



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

“Caracterización de la actividad celulolítica del
complejo enzimático producido en aislamientos
de *Beauveria bassiana* y *Fonsecaea*
compacta”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A:

MARTHA KARINA GUZMÁN ESPINOSA

ASESORA

M. en C. SOCORRO SANDRA MARTÍNEZ ROBLES

Co ASESOR

Q.F.B. LUIS ALBERTO PARRA OAXACA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO
2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Caracterización de la actividad celulolítica del complejo enzimático producido en aislamientos de Beauveria bassiana y Fonsecaea compacta.

Que presenta la pasante: **Martha Karina Guzmán Espinosa**

Con número de cuenta: **308261181** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Junio de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Q.F.B. Azucena Lee Mendoza</u>	
VOCAL	<u>M. en C. Erik González Ballesteros</u>	
SECRETARIO	<u>M. en C. Socorro Sandra Martínez Robles</u>	
1er. SUPLENTE	<u>Q.F. B. Leticia Cubillo Carrillo</u>	
2do. SUPLENTE	<u>Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Créditos

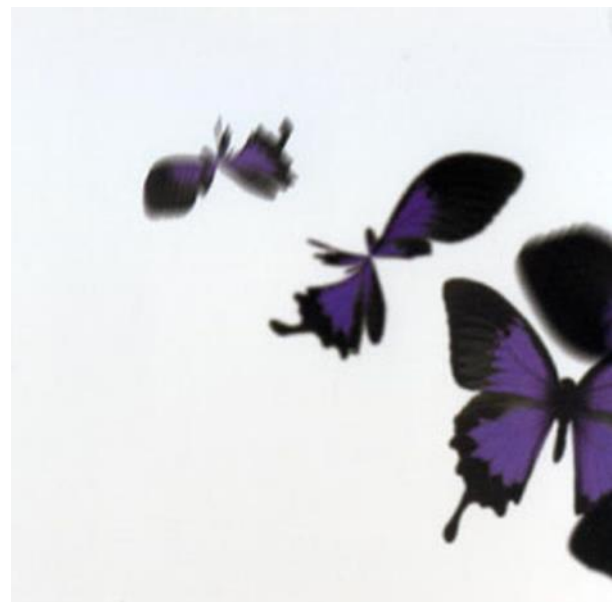
El presente trabajo se realizó en el laboratorio L-8 de la unidad de posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán a cargo del Dr. Andrés Romero Rojas y en los laboratorios de microbiología e inmunología, con el apoyo del profesor Q.F.B. Ladislao Palomar Morales.

La recolección de muestras se realizó en el municipio de Hueyoxtla por los alumnos del CBT "Dr. Efraín Hernández Xocolotzi", bajo la supervisión y dirección del QFB. Luis Parra Oaxaca, con recursos del COMECYT.

Y a mi compañera BQD. Emma Gabriela Medina Cortes que me brindó su confianza para poder seguir su investigación.

En el punto donde se detiene la ciencia,
empieza la imaginación.

Jules de Gaultier



Dedicatoria

A mis padres:

Edgar y Marta la pareja que gano y perdió batallas difíciles de la vida, la pareja que lo tuvo todo y lo perdió, y que aun así se levantaron y lo recuperó.

A mis hermanas:

Raquel por ser tan noble y de gran corazón, la que se quita un pedazo de corazón y los va regalando por el camino, hasta ya no sentir latidos.

Angélica, nos enseñó que la vida puede cambiar radicalmente, y que los sueños si se cumplen al precio que cueste.

Mis cuñados:

Marcial, eres el ser mas sensible y tierno del mundo, lo se por que nos entendemos, y me alegra que seas parte de mi vida, y la de mi hermana.

Jorge, lo que me has enseñado es que, si existe el amor de telenovela, loco, arriesgado y sin reglas, sabes que tienes una familia que acepta todas las cosas que otros rechazan.

Pedro, estuviste en todos los momentos difíciles para mí, en este cambio tan radical de vivir en familia a vivir sola, me hiciste sentir que, aunque estabas lejos aun así estaba acompañada, me hice mas segura de mi misma, y que no debo de tener miedo a los cambios.

Sin ustedes creo que me sentiría vacía, y sin un rumbo que seguir, por ustedes eh salido adelante en mis estudios y como persona.

Agradecimientos

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por permitirme concluir mi licenciatura, y conocer personitas que me enseñaron la amistad verdadera.

Esmeralda, Mariana y Edith, gracias por apoyarme en muchas locuras, en las clases, y estar ahí para mí, las quiero mucho, y saben que tienen una amiga que estará ahí para siempre.

Analessa, gracias por la época en que fuiste mi vecina, y que mis días fueran llevaderos aun sintiendo el estrés y la soledad de vivir por mi propia cuenta.

Amigos de juegos, Michel, gracias por llenar ese vacío con comida, cuando escribía la tesis, y levantarme los ánimos. Diego y Miguel, son los ángeles de la paciencia, inocentes como niños, y malvados como diablos, gracias por pasar tiempo conmigo y hacer tantas locuras tan divertidas; José y Eder, son unos niños atrapados en cuerpos de adulto, no dejen que brujas lastimen esa inocencia.

Ale, gracias por enseñarme muchas cosas en el laboratorio, en la vida, y que eres el hombre mas simpático y practico del mundo, y por ti supe que era la dieta de la pizza.

Itzel, sigue así, eres perseverante, y me ayudaste mucho, y lo sigues haciendo, eres mi hermana perdida.

A mis profesores Sandra y Erik, por ayudarme a realizar este trabajo, y apoyarme en situaciones de la vida, fueron unos guías en mi ultima etapa de mi licenciatura.

Y al coordinador Alejandro, yo se que nunca me olvidara, y mas por dormirme en sus clases, me ayudo muchísimo, y usted es una parte esencial de esa licenciatura, haga que los Bqd's vuelen tan alto y lejos como puedan.

Profesora Lety, usted tan risueña, gracias por el apoyo que me brindo, y siga así, le deseo mucho éxito en sus proyectos.

Índice.

Índice de imágenes.....	I
Índice de tablas.....	I
Índice de gráficos.....	II
Índice de diagramas.....	II
Abreviaturas y siglas.....	II
Glosario.....	III
Introducción.....	1
Marco teórico.....	2
2.1 Celulosa.....	2
2.1.2. Hemicelulosa.....	2
2.1.3. Lignina.....	3
2.2. El papel bond y la celulosa.....	3
2.2.1. Producción del papel.....	3
2.2.2. Pulpaje.....	3
2.2.3. Blanqueamiento.....	4
2.3. Degradación de la celulosa.....	4
2.3.1. Degradación de la celulosa en la naturaleza.....	4
2.4. Enzimas que degradan la celulosa.....	4
2.4.1 Glicosil hidrolasas.....	4
2.4.2. Nomenclatura y clasificación	5
2.4.3. Mecanismos de hidrólisis del enlace glicosídico.....	5
2.4.4. Hidrólisis de la celulosa.....	5
2.5. Enzimas del complejo celulítico.....	5
2.5.1. Endoglucanasas.....	5
2.5.2. Exoglucanasas.....	5
2.5.3. β -glucosidasas.....	6
2.6. Estructura molecular de las celulasas.....	6
2.7. Celulasas fúngicas.....	7
2.8. <i>Trichoderma reesei</i> microorganismo fúngico modelo de la producción de celulasas.....	7
2.9. Aplicación del complejo celulolítico en la biorremediación y la industria.....	8
2.10. <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Fonsecaea compacta</i> como productoras de celulasas.....	8
2.10.1. <i>Beauveria bassiana</i>	8
2.10.1.2. Morfología microscópica.....	9
2.10.1.3. Morfología macroscópica.....	9

2.10.1.4. Esporulaci3n.....	10
2.10.2. <i>Fonsecaea compacta</i>	11
2.10.2.1. Morfolog3a microsc3pica.....	12
2.10.2.2. Morfolog3a macrosc3pica.....	13
2.10.2.3. H3bitat y ecolog3a.....	13
3. Justificaci3n.....	14
4. Objetivos.....	14
4.1 Objetivo general.....	14
4.2 Objetivos espec3ficos.....	14
5. Hip3tesis.....	14
6. Materiales y m3todos.....	15
6.1 Cepas f3ngicas utilizadas en el trabajo.	16
6.1.2. Conservaci3n de cepas f3ngicas.....	16
6.2. Medios de cultivo.....	16
6.2.1. Caldo BHI (Infusi3n Cerebro Coraz3n)	16
6.2.2. Agar Base sangre adicionado con papel.....	16
6.2.3 Agar agua.....	16
6.2.4. Agar agua-papel.....	17
6.2.5 Agar agua-CMC (Carboximetil celulosa)	17
6.2.6 Agar agua-Celobiosa.....	17
6.2.7. Evaluaci3n cualitativa en los hongos <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Fonsecaea compacta</i>	17
6.3 Medio basal de Mandel.....	17
6.3.1 Crecimiento de los hongos <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Fonsecaea compacta</i> en medio de Mandel.....	17
6.3.2. Evaluaci3n cualitativa en del sobrenadante con enzimas de <i>Beauveria bassiana</i>	18
6.4. Cuantificaci3n de prote3nas por M3todo de Lowry.....	18
6.5. Concentraci3n de prote3nas por di3lisis inversa.....	19
6.6. Electroforesis.....	19
7. Resultados.....	20
8. An3lisis de Resultados.....	26
9. Conclusiones.....	31
10. Perspectivas	32
11. Referencias.....	32

Índice de imágenes

Imagen 1 Morfología microscópica de <i>Beauveria bassiana</i>	9
Imagen 2 Cultivo de <i>Beauveria bassiana</i> en agar Dextrosa Sabourau.....	9
Imagen 3 Cultivo de <i>Beauveria bassiana</i> en agar Dextrosa Sabourau, cultivo con un tiempo de crecimiento de 14 días.	10
Imagen 4 Morfología microscópica de <i>Fonsecaea compacta</i> (Esporulación tipo <i>Rhinocladiella</i>)	11
Imagen 5 Morfología microscópica de <i>Fonsecaea compacta</i> (Esporulación tipo <i>Cladosporium</i>)	12
Imagen 6 Morfología microscópica de <i>Fonsecaea compacta</i> (Esporulación tipo <i>Phialophora</i>)	12
Imagen 7 Morfología microscópica de <i>Fonsecaea compacta</i> Especulación para la identificación de la especie <i>Fonsecaea</i>	13
Imagen 8 Cultivo de <i>Fonsecaea compacta</i> en Agar Dextrosa Sabourau.....	13
Imagen 9 Agar agua adicionado con sustratos: Papel, celobiosa y CMC.....	20
Imagen 10 Agar base sangre con papel, con cultivos de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Fonsecaea compacta</i>	21
Imagen 11 Disponibilidad estructural de fibras de celulosa del papel bond	22
Imagen 12 Medio de Mandel adicionado con papel, cultivo de <i>Beauveria bassiana</i> y cultivo de <i>Fonsecaea compacta</i>	22
Imagen 13 Monitoreo del crecimiento en el medio basal de Mandel, al séptimo día de cultivo, en <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Fonsecaea compacta</i>	22
Imagen 14 Actividad celulolítica en sobrenadante concentrado de <i>Beauveria bassiana</i>	24
Imagen 15 Gel de electroforesis SDS-PAGE en muestra de <i>Beauveria bassiana</i>	24

Índice de tablas

Tabla 1 Características de los tres grupos de enzimas que componen el complejo celulolítico producido por hongos.	7
Tabla 2 Taxonomía de <i>Beauveria bassiana</i>	8
Tabla 3 Taxonomía de <i>Fonsecaea compacta</i>	10
Tabla 4 Agar papel.....	16
Tabla 5 Agar agua.....	16
Tabla 6 Agar agua CMC.....	17
Tabla 7 Agar agua celobiosa.....	17
Tabla 8 Medio de Mandel.....	18
Tabla 9 Solución de oligoelementos.....	17
Tabla 10 Gel de separación para SDS-PAGE al 10%.....	18
Tabla 11 Gel de concentración para SDS-PAGE al 3%.....	18
Tabla 12 Buffer de corrimiento para SDS-PAGE.....	18

Tabla 13 Diámetro de crecimiento micelial en agares y halo de hidrólisis.....	20
Tabla 14 Cálculo de concentración vs absorbancia método de Lowry.....	23
Tabla 15 Pesos moleculares de bandas del carril dos de muestras en condiciones reductoras	26
Tabla 16 Pesos moleculares de bandas del carril dos de muestras en condiciones no reductoras.....	26

Índice de gráficos

Gráfico 1 Curva patrón de proteínas por el método de Lowry.....	23
Gráfico 2 Peso molecular vs Rf.....	25
Gráfico 3 Log(PM) vs Rf	25

Índice de diagramas

Diagrama 1 Esquema de hidrólisis de celulosa.....	6
Diagrama 2 Procedimiento experimental.....	15

Abreviaturas y Siglas

(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amonio
BGL	β-glucosidasas
BHI	Agar Cerebro Corazón
CaCl ₂ ·7H ₂ O	Cloruro de calcio heptahidratado
CBH	Celobiohidrolasas
Cl ₂	Cloro molecular
ClO ₂	Dióxido de cloro
CoCl ₂ ·6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado
EG	Endoglucanasa
FeSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato de hierro (II) heptahidratado
G	Relative Centrifugal Force (RCF) o G-force
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogeno
HCl	Ácido Clorhídrico
KH ₂ PO ₄	Fosfato mono potásico
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado
NaOCl	Hipoclorito de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato de Zinc heptahidratado
NCBI	National Center for Biotechnology Information
EC	Enzyme Commission Number

Glosario

Biopesticida: Producto utilizado en el control de plagas principalmente de la agricultura cuyo origen es procedente de algún organismo vivo.

Celooligosacáridos: Polisacáridos provenientes del proceso de hidrólisis de la celulosa.

Célula conidiógena: Es una célula de la cual se forma la espora conidio.

Celulosa: Es un biopolímero compuesto exclusivamente de moléculas de β -glucosa

Conidio: El conidio es una espora asexual inmóvil, cuya espora está formada directamente a partir de una hifa o célula conidiógena o esporógena.

Conidióforos: Es una estructura microscópica especializada en la producción asexual de miles de esporas llamadas conidios

Dímero: Especie química que consiste en dos subunidades estructuralmente similares.

Enlace glicosídico: En el ámbito de los glúcidos, el enlace glucosídico es aquel mediante el cual un glúcido se enlaza con otra molécula, que puede ser o no ser otro glúcido.

Entomopatógeno: Está restringido técnicamente a aquellos organismos que producen una patogénesis letal en insectos o arácnidos

Estereoespecificidad: Propiedad de las enzimas que les permite unirse solo a un tipo de estereoisómero del sustrato.

Estereoisómero: Se dice que existe isomería cuando compuestos diferentes que tienen la misma fórmula molecular.

Extremos reductores: El extremo de la cadena polisacarídica que contiene el C anomérico libre (que no forma parte de un enlace glucosídico) se conoce como extremo reductor.

Fiálide: Célula terminal de conidióforo, en forma de botella que se une por su base en la métula.

Hidrólisis: Es una reacción química entre una molécula de agua y otra molécula, en la cual la molécula de agua se divide y sus átomos pasan a formar unión de otra especie química.

Hongo anamórfico: Los hongos se clasifican primariamente sobre la base de sus estructuras asociadas con la reproducción, y anamorfo se refiere a la reproducción asexual que tienen algunas especies fúngicas.

Hongos filamentosos: Son hongos formados por una serie de ramas tubulares llamadas hifas, el conjunto de las cuales forman el micelio.

