

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS Fundada en 1551

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de huaylas y Huaraz

TESIS para optar el Título Profesional de: BIÓLOGO con mención en Microbiología y Parasitología

AUTOR

LAURA VILCHES PAZ

ASESOR PH. D. PEDRO CASTELLANOS SÁNCHEZ

LIMA-PERÚ 2002

ASESOR

Ph. D. Pedro Castellanos Sánchez.

DEDICATORIA

A mi querida madre, quien es mi constante apoyo y a quien le dedico todos mis esfuerzos presentes y futuros.

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A mi asesor, el Ph. D. Pedro Castellanos Sánchez, por la confianza que me brindó y sus constantes orientaciones en el desarrollo del presente trabajo.
- ❖ A las profesoras Mg. Débora Alvarado Iparraguirre y Mg. Ruth García de la Guarda, del Laboratorio de Microbiología Molecular, y al profesor Mg. Enrique Escobar Guzmán, del Laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular, por el apoyo brindado.
- ❖ A mis amigos Elizabeth Sarmiento y Wilber Pineda, quienes se interesaron desde el inicio en mi trabajo.

CONTENIDO

RESUMEN	6
SUMMARY	8
I. INTRODUCCIÓN	10
II. ANTECEDENTES	17
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. Evaluación preliminar de la capacidad celulolítica	26
3.2. Aislamiento de nuevas cepas celulolíticas	27
3.3. Identificación genérica de cepas celulolíticas	28
3.4. Mantenimiento de cepas	28
3.5. Evaluación cualitativa de la actividad de exoglucanasas	28
3.6. Determinación cuantitativa de la actividad de exoglucanasas	30
3.7. Determinación cuantitativa de la producción de exoglucanasas en diferentes fuentes de carbono	31
3.8. Evaluación de la producción de exoglucanasas	32
IV. RESULTADOS	34
TABLAS	40
FIGURAS	48
V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	60
VI. CONCLUSIONES	71
VII. RECOMENDACIONES	73
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXOS	
1 Mecanismo de acción de las celulasas	82
2. Esquema de la actividad de la exoglucanasa	83
3. Composición de sustratos lignocelulósicos	84
4. Organigrama del aislamiento de cepas celulolíticas	85
5. Organigrama de la determinación cualitativa de la actividad de exoglucanasas	86
6. Fotos	87
7. Medios de cultivo	90

RESUMEN

Con el objetivo de determinar su potencial como cepas productoras de uno de los componentes del complejo enzimático celulasa: las exoglucanasas, se evaluaron inicialmente 104 cepas de hongos celulolíticos aislados de muestras de tierra con hojarasca de las provincias de Huaylas y Huaraz. De estas cepas, 10 (9,6%) fueron aisladas en el año 2000; las 94 cepas restantes (90,4%) en 1990. Estas últimas fueron reactivadas en medio APD y sólo 43 cepas (45,7%) fueron verificadas como celulolíticas por su desarrollo en sustratos celulósicos.

La actividad de exoglucanasas de las cepas celulolíticas se determinó cualitativamente mediante la evaluación del grado de desintegración del papel filtro en cultivos en medio Czapeck. Los sobrenadantes libres de células de estos cultivos se utilizaron para evaluar la pérdida de peso en 100 mg de papel filtro (para cada sobrenadante). En base a estos resultados se seleccionaron presuntivamente 25 cepas (55,6%), las que fueron cultivadas en medio Czapeck con papel filtro (0,5%) como única fuente de carbono. A partir de estos cultivos se realizó la evaluación cuantitativa de la actividad de exoglucanasas utilizando los sobrenadantes libres de células, mediante la actividad sobre papel filtro (APF). Para determinar esta actividad se cuantificaron los azúcares reductores por el método de Nelson (1944) y Somogyi. Las cepas con niveles mayores a 0,1 UI/ml de actividad exoglucanasa fueron seleccionadas y se evaluó su producción en medio Czapeck con diferentes fuentes de carbono (algodón, celulosa y papel filtro), así como también la actividad de exoglucanasas en medio Czapeck y medio Mandels, determinándose además biomasa, pH y proteínas solubles.

Las cepas que tuvieron las mayores actividades de exoglucanasas fueron: HU 216 C - *Chrysosporium* sp., HU 218 D - *Fusarium* sp. y HU 251 A -

Fusarium sp., con: 0,120 UI/ml, 0,137 UI/ml y 0,112 UI/ml respectivamente. Cuando se evaluaron diferentes fuentes de carbono para la producción de exoglucanasas por estas cepas, la cepa HU 216-C mostró la mayor actividad de exoglucanasas entre los cultivos con papel filtro(0,108 UI/ml), mientras que la cepa HU 251 A mostró la mayor actividad entre los cultivos con algodón (0,093 UI/ml). En la evaluación de la producción de exoglucanasas por estas 3 cepas en medios Mandels y Czapeck, se encontró que en medio Mandels las actividades enzimáticas y proteínas solubles fueron mayores a las obtenidas en medio Czapeck, variando generalmente en forma directa.

Puesto que las cepas evaluadas mostraron actividades de exoglucanasas muy aceptables no obstante los factores nutricionales mínimos utilizados en los ensayos, podemos concluir de este estudio que en nuestro país encontramos cepas fúngicas que pueden considerarse potenciales productoras de este componente del complejo celulasa. Siendo los residuos celulósicos de las actividades agroindustriales en nuestro país una constante de contaminación ambiental, las cepas obtenidas podrían ser utilizadas como una alternativa viable para el reuso de dichos residuos y por ende la disminución de la contaminación ambiental, además de otros usos posibles.

SUMMARY

Were analyzed one hundred and four native fungi isolated of samples of ground with dead leaves from Huaylas and Huaraz provinces, with regarding their potential as producing strains of one of the enzymes of the cellulase complex: the exoglucanases. Of these strains, ten were isolated lately(2000 year) and ninety four in the 1990 year; the latter were reactivate in PDA media and just forty three strains were verified like cellulolytic by their growth in cellulosic substrates.

The exoglucanases activity of the cellulolytic strains was determined in qualitative form by means the filter paper desintegration in cultivations in Czapeck media. The loss in weight of insoluble substrate was evaluated with the culture filtrates. Twenty five fungal (55,6%) strains were selected and evaluated in quantitative form by means filter paper activity (FPA), measuring the reducing sugar produced by the Nelson (1944) and Somogyi method.

The strains with exoglucanases activities higher than 0,1 UI/ml were selected; it was found that the strains HU 216 C - *Chrysosporium sp.*, HU 218 D - *Fusarium sp.* and HU 251 A - *Fusarium sp.*, had the higher activities, being obtained 0,120 IU/ml; 0,137 IU/ml and 0,112 IU/ml respectively. When different carbon sources (cotton,cellulose and filter paper) were tested for the exoglucanases production by these strains were obtained maximal activities of 0,108 IU/ml and 0,093 IU/ml of the exoglucanases produced in cultivations with paper filter and cotton respectively. In the evaluation of the production of these 3 strains in the Mandels and Czapeck medias was found that in the Mandels media the enzymatic activities and extracellular soluble proteins were higher to them obtained in the Czapeck media.

The acceptable grade of exoglucanases activities of the strains whereas the minimum conditions for cultivations indicate that in our country is possible to find fungal strains with potential like cellulases producers. The cellulolytic wastes of agricultural and industrial activities are a constant of contamination then the obtention of cellulases strains to offer a feasible choice for the transformation your.

I. INTRODUCCIÓN

Los principales polímeros vegetales sujetos a degradación microbiana en los hábitats del suelo incluyen a la celulosa, hemicelulosas y lignina (Atlas & Bartha 1980; Ladisch et al. 1983; Pourquoi & Vandecasteele 1985), siendo la celulosa el carbohidrato más abundante disponible en la biomasa vegetal, correspondiendo al menos a un tercio de toda la materia vegetal de la tierra (Han et al. 1971) y del 40% al 60% del material de la pared celular de madera y plantas herbáceas (Fan et al. 1982; Phillips 1985).

Las características de la celulosa han sido diversamente investigadas (Atlas & Bartha 1980; Fan et al. 1980; Ladisch et al. 1983; Phillips 1985; Pourquoi & Vandecasteele 1985; Gutiérrez – Correa 1986; Lehninger 1987). La celulosa es un hidrato de carbono consistente en su forma nativa de una cadena lineal de unidades de glucosa con enlaces glucosídicos β , 1-4. Se ha calculado que el peso molecular mínimo de la celulosa de diversas procedencias varía de 50 000 D a 25 000 000 D, que es el equivalente de 300 a 15 000 restos de glucosa. El análisis por difracción de rayos X indica que la celulosa presenta una estructura cristalina altamente ordenada, constituyendo fibras elementales o microfibras de 500 a 1000 angstroms de longitud. Algunas zonas de la fibra elemental contienen porciones de celulosa “amorfa” que es fácilmente hidrolizable. Las moléculas de celulosa están además organizadas en haces de cadenas paralelas que forman fibrillas. Aunque la celulosa posee elevada afinidad por el agua, es completamente insoluble en ella.

En las paredes celulares de las plantas, las fibrillas de celulosa muy densamente empaquetadas y dispuestas en haces paralelos, rodean a la célula, frecuentemente formando capas cruzadas. Estas fibrillas se hallan aglutinadas por

una matriz de otros tres materiales polímeros: hemicelulosa, pectina y extensina. Por su parte, la madera contiene otra sustancia polímera: la lignina (Lehninger 1987).

Así, la celulosa, con un estimado de velocidad de síntesis de $4 \times 10^7 - 4 \times 10^{10}$ tns/año (Béguin 1990; Singh & Hayashi 1995), constituye una abundante fuente de carbono que es usada como tal por muchos microorganismos. Todos estos microorganismos que pueden degradar celulosa cristalina producen un sistema complejo de enzimas que es denominado en forma general **celulasa**; cada sistema o complejo celulasa está compuesto de una variedad de enzimas con diferentes especificidades y modos de acción, que actúan en sinergismo para hidrolizar la celulosa. Sin embargo, hay que considerar que la susceptibilidad de la celulosa a la hidrólisis enzimática está afectada significativamente por los rasgos estructurales de los materiales celulósicos, que incluyen: grado de acumulación de agua, orden molecular, contenido de material asociado como la lignina, estructura capilar de las fibras de celulosa, área superficial, además del rasgo sugerido como el más importante: cristalinidad (Fan et al. 1980; Ooshima et al. 1983). A este respecto, se considera el pre-tratamiento de los sustratos lignocelulósicos como una alternativa para realzar la hidrólisis, puesto que aumenta la accesibilidad a la celulosa (Han & Callihan 1974; Fan et al. 1982; Gutiérrez-Correa 1986).

Las enzimas del complejo celulasa han sido agrupadas en tres componentes mayores (Ladisich et al. 1983; Pourquoi & Vandecasteele 1985; Gutiérrez-Correa 1986):

- Endo - β -glucanasas ó 1,4- β -D-glucan glucanohidrolasas (EC 3.2.1.4), que rompen los enlaces β -glucosídicos en forma aleatoria en el interior de las moléculas de celulosa, produciendo nuevos sitios de ataque complementados por las exoglucanasas. Como resultado, hay una rápida disminución en el largo de las cadenas y un lento incremento en los grupos reductores. El mejor sustrato para la medición de la actividad de endoglucanasas es un derivado soluble de celulosa tal como la carboximetilcelulosa (CMC).

- Exo- β -glucanasas ó 1,4- β -D-glucan celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91), que atacan gradualmente las moléculas de celulosa de los terminales no reductores liberando subunidades de celobiosa. No son muy activas contra celulosa cristalina pero exhiben acción sinérgica altamente cooperativa en presencia de endoglucanasas. Tienen muy limitada acción sobre sustitutos de celulosa como carboximetilcelulosa (CMC) e hidroximetilcelulosa (HEC).
- β -glucosidasas o celobiasas (EC 3.2.1.21), la que hidroliza celobiosa y celodextrinas de bajo peso molecular (celotriosas y celotetrosas) en glucosa.

En cada componente existe una multiplicidad enzimática que se puede encontrar en diferentes formas de isoenzimas, de modo general, estas enzimas son glucoproteínas (Pourquie & Vandecasteele 1985; Ramos y Forchiassin 1996).

La degradación total de la celulosa involucra los 3 componentes enzimáticos de la celulasa, el sinergismo entre éstos es explicado muy simplídicamente por Béguin (1990) quien propone que las endoglucanasas atacan las regiones amorfas de las fibras de celulosa, creando así sitios para las exoglucanasas los que entonces procederían hacia las regiones cristalinas de la fibra. Las β -glucosidasas ejecutarían el último paso de la hidrólisis e impedirían la acumulación de celobiosa, la que inhibiría a las exoglucanasas.(Anexo 1)

Con respecto a las exoglucanasas, Ladisch et al. (1983) mencionan su posible modo de acción según los siguientes pasos: 1) Adsorción y formación del complejo enzima sustrato, 2) Formación del producto, 3) Desorción y readsorción de la enzima o movimiento de la enzima a lo largo de la molécula de celulosa. En un modelo de celulosa de cadena extendida la hidrólisis de las cadenas exteriores expondrían los terminales no reductores de las cadenas interiores.(Anexo 2)

La hidrólisis enzimática de la celulosa ha sido intensamente investigada ya que ofrece las ventajas de su alta especificidad y actividad catalítica bajo condiciones ambientales moderadas, por lo que se requiere de organismos altamente productores de celulasas.

Las celulasas son sintetizadas por una variedad de microorganismos que se encuentran entre las bacterias (Han & Callihan 1974; Crawford & McCoy 1972; Stutzenberger 1972; Okeke & Paterson 1992) y hongos (Ceroni y Gutiérrez-Correa 1988; Barbosa & de Queiroz 1996; Castellanos et al. 1999), cuando crecen en sustratos celulósicos. Sin embargo, relativamente pocos microorganismos pueden producir el grupo de enzimas necesario para la degradación de celulosa cristalina; los hongos son los organismos más estudiados con respecto a la degradación de celulosa y producción de celulasas. Ramos y Forchiassin (1996) mencionan que los hongos son responsables de la mayor proporción de celulosis en la naturaleza y que su primacía no es solamente consecuencia de la eficiencia y diversidad de sus sistemas celulolíticos, sino que también tienen ventajas adaptativas que son: la rápida colonización de los sustratos y una eficiente remoción de los productos de hidrólisis; estas características los distinguen de los demás organismos como los principales descomponedores de materiales celulósicos.

Las especies de hongos celulolíticos más frecuentemente estudiadas pertenecen al género *Trichoderma* por ser los mejores productores de celulasas. Sin embargo otros géneros y especies de hongos tales como *Aspergillus* (Svistova 1984; Bastawde 1992), *Cladosporium* (Abrha & Gashe 1992), *Fusarium* (Murali et al. 1994), *Penicillium* (Keskar 1992), *Neurospora crassa* (Yazdi et al. 1990), incluyendo además hongos comestibles como: *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea*, *Pleurotus sp.* (Puntambekar 1995; Buswell et al. 1996), también producen celulasas. El hongo *Trichoderma reesei (viride)* es el mejor productor de celulasa extracelular, por lo que la mayoría de los estudios concernientes a la naturaleza, modo de acción y aspectos en general de las celulasas han sido realizados usando este microorganismo (Griffin et al. 1974; Kaneshiro et al. 1975; Linko et al. 1977; Illanes y Rossi 1980; Morozova et al. 1981; Ooshima et al. 1983; Mohagheghi et al. 1990; Maheswari et al. 1993). Sin embargo, la búsqueda de una eficiente y posiblemente mejor fuente de celulasa continúa debido a la baja actividad de β -glucosidasa en *Trichoderma viride*, lo que limita la velocidad y extensión de la hidrólisis, por lo que algunos investigadores han

orientado sus estudios al uso de cultivos mixtos (Szakács-Dobozi et al. 1985; Madamwar & Patel 1992; Dueñas et al. 1995).

La importancia de encontrar nuevas especies de microorganismos celulolíticos altamente productores reside en el hecho de que aunque se han aislado una gran variedad de bacterias y hongos capaces de utilizar la celulosa, no todos pueden producir altos niveles de enzimas extracelulares que permitan degradar “in vitro” la celulosa insoluble. Se puede realizar la: 1) Búsqueda de nuevos productores activos en condiciones naturales, 2) Obtención de nuevas cepas, del resultado de una selección de los cultivos ya conocidos, luego de mejorar su producción de celulasas ya sea por optimización de las condiciones de cultivo (Ali et al. 1991) o por mutación (Julca y Gutiérrez-Correa 1987; Zaldívar et al. 1987; Witkowska et al. 1989).

Las fuentes de origen de los microorganismos degradadores de celulosa son diversas, considerándose entre otras: suelo (Zaldívar et al. 1987; Ceroni y Gutiérrez-Correa 1988), despojos vegetales u hojarasca (Magnelli et al. 1987), efluentes de industrias (Mullings & Parish 1984; Prasertsan et al. 1992), residuos municipales (Stutzenberger et al. 1970), estiércol (Lee & Blackburn 1975), compost (Ramírez 1993).

En cuanto a los factores de los que depende la producción extracelular de celulasas microbianas tenemos: el tamaño del inóculo, fuente de carbono, pH, temperatura, presencia de inductores y/o inhibidores, aditivos del medio, aereación y tiempo de desarrollo. La importancia de la influencia que ejerce el medio en el que desarrollan los microorganismos celulolíticos sobre la producción enzimática ha llevado a que se trabaje con diversas fuentes de carbono (CMC, Avicel, algodón, etc.), de nitrógeno (asparagina, urea, glicina, etc.) y surfactantes (Tween 80, Tergitol, etc.), (Abrha & Gashe 1992; Bastawde 1992; Levin y Forchiassin 1995, 1997) e igualmente con variaciones de pH y temperatura (Herrera 1981; Mullings & Parish 1984; Steiner et al. 1994; Sugden & Bhat 1994; Pardo & Forchiassin 1998, 1999).

En consecuencia, la obtención de mejores microorganismos celulolíticos y su posterior cultivo “in vitro” nos permitirá contar con una fuente fácilmente disponible de enzimas celulolíticas para ser utilizadas en la hidrólisis de residuos lignocelulósicos. Además de la producción de celulosa, los organismos degradadores de celulosa son usados para la producción de biomasa y/o en la sacarificación de lignocelulósicos a azúcares simples los que pueden luego ser usados para varios propósitos (Saddler 1982; Gutiérrez-Correa 1986; Bastawde 1992; Keskar 1992; Prasertsan & Oi 1992; Wei et al. 1992). Los preparados enzimáticos de los microorganismos pueden ser usados para la agricultura pobre: en la producción de forrajes y alimentos para animales, aumentando el contenido proteico de los residuos lignocelulósicos, en el tratamiento de grano forrajero para incrementar su digestibilidad.

En el Perú 1,8 millones de toneladas de bagazo de caña de azúcar son producidas anualmente, este recurso abundante y poco costoso contiene cerca de 75% de celulosa y hemicelulosa hidrolizable que puede ser convertido en productos de valor agregado como por ejemplo alimento animal, o puede ser usado como sustrato para la producción de celulosa (Dueñas et al. 1995). Otro tipo de residuos agrícolas (paja de trigo, caña de maíz, etc.) incluyen en su composición 20-30% de hemicelulosa, 30-40% de celulosa y 5-10% de lignina (Ladisich et al. 1983; Pourquie & Vandecasteele 1985) y junto con algunos subproductos de las industrias agroalimentarias (pulpas, etc.) y forrajes pueden también ser “eliminados” en forma ventajosa. Además, puesto que el uso de microorganismos celulolíticos nos permitiría la utilización de los residuos agrícolas comunes como alimento para animales, se podría destinar más tierras al cultivo de alimento para la población.

Considerando entonces que nuestro país no está exento de la acumulación y pérdida de los desechos celulósicos generados anualmente a causa de las actividades agrícolas, forestales, industriales (maderas, papeleras, etc.) y municipales, lo que constituye una constante de contaminación ambiental, la

hidrólisis enzimática mediante el uso de celulasas o la degradación por microorganismos celulolíticos sería una alternativa para convertir estos residuos de tal forma que podamos obtener provecho de ellos.

Ya que la hidrólisis enzimática por microorganismos, especialmente por hongos, es una alternativa factible para el reuso de los residuos lignocelulósicos contaminantes y teniendo en cuenta los puntos expuestos anteriormente, se hace necesario seleccionar nuevas cepas de hongos productores de celulasas que brinden mejores perspectivas en la degradación de sustratos celulósicos.

Los objetivos del presente trabajo fueron:

1. Evaluar la capacidad celulolítica de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz.
2. Identificar genéricamente las cepas celulolíticas.
3. Cuantificar la actividad de exoglucanasas de las cepas con mayor poder degradativo y seleccionar las de mayor actividad.
4. Determinar la producción de exoglucanas de las cepas seleccionadas, en diferentes medios de cultivo.

