosphaeriaceae* han sido aisladas de tejidos vegetales sanos y con signos de enfermedad, en ambos casos a partir de los mismos hospederos (Pavlic y col. 2004; Slippers y col., 2005; Mohali y col. 2006;). Ha sido demostrado que los endófitos aislados de tejido sano también causan signos de enfermedad (Pavlic y col. 2004). Muchas de estas especies se conocen como patógenos oportunistas los cuales presentan una etapa latente como endófitos (Slippers y col. 2005). La actividad patogénica de las especies de *Botryosphaeriaceae*, aumenta debido a la variación en los factores ambientales, por ejemplo cuando las condiciones climáticas son extremadamente secas (Denman y col., 1999).

En el año de 2006 Crous y col. llevaron a cabo un estudio de clasificación taxonómica de distintas especies de la familia de *Botryosphaeriaceae*, el objetivo principal de este estudio fue emplear los datos obtenidos a partir de la secuencias de ADN ribosomal 28S de distintas especies de la familia para resolver los problemas relacionados con los linajes filogenéticos. A partir de este análisis se generaron, 12 clados y nuevas especies fueron re-clasificadas.

Uno de los nuevos clados analizados dentro de este trabajo es donde se encuentra nuestra especie de estudio *P. stromaticum*, el cual pertenece al clado número 7 donde se encuentran especies de "*Fusicoccum*". Las especies que conforman este clado fueron aisladas y descritas por primera vez en Venezuela, de los árboles de acacia y eucalipto. El taxón se distingue de otras especies de *Fusicoccum* en función de la forma y las pocas conidiomas que presenta, las cuales son grandes, tienen la capacidad de crecer a 35° C, y son de pared gruesa y se encuentran cubiertas de una pared mucosa, la cual está ausente en otras especies de *Fusicoccum*.

La morfología reportada por Crous y col en el 2006 para la especie *P. stromaticum* se presenta en la figura 33. Las características morfológicas de la cepa con la que se llevó a cabo nuestra experimentación se presentan en la figura 21 en la sección de resultados. En nuestras observaciones no fueron determinadas los conidios reportados por Crous en el 2006 por lo tanto consideramos que como perspectiva es necesario determinar condiciones de crecimiento donde la cepa induzca la formación de estructuras reproductivas para llevar a cabo una clasificación taxonómica completa.

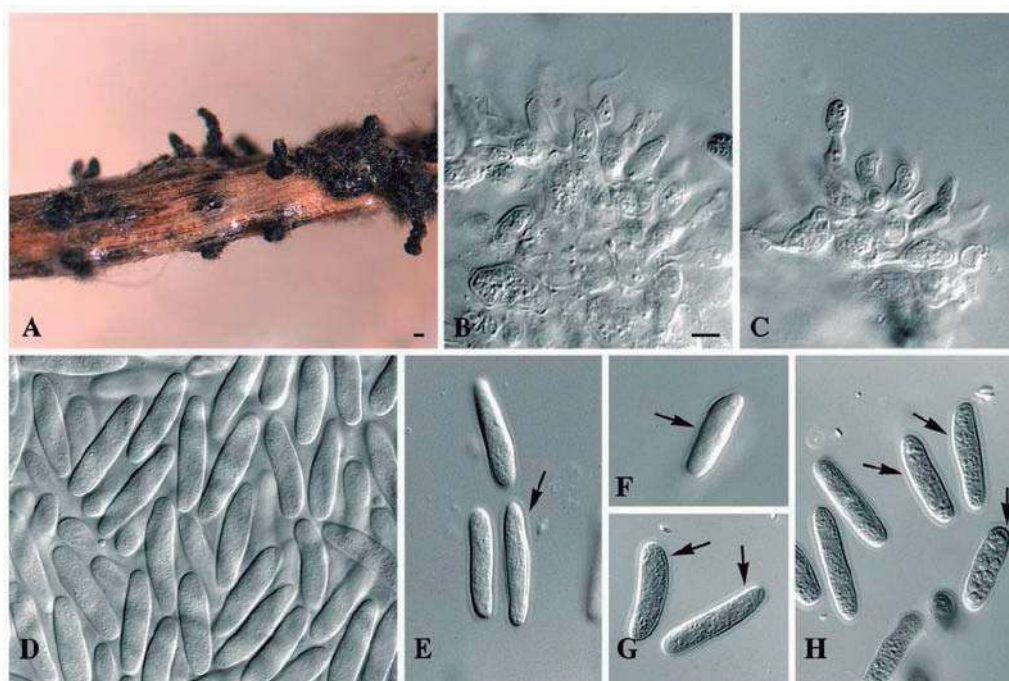


Figura 33. *Pseudofusicoccum stromaticum* (CBS 117448). A. Picnidios. B–C. Celulas conidiogenas. D–H. Conidias (las flechas indican la capa mucosida que rodea a las conidas). Escala de las barras A = 90 μ m, B = 6 μ m (Tomada de Crous y col., 2006).

Por otra parte se llevó a cabo una revisión bibliográfica para determinar si no se contaba con reportes sobre la actividad celulolítica generada a partir de esta

especie y no fueron encontrados, por lo tanto este trabajo es el primero en estudiar su complejo celulolítico en condiciones controladas.

