

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y AMBIENTALES**

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS Y/O  
LIGNOCELULOLÍTICAS DE HONGOS SAPRÓFITOS ECUATORIANOS”**

Realizado por:

**CECILIA JEREZ VENEGAS**

Director del proyecto:

**Dr. Lino Arisqueta Herranz, Ph.D.**

Como requisito para la obtención del título de:

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

Quito, 03 de Junio del 2021



## **DECLARACION JURAMENTADA**

Yo, CARMEN CECILIA JEREZ VENEAS, con cédula de identidad # 175022165-5, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento. A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.

A square image showing a handwritten signature in blue ink. The signature is cursive and appears to read 'Carmen Cecilia Jerez Veneas'.

**FIRMA Y CEDULA**

## **DECLARATORIA**

El presente trabajo de investigación titulado

**“OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS Y/O  
LIGNOCELULOLÍTICAS DE HONGOS SAPRÓFITOS ECUATORIANOS”**

Realizado por:

**CECILIA JEREZ VENEGAS**

como Requisito para la Obtención del Título de:

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGIA**

ha sido dirigido por el profesor

**LINO ARISQUETA HERRANZ**

quien considera que constituye un trabajo original de su autor



**FIRMA**

## **LOS PROFESORES INFORMANTES**

Los profesores informantes:

**JOSE RUBEN RAMIREZ**

**ALBERTO AGUIRRE**

Después de revisar el trabajo presentado,  
lo han calificado como apto para su defensa oral ante  
el tribunal examinador



---

FIRMA



FIRMA

Quito, 06 de JUNIO del 2021

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo lo dedico con todo mi amor a mis padres, Víctor y Karina, quienes han depositado su confianza y apoyo en cada nueva etapa de mi vida, sin dudar ni un solo momento de mi capacidad e inteligencia. Son la inspiración y el motor de mis días.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, por iluminar mi camino y permitirme cumplir este paso en mi vida. A mis padres, Víctor y Karina, dos personas ejemplo de dedicación y esfuerzo. Gracias por estar siempre presentes en todo momento, gracias por haberme dado todo, sinceramente sin ellos no hubiese podido llegar hasta aquí.

A mi hermana Victoria, por su apoyo incondicional.

Atenea y Benjamín, por su inmenso amor y alegrar mis días.

A mis docentes de la Universidad Internacional SEK (UISEK), sobre todo a mi tutor Lino, una persona con conocimientos y experticia admirable, gracias por haber fomentado mi desarrollo profesional. Por otra parte gracias a mis profesores José Rubén Ramírez y Alberto Aguirre, por su ayuda, paciencia y entrega en cada etapa de este proyecto.

Para ser enviado:

To be submitted:

**“OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS Y/O LIGNOCELULOLÍTICAS DE HONGOS SAPRÓFITOS ECUATORIANOS”**

Cecilia Jerez Venegas<sup>1</sup>, Lino Arisqueta<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias Naturales y Ambientales, Quito,

Ecuador. 24/06/2021 14:56:01

\*AUTOR DE CORRESPONDENCIA: Ph.D. Lino Arisqueta,

Universidad Internacional SEK,

Facultad de Ciencias Ambientales y Naturales, Quito, Ecuador.

Teléfono: 0983104230; email: [lino.arisqueta@uisek.edu.ec](mailto:lino.arisqueta@uisek.edu.ec)

## Resumen

Actualmente, la valorización de los residuos madereros, agroindustriales es de gran interés, debido a esto, en el presente trabajo se emplearon residuos de poda (paja) y residuos de aserraderos (aserrín) para la producción de enzimas lignocelulolíticas y/o celulolíticas. El objetivo de esta investigación fue aislar, identificar macroscópicamente y molecularmente el microorganismo con actividad celulolítica en diferentes fuentes de C. En la Reserva de Limoncocha se realizó la toma de muestra para posteriores análisis. El hongo identificado con ayuda de herramientas bioinformáticas fue *Chaetomium piluliferum*, el cual presentó halos de hidrólisis en carboximetilcelulosa como sustrato. Para poder analizar ciertos parámetros relativos a la actividad celulolítica del hongo *Chaetomium piluliferum*, como pH óptimo, salinidad o requerimientos de metales divalentes (tolerancia al EDTA-Na<sub>2</sub>), se realizaron ensayos enzimáticos en geles de agarosa 0.5% con CMC al 0.1%. Los ensayos *in plate*, muestran que a pH = 6, es donde los halos de inhibición se muestran más marcados (más claridad y/o diámetro). En cuanto al efecto de la salinidad, se puede observar que a medida que aumenta la salinidad del medio de ensayo, al menos en el rango analizado, mayor actividad celulolítica presenta los lisados. Por último, la concentración de EDTA no pareció tener ningún efecto en el rango de concentraciones ensayadas, lo que nos permite afirmar con cierta seguridad que el/los enzima/s con actividad celulolítica no requieren de metales como cofactores.

Los extractos enzimáticos producidos tienen gran potencial para su utilización biotecnológica, especialmente en la sacarificación de residuos de poda y de aserraderos, los cuales no afectan a la soberanía alimentaria, y la producción de bioetanol de segunda generación.

**Palabras clave:** lignocelulolíticos, celulolíticos, hongos, degradación, carboximetilcelulosa.

## **Abstract**

Currently, the valorization of wood and agro-industrial waste is of great interest, due to this, in the present work pruning waste (straw) and sawmill waste (sawdust) were used for the production of lignocellulolytic and / or cellulolytic enzymes. The objective of this research was to isolate, macroscopically and molecularly identify the microorganism with cellulolytic activity in different sources of C. In the Limoncocha Reserve a sample was taken for subsequent analysis. The fungus identified with the help of bioinformatics tools was *Chaetomium piluliferum*, which presented hydrolysis haloes in carboxymethylcellulose as substrate. In order to establish any relative relative to the cellulolytic activity of the *Chaetomium piluliferum* fungus, such as optimal pH, salinity or divalent metal requirements (tolerance to EDTA-Na<sub>2</sub>), enzymatic tests were carried out in 0.5% agarose gels with 0.1% CMC. The in plate tests show that at pH = 6, it is where the inhibition halos are more marked (more clarity and / or diameter). Regarding the effect of salinity, it can be observed that a measure that increases the salinity of the test medium, at least in the analyzed range, the lysates have greater cellulolytic activity. Finally, the EDTA concentration did not seem to have any effect in the range of concentrations tested, which allows us to affirm with some certainty that the enzyme (s) with cellulolytic activity does not require metals as cofactors.

The enzymatic extracts produced have great potential for their biotechnological use, especially in the saccharification of pruning and sawmill waste, which does not lead to food sovereignty, and the production of second generation bioethanol.

**Keywords: lignocellulolytics, cellulolytics, fungi, degradation, carboxymethylcellulose.**

## 1. INTRODUCCION

Los combustibles fósiles generan cantidades ingentes de gases contaminantes, como CO, CO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub> y SO<sub>x</sub>, los cuales al ser liberados causan daños al ambiente y alteran drásticamente el clima del planeta (Cardona, 2009). Por eso es importante el uso e investigación de nuevas fuentes de energía renovables como los biocombustibles de segunda generación, que son aquellos biocarburantes como alcoholes, esterres, éteres y otros productos químicos provenientes de compuestos orgánicos a partir de cultivos no comestibles, o residuos de base celulósica (biomasa) como aserrín, residuos de poda y cosecha. La ventaja de los biocombustibles con respecto a los combustibles consiste en una menor emisión de gases de efecto invernadero ya que el uso de la biomasa para consumo energético reduce las emisiones de CO<sub>2</sub> y otros (Salinas & Gasca, 2009)

Los biocombustibles de segunda generación son fabricados a partir de biomasa vegetal, muchas veces en forma de residuo, la cual contiene celulosa y/o lignocelulosa (BOLIN, 1976) que, por no emplearse en la alimentación humana ni animal, no afecta a la soberanía alimentaria como sí lo haría el bioetanol producido a partir de la fermentación del maíz. Las tendencias actuales apuntan al aprovechamiento preferente de residuos provenientes de cultivos ya sean estos alimenticios (paja, bagazo de caña y granos, corazón de la mazorca de maíz, recortes de frutales, etc.) como madereros (residuos de poda o tala), incluidos los residuos madereros en la fabricación de muebles (aserrín, recortes, etc.) y otros que presentan un valor económico relativamente bajo o nulo y ningún valor nutricional (Castro, 2012)

El material lignocelulósico está compuesto por tres estructuras: lignina, celulosa y hemicelulosa. Sin embargo, dependiendo del tipo de material lignocelulósico, se encuentran otras estructuras en menores o mayores proporciones como son el xilano y la pectina, entre otros. Lo anterior le otorga características de rigidez e impenetrabilidad como método de

defensa contra patógenos habituales de las plantas. Una estrategia prometedora para la obtención de biocombustibles implica la producción de enzimas celulolíticas, la hidrólisis de la biomasa y la fermentación de los azúcares resultantes para generar los productos deseados (Vázquez-montoya et al., 2019)

La producción de celulasa por diferentes microorganismos celulolíticos se está estudiando dinámicamente para reducir el costo de descomposición de la biomasa vegetal. La hidrólisis completa de celulosa está mediada por una combinación de tres tipos principales de celulasas (Figura 1): 1. Endoglucanasas que actúan sobre los enlaces internos entre las unidades de glucosa que forman la celulosa y así convierten las cadenas largas a oligosacáridos, 2. Las exoglucanasas, actúan sobre los extremos reductores y no reductores de las cadenas de celulosa liberando celobiosas, y 3. Glucosidasas, hidrolizan la celobiosas para formar glucosa (Cuervo et al., 2009) & (Zuñiga, 2013)