II. ANTECEDENTES

Desde los trabajos pioneros de Reese y col. en 1950 (Ladish et al. 1983; Lee & Fan 1980; Sing & Hayashi 1995) hasta la fecha, son numerosas las investigaciones realizadas a nivel internacional sobre celulasas. Aquí se mencionan algunas de ellas.

Stutzenberger et al. (1970), investigaron los microorganismos con actividad celulolítica durante la compostación de residuos municipales sólidos, aislando 3 especies celulolíticas: *Aspergillus fumigatus*, *Bacillus* sp., *Thermoactinomyces* sp. La actividad de la celulasa fue determinada en los extractos clarificados de compost por medición de la velocidad de hidrólisis de la carboximetilcelulosa(CMC). La máxima actividad se obtuvo a 65° C y pH 6,0 con una concentración de CMC al 2,5%.

Crawford & McCoy (1972), trabajaron con celulasas de *Streptomyces thermodiasticus* y *Thermomonospora fusca*. Estas celulasas fueron producidas en cultivos con CMC como fuente de carbono. Purificaron parcialmente las celulasas obtenidas y las usaron para determinar los productos finales de la hidrólisis de CMC, obteniendo celobiosa, glucosa y oligosacáridos largos intermedios. Por lo que concluyeron que esto indicaría la hidrólisis interna de las cadenas de CMC.

Stutzenberger (1972), estudió la actividad celulolítica de *Thermomonospora curvata* y sus requerimientos nutricionales para la producción de celulasa. Obtuvo que el uso de un medio mínimo de sales minerales para la producción de celulasa (C₁ y C_x) por *T. curvata* incrementó 11 veces la actividad extracelular C₁ (medida por la velocidad de hidrólisis de la fibra de algodón) en comparación

con un medio previamente usado con extracto de levadura. Además obtuvo que con las fibras de algodón se logró la más alta producción de celulasas, en comparación con otras fuentes solubles e insolubles de carbohidratos. Por otro lado, estudió las condiciones óptimas para la producción de celulasas por *Thermomonospora curvata*, empleando fibras de algodón (actividad C1) y CMC (actividad Cx) como sustratos, para lo que consideró los factores: concentración del sustrato, temperatura óptima y pH.

Linko et al. (1977), estudiaron la producción de celulasa y hemicelulasas por *Trichoderma viride* QM 9414 en diferentes fuentes de carbono, encontrando que un pH bajo estimula la formación de celulasa.

Illanes y Rossi (1980), estudiaron la cinética de inducción de las fracciones exo y endoglucanasa del complejo celulolítico de *Trichoderma reesei* QM 9414, cultivado en un medio de sales minerales, ácido glutámico y peptona, adicionando inductores: lactosa, celobiosa y celulosa. Los resultados indicaron que la fracción endoglucanasa es inducida por lactosa y celobiosa, mientras que la fracción exoglucanasa no se sintetizó en respuesta a la adición de estos sacáridos bajo las condiciones del ensayo. Ambas fracciones fueron inducidas por la adición de celulosa al medio de cultivo.

Saddler (1982), trabajó con más de cien cepas de hongos pudridores de madera, comparando su capacidad para degradar bloques de madera mediante la evaluación de peso perdido debido a la degradación fúngica. Algunas de estas cepas, como: *Phanerochaete chrysosporium*, *Liberetella* sp., *Myrothecium verrucaria*, *Trichoderma* sp., entre otras, fueron ensayadas para determinar su actividad celulasa extracelular usando una variedad de medios sólidos conteniendo CMC. Las cepas de *Trichoderma* crecieron dando un alto rendimiento de celulasa.

Szczodrak et al. (1982), determinaron la actividad celulolítica de 17 especies de hongos, entre las que *Aspergillus terreus* F-413 mostró la más alta actividad

en un rango de pH entre 4,8 - 5,3 encontrando también actividad lignolítica en esta especie.

Wicklów et al. (1984), examinaron la habilidad de 12 especies de *Cyathus* para modificar diferencialmente la lignina y componentes celulósicos de la paja de trigo y madera de arce plateado. Sus resultados indicaron que la velocidad y patrón de degradación biológica de la lignocelulosa nativa difiere de acuerdo al sustrato y especie fúngica.

Szakács-Dobozi et al. (1985), con el fin de mejorar la degradación enzimática de los sustratos celulósicos, compararon las actividades de los sobrenadantes de los cultivos de 6 hongos, en forma individual y mezclada, sobre celulosa pura (papel filtro Whatman N°1, Avicel y algodón) y sustratos ricos en celulosa (paja de trigo y tallo de maíz). Observaron que la velocidad de hidrólisis de la celulosa pura en general se incrementó por la mezcla de enzimas en comparación a las enzimas del sobrenadante derivado de una sola fuente microbiana. El efecto fue particularmente alto cuando los sistemas enzimáticos de una especie de *Trichoderma* y de una especie de *Aspergillus* o *Penicillium* fueron trabajados juntos.

Zaldivar et al. (1987), estudiaron la producción de celulasas por una cepa nativa de *Trichoderma pseudokoningii* y mutantes derivados, en presencia y ausencia de un represor catabólico, utilizando para el cultivo medio líquido de Mandels con 7,5 gr/L de celulosa microcristalina.

Yazdi et al. (1990), investigaron el complejo celulasa de *Neurospora crassa*, determinando la temperatura y pH óptimos para su actividad y estabilidad, y los efectos de algunos surfactantes no iónicos y ácidos grasos en la producción/liberación de las enzimas celulolíticas. Los resultados mostraron que la actividad máxima ocurrió entre pH 4,0 - 7,0, siendo el pH 5,0 o cerca el óptimo para la estabilidad de todos los componentes. La temperatura óptima resultó entre 45 - 65°C, con un rango de 45 - 50°C para su estabilidad. La

presencia de ácidos grasos y surfactantes resultó en el incremento de la producción tanto de endo como exoglucanasas en el medio. El ácido oleico fue el ácido graso más efectivo y el Tween 80 el más efectivo surfactante.

Ali. et al. (1991), optimizaron las condiciones de cultivo para la producción de celulasa por *Aspergillus terreus* GTC 826 utilizando jacinto acuático como sustrato. La máxima producción de celulasa de la cepa evaluada cultivada a 40°C fue luego de 120 horas, con un pH inicial de 6,0.

Abrha & Gashe (1992), reportaron los efectos que algunas fuentes de carbono, nitrógeno y surfactante tuvieron sobre la producción del complejo celulasa por una especie de *Cladosporium*. También reportaron los efectos que el pH y temperatura tuvieron sobre la actividad celulolítica. *Cladosporium* sp. produjo grandes cantidades de enzimas celulasas cuando desarrolló en cultivos agitados con medio conteniendo CMC; hubo significativamente menor actividad cuando Avicel, papel filtro y algodón fueron usados como sustrato. Todos los componentes de la celulasa fueron óptimamente activos en el ensayo a pH 5,0 y 60°C.

Ali & Sayed (1992), estudiaron la regulación de la síntesis del complejo celulasa de *Aspergillus terreus* GTC 826, que fue inducida por glucosa, xilosa y celobiosa hasta 5,0 mg/ml, encontrando que más allá de esta concentración ellos reprimen la síntesis enzimática.

Bastawde (1992), reportó la producción de celulasa por una cepa de *Aspergillus terreus* aislada de despojos vegetales y su capacidad para sacarificar diferentes sustratos celulósicos, obteniendo alta actividad de celulasas a partir de cultivos en agitación por 8 días a 40°C ó 14 días a 28°C en un medio conteniendo 2,5% (w/v) de celulosa en polvo y 1% (w/v) de salvado de trigo. Comparando los resultados obtenidos en ambas condiciones de tiempo/temperatura hubo pequeñas diferencias entre las actividades finales de endoglucanasa (14,4 U/ml.); actividad sobre papel filtro (1,3 U/ml.) y beta glucosidasa (10 U/ml.). La endoglucanasa

tuvo una actividad máxima a 60° C y pH 3,8; las otras dos enzimas fueron óptimas a 60° C y pH 4,8. La máxima hidrólisis de diferentes sustratos celulósicos (cerca de 50%) fue obtenida dentro de las 48 horas cuando 1,1 U/ml de actividad celulasa de papel filtro fue empleada para sacarificar 100 mg de algodón tratado, papel filtro, bagazo y paja de arroz, a 50° C y pH 4,8. El mayor producto final, glucosa, fue producido de todos los sustratos, con rastros de celobiosa y otros oligosacáridos largos presentes en los hidrolizados de paja de arroz.

Keskar (1992), describió las condiciones óptimas para la producción de celulasa por *Penicillium janthinellum* en cultivos agitados, empleando sustratos celulósicos tratados con álcali así como celulosa nativa. Las máximas actividades de CMcelulasa, exoglucanasas y beta glucosidasa logradas por dicha especie fueron 60,5 y 9 U/ml respectivamente. La hidrólisis enzimática de paja de trigo pretratada, algodón y papel filtro fue de 57% a 58% en 48 horas a 50°C con glucosa como el mayor producto.

Madamwar & Patel (1992), investigaron un sistema celulasa con alta actividad hidrolítica y β -glucosidasa obtenido por *Trichoderma reesei* QM 9414 y *Aspergillus niger*. El cultivo fue desarrollado en medios con bagazo, mazorcas de maíz y aserrín como sustratos celulósicos, resultando el cultivo con bagazo con la mayor actividad y el cultivo con aserrín el de menor actividad.

Prasertsan et al. (1992), aislaron 34 cepas de hongos celulolíticos de muestras tomadas de los residuos y efluentes del molino de aceite de palma empleando agar CMC. Aunque 13 cepas aisladas mostraron buena desintegración del papel filtro dentro de los 14 días, sólo 8 cepas exhibieron zonas claras alrededor de sus colonias en agar CMC, de las que se seleccionaron 3 con las más altas actividades celulasas sobre CMC.

Wei et al. (1992), determinaron la actividad celulolítica de 12 especies de *Xylaria* y 5 especies de *Hypoxylon*; *Trichoderma reesei* QM 9414 también fue

evaluado para la comparación. Cepas de *Xylaria anisopleura* y *Xylaria regalis* tuvieron altas actividades de endo y exocelulasas luego de 2 semanas de incubación. El pH óptimo para estas enzimas celulolíticas fue aproximadamente 5.0 y el rango de temperatura óptima de 37 - 50°C.

Maheswari et al. (1993), determinaron la eficiencia en la conversión de paja de trigo por enzimas celulolíticas producidas en cultivos de *Trichoderma reesei* en un medio suplementado con celulosa en polvo. No encontraron relación entre la producción de celulosa y la utilización del sustrato.

Murali et al. (1994), determinaron la actividad de los componentes del complejo celulosa en cuatro especies de *Fusarium*, en cultivos en agitación con celulosa como fuente de carbono: *F. lini*, *F. lycopersici*, *F. Pallidoroseum* y *F. semitectum*, produjeron respectivamente 0,19; 0,33; 0,13 y 0,09 U/ml de actividad sobre papel filtro, mientras que *Trichoderma reesei* produjo en comparación 0,8 U/ml.

Steiner et al. (1994), estudiaron algunos de los parámetros culturales (fuentes de carbono y nitrógeno) y los efectos de la temperatura y pH sobre la estabilidad de las enzimas celulolíticas producidas por una cepa de *Penicillium purpurogenum*. Los resultados obtenidos mostraron que las enzimas en el sobrenadante fueron estables sobre los 50°C y entre pH 4,4 y 5,6 por 48 horas. Emplearon como fuentes de carbono: celulosa, paja de trigo y trigo integral, resultando la primera de ellas la mejor fuente para la producción de celulasas para la actividad sobre papel filtro.

Levin y Forchiassin (1995), investigaron la capacidad celulolítica de *Trametes trogii* en relación con la variación de las fuentes carbonadas y nitrogenadas presentes en el medio de cultivo. Entre las fuentes de carbono, la celulosa cristalina, la celobiosa y una mezcla de CMC y celobiosa resultaron en la mayor producción enzimática. La concentración óptima de la fuente de carbono fue de 10 g/L.

Barbosa & de Queiroz (1996), aislaron 48 hongos filamentosos a partir de avena procesada, siendo analizados respecto a su capacidad celulolítica. Todas las cepas fueron positivas para la celulasa, *Aspergillus janus var. brevis* y *Penicillium bilaii*, revelaron los mayores niveles enzimáticos.

Levin y Forchiassin (1997), caracterizaron los efectos que tienen las condiciones de cultivo sobre la producción de las enzimas del complejo celulasa en *Trametes trogii*, el cual produjo el sistema celulolítico completo creciendo con celulosa cristalina como única fuente de carbono en condiciones estáticas y de agitación. No encontraron diferencias significativas entre los cultivos estáticos y los de agitación en cuanto a los valores de endo y exoglucanasas. La adición de glucosa al medio de cultivo redujo drásticamente la producción enzimática. El pH óptimo para la síntesis del sistema celulasa fue 5,6, mientras que los óptimos para las actividades enzimáticas fueron 3,1; 4,1 y 5,3 para endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa respectivamente. La mayor actividad en el sobrenadante se obtuvo en cultivos incubados entre 25° y 28° C. Las temperaturas que optimizaron las actividades enzimáticas fueron 45°C (endoglucanasa), 50° C(exoglucanasa) y 60° C (β -glucosidasa).

Pardo & Forchiassin (1998, 1999), examinaron el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno, temperatura y pH en la producción de celulasas por *Nectria catalinensis*. Como fuente de carbono emplearon celulosa microcristalina. La temperatura óptima para la producción de celulasas, para el crecimiento y la degradación de celulosa fue de 23° C. Además, a pH 6,5 se obtuvo el máximo crecimiento y degradación de celulosa; la máxima producción de exoglucanasa se alcanzó a pH 7,5. Por otro lado, analizaron los efectos de la temperatura y pH en la actividad y estabilidad celulasa en la misma cepa de *Nectria catalinensis* en un medio con celulosa microcristalina. La temperatura óptima para la actividad del sistema celulolítico se obtuvo en el rango de 50° - 55°C, con un óptimo para la estabilidad entre 23 y 37° C después de un período de incubación de 72 horas. Para las diferentes enzimas, la actividad máxima se obtuvo en un rango de pH de

4,8 - 5,8 siendo el pH 4,8 cercano al óptimo para la estabilidad de todas las enzimas.

En el ámbito nacional son relativamente pocas las investigaciones relacionadas al complejo celulasa, algunas de las cuales mencionamos a continuación.

Julca y Gutiérrez-Correa (1987), determinaron la producción de celulasas por mutantes hipercelulolíticos a partir de una cepa de *Trichoderma reesei*.

Ceroni (1988), realizó la detección de germoplasma celulolítico en 136 cepas aisladas de suelos de las Lomas de Lachay, mediante una selección semicuantitativa en agar celulosa obteniendo 55 cepas (40,44%) con desarrollo y degradación de la celulosa. Luego evaluó la producción de celulasas en seis de estas cepas obteniendo actividades mayores en *Cladosporium* sp. 0,022 UI/ml, *Fusarium* sp. 0,039 UI/ml, *Aspergillus* sp. 0,039 UI/ml, *Penicillium* sp. 0,051 UI/ml.

Ceroni y Gutiérrez-Correa (1988), estudiaron la cinética de producción de celulasas en 6 diferentes hongos aislados a partir de los suelos de las Lomas de Lachay: *Gilmaniella* sp., *Trichoderma glaucum*, *T. harzianum*, *Penicillium implicatum*, *P. spinolosum*, y Sphaeropsidales. Utilizando lactosa 1% como inductor detectaron velocidades de incremento de la actividad enzimática; además observaron en la mayoría de los casos una relación bastante directa entre la biosíntesis de proteínas, enzimas y biomasa.

Nakandakari (1988), aisló 9 cepas de hongos celulolíticos a partir de muestras de tierra, de las cuales sólo 3 cepas correspondientes una a *Trichoderma* sp., y dos a *Aspergillus* sp. fueron determinadas como secretoras de enzimas celulolíticas. Sólo la primera cepa fue evaluada en la cuantificación de las

actividades de los tres componentes, encontrándose sólo actividad de endoglucanasas.

Ramirez (1993), estudió la degradación enzimática de la celulosa por 158 cepas de actinomicetos termófilos aislados de diversas muestras. Estas cepas fueron cultivadas en los medios de Crawford y McCoy y Skinner, evaluando la actividad degradativa sobre el papel filtro. En el primer medio obtuvo 12 cepas (7,60%) con muy buena actividad celulolítica y 71 cepas (44,94%) con buena actividad. En el medio de Skinner obtuvo 4 cepas (2,53%) con muy buena actividad celulolítica y 29 cepas (18,35%) con buena actividad. Seleccionó 10 cepas para determinar cuantitativamente la actividad de cada componente celulolítico, obteniendo como máxima actividad de exoglucanasas 0,334 UI/ml, por una especie de *Streptomyces*.

Dueñas et al. (1995), investigaron la producción de celulasas por cultivos mixtos de una cepa de *Trichoderma reesei* y una de *Aspergillus phoenicis* en medio con bagazo pretratado (0,2%) y glucosa (0,2%). Actividades significativamente altas de todas las enzimas del complejo celulasa fueron obtenidas en 4 días. La mayor actividad de celulasa sobre papel filtro fue de 18,7 UI/g de peso seco, representando aproximadamente de tres a seis veces más sobre las actividades logradas en los cultivos simples.

Castellanos et al. (1999, 2000), aislaron hongos con propiedades celulolíticas de diferentes regiones de nuestro país, utilizando medio mínimo de sales minerales Czapeck. Obtuvieron 87 cepas (45,1%) de la provincia Huaylas, 61 cepas (31,6%) de Huaraz y 45 cepas (23,3%) de Tingo María. Por otro lado, trabajaron con muestras de suelo de las provincias de Concepción y Satipo para el aislamiento, identificación y selección de hongos celulolíticos. El aislamiento se realizó en medio mínimo de sales minerales Czapeck. Se lograron aislar 139 cepas de las cuales identificaron genéricamente 117 cepas (84,17%). Entre los géneros que aislaron mencionan: *Chrysosporium* (14%), *Penicillium* (14%), *Fusarium* (13%), *Acremonium* (4%), *Aspergillus* (4%).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA.

1.1. Material Biológico: Se trabajó con cepas celulolíticas aisladas en el año 1990 a partir de muestras de tierra con hojarasca de las provincias de Huaylas (45 cepas) y Huaraz (60 cepas), y que fueron mantenidas en Agar Papa Dextrosa (APD) pH 5,5, sin ser reactivadas desde el año de su aislamiento. Para la evaluación de su capacidad celulolítica estas cepas tuvieron que ser previamente reactivadas.

1.2. Reactivación: Se tomaron inóculos de las cepas originales con el asa de siembra en ángulo recto y se sembraron en nuevos tubos con APD en plano inclinado pH 5,5. Se incubaron por un período inicial de 5 días a temperatura ambiente al cabo de los cuales y en caso de no observarse crecimiento se resembró nuevamente a partir de la cepa original previa remoción del micelio, para luego incubar por un período máximo de 15 días a temperatura ambiente.

En los casos que no se registró crecimiento al cabo del período máximo de incubación, se recurrió a los ceparios originales a los que se agregó medio Czapeck pH 5,5 (2 ml). Se removió el micelio con el asa de siembra y se incubó durante 24 horas a 30°C. Luego se procedió nuevamente como en el párrafo anterior.

Se realizaron microcultivos de las cepas reactivadas para constatar su pureza y posterior identificación.

1.3. Evaluación: Con el asa de siembra se tomaron inóculos de las cepas reactivadas con 4-5 días de crecimiento y se sembraron en placas

conteniendo papel filtro y algodón embebidos en medio Czapeck pH 5,5 (1-2 ml). Se incubaron los cultivos a temperatura ambiente por un período máximo de 15 días, durante los cuales se realizaron observaciones diarias del desarrollo con ayuda del microscopio. Además se realizaron microcultivos para verificar su pureza. Las cepas que desarrollaron adecuadamente en los sustratos celulósicos (algodón y/o papel filtro) fueron consideradas celulolíticas.

2. AISLAMIENTO DE NUEVAS CEPAS CELULOLÍTICAS.

2.1. Muestras: Complementariamente se trabajó con dos muestras de tierra con hojarasca tomadas en la Hacienda Cuba en la provincia Huaylas, departamento de Ancash, catalogadas como muestras N° 1 y N° 2.