Para determinar las condiciones óptimas de la obtención de celulasas se llevaron a cabo dos tipos de crecimiento diferentes; uno en medio líquido con agitación y otro en medio sólido sin agitación. Como fuentes de carbono se utilizaron dos tipos de celulosa la tipo 20 y 101, además del algodón como sustrato sólido. También se determinó la fuente de nitrógeno adecuada para la obtención de las celulasas y con los resultados obtenidos se llevó a cabo un experimento ortogonal en el cual se analizaron los distintos factores involucrados en la fermentación, de esta manera se determinaron las condiciones óptimas de producción.

La producción de celulasas tanto para medio sólido como para medio líquido fue diferente. Observamos que para el caso en medio líquido la producción de β -glucosidasas disminuyó significativamente un 86% con respecto al valor mayor generado en medio sólido, es decir para producir β -glucosidasas el mejor tipo de crecimiento fue en medio sólido. Para el caso de endo y exocelulasas el comportamiento observado fue diferente; la mayor producción para los dos casos fueron observadas en medio líquido sin embargo la producción disminuyó 67% y 94% respectivamente en medio sólido, por lo tanto la mejor producción de estas dos enzimas se generó en la condición de crecimiento en medio líquido. Este tipo de comportamiento nos habla de una adaptación diferente en las condiciones de crecimiento, para *P. stromaticum*. Las dos condiciones analizadas son buenas y producen un complejo celulolítico diferente, lo cual se presenta como una ventaja biotecnológica para la utilización del hongo en la producción de enzima. Sin embargo fue seleccionada la condición en la que las β -glucosidasas no presentaron inhibición, la cual fue en el crecimiento sólido. Debido a que de acuerdo con el análisis estadístico realizado se determinó que las β -glucosidasas son una variable de importancia en la producción de celulasas.

Otra de las variables que fue analizada para poder determinar los factores que intervienen en la producción de celulasas fue la fuente de nitrógeno añadida al medio de cultivo, fueron analizadas diferentes fuentes de nitrógeno tanto inorgánicas como orgánicas, sin embargo se observó que la adición de nitrato de potasio únicamente para los tres casos de enzima indujo una mayor producción de celulasas para los tres casos por lo tanto fue seleccionada como la fuente de nitrógeno adecuada. Dentro de nuestro equipo de investigación Calderón en el 2009 determinó, las condiciones de crecimiento óptimas para la producción de celobiosa deshidrogenasa por el aislado fúngico fitopatógeno *C. lindemuthianum* donde se presentó que la mayor producción de celobiosa deshidrogenasas fue

obtenida con la adición de nitrato de potasio al medio de cultivo. Cabe destacar que la celobiosa deshidrogenasa es un enzima que también pertenece al metabolismo y degradación de la celulosa, por lo tanto corroboramos que el nitrato de potasio como fuente de nitrógeno es esencial para la producción de enzimas celulolíticas.

La producción de enzimas celulolíticas por el aislado fúngico *P. stromaticum* fue posteriormente optimizado utilizando un diseño experimental Taguchi con la finalidad de obtener la combinación específica de los factores que afectan a la producción de enzima.

El diseño experimental utilizado se basa en el estudio de procesos, los cuales pueden considerarse como una caja negra a la cual ingresan diversas variables que interactúan para producir un resultado. Las variables que ingresan al proceso se denominan variables de entrada, y el resultado, variable de salida. El nivel de la variable de salida depende de los niveles que adopten las variables de entrada, y por lo tanto en los procesos es importante explorar la combinación de variables de entrada que producen la variable de salida óptima. La búsqueda de las combinaciones óptimas de las variables de entrada da lugar al diseño experimental, que es una prueba (o un conjunto de pruebas) en la cual se realizan cambios sistemáticos y controlados a las variables de entrada para medir el efecto sobre la variable de salida. El diseño experimental utiliza técnicas como la regresión múltiple, la respuesta superficial y el análisis de varianza.

Para llevar a cabo la optimización de las condiciones de producción de celulasas fueron analizados 4 factores; las concentraciones de sustrato sólido (algodón) y de celulosa, la concentración de la fuente de nitrógeno añadida y la cantidad de inóculo, estos factores fueron analizados en tres niveles diferentes utilizando un arreglo ortogonal L9, este número indica la cantidad de corridas experimentales que deben llevarse a cabo. Las variables de respuesta analizadas fueron la producción de las tres enzimas del complejo celulolítico; β -glucosidasas, endocelulasas y exocelulasas.

En el análisis de datos, se evaluaron los promedios de las variables de respuesta obtenidas por cada corrida del experimento ortogonal y se analizó la variación de los resultados con una relación señal/ruido o número S/N que genere la maximización de la variable de respuesta. En los experimentos Taguchi dos tipos de factores son delimitados; aquellos que pueden ser controlados por el investigador (factores de control), y los factores inherentes que no pueden ser controlados directamente (factores ruido). La proporción señal/ruido es un índice de robustez de calidad, y muestra la magnitud de la interacción entre factores de control y factores de ruido. Este valor se representa en escala logarítmica. De

acuerdo con este análisis se consideran como óptimos los niveles de los factores que maximicen la relación S/N (Número S/N = Factores control/ Factores ruido).