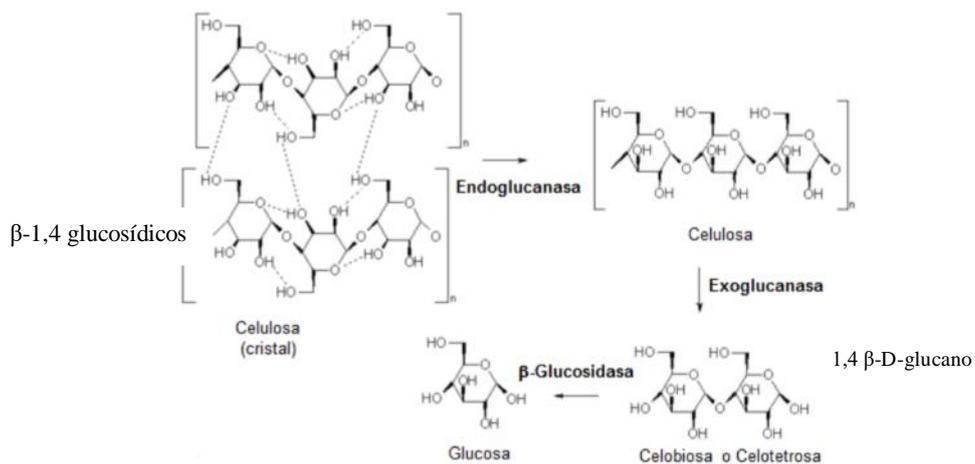


Figura 1. Degradación de celulosa mediante un complejo enzimático de celulasa (Zuñiga, 2013)

Algunas especies de hongos son capaces de producir enzimas extracelulares que degradan este tipo de material y hacen posible su reciclaje. La producción de enzimas

extracelulares por parte de hongos y ciertas bacterias, es útil en la degradación de material lignocelulósico para obtener los azúcares que conforman estas estructuras y aprovecharlos en diversos procesos biotecnológicos e industriales de interés, como son la obtención de biocombustibles de segunda generación (etanol, biobutanol, octanol y metanol), ácidos orgánicos, glucosa, forraje para el ganado, materia prima para la industria del papel, textilera, entre otras (Castro Saya, 1989). Pero el uso de hongos ha sido más determinante que el de bacterias ya que los hongos pueden producir grandes cantidades de enzimas, que se secretan al medio para una fácil extracción y purificación (Vázquez-montoya et al., 2019)

El hongo más común para la producción de celulasa es *Trichoderma reesei*, pero la desventaja de este microorganismo es que depende de medios costosos para producirse y además carece de suficiente actividad glucosídica (Vázquez-montoya et al., 2019) Por lo tanto, en la actual investigación se pretende obtener y caracterizar enzimas capaces de degradar celulosa y/o lignocelulosa a partir de otros hongos saprófitos ecuatorianos, para la obtención de azúcares fermentables de residuos vegetales lignocelulósicos.

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Reactivos y Equipos

**Tabla 1. Reactivos.**

Nombre	Formula	Casa Comercial
Penicilina	$C_{16}H_{18}N_2O_4S$	Life
Ácido Clorhídrico	HCl	Sigma
Etanol		JT BAKER
Acetato de Sodio Trihidratado	$CH_3COONa$	Fisher Scientific Company
Tritón X-100		Promega
Dextrosa		Conda
Agua de Peptona		Cultimed
Ácido Acético, Glacial	$CH_3COOH$	JT BAKER
Sucrosa	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Loba Cheme PVT. LTD.
EDTA	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	La casa de los químicos Laquin
Carboximetil celulosa sódico		Aldrich
Cloruro de Sodio	NaCl	PanReac
Tris Free Base	$C_4H_{11}NO_3$	Caisson
Sulfato de Amonio	$(NH_4)_2SO_4$	PanReac
Molibdato de Sodio dihidratado	$Na_2MoO_4 * 2H_2O$	Merck
Sulfato de Zinc hexahidratado	$ZnSO_4 * 6H_2O$	Fisher Scientific Company
Cloruro de Cobalto (II)	$Cl_2Co$	Sigma
Sulfato Manganeso monohidratado	$MnSO_4 * H_2O$	Mallinckrodt
Sulfato de Magnesio heptahidratado	$MgSO_4 * 7H_2O$	PanReac
Cloruro de Calcio dihidratado	$CaCl_2 * 2H_2O$	Sigma
Fosfato Dipotásico	$K_2HPO_4$	Sigma
Sulfato Ferroso heptahidratado	$FeSO_4 * 7H_2O$	Fisher Chemical
Sulfato de cobre (II) pentahidratado	$CuSO_4 * 5H_2O$	
Primer: ITS3 & ITS4		Invitrogen
Dream Taq DNA Polymerase		Thermo Scientific
10x Dream Taq Buffer		Thermo Scientific
dNTPS		Invitrogen
Fast DNA Spin Kit		Mpbio
Agarosa		Invitrogen
TAE 1X		
SyberSafe		Invitrogen

**Tabla 2. Equipos.**

<b>Nombre</b>	<b>Modelo</b>	<b>Marca</b>
Refrigeradora	Avant	Indurama
Balanza analítica	PA213	OHAUS
Plancha de calentamiento y agitación	HP88854105	Thermo SCIENTIFIC
Centrífuga	XC-2450	Premiere
pH-metro	ORION STAR A111	Thermo SCIENTIFIC
Cámara de electroforesis		Thermo SCIENTIFIC
Termociclador		
Espectrofotómetro	DR 5000	HACH
Autoclave	25X-1	All American
Incubadora	B12	Heraeus INSTRUMENTS
Cámara de luz UV	441203	uvitec
HPLC	Series 200	PerkinElmer
Sonicador		
Qubit		

## **2.2 Métodos**

### **2.2.1 Aislamiento de hongos celulolíticos**

#### **2.2.1.1. Recolección de la muestra de hongo**

En la Reserva Biológica Limoncocha del cantón Shushufindi de la provincia de Sucumbíos, en la región amazónica norte del Ecuador, se recolectó madera en estado de descomposición, que presentaba hongos claramente visibles. La presencia del cuerpo fructífero en los restos madereros fue uno de los parámetros de recolección.

### 2.2.1.2 Preparación de los medios selectivos

**Tabla 4. Medios de cultivo**

Medio de cultivo	Composición por litro
Agar papa - dextrosa (APD)	Agar 15g; Infusión de patata 4,0g; D(+)-Glucosa 20g; pH final $5.6 \pm 0,2$ .
Sales minerales para medios líquidos	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0165g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2.12g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 6.81g; $\text{CoCl}_2$ 0.466g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3.0g; $\text{H}_2\text{O}$ Destilada 1L
Medio Selectivo Paja (MSP)	$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 0.99056g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0913g; $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.75g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1544g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1304g; Sales minerales 1mL; paja cortada 10g.
Medio Selectivo Aserrín (MSA)	$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 0.99056g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0913g; $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.75g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1544g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1304g; Sales minerales 1mL; aserrín esterilizado 10g.
Medio Nutritivo (MN)	Dextrosa 20g; Agua Peptonada 10g; pH final 5.0

*Los medios MSA y MSP fueron desarrollados por Cecilia Jerez.*

Con el fin de aislar hongos que crecieran a base de residuos celulósicos y/o lignocelulósicos, se prepararon medios de cultivo cuya única fuente de carbono disponible fueran la celulosa (paja) o la lignocelulosa (aserrín) (Tabla 4). Para esto, la paja se trituró hasta obtener una granulometría pequeña. Esta fuente de carbono se añadió a una base que contenía sales minerales y una fuente de nitrógeno y otra de fósforo (Tabla 4). La paja se autoclavó una vez añadida al medio líquido, pero el aserrín hubo de descontaminarse mediante luz UV y añadirlo una vez el medio de cultivo líquido con sus sales y fuente de nitrógeno y fósforo estuvo autoclavado. Esto se debió a que el autoclavado del medio líquido con aserrín alteraba las propiedades de la mezcla, resultando en un líquido opaco de color negruzco.

Después de autoclavar el medio, se añadió el antibiótico en presencia de mechero bunsen (la penicilina se disolvió en agua y después se filtró con ayuda de una jeringa y un filtro de  $0,2 \mu$ ).

### 2.2.1.3. Cultivo y mantenimiento de los hongos

Las muestras que se tomaron de la madera en estado descomposición (pequeños fragmentos de madera con micelio visible) fueron colocadas en matraces Erlenmeyer con

medio selectivo de paja (MSP) y de aserrín (MSA) (Tabla. 4) y se incubaron a 25°C, en dos condiciones de pH (3 y 5) en agitación orbital a 120 rpm, durante 8 días.

Cuando se observó la presencia de micelio y hongos en el cultivo líquido, éstos se sembraron mediante asa Digrafsky en placas Petri con agar patata – dextrosa (APD) (Tabla. 4) con el fin de analizar la morfología de los hongos que estaban creciendo.

#### 2.2.1.4. Obtención de cultivos puros del hongo

El aislamiento de los hongos se llevó a cabo cuando el micelio comenzó a hacerse evidente en el medio sólido. Para ello, se cortó un pedazo de la colonia algodonosa del hongo y se sembró en una nueva caja Petri con APD y antibiótico dentro de la campana de flujo laminar. Este proceso se realizó varias veces hasta lograr cultivos puros del hongo, identificado en la UISEK como 221119LCHP (Echandi, 1967).

#### 2.2.2. Identificación molecular del hongo

**Tabla 3. Cebadores utilizados para amplificación**

Primer	Secuencia	Dirección	Tamaño del amplicón	Temperatura de hibridación	Referencia
ITS <sub>3</sub>	GCATCGATGAAGAACGCAGC	Forward	330pb	43-55°C	White et al., 1990
ITS <sub>4</sub>	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Reverse		43-55°C	White et al., 1990

Para la extracción de ADN genómico se partió de cultivos en APD a pH 3 y 5, 25 °C de 8 días siguiendo los protocolos de FastDNA Spin Kit de MPBIO y de Wizard Genomic DNA Purification Kit from Yeast Cultures.

Con un bisturí previamente esterilizado, se cortaron pedazos de agar de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> que presentaban micelio evidente, se colocaron en eppendorfs con agua destilada y se almacenaron a -20°C hasta ser extraídos.

La región hipervariable del ADN<sub>r</sub> de 5.8 S se amplificó en un volumen final de 25 $\mu$ L, utilizando Dream taq para la reacción y una concentración de 1 $\mu$ M para los cebadores. Se realizaron 35 ciclos que consistían en una desnaturalización inicial a 95°C por 3min, seguido de una desnaturalización a 94°C por 1min, hibridación a 55°C por 1min, la extensión a 72°C por 1.5 min y la extensión final a 72°C por 3 min. Para todas las reacciones de PCR, se utilizó una mezcla de reacción sin ADN como control negativo. Las secuencias de los cebadores con sus respectivas características se encuentran en la Tabla 3 del apartado de materiales.