2.2. Aislamiento: El método utilizado para el aislamiento de hongos celulolíticos fue el de acumulación de cultivos en sustratos celulósicos (Castellanos et al. 1999) (Anexo 4), para lo cual se procedió del siguiente modo:

Se sembró 1-2 g de muestra en frascos conteniendo cada uno un sustrato diferente como fuente de carbono (algodón, aserrín, papel filtro o viruta) embebido en medio Czapeck pH 5,5 (10-15 ml). El aserrín y viruta fueron pre-tratados con HCl 5% durante 24 horas para liberar la fracción de lignina y favorecer la exposición de la celulosa a las exoglucanasas. Cada muestra se trabajó en los cuatro sustratos. Este ensayo se realizó por cuadruplicado, es decir que se trabajó en total 16 frascos para cada muestra (4 frascos por sustrato). Se incubaron los cultivos por un período máximo de 15 días a temperatura ambiente, con observaciones y registros diarios del desarrollo.

A medida que se observó crecimiento en los frascos, se realizaron las resiembras respectivas con el asa de siembra en ángulo recto, hacia placas conteniendo papel filtro y algodón embebidos en medio Czapeck pH 5,5 (1-2ml). Se empleó una placa para cada forma de crecimiento. Se

incubaron las placas a temperatura ambiente por un período máximo de 15 días, con observaciones diarias al microscopio. En los casos en los que se observó crecimientos diferentes se procedió a separarlos en nuevas placas por resiembra.

A partir de las placas que mostraron crecimiento adecuado y de una sola forma (cepa) se realizaron microcultivos para verificar su pureza y posterior identificación, luego se sembraron las cepas puras en tubos con APD pH 5,5 en plano inclinado para su mantenimiento a temperatura ambiente. Las cepas fueron codificadas según el orden de aislamiento.

3. IDENTIFICACIÓN GENÉRICA DE CEPAS CELULOLÍTICAS.

Se realizó la identificación genérica de las cepas celulolíticas en base a la observación de sus características macroscópicas y microscópicas. Se utilizaron manuales de identificación (Rudakov 1981; Egorova 1986).

La observación macroscópica se realizó teniendo en cuenta: aspecto, superficie y color de las colonias desarrolladas en medio APD.

La observación microscópica de las estructuras de identificación se realizó mediante microcultivos en APD.

4. MANTENIMIENTO DE CEPAS.

Las cepas de trabajo, debidamente codificadas e identificadas, se mantuvieron en APD pH 5,5 en plano inclinado, a temperatura ambiente. Fueron reactivadas cada dos meses.

5. EVALUACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD DE EXOGLUCANASAS.

Se evaluó cualitativamente la actividad de exoglucanasas de las cepas celulolíticas mediante la degradación del papel filtro (Prasertan et al. 1992;

Ramírez 1993), y la pérdida de peso (adaptación del método de Saddler 1982), (Anexo 5). Luego se realizó una selección preliminar de cepas.

5.1. Degradación del papel filtro: Con el asa de siembra se tomaron inóculos de las cepas y se sembraron en tubos conteniendo medio Czapeck pH 5,5 (15 ml) con una tira de papel filtro Whatman N° 1 como fuente de carbono. Se procedió a incubar los cultivos durante 25 días en baño maría (Precision Scientific) a 30° C con agitación periódica (9 horas/día). Durante este tiempo se observó y registró diariamente el crecimiento micelial y la degradación del papel filtro.

Terminado el período de incubación se clasificó cada cepa de acuerdo a la degradación del papel filtro según los criterios: Muy buena, buena, regular, no observable. De manera complementaria también se clasificaron las cepas de acuerdo a su crecimiento según los criterios: Abundante, regular, escaso.

5.2. Evaluación de la pérdida de peso, (adaptación del método Saddler 1982):

Los cultivos obtenidos de la degradación del papel filtro fueron filtrados y centrifugados a 5000 rpm durante 15 minutos. Cada sobrenadante (2 ml) fue incubado con papel filtro Whatman N° 1 (100 mg aprox.) y buffer acetato 0,05 M pH 4,5 (2 ml), durante 5 días a 50°C en baño maría. Al término de la incubación el papel filtro fue lavado con agua destilada, secado a 60°C por 24 horas y luego pesado.

Se determinó el peso perdido por diferencia con el peso inicial. Se realizaron tres ensayos por cultivo.

5.3 Selección preliminar de cepas: Se realizó la preselección en base a la mejor degradación del papel filtro y la mayor pérdida de peso registrada.

6. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DE EXOGLUCANASAS.

Se determinó cuantitativamente la actividad de exoglucanasas de las cepas preseleccionadas, mediante la cuantificación de azúcares reductores medidos como glucosa, que fueron producidos por la actividad sobre papel filtro (APF). (Saddler 1982). Cada cepa se trabajó por duplicado.

6.1. Obtención de sobrenadantes: Con el asa de siembra se tomaron inóculos de las cepas preseleccionadas y se sembraron en tubos conteniendo medio Czapeck pH 5,5 (15 ml.) y papel filtro como fuente de carbono (0,5%). Se incubaron los cultivos durante 20 días a 30°C. Terminado el período de incubación los cultivos fueron filtrados y centrifugados a 5 000 rpm por 15 minutos, y los sobrenadantes fueron empleados en la determinación de la actividad de exoglucanasas sobre papel filtro.

6.2. Actividad sobre papel filtro (APF), (Saddler 1982): Se tomaron inóculos de 1 ml de los sobrenadantes obtenidos y se colocaron en tubos conteniendo papel filtro Whatman N° 1 (50 mg) y buffer acetato 0,05 M pH 4,5 (1 ml). Se incubaron los tubos con las mezclas a 50° C durante 1 hora. Luego se procedió a determinar la actividad sobre papel filtro mediante la medición de azúcares reductores por el método de Nelson (1944) y Somogyi, como se describe a continuación:

- En un tubo con 1 ml de la muestra problema (mezcla incubada o solución de glucosa para el caso de la curva estándar) se añadió 1 ml del reactivo de Somogyi.
- Se hirvió en baño maría por 15 minutos, luego se enfrió en agua corriente.
- Se agregó 1 ml del reactivo de Nelson y se completó con agua destilada hasta 25 ml.
- Se realizó la lectura de la densidad óptica a 540 nm.

Cabe precisar que se realizó inicialmente una curva estándar con glucosa en concentraciones determinadas (20, 40, 60, 80 y 100 ug/ml).

La actividad enzimática se expresó en unidades internacionales (UI)/ml, definida como la cantidad de enzima que libera una μmol de glucosa por minuto por mililitro de sobrenadante, bajo las condiciones del ensayo.

6.3. Selección: Se seleccionaron las cepas con mayor actividad enzimática (UI/ml).

7. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA PRODUCCIÓN DE EXOGLUCANASAS EN DIFERENTE FUENTES DE CARBONO.

Se determinó cuantitativamente la actividad sobre papel filtro (APF) de las exoglucanasas producidas por las cepas seleccionadas en tres diferentes sustratos como fuentes de carbono (algodón, celulosa y papel filtro).

Para esto se prepararon suspensiones homogéneas de esporas en agua destilada de cada una de las cepas seleccionadas. Se inocularon 2 ml de las suspensiones en frascos conteniendo 50 ml de medio Czapeck pH 5,5 complementado con algodón (1%), celulosa (1%) o papel filtro (0,5%) como única fuente de carbono (un sustrato diferente por frasco). Cabe señalar que cada cepa se trabajó en los tres sustratos, y que este ensayo se realizó por triplicado para cada cepa.

Se incubaron los frascos inoculados durante 20 días a temperatura ambiente. Concluido el período de incubación se midió el pH de los cultivos y luego se procedió a filtrarlos y centrifugarlos a 5 000 rpm durante 15 minutos. Se determinó la actividad de exoglucanasas por su actividad sobre papel filtro (APF), mediante la cuantificación de azúcares reductores (item 6.2).

8. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EXOGLUCANASAS.

Se evaluó la producción de exoglucanasas de las cepas seleccionadas durante un período de 24 días (cada cepa se trabajó por triplicado), mediante la determinación del pH, biomasa, actividad de exoglucanasas y proteínas solubles. Para esto se preparó inicialmente soluciones homogéneas de esporas en agua destilada de las cepas seleccionadas. Se inocularon 2 ml de las suspensiones en frascos con 150 ml de medio Czapeck pH 5,5 y frascos con 150 ml de medio Mandels modificado pH 5,5, ambos medios con papel filtro (0,5 %) como única fuente de carbono. Cada cepa se trabajó por triplicado en los dos medios. Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente. Cada 4 días se tomaron muestras para determinar: pH, biomasa, actividad de exoglucanasas y proteínas solubles.

8.1. Determinación de la biomasa: La biomasa se obtuvo por diferencia de pesos entre los depósitos con micelio sedimentado y secado a 80°C por 24 horas y los depósitos solos secados a 100° C por 2 horas. Se expresó la biomasa en mg de micelio/ml.

8.2. Actividad de exoglucanasas: Se determinó por su actividad sobre papel filtro (item 6.2).

8.3. Determinación de proteínas solubles: Se realizó por el método de Lowry (Lowry et al. 1951):

- A 1 ml de la muestra problema (sobrenadante del cultivo filtrado y centrifugado o solución de seroalbúmina bovina para el caso de la curva estándar) se le agregó 2,5 ml del reactivo alcalino de Lowry, manteniendo la reacción en reposo por 10 minutos a temperatura ambiente.

- Se añadió 0,5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu diluído (1:2), se dejó en reposo durante 30 minutos y se efectuó la lectura de la densidad óptica a 750 nm .

Se realizó una curva estándar con seroalbúmina bovina fracción V en concentraciones determinadas: 25, 50, 75 y 100 ug/ml.

Las proteínas solubles fueron expresadas en mg/ml.

IV. RESULTADOS

1. EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA

Del total de 45 cepas provenientes de Huaylas se logró reactivar 29 cepas (64,5%) entre 3 y 6 días, y 6 cepas (13,3%) entre 7 y 12 días; obteniéndose en total 35 cepas (77,8%) reactivadas (CR), mientras que las restantes 10 cepas (22,2%) no desarrollaron en el medio de cultivo por lo que se consideran cepas no reactivadas (CNR).(Tabla N° 1)

De las CR (77,8%) se obtuvo porcentajes próximos de CR celulolíticas y CR no celulolíticas, específicamente 18 cepas (40%) en el primer caso y 17 cepas (37,8%) en el segundo, variando el tiempo de desarrollo en los sustratos celulósicos entre los 3 días, en la mayor parte de las CR celulolíticas (28,9%), y los 10 días en un solo caso.(Tabla N° 2)

En lo que respecta a la provincia Huaraz (Tabla N° 1) tenemos que de las 60 cepas se logró reactivar 53 cepas (88,4%) entre 2 y 5 días, y 6 cepas (9,9%) entre 7 y 8 días, totalizando 59 CR (98,3%). Sin embargo, 34 cepas (56,6%) resultaron no celulolíticas y 25 (41,7%) resultaron celulolíticas, necesitando la mayoría de ellas entre 2 y 5 días para desarrollar en los sustratos celulósicos y hasta 10 días en un caso (Tabla N° 2). No se logró reactivar 1 cepa (CNR).

2. AISLAMIENTO DE NUEVAS CEPAS CELULOLÍTICAS.

Se logró aislar 8 cepas celulolíticas de la muestra N° 1 y 2 cepas celulolíticas de la muestra N° 2. Estas cepas fueron codificadas según el orden de aislamiento.

En la muestra N° 1 se obtuvo 16 formas de crecimiento; sólo en el papel filtro hubo crecimiento constante en todos los ensayos, observándose en total 6 formas de crecimiento (37.5%), las que fueron confirmadas como celulolíticas en la placa con papel filtro y algodón, correspondiendo a 6 (75%) de las 8 cepas aisladas en esta muestra. En aserrín se registró similar desarrollo con 5 formas de crecimiento (31,2%), pero a diferencia del anterior sustrato, estas cepas no fueron confirmadas como celulolíticas. El algodón y la viruta fueron los sustratos en los que hubo menos crecimiento con 3 (18,8%) y 2 (12,5%) formas de desarrollo respectivamente, con la diferencia de que 2 de las cepas que crecieron en algodón se confirmaron como celulolíticas correspondiendo a las restantes 2 cepas aisladas de esta muestra. (Figura N° 2 A)

El 50% del crecimiento fúngico obtenido de esta muestra resultó confirmado como celulolítico.

En lo que respecta a la muestra N° 2 se registraron 15 formas de crecimiento fúngico, la mayoría en los 4 ensayos correspondientes a los sustratos: aserrín, papel filtro y viruta, con 4 (26,7%), 5 (33,3%) y 5 (33,3%) formas de desarrollo respectivamente, de las que sólo una procedente del cultivo en papel filtro fue confirmada como celulolítica en placa. En el sustrato algodón sólo hubo una forma de crecimiento la que también se confirmó como celulolítica.(Figura N° 2 B)

En esta muestra sólo el 13,4% del crecimiento fúngico obtenido se confirmó como celulolítico.

3. IDENTIFICACIÓN GENÉRICA DE CEPAS CELULOLÍTICAS.

Los resultados porcentuales son dados en referencia al número de cepas celulolíticas de cada provincia, esto es 28 cepas de Huaylas (18 reactivadas y 10 aisladas) y 25 cepas de Huaraz.

En la provincia Huaylas tenemos 12 cepas (42,9%) del género *Penicillium*, 9 cepas (32,1%) del género *Aspergillus*, 4 cepas (14,3%) del género *Cladosporium*, y 3 cepas (10,7%) del género *Fusarium*.(Figura N° 3)

En la provincia Huaraz tenemos 13 cepas (52%) del género *Fusarium*, 7 cepas (28%) del género *Penicillium*, 3 cepas (12%) del género *Chrysosporium*, 1 cepa (4%) del género *Aspergillus*, y 1 cepa (4%) del género *Nigrospora*.(Figura N° 3)

4. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD DE EXOGLUCANASAS.

De las 28 cepas celulolíticas de la provincia Huaylas y de las 25 cepas de la provincia Huaraz fueron procesadas 22 y 23 cepas respectivamente.

4.1. Degradación del papel filtro: De las cepas celulolíticas de Huaylas, 4 cepas (18,1%) ocasionaron una degradación entre regular y buena y 18 cepas (81,9%) no ocasionaron una degradación observable. (Tabla N° 3)

De las cepas celulolíticas de Huaraz, 3 cepas (13,1%) ocasionaron una muy buena degradación del papel filtro, 15 cepas (65,2%) ocasionaron entre regular y buena degradación y 5 cepas (21,7%) no ocasionaron una degradación observable, predominando las cepas con regular crecimiento.(Tabla N° 3)

4.2. Evaluación de la pérdida de peso: De las cepas procesadas de la provincia Huaylas, 8 cepas (36,4%) ocasionaron entre 2% y 3% de

pérdida de peso en el sustrato y 14 cepas (63,6%) ocasionaron menos de 2% de pérdida.(Tabla N° 3)

De las cepas procesadas de la provincia Huaraz, el porcentaje de pérdida de peso ocasionado en el sustrato estuvo entre 2% y 5% en 17 cepas (73,9%) y menor de 2% en 6 cepas (26,1%).(Tabla N° 3)

4.3. Preselección: Se preseleccionaron las cepas que ocasionaron entre Buena y Muy Buena degradación del papel filtro y/o entre 2% y 5% de pérdida de peso, resultando 8 cepas de la provincia Huaylas y 17 cepas de Huaraz.

5. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DE EXOGLUCANASAS.

5.1. Actividad sobre papel filtro (APF): Las cepas de la provincia Huaylas mostraron actividades enzimáticas de exoglucanasas entre 0.014 UI/ml y 0.073 UI/ml, correspondiendo esta última a la cepa HY025 (*Aspergillus* sp.), mientras que en la provincia Huaraz, las actividades variaron entre 0,016 UI/ml y 0,137 UI/ml la más alta que correspondió a la cepa HU 218 D (*Fusarium* sp.). (Tabla N° 4)

5.2. Selección: Se seleccionaron las cepas con actividades enzimáticas mayores a 0,1 UI/ml, resultando seleccionadas 3 cepas provenientes de la provincia Huaraz: 216 C (*Chrysosporium* sp.), 218 D (*Fusarium* sp.), 251 A (*Fusarium* sp.). (Tabla N° 4)

6. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA PRODUCCIÓN DE EXOGLUCANASAS EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

Al determinar la actividad sobre papel filtro (APF) de las exoglucanasas producidas en medio con celulosa, no se obtuvo actividad enzimática significativa, contrario a lo que se obtuvo con las exoglucanasas producidas en medio con algodón o papel filtro, con las que se obtuvo actividades máximas

de 0,095 UI/ml y 0,108 UI/ml respectivamente, correspondiendo ambas a la cepa HU 216 C (*Chrysosporium* sp.). (Tabla N° 5)

7. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EXOGLUCANASAS.

De las exoglucanasas producidas en medio Czapeck (Tabla N° 6), la cepa HU 216 C registró la mayor APF: 0,126 UI/ml, correspondiendo a la actividad máxima alcanzada en el menor tiempo, esto es a los 16 días de incubación (Figura N° 6). La cepa HU 251 A, fue la que más demoró en alcanzar su máxima actividad, correspondiendo a 0,109 UI/ml en 24 días de incubación. (Figura N° 10)

En medio Mandels (Tabla N° 7) las APF obtenidas fueron mayores; la cepa HU 216 C produjo un máximo de 0,176 UI/ml a los 20 días de incubación (Figura N° 6), mientras que la cepa HU 218 D demoró hasta el día 24 para alcanzar su máxima actividad que fue de 0,144 UI/ml (Figura N° 8). La actividad de la cepa HU 251 A fue de 0,124 UI/ml a los 20 días de incubación. (Figura N° 10)

Las proteínas solubles producidas en medio Czapeck y Mandels variaron en forma general de manera directa con las actividades enzimáticas, obteniéndose un máximo de 0,414 mg/ml de la cepa HU 216 C en medio Czapeck a los 24 días de cultivo, y 0,465 mg/ml de la misma cepa en medio Mandels a los 16 días de cultivo. (Figuras N° 7 A y N° 7 B)

Los valores de biomasa en ambos medios aumentaron en los períodos iniciales hasta aproximadamente los 12 días de cultivo, manteniéndose estables en términos generales hasta los 20 días aprox. para luego descender ligeramente hacia el final de la incubación.

El pH en los cultivos con medio Czapeck, fue ascendiendo alcanzando el valor máximo de 6,5 en el cultivo de la cepa HU 218 D a los 24 días; hacia el

final de la incubación el pH descendió hasta un valor mínimo de 4,9 en el cultivo de la cepa HU 216 C (Figura N° 7 A). En los cultivos con medio Mandels de las cepas HU 218 D y HU 251 A, los valores de pH descendieron en la primera etapa para luego aumentar, mientras que en el cultivo de la cepa HU 216 C, el pH se incrementó para luego mantenerse estable. (Figura N° 7 B)

TABLAS

TABLA N° 1 : Número de cepas fúngicas según el tiempo de reactivación en APD.(*)

PROVINCIA	TIEMPO DE REACTIVACIÓN(**)								TOTAL CR	TOTAL CNR	TOTAL CEPAS
	2	3	4	5	6	7	8	12			
HUAYLAS	–	7	6	7	9	1	3	2	35	10	45
	–	(15,5%)	(13,4%)	(15,5%)	(20%)	(2,2%)	(6,7%)	(4,5%)	(77,8%)	(22,2%)	(100%)
HUARAZ	10	22	6	15	–	2	4	–	59	1	60
	(16,7%)	(36,7%)	(10%)	(25%)	–	(3,3%)	(6,6%)	–	(98,8%)	(1,7%)	(100%)

(*) = Agar papa dextrosa pH 5,5. Incubación a temperatura ambiente.

(**) = Tiempo en días.

CR = Cepas reactivadas.

CNR = Cepas no reactivadas.

TABLA N° 2 : Número de cepas fungicas según el tiempo de desarrollo en sustratos celulósicos.(*)

PROVINCIA	TIEMPO DE DESARROLLO (**)						CR	CR NO	TOTAL
	2	3	4	5	8	10	CELULOLIT.	CELULOLIT.	CR
HUAYLAS	–	13	1	1	2	1	18	17	35
	–	(28,9 %)	(2,2 %)	(2,2 %)	(4,5 %)	(2,2 %)	(40 %)	(37,8 %)	(77,8 %)
HUARAZ	3	13	5	3	–	1	25	34	59
	(5 %)	(21,7 %)	(8,3 %)	(5 %)	–	(1,7 %)	(41,7 %)	(56,6 %)	(98,3 %)

(*) = Papel filtro y algodón en medio mínimo de sales minerales Czapeck pH 5,5. Incubación a temperatura ambiente.