Las gráficas obtenidas para cada una de las variables de respuesta nos indicaron los niveles óptimos de cada uno de los factores analizados. Para el caso de β -glucosidasas los niveles de cada factor fueron; concentración de algodón, nivel 2, concentración de celulosa, nivel 1; fuente de nitrógeno, nivel 3 y cantidad de inóculo nivel 2. Para endocelulasas los niveles óptimos fueron 2, 1, 3, 3 y para el caso de exocelulasas 2, 2, 1,3, respectivamente. Observamos que para el caso de β -glucosidas y endocelulasas los niveles óptimos fueron similares y únicamente presentaron diferencias en la concentración de inóculo añadida, lo que nos indica que estas enzimas son producidas en condiciones de crecimiento similares. La producción de exocelulasas presentó mayores diferencias entre los factores analizados, ya que la concentración de celulosa y la cantidad de nitrógeno cambiaron con respecto a los valores obtenidos para endo y exocelulasas, indicándonos que estas enzimas son más sensibles a las condiciones de crecimiento. Podría suponerse que las condiciones de crecimiento óptimas fueran iguales para los tres casos sin embargo los datos obtenidos indican que existen variaciones entre ellas, sin embargo esto quedó mayormente entendido al analizar por separado los parámetros fisicoquímicos afectaron a la actividad específica de las celulasas obtenidas.

Con la determinación de las condiciones óptimas se prepararon medios de cultivo en estas condiciones de crecimiento y las celulasas obtenidas fueron analizadas en cuanto a los efectos que ejercieron el pH, la temperatura, y la concentración de sustrato.

En cuanto al efecto del pH se observó que para los tres casos de enzima el intervalo óptimo correspondieron a los valores de pH reportados para otras celulasas. El pH óptimo de las β -glucosidasas se presentó entre 4-4.5, para endocelulasas fue entre 4.5-5 y para exocelulasas fue delimitado entre 3.5-4.5. Estos valores corresponden a los reportados por Dashtban y col en el 2009 quien reporta pH óptimos de endo y exocelulasas entre 4-5, para β -glucosidasas reporta que el valor de pH puede ser variable debido a que las enzimas presentan ser intracelulares, extracelulares o adheridas a la pared celular.

Las temperaturas óptimas reportadas por Dasthban y col., 2009, para β -glucosidasas es de 45-75°C, para endocelulasas de 50-70 °C y para exocelulasas de 37-60°C. Para este estudio las temperaturas óptimas para β -glucosidasas, endocelulasas y exocelulasas fueron de 50°C, 60°C y 60 °C respectivamente los cuales se encuentran dentro de los intervalos reportados.

En base a las temperaturas óptimas obtenidas se llevó a cabo un ensayo de estabilidad térmica donde las enzimas fueron analizadas en diferentes intervalos de tiempo y la actividad enzimática residual fue medida. Se observó que para las β -glucosidasas la actividad específica se mantuvo en la temperatura óptima que

fue 50 °C y también a 60°C lo que indica que estas enzimas son termoestables. Esta termoestabilidad es comparable con lo reportado para β -glucosidasas de hongos mesófilos (Woodward y col., 1982) Especies del género *Aspergillus* han sido ampliamente estudiados por su capacidad de producción de β -glucosidasas. En el 2001 Jager y col., publicaron un análisis de las características fisicoquímicas de β -glucosidasas producidas por tres especies de *Aspergillus* (*A. phoenicis*, *A. niger* y *A. carbonarius*). En el análisis de estabilidad térmica determinaron que, una exposición a 50°C durante 2 horas mantuvo la actividad residual al 100% para las enzimas de los tres casos analizados. Sin embargo cuando la temperatura aumentó a 60°C la actividad residual de las β -glucosidasas disminuyó un 13%, para el caso de *A. phoenicis*, 47% para el caso de *A. carbonarius* y 36 % para *A. niger*. Estos datos contrastan por lo reportado en éste trabajo ya que las β -glucosidasas producidas por *P. stromaticum* en 60°C mantuvieron su actividad específica lo que nos indica mayor estabilidad térmica. Sin embargo para endo y exocelulasas se observó una disminución en la actividad específica lo que indica que son enzimas sensibles a la exposición a la temperatura en intervalos de tiempo cortos.

El análisis en cuanto al efecto que ejerce la concentración de sustrato en los perfiles de β -glucosidasas y endocelulasas encontramos que no generaron una inhibición por sustrato, sin embargo para el caso de exocelulasas se observó una clara inhibición lo cual indica que son enzimas sensibles a concentraciones elevadas de sustrato. Cabe destacar que el perfil observado de β -glucosidasas sugiere que las enzimas no presentan inhibición por producto final, esta característica es importante para la aplicación industrial, de las β -glucosidasas, debido a que la mayoría de estas enzimas microbianas son sensibles a la inhibición por glucosa (Woodward y col., 1982; Gueguen y col., 1995; Bothast y col., 1997; Riou y col., 1998)