Los productos de amplificación se verificaron mediante electroforesis en gel agarosa (1.5%) teñido con Syber Safe (1  $\mu$ l/ml) durante 1h a 100 v. En cada pocillo se colocaron 6  $\mu$ L de producto de PCR más 3  $\mu$ L de buffer de carga y en los pocillos laterales 4  $\mu$ L de marcador para determinar el tamaño de los amplicones. La visualización de la electroforesis se realizó sobre la cámara de luz UV.

El producto de PCR se purificó empleando un kit de purificación PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit de Invitrogen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Después se procedió a medir la concentración de ADN empleando el kit de Thermo - Fisher (Qubit™ dsDNA BR Assay Kit) según las instrucciones del fabricante, con el fin de determinar si la concentración de ADN de las muestras era la requerida para el proceso de secuenciación.

En los casos en que la concentración de ADN no fue suficiente, se procedió a repetir la amplificación descrita más arriba en este apartado, empleando el producto de PCR como molde.

Los productos de PCR obtenidos fueron enviados a la empresa MacroGEN, en Corea, para su secuenciación. El método empleado fue secuenciación por dideoxi Sanger. Una vez obtenidos los resultados de las secuencias se empleó el software GeneStudio para la edición de la secuencia. Después, con el BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) se compararon

las secuencias de nucleótidos de su base de datos con las secuencias depuradas en GeneStudio, para determinar la especie fúngica aislada (221119LCHP) (Ochoa, 2008)

Posteriormente se realizó un análisis filogenético mediante el programa MEGA X en la construcción del árbol filogenético con los marcadores ITS (*internal transcribed spacer*), utilizando diferentes métodos (*Maximum Likelihood* y *Kimura 2*) con el fin de indicar las relaciones con otros organismos.

### **2.2.3. Determinación del crecimiento fúngico – Curva de crecimiento fúngico**

Para determinar las mejores condiciones de cultivo, así como la fase exponencial de crecimiento del hongo en medio líquido en la que debía de recogerse la biomasa para las pruebas subsiguientes, procedimos a medir el crecimiento fúngico.

La determinación de la velocidad de crecimiento de los hongos en medio sólido se realizó a través de:

-Observación macroscópica teniendo en cuenta forma, superficie y color de las colonias que se desarrollaron en el medio sólido APD (Vilches, 2002).

El crecimiento en medio líquido se midió mediante espectrofotometría. Para ello, cada día durante 9 días, se filtraron 2 mL de medios MSP y MSA pH = 3 y 5, empleando una gasa estéril, y se midió la absorbancia del filtrado resultante a 600 nm obteniendo una curva de crecimiento.

### **2.2.4. Lisis celular y determinación de la concentración de proteína**

Una vez determinado el tiempo adecuado (7 Días) para recoger la muestra, se evaluó el mejor método de lisado, comparando dos métodos de sonicación fuerte (Klimek-Ochab et al., 2011). Para ello se filtraron 30 mL de cultivo en MSP y MSA de 7 días mediante gasa estéril.

Después, el filtrado se centrifugó a 1000 RCF por 10 min a 15°C, se retiró el sobrenadante y el pellet que contenía las células se lavó por tres veces, resuspendiéndolo en 1 mL de buffer de lisis y centrifugándolo a 1350 rpm por 5 min, para eliminar todo resto de medio de cultivo.

Por último, se volvió a centrifugar a 1350 rpm y se resuspendió en un volumen final de 500 µL de buffer de lisis, quedando así listo para la sonicación.

Los dos métodos de sonicación comparados, empleando el equipo SONICS Vibra – cell, fueron los siguientes:

- 1) 19 ciclos de 11 s de sonicación seguidos de 2 min de descanso en baño con hielo.
- 2) 7 ciclos de 30 s de sonicación seguidos de 2 min de descanso en baño con hielo

El tiempo total de sonicación fue de 3.5 min en ambos casos.

Posteriormente, se determinó la concentración de proteína total en las muestras sonicadas empleando el método de BCA (ácido bicinonínico), QuantiPro™ BCA Assay Kit de SIGMA, siguiendo las instrucciones del fabricante en una placa de espectrofotometría de 96 pocillos y con recta patrón de seroalbúmina bovina.

## **2.2.5. Análisis de la actividad celulolítica *in gel***

### **2.2.5.1. SDS – PAGE**

Las muestras sonicadas se sometieron electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS – PAGE) al 10% sin agentes reductores como mercaptoetanol o ditioneitol, a 100 V durante 1h. Estas condiciones se mantuvieron tanto para la comparación del patrón de bandeo, mediante tinción Coomassie, entre las muestras cultivadas en MSP y MSA, como para la visualización *in gel* de la actividad celulolítica (zimograma).

### **2.2.5.2. Zimograma**

El zimograma se llevó a cabo siguiendo el método descrito por (Cano-Ramírez et al., 2017), con algunas modificaciones. Los geles de poliacrilamida al 10% se copolimerizaron con carboximetil celulosa (CMC) al 0.5%. La electroforesis se realizó siguiendo el procedimiento descrito más arriba, pero en refrigeración a 4 °C. Se cargaron 5.4 ug de proteína total por pocillo de la muestra de hongos cultivada en medio nutritivo (MN) durante 7 días. Una vez finalizada la electroforesis, los geles se lavaron 2 veces por 30 min a T° ambiente, en 2 buffers distintos para eliminar el SDS y renaturalizar las proteínas. Un gel se incubó en buffer acético – acetato pH = 5.5 y el otro gel en buffer Tris – HCl, pH = 7.4, ambos conteniendo 2.5% de Triton X – 100. Después de la renaturalización, los geles se lavaron en sus buffers respectivos sin Triton X – 100 y se incubaron en el mismo buffer durante 3h y 30 min a 30 °C con agitación orbital.

Para visualizar las bandas de degradación de celulosa, los geles se incubaron durante 15 min en Congo Red al 0.1% a T ambiente. Después se lavaron 3 veces con NaCl 1 M durante 5 min, y se aumentó el contraste con ácido acético 1% v/v para revelar bandas claras frente al fondo rojizo oscuro, correspondientes a la CMC degradada.

### **2.2.6. Análisis de la actividad celulolítica *in plate***

Para poder analizar ciertos parámetros relativos a la actividad celulolítica del hongo *Chaetomium piluliferum*, como pH óptimo, salinidad o requerimientos de metales divalentes (tolerancia al EDTA-Na<sub>2</sub>), se realizaron ensayos enzimáticos en geles de agarosa 0.5% con CMC al 0.1%. Sobre la superficie del gel se aplicaron los lisados de hongos cultivados en MN (5 ug), MSP (0.5 ug) y MSA (0.09 ug) y, tras 30 min de incubación a 30 °C, los geles se lavaron con H<sub>2</sub>O destilada y se tiñeron con Congo Red (0.1%) durante 15 min. Después se lavaron 3

veces con NaCl 1 M durante 5 min y posteriormente se incubaron con acético 1% para aumentar el contraste.

#### **2.2.6.1. Efecto del pH**

Se evaluaron los siguientes pH: 3, 4, 5, 6, 7 y 8. Para ello, la agarosa (1%) se disolvió en buffer acético - acetato 0.1 M ajustado a los pH 3, 4, 5 y 6, y en buffer Tris – HCl ajustado a pH 7 y 8, todos ellos conteniendo 0.1% de CMC y 0.5% de agarosa y se dejó polimerizar en placas Petri P6.

#### **2.2.6.2 Efecto de la concentración de NaCl**

Se evaluaron los siguientes porcentajes de NaCl: 2%, 5%, 10%, 15%, 20%. Para ello, las cantidades de NaCl apropiadas se disolvieron en buffer acético – acetato pH 5.5 con agarosa 0.5% y CMC 0.1% y los geles se dejaron polimerizar en placas Petri P6.

#### **2.2.6.3. Efecto de la concentración de EDTA**

Se evaluaron los siguientes porcentajes/concentraciones de EDTA – Na<sub>2</sub>: 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM. . Para ello, las cantidades apropiadas de EDTA – Na<sub>2</sub>, se disolvieron en buffer acético – acetato pH 5.5 con agarosa 0.5% y CMC 0.1% y los geles se dejaron polimerizar en placas Petri P6.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Aislamiento y determinación de las mejores condiciones de cultivo de un hongo con capacidad lignocelulolítica aislado de madera en descomposición de la reserva de Limoncocha

A partir de madera en descomposición muestreada en la reserva de Limoncocha y, empleando los medios selectivos descritos en Materiales y Métodos, se aisló una cepa fúngica. El análisis macroscópico de la cepa (Rodas. O, 2019) reveló un micelio aéreo abundante, de color blanco y algodonoso (Fig. 2).



*Figura 2. Vista macroscópica del cultivo puro del hongo aislado en una caja Petri con medio APD pH 5.*

El hongo aislado creció mejor a pH 5 que a pH 3 tal y como puede observarse en la Figura 3. El mayor crecimiento a pH 5 es evidente a partir del día dos, donde se aprecia que las placas Petri a este pH se encuentran recubiertas y el medio ha perdido transparencia. Estas diferencias se mantienen, incluso más pronunciadas, hasta la semana de cultivo. Esto se cumplió también para los medios de cultivo selectivos MSP y MSA (no se muestra el dato).

En vista de esto, las curvas de crecimiento en medios selectivos para la estimación del mejor momento para la recolección del hongo se realizaron midiendo la OD 600 nm a pH 5 (apartado 2.2.3. de materiales y métodos). En la Figura 4 se muestran los resultados de las curvas de crecimiento. Para obtener biomasa suficiente (el crecimiento en medio selectivo fue bastante lento) se decidió hacer las recolecciones a los 7 días (168 h) (cuadro rojo Figura 4) de iniciar los cultivos en medios selectivos, momento en que todavía no se había alcanzado el máximo de crecimiento.

