



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN**  
**PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL**  
**UNIDAD SINALOA**



Producción de celulasas en fermentación  
sumergida utilizando microorganismos aislados de  
*Moringa oleifera* con potencial aplicación en  
procesos biotecnológicos

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO  
DE DOCTOR EN  
CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

ELVA LORENA VÁZQUEZ MONTOYA

GUASAVE, SINALOA, MÉXICO; MAYO 2019.



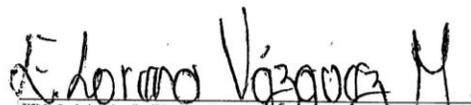
# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa. El día 03 del mes de mayo del año 2019, la que suscribe Elva Lorena Vázquez Montoya alumna del programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología, con número de registro A130373, adscrita al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa, manifiesto ser la autora intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección la Dra. Claudia Castro Martínez y Dra. Silvia Luna Suárez, y cedo los derechos del trabajo titulado "Producción de celulasas en fermentación sumergida utilizando microorganismos aislados de *Moringa oleifera* con potencial aplicación en procesos biotecnológicos", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso de la autora y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones [vazquez\\_montoyalorena@yahoo.com.mx](mailto:vazquez_montoyalorena@yahoo.com.mx); [clcastro@ipn.mx](mailto:clcastro@ipn.mx) y [sluna@ipn.mx](mailto:sluna@ipn.mx). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
ELVA LORENA VAZQUEZ MONTOYA



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 03 de mayo del 2019

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-Sinaloa en su sesión ordinaria No. V celebrada el día 02 del mes de mayo conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

**VÁZQUEZ**  
Apellido paterno

**MONTOYA**  
Apellido materno

**ELVA LORENA**  
Nombre (s)

Con registro: 

A	1	3	0	3	7	3
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:  
**“Producción de celulasas en fermentación sumergida utilizando microorganismos aislados de *Moringa oleifera* con potencial aplicación en procesos biotecnológicos”**

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

\* Búsqueda de microorganismos celulolíticos en biomasa de *M. oleifera*

\* Producción de celulasas utilizando hongos filamentosos en fermentación sumergida

\* Pretratamiento del residuo de *M. oleifera*

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:

**Dra. Claudia Castro Martínez y Dra. Silvia Luna Suárez**

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en: CIIDIR-Sinaloa

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

**Dra. Claudia Castro Martínez**  
12304-EC-16 Profesor titular C

**Dra. Silvia Luna Suárez**  
14158-EF-19 Profesor titular C

Aspirante

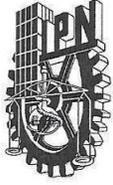
**Elva Lorena Vázquez Montoya**

Presidente del Colegio

**Dr. Héctor Manuel Esparza Leal**



**CIIDIR - IPN**  
UNIDAD SINALOA  
DIRECCION



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa siendo las 09 horas del día 02 del mes de mayo del 2019 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR SINALOA para examinar la tesis titulada:

"Producción de celulasas en fermentación sumergida utilizando microorganismos aislados de Moringa oleifera con potencial aplicación en procesos biotecnológicos"

Presentada por el alumno:

**VÁZQUEZ**

Apellido paterno

**MONTOYA**

Apellido materno

**ELVA LORENA**

Nombre (s)

Con registro: 

A	1	3	0	3	7	3
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

### DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Claudia Castro Martínez  
12304-EC-16 Profesor titular C

Dra. Silvia Luna Suárez  
14158-EF-19 Profesor titular C

Dr. Sergio Medina Godoy  
13377-EE-18 Profesor titular C

Dra. Melina López Meyer  
13298-EF-18 Profesor titular C

Dr. Antonio Luna González  
13130-EY-18 Profesor titular C

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Héctor Manuel Esparza Leal



**CIIDIR - IPN**  
UNIDAD SINALOA  
DIRECCIÓN

## AGRADECIMIENTOS A PROYECTOS

El trabajo de tesis se desarrolló en el Departamento de Biotecnología Agrícola del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Sinaloa del Instituto Politécnico Nacional (IPN). El presente trabajo fue apoyado económicamente por SAGARPA-CONACYT a través del proyecto “Tecnología para el cultivo, manejo poscosecha, producción de biocombustibles y coproductos de moringa en México” (No. 175519) y a través de los proyectos IPN SIP20144369, SIP20150270, 20161022. También por la beca para estudiantes de posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con clave 366425, y a través del Programa Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI) del IPN.