Lignocelulosa: La lignocelulosa es el principal componente de la pared celular de las plantas, esta biomasa producida por la fotosíntesis.

Saprobio: Organismos que viven en medios ricos en sustancias orgánicas en descomposición. Degradan progresivamente la materia orgánica y llevan a cabo una autodepuración biológica.

Saprófito: Es un organismo heterótrofo vegetal que obtiene su energía de materia orgánica muerta o de los detritos desechados por otros seres vivos, de los cuales extrae los compuestos orgánicos que requiere como nutrientes.

1.Introducción

Las enzimas tienen muchas aplicaciones en diversos tipos de industrias, estos componentes bioquímicos son utilizados para tratar la materia prima. Estas son obtenidas de distintas fuentes, ya sean animales, en plantas o microorganismos, su utilización marca una ventaja en la realización de productos y por ejemplo se comienza a disminuir el impacto ecológico, al utilizar catalizadores naturales.

Sus aplicaciones industriales van desde la papelera, donde el uso de celulasas permite ahorrar energía durante el proceso, porque facilitan el drenaje y mejoran las propiedades de los productos. En el caso de la industria textil, las celulasas se emplean en el lavado a la piedra, técnica utilizada para producir aspecto descolorido en prendas vaqueras, sustituyendo los tratamientos tradicionales, costosos y contaminantes. En la industria alimentaria, las celulasas se usan en la extracción y clarificación de jugos de frutas y verduras, en la producción de néctares de frutas y purés y en la extracción de aceite de oliva. También se añaden celulasas para mejorar el malteado de cebada en la fabricación de cerveza y en la industria del vino. El bioetanol es un biocombustible de origen vegetal que se utiliza en motores de explosión como aditivo o sustitutivo de la gasolina. que se produce a partir de la fermentación de materia orgánica rica en azúcar (caña, remolacha o vino), así como de la transformación en azúcar del almidón presente en los cereales.

Aunque es el mayor productor de enzimas celulíticas es el hongo *Trichoderma reesei*, por sus ventajas de secretar cantidades favorables de enzimas, se sabe que aun así las enzimas se comportan de diferente manera, y por eso el estudio de más complejos enzimáticos en otros hongos.

Este trabajo está dirigido al estudio de la hidrólisis enzimática de la celulosa realizada por microorganismos que la degradan, los hongos *Beauveria bassiana* y *Fonsecaea compacta*. El estudio de las celulasas fúngicas es amplio, pero beneficioso en la industria, *Beauveria bassiana* y *Fonsecaea compacta* no han sido reportados como productores del complejo celulolítico, y bien pueden tener alguna aplicación industrial o biotecnológica. En el presente trabajo se inicia la investigación del complejo celulolítico, para la recuperación de las enzimas, ya que es un trabajo inconcluso debido a la amplia forma de estudio del complejo, y para caracterizarlo en su totalidad se necesitarían más metodologías específicas.

2. Marco teórico

La lignocelulosa (celulosa, hemicelulosa y lignina) es el principal y más abundante componente de la biomasa producida por la fotosíntesis. La pared celular de las plantas está formada por lignocelulosa, la composición y porcentajes de los polímeros varían entre las especies de plantas (Ragauskas et al., 2006). Está constituido por los tejidos de los vegetales cuyas células presentan una pared formada por un entramado de microfibrillas de celulosa formando capas recubiertas de hemicelulosas y sobre las que se deposita la lignina.

2.1 Celulosa

La celulosa es el compuesto orgánico más abundante de la Tierra, y el principal componente de la pared celular vegetal. Se trata de un polímero lineal de moléculas de D-glucosa, unidas entre sí mediante enlaces glicosídicos β -1,4 (Pettersen, 1984). A través de los enlaces β -1,4 se encuentran unidas las unidades β -D-glucopiranosas, que forman cadenas rectas reforzadas por enlaces cruzados de puentes de hidrógeno (Melo, 2007).

Sus extremos son asimétricos: los que contienen el carbono anomérico libre de la molécula de glucosa se conocen como extremos reductores, mientras que los que tienen el carbono anomérico implicado en un enlace con extremos no reductores (Pettersen, 1984). Cada una de las unidades de glucosa de la cadena lineal están rotadas 180° con respecto a las glucosas colindantes a lo largo del eje. Debido a la ausencia de ramificaciones, la cadena de celulosa tiene una estructura plana, estabilizada mediante puentes de hidrógeno entre los múltiples grupos hidroxilo de la misma cadena o entre cadenas adyacentes, lo que las mantiene firmemente unidas y lo que contribuye a proporcionar rigidez a la pared celular. (Klemm et al., 2005; O'Sullivan, 1997).

En relación a la cantidad de puentes de hidrogeno en las moléculas de celulosa, se ha propuesto un modelo estructural con dos estados: cristalino y amorfo. las regiones cristalinas están altamente organizadas con mayor número de puentes de hidrógeno, hacen a la celulosa insoluble en la mayoría de disolventes, y dificultan que sea atacada por enzimas (Himmel et al., 2007). Estas regiones están separadas por zonas amorfas, que se presentan en pequeños porcentajes y son menos ordenadas y compactas, y tienen mayor capacidad para absorber moléculas de agua, lo que confiere a esta celulosa gran flexibilidad y cierta solubilidad además de hacerla más susceptible a la degradación enzimática (Cowling, 1975).

En la naturaleza, la celulosa no se encuentra en forma de cadenas sencillas, sino que desde su síntesis estas se ordenan en filamentos que forman las fibrillas elementales, microfibrillas, que se asocian mediante interacciones no covalentes con la hemicelulosa y la lignina. (Lynd et al., 2002)

2.1.2. Hemicelulosa

Las hemicelulosas no son moléculas homogéneas sino heteropolisacáridos (polisacáridos formados por diferentes monosacáridos) complejos. Están formadas principalmente por pentosas (β -D-xilosa y α -L-arabinosa), hexosas (β -D-glucosa, β -D-galactosa y β -D-manosa) y ácidos urónicos (β -D-glucorónico y α -D-galacturónico). Algunas de estas unidades se encuentran usualmente acetiladas o metiladas.

En las plantas de madera dura, la forma más abundante de hemicelulosa es el xilano, mientras en las plantas de madera blanda, contienen principalmente β -D-glucomanano (Kumar et al., 2008). En comparación con la celulosa, la hemicelulosa tiene una estructura ramificada, con cadenas laterales cortas formadas por los diferentes azúcares, lo que le confiere una naturaleza amorfa y facilita su degradación. (Martínez et al., 2005; Pérez et al., 2002).

La función más importante de la hemicelulosa es conectar la lignina y las fibras de celulosa, dando mayor rigidez a la red celulosa-hemicelulosa-lignina. La lignina y la hemicelulosa se mantienen

unidas de manera predominante a través de enlaces tipo éter o éster, mientras que la unión con la celulosa es a través de puentes de hidrogeno.

2.1.3. Lignina

La lignina es el componente más complejo y menos caracterizado de la pared celular. Está compuesto por la polimerización oxidativa y aleatoria de tres alcoholes de tipo fenilpropano (alcohol cumarílico, coniferílico y sinapílico), unidos por distintos enlaces covalentes. Como consecuencia, se forma un polímero muy heterogéneo, insoluble, ramificado, y altamente resistente a la degradación química y biológica.

Junto con la hemicelulosa, la lignina crea una matriz amorfa en la que están embebidas las fibras de celulosa, actuando como material cementante entre las células. Juega un papel esencial en el transporte de agua y sales minerales y protege al resto de los componentes de la pared celular vegetal del ataque de microorganismos (Sánchez, 2009). Sin embargo, para determinadas aplicaciones industriales basadas en el aprovechamiento de la celulosa y la hemicelulosa, la lignina es un componente indeseable, siendo necesaria su transformación a través de distintos métodos.

2.2. El papel bond y la celulosa

El papel es un material constituido por una delgada lámina elaborada a partir de pulpa de celulosa, una pasta de fibras vegetales molidas suspendidas en agua, generalmente blanqueada, y posteriormente secada y endurecida, a la que normalmente se le añaden sustancias como polipropileno o polietileno con el fin de proporcionarle características especiales. Parte del proceso básico para la obtención de la celulosa y el papel consiste en la eliminación de la lignina.

2.2.1. Producción del papel

La producción del papel abarca una gran parte de la industria a nivel mundial, cuya principal fuente de fibra es la madera, procedente principalmente de los bosques de coníferas, tropicales y boreales. La composición química de la madera es muy variable, se compone principalmente de celulosa, lignina y hemicelulosa y otros materiales. Industrialmente la pulpa de celulosa blanca se obtiene a través de procesos que conlleva dos etapas: el pulpaje y el blanqueamiento.

2.2.2. Pulpaje

Se realiza a partir de la madera, mediante su trituración tanto mecánica como por la acción de productos químicos, entre otros, ácido sulfúrico y cloro. El objetivo es remover la lignina para la fibra de celulosa, separando la celulosa contenida en la madera, de los otros componentes. Este proceso puede ser de dos tipos: mecánico o químico.

Actualmente a nivel mundial el proceso más utilizado para el pulpaje sigue siendo el método de Kraft, a pesar de la contaminación que genera y el costo que conlleva el proceso. El proceso implica la utilización de hidróxido de sodio (NaOH) y sulfuro de sodio (Na₂S) para extraer la lignina de las fibras de la madera, usando grandes recipientes a presión llamados digestores. El líquido que se separa, llamado licor negro, se concentra por evaporación y se quema en una caldera de recuperación para generar vapor de alta presión, que puede utilizarse para las necesidades de vapor de la planta o para la producción de energía eléctrica. Las plantas modernas son más que autosuficientes en la producción de energía.

La porción inorgánica del licor se emplea para regenerar el hidróxido de sodio y el sulfito de sodio necesario para el pulpeo. En el caso de las maderas de coníferas, se obtiene una sustancia jabonosa como subproducto de la evaporación. Ese jabón es acidificado para producir aceite de pino, una fuente de resinas, ácidos grasos y otros productos químicos.

2.2.3. Blanqueamiento

La principal razón del blanqueo de la pulpa es la de eliminar el contenido de lignina residual evitando así causar daños en la calidad de la fibra. ya que la lignina produce una decoloración marrón en el papel final. La eliminación de la lignina, que es un material químicamente complejo, produce una pulpa con un matiz más luminoso. En esta etapa se le otorga a la pulpa la blancura que corresponda según los estándares establecidos para su comercialización.

El blanqueo corresponde a un tratamiento químico en etapas sucesivas y bajo condiciones de operación distintas. Los principales reactivos químicos utilizados son cloro elemental (Cl₂), dióxido de cloro (ClO₂) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂). El hidróxido de sodio (NaOH) se utiliza entre algunas etapas de blanqueo para regular el pH, de modo de facilitar la extracción del material disuelto. La pasta química es

blanqueada con removedores de lignina. La pasta mecánica -que por definición contiene grandes cantidades de lignina- se aclara usualmente con peróxido de hidrógeno que cambia la estructura de la lignina y altera el color, pero no la elimina.

En las tecnologías convencionales de blanqueo de la pasta química, la lignina se degrada y remueve con la ayuda de gas cloro (Cl_2). La pasta se blanquea luego en varias etapas que emplean dióxido de cloro (ClO_2) e hipoclorito de sodio (lavandina, NaOCl).

2.3. Degradación de la celulosa

2.3.1. Degradación de la celulosa en la naturaleza

La degradación de la biomasa lignocelulósica es el paso central para el reciclado del carbono en los ecosistemas terrestres. Sin embargo, debido al carácter recalcitrante de varios componentes de la pared celular vegetal, solamente ciertos microorganismos son capaces de degradarla. Numerosos hongos filamentosos pueden modificarla o degradarla; en función de los patrones de degradación que producen sobre la biomasa lignocelulósica, podemos clasificarlos como hongos de podredumbre blanca, podredumbre parda y podredumbre blanda (Blanchette, 1991; Martínez et al., 2005; Martínez et al., 2011; Schwarze et al., 2000).

Los hongos de la podredumbre blanca son los únicos organismos capaces de degradar completamente la lignina, transformándola en CO_2 y agua (Kirk y Farrell, 1987). Sin embargo, no pueden utilizarla como única fuente de carbono y energía, degradándola para tener acceso a la celulosa y la hemicelulosa (Leatham, 1986).

Los hongos de la podredumbre parda, por su parte, atacan preferentemente a las gimnospermas, degradando los polisacáridos, a los que consiguen llegar modificando parcialmente la lignina (Martínez et al., 2011; Yelle et al., 2008). Los hongos de la podredumbre blanca y parda pertenecen al grupo de los basidiomicetos. Por el contrario, la mayoría de los hongos de podredumbre blanda pertenecen a los ascomicetos y actúan preferentemente sobre material vegetal con bajo contenido en lignina. Usualmente requieren contenidos más altos de humedad que los otros dos. En la naturaleza, la degradación de la celulosa y la hemicelulosa tiene lugar cuando la estructura de la lignina es alterada, lo que facilita la colonización de nuevas poblaciones de microorganismos (Blanchette, 1995; Daniel et al., 2003; Perestelo et al., 1999). En este proceso actúan de forma coordinada diferentes enzimas conocidas generalmente como celulasas y hemicelulasas, pertenecientes al grupo de las glicosil hidrolasas.

2.4. Enzimas que degradan la celulosa

2.4.1 Glicosil hidrolasas

Las enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar los enlaces glicosídicos entre dos o más carbohidratos o entre un carbohidrato y un compuesto no glucídico (aglicón) reciben el nombre de glicosil hidrolasas. El enlace glicosídico es uno de los enlaces

más estables que existen en la naturaleza, con una vida media de más de 5 millones de años (Wolfenden et al., 1998).

2.4.2. Nomenclatura y clasificación

Al igual que el resto de enzimas, las glicosil hidrolasas poseen un número EC (Enzyme Commission Number), de acuerdo a la clasificación de la IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology). En esta clasificación, basada en las reacciones catalizadas por las enzimas (en concreto, en su capacidad para hidrolizar el enlace glicosídico) las glicosil hidrolasas están incluidas en el grupo EC 3.2.1.x.

2.4.3. Mecanismos de hidrólisis del enlace glicosídico

Koshland (1953) propuso dos mecanismos de reacción estereoespecíficos diferentes para la ruptura del enlace glicosídico: inversión y retención. En ambos casos, la hidrólisis del enlace glicosídico está mediada por la acción de dos residuos catalíticos, generalmente dos residuos carboxílicos, presentes en el centro activo de la enzima.

El mecanismo de inversión (Willner et al., 2007) tiene lugar en una sola etapa, mediante un proceso catalítico ácido-base. Uno de los dos residuos carboxílicos opera como base, facilitando el ataque de una molécula de agua al carbono anomérico y el otro, como ácido, asistiendo la separación del oxígeno. Esta sustitución nucleofílica genera un producto con estereoquímica opuesta al sustrato. En el mecanismo de retención tiene lugar un desplazamiento doble.

El primer ataque nucleofílico al carbono anomérico es asistido por el residuo que actúa como base, formando un enlace covalente transitorio entre la enzima y el glicósido. El segundo ataque nucleofílico ocurre por la entrada de una molécula de agua que pierde un protón, con asistencia del residuo básico que en la primera etapa actuó como ácido. Como resultado, se deshace el estado transitorio y se regenera la enzima (Rye y Withers, 2000; Withers, 2001).