De acuerdo con los valores obtenidos para el efecto de la concentración de sustrato se determinaron las constantes cinéticas aparentes de las celulasas obtenidas, los valores de V_{max} y K_m obtenidos para cada uno de los casos de las celulasas fueron para β -glucosidasas 109.72 U/mg y 0.11 mM; endocelulasas 61.88 y 0.048 y exocelulasas 18.535 U/mg y 0.123 mM respectivamente. De acuerdo con la revisión realizada de los parámetros fisicoquímicos obtenidos de otras celulasas los valores indican una mayor afinidad hacia los sustratos analizados. Por ejemplo; comparando los resultados obtenidos para el complejo celulolítico del hongo fitopatógeno *C. lindemuthianum* en los tres casos tanto la K_m como la V_{max} obtenidas fueron menores. Cabe destacar que la K_m de las β -glucosidasas de *P. stromaticum* (K_m = 0.11 mM) fue menor comparada con la K_m de las β -glucosidasas de *Aspergillus niger* (K_m = 21 mM); uno de los hongos ampliamente estudiados para la obtención de estas enzimas.

Este trabajo permitió llevar a cabo la selección de un aislado fúngico del cual no había sido reportada su actividad celulolítica. El complejo celulolítico obtenido presentó una incrementada producción de β -glucosidasas las cuales son enzimas importantes en los procesos de hidrólisis. Los parámetros fisicoquímicos de las β -glucosidasas obtenidas nos indican que presentan un elevado potencial para su uso a nivel industrial debido a que no presentaron inhibición por sustrato y presentaron termoestabilidad, ambas características son importantes para la aplicación a nivel industrial. El crecimiento en medio sólido fue seleccionado como la mejor forma de crecimiento para la producción de enzimas, esta forma de crecimiento presenta ventajas con respecto al crecimiento en medio líquido, por lo tanto también es una ventaja para su aplicación a gran escala. Debido a que no se contaba con la caracterización taxonómica de este aislado fúngico se llevó a cabo la secuenciación de sus ITS cuyos resultados ayudaron a la aproximación taxonómica del mismo, *P. stromaticum*, esta especie no ha sido reportada en cuanto a su capacidad celulolítica por lo tanto este es el primer reporte y propone a esta especie como una nueva opción para la producción de β -glucosidasas.

CONCLUSIÓN

El aislado fúngico fitopatógeno *P. stromaticum* en condiciones controlados produjo un complejo celulolítico, el cual presentó una actividad enzimática elevada de β -glucosidasas.

9. REFERENCIAS

- Adelin E., N. Slimani, S. Cortial, I. Schmitz-Alfonso y J. Ouazzani. 2011. **Platotex: an innovative and fully automated device for cell growth scale-up of agar-supported solid-state fermentation.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 38:299–305.
- Aro N., T. Pakula y M. Penttilä. 2005. **Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi.** *FEMS Microbiology Reviews* 29:719–739.
- Baldrian P. y V. Valaskova. 2008. **Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi.** *FEMS Microbiology Reviews* 32:501-521.
- Baldwin B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojcickowski, C. S. Campbell y M. J. Donoghue. 1995. **The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny.** *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 82(2):247-277.
- Bartnicki-García S. y W. J. Nickerson. 1962. **Nutrition, growth and morphogenesis of *Mucor rouxii*.** *Journal of Bacteriology* 84:841-858.
- Béguin P. y J. P. Aubert. 1994. **The biological degradation of cellulose.** *FEMS Microbiology Reviews* 13:25-58.
- Bernfeld P. 1955. **Amylase, α and β .** En Colowick, S. P. & Kaplan, N. O. (Ed) **Methods in Enzymology.** New York Academic Press pp. 149-150
- Bisaria V. S. y T. K. Ghose. 1981. **Biodegradation of cellulosic material: substrate, microorganism, enzyme and products.** *Enzyme and Microbial Technology* 3:91–104.
- Boisset C., C. Fraschini, M. Schülein, B. Henrissat y H. Chanzy. 2000. **Imaging the enzymatic digestion of bacterial cellulose ribbons reveals the endo character of the cellobiohydrolase Cel6A from *Humicola insolens* and its mode of synergy with cellobiohydrolase Cel7A.** *Applied and Environmental Microbiology* 66:1444-1452.
- Bothast R. J. y B. C. Saha. 1997. **Ethanol production from agricultural biomass substrates.** *Advances in Applied Microbiology* 44:261–286.
- Camacho N. A. y O. G. Aguilar. 2003. **Production, purification and characterization of a low molecular mass xylanase from *Aspergillus* sp.**