(**) = Tiempo en días.

CR = Cepas reactivadas.

TABLA N° 3 : Número de cepas de las provincias Huaylas y Huaraz según condición de reactivación.

PROVINCIA	CARACTERÍSTICA	IR	IIR	INCUBACIÓN(*)	TOTAL
HUAYLAS	CR CELULOLÍTICAS	12 (26,6 %)	3 (6,7 %)	3 (6,7 %)	18 (40 %)
	CR NO CELULOLÍTICAS	14 (31,1 %)	3 (6,7 %)	- -	17 (37,8 %)
	TOTAL CR	26 (57,7 %)	6 (13,4 %)	3 (6,7 %)	35 (77,8 %)
HUARAZ	CR CELULOLÍTICAS	23 (38,4 %)	2 (3,3 %)	- -	25 (41,7 %)
	CR NO CELULOLÍTICAS	33 (54,9 %)	- -	1 (1,7 %)	34 (56,6 %)
	TOTAL CR	56 (93,3 %)	2 (3,3 %)	1 (1,7 %)	59 (98,3 %)

CR = Cepa reactivada.

IR = CR en la primera resiembra a partir del cepario original.

IIR = CR en la segunda resiembra a partir del cepario original.

(*) = CR a partir de suspensión de la cepa original en medio mínimo de sales minerales Czapeck pH 5,5 incubada a 30°C durante 24 horas.

TABLA N° 3 : Número de cepas fúngicas en la evaluación cualitativa de la actividad de exoglucanasas según los criterios de selección preliminar .(*)

PROVINCIA	CRECIMIENTO MICELIAL			DEGRADACION DEL P.F.				PÉRDIDA DE PESO (%)				
	A	R	E	MB	B	R	E	<1	<2	<3	<4	<5
HUAYLAS	5 (22,7%)	8 (36,4%)	9 (40,9%)	– –	1 (4,6%)	3 (13,6%)	18 (81,8%)	4 (18,2%)	10 (45,4%)	8 (36,4%)	–	–
HUARAZ	2 (8,7%)	14 (60,9%)	7 (30,4%)	3 (13,1%)	5 (21,7%)	10 (43,5%)	5 (21,7%)	4 (17,4%)	2 (8,7%)	14 (60,9%)	2 (8,7%)	1 (4,3%)

(*) = Ver secciones 5.1 – 5.2

A = Abundante.

R = Regular.

E = Escazo(a).

MB = Muy buena.

B = Buena.

TABLA N° 4 : Actividades enzimáticas(A.E.) de exoglucanasas(*) producidas por las cepas preseleccionadas en medio con papel filtro como fuente de carbono.

N° CEPA	CÓDIGO	GÉNERO	A.E. (UI/ml)
21	HY 025	<i>Aspergillus</i> sp.	0,073
25	HY 029	<i>Cladosporium</i> sp.	0,028
31	HY040	<i>Fusarium</i> sp.	0,052
34	HY 060	<i>Penicillium</i> sp.	0,026
35	HY 061	<i>Penicillium</i> sp.	0,027
38	HY 064	<i>Penicillium</i> sp.	0,016
43	HY 078 A	<i>Aspergillus</i> sp.	0,014
44	HY 078 B	<i>Fusarium</i> sp.	0,016
4	HU 201 C	<i>Nigrospora</i> sp.	0,049
11	HU 208 A	<i>Penicillium</i> sp.	0,051
14	HU 211 B	<i>Fusarium</i> sp.	0,053
16	HU 212 A	<i>Fusarium</i> sp.	0,056
17	HU 212 B	<i>Chrysosporium</i> sp.	0,047
20	HU 213 A	<i>Fusarium</i> sp.	0,052
32	HU 215 B	<i>Fusarium</i> sp.	0,087
35	HU 216 B	<i>Fusarium</i> sp.	0,014
36	HU 216 C	<i>Chrysosporium</i> sp.	0,120
37	HU 217 A	<i>Penicillium</i> sp.	0,016
38	HU 217 B	<i>Fusarium</i> sp.	0,020
42	HU 218 A	<i>Fusarium</i> sp.	0,080
45	HU 218 D	<i>Fusarium</i> sp.	0,137
46	HU 218 E	<i>Fusarium</i> sp.	0,094
51	HU 251 A	<i>Fusarium</i> sp.	0,112
52	HU 251 B	<i>Fusarium</i> sp.	0,023
60	HU 257	<i>Fusarium</i> sp.	0,035

(*) Actividad sobre papel filtro de los sobrenadantes de los cultivos de las cepas de la selección preliminar, luego de 20 días de incubación a 30°C, en condiciones estáticas. Las actividades enzimáticas están expresadas en Unidades Internacionales por mililitro (UI/ml).

■ Cepas seleccionadas.

TABLA N° 5 : Actividades enzimáticas(A.E.) de exoglucanasas(*) producidas por las cepas seleccionadas en medios con diferente fuente de carbono.

FUENTE DE CARBONO	HU 216 C		HU 218 D		HU 251 A.	
	<i>Chrysosporium</i> sp. A.E.	pH.	<i>Fusarium</i> sp. A.E.	pH.	<i>Fusarium</i> sp. A.E.	p.H.
CELULOSA	0,003	5,9	0,007	6,1	0,006	5,9
ALGODÓN	0,095	6,2	0,082	6,2	0,093	6,0
P. FILTRO	0,108	5,9	0,097	6,0	0,080	6,1

(*) Actividad sobre papel filtro de los sobrenadantes de cultivos de las cepas seleccionadas, incubados durante 20 días a temperatura ambiente en condiciones estáticas. Las actividades están expresadas en Unidades Internacionales/ml.

TABLA N° 6 : Actividades enzimáticas sobre papel filtro (UI/ml), proteínas solubles (mg/ml), biomasa (mg/ml) y pH en cultivos en medio mínimo de sales minerales Czapeck de las cepas seleccionadas.(*)

TIEMPO (Días)	HU 216 C <i>Chrysosporium</i> sp.				HU 218 D <i>Fusarium</i> sp.				HU 251 A <i>Fusarium</i> sp.			
	A.E.	Prot.	Biom.	pH	A.E.	Prot.	Biom.	pH	A.E.	Prot.	Biom.	pH
4	-	-	5,1	5,7	-	-	5,7	5,6	-	-	5,2	5,57
8	0,018	0,074	5,8	5,95	0,004	0,024	6,7	5,8	-	-	6,2	5,77
12	0,053	0,189	7,5	5,95	0,018	0,112	6,3	5,97	0,011	0,109	6,0	5,97
16	0,126	0,363	7,6	5,9	0,081	0,340	6,3	6,0	0,066	0,082	7,8	5,77
20	0,087	0,320	7,4	5,5	0,115	0,390	6,6	6,27	0,092	0,276	7,6	6,1
24	0,090	0,414	6,8	4,9	0,099	0,368	5,3	6,5	0,109	0,304	7,4	5,87

(*). Cultivos en medio Czapeck con papel filtro como fuente de carbono, pH inicial 5,5 e incubados a temperatura ambiente en condiciones estáticas.

TABLA N° 7 : Actividades enzimáticas sobre papel filtro (UI/ml), proteínas solubles (mg/ml), biomasa (mg/ml) y pH en cultivos en medio Mandels de las cepas seleccionadas.(*)

TIEMPO (Días)	HU 216 C <i>Chrysosporium</i> sp.				HU 218 D <i>Fusarium</i> sp.				HU 251 A <i>Fusarium</i> sp.			
	A.E.	Prot.	Biom.	pH	A.E.	Prot.	Biom.	pH	A.E.	Prot.	Biom.	pH
4	-	-	5,4	5,65	-	-	6,1	5,5	-	-	7,2	5,3
8	0,003	0,162	4,9	5,85	0,009	0,094	6,9	5,25	0,006	0,069	7,0	5,25
12	0,026	0,246	6,3	6,0	0,052	0,166	7,8	5,5	0,017	0,131	7,6	5,2
16	0,091	0,465	8,5	5,8	0,037	0,201	8,9	4,9	0,085	0,222	7,8	4,45
20	0,176	0,329	8,4	6,0	0,106	0,347	8,8	4,95	0,124	0,273	9,6	4,25
24	0,169	0,386	6,1	5,9	0,144	0,398	8,9	5,15	0,123	0,358	9,2	5,1

(*) Cultivos en medio base de Mandels modificando la fuente de carbono por papel filtro, con pH inicial de 5,5 e incubados a temperatura ambiente en condiciones estáticas.

FIGURAS

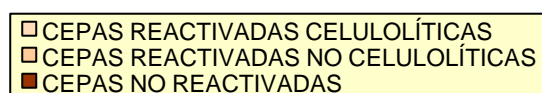
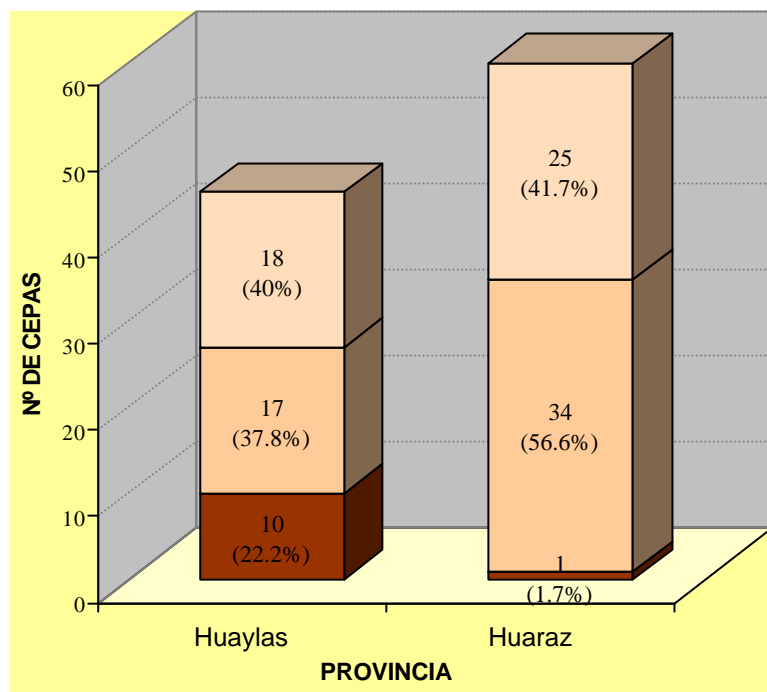
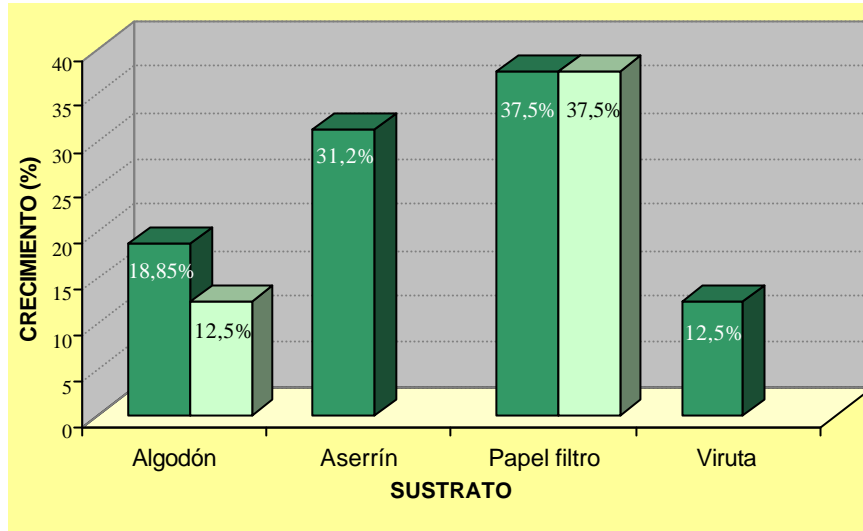


FIG. N° 1. Número de cepas fúngicas de las provincias Huaylas y Huaraz según reactivación* y capacidad celulolítica**.

* Reactivación en APD en un período máximo de incubación de 15 días.

** Verificada por desarrollo de la cepa en sustratos celulósicos.

A)



B)

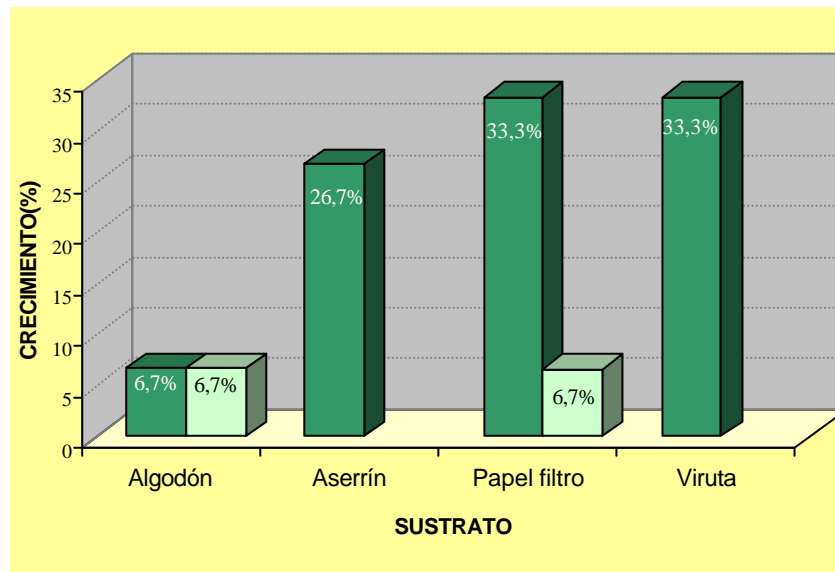


FIG. N° 2. Crecimiento micelial* y celulolítico** obtenido a partir de : A) Muestra N°1 y B) Muestra N°2.

* registrado durante la incubación de las muestras en medio Czapeck durante un período máximo de 15 días a temperatura ambiente.

** registrado durante la incubación en sustratos celulósicos del micelio obtenido de las muestras.

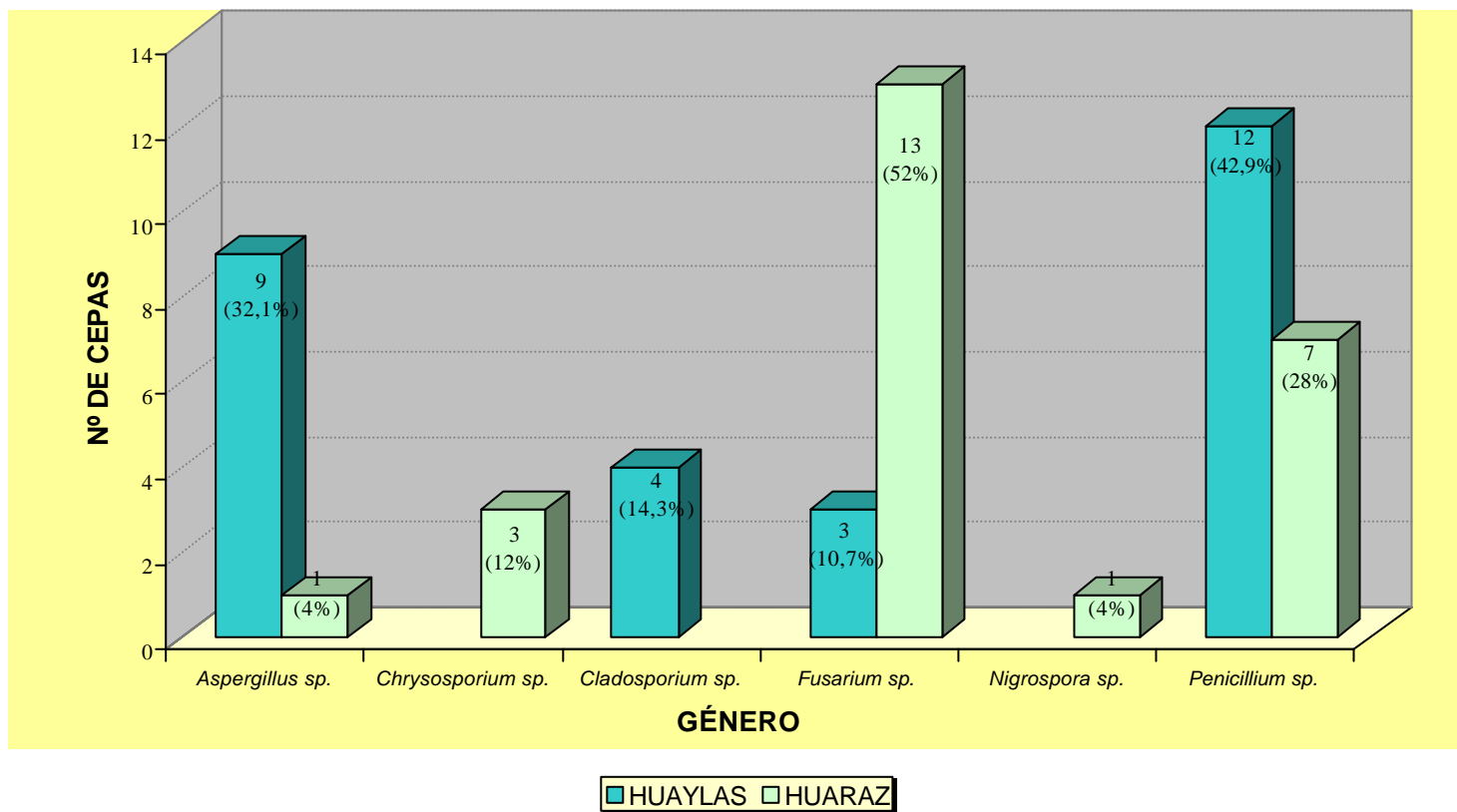


FIG. N° 3. Número y porcentajes de cepas celulolíticas de las provincias Huaylas y Huaraz según identificación genérica.

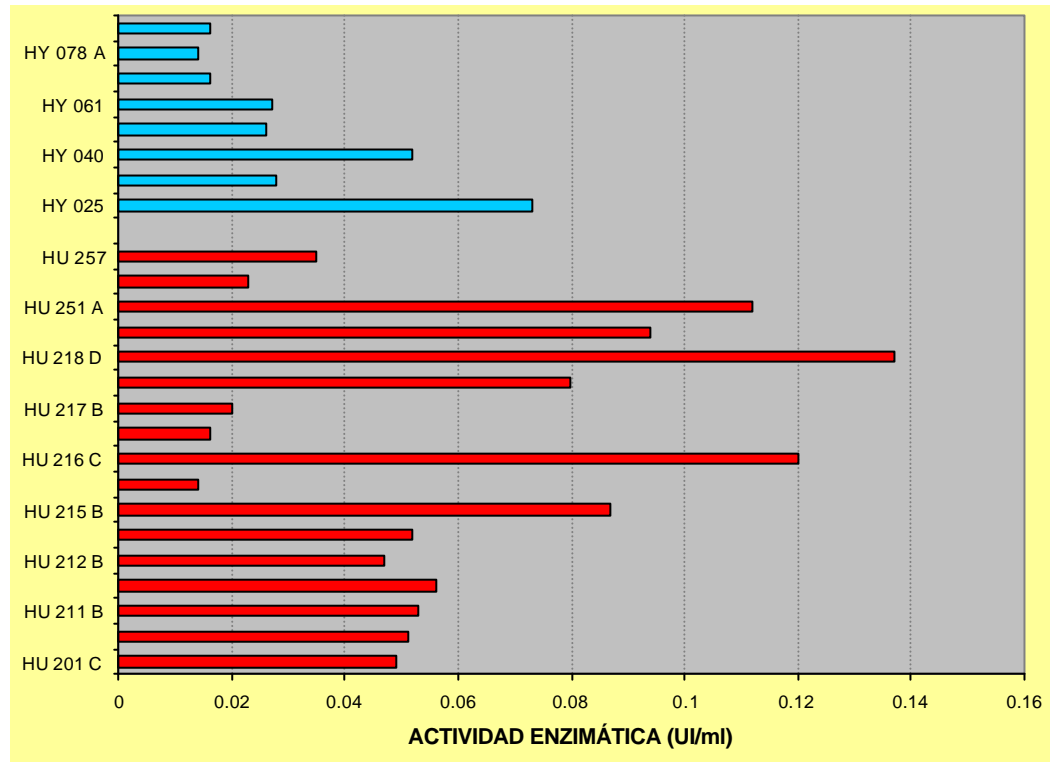


FIG. N° 4 Actividades enzimáticas de exoglucanasas* producidas por las cepas fúngicas seleccionadas preliminarmente.

* Actividad sobre papel filtro (APF) de los sobrenadantes de los cultivos en medio Czapeck incubados durante 20 días a 30°C en condiciones estáticas.