2.4.4. Hidrólisis de la celulosa

En la actualidad, sigue vigente el interés por estudiar los sistemas celulolíticos de los microorganismos productores de grandes cantidades de celulasas. El cribado de microorganismos productores, el incremento en la producción por mutaciones genéticas, la purificación y caracterización de los componentes del complejo, el estudio de los mecanismos de ataque a la celulosa, la obtención de proteínas recombinantes, la determinación de las estructuras tridimensionales y la demostración de su potencial industrial son aspectos relevantes en este campo (Bhat y Bhat, 1997; Foreman et al., 2003; Kumar et al., 2008; Martínez et al., 2008). Concretamente, las celulasas pueden emplearse en diferentes sectores industriales, como el textil, farmacéutico, alimentario y, más recientemente, el de los biocombustibles.

2.5. Enzimas del complejo celulítico

De forma general, existen tres tipos de celulasas, que actúan de forma coordinada y sinérgica para degradar la celulosa hasta moléculas de glucosa.

2.5.1. Endoglucanasas

Las endoglucanasas (EG, EC 3.2.1.4), hidrolizan aleatoriamente los enlaces glicosídicos internos de las regiones amorfas de la celulosa, generando oligosacáridos de diferentes longitudes y proporcionando nuevos extremos libres susceptibles de ser degradados por otras enzimas del sistema celulolítico (figura 2.1) (Aro et al., 2005; Lynd et al., 1991). Provocan un marcado decrecimiento de la longitud del polímero, así como un incremento equivalente de la concentración de azúcares reductores.

2.5.2. Exoglucanasas

Las exoglucanasas, también llamadas celobiohidrolasas (CBH, EC 3.2.1.91), actúan progresivamente sobre los extremos de las cadenas de celulosa, liberando el dímero de glucosa (celobiosa) como principal producto. Las CBH se dividen en dos tipos: CBH I, que hidrolizan los extremos reductores, y CBH II, que actúan sobre los extremos no reductores. (figura 2.1) En estas enzimas es común encontrar inhibición por producto (Zhang y Lynd, 2004). Como resultado de su actuación se produce una rápida liberación de azúcares reductores, aunque la longitud del polímero no disminuye significativamente. Las CBH son las enzimas mayoritarias en el sistema celulolítico, representando el 40-70% del componente total del sistema de celulasas y pueden hidrolizar la celulosa cristalina (Esterbauer et al., 1991).

2.5.3. β -glucosidasas

Las β -glucosidasas, o β -1,4-glucosidasas (BGL EC 3.2.1.21), catalizan la transformación de celobiosa y celooligosacáridos en glucosa. (figura 2.1) Este proceso completa la degradación de la celulosa y evita la acumulación de inhibidores de las CBH y las EG (celobiosa y oligosacáridos) (Emert y Brown, 1973; Workman y Day, 1982). Como éstas, las BGL también se pueden inhibir por su producto de hidrólisis (de Castro y Pereira, Jr., 2010; Leite et al., 2008). Estas enzimas son especialmente importantes entre las celulasas por su distribución universal, su amplia especificidad de sustrato y su versatilidad para actuar en reacciones de hidrólisis o síntesis, dependiendo de las condiciones de reacción.

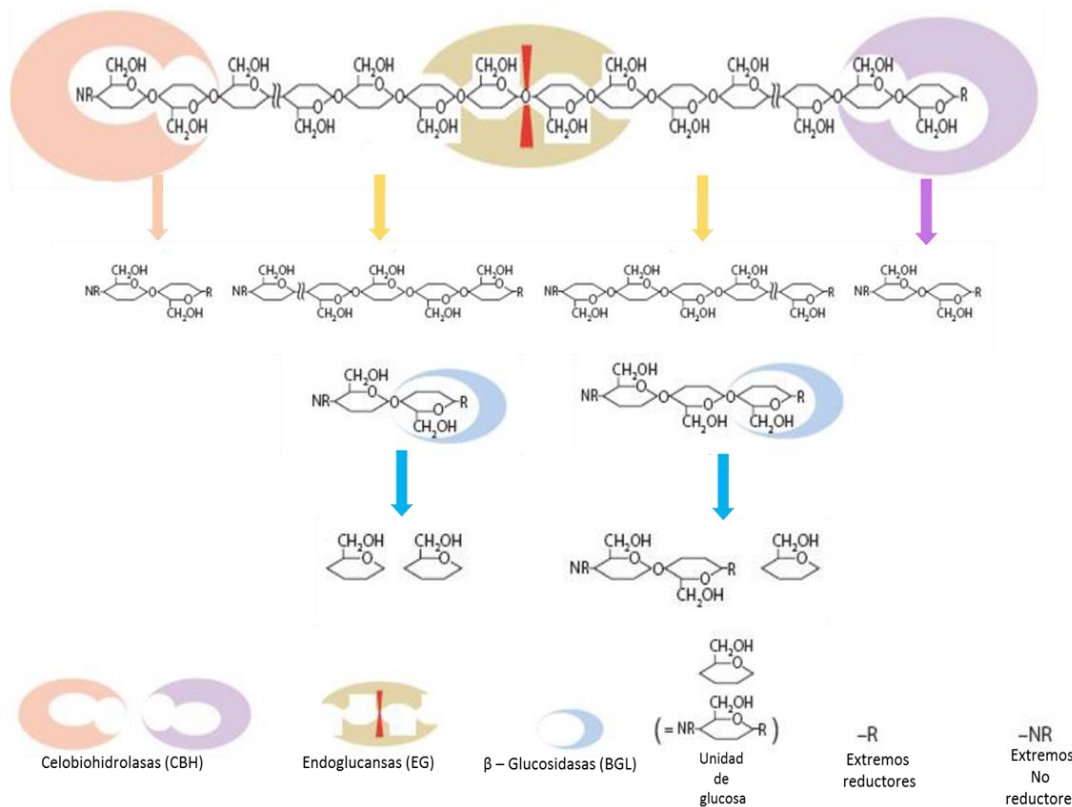


Diagrama 1. Esquema de hidrólisis de celulosa propuesta por Watanabe y Tokuda, 2010.

2.6. Estructura molecular de las celulasas

Las celulasas poseen una compleja arquitectura molecular que consta al menos de dos dominios diferentes: el dominio catalítico y el dominio de unión a la celulosa (Schulein, 1997). El dominio catalítico incluye más del 70% de la secuencia de la proteína y contiene el sitio activo, por lo que es responsable del hidrólisis del enlace glicosídico. La especificidad de sustrato de una determinada celulasa se puede predecir con frecuencia en base a la estructura del sitio activo: la forma de hendidura o de bolsillo es característica de enzimas con actividad exo, mientras que la forma de túnel se da típicamente en enzimas de tipo endo (Lynd et al., 2002). A menudo este dominio se puede subdividir en varios dominios estructurales.

El dominio de unión a celulosa favorece el acceso del dominio catalítico al sustrato, facilitando la hidrólisis, siendo especialmente importante en las etapas iniciales de unión al polímero (Teeri et al., 1998). Los dominios de unión a celulosa están formados por entre 30 y 200 aminoácidos, pudiendo presentarse como un dominio simple, doble o triple en una misma proteína. Los dominios de unión a celulosa provocan una asociación más estrecha y prolongada entre la enzima y el sustrato, incrementando la velocidad de hidrólisis, por lo que su eliminación disminuye drásticamente la actividad enzimática (Shoseyov et al., 2006).

Entre el dominio catalítico y el dominio de unión a celulosa se encuentra una secuencia de entre 10 y 60 aminoácidos que actúa como conector flexible, lo que permite que ambos dominios actúen de forma independiente (Wilson e Irwin, 1999). Esta secuencia varía de una enzima a otra, aunque su composición suele ser rica en treonina y serina, generalmente glicosiladas, lo que proporciona al conector rigidez y lo protege de la acción de proteasas (Srisodsuk et al., 1993).

2.7. Celulasas fúngicas

El microorganismo en su hábitat natural depende del uso de los polímeros de la pared celular vegetal como fuente de carbono y, por tanto, podrían emplearse como fuentes potenciales de enzimas celulíticas. Aunque existen diferentes complejos enzimáticos bacterianos comercializados, principalmente de *Clostridium*, *Cellulomonas* y *Thermomonospora* (Kuhad et al., 2011), la mayor parte de las celulasas comerciales proceden de hongos filamentosos. Esto es debido a que producen enzimas extracelulares en mayor cantidad y normalmente poseen alta eficacia catalítica. Desde 1976 se han aislado más de 14.000 especies fúngicas degradadoras de celulosa, aunque los crudos enzimáticos comercializados proceden mayoritariamente de los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Penicillium* (Kuhad et al., 2011; Kumar et al., 2008).

Tabla 1. Características de los tres grupos de enzimas que componen el complejo celulolítico producido por hongos.					
Enzima	Sustrato	Peso molecular (kDa)	Temperatura optima °C	pH Optimo	oligomerizacion
EG Endoglucanasas	Celulosa (regiones amorfas)	22-45	50-70	4-6	monomérico
CBH Exoglucanasas	Celulosa (Regiones cristalinas)	50-65	37-60	4-6	monomérico
BGL β-glucosidasas	Celobiosa y celo-oligosacáridos	35-450	40-75	Variable	Monomérico, dimérico y trimérico

Adaptada de Dashtban et al. (2009).

2.8. *Trichoderma reesei* microorganismo fúngico modelo de la producción de celulasas.

Desde el descubrimiento de su potencial como productor de celulasas, el ascomiceto *T. reesei* ha centrado el interés de numerosos estudios. Concretamente, la obtención de mutantes hiperproductores de celulasas es parte de un proyecto nacional activo desde 1970 en Japón, destinado a la producción de celulasas para la generación de combustibles alternativos al petróleo (Nitta et al., 2012). Si bien se

han estudiado mutantes que han podido producir más celulasas que la cepa procedente, actualmente el mutante más estudiado y utilizado es la cepa RUT-C30, capaz de producir de 15 a 20 veces más celulasas que la cepa parental QM6a, además de evitar la represión catabólica por glucosa (Peterson y Nevalainen, 2012). Estas características han convertido a RUT-C30 en la cepa de referencia entre los hongos con alta producción de celulasas (Le Crom et al., 2009).

2.9. Aplicación del complejo celulolítico en la biorremediación y la industria

Las celulasas son enzimas útiles para diferentes sectores industriales. En la industria papelera, el uso de celulasas permite ahorrar energía durante el proceso de refinado, porque facilitan el drenaje y mejoran las propiedades de los productos (Kuhad et al., 2011). En el caso de la industria textil, las celulasas se emplean en el lavado a la piedra, técnica utilizada para producir aspecto descolorido en prendas vaqueras, sustituyendo los tratamientos tradicionales con piedra pómez (Belghith et al., 2001; Bhat, 2000; Ng et al., 2010).

En la industria alimentaria, las celulasas se usan en la extracción y clarificación de jugos de frutas y verduras, en la producción de néctares de frutas y purés y en la extracción de aceite de oliva. También se añaden celulasas para mejorar el malteado de cebada en la fabricación de cerveza y en la industria del vino. (Galante et al., 1998). El bioetanol es un biocombustible de origen vegetal que se produce a partir de la fermentación de materia orgánica rica en azúcar (caña, remolacha o vino), así como de la transformación en azúcar del almidón presente en los cereales. Se utiliza en motores de explosión como aditivo o sustitutivo de la gasolina. La producción de bioetanol se basa en un proceso bien conocido: la fermentación alcohólica. Si bien *Trichoderma reesei* es un microorganismo que interviene en la fermentación para la realización del biocombustible en la parte de la fermentación de materia orgánica.

2.10. *Beauveria bassiana* y *Fonsecaea compacta* como productoras de celulasas.

Se realizó una búsqueda de antecedentes acerca de la producción del complejo celulolítico producido por *B. bassiana* y *F. compacta*, sin embargo, no hay un reporte como tal, en el caso de *Beauveria bassiana* hay más información sobre el uso como biopesticida, por ser un entomopatógeno amigable con el medio ambiente, y en la búsqueda de datos se recurrió a la plataforma *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) solo se tiene registro de la secuenciación de la proteína endoglucanasa tipo II. En *Fonsecaea compacta* sigue sin haber registros de la actividad celulolítica, pero se sabe que interviene en la descomposición de materia orgánica.

2.10.1. *Beauveria bassiana*

B. bassiana es un hongo anamórfico que produce conidios hialinos esféricos, que se ha reportado como patógeno de artrópodos. Anteriormente se había clasificado dentro del género *Beauveria* Vuill., junto con tres especies de importancia agrícola, *B. bassiana*, *B. brongniartii* y *B. alba* (Hoog, 1972). Vuillemin (1912) clasificó a *Beauveria* dentro de la familia *Verticilliaceae*. Filogenéticamente se ha evidenciado que *Beauveria* está asociado con la familia *Cordycipitaceae* del orden *Hypocreales*. Así mismo, se ha reportado que *B. bassiana* y *B. brongniartii* están ligados en desarrollo y filogenéticamente a las especies del género *Cordyceps* (Rehner et al., 2011). *B. bassiana* representa la parte asexual, mientras que *Cordyceps bassiana* la parte sexual (Rehner y Buckley, 2005).

Tabla 2. Taxonomía de <i>Beauveria bassiana</i>	
Reino	<i>Fungi</i>
Sub-reino	<i>Dikarya</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Sub-fylum	<i>Pezizomycotina</i>
Clase	<i>Sordariomycetes</i>
Sub-clase	<i>Hypocreomycetidae</i>
Orden	<i>Hypocreales</i>
Familia	<i>Cordycipitaceae</i>
Género	<i>Beauveria</i>
Especie	<i>bassiana</i>
NCBI taxonomy browser Taxonomy ID: 655819	

2.10.1.2. Morfología microscópica

Es una hifa septada, con conidióforos de 1-2 μm de diámetro, de donde nacen conidios hialinos redondos u ovalados de 2-3 μm de diámetro, que se insertan en forma de racimo (Imagen 1)

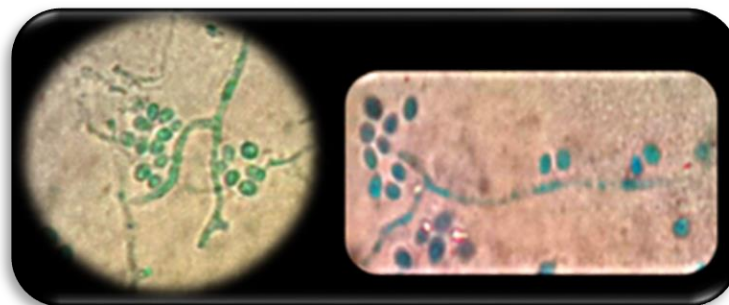


Imagen 1. Morfología microscópica de *Beauveria bassiana*.