- and its application in bakery.** *Applied Biochemistry Biotechnology* 104:159–172.
- Cai Y. J., S. J. Chapman, J. A. Buswell y S. T. Chang. 1999. **Production and distribution of endoglucanase, cellobiohydrolase, and β -glucosidase components of the cellulolytic system of *Volvariella volvacea*, the edible straw mushroom.** *Applied and Environmental Microbiology* 65:553-559.
- Calderón Oropeza M. A. 2009. **Caracterización parcial de la celobiosa deshidrogenasa de *Colletotrichum lindemuthianum*.** Tesis de maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Cao W. G. y D. L. Crawford. 1993. **Purification and some properties of β -glucosidase from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* strain Smf.** *Canadian Journal of Microbiology* 39:125-129.
- Chahal D. S. 1985. **Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production.** *Applied and Environmental Microbiology* 49:205-210.
- Crous P. W., B. Slippers, M. J. Wingfield, J. Rheeder, W. F. O. Marasas, A. J. L. Philips. 2006. **Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*.** *Studies in Mycology* 55:235–253.
- Cuervo L., J. L. Folch y R. E. Quiroz. 2009. **Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol.** *BioTecnología* 13:11-25.
- Czaja W. K., D. J. Young, M. Kawecki y R. M. Brown. 2007. **The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications.** *Biomacromolecules* 8:1-12.
- Das K, A. Solehah, V. T. Balaumani y M. A. Amiza. 1994. **Enzymes for improved extraction and stabilization of colour and flavour of orange juice.** *Journal of Food Science and Technology* 31:508-510.
- Das M., T. V. Royer y L. G. LeV. 2007. **Diversity of fungi, bacteria, and actinomycetes on leaves decomposing in a stream.** *Applied and Environmental Microbiology* 73:756–767.
- Dashtban M., H. Schraft y W. Qin. 2009. **Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; Opportunities & perspectives.** *International Journal of Biological Sciences* 5: 578-595.
- Denman S., P. W. Crous y M. J. Wingfield. 1999. **A taxonomic reassessment of *Phyllachoraproteae*, a leaf pathogen of *Proteaceae*.** *Mycologia* 91:510–516.

- Denman S., P. W. Crous, J. E. Taylor, J. C. Kang, I. Pascoe y M. J. Wingfield. 2000. **An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny.** *Studies in Mycology* 45:129–140.
- Divne C., J. Stahlberg, T. T. Teeri y T. A. Jones. 1998. **High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50 Å long tunnel of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*.** *Journal of Molecular Biology* 275:309-325.
- Doppelbauer P., H. Esterbauer, W. Steiner, R. M. LaVertty y H. Steinmuller. 1987. **The use of lignocellulosic wastes for production of cellulose by *Trichoderma reesei*.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 26:485–494.
- Duff S. J. B. 1985. **Cellulase and β -glucosidase production by mixed culture of *Trichoderma reesei* Rut C30 and *Aspergillus phoenicis*.** *Biotechnology Letters* 7:185-190.
- Duran P. K. y R. M. Cooper. 1988. **The role of pectinase in vascular with disease as determined by defined mutants of *Verticillium albo-atrum*.** *Physiological and Molecular Plant Pathology* 32:363- 371.
- Eberhart B. M., R. S. Beek y K. M. Goolsby. 1977. **Cellulase of *Neurospora crassa*.** *Journal of Microbiology* 130:181–186.
- Eggleston G. 2007. **Advances in the industrial application of enzymes on carbohydrate-based materials.** En Eggleston G y J. R. Vercellotti (Eds.) **Industrial application of enzymes on carbohydrate-based materials.** ACS Symposium Series, Washington, DC, USA. pp. 1-16.
- Fadel M. 2001. **High-level xylanase production from sorghum flour by a newly isolate of *Trichoderma harzianum* cultivated under solid state fermentation.** *Annals of Microbiology* 51:61-78.
- Flores García A. 2004. **Capacidad celulolítica de *Colletotrichum lindemuthianum* en la fase saprofítica.** Tesis de maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Foreman P. K., D. Brown, L. Dankmeyer, R. Dean, S. Diener, N. S. Dunn-Coleman, et al. 2003. **Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*.** *Journal of Biological Chemistry* 278:31988-31997.

- Gamarra N. N., G. K. Villena y M. Gutiérrez-Correa. 2010. **Cellulase production by *Aspergillus niger* in biofilm, solid-state, and submerged fermentations.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 87 (2):545-551.
- Gueguen Y., P. Chemardin, A. Arnaud y P. Galzy. 1995. **Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from *Botrytis cinerea*.** *Enzyme and Microbial Technology* 78:900–906.
- Guerra G., M. Ramos-Leal, G. Casado, J. Argüelles, M. I. Sánchez, A. M. Manzano, et al. 2006. **Cellulase production with sugarcane straw by *Trichoderma citrinoviride* on solid bed.** *Sugar Tech* 8:30-35.
- Gunju R. K., P. J. Vithayuthil y S. K. Murthy. 1990. **Factors influencing production of cellulases by *Chaetomium thermophile* var. *coprophile*.** *Indian Journal of Experimental Biology* 28:259–264.
- Habu N., K. Igarashi, M. Samejimat, B. Petterson y L. K. E. Eriksson. 1997. **Enhanced production of cellobiose dehydrogenase in cultured of *Phanerochaete chrysosporium* supplemented with bovine calf serum.** *Biotechnology and Applied Biochemistry* 20:97-102.
- Hao J. J., X. J. Tian, F. Q. Song, X. B. He, Z. J. Zhang y P. Zhang. 2006. **Involvement of lignocellulolytic enzymes in the decomposition of leaf litter in a subtropical forest.** *Journal of Eukaryotic Microbiology* 53:193-198.
- Harbak L. y H. V. Thygesen. 2002. **Safety evaluation of a xylanase expressed in *Bacillus subtilis*.** *Food and Chemical Toxicology* 40:1–8.
- Henriksson G., A. Nutt, B. Petterson, J. Stahlberg, G. Johansson y G. Petterson. 1999. **Endoglucanase 28 (Cell12A), a new *Phanerochaete chrysosporium* cellulose.** *European Journal of Biochemistry* 259: 88-95.
- Henrissat B. 1991. **A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities.** *Biochemical Journal* 280(2):309-316.
- Henrissat B. 1994. **Cellulases and their interaction with cellulose.** *Cellulose* 1:169-196.
- Henrissat B. y A. Bairoch. 1993. **New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities.** *Biochemical Journal* 293:781–788.
- Hutnan M., M. Drtil y L. Mrafkova. 2000. **Anaerobic biodegradation of sugar beet pulp.** *Biodegradation* 11:203–211.