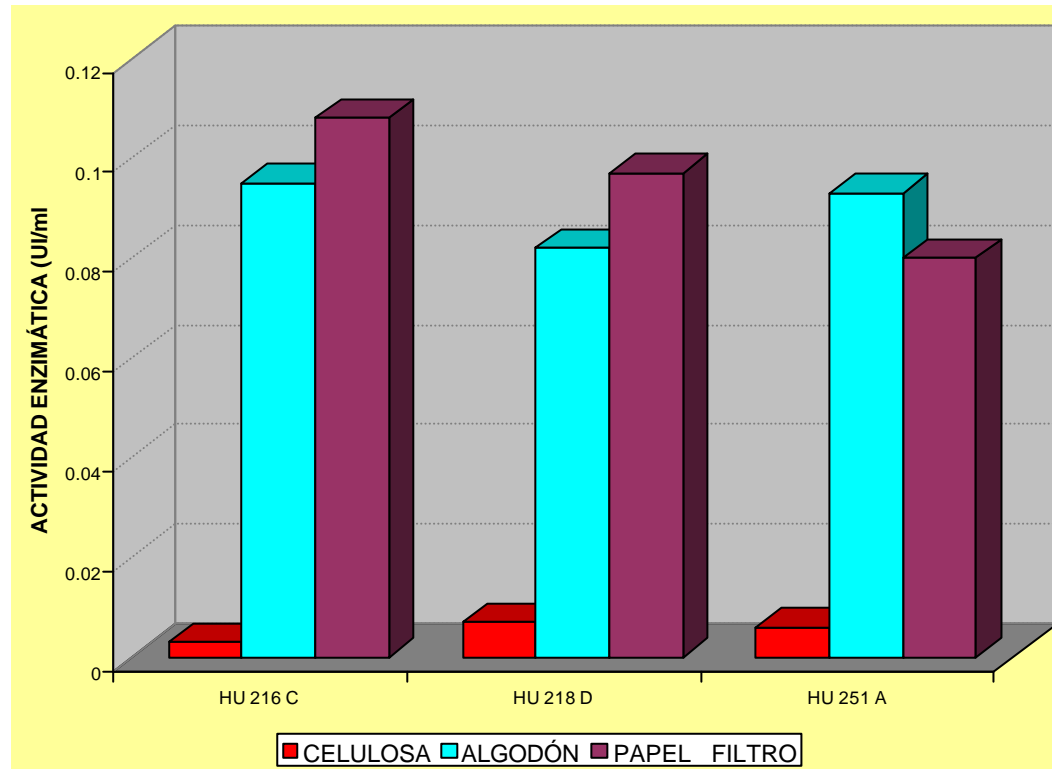


FIG. N° 5. Actividades enzimáticas de exoglucanasas* producidas por las cepas fúngicas seleccionadas, en cultivos con diferentes fuentes de carbono.

* Actividad sobre papel filtro de los sobrenadantes de los cultivos en medio Czapeck luego de 20 días de incubación a temperatura ambiente en condiciones estáticas.

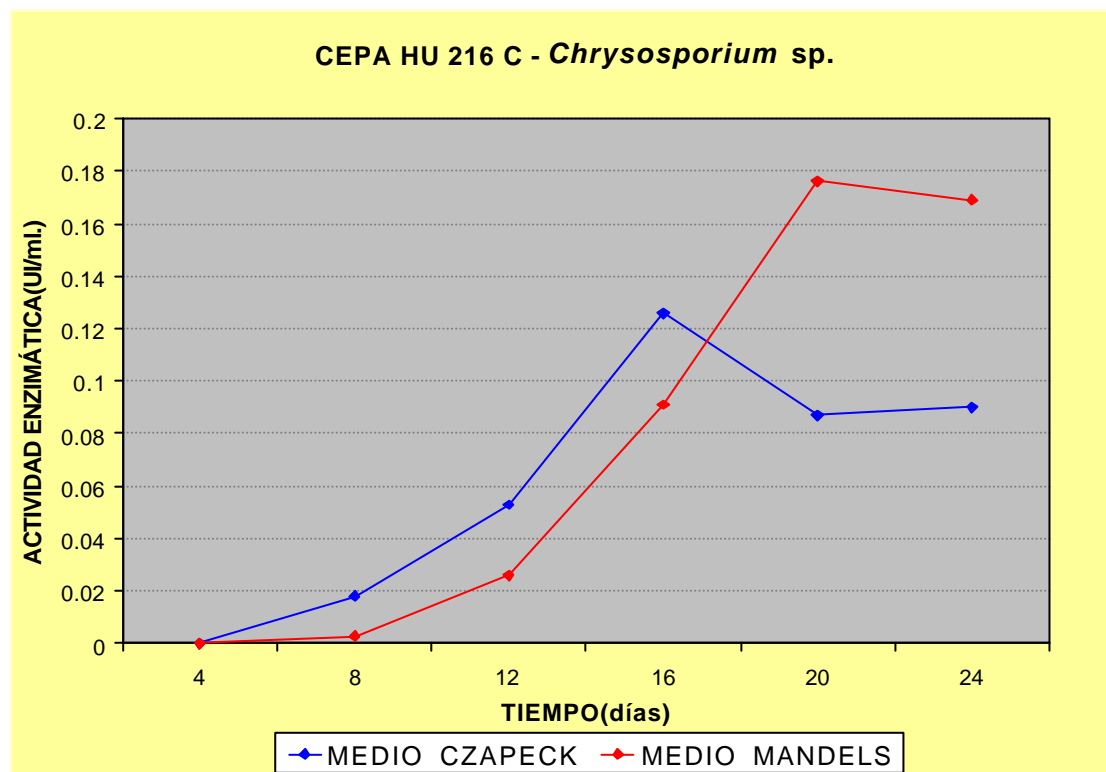
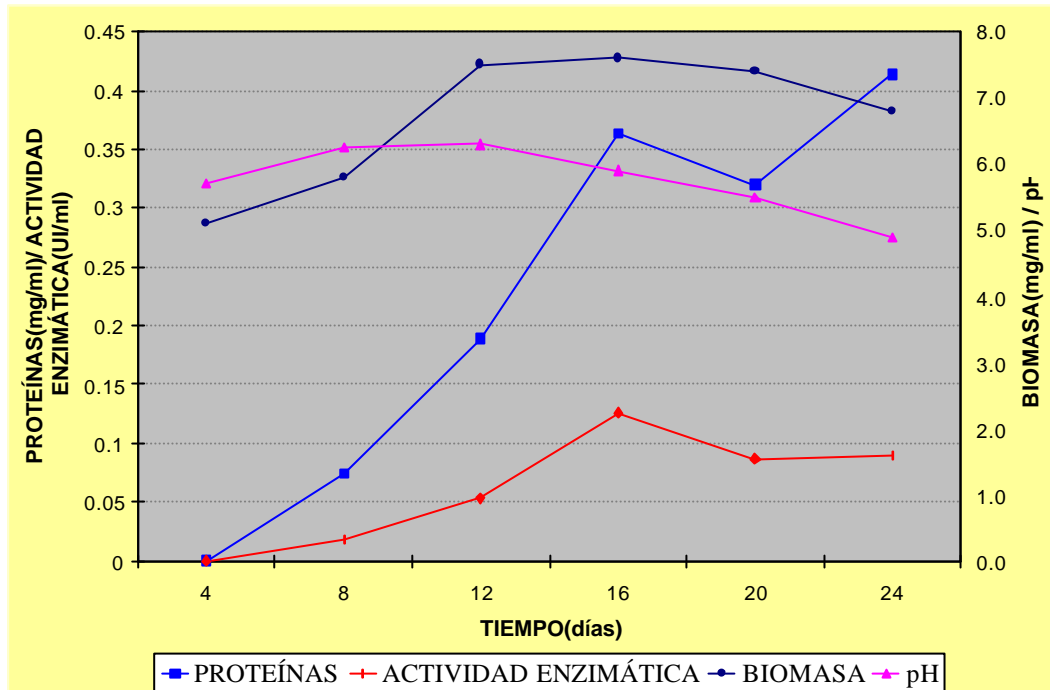


FIG. N° 6. Producción enzimática de exoglucanasas de la cepa HU 216 C – *Chrysosporium* sp., en cultivos en medios Czapeck y Mandels con papel filtro como fuente de carbono, incubados a temperatura ambiente en condiciones estáticas

A)



B)

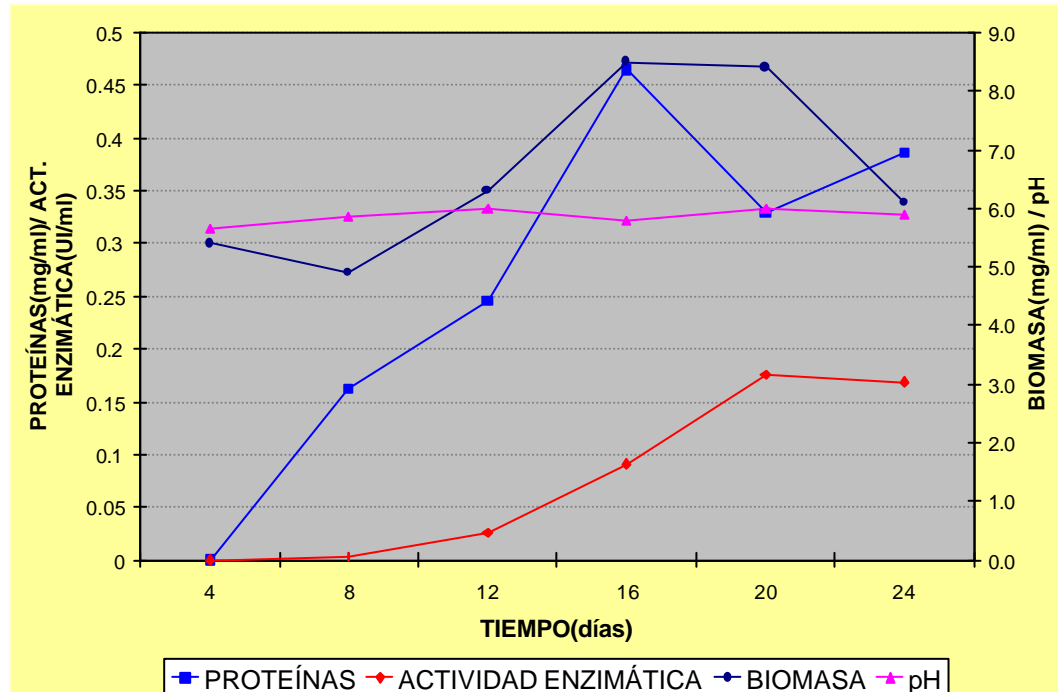


FIG. N° 7. Determinación de las proteínas solubles, biomasa y pH durante la evaluación de la producción de exoglucanasas de la cepa HU 216 C – *Chrysosporium* sp. en los cultivos en medios: A) Czapeck y B) Mandels.

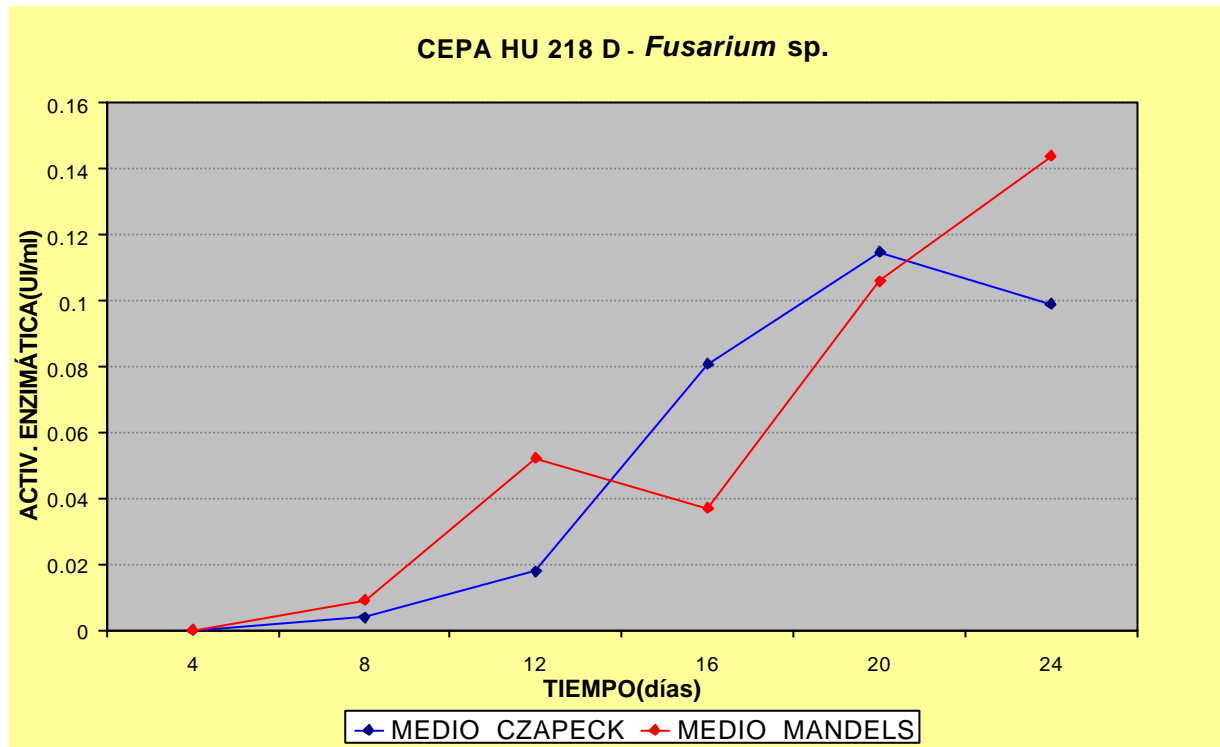


FIG. N° 8. Producción enzimática de exoglucanasas de la cepa HU 218D - *Fusarium* sp. en cultivos en medios Czapeck y Mandels con papel filtro como fuente de carbono, incubados a temperatura ambiente en condiciones estáticas.

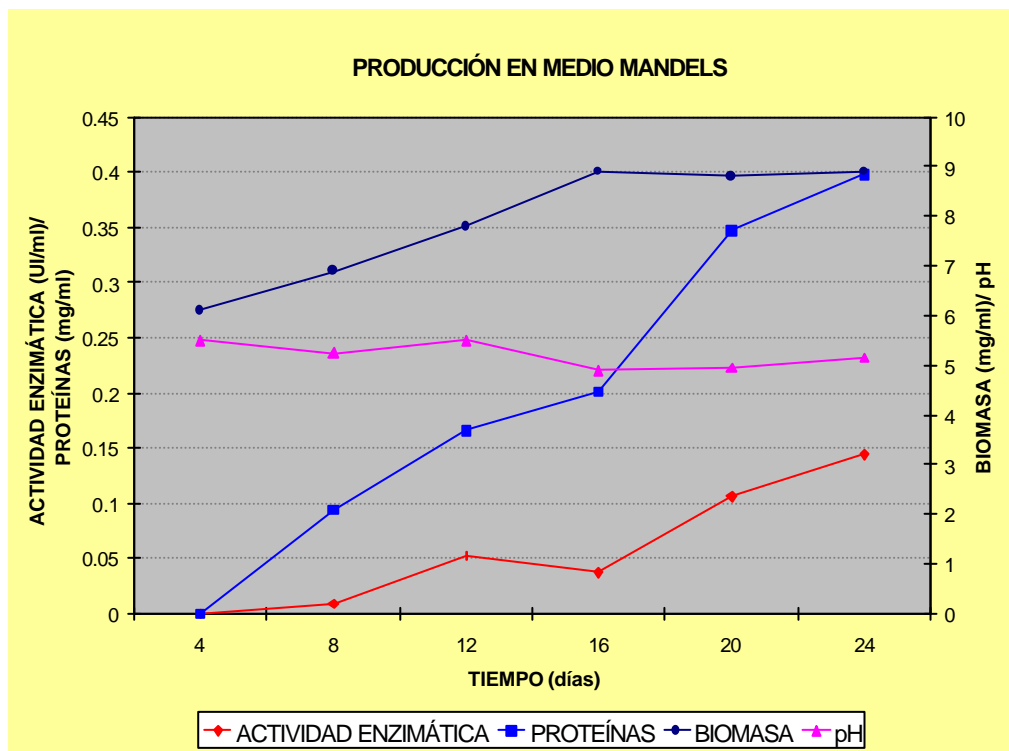
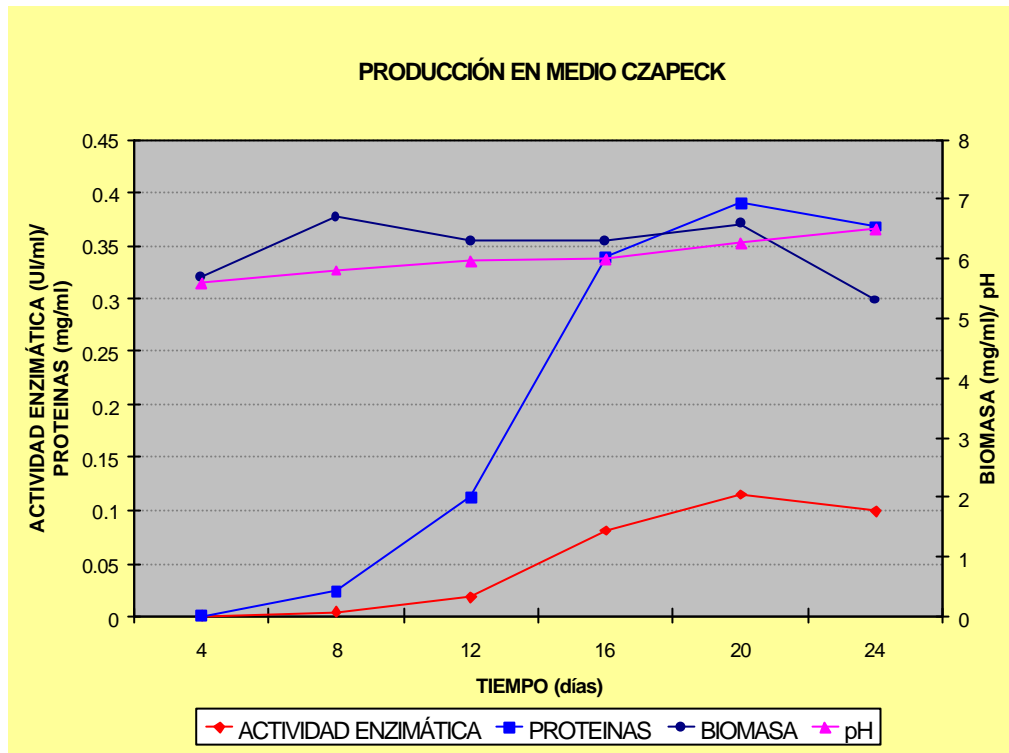


FIG. N° 9. Niveles de proteínas solubles, actividad enzimática, biomasa y pH durante la producción de exoglucanasas de la cepa HU 218 D - *Fusarium* sp. en cultivos en medios Czapeck y Mandels, con papel filtro como fuente de carbono.

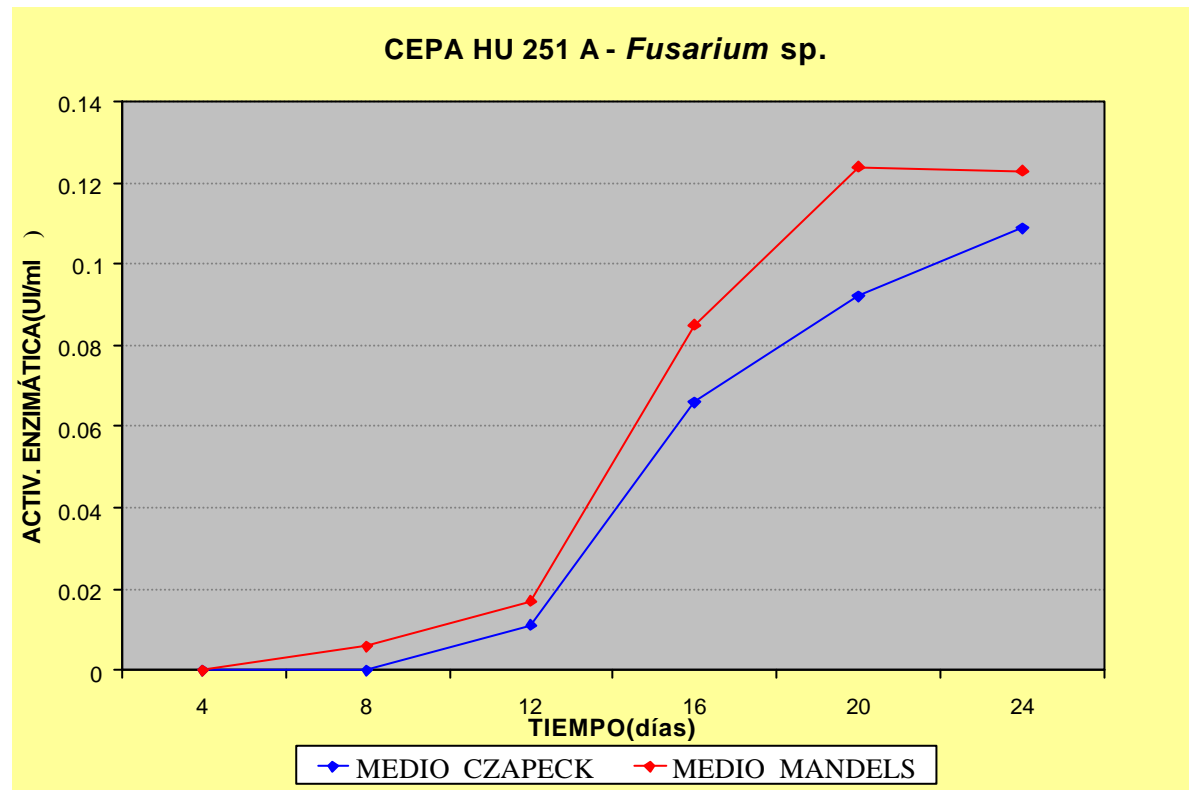


FIG. N° 10 . Producción enzimática de exoglucanasas de la cepa HU 251 A - *Fusarium* sp. en cultivos en medios Czapeck y Mandels con papel filtro como fuente de carbono, incubados a temperatura ambiente en condiciones estáticas.