Tinción de azul de lactofenol a 1000 aumentos, Fotografía M. Karina Guzmán Espinosa 2017

2.10.1.3. Morfología macroscópica

En Agar Dextrosa Sabouraud crece un micelio blanco algodonoso, de forma radial a las condiciones de 25°C/7 días (Imagen 1), al envejecer se vuelve un micelio pulverulento y de forma seca, el reverso del micelio se torna amarillento (Imagen 2)

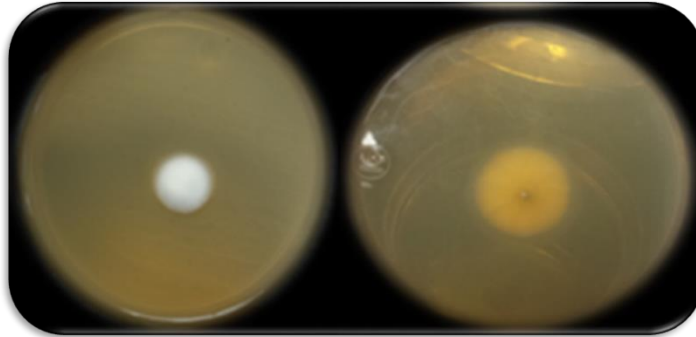


Imagen 2. Cultivo de *Beauveria bassiana* en agar Dextrosa Sabouraud, cultivo con un tiempo de crecimiento de 7 días.) Fotografía M. Karina Guzmán Espinosa 2017

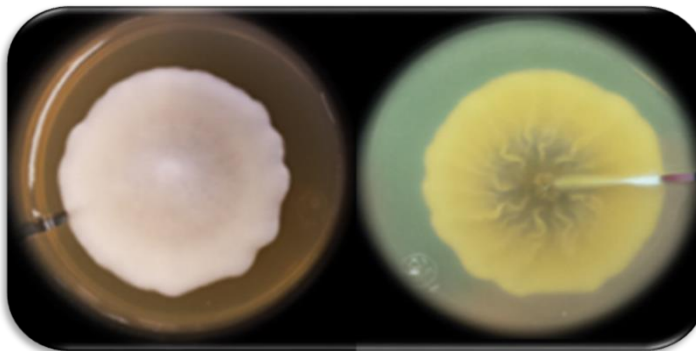


Imagen 3. Cultivo de *Beauveria bassiana* en agar Dextrosa Sabouraud, cultivo con un tiempo de crecimiento de 14 días.) Micelio aéreo (izquierda) y Micelio sumergido (derecha) Fotografía M. Karina Guzmán Espinosa 2017

2.10.1.4. Esporulación

Es dependiente de la humedad, a menor humedad mayor esporulación, y a mayor humedad, mayor crecimiento micelial y menor esporulación.

2.10.2. *Fonsecaea compacta*

Fonsecaea compacta es una especie fúngica saprófita que se encuentra en la familia Herpotrichiellaceae. *F. compacta* es un hongo dematiáceo, y un agente etiológico raro de la cromoblastomycosis. *F. compacta* es ampliamente considerada como una variedad displásica de *Fonsecaea pedrosoi*, su precursor morfológico. (Hoog, G. S 2004). El género *Fonsecaea* actualmente contiene dos especies, *F. pedrosoi* y *F. compacta*. Se han aislado más de 100 cepas de *F. pedrosoi*, pero solo dos de *F. compacta*. (Vollum, Dorothy I. (1977))

Tabla 3. Taxonomía de <i>Fonsecaea compacta</i>	
Reino	<i>Fungi</i>
Sub-reino	<i>Dikarya</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Sub-fylum	<i>Pezizomycotina</i>
Clase	<i>Eurotiomycetes</i>
Sub-clase	<i>Chaetothyriomycetidae</i>
Orden	<i>Chaetothyriales</i>
Familia	<i>Herpotrichiellaceae</i>
Género	<i>Fonsecaea</i>
Especie	<i>compacta</i>
NCBI taxonomy browser Taxonomy ID: 86057	

F. compacta y *F. pedrosoi* son fácilmente distinguibles entre sí. (McGinnis, Michael R. (2012)) *F. compacta* se caracteriza por sus cabezas conidiales compactas, cicatrices romas y conidios subglobosa a ovoide, mientras que *F. pedrosoi* tiene cabezas conidiales sueltas, cicatrices prominentes y conidios alargados.

2.10.2.1. Morfología microscópica

Las formas morfológicas de *F. compacta* se conocen como:

-Tipo *Rhinocladiella*

-Tipo *Cladosporium*

Tipo *Phialophora*

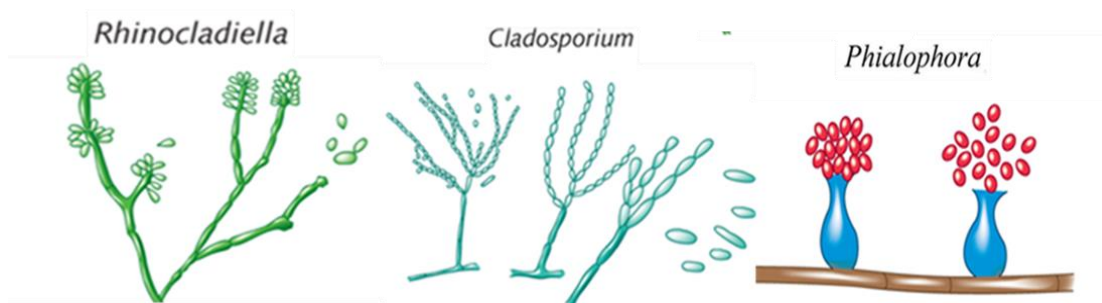


Figura 2. Morfología microscópica de *Rhinocladiella*, *Cladosporium* y *Phialophora*. Bonifaz Trujillo, Alexandro Recuperado de Micología Medica Básica

Conidiación tipo *Rhinocladiella*: Los conidióforos son simples y con frecuencia no se diferencian de la célula vegetativa. En la punta y a lo largo del conidióforo se producen conidios unicelulares cilíndricos únicos. El conidióforo se elonga simpodialmente para producir más conidios. Cuando se desprenden los conidios,

en el conidióforo se observan pequeñas cicatrices; en el conidio también queda una cicatriz de unión. (Imagen 4)

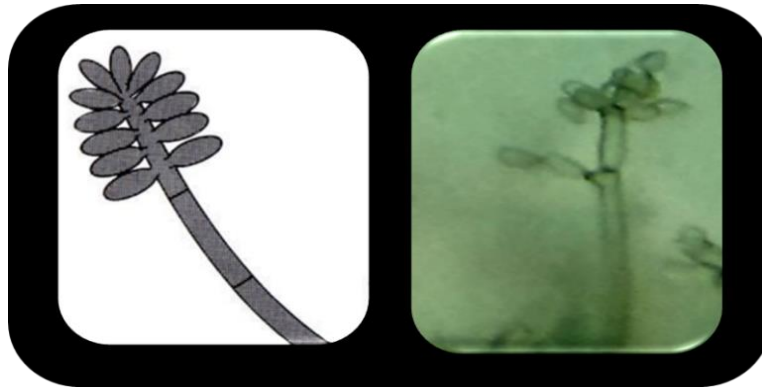


Imagen 4. Morfología microscópica de *Fonsecaea compacta* (Esporulación tipo *Rhinocladiella*) Tinción de azul de lactofenol a 1000 aumentos cultivo de 14 días de crecimiento. Fotografía M. Karina Guzmán Espinosa 2017 (Izquierda) Esquema general de *Rhinocladiella*

Conidiación tipo *Cladosporium*: Un primer conidio, ligeramente ensanchado en el extremo distal tiene función de conidióforo. En la punta se forman dos o más conidios elongados, los cuales a su vez producen más conidios en forma acrópeta formando cadenas largas. El conidio más joven se encuentra en el extremo distal de la cadena. (Imagen 5)



Imagen 5. Morfología microscópica de *Fonsecaea compacta* (Esporulación tipo *Cladosporium*)

Tinción de azul de lactofenol a 1000 aumentos cultivo de 14 días de crecimiento. (Fotografía M. Karina Guzmán Espinosa 2017 (Izquierda) Esquema general de *Cladosporium*

Conidiación tipo *Phialophora*. Presenta una célula conidiógena llamada fiálide, en posición terminal o lateral a la hifa. Esta fiálide es una estructura que generalmente tiene forma de frasco (botella o florero), de cuerpo redondo, oval o alargado; un cuello estrecho y una apertura que puede tener un collarete o labio. Los conidios se forman en la apertura de la fiálide y son expulsados a través del cuello, acumulándose a su alrededor. Los conidios son ovales, de pared lisa, hialinos, sin cicatrices de unión. (Imagen 6)



Imagen 6. Morfología microscópica de *Fonsecaea compacta* (Esporulación tipo *Phialophora*)

Tinción de azul de lactofenol a 1000 aumentos cultivo de 14 días de crecimiento. Fotografía M. Karina Guzmán Espinosa 2017 Esquema general de *Phialophora*

Los tipos de desarrollo de tipo *Rhinocladiella* y *Phialophora* se conocen mejor como anamórfos adicionales de *Fonsecaea*. Los aislamientos de *F. compacta* pueden producir hasta cuatro tipos diferentes de conidióforos. Cuando los hongos producen más de una forma morfológica en cultivo, como en el caso de *F. compacta* y *F. pedrosoi*, la forma más estable, distinta y única que se produce en condiciones estándar se usa para identificar el hongo. (Imagen 7)

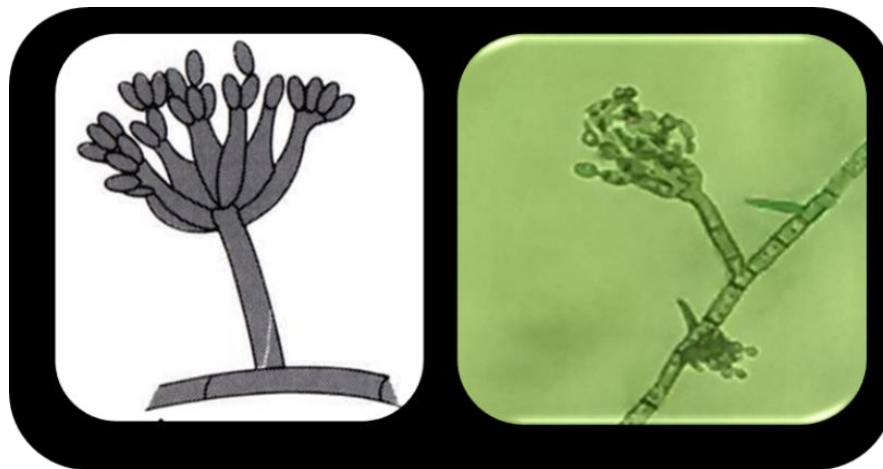


Imagen 7. Morfología microscópica de *Fonsecaea compacta* Especificación para la identificación de la especie *Fonsecaea*.

Tinción de azul de lactofenol a 1000 aumentos en cultivo de 14 días de crecimiento. Fotografía M. Karina Guzmán Espinosa 2017

2.10.2.2. Morfología macroscópica

Las colonias en Agar Dextrosa Sabouraud son de crecimiento lento, aterciopeladas a lanosas, limitadas, en ocasiones con surcos y radiaciones; al reverso se observa

un pigmento negro-ocre que difunde lentamente a través del medio de color oliva a color negro.

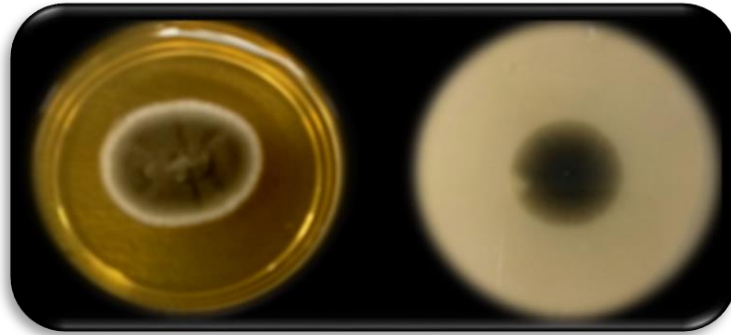


Imagen 8. Cultivo de *Fonsecaea compacta* en Agar Dextrosa Sabouraud,

Tiempo de crecimiento de 21 días. Micelio aéreo (izquierda) y Micelio sumergido (derecha) *Fotografía M. Karina Guzmán Espinosa 2017*

2.10.2.3. Hábitat y ecología

F. compacta se encuentra predominantemente en condiciones húmedas y cálidas como América Latina y Asia, aunque también se ha visto en Europa. Su hábitat natural consiste en tierra y material vegetal leñoso. Es un saprobio, comúnmente asociado con la descomposición de la hojarasca forestal. (Attili, D. S, 1998)

3. Justificación

El desarrollo de la presente investigación propone el estudio de los complejos celulolíticos en los hongos *Beauveria bassiana* y *Fonsecaea compacta*, debido a que no han sido reportados sobre la actividad celulolítica utilizando como fuente de carbono papel bond ya que se buscó una fuente de carbono de fácil acceso y poder contribuir al reciclado de este.

Al obtener el complejo celulolítico de *Beauveria bassiana* y *Fonsecaea compacta* se podrían estudiar de mejor manera, ya que es importante favorecer la secreción de estas enzimas para su estudio, y evaluar si poseen características que sean benéficas para la industria, biorremediación o procesos biotecnológicos.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Realizar pruebas iniciales de caracterización de la actividad celulolítica del complejo enzimático producido en cultivos de *Beauveria bassiana* y *Fonsecae compacta*.

4.2 Objetivos Específicos

Evaluar la actividad enzimática celulolítica y comportamiento de los hongos *Beauveria bassiana* y *Fonsecaea compacta* en medios adicionados con Carboximetil celulosa, celobiosa y papel bond.

Analizar la capacidad de los hongos *Beauveria bassiana* y *Fonsecaea compacta* para producir celulasas en el Medio de Mandel utilizando como fuente de carbono celulosa proveniente del papel bond y obtener el sobrenadante para realizar un análisis electroforético para observar si hay proteínas que pudieran corresponder a las enzimas del complejo celulítico.

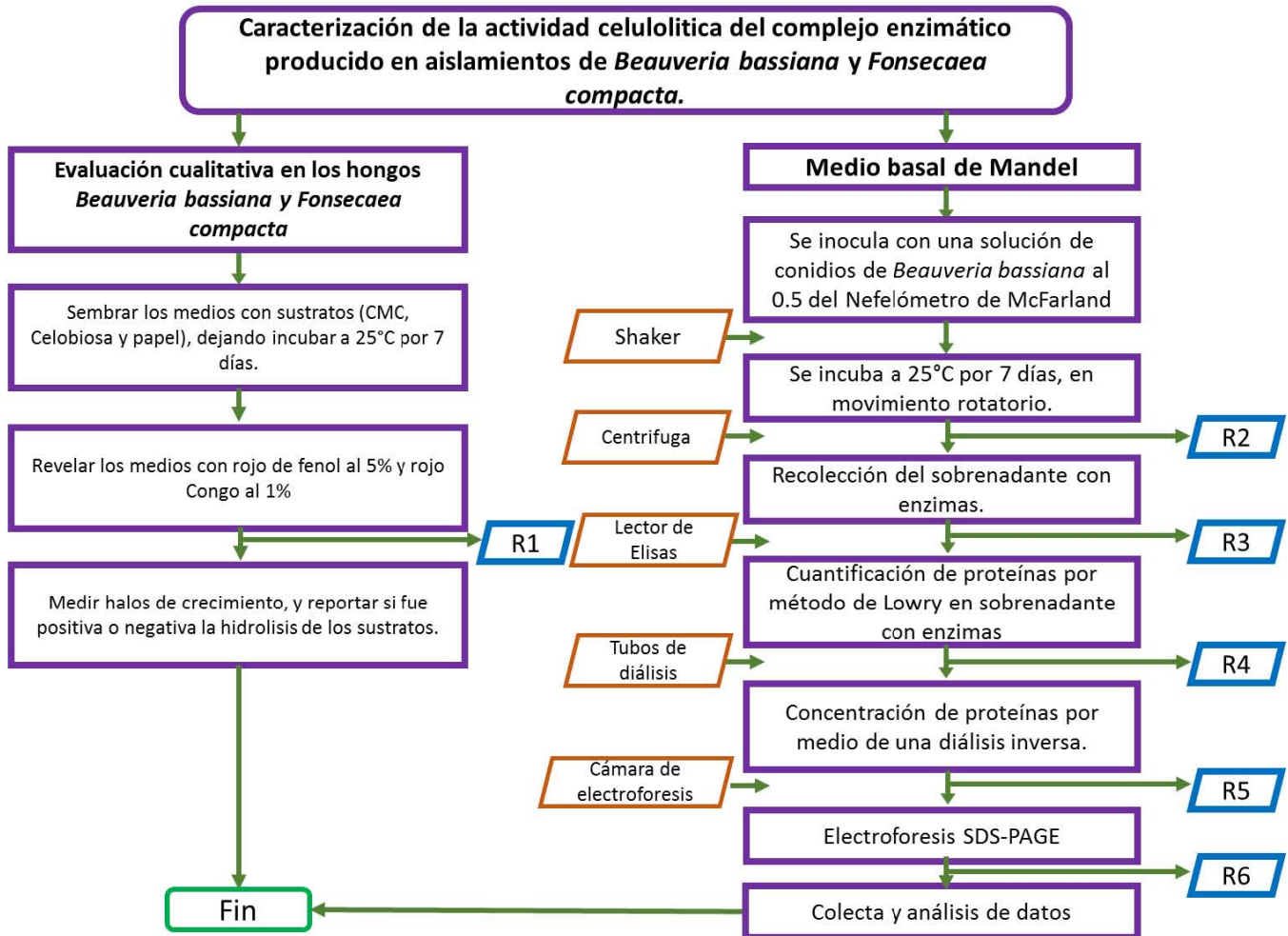
5. Hipótesis

Al favorecer la secreción del complejo celulolítico de *Beauveria bassiana* y *Fonsecaea compacta*, enfrentándolos en distintos medios con sustratos como la celobiosa, Carboximetil celulosa y papel, se podrán estudiar de manera cualitativa la actividad hidrolítica y crecimiento, comparándolos entre sí.