- Ilmen M., A. Saloheimo, M. L. Onnela y M. E. Penttilä. 1997. **Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*.** *Applied and Environmental Microbiology* 63:1298-1306.
- Irwing D., D. H. Shin, S. Zhang, K. B. Barr, J. Sakon, A. P. Karplus, et al. 1998. **Roles of the catalytic domain and two cellulose binding domains of *Thermonospora fusca* in cellulose hydrolysis.** *Journal of Bacteriology* 180:1709-1714.
- Ishihara H., K. Imamura, M. Kita, T. Aimi y Y. Kitamoto. 2005. **Enhancement of the viscometric endocellulase activity of *Polyporus arcularius* CMCase IIIa by cellobiose and cello-oligosaccharides.** *Mycoscience* 46:148–153.
- Jäger S., A. Brumbauer, E. Fehér, K. Réczey y L. Kiss. 2001. **Production and characterization of β -glucosidases from different *Aspergillus* strains.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17:455-461.
- Jeffries T. W. 1994. **Biodegradation of lignin and hemicelluloses.** En: Ratledge C. (Ed.) **Biochemistry of microbial degradation.** Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp. 233–277.
- Jeya M., A. R. Joo, K. M. Lee, M. K. Tiwari, K. M. Lee, S. H. Kim, et al. 2010. **Characterization of β -glucosidase from a strain of *Penicillium purpurogenum* KJS506.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 86:1473–1484.
- Kato S., S. Haruta, Z. J. Cui, M. Ishii, A. Yokota e Y. Igarashi. 2004. ***Clostridium straminisolvens* sp. nov., a moderately thermophilic, aerotolerant and cellulolytic bacterium isolated from a cellulose degrading bacterial community.** *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:2043–2047.
- Kaur G., S. Kumar y T. Satyanarayana. 2004. **Production, characterization and application of a thermostable polygalacturonase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* Apinis.** *Bioresource Technology* 94:239–243.
- Ketudat Cairns J. R. y A. Esen. 2010. **β -Glucosidases.** *Cellular and Molecular Life Sciences* 67:3389–340
- Kubicek C. P. 1981. **Release of carboxymethyl-cellulase and β -glucosidase from cell walls of *Trichoderma reesei*.** *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 13:226-231.

- Kubicek C. P. 1992. **The cellulose proteins of *Trichoderma reesei*: structure, multiplicity, mode of action and regulation of formation.** *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology* 45:1-27.
- Kumar R., S. Singh y O. V. Singh. 2008. **Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35:377–391.
- Lowry O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr y R. J. Randall. 1951. **Protein measurement with the folin-phenol reagents.** *Journal of Biological Chemistry* 193:265-275.
- Lykidis A., K. Mavromatis, N. Ivanova, I. Anderson, M. Land, G. DiBartolo, M. Martinez, A. Lapidus, S. Lucas, A. Copeland, P. Richardson, D.B. Wilson, N. Kyrpides. 2007. **Genome sequence and analysis of the soil cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca* YX.** *Journal Bacteriology* 189: 2477-2486
- Lyman E. S., B. Li y V. Renganathan. 1995. **Purification and characterization of a cellulose-binding β -glucosidase from cellulose degrading cultures of *Phanerochaete chrysosporium*.** *Applied and Environmental Microbiology* 61:2976–2980.
- Lynd R., P. Weimer, W. H. Zyl e I. S. Pretorius. 2002. **Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66:506–577.
- Maat J., M. Roza, J. Verbakel, H. Stam, M. J. Santos da Silva, M. Bosse, et al. 1992. **Xylanases and their applications in bakery.** En: Visser J., G. Beldman, M. A. SomerenKusters-van y A. G. J. Voragem (Eds.) **Xylans and xylanases.** Elsevier, Amsterdam, pp 349–360.
- Mandels M. 1975. **Microbiological source of cellulase.** *Biotechnology and Bioengineering Symposium* 5:81-105.
- Mandels M. y E. T. Reese. 1965. **Inhibition of cellulases.** *Annual Review of Phytopathology* 3:85.
- Martínez Anaya C., E. Balcázar López, E. Dantán González y J. L. Folch-Mallol. 2008. **Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética.** *Revista Latinoamericana de Microbiología* 50:119–131.
- Martínez Pacheco M. M., J. Saucedo Luna, A. Flores García, R. E. Martínez Muñoz, J. Campos García. 2009. ***Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. &**