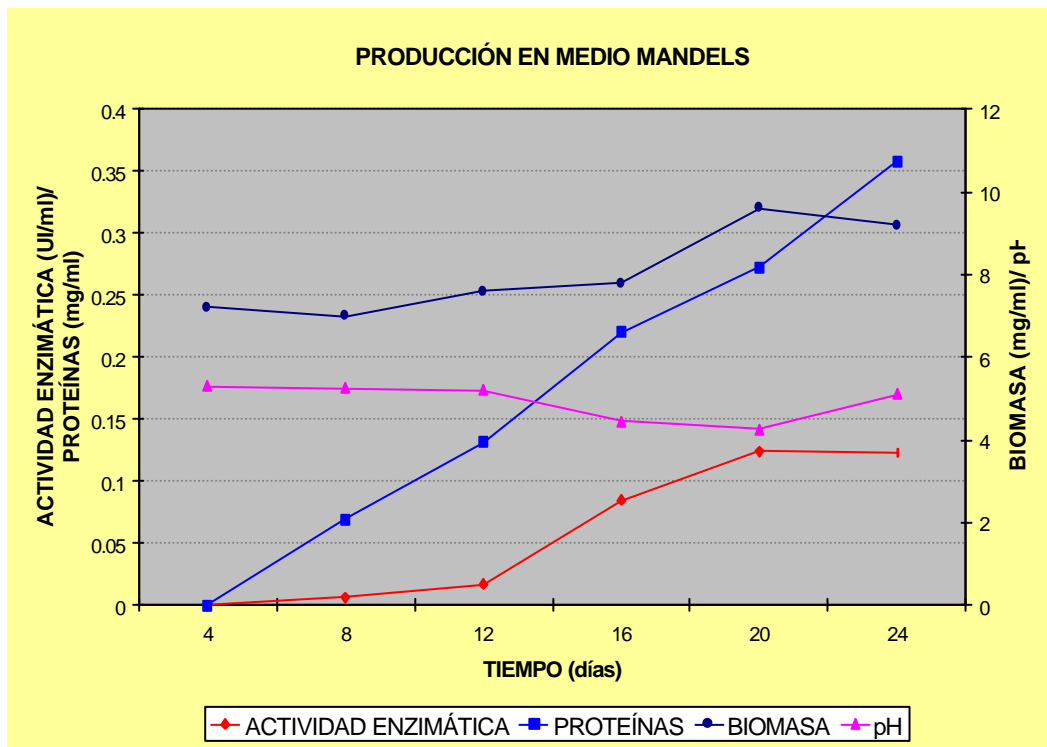
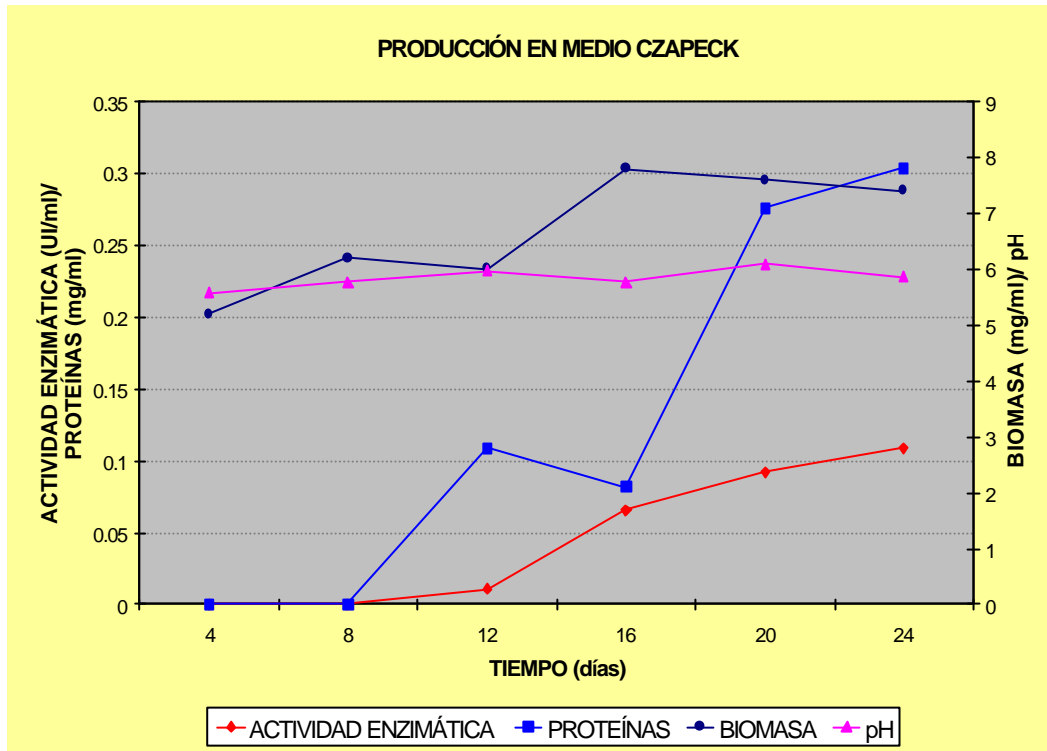


FIG. N° 11. Niveles de proteínas solubles, actividad enzimática, biomasa y pH durante la producción de exoglucanasas de la cepa HU 251 A - *Fusarium* sp. en cultivos en medios Czapeck y Mandels, con papel filtro como fuente de carbono.

V. DISCUSIÓN

1. EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA CAPACIDAD CELULOLÍTICA.

Es conocido que el almacenamiento en condiciones adecuadas y subcultivos periódicos de una cepa, son factores determinantes en la conservación de las características de éstas. En lo referente a cepas celulolíticas generalmente se mantienen en APD inclinado tal como lo señalan Ali et al. (1991) y Okeke & Paterson (1992), u otro agar como el indicado por Illanes & Rossi (1980) que mantuvieron una cepa de *Trichoderma reesei* en agar glucosa, peptona y sales complementarias; la temperatura de mantenimiento generalmente es a 4°C, con reactivaciones periódicas cada 2 meses.

En contraste con estas condiciones, las cepas celulolíticas correspondiente a las provincias Huaylas y Huaraz que conformaban el material biológico a ser evaluado, fueron mantenidas en APD inclinado a temperatura ambiente y sin ser subcultivadas, por lo que un breve análisis de los resultados de su reactivación, previa a la evaluación de su capacidad celulolítica, podría servir como orientación en casos similares.

En ambas provincias se logró altos porcentajes de reactivación (Tabla N° 1): 35 cepas (77.8%) y 59 cepas (98.3%), para Huaylas y Huaraz respectivamente, aunque considerando en algunos casos períodos de hasta 12 días de incubación. En general 20 cepas (44.4%) de Huaylas se reactivaron dentro de los 5 días de incubación y 15 cepas (33.4%) necesitaron de 6-12 días. La mayor parte de las cepas de Huaraz, esto es 53 cepas (88.4%), se reactivaron dentro de los 5 días. Entre los géneros que se reactivaron más

rápidamente están *Chrysosporium* sp. y *Fusarium* sp. (2 - 3 días), mientras que los *Penicillium* sp. se demoraron un poco más (5 - 8 días).

Ahora, si bien se logró altos porcentajes de reactivación, no ocurrió esto al evaluar la capacidad celulolítica de las cepas en sustratos celulósicos. Sólo 18 (40%) y 25 (41.7%) de las cepas de Huaylas y Huaraz respectivamente resultaron conservarse como celulolíticas (Fig. N° 1), es decir que casi la mitad o más “perdieron” esta capacidad, aunque probablemente esto deba entenderse más como una inactivación en el mecanismo de producción debido a las condiciones de almacenamiento, por lo que probablemente su capacidad celulolítica podría reactivarse en medios más suplementados y con fuentes de carbono que induzcan su biosíntesis.

La mayor parte de las cepas celulolíticas: 15 (33.3%) en Huaylas y 24 (40%) en Huaraz, desarrollaron en los sustratos celulósicos dentro de los 5 días (Tabla N° 2), encontrándose entre ellas las cepas que fueron posteriormente preseleccionadas. Hubo cepas que demoraron mas tiempo como HU 215 B - *Fusarium* sp. que creció luego de 10 días y no obstante resultó preseleccionada por producir un aceptable porcentaje de pérdida de peso; esto apoya la necesidad de incubar este tipo de cepas por un período mayor al común para lograr recuperar cepas celulolíticas que posteriormente y en mejores condiciones podrían producir niveles óptimos de celulasas.

2. AISLAMIENTO DE NUEVAS CEPAS CELULOLÍTICAS.

Para la obtención de cepas celulolíticas generalmente se procede primero al aislamiento de las cepas y luego se evalúan en sustratos celulósicos; sin embargo el método de acumulación de cultivo empleado aquí, nos permitió aislar cepas celulolíticas desde un primer momento resultando además un método económico y práctico para el aislamiento de cepas potencialmente productoras de celulasas. Además, es indispensable considerar el tipo de muestra y zona de colección, puesto que es una condición importante para

lograr aislar cepas con altas posibilidades degradativas de residuos celulósicos; en este caso se trabajó con muestras de tierra y hojarasca de zonas agrícolas. A partir del mismo tipo de muestra colectada en un bosque, Magnelli et al. (1997) aislaron 70 cepas fúngicas que fueron luego evaluadas por su capacidad celulolítica en relación al crecimiento en medio sólido con celulosa, resultando en general positivas.

Similar procedimiento emplearon Barbosa y de Queiroz (1996), quienes obtuvieron 48 hongos aislados a partir de avena procesada y que igualmente fueron luego examinados en su capacidad celulolítica resultando todos positivos. Por su parte, Prasertsan et al. (1992), simultáneamente al aislamiento evaluaron el poder celulolítico a partir de muestras de residuos del molino de aceite de palma, empleando medios sólidos con CMC y fibra de palma y realizando subcultivos hasta obtener cultivos puros, logrando aislar 34 cepas celulolíticas. Por el contrario, Nakandakari (1988) trabajó con muestras de tierra de áreas verdes urbanas, y aunque inicialmente obtuvo 11 cepas aisladas en agar celulosa sólo 3 de éstas produjeron halos en medio sólido y al evaluarse una de ellas se encontró sólo un componente del complejo (endoglucanasas).

Estos trabajos apoyan el hecho de que un tipo de muestra adecuado y un método simple de aislamiento directo de cepas celulolíticas es una forma práctica y poco costosa para la obtención primaria de cepas, aunque tiene la desventaja de no brindarnos una orientación directa sobre el nivel de producción de celulasas.

Debemos tener en cuenta también el tipo de sustrato que mejor se adecúe al aislamiento de cepas productoras de exoglucanasas; autores como Lee & Fan (1980) y Singh & Hayashi (1995) mencionan la incapacidad de las exoglucanasas para atacar la celulosa microcristalina o en todo caso la lenta degradación de la celulosa cristalina pretratada. Nakandakari (1988) empleó celulosa microcristalina, obteniendo cepas que sólo produjeron endoglucanasas; Magnelli et al. (1997) emplearon celulosa y asparagina para

obtener cepas productoras de endoglucanasas. Sin embargo, Abrha & Gashe (1992) citan trabajos en los que se determina que los sustratos celulósicos insolubles son efectivos sustratos para la producción de celulasas en algunos hongos.

Al incubar nuestras muestras en diferentes sustratos insolubles observamos que a partir de los frascos con papel filtro se logró el aislamiento de la mayor parte de las cepas obtenidas (Figura N° 2); así tenemos que a este sustrato correspondió el 37.5% del crecimiento observado en la muestra N° 1, el que además resultó celulolítico en su totalidad. Sin embargo, se debe considerar que existe la posibilidad del desarrollo de microorganismos no necesariamente celulolíticos a expensas de los nutrientes iniciales del medio y/o metabolitos secretados por los microorganismos celulolíticos. Esto explicaría lo ocurrido en la muestra N° 2, donde el 33.3% del crecimiento observado ocurrió en papel filtro, pero sólo el 6.7% resultó celulolítico. Si bien es cierto que se debe considerar la posible presencia de cofactores como iones metálicos en la zona de origen de la muestra que favorecerían la actividad del complejo celulasa de los microorganismos, algunos trabajos realizados a este respecto como los de Ali et al. (1991) y Bastawde (1992) señalan que los iones metálicos no afectan significativamente la actividad enzimática de celulasas, a excepción del Co^{2+} que aumentó la producción de celulasas en el primero de los trabajos mencionados.

Además del papel filtro, el algodón también resultó ser un buen sustrato para el aislamiento de cepas celulolíticas obteniendo el 12.5% y 6.7% de crecimiento celulolítico en las muestras N° 1 y N° 2 respectivamente.

3. IDENTIFICACIÓN DE CEPAS CELULOLÍTICAS.

Entre las cepas celulolíticas de Huaylas predominaron los géneros *Aspergillus* (32.1%) y *Penicillium* (42.9%) y en menores porcentajes *Cladosporium* y *Fusarium*; mientras que entre las cepas celulolíticas de Huaraz

predominó el género *Fusarium* (52%), seguido de *Penicillium* (28%) y en menores porcentajes *Chrysosporium*, *Aspergillus* y *Nigrospora*. (Figura N° 3)

En otros trabajos, también se mencionan estos géneros entre las cepas celulolíticas, así Abrha & Gashe (1992) aislaron una cepa de *Cladosporium* sp; Barboza & de Queiroz (1996) identificaron especies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* y *Nigrospora*; Magnelli et al. (1997) obtuvieron especies de *Penicillium* y *Fusarium*, mientras que Murali et al. (1994) aislaron 4 especies de *Fusarium*, y Steiner et al. (1994) identificaron una especie de *Penicillium*.

4. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD DE EXOGLUCANASAS.

Para lograr obtener las cepas con la mayor posibilidad de producción de exoglucanasas en las condiciones del laboratorio, se realizó una determinación cualitativa de la actividad en base a los procedimientos ya señalados en la parte de métodos.

En general se obtuvo altos porcentajes de crecimiento entre los niveles de regular y abundante, específicamente 59.1% y 69.6% entre las cepas celulolíticas de Huaylas y Huaraz respectivamente (Tabla N° 3), pero esto no resultó ser un indicativo para su preselección, puesto que hubo cepas como HY 086B y HY 084 que crecieron abundantemente en el papel filtro, pero la degradación que produjo no estuvo en niveles observables, aunque ocasionaron pérdidas de peso entre el 1% y 2%. Contrariamente cepas como HU 218D y HU 216C cuyos crecimientos se consideraron como regulares, ocasionaron muy buena degradación del papel filtro y porcentajes de pérdidas de peso mayores al 3%. Estas observaciones son similares a las obtenidas por Levin y Forchiassin (1995), quienes encontraron que hubo desarrollo micelial del hongo *Trametes trogii* en todos los medios que utilizaron (variando la fuente

de carbono) aunque el nivel de éste no siempre correspondió con el nivel de producción de celulasas.

De las cepas celulolíticas de la provincia Huaylas, sólo el 4.6% ocasionaron buena degradación, mientras que en un alto porcentaje la degradación no fue observable; no obstante al evaluarse la pérdida de peso ocasionada, si bien algunas de estas cepas no alcanzaron los más altos porcentajes, al menos tuvieron niveles aceptables (ligeramente superior al 2%). Esto nos permite incluir en la preselección cepas como HY 078 A - *Aspergillus* sp. que si bien resultaría con bajos niveles de producción al ser cuantificada su actividad, nos dan un indicio sobre su capacidad celulolítica, ya que estas cepas posteriormente pueden ser utilizadas en cultivos mixtos o en condiciones inductivas, como en el estudio de Madamwar & Patel (1992) que evaluaron una especie de *Aspergillus* sp. con niveles bajos en la producción de los componentes endo y exoglucanasas en cultivo simple, y en cocultivos con *Trichoderma reesei* obteniendo marcados incrementos. Así mismo, la cepa HY 029 - *Cladosporium* sp. pudo preseleccionarse por la pérdida de peso ocasionada, y aunque su cuantificación resultaría baja sabemos por otros trabajos como el de Abrha & Gashe (1992) que cepas de este género producen considerable actividad celulolítica en condiciones óptimas.

Entre las cepas celulolíticas de la provincia Huaraz hubo mayores porcentajes de degradación entre buena y muy buena (34,8%) y regular (43,5%) que es equivalente al 73,9% de cepas que produjeron entre 2% y 5% de pérdida de peso, siendo la mayoría especies del género *Fusarium*, coincidiendo con Murali et al.(1994) quienes obtuvieron significativas actividades sobre papel filtro en 4 cepas de este género.

En cuanto a lo anteriormente mencionado sobre la no coincidencia entre algunos resultados de los procedimientos cualitativos se debe señalar que es similar a lo obtenido por Prasertsan et al. (1992) quienes trabajaron no sólo con la degradación del papel filtro sino que además emplearon el método de zonas claras en agar, de 34 cepas celulolíticas sólo 13 produjeron desintegración del

papel filtro y de éstas sólo 8 exhibieron también halos alrededor de sus colonias en agar CMC, además hubo cepas que si bien no ocasionaron desintegración del papel filtro si formaron halos en el agar, seleccionándose al final las cepas positivas a ambas evaluaciones. En forma similar Saddler (1982) trabajó con pérdidas de peso ocasionada en bloques de madera y formación de halos en agar CMC, indicando sus resultados que un hongo altamente degradativo, capaz de reducir el peso de un bloque de madera en altos porcentajes, no necesariamente va a formar los mayores halos en el agar. Incluso Ramírez (1993) empleando paralelamente 2 medios diferentes de cultivo para un mismo método, reportó divergencias en sus resultados: en un medio obtuvo 7,60 % de cepas con muy buena degradación del papel filtro y 44,94% con buena degradación, mientras que en el otro medio obtuvo sólo 2,53% y 18,35% respectivamente.

5. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD DE EXOGLUCANASAS.

Las mayores actividades sobre el papel filtro (APF) fueron logrados por cepas de Huaraz (Figura N° 4), específicamente por las cepas: HU218D y HU251A identificadas ambas como *Fusarium* sp., cuyas actividades fueron 0,137 UI/ml y 0,112 y UI/ml respectivamente; aunque éstas fueron menores a las obtenidas por Murali et al. (1994) con cepas de *Fusarium lycopersici* (0,33 U/ml) y *Fusarium lini* (0,19 U/m) debemos considerar factores como el medio de cultivo y condiciones de aereación que pudieron favorecer la mayor actividad en dicho estudio, en el cual se cultivaron las cepas en un medio más complejo: Reese y Mandels, con agitación constante, mientras que el medio aquí empleado es un medio mínimo con nitrato de sodio como única fuente de nitrógeno. El pH del medio es otro factor a considerar: Ali et al. (1991) anotan que el pH óptimo para la producción de celulasas en general por hongos, varía de especie a especie, existiendo en la mayoría de los casos un rango de 3,0 a 6,0; *Penicillium janthinellum* obtuvo un rango de pH óptimo para la producción de los componentes celulolíticos de 4,5 a 5,5. El pH y temperatura

óptimos para la actividad enzimática son igualmente variables, así Abrha & Gashe (1992) mencionan un rango entre 4,0 a 6,0 y reportan una especie de *Cladosporium* sp. con APF óptima a pH 5,0 y 60°C, mientras que a 50°C obtuvieron el 89% de la actividad.