Con el medio de Mandel adicionando papel como fuente de carbono, se favorecerá la secreción del complejo para su recuperación, separando las proteínas por medio de una electroforesis en condiciones desnaturizantes, para verificar si hay proteínas con peso molecular que coincidan con proteínas del complejo celulolítico.

6. Materiales y Métodos

Diagrama 2. Procedimiento experimental



R1 Desechos biológicos (medios de cultivo con microorganismo) Se inactivan por autoclave a condiciones estándar 121°C/15lb/30 minutos.

R2 Desechos biológicos (medios de cultivo con microorganismo) Se inactivan por autoclave a condiciones estándar 121°C/15lb/30 minutos, y se separa la parte sólida (papel) del medio, al estar ya inactivada se puede desechar en basura municipal.

R3 Material de laboratorio ocupado se esteriliza para inactivación por autoclave de los microorganismos fúngicos.

R4 Reactivos orgánicos de Lowry, se etiquetan y se resguardan para su disposición final, recolección de cobre.

R5 La bolsa de diálisis es inactivada por autoclave condiciones estándar 121°C/15lb/30 minutos.

R6 Reactivos de electroforesis y gel de poliacrilamida, se etiquetan y se resguardan para su disposición final

6.1 Cepas fúngicas.

Estas cepas fúngicas de *Beauveria bassiana* y *Fonsecaea compacta* fueron obtenidas a partir de un muestreo de suelo con residuos vegetales en proceso de descomposición que realizaron por alumnos del CBT “Dr. Efraín Hernández Xolocotzi”, que posteriormente fueron aislados e identificados por Emma Gabriela Medina Cortes en su trabajo titulado “Identificación bioquímica y análisis bioinformático de microorganismos con actividad celulolítica y evaluación de la actividad enzimática implicada en la hidrólisis de celulosa contenida en papel bond con tinta.”

6.1.2. Conservación de cepas fúngicas

La *Beauveria bassiana* y la *Fonsecaea compacta*, se conservaron en solución salina estéril, provenientes de un cultivo de caldo de infusión cerebro/corazón.

6.2. Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo se prepararon con agua destilada y se esterilizaron en condiciones estándar de calor húmedo 121°C/ 15 PSI por 15 minutos.

6.2.1. Caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón)

Se disuelven 52gr. De caldo BHI (BD Bioxon®) en 1 litro de agua destilada, calentar a ebullición por un minuto hasta su completa disolución y se esterilizaron a condiciones estándar. Este medio se utiliza para crecer los hongos y pasarlos a agua destilada en viales para su conservación.

6.2.2. Agar base sangre adicionado con papel

Se utiliza este medio para la corroboración de la actividad celulolítica, empleando como fuente de carbono, celulosa proveniente de papel bond con tinta de impresora, así mismo, al utilizar las cepas en conservación se enfrentaron a este medio para mantener su actividad celulolítica y tener un aislamiento para las posteriores pruebas.

Componente	g/L
Papel pulverizado	3%
Medio agar base sangre (Merck)	40g.

6.2.3 Agar Agua

El agar agua se usa como base para la humedad necesaria para los hongos *Beauveria bassiana* y *Fonsecaea compacta*, y se fue adicionando con sustratos: papel, Carboximetil celulosa y celobiosa.

Tabla 6. Agar Agua	
Componentes	g/L
Agua	1 litro
Agar bacteriológico	15%

6.2.4. Agar agua adicionado con papel

Se manejó la base descrita anteriormente, solo que se agregó un círculo de papel estéril (papel filtro grado 595 1/2, Schleicher & Schuell ®), donde se sembraron los hongos por picadura.

6.2.5 Agar agua adicionado carboximetilcelulosa (CMC)

Base agar agua adicionando CMC.

Tabla 7 Agar agua adicionado con CMC	
Componentes	g/L
Agua	1 litro
Agar bacteriológico	15%
CMC	1%

6.2.6 Agar agua adicionado con Celobiosa

Base agar agua adicionando Celobiosa.

Tabla 8 Agar agua adicionado con celobiosa	
Componentes	g/L
Agua	1 litro
Agar bacteriológico	15%
Celobiosa	1%

6.2.7. Evaluación cualitativa en los hongos *Beauveria bassiana* y *Fonsecaea compacta*

Al tener los agares con sustratos, se sembraron los hongos por picadura, y se dejaron 7 días a temperatura ambiente, al pasar este tiempo se verificó la forma en

que crecieron, y se revelo con rojo de fenol al 5% (agar celobiosa) y rojo Congo al 1% (agar CMC y papel).

El rojo congo se utiliza para revelar la actividad celulolítica, debido a que se fija a las cadenas largas de celulosa; y el rojo de fenol es un indicador de pH que vira de 6 (color rojo) y 4 (color amarillo)

6.3 Medio basal de Mandel

Se utilizó el medio creado por Mary Mandel y James Weber (1969), que tiene como finalidad promover la excreción de enzimas del complejo celulolítico en hongos, se le dice basal ya que contiene nutrientes mínimos para que el microorganismo pueda crecer, y es adicionado con cofactores, y sales que amortiguan el cambio de pH, sin embargo, el pH es ajustable a las condiciones que el hongo lo requiera, el pH utilizado fue de 6; y un detergente (Tween 80) que evita la viscosidad del medio y se mantengan las proteínas excretadas en un medio acuoso, el Medio de Mandel puede ser adicionado con cualquier fuente de carbono, que promueva la excreción del complejo celulolítico, en este caso se utilizó papel bond con tinta de impresora (pulverizado), y la concentración del papel fue de 12 g/L.

Se coloca en matraces Erlenmeyer de 500ml. En cada uno de ellos se introdujo la cantidad de 300 ml. del Medio de Mandel y 3.6 g. de papel pulverizado y se esterilizo a condiciones estándar de 121°C/15 lb/15 min.

Se agregan antibióticos para evitar contaminación por bacterias, se utilizó Gentamicina a 0.05 g/L.

Se inocularon conidios de *Beauveria bassiana* en una solución de 2 ml, a 0.5 del nefelómetro de McFarland.

Tabla 9 Medio de Mandel	
Componente	g/L
KH ₂ PO ₄	8.00 g.
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.40 g.
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.30 g.
CaCl ₂ ·7H ₂ O	0.79 g.
Peptona bacteriológica	1.00 g.
Urea	0.30 g.
Tween 80	2.00 ml
Solución de oligoelementos	1.00 ml
Agua destilada hasta 1000 ml.	

Tabla 10 Solución de oligoelementos	
Componente	g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4.57 g.
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.82 g.
CoCl ₂ ·6H ₂ O	4.33 g.
HCl	5.00 ml
Agua destilada hasta 500 ml.	

6.3.1 Crecimiento de los hongos *Beauveria bassiana* y *Fonsecaea compacta* en medio de Mandel

Los matraces inoculados con los Hongos *Beauveria bassiana* y *Fonsecaea compacta*, fueron sometidos a una agitación rotatoria (Shaker – Multi tube rotator Barnstead International MOD 4632), por 7 días a temperatura ambiente, de los cuales cada día, se monitoreaba su crecimiento, observando el crecimiento adherido al papel bond, en los dos hongos.

Finalizado el proceso, se sometió a centrifugación de 3000 RCF en tubos de fondo cónico de 50 ml, con el fin de eliminar restos de papel y lo más posible de micelio de los hongos.

El sobrenadante se recolecta en otros tubos de fondo cónico estériles, y se denomina como “sobrenadante con enzimas”, se cuantifican las proteínas

6.3.2. Evaluación cualitativa en del sobrenadante con enzimas de *Beauveria bassiana*.

En los agares con sustratos se decidió hacer un pozo, donde se colocó una cantidad de 0.5 ml de sobrenadante con enzimas, y se incubo a diferentes tiempos (10, 15, 30min.) a una temperatura de 35°C, donde pasado estos tiempos se revelo con rojo de fenol al 5% (agar celobiosa) y rojo Congo al 1% (agar CMC).

6.4. Cuantificación de proteínas por Método de Lowry

La concentración de proteína antes y después de la diálisis inversa, se determinó por el método de Lowry, empleando albumina de suero bovino como curva patrón en una longitud de onda de 540nm.

6.5. Concentración de proteínas por diálisis inversa

Se usaron tubos de diálisis sin costura de celulosa con alta retención de proteínas (Sigma Aldrich®). La técnica se empleó a una temperatura de 0-3°C, en azúcar pulverizada.

6.6. Electroforesis

Las electroforesis se realizaron en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) con geles de poliacrilamida a concentración de 10% (gel separador) y de 3% (gel concentrador), y se usó el marcador preteñido Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards (10–250 kD) (BioRad®)

Tabla 11. Gel de separación para SDS-PAGE al 10%	
COMPONENTE	mL
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	1.700
TRIS-HCl 1.5 M pH 8.8	1.300
10% Persulfato De amonio	0.100
TEMED	0.002
SDS 10%	0.050
H ₂ O	2.000

Tabla 12. Gel de concentración para SDS-PAGE al 3%	
COMPONENTE	mL
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	1.000
TRIS-HCl 1.5 M pH 6.8	1.300
10% Persulfato de amonio	0.100
TEMED	0.004
SDS 10%	0.050
H ₂ O	2.700

Tabla 13. Buffer de corrimiento para SDS-PAGE	
Componente	g/L
Glicina	14.5
Tris-HCL	3.0
SDS	10%
Ajustar a pH de 8.3-9.0	

Tras la electroforesis las proteínas se visualizaron en tinción de azul de Comassie R-250 al 0,1% en metanol 40% y ácido acético 10%. Posteriormente, el gel se lavó sucesivas veces en una solución acuosa de metanol 30% y ácido acético 10%, con agitación suave, hasta visualizar las bandas de proteínas.

7. Resultados

Evaluación cualitativa de la actividad enzimática celulolítica y comportamiento de los hongos *Beauveria bassiana* y *Fonsecaea compacta* en medios adicionados con papel, celobiosa y carboximetilcelulosa.

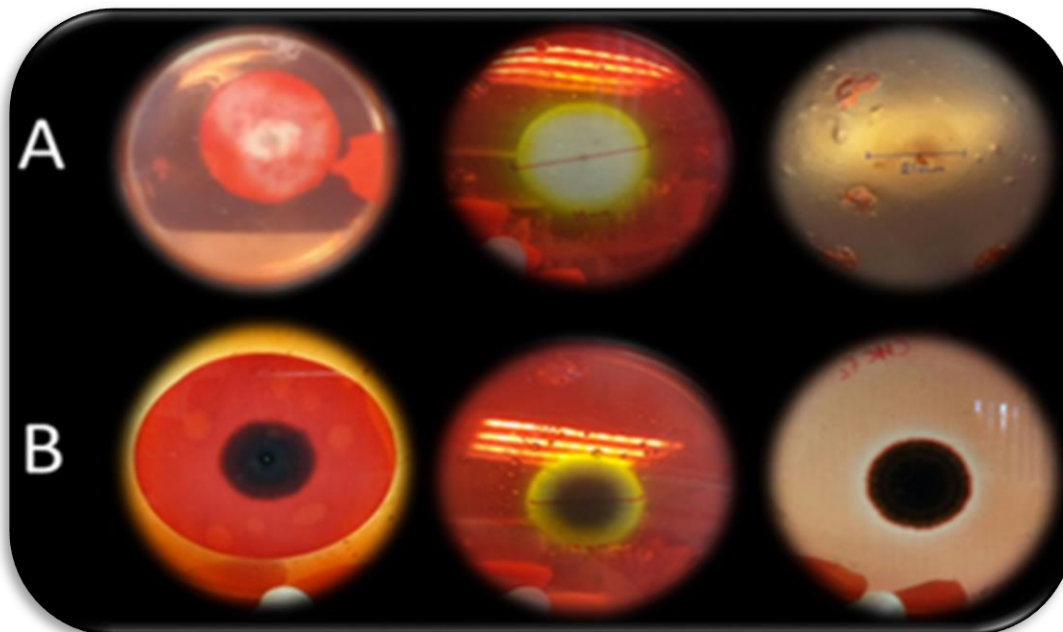


Imagen 9: Agar agua adicionado con sustratos: Papel, celobiosa y CMC (izquierda a derecha) en cultivos de (A) *Beauveria bassiana* y (B) *Fonsecaea compacta*

Tabla 14 Diámetro de crecimiento micelial (mm) en agares con sustrato al 7° día/ halo de hidrólisis			
	Agar papel /halo de hidrólisis	Celobiosa/ halo de hidrólisis	Carboximetil celulosa/ halo de hidrólisis
<i>Beauveria bassiana</i>	21mm /positiva	35mm/positiva	21mm/no evidente
<i>Fonsecaea compacta</i>	20mm/no evidente	25mm/positiva	30mm/positiva

En el agar agua-papel se observa un crecimiento en *Beauveria bassiana* y *Fonsecaea compacta* parecido, pero en *Fonsecaea compacta*, no se ve ningún halo de hidrólisis en el disco de papel, a diferencia de *Beauveria bassiana*, donde se difumina el halo, y se ven las partes donde no se fija el rojo Congo.

En el agar agua-celobiosa, el crecimiento es mayor en *Beauveria bassiana* que en *Fonsecaea compacta*, y en los dos se observa un cambio de pH, alrededor del hongo, al ser revelado con Rojo de fenol, lo que nos indica acidificación del medio, y presencia de un proceso metabólico (utilización de la celobiosa como fuente de carbono) en los dos hongos por igual.

En el agar carboximetil celulosa, el crecimiento de *Beauveria bassiana* se ve disminuido que en *Fonsecaea compacta*, ya que en *Beauveria*, la hifa aérea se observaba translúcida y no se desarrolla normalmente, en *Fonsecaea compacta* su desarrollo fue adecuado, y la hifa aérea se desarrolló como en cualquier otro medio.

Al ser revelado el medio de carboximetil celulosa con rojo Congo, se visualizó un halo de hidrolisis en *Fonsecaea compacta*, en *Beauveria bassiana* a pesar de que hubo un crecimiento desfavorable, no se logró observar ningún halo de hidrolisis.