- Magn.) Scrib. is a potential cellulases producer microorganism.** *Revista Latinoamericana de Microbiología* 51: 23-31.
- Martins L. F., D. Kolling, M. Camassola, A. J. Dillon y L. P. Ramos. 2008. **Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates.** *BioresourceTechnology* 99:1417–1424.
- Mejía-Castillo T., F. Mújica-Lengua, A. González Robles y J. Ortega-López. 2002. **Proteínas con afinidad a celulosa: una herramienta en biotecnología.** *Avance y perspectiva* 21:267-271.
- Menon K., K. K. Rao y S. Pushalkar. 1994. **Production of β -glucosidase by *Penicillium rubrum* O stall.** *Indian Journal of Experimental Biology* 32:706–709.
- Miller G. L. 1959. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar** .*Analytical Chemistry* 31:462- 428.
- Mohali S., B. Slippers y M. J. Wingfield. 2006. **Two new *Fusicoccum* species from *Acacia* and *Eucalyptus* in Venezuela, recognized based on morphology and DNA sequences data.** *Mycological Research* 110:405–413.
- Morais H., C. Ramos, N. Matos, E. Forgacs, T. Cserhati, V. Almeida, et al. 2002. **Liquid chromatographic and electrophoretic characterisation of extracellular β -glucosidase of *Pleurotus ostreatus* grown in organic waste.** *Journal of Chromatography B. Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 770:111-119.
- Murray P., N. Aro, C. Collins, A. Grassick, M. Penttila, M. Saloheimo y M. Tuohy. 2004. **Expression in *Trichoderma reesei* and characterization of a thermostable family 3 β -glucosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*.** *Protein Expression and Purification* 38:248-257.
- Navarrete-Bolaños J. L., C. L. Rangel-Cruz, H. Jiménez-Islas, E. Botello-Alvarez y R. Rico-Martínez. 2005. **Pre-treatment effects on the extraction efficiency of xanthophylls from marigold flower (*Tagetes erecta*) using hexane.** *Food Research International* 38:159-165.
- Ovando-Chacón S. L. y K. N. Waliszewski. 2005. **Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos.** *Universidad y Ciencia.* 21 (42): 111-120.

- Pavlic D., B. Slippers, T. A. Coutinho, M. Gryzenhout y M. J. Wingfield. 2004. ***Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa.** *Studies in Mycology* 50:313–322.
- Peña C. y A. F. Gonzáles. 2008. **Evolución dirigida en la generación de biocatalizadores: Biocatalizadores hechos a medida.** *BioTecnología* 12:4–23.
- Percival Zhang Y. H., M. E. Himmel y J. R. Mielenz. 2006. **Outlook for cellulose improvement: screening and selection strategies.** *Biotechnology Advances* 24:452–481.
- Pérez J., A. Muñoz-Dorado, T. De la Rubia y E. Martínez. 2002. **Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview.** *International Microbiology* 5:53–63.
- Pettersen R. C. 1984. **The chemical composition of wood.** En: Rowell R. M. (Ed.) **The chemistry of solid wood.** American Chemical Society, Washington DC, USA, pp 57–126.
- Phillips A. J. L., A. Alves, A. Correia y J. Luque. 2005. **Two new species of *Botryosphaeria* with brown, septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs.** *Mycologia* 97:513–529.
- Polizeli M. L., A. C. Rizzatti, R. Monti, H. F. Terenzi, J. A. Jorge y D. S. Amorim. 2005. **Xylanases from fungi: properties and industrial applications.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 67:577–591.
- Qin Y., H. He, N. Li, M. Ling y Z. Liang. 2010. **Isolation and characterization of a thermostable cellulase-producing *Fusarium chlamydosporum*.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26:1991–1997.
- Rabinovich M. L., M. S. Melnick y A. V. Bolobova. 2002. **The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes.** *Biochemistry* 67(8):850–871.
- Rahman Z., Y. Shida, T. Furukawa, Y. Suzuki, H. Okada, W. Ogasawara, et al. 2009. **Application of *Trichoderma reesei* cellulose and xylanase promoters through homologous recombination for enhanced production of extracellular β -glucosidase I.** *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 73:1083–1089.
- Rajendran A., P. Gunasekaran y M. Lakshmanan. 1994. **Cellulase activity of *Humicola fuscoatra*.** *Indian Journal of Microbiology* 34:289–295.