## DEDICATORIA

- ☞ A Dios, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente.
  
- ☞ A mí amado esposo Chevy, por creer en mí y acompañarme en todo momento.
  
- ☞ A mis hijos Scarleth, Karla Estefania y Sebastián, por ser mi motivo para superarme cada día más.
  
- ☞ A mi nieta Isa Estefanía, por iluminar mi existencia y fortalecerme para trabajar por un futuro mejor.
  
- ☞ A mi madre María Elva y mis hermanos Salomé, Nadia y Eudor, por exortarme a conquistar mis ideales.
  
- ☞ A todos mis amigos y familiares que me impulsaron a continuar y no perecer en el intento.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto Politécnico Nacional (IPN), por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado. En especial al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Sinaloa, por ser la sede de todo el conocimiento adquirido en estos años. A sus docentes y al personal de cada uno de sus departamentos, por su atención y motivación durante mi estancia como alumna.

A mis directoras Dra. Claudia Castro Martínez y Dra. Silvia Luna Suárez, a mi comité tutorial Dra. Melina López Meyer, Dr. Sergio Medina Godoy y Dr. Antonio Luna González. Por acompañarme e instruirme como alumna, aportando a mi formación profesional y como ser humano.

A mis compañeros de Laboratorio de Bioenergéticos Sandy, Laurita y Cande. En especial al Dr. Juan Carlos Álvarez Martínez y a la Dra. Lelie Denise Castro Ochoa, quienes me orientaron en todos los momentos que necesité sus consejos.

A todos los integrantes del laboratorio de Bioinsecticidas, que me ayudaron de una manera desinteresada y al Dr. Eusebio Nava Pérez por apoyarme en el análisis estadístico de esta investigación.

Al laboratorio de Ecología Molecular de la Rizosfera y el laboratorio de Interacción Microorganismo Planta, de una manera especial a la M. en C. Claudia María Ramírez Douriet y a la Dra. Karla Yeriana Leyva Madrigal, por su apoyo en el análisis molecular y filogenético que se realizó en este trabajo de tesis.

Al Dr. Hervey Rodríguez González, por las facilidades prestadas para realizar los análisis en el laboratorio de Nutrición Animal, así mismo al Dr. Sergio Medina Godoy del laboratorio de Alimentos Funcionales.

Agradezco a los ingenieros Celestino, Antonio y Aldo, por compartir sus conocimientos y habilidades en el área de informática.

Un especial agradecimiento a mi amiga y compañera Magnolia, por todos los momentos que compartimos en esta gran aventura que fue el doctorado y por nuestra incondicional amistad.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 Biomasa lignocelulósica .....	4
2.1.1 Celulosa .....	5
2.1.2 Hemicelulosa.....	6
2.1.3 Lignina.....	7
2.1.4 Otros compuestos .....	9
2.1.5 <i>Moringa oleifera</i> .....	9
2.2 Fermentación sumergida o líquida .....	12
2.3 Biodegradación enzimática de la celulosa.....	14
2.3.1 Microorganismos productores de celulasas .....	14
2.3.2 Hongos celulolíticos.....	15
2.4 Celulasas.....	17
2.4.1 Propiedades de las celulasas .....	18
2.4.2 Aplicaciones de las celulasas.....	19
2.4.2.1 Celulasas en la industria de la extracción de productos vegetales.....	20
2.4.2.2 Celulasas en la industria de la alimentación animal .....	21
2.4.2.3 Celulasas en la industria cervecera.....	21
2.4.2.4 Celulasas en la agricultura .....	22
2.4.2.5 Celulasas en la industria textil y lavandería.....	22
2.4.2.6 Celulasas en la Industria de pulpa y el papel .....	22
2.4.2.7 Celulasas en investigación y biotecnología .....	23
2.4.2.8 Celulasas en biocombustibles .....	23
3. JUSTIFICACIÓN .....	24
4. OBJETIVOS .....	25
4.1 Objetivo general .....	25
4.2 Objetivos específicos.....	25
5. HIPÓTESIS .....	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	26