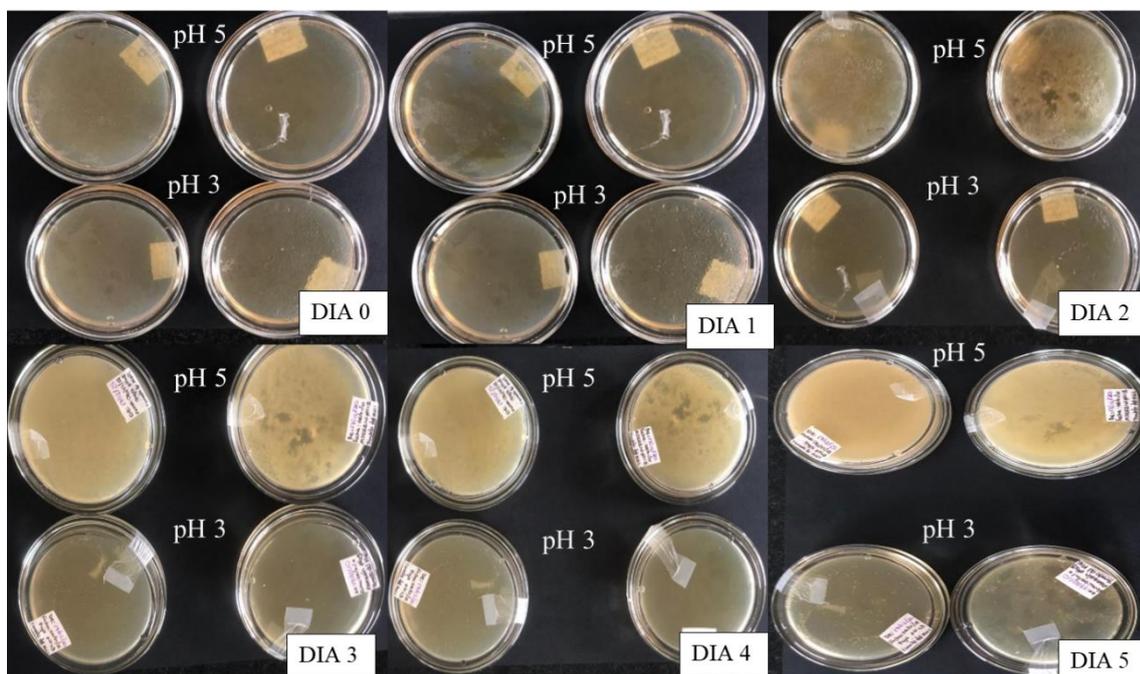


Figura 3. Comparación del crecimiento del hongo aislado en medio APD a pH 3 y 5.

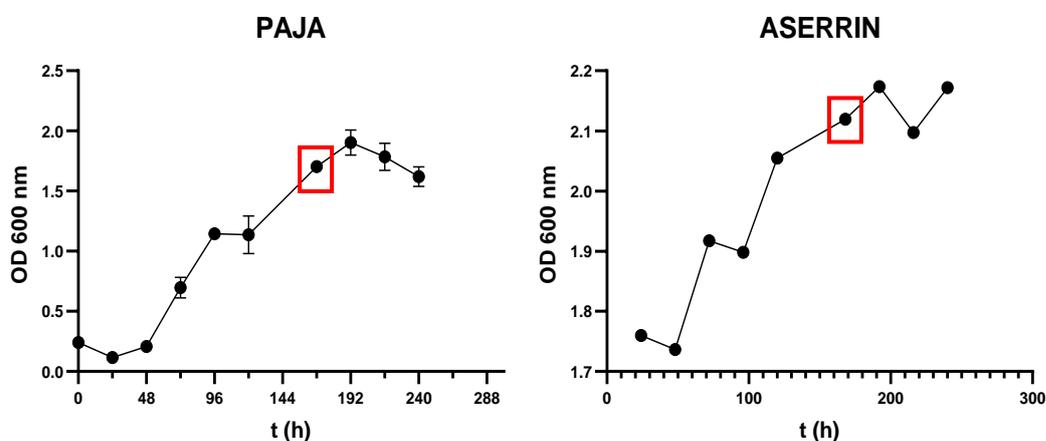


Figura 4. Cinética de crecimiento del hongo en medio mineral con paja y aserrín a pH 5

Aunque los valores de OD 600 nm para el medio MSA que contenía aserrín son mayores a los que se obtuvieron para el medio MSP con paja, hay que recalcar que, debido a las propiedades del medio, más turbias, se partió de una absorbancia de aproximadamente 1,75 por lo que el crecimiento en este medio fue bastante menor (1,75  $\rightarrow$  2,2 U.A.) en comparación con el crecimiento en MSP (0,25  $\rightarrow$  1,8 U.A.). Esto se ve corroborado por el hecho de que en el medio MSA siempre se logró obtener menos proteína fúngica.

### 3.2. Identificación molecular del hongo aislado de la reserva de Limoncocha

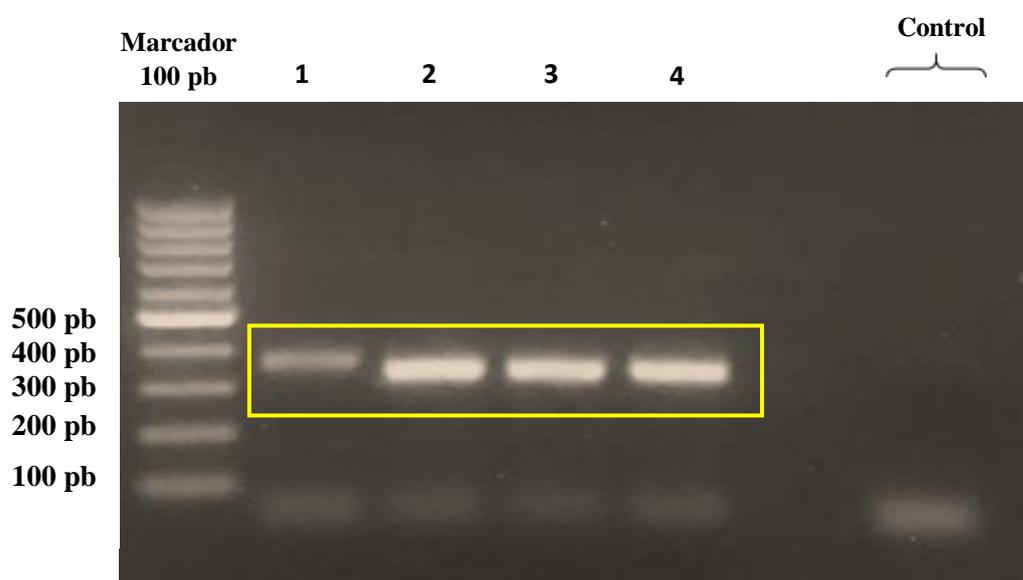


Figura 5. Electroforesis de los productos de amplificación por PCR. (1-2) hongo APD a pH 3; (3-4) hongo APD a pH 5.

Para la identificación del hongo aislado, además del análisis macroscópico y microscópico del cultivo puro, se realizó la amplificación de la región hipervariable ITS de ADN ribosomal empleando los primers ITS3 e ITS4 cuyas secuencias se muestran en la tabla 3 de Materiales y Métodos. En la figura 5 se observan los productos de PCR en gel de agarosa al 1,5 %. Las calles 1 y 2 corresponden a los productos de amplificación de ADN extraído de hongos creciendo en APD a pH 3 y las calles 3 y 4 a pH 5. Todos los productos de la PCR amplificados mostraron un tamaño entre 300-400 pb aproximadamente.

La secuencia de estos productos de PCR presentó un porcentaje de identidad del 99.33 % con la especie *Chaetomium piluliferum*. A continuación, se procedió a realizar un árbol filogenético para confirmar el BLAST con el fin de obtener un resultado más concreto.

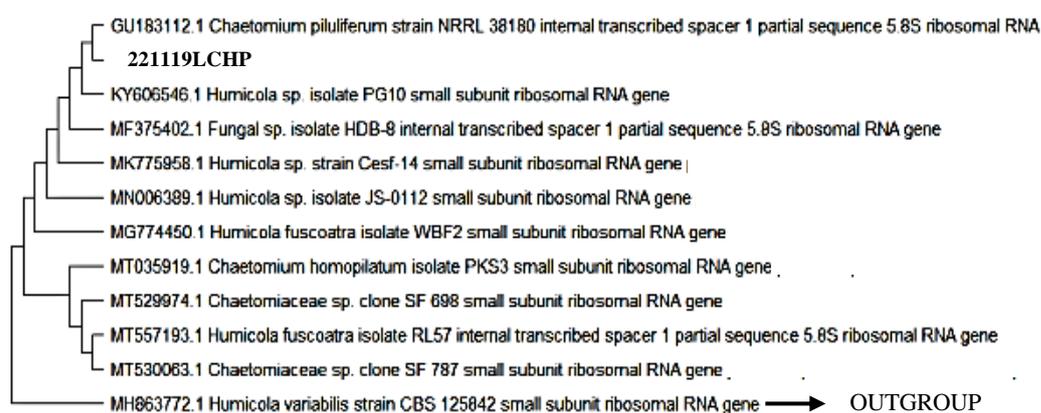


Figura 6. Árbol Filogenético (Maximum likelihood) basado en secuencias ITS

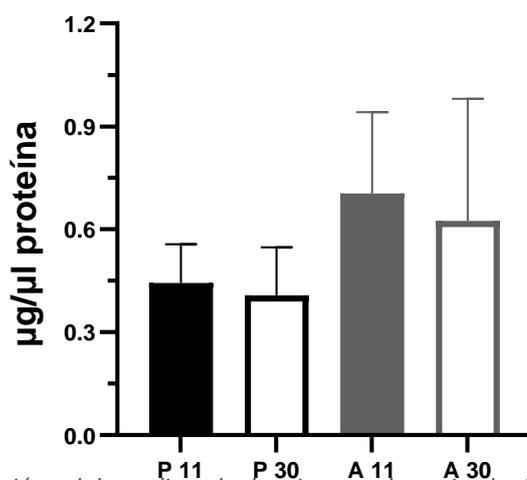
La construcción del árbol filogenético se realizó con el programa MEGA y fue basado en la secuencia ITS con el método de sustitución nucleotídica de *Maximum likelihood* (Figura 6). Aparentemente, 221119LCHP es de la especie *Chaetomium* debido a su similitud con la especie GU183112.1 *Chaetomium piluliferum*, ya que se encuentran en el mismo clado teniendo el mismo ancestro en común.