- Riou C., J. M. Salmon, M. J. Vallier, Z. Günata y P. Barre. 1998. **Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*.** *Applied and Environmental Microbiology* 64:3607–3614.
- Ross P., R. Mayer y M. Benziman. 1991. **Cellulose biosynthesis and function in bacteria.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 55:35-58.
- Rubin E. M. 2008. **Genomics of cellulose biofuels.** *Nature* 454:841-845.
- Sadana J. C., A. H. Lachke y R. V. Patil. 1984. **Endo-(1-4)- β - D-glucanases from *Sclerotium rolfsii* – purification, substrate specificity, and mode of action.** *Carbohydrate Research* 133:297–312.
- Saha B. C. y J. R. Bothast. 1996. **Production, purification and characterization of highly glucose-tolerant novel β -glucosidase from *Candida peltata*.** *Applied and Environmental Microbiology* 162:3165-3170.
- Samiey B. y M RafiDargahi. 2010. **Kinetics and thermodynamics of adsorption of Congo red on cellulose.** *Central European Journal of Chemistry* 8:906–912.
- Sandgren M., J. Stahlberg y C. Mitchinson. 2005. **Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes.** *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 89:246-291.
- Sarker B.C., R. K. Singh, B. K. Kumbhar, Y. C. Agrawal y M. K. Kulshreshtha. 1999. **Response surface analysis of enzyme assisted oil extraction factors for sesame, groundnut and sunflower seeds.** *Journal of Food Science and Technology* 36:511-514.
- Saucedo Luna J., A. J. Castro Montoya, M. M. Martínez Pacheco, C. R. Sosa Aguirre, J. Campos García. 2011. **Efficient chemical and enzymatic saccharification of the lignocellulosic residue from *Agave tequilana* bagasse to produce ethanol by *Pichia caribbica*.** *Journal Industrial Microbiology Biotechnology* 38:725–732
- Sazci A., A. Radford y K. Erenler. 1986. **Detection of cellulolytic fungi by using Congo red as an indicator: a comparative study with the dinitrosalicylic acid reagent method.** *Journal of Applied bacteriology* 61:559-562.
- Sharma A., S. K. Khare y M. N. Gupta. 2001. **Hydrolysis of rice hull by crosslinked *Aspergillus niger* cellulase.** *Bioresource Technology* 78:281–284.

- Singh A., A. B. Abidi, N. S. Darmwal y A. K. Agrawal. 1988. **Fermentation of corn cobs by *Aspergillus niger* AS101 for the production of cellulose and single cell protein.** *Biomembranes* 14:153–157.
- Singh A., A. B. Abidi, N. S. Darmwal y A. K. Agrawal. 1990. **Saccharification of cellulosic substrates by *Aspergillus niger* cellulase.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 6:333–336.
- Slippers B., G. I. Johnson, P. W. Crous, T. A. Coutinho, B. D. Wingfield y M. J. Wingfield. 2005. **Phylogenetic and morphological reevaluation of the *Botryosphaeria* species causing diseases of *Mangifera indica* in Australia.** *Mycologia* 97:99–110.
- Slippers B., P. W. Crous, S. Denman, T. A. Coutinho, B. D. Wingfield y M. J. Wingfield. 2004. **Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*.** *Mycologia* 96:83–101.
- Steiner J., C. Saccha y J. Enzyaguirre. 1993. **Culture condition for enhanced cellulose production by a native strain of *Penicillium purpurogenum*.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10:280–284.
- Sternberg D., P. Vijayakumar y E. T. Reese. 1977. **β -Glucosidase: Microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose.** *Canadian Journal of Microbiology* 23:139-147.
- Stick R. V. y A. G. Watts. 2002. **The chameleon of retaining glycosyltransferases: The catalytic nucleophile.** *Monatshefte fur Chemie Chemical Monthly* 133:541-554.
- Szijarto N., Z. Szengyel, G. Liden y K. Reczey. 2004. **Dynamics of cellulase production by glucose grown cultures of *Trichoderma reesei* Rut-C30 as a response to addition of cellulose.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 113:115–124
- Twomey L. N., J. R. Pluske, J. B. Rowe, M. Choct, W. Brown, M. F. McConnell y D. W. Pethick. 2003. **The effects of increasing levels of soluble non-starch polysaccharides and inclusion of feed enzymes in dog diets on faecal quality and digestibility.** *Animal Feed Science and Technology* 108(1–4):71–82.
- Uzcategui E., A. Ruiz, R. Montesino, G. Johansson y G. Pettersson. 1991. **The 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*.**

1. **A system of synergistically acting enzymes homologous to *Trichoderma reesei*.** *Journal of Biotechnology* 19:271–285.
- Van-Wyk J. P. H. 1997. **Cellulose adsorption–desorption and cellulose saccharification during enzymatic hydrolysis of cellulose material.** *Biotechnology Letters* 19:775–778.
- Wojtczak G., C. Breuil, J. Yamuda y J. N. Saddler. 1987. **A comparison of the thermostability of cellulose from various thermophilic fungi.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 27:82–87.
- Woodward J. y A. Wiseman. 1982. **Fungal and other β -glucosidases—their properties and applications.** *Enzyme and Microbial Technology* 4:73–79.
- Yan T. S. y C. L. Lin. 1996. **Purification and characterization of a glucose tolerant β -glucosidase from *Aspergillus niger* CCRC31494.** *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 61:965–970.
- Yoon J. J., C. J. Cha, Y. S. Kim y W. Kim. 2008. **Degradation of cellulose by the major endoglucanase produced from the brown-rot fungus *Fomitopsis pinicola*.** *Biotechnology Letters* 30:1373–1378.
- Yu H., G. Zeng, H. Huang, X. Xi, R. Wang, D. Huang, et al. 2007. **Microbial community succession and lignocellulose degradation during agricultural waste composting.** *Biodegradation* 18:793–802.
- Zoran M. 2008. **Physiological roles of plant glycoside hydrolases.** *Planta* 227:723–740.

Referencias electrónicas:

(<http://www.cazy.org/>).

(<http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>)