Agar base sangre adicionado con papel

El halo de hidrolisis es evidente en el medio en el cultivo de *Beauveria bassiana*, al ser revelado con rojo Congo al 1% este se fija en las porciones donde no se observa el halo, indicándonos que se ha roto la cadena de celulosa. En el cultivo de *Fonsecaea compacta* se observa un halo pequeño alrededor del micelio aéreo, al revelarse con rojo Congo solo se observa el halo sobre el crecimiento del hongo.

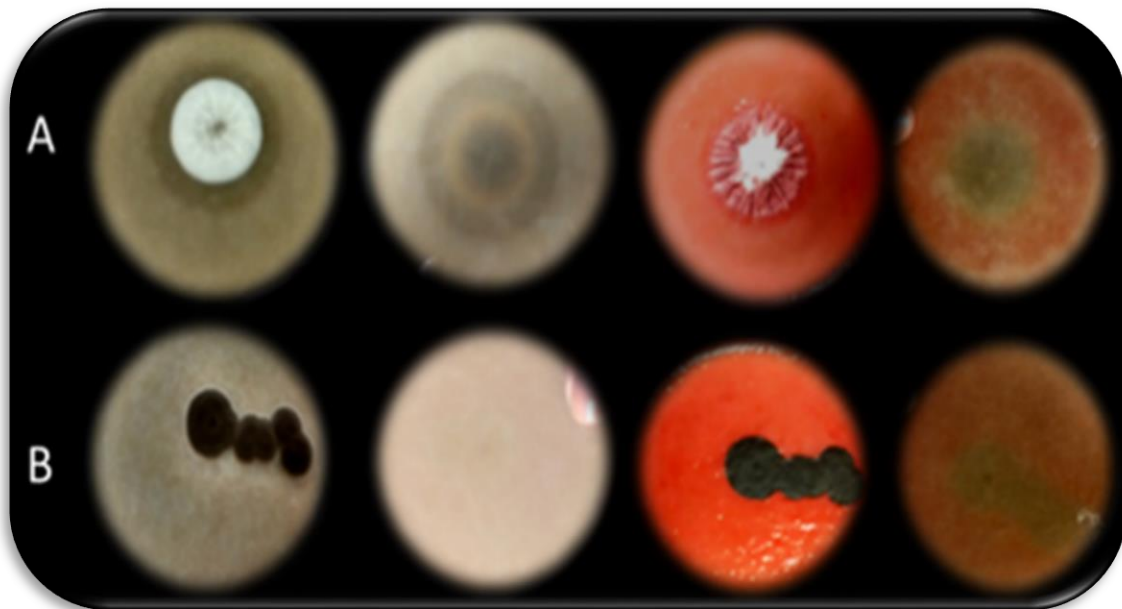


Imagen 10: Agar base sangre con papel, con cultivos de *Beauveria bassiana* y *Fonsecaea compacta*

(A) *Beauveria bassiana* en agar base sangre con papel, sin ser revelado con rojo Congo (micelio aéreo y micelio sumergido) y revelado con rojo Congo.

(B) *Fonsecaea compacta* en agar base sangre con papel, sin ser revelado con rojo Congo (micelio aéreo y micelio sumergido) y revelado con rojo Congo.

La disponibilidad de las fibras de celulosa contenidas en el papel con tinta es diferente después del tratamiento de pulverizado ya que las cadenas de celulosa están más expuestas, que en una lámina de papel bond.

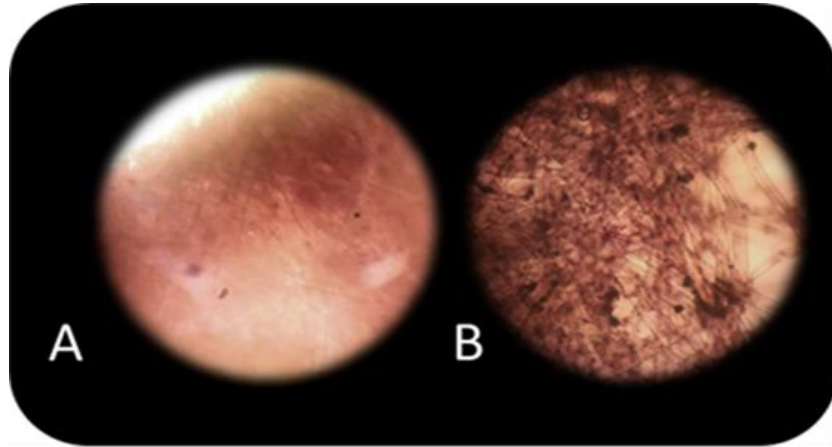


Imagen 11: Disponibilidad estructural de fibras de celulosa del papel bond sin proceso de pulverizado (A) y pulverizado (B).

Medio basal de Mandel

Matraces con medio de Mandel adicionado con papel con cultivos de 7 días de *Beauveria bassiana* y *Fonsecaea compacta*, el papel se aglomera en esferas por el movimiento rotatorio del agitador, y el micelio no se observa en la superficie, ya que los hongos crecieron alrededor de las esferas de papel.



imagen 12: Medio de Mandel adicionado con papel con tinta, cultivo de *Beauveria bassiana* (izquierda) cultivo de *Fonsecaea compacta* (derecha).

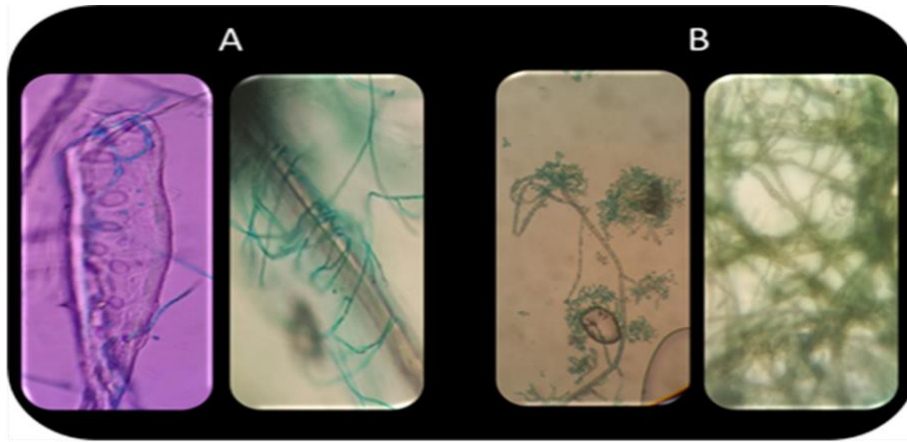


Imagen 13: Monitoreo del crecimiento en el medio basal de Mandel, al séptimo día de cultivo, (A) *Beauveria bassiana* y (B) *Fonsecaea compacta*.

Las hifas en *Beauveria bassiana* se van enredando en las fibras del papel, en *Fonsecaea compacta* se entretejen en los aglomerados de papel.

Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

Se cuantificaron las proteínas contenidas en el sobrenadante recuperado del medio de Mandel en cultivo de *Beauveria bassiana*, antes (absorbancia 1) y después (absorbancia 2) de la diálisis inversa, para obtener una concentración adecuada para realizar la electroforesis. El Método matemático utilizado fue la curva patrón estándar, utilizando la ecuación de la recta para obtener las concentraciones problema de las proteínas.

Tabla 15 Cálculo de concentración vs absorbancia Método de Lowry	
Concentración en mg/μL	Absorbancia
0.000	0.000 blanco Agua destilada
0.005	0.0243
0.01	0.0382
0.015	0.059
0.02	0.0699
0.025	0.0877
0.03	0.1096
0.035	0.1187
0.003	0.0185 Abs. Problema 1
0.006	0.0302 Abs. Problema 2

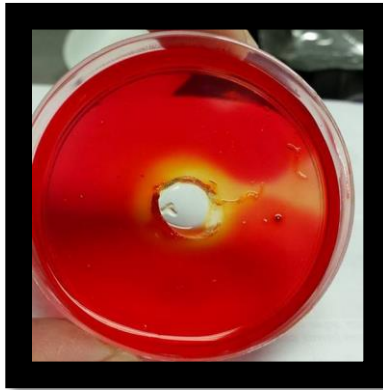
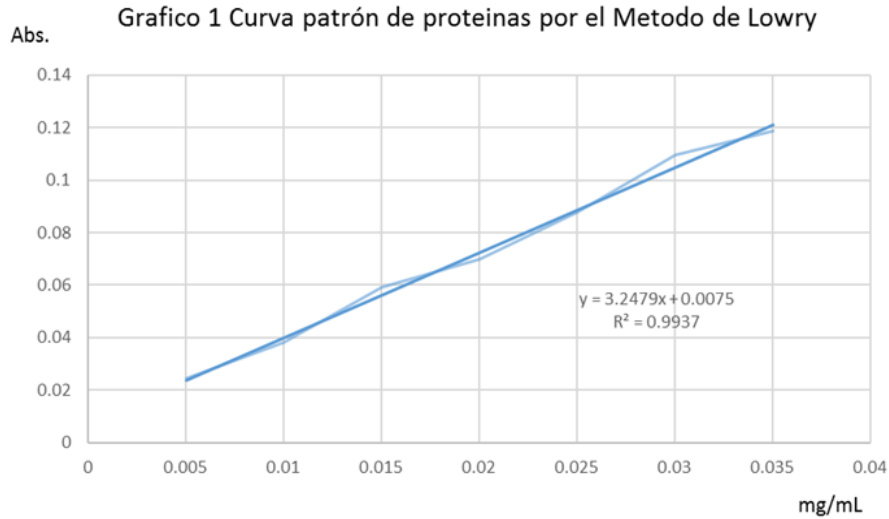


Imagen 14: Actividad celulolítica del sobrenadante concentrado después de la diálisis inversa.

Se observa la acidificación del medio después de colocar sobrenadante en un medio adicionado con celobiosa, para verificar si aún existía actividad celulolítica aun después de la diálisis; dando positivo a hidrolisis.

Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis en condiciones desnaturizantes se utilizó para separar las proteínas contenidas en el sobrenadante de enzimas, concentrado por una diálisis inversa, proveniente del cultivo de *Beauveria bassiana* a partir del medio de Mandel, en el primer carril se encuentra las bandas provenientes del marcador de peso molecular preteñido Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards (10–250 kD) (BioRad®), en el segundo carril se encuentra la muestra del sobrenadante concentrado en condiciones reductoras con 2-Mercaptoetanol, mostrándose cuatro bandas, y el tercer carril; el mismo sobrenadante concentrado en condiciones no desnaturizantes; mostrándose seis bandas de diferentes pesos moleculares. (Imagen 15)

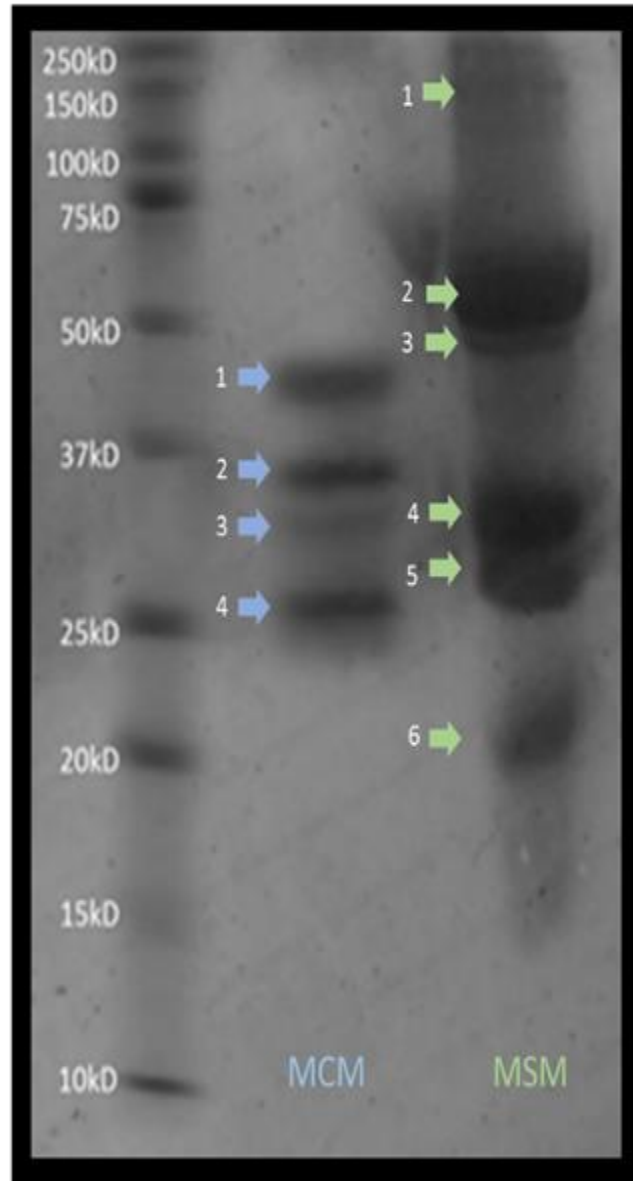
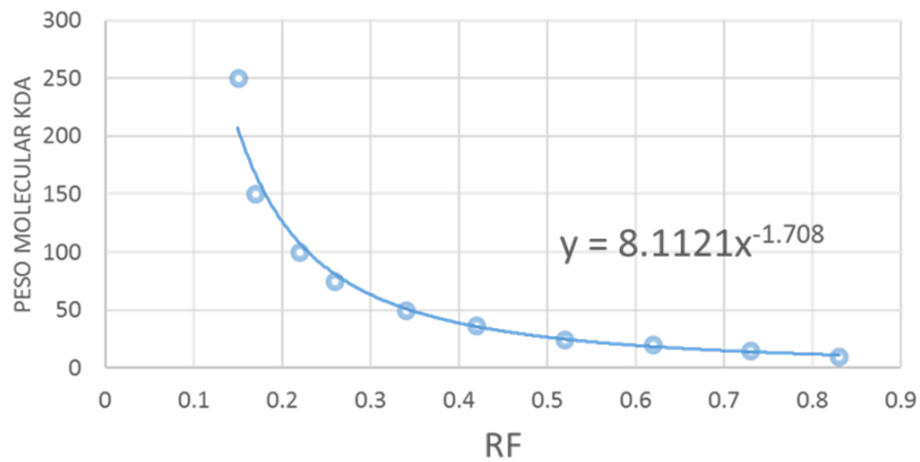


Imagen 15 Gel de electroforesis SDS-PAGE, Muestra de *Beauveria bassiana* en condiciones reductoras (MCM), Muestra de *Beauveria bassiana* en condiciones no reductoras (MSM).

Para determinar el peso molecular de cada una de las bandas mostradas en el gel se realizan gráficos, donde se calcula el Rf que es una medida convencional de la movilidad de la proteína relativa al frente de migración.