### 3.3. Caracterización de enzimas celulolíticas y/o lignocelulolíticas de *Chaetomium piluliferum*

Debido a la falta de medios para la concentración y purificación de proteínas secretadas al medio de cultivo, se procedió a caracterizar las actividades celulolíticas y/o lignocelulolíticas a partir de lisados celulares. Como muchos microorganismos producen enzimas específicas en función de los sustratos a partir de los que deben nutrirse, los análisis

iniciales se realizaron en ambos medios selectivos MSP y MSA. En ambos casos la única fuente de carbono fue celulosa (paja) o lignocelulosa (aserrín), más compleja de degradar, por lo que los hongos creciendo en esos medios debían poder degradar esos sustratos.

En primer lugar, establecimos el mejor método de lisis celular. Previamente ya habíamos descartado la sonicación suave en baño por no obtener suficiente cantidad de proteína. Por eso, y partiendo de bibliografía (Klimek-Ochab et al., 2011), comparamos dos medios de disrupción celular mediante ultrasonidos (con sonda) ambos con un tiempo total de sonicación de 3 min y medio: el primero alternaba 19 ciclos de sonicación (11 s) y enfriamiento en baño con hielo (2 min); el segundo alternaba 7 ciclos de sonicación (30 s) y de enfriamiento (2 min).



*Figura 7. Disrupción celular aplicando dos tiempos de sonicado. (Paja 11 y Aserrín 11) 30 s para proporcionar ondas acústicas y 2 min de descanso hasta completar 3.5 min; (Paja 30 y Aserrín 30) 11 s y 2 min de descanso, hasta completar 3.5min.*

En la Figura 7 se muestran las concentraciones de proteínas ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) que se obtuvieron al emplear los dos métodos de disrupción celular. Tal y como puede observarse, no hubo una diferencia apreciable, si acaso una tendencia a obtener un poco más de proteína en la sonicación de 11 s. En la bibliografía de referencia mencionada más arriba escogieron este último método, y nosotros nos inclinamos por él debido a que los ciclos más cortos de

sonicación protegen más las proteínas y nos interesaba analizar las actividades enzimáticas de los lisados fúngicos.

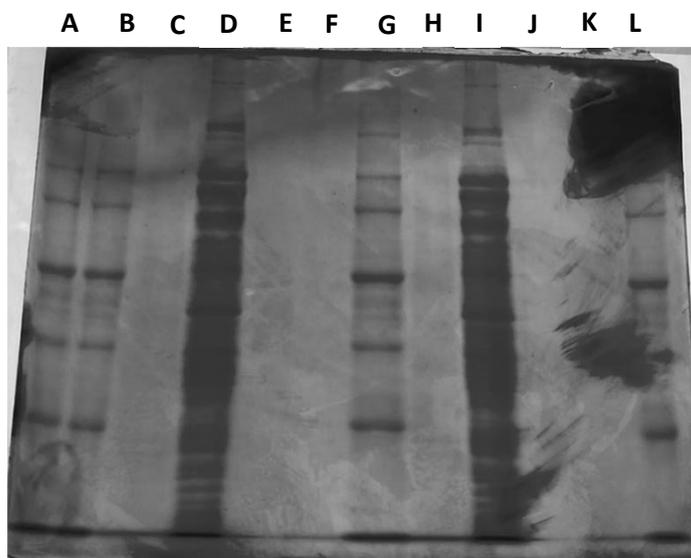


Figura 8. Electroforesis en SDS-PAGE al 8% de proteínas a partir de lisados de *Chaetomium piluliferum*. (A, B, G Y L) Estándar de proteína MW; (C) y (H) microalgas; (D) y (I) hongo MN; (E) y (J) hongo MSA; (F) y (K) hongo MSP.

A continuación, se procedió a realizar un SDS – PAGE con la intención de identificar diferencias en los patrones de bandeo proteico entre el medio MSP y el MSA que indicaran la inducción de enzimas específicas. También queríamos comprobar si los lisados tenían la calidad suficiente para el análisis *in gel* de las actividades enzimáticas de interés, es decir, si realmente se había homogenizado correctamente liberando proteína citosólica, y no había agregados u otros artefactos. Sorprendentemente, no se logró que la proteína penetrara en el gel de poliacrilamida, aunque el procedimiento se repitió varias veces (no se muestran los resultados). Para comprobar que esto no se debió a una mala sonicación, o a elementos de los medios de cultivos (alguna sal mineral) que provocaran la precipitación de la proteína con el SDS al pH de la electroforesis, probamos a repetir los procedimientos de sonicación y SDS - PAGE pero incluyendo también otro microorganismo con pared celular (microalgas del género *Chlorella*) y el mismo hongo cultivado en un medio completamente distinto (medio

nutritivo, MN). La figura 8 muestra los resultados del SDS – PAGE. Tal y como puede verse, solo la proteína de las calles D e I, correspondiente a los hongos cultivados en MN, penetró en el gel. Ni las muestras de hongo en MSP (F, K) y MSA (E, J) ni las muestras de *Chlorella* (C, H) penetraron de manera apreciable. Esto nos llevó a deducir que fueron los medios de cultivo (MSP y MSA), similares en composición de sales a los medios de cultivo para *Chlorella*, los que interfirieron en la electroforesis.

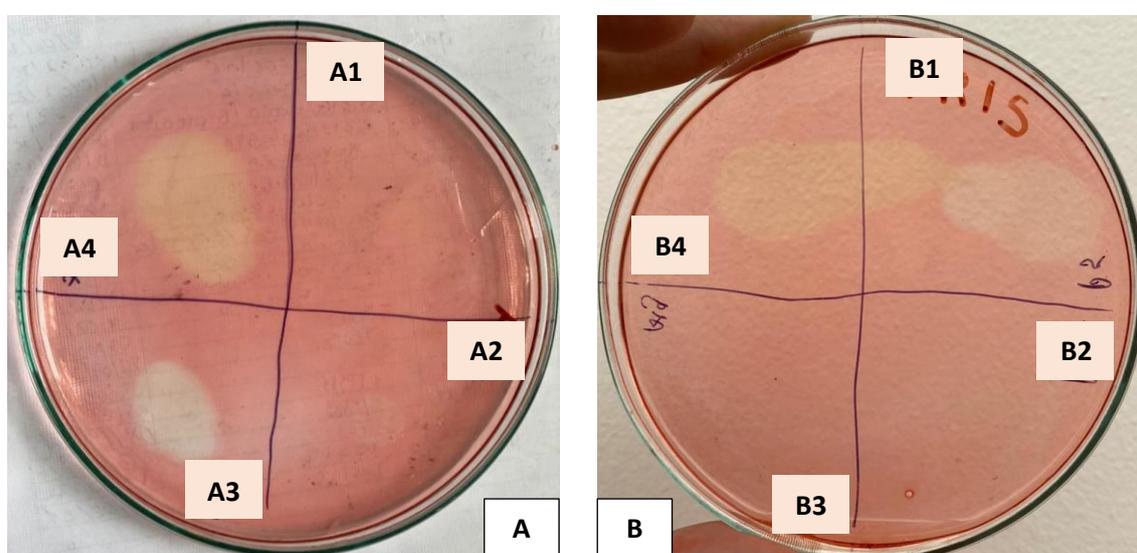


Figura 9. A. Plate a pH 5,5, CMC-Na al 0,1% y agarosa al 0.5%; B. Plate a pH 7,4, CMC-Na al 0,1% y agarosa al 0.5%; (A1 y B3) muestra de alga, (A2 y B2) muestra de hongo MSA (A3) y (B1) muestra de hongo MSP y (A4 y B4) muestra de hongo MN.

También quisimos analizar la actividad enzimática de estas muestras. La imposibilidad de dializar las muestras de MSP y MSA para eliminar sustancias interferentes de los medios de cultivo, nos llevó a limitarnos al hongo crecido en MN para el análisis de actividades celulolíticas y/o lignocelulolíticas *in gel*. Además de esto, se nos presentaron otros inconvenientes o limitaciones: el único sustrato puro comercial que pudo conseguirse fue la celulosa (carboximetilcelulosa, CMC); no pudo obtenerse el ácido dinitrosalícilico (DNS) empleado para la detección de azúcares reductores a partir de cualquier sustrato polisacárido por absorbancia. Esto nos limitó a ensayos cualitativos de degradación de celulosa *in plate* o

*in gel*, visualizando halos de degradación en placas Petri con agarosa copolimerizada con CMC o en geles de poliacrilamida copolimerizada con CMC. Por tanto y, en resumen, solo se pudo analizar la actividad celulolítica *in plate* (de todas las muestras) o celulolítica *in gel* del hongo crecido en MN (las otras no entraron en el gel). No pudieron evaluarse las actividades lignocelulolíticas del hongo en crecido en ninguna condición.

Así, la figura 9 muestra los ensayos *in plate* de las mismas muestras que se corrieron en el SDS – PAGE de la figura 8. Todas las muestras menos las de algas *Chlorella*, tuvieron actividad celulolítica, aunque las muestras de hongo crecido en MSA, cuyas muestras tenían muy poca cantidad de proteína comparadas con las del mismo hongo crecido en MSP o MN, tuvieron mucha menos actividad aparente que estas muestras. Todo esto confirma que el problema presentado en el SDS – PAGE de la figura 8 no se debió a un mal lisado de las muestras que no hubiera liberado proteínas citosólicas, ya que las muestras de hongo crecido en MSP, que no entraron en el gel (Fig. 8, F y K), tenían una actividad *in plate* comparable a las de hongo crecido en MN (Fig. 9, A3 – B1 y A4 - B4) que sí entraron en el gel (Fig. 8, D e I).