Entre las cepas de Huaylas la mayor APF correspondió a un *Aspergillus* sp. con 0,073 UI/ml, que es significativamente menor a las obtenidas con otras cepas del mismo género, como en los trabajos de Bastawde (1992), quien evaluó la APF de *Aspergillus terreus* resultando 0,3 UI/ml; Szakács-Dobozi et al. (1985) quienes obtuvieron 0,5 UI/ml en una cepa de la misma especie. Sin embargo, igualmente debemos considerar que los medios de cultivo empleados por estos investigadores fueron más complejos, así Bastawde utilizó un medio Mandels & Weber que consta de 3 fuentes de nitrógeno, adicionando además un surfactante y 2 fuentes de carbono (polvo celulosa y papel filtro), mientras que Szakács-Dobozi et al. cultivaron la cepa en un medio propio con varias fuentes de nitrógeno, iones metálicos y elementos traza; en ambos casos los cultivos se mantuvieron en agitación constante.

Respecto a las actividades sobre papel filtro (APF) logradas por cepas de otros géneros observamos en la Tabla N° 4 que entre los *Penicillium* sp. la cepa HU 208A tuvo 0,051 UI/ml, mientras que en otros trabajos se reportan actividades mayores en este género: Steiner et al. (1994) lograron 0,22 UI/ml con *Penicillium purpurogenum* cultivado en medios Mandels & Weber con celulosa como fuente de carbono en agitación continua; Szakács-Dobozi et al. (1985) obtuvieron 0,57 UI/ml con *Penicillium verrucosum* cultivado en un medio propio más arriba descrito; Ceroni y Gutiérrez-Correa (1988) lograron 0,462 UI/ml y 0,625 UI/ml en *Penicillium implicatum* y *Penicillium spinolosum* respectivamente en cultivos con medio suplementado con vitaminas, un surfactante y lactosa (1%) como inductor. Todas estas cepas fueron cultivadas en agitación.

Sólo una cepa de *Cladosporium* sp. (HY 029) fue evaluada obteniendo 0.028 UI/ml que contrasta con lo reportado por Abrha & Gashe (1992) en el mismo género que obtuvo 3 UI/ml de APF a partir de cultivo en un medio complementado con extracto de levadura y traza de minerales, y papel filtro como fuente de carbono.

6. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LA PRODUCCIÓN DE EXOGLUCANASAS EN DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

Las cepas seleccionadas produjeron insignificantes APF a partir de los cultivos con celulosa cristalina (Tabla N° 5), lo que indica su incapacidad para atacar este sustrato, concordando con lo sostenido por Lee & Fan (1980) y Singh & Hayashi (1995) quienes indican que las exoglucanasas exhiben muy poca acción contra la celulosa cristalina. Los resultados obtenidos por Levin y Forchiassin (1995) sustentan estas observaciones, puesto que registraron menor crecimiento y producción del complejo celulasa en cultivos de *Trametes trogii* con celulosa cristalina que con otros sustratos, lo que atribuye al hecho de tratarse de un polímero de lenta degradación. Sin embargo, Murali et al. (1994) obtuvieron buenas producciones en cultivos de especies de *Fusarium* con este sustrato; también Levin y Forchiassin (1995) reportan que la celulosa cristalina al 1% sirvió como única fuente de carbono para la producción de exoglucanasa por *Trametes trogii*. En los cultivos con algodón y papel filtro las AFP obtenidas fueron mayores logrando las cepas HU 216C - *Chrysosporium* sp. y HU 218 D - *Fusarium* sp. mejores niveles en papel filtro, no así HU 251A - *Fusarium* sp. que logró mayor producción en algodón. (Figura N° 5)

Abrha & Gashe (1992) reportaron que cada material celulósico que emplearon como sustrato para la producción de celulasas tuvo una concentración óptima a la que los componentes del complejo fueron producidos en mayor cantidad; así obtuvo a partir de cultivos con papel filtro (0,5%) y algodón (1.5%) APF de 3 UI/ml y 1 UI/ml respectivamente, logradas por una cepa de *Cladosporium* sp. Si a esto añadimos el comportamiento

propio de cada cepa, podemos comprender que aunque la producción de exoglucanasas de HU 216C - *Chrysosporium* sp. fue mayor en papel filtro que en algodón, esta última resultó mayor que la lograda por HU 251A - *Fusarium* sp. en el papel filtro, mientras que esta cepa obtuvo mayor producción en algodón. Esto concuerda con lo señalado por Stutzenberguer (1972) quien concluye que el tipo y concentración de sustrato fue crítico para la máxima producción de los componentes del complejo celulolítico en el medio mínimo empleado; encontrando que el algodón probó ser mejor sustrato para la producción obteniendo actividades máximas por una cepa de *Thermomonospora curvata* con concentraciones de 7 a 8 mg/ml.

7. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EXOGLUCANASAS.

La producción de celulasas y proteínas en las 3 cepas seleccionadas fue mayor en medio Mandels que en Czapeck (Tablas N° 6 y N° 7), algo comprensible si se tiene en cuenta que el medio Mandels contiene 2 fuentes de nitrógeno (sulfato de amonio y peptona) además de microelementos. Bastawde (1992) reportó que el sulfato de amonio favoreció la producción de celulasa en *Aspergillus terreus* en mayor proporción que otras fuentes probadas. También Keskar (1992) obtuvo buena producción de celulasas en cultivo de *Penicillium janthinellum* con sales de amonio en el medio; particularmente con sulfato de amonio al 0,7% logró una óptima producción.

En ambos medios las producciones: enzimática, de proteínas y de biomasa, mostraron cercana relación. Particularmente en HU 216C - *Chrysosporium* sp. (Figura N° 7) y HU 251A - *Fusarium* sp. (Figura N° 11) en medio Czapeck se observa alta producción enzimática y de proteínas en forma paralela. Sin embargo, también podemos notar que en los períodos finales de algunos cultivos como HU 216C - *Chrysosporium* sp. (Figura N° 7) y HU 218D - *Fusarium* sp. (Figura N° 9) en ambos medios, se registra disminución de la producción enzimática pero aumento de proteínas en el medio, lo que se

debería a la autólisis del micelio que originaría liberación de proteínas intracelulares, lo que concuerda con la disminución en los valores de biomasa registrados. Estos resultados son similares a los obtenidos por Ceroni y Gutiérrez Correa (1988) en algunos de los cultivos de su estudio, reportando además relaciones directas entre la producción de proteínas y el crecimiento de los hongos.

El pH en medio Czapeck evolucionó de forma similar en todos los cultivos, registrándose un incremento en los períodos iniciales para luego mantenerse estable y finalmente disminuir. El crecimiento se debería según lo anotado por Nakandakari (1988) al uso del nitrato de sodio como fuente de nitrógeno, ya que cuando éste es empleado los iones hidrógeno son removidos del medio para la reducción del nitrato y el pH tiende a elevarse.

En medio Mandels, el pH en líneas generales muestra una disminución en los períodos de crecimiento lo que se debería principalmente a la utilización del sulfato de amonio del medio como fuente de nitrógeno, esto concuerda con lo reportado por Nakandakari (1988) en cultivos con el mismo medio, mencionando que el microorganismo al asimilar el amonio libera al medio iones hidrógeno provocando la disminución del pH. Ali et al (1991) también reportaron que cuando las sales de amonio fueron usadas como fuente de nitrógeno el valor de pH del medio decreció. Ceroni y Gutiérrez Correa (1988) usando sulfato de amonio observaron un ligero incremento inicial del pH para luego recién disminuir, lo que se explica por el uso adicional de la urea que en la primera fase del desarrollo permite la liberación de iones amonio al medio provocando un aumento del pH, pero luego al asimilarse el amonio se liberan los iones hidrógeno con la subsecuente baja en el pH.

VI. CONCLUSIONES

1. Se lograron recuperar el 77,8% y el 98,3% de cepas de hongos procedentes de Huaylas y de Huaraz respectivamente, los que constituyen altos porcentajes considerando que dichas cepas permanecieron durante un período prolongado sin ser reactivadas. Sin embargo, sólo el 40% de las cepas de Huaylas y el 41,7% de las cepas de Huaraz lograron mantener su característica de celulolíticas.
2. El aislamiento de hongos celulolíticos mediante la acumulación de cultivo en sustratos celulósicos insolubles es un método directo y adecuado para trabajar muestras provenientes de zonas con altos niveles de degradación natural de la celulosa.
3. El grado de crecimiento de las cepas celulolíticas evaluadas no fue necesariamente equivalente al nivel de producción de exoglucanasas, por lo que se considera que este criterio no constituye un indicativo para la selección de cepas productoras.
4. Los géneros que tuvieron mayor representación fueron *Penicillium* (42,9%) y *Aspergillus* (32,1%) entre las cepas de Huaylas, y *Fusarium* (52%) y *Penicillium* (28%) entre las cepas de Huaraz.
5. Las cepas nativas de *Fusarium* sp. provenientes de Huaraz fueron las mejores productoras de exoglucanasas.

6. Las cepas que mostraron las mayores actividades enzimáticas fueron HU 216C - *Chrysosporium* sp., HU 218 D - *Fusarium* sp. y HU 251 A - *Fusarium* sp.
7. Los métodos cualitativos y cuantitativo mostraron relación entre sus resultados, lo que fue apreciable en las 3 cepas seleccionadas, las que ocasionaron muy buena degradación del papel filtro y mayores porcentajes de pérdida de peso.
8. El papel filtro y el algodón mostraron ser buenos sustratos para el aislamiento de cepas celulolíticas y como fuentes de carbono para la producción de exoglucanasas.
9. El uso del medio Mandels permitió la obtención de mayores niveles de producción de exoglucanasas, proteínas solubles y biomasa.

VII. RECOMENDACIONES

1. Emplear en el aislamiento de cepas celulolíticas el método de acumulación de cultivo en sustratos celulósicos pero con dos medios de cultivo en forma paralela, con el fin de evaluar mejoras en los resultados.
2. Los métodos cualitativos empleados no muestran absoluta concordancia entre sus resultados, sin embargo brindan en conjunto la orientación necesaria para la selección de cepas, por lo que sería conveniente evaluar las cepas celulolíticas en base a por lo menos 2 métodos cualitativos.
3. Evaluar las cepas seleccionadas en cultivos con otras fuentes de carbono, variando las concentraciones, hasta hallar el sustrato más adecuado para cada cepa así como la concentración requerida para lograr la mejor producción enzimática.
4. Optimizar las condiciones de cultivo de las cepas seleccionadas para la producción de exoglucanasas, evaluando la influencia de fuentes nitrogenadas, variaciones de temperatura y pH.
5. Optimizar las condiciones de la actividad enzimática de exoglucanasas de las cepas seleccionadas, evaluando la influencia de las variaciones de temperatura y pH.
6. Evaluar cuantitativamente la producción de exoglucanasas en medios complejos: con dos o más fuentes de nitrógeno, vitaminas, surfactantes; así como en medios con inductores.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- **Abrha, B. & Gashe, B.A.** 1992. Cellulase production and activity in a species of *Cladosporium*. World J. Microbiol. and Biotech. 8, 164-166.
- **Ali, S. & Sayed, A.** 1992. Regulation of cellulase biosynthesis in *Aspergillus terreus*. World J. Microbiol. and Biotech. 8, 73- 75.
- **Ali, S.; Sayed, A.; Sarker, R.I. & Alam, R.** 1991. Factors affecting cellulase production by *Aspergillus terreus* using water hyacinth. World J. Microbiol. and Biotech. 7, 62-66.
- **Atlas, R.M. & Bartha, R.** 1980. The carbon cycle. In: Microbial Ecology: Fundamentals and applications. Addison-Wesley Publishing Company.
- **Barbosa, E. & de Queiroz, M.A.** 1996. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. Rev. de Microb. Sao Paulo. 27(1), 7-9.
- **Bastawde, K.B.** 1992. Cellulolytic enzymes of a thermotolerant *Aspergillus terreus* strain and their action on cellulosic substrates. World J. Microbiol. and Biotech. 8, 45-49.
- **Béguin, P.** 1990. Molecular Biology of cellulose degradation. Annu. Rev. Microbiol. 44, 219-248.
- **Beldman, G.; Rombotus, F.M.; Voragen, A.G.J. & Pilnik, W.** 1984. Application of cellulase and pectinase from fungal origin for the liquefaction and saccharification of biomass. Enzyme Microbial Technology. Nov. 6, 503.
- **Bezborodov, A.M.** 1984. Enzimas de los microorganismos y sus aplicaciones. Editorial Ciencia. Moscú.
- **Buswell, J.A.; Cai, Y.J.; Chang, S.T.; Peberdy, J.F.; Fu, S.Y. & Yu, H.S.** 1996. Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. World J. Microbiol. and Biotech. 12, 537-542.

- **Castellanos, P.; Lancho, A; Rengifo, M. y Vilches, L.** 1999. Biosíntesis de celulasa: Aislamiento de cepas celulolíticas. VIII Reunión Científica del ICBAR. Lima. pág. 67.
- **Castellanos, P.; Lancho, A; Vilches, L. y Huerta, L.** 2000. Aislamiento, identificación y selección de cepas productoras de celulasa de dos regiones del Perú. IX Reunión Científica del ICBAR. Lima. pág.118.
- **Ceroni, A.H.** 1988. Detección y evaluación de germoplasma celulolítico en 1326 cepas de hongos de suelo. Tesis para optar el título de Biólogo. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- **Ceroni, A. y Gutierrez-Correa, M.** 1988. Producción de celulasa por hongos: estudios cinéticos en hongos silvestres. Boletín de Lima.55,13-20.
- **Crawford, D.L. & McCoy, E.**1972. Cellulases of *Thermomonospora fusca* and *Streptomyces thermodiastaticus*. Appl. Microbiol. 24: 1, 150-152.
- **Crueger, W. & Crueger, A.**1980. Biotechnology. Sinauer Associates ,Inc. 2ª . ed., 313-316.
- **Dueñas, R.; Tengerdy, R.P. & Gutierrez-Correa, M.** 1995. Cellulase production by mixed fungi in solid-substrate fermentation of bagasse. World J. Microbiol. and Biotech. 11, 333-337.
- **Egorova, L.** 1986. Hongos del suelo. Instituto de Biología del suelo. Academia de Ciencias. URSS.
- **Enari, T.M. & Markkanen, P.**1977. Production of cellulolytic enzymes by fungi. Advances in Biochemical Engineering, 5.
- **Fan, L.T.; Lee, Y-H & Beardmore, D.H.** 1980. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. Biotechnology and Bioengineering. XXII, 177-199.
- **Fan, L.T.; Lee, Y-H. & Gharpuray, M.M.** 1982. The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. Microbial reactions.Vol 23:157.Reprint from Advances in Biochemical Engineering.
- **Gibaja, S.** 1977. Guía para el análisis de los compuestos del carbono. Dirección Universitaria de Biblioteca y Publicaciones de la UNMSM.Lima.

- **Griffin, H.L.; Sloneker, J.H. & Inglett, G.E.** 1974. Cellulase production by *Trichoderma viride* on feedlot waste. *Appl. Microbiol.* 27: 6, 1061-1066.
- **Gutierrez-Correa, M.** 1986. Producción de etanol y proteína. En Primer Simposium Nacional de Biotecnología. CONCYTEC. Julio. Lima. 45 pp.
- **Han, Y.W. & Callihan, C.D.** 1974. Cellulose fermentation: Effect of substrate pretreatment on microbial growth. *Appl. Microbiol.* 27:1,159-165.
- **Han, Y.W.; Dunlap, C.E. & Callihan, C.D.** 1971. Single cell protein from cellulosic wastes. *Food Technology.* 25:130, 32-35.
- **Herrera, R.P.** 1981. Hongos celulolíticos. Informe para optar el Grado de Bachiller en Ciencias. UPCH. Lima.
- **Illanes, A. y Rossi, M.C.** 1980. Inducción de celulasa de *Trichoderma reesei* en medios de cultivo definidos. *Rev. Argentina de Microbiol.* 12(3), 79-86.
- **Julca, M. y Gutiérrez-Correa, M.** 1987. Producción de celulasas por hongos: Obtención de mutantes hipercelulolíticos. *Boletín de Lima.* 54, 48-54.
- **Kaneshiro, T.; Kelson, B.F. & Sloneker, J.H.** 1975. Fibrous material in feedlot waste fermented by *Trichoderma viride*. *Appl. Microbiol.* 879-880.
- **Keskar, S.S.** 1992. Cellulase production by *Penicillium janthinellum*. *World J. Microbiol. and Biotech.* 8, 534-535.
- **Koneman, E.W.; Roberts, G.D. & Wright, S.E.** 1978. *Practical Laboratory Micology.* 2^a .ed.
- **Ladisch, M.R.; Lin, K.W.; Voloch, M. & Tsao, G.T.** 1983. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme Microb. Technol.* 5, 82-102.
- **Lee, B.H. & Blackburn, T.H.** 1975. Cellulase production by a Thermophilic *Clostridium* species. *Appl. Microbiol.* 346-353.
- **Lee, Y-H. & Fan, L.T.** 1980. Properties and mode of action of cellulase. Reprint from *Advances in Biochemical Engineering* 18, 101-129.
- **Lehninger, A.L.** 1987. *Bioquímica.* Ediciones Omega, S.A. 2^a . ed. Barcelona.
- **Levin, L. y Forchiassin, F.** 1995. Influencia de fuentes carbonadas y nitrogenadas sobre la actividad celulolítica de *Trametes trogii*. *Revista Argentina de Microbiología.* 27, 11-20.

- **Levin, L. y Forchiassin, E.** 1997. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de celulasas por *Trametes trogii*. Revista Argentina de Microbiología. 29, 16-23.
- **Linko, M.; Markkanen, P. & Bailey, M.**1977. Production of cellulases and hemicellulases by *Trichoderma viride*. Reprint from Proceedings of Bioconversion Symposium. Feb. 21-23.
- **Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A. & Randall, R.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent J. Biol. Chem. 193, 265 – 275.
- **Madamwar, D. & Patel, S.** 1992. Formation of cellulases by co-culturing of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* on cellulosic waste. World J. Microbiol. and Biotech. 8, 183-186.
- **Magnelli, P.E.; Martinez, A. y Mercuri, O.A.** 1997. Método simple para determinar actividad celulolítica en hongos. Revista Argentina de Microbiología 29, 210-214.
- **Maheswari, D.K.; Jahan, H.; Paul, J. & Varma, A.** 1993. Wheat straw a potencial substrate for cellulase production using *Trichoderma reesei*. World J. Microbiol. and Biotech. 9, 120-121.
- **Mohagheghi, A.; Grohmann, K. & Wyman, Ch.E.** 1990. Production of cellulase on mixtures of xylosa and cellulose in a fed-Batch process. Biotechnology and Bioengineering. 35, 211-216.
- **Morozova, E.S.; Oranskaya, M.S. y Logunov, A.I.** 1981. Selección y perspectivas posteriores de Desarrollo. Investigación de selección Genética de *Trichoderma viride*, productor de enzimas celulolíticas. En: Celulasa de Microorganismos. Ed. Ciencia. Moscú.
- **Mullings, R. & Parish, J.H.** 1984. New reducing sugar assay for the study of cellulases. Enzyme Microb. Technol. 6, 491-496.
- **Murali, H.S.; Mohan, M.S.; Manja, K.S. & Sankaran, R.** 1994. Cellulolytic activity of four *Fusarium* spp. World J. Microbiol. & Biotech. 10, 487.
- **Nakandakari, J.** 1988. Aislamiento, selección y estudios preliminares de hongos secretores de celulasas. Tesis para optar el grado de Bachiller en Biología. UPCH. Lima.
- **Nelson, N.** 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153, 375-380.