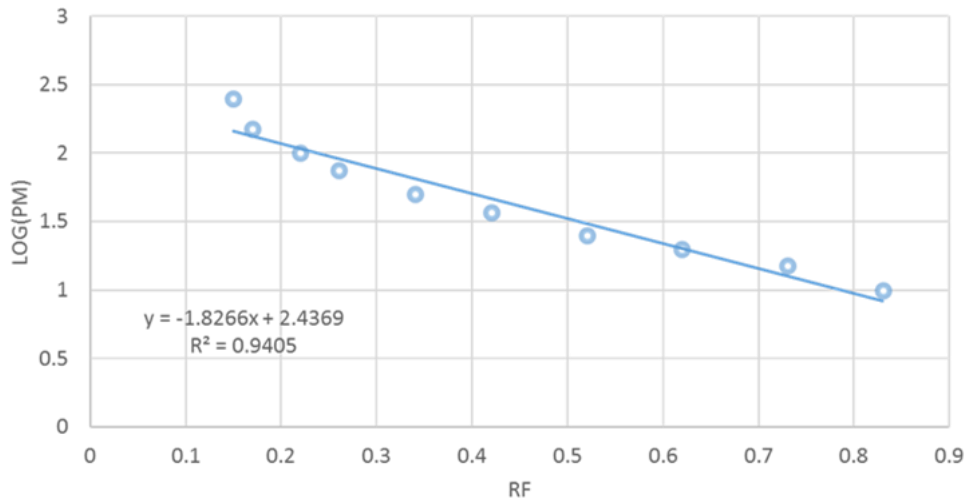
$$\text{Rf} = \frac{\text{Distancia que migra una proteína}}{\text{Distancia que migra el frente del gel}}$$

Gráfico 2 : Peso molecular vs Rf



Al realizar un Gráfico del peso molecular de la proteína patrón (marcador de peso molecular) como función del valor de Rf, se obtiene un gráfico ligeramente sigmoideo. (Gráfico 2)

Gráfico 3: Log PM vs Rf



El peso desconocido puede estimarse por el análisis de regresión lineal o por interpolación en la curva del log(PM) contra Rf. (Gráfico 3)

Tabla 15 Pesos moleculares de bandas del carril dos de muestras en condiciones reductoras (MCM)		
Numero de banda	Rf incógnitas de MCM (90mm)	Peso Molecular (kDa)
1	0.38	42.3500
2	0.44	36.9600
3	0.48	34.4100
4	0.53	28.9900

Tabla 16 Pesos moleculares de bandas del carril tres de muestras en condiciones no reductoras (MSM)		
Numero de banda	Rf incógnitas de MCM (90mm)	Peso Molecular (kDa)
1	0.20	157.7500
2	0.26	80.9700
3	0.35	48.7300
4	0.48	34.4100
5	0.52	29.1206
6	0.61	18.8700

Se calculó los pesos moleculares de cada banda de los carriles dos (MCM) y el tres (MSM), a partir de la ecuación de la recta, obteniendo pesos moleculares desde 28 a 42 kDa, y de 18 a 157 kDa.

8. Análisis de resultados

Se utilizó agares con sustratos que son intermediarios en el hidrolisis de la celulosa como la carboximetilcelulosa y la celobiosa, para ver el comportamiento de los hongos *Beauveria bassiana* y *Fonsecaea compacta*.

En el agar agua con papel filtro grado 595 1/2, Schleicher & Schuell®, que esta mayormente compuesto por α -celulosa que constituye una celulosa insoluble y no degradada de alto peso molecular, los hongos *Beauveria bassiana* (21mm) y *Fonsecaea compacta* (20mm) crecieron favorablemente, con un radio micelial parecido, indicándonos que está obteniendo recurso energético a partir del papel,

para observar la utilización de la alfa-celulosa, se revelo con rojo Congo al 1%, aclarando zonas de hidrolisis en *Beauveria bassiana*, en *Fonsecaea compacta* este halo no es evidente, pero no obstante no significa que no utilice la celulosa, ya que el crecimiento está presente. (imagen 9, tabla 14)

La diferencia del crecimiento en papel filtro grado 595 ½, (catalogo Millipore®) y en papel bond normal, es diferente, ya que es mejor en el papel bond, debido a la estructura de la celulosa y la disponibilidad de esta, pero aun así los hongos son capaces de hidrolizar la celulosa en cualquier tipo de presentación, pero quizá el tiempo de la utilización completamente sea variado y más alargado.

En el agar agua adicionado con celobiosa, los hongos crecieron de diferente diámetro ya que en *Beauveria bassiana* (35mm) fue un crecimiento mayor respecto al de *Fonsecaea compacta* (25mm), al revelarlos con rojo de fenol, se vio un vire a un color amarillo, indicándonos acidificación del medio, ya que se siguió el mismo principio del medio rojo de fenol, el cual al utilizar un azúcar este medio se acidifica y cambia de color a amarillo indicándonos la utilización de dicho azúcar, de igual manera cualquier otro indicador de pH, servirá mientras el rango de vire sea entre 6 a 4. (imagen 9, tabla 14)

En el caso del agar agua adicionado con carboximetil celulosa es un derivado de la celulosa, pero más soluble en agua, este sustrato se utiliza para evaluar la actividad celulolítica de microorganismos, si bien el crecimiento de los hongos *Beauveria bassiana* (21mm) y *Fonsecaea compacta* (30mm) es muy diferente debido a que se ve disminuido en *Beauveria bassiana* que en *Fonsecaea compacta*, y estructuralmente *Beauveria bassiana* no se desarrolla adecuadamente, ya que su micelio aéreo es translucido y se observa seco, y no algodonoso como se describe normalmente.

El agar agua se utilizó para ayudar a obtener la humedad adecuada que requería el hongo en los siete días de cultivo; ya que es un medio pobre, que solo contiene agar y agua, también se utilizó para evitar la utilización de otras fuentes de energía y solo los hongos se limitaran a los sustratos elegidos.

Si bien a base de estas comparaciones, sabemos que la actividad de cada una de las enzimas se ve implicada en la degradación de cada uno de los sustratos, ya que en el agar celobiosa interviene la enzima β -glucosidasa, que degrada celobiosa hasta glucosa, y bien esta es utilizada por *Fonsecaea compacta* y en *Beauveria bassiana*, y al observar el crecimiento de los hongos en este medio con el sustrato podemos confirmar que hay actividad de la β -glucosidasa y se está utilizando para el crecimiento de estos.

La evaluación de las enzimas endoglucanasa y exoglucanasa se ven observados en los agares con CMC y papel, ya que estos trabajan en conjunto para romper la cadena de celulosa, al romper esta cadena se generan fragmentos más pequeños

de la hidrólisis de esta y que intervienen las exoglucanasas para liberar su principal producto: la celobiosa.

Estas al estudiarlas por separado se necesitan recuperar y separar por alguna técnica cromatografía de exclusión, ya que al trabajar con sinergismo las tres enzimas es imposible estudiarlas cualitativamente por este método.

De igual manera al observar el comportamiento de los hongos, se puede decir que la actividad "endo" y "exo" es parecida en los dos hongos, por su crecimiento parecido, pero que se diferencian al no haber un halo de hidrólisis evidente en *Fonsecaea compacta* en el papel, quizá se deba a que es diferente la utilización o el tiempo del cultivo, ya que dependerá de cada hongo su forma de utilización de cada sustrato, y el tiempo en que lleve su hidrólisis total, lo que si podemos decir es que la hidrólisis en el papel por parte de *Beauveria bassiana* es evidente más rápido que en *Fonsecaea*.

El agar base sangre con papel se utilizó para ver si los hongos podían crecer en condiciones que los limitaran en cuanto a fuente de carbono, el papel esta hecho de fibras de celulosa, a lo que solo de esta manera obtendría este polímero como un recurso energético, al observar el crecimiento de los dos hongos en este medio, se confirma que utilizan esta fuente de carbono, porque, en caso de *Beauveria bassiana*, se observó un halo de hidrólisis, y su crecimiento fue adecuado para los días que se incubo que fueron siete a temperatura ambiente ; en el caso *Fonsecaea compacta* no había un halo de hidrólisis evidente, pero su crecimiento fue más lento y no correspondía a un cultivo de siete días. La actividad celulolítica se evidenció mediante evaluación cualitativa con el revelado de zonas de aclaramiento utilizando rojo Congo al 1% (p/v), se utiliza como revelador debido a que se adhiere a la celulosa. (Hendricks et al., 1995; Lu et al.,2005; Zhang et al.,2006).

El colorante no se fijó donde se observaba el halo en caso de *Beauveria bassiana*, en *Fonsecaea compacta* fue evidente un halo donde no se fijó el colorante; de tamaño pequeño pegado al micelio aéreo. En este medio, sabemos que los hongos utilizan celulosa proveniente del papel bond, y pueden desarrollarse como en cualquier otro medio rico, y esta entendido que producen enzimas que degradan la celulosa. (Imagen 9)

De igual manera, sabemos que los hongos *Fonsecaea compacta* y *Beauveria bassiana* se comportan de manera diferente en los cultivos en este medio, y que su utilización de la celulosa es distinta entre ellos. Por lo anterior se utilizó el medio de Mandel para promover la secreción del complejo celulolítico, ya que con el antecedente del agar papel, sabemos que tiene la capacidad de producir dicho complejo.

Medio basal de Mandel en *Beauveria bassiana*

Es un medio creado por Mary Mandel y James Weber (1969), que describen en su artículo, es un medio basal, para la fermentación y recuperación de las celulasas,

está compuesto de sales y oligoelementos, que mantienen el pH y cofactores para el sostén de la actividad celulolítica, al igual que evita la viscosidad por los metabolitos secundarios y estén en una solución acuosa para su posterior recuperación.

El medio se modificó respecto a la fuente de carbono, utilizando papel bond con tinta, ya que se puede emplear cualquier fuente que contenga celulosa, pero esto afecta en la producción de las enzimas, un ejemplo, se puede usar hojarasca en el medio, pero la disponibilidad de la celulosa es limitada ya que está envuelta por fibras lignocelulosicas y se ve mermado. En la fijación de las enzimas celulolíticas por la disponibilidad estructural de esta, o bien tener una fuente de carbono de fácil disponibilidad como la celulosa micro cristalina, favorece en tiempo, actividad y la producción del complejo.

El papel bond con tinta se utilizó como fuente de carbono, por reciclaje, ya que es un material que se dispone en todos lados, sin costo, y que está libre de lignina, la desventaja de utilizar el papel, es que son fibras compactas, y evita la disponibilidad estructural de la celulosa, y la fijación de las enzimas se ve afectado. (Imagen 11)

Otro de los inconvenientes es que al tener una menor disponibilidad estructural es mayor el tiempo de la fermentación y no es adecuada la secreción del complejo.

Cabe mencionar que en procesos biotecnológicos la palabra fermentación se denomina a la producción industrial de biomasa, enzimas o metabolitos en general mediante el crecimiento controlado de células, especialmente las bacterianas (Amerine, 1967).

El crecimiento del hongo *Beauveria bassiana* y *Fonsecaea compacta* fue monitoreado en siete días, tomando muestras diarias y observándolas en el microscopio, en los días uno y dos, se observaron conidios, en el tercer día se observaron hifas, a partir de cuarto día al séptimo, las hifas se fueron enredando en las fibras de papel. (imagen 13), esto nos indica que los hongos buscan crecer cerca de la fuente de carbono.

Se cuantificaron las proteínas por método de Lowry contenidas en el sobrenadante recuperado en el Medio de Mandel, con el cual hubo un incremento de proteínas respecto a un blanco. (Grafico 1)

La concentración es muy poca (0.98mg/ml), a pesar de que el medio sea un promotor para estas enzimas, pero sabemos que la fuente de carbono quizás no sea la óptima, y que igualmente el complejo es secretado en proporciones diferentes respecto a las tres enzimas, y que puede que se vaya disminuyendo la secreción al paso de los días por algún tipo de inhibición existente, ya que se sabe que estas enzimas tienden a ser inhibidas por el producto generado. (Emert y Brown, 1973; Workman y Day, 1982)

Al tener poca concentración de proteínas en el sobrenadante del medio de Mandel, se concentró por medio de una diálisis inversa.

Se usaron tubos de diálisis sin costura de celulosa con alta retención de proteínas (Sigma Aldrich®). La técnica se empleó a una temperatura de 0-3°C, en azúcar pulverizada, debido a que la actividad enzimática comienza a partir de los 25°C, pero las celulasas poseen dos dominios diferentes: el dominio catalítico y el dominio de unión a la celulosa (Schulein, 1997). A lo que las enzimas pueden quedar adheridas a la membrana de diálisis, ya que solo con el hecho de bajar la temperatura solo se evita la actividad de estas, el inconveniente de este proceso, es que al hacerlo en frío, se alarga el tiempo de la diálisis ya que moléculas de fuera y por dentro del tubo se ven afectadas por este factor.

Al saber que las proteínas se fijarían en la membrana de diálisis se realizó una prueba cualitativa, donde se verificó si algunas proteínas tendrían actividad celulítica colocándolas en un medio adicionado con celobiosa, e incubándolo 15 minutos a temperatura de 36°C, se obtuvo un halo de hidrolisis, indicando que aún hay enzimas del complejo celulolítico y que no todas se perdieron al hacer la diálisis. (Imagen 14)

En el caso de *Fonsecaea compacta* no se realizó la electroforesis, y el sobrenadante obtenido del medio de Mandel, no fue posible recuperarlo, debido a que el crecimiento de *Fonsecaea compacta* se vio afectado por situaciones respecto a la temperatura y humedad, ya que en temporadas frías el hongo no crece adecuadamente; se adaptó una incubadora para mantenerlo a condiciones adecuadas, pero la humedad requerida no se logró aportar. Si bien en la literatura, se menciona que es un hongo perteneciente a temperaturas cálidas y húmedas. (Attili, D. S, 1998), pero el trabajo realizado fue en las temporadas otoño-invierno, donde no fue posible recuperar un cultivo de *Fonsecaea compacta*.

Fonsecaea compacta se trabajó en las otras partes de la experimentación, pero en temporadas cálidas donde el microorganismo si tenía condiciones óptimas para su crecimiento y desarrollo.

A partir del concentrado de enzimas, se realizó una electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) en *Beauveria bassiana*. En el carril dos, (MCM) se colocó concentrado en condiciones reductoras con 2-mercaptoetanol, y en el carril tres en condiciones no reductoras. (imagen 15)

En el carril en condiciones reductoras, se observaron 4 bandas de pesos moleculares en un rango de 28 a 42 kDa, si bien sabemos que el 2-mercaptoetanol separa los enlaces disulfuro de las proteínas y las estructuras cuaternaria y terciaria se ven disruptas, y se utiliza para el análisis de la oligomerización de las proteínas (Knight, J. J.2004). (Imagen 15)

Buscando en la literatura sobre el grado de oligomerización de las enzimas del complejo celulolítico, no hay reportes como tal, ya que depende del origen del complejo ya sea bacteriano o fúngico y varían estructuralmente.

En este caso las bandas observadas no sabemos si corresponden a alguna proteína que forme parte del complejo celulolítico, y si son subunidades de una misma proteína o de diferentes proteínas, y si es que llegaran a corresponder a alguna proteína del complejo celulolítico serían de la enzima BGL, ya que presentan hasta tres tipos de dímeros.

Tabla 17. Comparación de pesos moleculares (kDa) de distintas especies fúngicas productoras del complejo celulolítico.			
Celulasas	Especie	Análisis electroforético en <i>B. bassiana</i>	
BGL-1	<i>T. amestolkiae</i> 70 kDa	<i>Beauveria bassiana</i> 80 kDa	
	<i>P. piceum</i> 92 kDa		
	<i>S. sclerotiorum</i> 76.5 kDa		
	<i>T. reesei</i> 117 kDa		
BGL-2	<i>T. amestolkiae</i> 100 kDa		
	<i>T. reesei</i> 98kDa		
BGL-3	<i>T. amestolkiae</i> 100 kDa		
EG	<i>P. pinophilum</i> 42 kDa		<i>Beauveria bassiana</i> 48 kDa
	<i>T. reesei</i> 52.8 kDa.		
CBH	<i>F. oxysporum</i> 110 kDa		<i>Beauveria bassiana</i> 154 kDa, 80 kDa y 48 kDa.