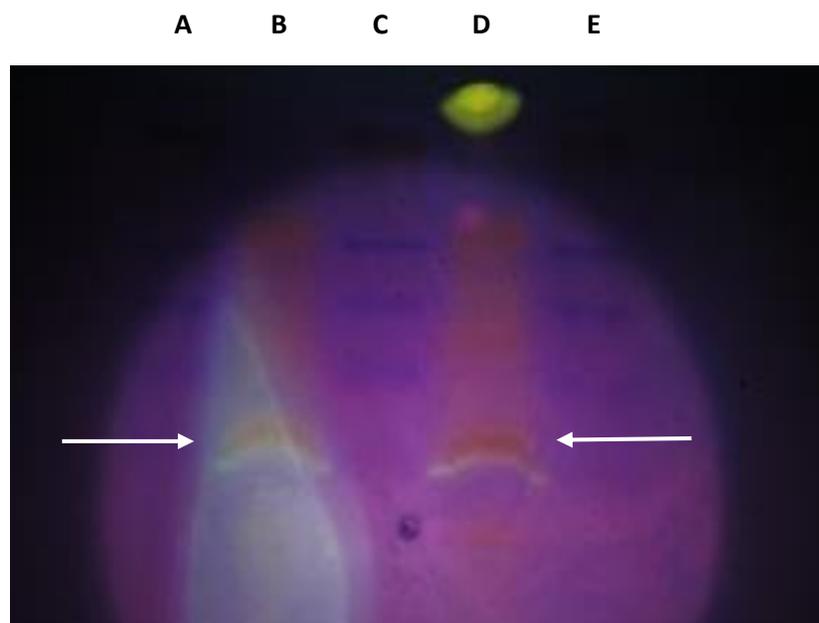


Figura 10. Zimograma mediante SDS PAGE al 10%. (B) y (D) muestra de lisados obtenidas a partir del hongo MN; (A, C, E) marcadores de peso molecular.

A continuación, quisimos realizar la caracterización *in gel* de la/s actividad/es celulolítica/s mediante zimograma en SDS – PAGE copolimerizada con CMC (Fig. 10). En las calles B y D se puede observar una única banda de proteína con halo de degradación de CMC (indicado con flecha). El cálculo del peso molecular de la banda con actividad celulolítica se realizó empleando una recta patrón construida representando la movilidad electroforética de los marcadores de peso molecular frente al log [peso molecular] e interpolando la movilidad electroforética de nuestra banda de interés. El cálculo arrojó un peso molecular de aproximadamente 29 kDa.

Por último, y para completar la caracterización de la actividad celulolítica del hongo *C. piluliferum*, se realizaron varios ensayos *in plate* para averiguar el pH óptimo, así como los requerimientos de salinidad y de metales. Para ello, se prepararon placas Petri con agarosa copolimerizada con CMC en las distintas condiciones de pH (3 – 8), salinidad (2 % - 20 % NaCl) y distintas concentraciones de EDTA que es un quelante de metales divalentes (1 mM – 20 mM) tal y como se muestra en las figuras 11, 12 y 13.

En la Figura 11, podemos observar que es a pH = 6 (pH 5 – 7) donde los halos de inhibición se muestran más marcados (más claridad y/o diámetro). En cuanto al efecto de la salinidad (Fig. 12) puede observarse que, a medida que aumenta la salinidad del medio de ensayo, al menos en el rango analizado por nosotros, mayor actividad celulolítica presentan los lisados. Por último, la concentración de EDTA no pareció tener ningún efecto en el rango de concentraciones ensayadas (Figura. 13), lo que nos permite afirmar con cierta seguridad que el/los enzimas/s con actividad celulolítica no requieren de metales como cofactores. El hecho de que en todos los ensayos los lisados correspondientes a hongos MSA presenten menores actividades se debe, probablemente, a que nunca se pudo lograr la misma cantidad de proteína en estas muestras.

## Efecto pH

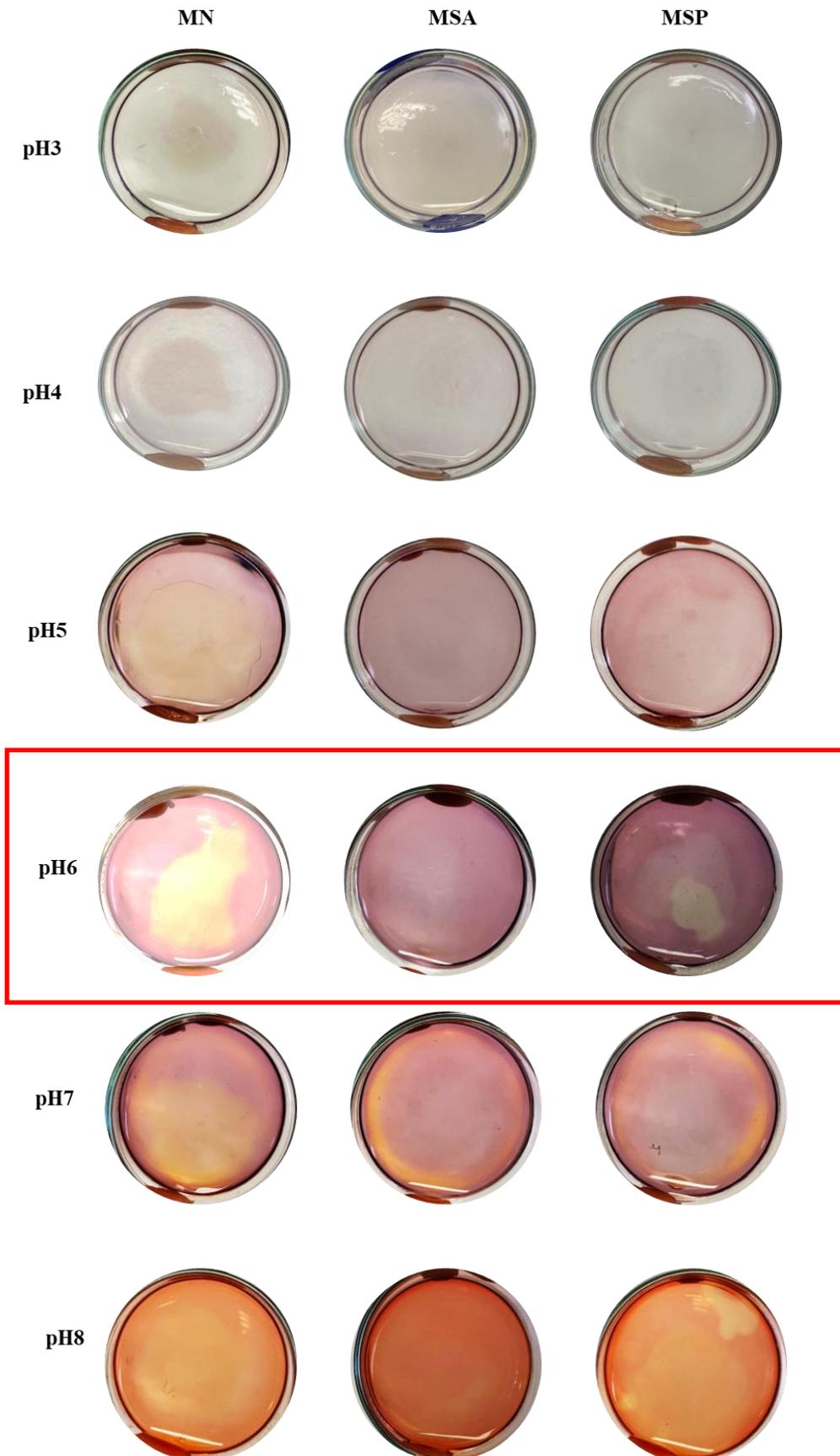


Figura 11. Efecto del pH sobre la actividad celular *in plate* de lisados de hongos crecidos en MSA, MSP y MN. Los ensayos fueron llevados conpolimerizando carboximetilcelulosa al 0.1% en placas

## Efecto NaCl

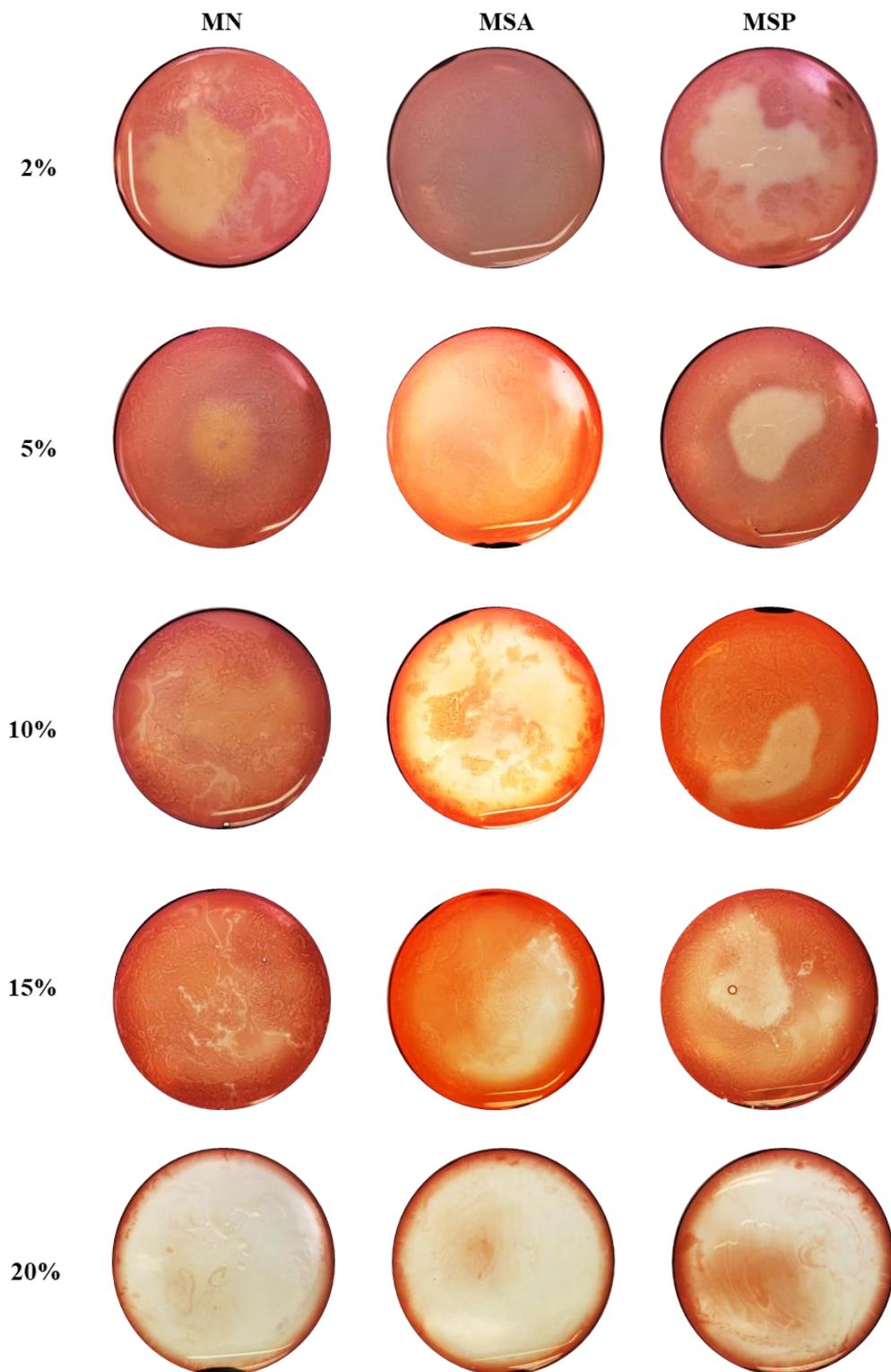


Figura 12. Efecto de NaCl sobre la actividad celulasa in plate de lisados de hongos crecidos en MSA, MSP y MN. Los ensayos fueron llevados copolimerizando carboximetilcelulosa al 0.1% en placas petri con agarosa 0.5%