- **Okeke, B.C. & Paterson, A.** 1992. Simultaneous production and induction of cellulolytic and xylanolytic enzymes in a *Streptomyces sp.* World J. Microbiol. and Biotechn. 8, 483-487.
- **Ooshima, H.; Sakata, M. & Harano, Y.** 1983. Adsorption of cellulase from *Trichoderma viride* on cellulose. Biotechnology and Bioengineering, Vol. XXV, 3103-3114.
- **Pardo, A.G. & Forchiassin, F.** 1998. Influence of different cultural conditions on cellulase production by *Nectria catalinensis*. Revista Argentina de Microbiología. 30, 20-29.
- **Pardo, A.G. & Forchiassin, F.** 1999. Influence of temperature and pH on cellulase activity and stability in *Nectria catalinensis*. Revista Argentina de Microbiología. 31, 31-35.
- **Phillips, J.A.** 1985. It need not be "feedstock or food". Chemistry Technology. 16, 377-384.
- **Pishkov, R.S. y Popov, V.G.** 1984. Biotecnología. Perspectivas de Desarrollo. Edit. Ciencia. Moscú.
- **Pourquie, J. y Vandecasteele, J-P.** 1985. Conversión de compuestos lignocelulósicos por hidrólisis enzimática y fermentación acetona-butanol. Biotecnología. 2ª .ed. 583-601.
- **Prasertsan, P.; H-kittikul, A. & Chitmanee, B.** 1992. Isolation and selection of cellulolytic fungi from palm oil mill effluent. World J. Microbiol. and Biotech. 8, 614-617.
- **Prasertsan, P. & Oi, S.** 1992. Production of cellulolytic enzymes from fungi and use in the saccharification of palm cake and palm fibre. World J. Microbiol. and Biotech. 8, 536-538.
- **Puntambekar, U.S.** 1995. Cellulase production by the edible mushroom *Volvariella diplasia*. World J. of Microbiol. and Biotech. 11, 695.
- **Ramírez, P.S.** 1993. Degradación enzimática de la celulosa. Tesis para optar el título de Biólogo. UNMSM. Lima.
- **Ramos, A.M. y Forchiassin, F.** 1996. Producción de endoglucanasa en cuatro especies del género *Saccobolus*. Rev. Argentina de Microbiología. 28, 55-62.

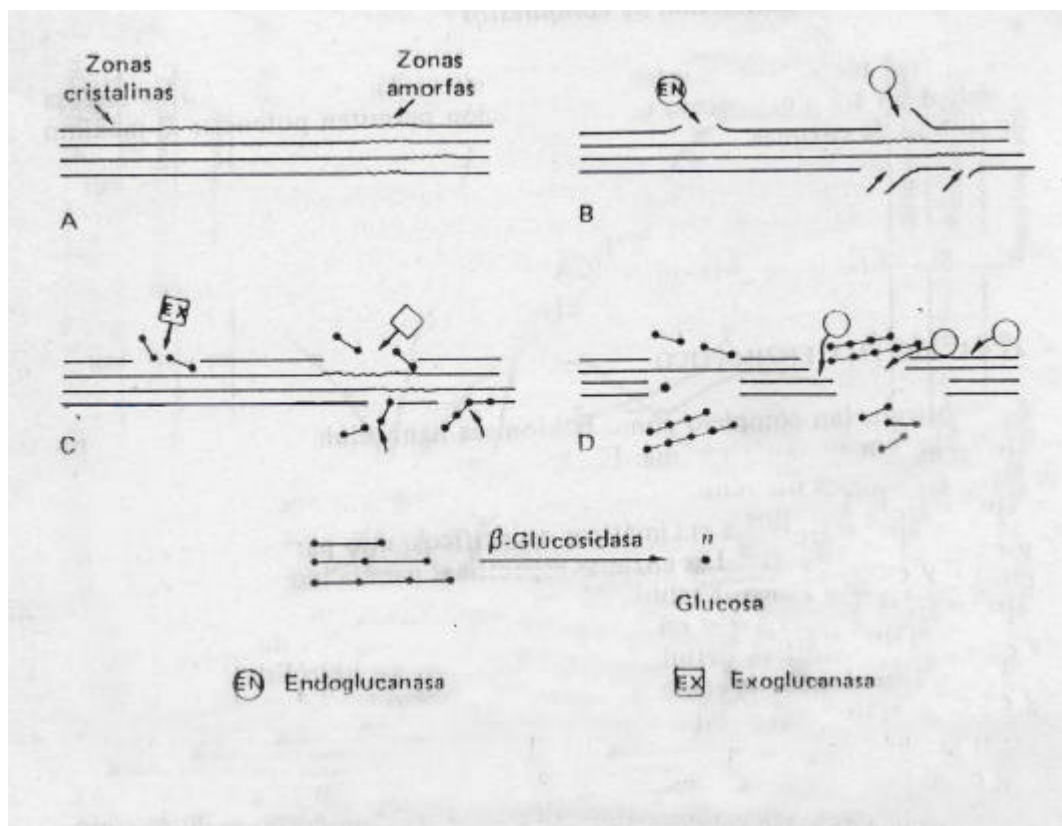
- **Rudakov, O. L.** 1981. Hongos miceliales: Biología y valor práctico. Instituto de Microbiología, Academia de Ciencias. URSS.
- **Saddler, J.N.** 1982. Screening of highly cellulolytic fungi and the action of their cellulase enzyme system. *Enzyme Microb. Technol.* 4, 414-418.
- **Singh, A. & Hayashi, K.** 1995. Microbial cellulases: Protein architecture, molecular properties and biosynthesis. *Adv. in Appl. Microbiol.* 40, 1-44.
- **Steiner, J.; Socha, C. & Eyzaguirre, J.** 1994. Culture conditions for enhanced cellulase production by a native strain of *Penicillium purpurogenum*. *World J Microbiol. and Biotech.* 10, 280-284.
- **Stutzenberger, F.J.** 1972. Cellulolytic activity of *Thermomonospora curvata*: Nutritional requirements for cellulase production. *Appl. Microbiol.* 24: 1, 77-82.
- **Stutzenberger, F.J.** 1972. Cellulolytic activity of *Thermomonospora curvata*: Optimal assay conditions, partial purification and product of the cellulase. *Appl. Microbiol.* 24: 1, 83-90.
- **Stutzenberger, F.J.; Kaufman, A.J. & Lossin, R.D.** 1970. Cellulolytic activity in municipal solid waste composting. *Canadian Journal of Microbiology.* 16, 553-560.
- **Sugden, C. & Bhat, M.K.** 1994. Cereal straw and pure cellulose as carbon sources for growth and production of plant cell-wall degrading enzymes by *Sporotrichum thermophile*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 10, 444-451.
- **Svistova, I.D.** 1984. Síntesis de celulasa de *Aspergillus terreus*. Resumen de la sustentación del Grado de candidato en Ciencias Biológicas. Academia de Ciencias. Moscú.
- **Szakács Dobozi, M.; Szakács, G.; Meyer, D. & Klappach, G.** 1985. Enhancement of enzymatic degradation of cellulose by application of mixed enzyme systems of different fungal origin. *Acta Biotechnol.* 5(1), 27-33.
- **Szczodrak, J.; Trojanowski, J.; Ilczuk, Z. & Ginalska, G.** 1982. Cellulolytic activity of Moulds. Characteristics of the cellulases complex and xylanases of the strain *Aspergillus terreus* F-413. *Acta Microbiológica Polónica.* Vol 31. pp 257.

- **Wei, D-L.; Chang, S.C.; Wei, YH.; Lin, YW.; Chuang,C.L. & Jong, S.C.** 1992. Production of cellulolytic enzymes from the *Xylaria* and *Hypoxylon* species of xylariaceae. *World J. Microbiol.and Biotechn.*8, 141-146.
- **Wicklów, D.T.; Langie, R.; Crabtree, S. & Detroy, R.W.** 1984. Degradation of lignocellulose in wheat straw versus hardwood by *Cyathus* and related species (Nidulariaceae). *Can. J. Microbiol.*30, 632-636.
- **Witkowska, D.; Bien, M. & Sobieszczanski, J.** 1989. The effect of *Trichoderma viride* C-1 UV mutagenization on cellulase activity. *Microbiología SEM.* 5,113-119.
- **Yazdi, M.T.; Woodward, J.R. & Radford, A.** 1990. The cellulase complex of *Neurospora crassa*:activity, stability and release. *Journal of General Microbiology.* 136, 1313-1319.
- **Zaldívar, M.; Steiner, J.; Musalem, M. y Contreras, I.** 1987. Aislamiento de un mutante de *Trichoderma pseudokoningii* hiperproductor de celulasas. *Microbiología SEM.* 3, 33-44.

ANEXOS

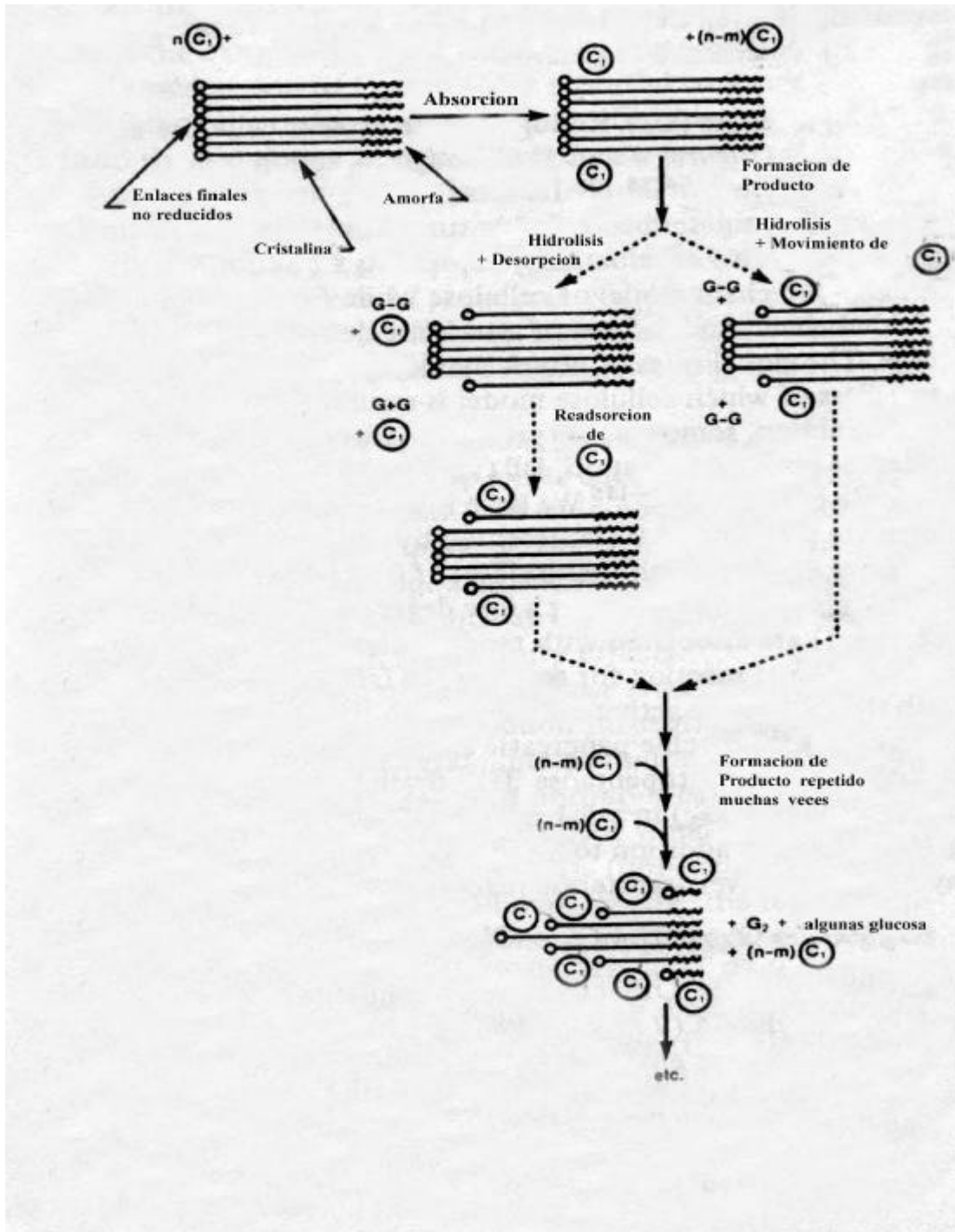
1. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS CELULASAS EN LA FIBRILLA DE CELULOSA

(Según Montencourt y Eveleigh)*



* Tomado de Pourquie & Vandecasteele 1985

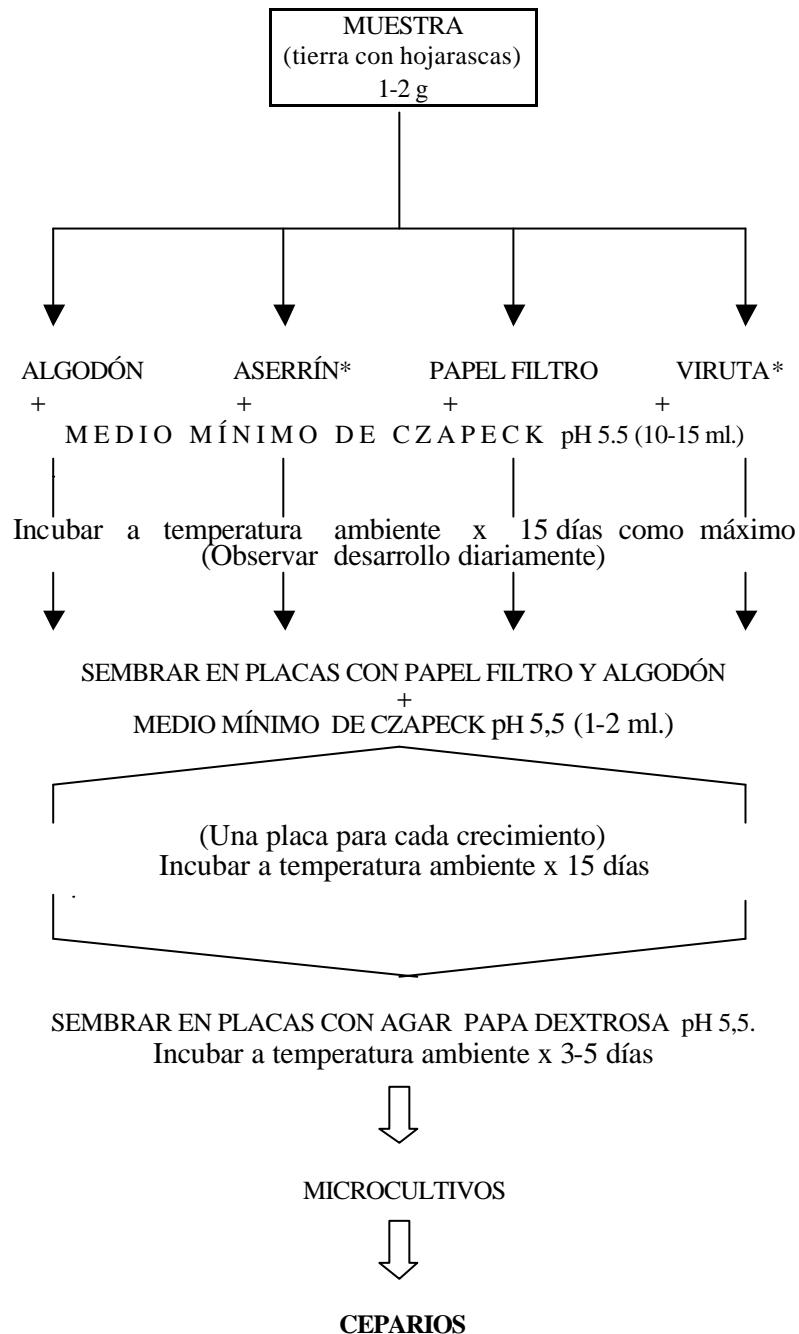
2. ESQUEMA DE LA ACTIVIDAD DE LA EXOGLUCANASA EN UN MODELO DE CADENA EXTENDIDA DE LA CELULOSA
(Según Ladisch et al. 1983)



3 . COMPOSICIÓN DE SUSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS (Según Crueger & Crueger 1990)

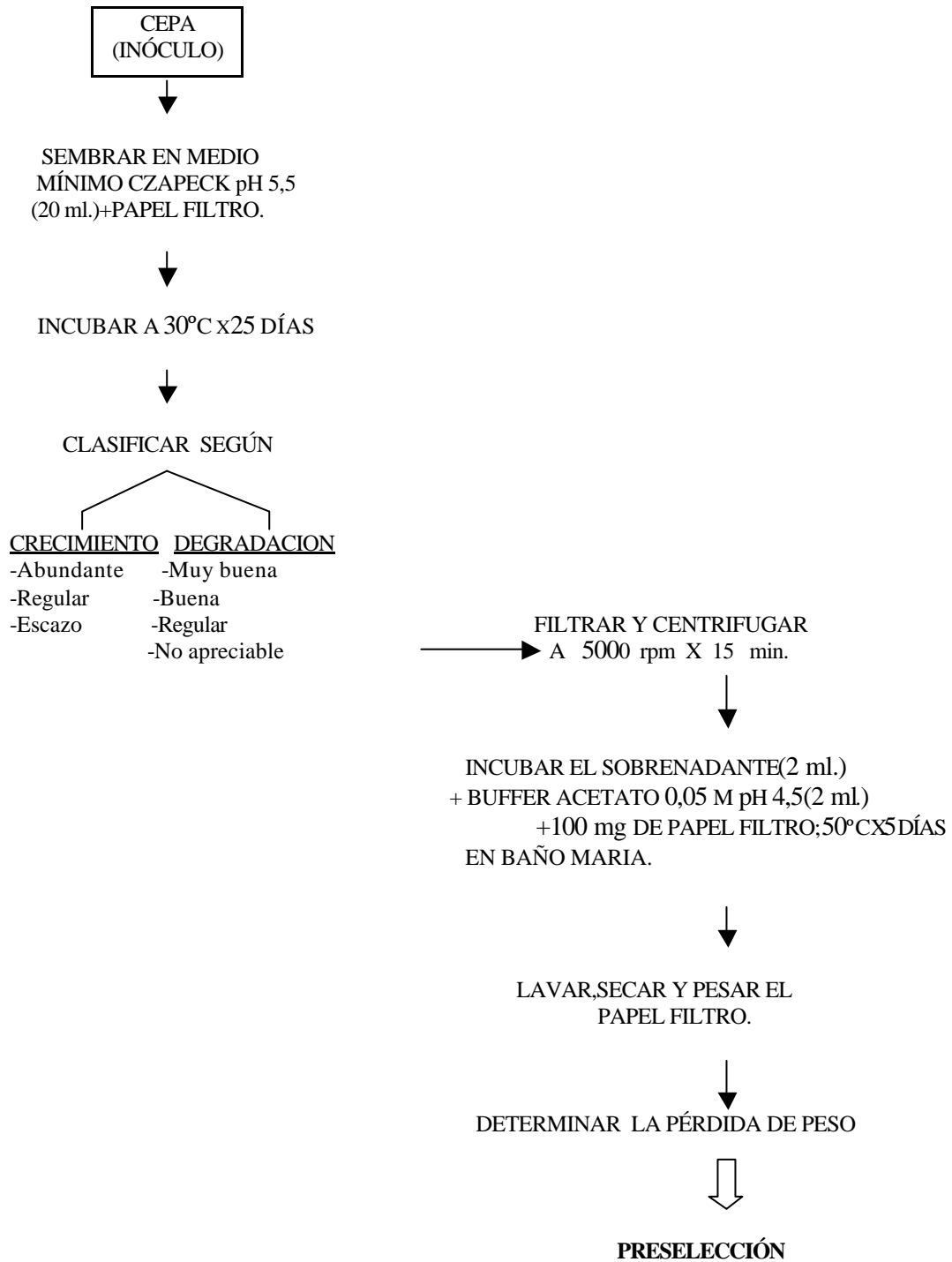
	% CELULOSA	% HEMICELULOSA	% LIGNINA
Madera(Angiospermas)	40 - 55	24 - 40	18 - 25
Madera(Gimnospermas)	45 - 50	25 - 35	25 - 35
Grass	25 - 40	25 - 50	10 - 30
Hoja	15 - 20	80 - 85	-
Periódico	40 - 55	25 - 40	18 -30
Residuos de la manufactura del papel	60 - 80	20 - 30	2 - 10

4. ORGANIGRAMA DEL AISLAMIENTO DE CEPAS CELULOLÍTICAS



* Sustratos pre-tratados con HCl 5% durante 24 horas.

5. ORGANIGRAMA DE LA DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD DE EXOGLUCANASAS



7. MEDIOS DE CULTIVO

A. AGAR PAPA DEXTROSA(APD)

Papa	300 g
Glucosa	20 g
Agas-agar	15 g
Agua destilada	1000 ml
pH 5,5-5,6	
T° autoclave	121°Cx10 min.

B. MEDIO MÍNIMO CZAPECK

NaNO ₃	2 g
KH ₂ PO ₄	1 g
KCl	0,50 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
Agua destilada	1000 ml

C. MEDIO MANDELS

KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,30 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,30 g
(NH ₄) ₂ .SO ₄	1,40 g
Peptona	0,50 g
Carbohidrato*	10 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	5 mg
MnSO ₄ .7H ₂ O	1,6 mg
ZnSO ₄ .H ₂ O	1,4 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	1 mg
Agua destilada	1000 ml

* Se reemplazó con papel filtro (0,5%)