En el caso de la muestra en condiciones no reductoras tenemos seis bandas de 19-157 kDa, (Imagen 14) en las cuales se hicieron cálculos mediante la comparación de su movilidad electroforética relativa (Rf) para determinar sus pesos moleculares, al comparar estos pesos moleculares con la literatura se encontró que los pesos

moleculares de las enzimas BGL en *T. amestolkiae* son de 70 kDa para BGL-1 y 100 kDa para BGL-2 y BGL-3, (Gil, 2005) y en *P. piceum* su peso de BGL-1 es de 92 kDa (Chen et al., 2010), y otro hongo filamentoso como en *Sclerotinia sclerotiorum* su BGL-1 pesa 76.5 kDa, (Issam, SM 2003) en *Beauveria* no sabemos cuántos isómeros de BGL están presentes, pero tenemos una banda que podría corresponder a un isómero de BGL con un peso molecular de 80 kDa.

En el caso de las endoglucanasas sabemos que el peso molecular en *Penicillium pinophilum* es de 42 kDa (Pol D1, Laxman RS, Rao M. 2012), tenemos una banda que corresponde a un peso molecular parecido de 48 kDa.

En las exoglucanasas se tiene reportado que varían los pesos moleculares desde 40 a 250 kDa, pero se tiene el dato de que en el hongo filamentoso *Fusarium oxysporum* corresponde a un peso molecular de 110 kDa, (Christakopoulos, 1994) se analizan bandas con pesos moleculares que podrían entrar en el rango, pero es aún incierto a cuál anda de los pesos moleculares obtenidos correspondan a esta enzima ya que se tienen bandas de 154 kDa ; 80 kDa y 48 kDa.

Para saber si estas bandas corresponden a una enzima que tiene actividad celulolítica se recomendaría hacer una electrotransferencia o un zimograma con sustratos específicos donde se observe las actividades, sin embargo, en esta electroforesis desnaturante es imposible detectar la actividad enzimática, el zimograma o electrotransferencia sería desde una electroforesis nativa, para poder determinar si corresponden o no al complejo.

La información generada en este trabajo, da pie a continuar con estudios de carácter bioquímico principalmente, con el fin de determinar las características de las proteínas encontradas en los extractos enzimáticos de *Beauveria bassiana*, y aplicarlo en *Fonsecaea compacta*, ya que queda inconclusa esta parte de este microorganismo.

9. Conclusiones

Se comparó la actividad producida por complejos celulolíticos, producidos por *Beauveria bassiana* y *Fonsecaea compacta*, de forma cualitativa, enfrentándolas a distintos sustratos que intervienen en la ruptura de la cadena de celulosa.

Se evaluó el sobrenadante obtenido del medio de Mendel que se utilizó como promotor de enzimas celulolíticas, donde se manejó como sustrato papel bond con tinta, se determinó que el papel sería una buena fuente de carbono de fácil acceso, pero muy tardado en el proceso de fermentación.

El estudio electroforético nos indica la presencia de proteínas que pudieran corresponder al complejo celulolítico, pero aun así se desconoce su peso molecular con exactitud, y cuál de todos los resultados pudieran corresponder, pero aun así se recomienda la separación de estas para su estudio en profundidad.

Se estableció una metodología donde pudieran recuperarse las enzimas para su posterior estudio, así como su manejo y manutención.

10. Perspectivas

Se deben analizar parámetros bioquímicos sobre las enzimas, sobre su pH óptimo, temperatura adecuada, y que tipos de inhibiciones, para su mejor caracterización. El estudio de cada una de las enzimas es primordial, pero estas deben ser estudiadas por separado, para así obtener más datos. El sobrenadante con enzimas se puede utilizar para su estudio y separación por medio de una cromatografía de exclusión, para hacer análisis de inhibición, actividad hidrolítica, y composición de aminoácidos de cada proteína.

Para saber si las enzimas extraídas desde el concentrado proveniente del medio de Mandel corresponden al complejo celulolítico se recomienda una técnica de zimograma para así determinar si hay actividad enzimática y poderlas caracterizar en cuanto su peso molecular.

Para un estudio molecular posterior se deben obtener más datos sobre el complejo celulolítico, ya que en *Fonsecaea compacta* no hay datos sobre dicha actividad, y en *Beauveria bassiana* no ha sido reportada como tal, ya que se necesita la secuenciación de los genes de estas proteínas y ya se podrían comparar la homología que hay entre otras especies productoras del complejo.

La aplicación de *Beauveria bassiana* es diversa debido a que se utiliza como biopesticida, una idea es fusionar las ideas del reciclado de componentes celulolíticos y la acción biopesticida en invernaderos controlados, para su utilización en la tierra y aportar nutrientes, y así fomentar el reciclado de papel, y se evitarían plagas perjudiciales en cultivos.

11. Referencias

1. Amerine, M.A., Berg, H.W., Cruess, W.V., The technology of wine making. 2da.ed. Westport: AVI, 1967, pp.797.
2. Bakos, P., Uvas para todo Misiones., Diario el Territorio, Posadas (9/12/2009). Suplemento Económico p. 8. Misiones Argentina, 2009.
3. Attili, D. S.; Hoog, G. S. de; Pizzirani-Kleiner, A. A. (1998). "rDNA-RFLP and ITS1 sequencing of species of the genus *Fonsecaea*, agents of chromoblastomycosis". *Medical Mycology*. 36 (4): 219–225.
4. Aro, N., Pakula, T. y Penttila, M., 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 719-739.
5. Belghith, H., Ellouz-Chaabouni, S. y Gargouri, A., 2001. Biostoning of denims by *Penicillium occitanis* (Po16) cellulases. *Journal of Biotechnology*, 89: 257-262.
6. Bhat, M.K., 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18: 355-383.
7. Bhat, M.K. y Bhat, S., 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, 15: 583-620.
8. Blanchette, R.A., 1991. Delignification by wood-decay fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 29: 381-398.
9. Blanchette, R.A., 1995. Degradation of the lignocellulose complex in wood. *Canadian Journal of Botany*, 73: S999-S1010.
10. CHRISTAKOPOULOS', Peter W. GOODENOUGH', Dimitris KEKOS', Basil J. MACRIS', Marc CLAEYSSENS³ and Mahalingeshwara K. BHAT Purification and characterisation of an extracellular glucosidase with transglycosylation and exo-glucosidase activities from *Fusarium oxysporum*
11. Chen et al., 2010 M. Chen, Y.Q. Qin, Z.Y. Liu, K. Liu, F.S. Wang, Y.B. Qu Isolation and characterization of a β -glucosidase from *Penicillium decumbens* and improving hydrolysis of corncob residue by using it as cellulase supplementation.
12. *Enzyme Microb. Technol.*, 46 (2010), pp. 444-449
13. Cowling, E.B., 1975. Physical and chemical constraints in hydrolysis of cellulose and lignocellulosic materials. *Biotechnology and Bioengineering*, 5: 163-181.
14. Daniel, A.I.D., Neto, C.P., Evtuguin, D.V. y Silvestre, A.J.D., 2003. Hexenuronic acid contents of *Eucalyptus globulus* kraft pulps: Variation with pulping conditions and effect on ECF bleachability. *Tappi Journal*, 2: 3-8.
15. Dashtban, M., Schraft, H. y Qin, W., 2009. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues: opportunities & perspectives. *International Journal of Biological Sciences*, 5: 578-595.

16. de Castro, A.M. y Pereira, N., Jr., 2010. Production, properties and application of cellulases in the hydrolysis of agroindustrial residues. *Quimica Nova*, 33: U181-U208.
17. Emert, G.H. y Brown, R.D., 1973. Purification and characterization of cellobiase from *Trichoderma viride*. *Federation Proceedings*, 32: 528-535.
18. Esterbauer, H., Steiner, W., Labudova, I., Hermann, A. y Hayn, M., 1991. Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. *Bioresource Technology*, 36: 51-65.
19. Foreman, P.K., Brown, D., Dankmeyer, L., Dean, R., Diener, S., Dunn-Coleman, N.S., Goedegebuur, F., Houfek, T.D., England, G.J., Kelley, A.S., Meerman, H.J., Mitchell, T., Mitchinson, C., Olivares, H.A., Teunissen, P.J.M., Yao, J. y Ward, M., 2003. Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 31988-31997.
20. Galante, Y., De Conti, A. y Monteverdi, R., 1998. Application of *Trichoderma* enzymes in the food and feed industries. Harman GE, Kubicek CP, editors. *Trichoderma and Gliocladium*. London: Taylor and Francis, 327-342.
21. Himmel, M.E., Ding, S.Y., Johnson, D.K., Adney, W.S., Nimlos, M.R., Brady, J.W. y Foust, T.D., 2007. Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 315: 804-807.
22. DE HOOG, G.S. 1972. The genera *Beauveria bassiana*, *Iritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. *Studies in Mycology* 1 : 1-41.
23. Kirk, T.K. y Farrell, R.L., 1987. Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology*, 41: 465-505.
24. Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.P. y Bohn, A., 2005. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie-International Edition*, 44: 3358-3393.
25. Koshland, D.E., 1953. Stereochemistry and the Mechanism of Enzymatic Reactions. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 28: 416-436.
26. Kuhad, R.C., Gupta, R. y Singh, A., 2011. Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research*, 2011: 280696-280706.
27. Kumar, R., Singh, S. y Singh, O.V., 2008. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35: 377-391.
28. Le Crom, S., Schackwitz, W., Pennacchio, L., Magnuson, J.K., Culley, D.E., Collett, J.R., Martin, J., Druzhinina, I.S., Mathis, H., Monot, F., Seiboth, B., Cherry, B., Rey, M., Berka, R., Kubicek, C.P., Baker, S.E. y Margeot, A., 2009. Tracking the roots of cellulase hyperproduction by the fungus *Trichoderma reesei* using massively parallel DNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 16151-16156.

29. Leatham, G.F., 1986. The ligninolytic activities of *Lentinus edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 24: 51-58.
30. Leite, R.S.R., Alves-Prado, H.F., Cabral, H., Pagnocca, F.C., Gomes, E. y Da Silva, R., 2008. Production and characteristics comparison of crude beta-glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* and *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, 43: 391-395.
31. Lymar, E.S., Li, B. y Renganathan, V., 1995. Purification and characterization of a cellulose-binding beta-glucosidase from cellulose-degrading cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 2976-2980.
32. Lynd, L.R., Cushman, J.H., Nichols, R.J. y Wyman, C.E., 1991. Fuel ethanol from cellulosic biomass. *Science*, 251: 1318-1323.
33. Mandels, M. y Weber, J., 1969. Production of cellulases. *Advances in Chemistry Series*, 95: 391-414.
34. Martínez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Duenas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillen, F., Martínez, M.J., Gutierrez, A. y del Rio, J.C., 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, 8: 195-204.
35. Martínez, A.T., Rencoret, J., Nieto, L., Jimenez-Barbero, J., Gutierrez, A. y del Rio, J.C., 2011. Selective lignin and polysaccharide removal in natural fungal decay of wood as evidenced by in situ structural analyses. *Environmental Microbiology*, 13: 96-107.
36. Martínez, D., Berka, R.M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S.E., Chapman, J., Chertkov, O., Coutinho, P.M., Cullen, D., Danchin, E.G., Grigoriev, I.V., Harris, P., Jackson, M., Kubicek, C.P., Han, C.S., Ho, I., Larrondo, L.F., de Leon, A.L., Magnuson, J.K., Merino, S., Misra, M., Nelson, B., Putnam, N., Robbertse, B., Salamov, A.A., Schmoll, M., Terry, A., Thayer, N., Westerholm-Parvinen, A., Schoch, C.L., Yao, J., Barbote, R., Nelson, M.A., Detter, C., Bruce, D., Kuske, C.R., Xie, G., Richardson, P., Rokhsar, D.S., Lucas, S.M., Rubin, E.M., Dunn-Coleman, N., Ward, M. y Brettin, T.S., 2008. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnology*, 26: 553-560.
37. Mello, B.L. y Polikarpov, I., 2014. Family 1 carbohydrate binding-modules enhance saccharification rates. *AMB Express*, 4: 36-42.
38. Ng, I.S., Li, C.W., Chan, S.P., Chir, J.L., Chen, P.T., Tong, C.G., Yu, S.M. y Ho, T.H.D., 2010. High-level production of a thermoacidophilic beta-glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. *Bioresource Technology*, 101: 1310-1317.

39. Nitta, M., Furukawa, T., Shida, Y., Mori, K., Kuhara, S., Morikawa, Y. y Ogasawara, W., 2012. A new Zn(II)(2)Cys(6)-type transcription factor BglR regulates beta-glucosidase expression in *Trichoderma reesei*. *Fungal Genetics and Biology*, 49: 388-397.
40. O'Sullivan, A.C., 1997. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*, 4: 173-207.
41. Purification and biochemical characterization of endoglucanase from *Penicillium pinophilum* MS 20. *Indian J Biochem Biophys*. 2012 Jun;49(3):189-94.
42. Perestelo, F., González, J.M. y Falcón, M.A., 1999. Lignin biodegradation: Importance of bacteria and imperfect fungi. *Recent Research Developments in Biotechnology & Bioengineering*, 2: 175-210.
43. Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T. y Martínez, J., 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International microbiology. The official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 5: 53-63.
44. Peterson, R. y Nevalainen, H., 2012. *Trichoderma reesei* RUT-C30-thirty years of strain improvement. *Microbiology-Sgm*, 158: 58-68.
45. Pettersen, R.C., 1984. The chemical composition of wood. En "The Chemistry of Solid Wood" (Powell, R.M. ed.), ACS, 57-126.
46. Rye, C.S. y Withers, S.G., 2000. Glycosidase mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 4: 573-580.
47. Sánchez, C., 2009. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol. Advances*, 27: 185-194.
48. Schulein, M., 1997. Enzymatic properties of cellulases from *Humicola insolens*. *Journal of Biotechnology*, 57: 71-81.
49. Schwarze, F.W.M.R., Engels, J. y Mattheck, C., 2000. *Fungal strategies of decay in trees*. Springer Verlag, Berlin.
50. Shoseyov, O., Shani, Z. y Levy, I., 2006. Carbohydrate binding modules: Biochemical properties and novel applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70: 283-290.
51. Srisodsuk, M., Reinikainen, T., Penttilä, M. y Teeri, T.T., 1993. Role of the interdomain linker peptide of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase-I in its interaction with crystalline cellulose. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 20756-20761.
52. Teeri, T.T., Koivula, A., Linder, M., Wohlfahrt, G., Divne, C. y Jones, T.A., 1998. *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose. *Biochemical Society Transactions*, 26: 173-178.
53. Watanabe, H. and Tokuda, G., 2010. Cellulolytic systems in insects. *Annual Review of Entomology*, 55: 609-632.
54. Willner, I., Basnar, B. y Willner, B., 2007. From molecular machines to microscale motility of objects: Application as "smart materials", sensors, and nanodevices. *Advanced Functional Materials*, 17: 702-717.

55. Wilson, D. y Irwin, D., 1999. Genetics and properties of cellulases. Recent progress in bioconversion of lignocellulosics. Springer Berlin Heidelberg, 65: 1-21.
56. Withers, S.G., 2001. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. Carbohydrate Polymers, 44: 325-337.
57. Wolfenden, R., Lu, X.D. y Young, G., 1998. Spontaneous hydrolysis of glycosides. Journal of the American Chemical Society, 120: 6814-6815.
58. Workman, W.E. y Day, D.F., 1982. Purification and properties of beta-glucosidase from *Aspergillus terreus*. Applied and Environmental Microbiology, 44: 1289-1295.
59. Yelle, D.J., Ralph, J., Lu, F. y Hammel, K.E., 2008. Evidence for cleavage of lignin by a brown rot basidiomycete. Environmental Microbiology, 10: 1844-1849.
60. Zhang, Y.H.P. y Lynd, L.R., 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. Biotechnology and Bioengineering, 88: 797-824.