## Efecto EDTA

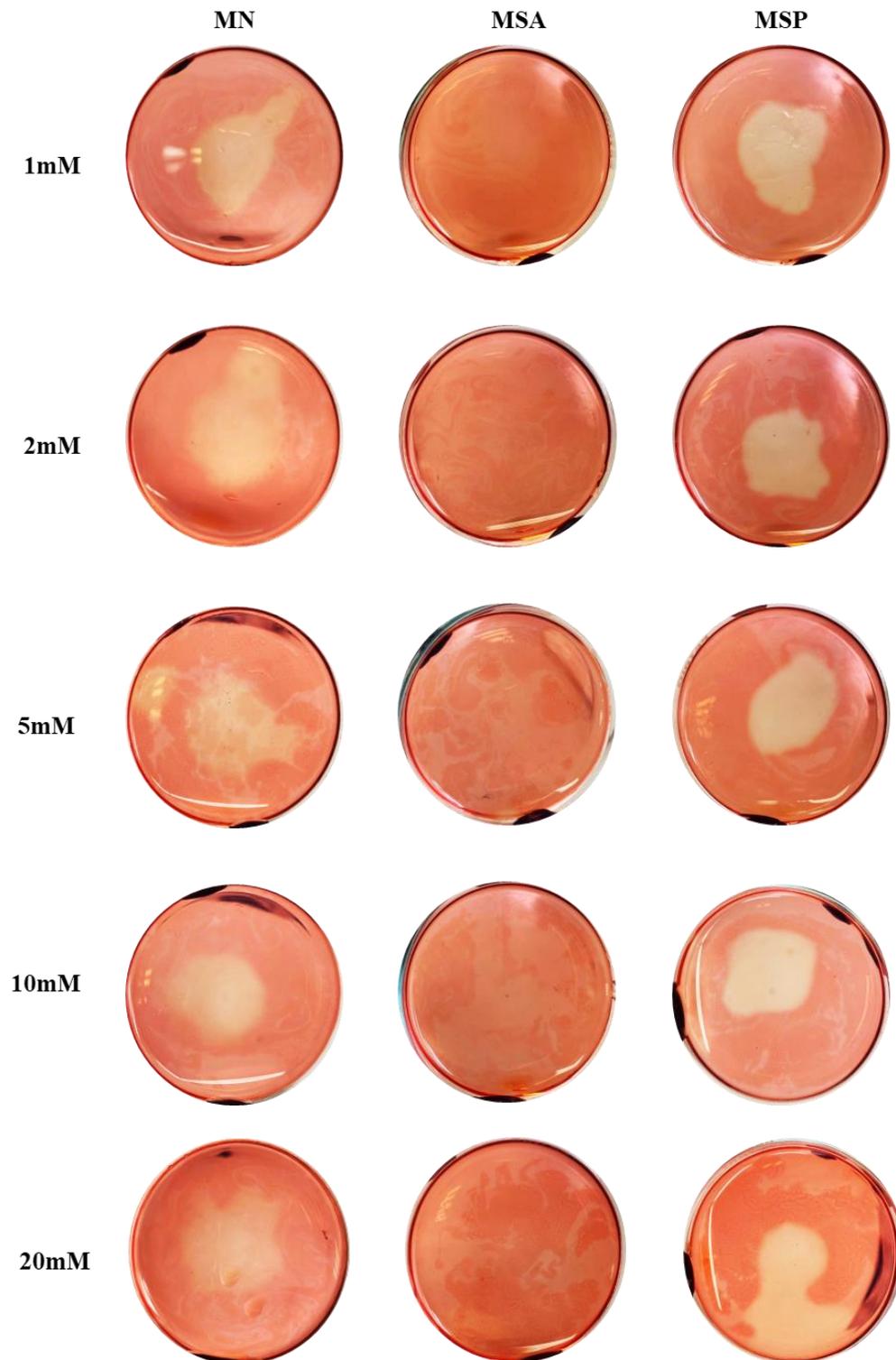


Figura 13. Efecto de EDTA sobre la actividad celulasa in plate de lisados de hongos crecidos en MSA, MSP y MN. Los ensayos fueron llevados copolimerizando carboximetilcelulosa al 0.1% en placas petri con agarosa 0.5%

#### 4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la naturaleza, solo cierto grupo de microorganismos son capaces de degradar la celulosa, como los hongos filamentosos, los cuales son eficientes por su capacidad de secretar una gran variedad de enzimas (Vázquez-montoya et al., 2020). En el presente estudio se aisló una muestra de hongo a partir de madera en estado de descomposición en la reserva de Limoncocha, la cual presentaba un micelio visible y se realizaron varios métodos para determinar la especie fúngica en cuestión: 1) macroscópicos y 2) identificación molecular, siendo esta última la más determinante para la identificación. En base al análisis filogenético de la secuencia de ITS de ADNr, el microorganismo celulolítico identificado fue *Chaetomium piluliferum*. En el estudio de (Wang et al., 2016) se menciona que las características de cultivo de *Chaetomium piluliferum* cuando crece en PCA (*plate count agar*) a 25 ° C muestra hifas aéreas flojas de color blanco, con un borde entero o ligeramente ondulado, sin exudados coloreados, igual que el hongo que se puede observar en la Figura. 2 del presente estudio. También indica que ciertas coloraciones del hongo dependen del medio donde crece. Por ejemplo, si crece en OA (formulación de Ottaviani y Agosti), presenta hifas aéreas blancas y escasamente flojas y que luego se tornan parcialmente de color gris ratón pálido y si se cultiva en MEA (agar extracto malta) presenta un borde completo con hifas aéreas flojas, blancas a rosadas. Los medios selectivos empleados en el aislamiento solo contienen una fuente de carbono: celulosa en el caso de MSP y lignocelulosa en el caso de MSA. El hecho de que el hongo aislado fuera capaz de crecer en estos medios indica que efectivamente posee capacidad de degradar esos sustratos. Esto concuerda con la naturaleza saprófita de los hongos del género *Chaetomium* (Rossman et al., 2017)

El pH del medio de cultivo donde crece un hongo influye directamente sobre la actividad de los enzimas ligados a la membrana y pared celular, es decir, influye directamente sobre su metabolismo y por lo tanto en el crecimiento del mismo (Hernandez, 2020). Este hongo se

desarrolló más rápido a pH 5 que a pH 3 (Figura. 3), y el pH óptimo para la actividad enzimática celulasa estuvo entre 5 y 6, lo que concuerda con lo descrito para los hongos filamentosos superiores (Ascomycetes y Basidiomycetes) (MOLINA, 2013), así como para otros enzimas aislados de *Chaetomium piluliferum* (Paszczynski et al., 1977).

La secuenciación y el análisis de “*maximun likelihood*” basado en homología e identidad de la región ITS de ADNr (White et al., 1990) resultó útil para corroborar la identificación morfológica macroscópica obtenida previamente (Figura. 6) y es probablemente la mejora alternativa cuando no se cuenta con taxónomos especializados en hongos filamentosos para los que no existe una batería de pruebas bioquímicas fenotípicas tan accesibles en la universidad.

En los estudios de (Haider & Domsch, 1969) y (Rossman et al., 2017) se indica que *Chaetomium piluliferum* es un hongo capaz de producir enzimas que descomponen pectina, xilano y carboximetilcelulosa, lo que concuerda con los resultados del presente estudio, tal y como puede observarse en la Figura. 9 y deducir del hecho de que podían crecer en medios cuyas únicas fuentes de C fueron paja o aserrín. Como ya se mencionó más arriba, tuvimos limitaciones, como la imposibilidad de realizar ensayos cuantitativos *in vitro* mediante ácido dinitrosalicílico (ninguna casa comercial nos lo proporcionó en Ecuador), o de conseguir sustratos polisacáridos distintos de la carboximetilcelulosa, CMC, (xilano, lignina, etc.). Esto nos limitó a ensayos cualitativos (no cuantitativos) y a actividad/es celulolítica/s *in plate*. A pesar de esto, conseguimos evaluar los requerimientos de pH, NaCl y metales divalentes como  $Ca^{2+}$  (aquellos quelados por EDTA- $Na_2$ ) del conjunto de actividades en lisados de hongos crecidos en MSP, MSA y MN (Figura. 11, 12 y 13)

Los microorganismos, en general, se adaptan a aquellos sustratos presentes en sus medios ambientes o medios de cultivo y no inducen necesariamente la producción de aquellos enzimas que no necesitan. De este modo, es posible que los enzimas inducidos en presencia

de celulosa (paja) o lignocelulosa (aserrín), un sustrato mucho más complejo, fueran distintas y, por tanto, con propiedades cinéticas distintas. El hecho de que los lisados de hongos crecidos en los medios selectivos MSA y MSP no entraran en el gel, limitó nuestros zimogramas a la/s actividad/es celulolíticas inducidas en MN. A este respecto, la actividad celulolítica de los lisados de hongos crecidos en MN, correspondió a una única proteína de unos 29 kDa. En el caso de los hongos crecidos en MSP y MSA no podemos hacer esta afirmación, sin embargo, en todas las muestras analizadas mediante ensayo *in plate* el pH óptimo (5 – 6) y los requerimientos de NaCl y metales divalentes fueron similares, al menos por lo que puede apreciarse a simple vista en estos ensayos cualitativos. Por otro lado, y debido a que el hongo creció mejor a pH 5 y que la literatura establece un rango para *Chaetomium* de entre pH 5 y 6 (Paszczyński & Trojanowski, 1977) es posible que el pH óptimo de otras enzimas que contribuyeran a la degradación de CMC fuera similar. Lo que sí podemos afirmar, por otro lado, es que la capacidad de degradar CMC no se debe a metaloproteínas, es decir, proteínas que requieren de un ion metálico como cofactor ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , etc.) ya que concentraciones crecientes de EDTA –  $\text{Na}_2$  no tuvieron un efecto inhibitor sobre los ensayos *in plate* (Figura. 13).

En este estudio el hongo *Chaetomium piluliferum* rindió mayor concentración de proteínas en el MSP y MN, a diferencia del estudio realizado (VILLA & ESPIN, 2010) donde el hongo *Phanerochaete chrysosporium* presenta un mejor crecimiento cuando el inóculo tiene como medio de cultivo PDA y Aserrín (PDA+ASE).

Por último, los lisados de los hongos crecidos en MSA fueron los que presentaron una menor actividad total *in plate*, debido probablemente a que el crecimiento del hongo en este medio fue mucho más lento y, por tanto, el rendimiento en proteína que logramos fue mucho menor aunque, de nuevo, la carencia de DNS, no nos permitió establecer con claridad la actividad celulosa específica (actividad / unidad de proteína). Estos resultados difieren de los

obtenidos por (Villa & Espin, 2010), que observaron un mayor crecimiento del hongo filamentoso *Phanerochaete chrysosporium* en medio PDA + aserrín. De todos modos, el aserrín es el sustrato natural que menos se parece al sustrato comercial CMC, ya que la estructura del residuo celulósico de plantas leñosas es mucho más complejo ya que incluye elementos que otorgan rigidez y dificultan la degradación. Por esto, sería en este medio de cultivo donde esperaríamos una inducción de enzimas más diferente y, por tanto, condiciones de ensayo distintas. Las endoglucanasas degradan fácilmente la CMC; mientras que las celobiohidrolasas no son capaces de degradar CMC. Además (Ram & Mar, 2003) indica que la actividad endo-b-1,4-Glucanasa (EC 3.2.1.4) o CMCase se da mejor a pH 6.

## 5. CONCLUSIONES

- Los medios diseñados por la autora son útiles para el aislamiento y desarrollo de *Chaetomium piluliferum*, pero son problemáticos a la hora analizar actividades *in gel* mediante SDS-PAGE.
- *Chaetomium piluliferum*, es capaz de producir enzimas celulolíticas, lo cual es una posible alternativa para la obtención de azúcares fermentables.
- La actividad celulolítica de los lisados de hongos crecidos en MN, correspondió a una única proteína de unos 29 kDa.
- El análisis de la actividad *in plate*, aunque tiene limitaciones desde el punto de vista cuantitativo, resulta útil para el análisis de algunos parámetros cinéticos de los enzimas como pH, % NaCl y requerimiento de metales.

## 6. RECOMENDACIONES O LIMITACIONES

- Colocar antibiótico en los medios de cultivos después de autoclavar en presencia del mechero, para evitar el crecimiento de otros microorganismos como las bacterias.

- Para evitar dañar la muestra aislada del hongo al momento de aislar, se recomienda un lisado a 4°C, 19 ciclos de sonicación (11 s) y enfriamiento en baño con hielo (2 min), hasta cumplir 3,5 min de proporcionar ondas acústicas.
- Debería obtenerse ácido dinitrosalicílico para el análisis cuantitativo de las actividades enzimáticas que, además, permite cuantificar la degradación de sustratos naturales porque detecta la liberación de azúcares reductores.
- Para evitar problemas al momento de correr en SDS-PAGE, se recomienda utilizar muestras que crezcan en medios más simples como el MN, o lavar las muestras mediante diálisis o mini – columnas cromatográficas

## 7. BIBLIOGRAFIA

- BOLIN, H. R. (1976). TEXTURE AND CRYSTALLIZATION CONTROL IN RAISINS. *Journal of Food Science*, 41(6), 1316–1319. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1976.tb01161.x>
- Cano-Ramírez, C., Santiago-Hernández, A., Rivera-Orduña, F. N., Pineda-Mendoza, R. M., Zúñiga, G., & Hidalgo-Lara, M. E. (2017). One-step zymogram method for the simultaneous detection of cellulase/xylanase activity and molecular weight estimation of the enzyme. *Electrophoresis*, 38(3–4), 447–451. <https://doi.org/10.1002/elps.201600347>
- Cardona, C. A. (2009). Perspectivas de la producción de biocombustibles en Colombia : contextos latinoamericano y mundial. (Perspectives of biofuels production in Colombia : latinamerican and world Contexts, in spanish). *Revista de Ingeniería Uniandes*, 29, 109–120. <http://www.scielo.org.co/pdf/ring/n29/n29a14.pdf>
- Castro, M. (2012). Reflexiones en torno al desarrollo de los biocombustibles en Ecuador. *CEDA. Centro Ecuatoriano de Desarrollo Ambiental - Temas de Análisis.*, 25, 1–6. <http://www.olade.org/sites/default/files/CIDA/Biocomustibles/Otros/CEDA Reflexiones desarrollo Biocombustibles Ecuador.pdf>
- Castro Saya, Y. (1989). Estudio de la bioquímica de enzima lignocelulolíticas. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53, 160. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Cuervo, L., Folch, J., & Quiroz, R. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Bio Tecnología*, 13(3), 11–25. [http://www.smbb.com.mx/revista/Revista\\_2009\\_3/Lignocelulosa.pdf](http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2009_3/Lignocelulosa.pdf)
- Daniels, J. (1961). *Chaetomium piluliferum* sp.nov., the perfect state of *Botryotrichum piluliferum*. *Transactions of the British Mycological Society*, 44(1), 79-IN7.

[https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(61\)80009-0](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(61)80009-0)

- Haider, K., & Domsch, K. H. (1969). Abbau und Umsetzung von lignifiziertem Pflanzenmaterial durch mikroskopische Bodenpilze. *Archiv Für Mikrobiologie*, 64(4), 338–348. <https://doi.org/10.1007/BF00417015>
- Hernandez, N. (2020). *EVALUACION DEL CRECIMIENTO DEL HONGO PLEUROTUS OSTREATUS (BASIDIOMYCOTA) EN DISTINTOS SUSTRATOS LIGNOCELULOSICOS (CAPACHO DE MAIZ, HOJA DE ALMENDRO Y ASERRIN) EN LA ESTACION ECOLOGICA LAS GUARTINAJAS EN EL MUNICIPIO DE TIERRA ALTA-CORDOBA-COLOMBIA.*
- Klimek-Ochab, M., Brzezińska-Rodak, M., Zymańczyk-Duda, E., Lejczak, B., & Kafarski, P. (2011). Comparative study of fungal cell disruption-scope and limitations of the methods. *Folia Microbiologica*, 56(5), 469–475. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0069-2>
- MOLINA, C. (2013). *OBTENCION DE EXTRACTOS ENZIMATICOS CON ACTIVIDAD LIGNINOLITICA Y CELULOLITICA A PARTIR DEL CRECIMIENTO DEL HONGO LENTINUS EDODES (SHITAKE) EN ASERRIN TROPICAL.*
- Ochoa, D. (2008). “*CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE 60 HONGOS QUE FORMAN PARTE DEL CEPARIO MICOLOGICO DEL C.B.C.M. DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA.*”
- Ram, P., & Mar, J. (2003). *Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos : aislamiento , caracterización y determinación de la actividad celulolítica.* 10(1), 67–77.
- Rossmann, A. Y., Allen, W. C., Castlebury, L. A., & Bogaerts, A. (2017). (2505–2506) proposals to conserve the names *Chaetomium piluliferum* (*Botryotrichum piluliferum*) against *Coccospora agricola* and *Gnomonia intermedia* (*Ophiognomonia intermedia*) against *Gloeosporium betulae* (*Discula betulae*) (Ascomycota: Sordariomycetes). *Taxon*, 66(2), 514–515. <https://doi.org/10.12705/662.18>
- Salinas, E., & Gasca, V. (2009). Los biocombustibles. *El Cotidiano*, 16(157), 8. <https://www.redalyc.org/pdf/325/32512739009.pdf>
- Vázquez-montoya, E. L., Castro-ochoa, L. D., Maldonado-mendoza, I. E., Luna-suárez, S., & Castro-martínez, C. (2019). Moringa straw as cellulase production inducer and cellulolytic fungi source. *Revista Argentina de Microbiología*, xx. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.02.005>
- Vázquez-montoya, E. L., Castro-ochoa, L. D., Maldonado-mendoza, I. E., Luna-suárez, S., & Castro-martínez, C. (2020). Moringa straw as cellulase production inducer and cellulolytic fungi source. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(1), 4–12. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.02.005>
- Vilches, L. (2002). *Determinacion de la actividad de exoglucanasas de cepas fungicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz.* [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/1406/Vilchez\\_pl.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/1406/Vilchez_pl.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- VILLA, Y., & ESPIN, N. (2010). Determinación de la cinética de crecimiento del hongo *Phanerochaete chrysosporium* en residuos lignocelulósicos y determinación de la

actividad ligninoperoxidásica. In *Revista Politécnica*.

[http://revistapolitecnica.epn.edu.ec/ojs2/index.php/revista\\_politecnica2/article/viewFile/192/pdf](http://revistapolitecnica.epn.edu.ec/ojs2/index.php/revista_politecnica2/article/viewFile/192/pdf)

Wang, X. W., Houbraeken, J., Groenewald, J. Z., Meijer, M., Andersen, B., Nielsen, K. F., Crous, P. W., & Samson, R. A. (2016). Diversity and taxonomy of Chaetomium and chaetomium-like fungi from indoor environments. *Studies in Mycology*, 84, 145–224. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2016.11.005>

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. In *GENETICS AND EVOLUTION* (Vol. 55, Issue 3).

Zuñiga, F. (2013). *Estudio del efecto de la adición de extremos polipeptídicos hidrofóbicos en la expresión y purificación de proteínas recombinantes*.