6.1 Aislamiento, evaluación e identificación de microorganismos celulolíticos presentes en la biomasa de <i>M. oleifera</i> .....	26
6.1.1 Localización y condiciones de muestreo .....	26
6.1.2 Aislamiento de microorganismos a partir de biomasa aérea de <i>M. oleifera</i> .....	27
6.1.3 Selección de microorganismos con actividad celulolítica cualitativa .....	27
6.1.4 Conservación de microorganismos .....	29
6.1.5 Identificación morfológica de los microorganismos seleccionados.....	29
6.1.6 Identificación molecular de los microorganismos seleccionados.....	29
6.2 Evaluación de las actividades celulolíticas cuantitativas de los microorganismos aislados, utilizando fuentes de carbono sintéticas en fermentación sumergida .....	32
6.2.1 Fermentación de los microorganismos en medio líquido.....	32
6.2.2 Determinaciones analíticas .....	33
6.2.3 Análisis estadístico.....	35
6.3 Cuantificación de las actividades celulolíticas de <i>P. funiculosum</i> FG1, utilizando el residuo de <i>M. oleifera</i> como fuente de carbono en fermentación sumergida .....	35
6.4 Establecimiento de las condiciones de pretratamiento del residuo de <i>M. oleifera</i> para disminuir su recalcitrancia y aumentar la biodisponibilidad de celulosa .....	36
6.4.1 Secado y tratamiento mecánico .....	36
6.4.2 Tratamiento hidrólisis ácida.....	36
6.4.3 Caracterización estructural del residuo de <i>M. oleifera</i> .....	37
6.5 Evaluación del extracto enzimático de <i>P. funiculosum</i> FG1 en la sacarificación de biomasa de <i>M. oleifera</i> .....	37
6.5.1 Concentración del extracto crudo.....	37
6.5.2 Sacarificación .....	38
7. RESULTADOS .....	39
7.1 Aislamiento y selección de microorganismos celulolíticos de biomasa de <i>M. oleifera</i> .....	39
7.1.1 Aislamiento de microorganismos a partir de biomasa de <i>M. oleifera</i> .....	39
7.1.2 Actividad celulolítica cualitativa de los microorganismos aislados y purificados .....	39

7.2 Identificación morfológica y molecular de los microorganismos que se seleccionaron por su actividad celulolítica cualitativa.....	40
7.2.1 Identificación morfológica de los microorganismos seleccionados.....	40
7.2.2 Identificación molecular de los microorganismos seleccionados.....	44
7.3 Efecto de fuentes de carbono sintéticas sobre la producción de azúcares reductores y actividades enzimáticas de los microorganismos seleccionados.....	46
7.3.1 Efecto de dos fuentes de carbono (CMC y Avicel) sobre la producción de azúcares reductores.....	47
7.3.2 Actividades enzimáticas celulolíticas (EnG, ExG y BG) de los microorganismos seleccionados utilizando dos fuentes de carbono (CMC y Avicel) en fermentación sumergida.....	48
7.4 Actividad celulolítica de <i>P. funiculosum</i> FG1 utilizando residuos de <i>M. oleifera</i> como fuente de carbono.....	51
7.5 Pretratamiento y caracterización estructural del residuo de <i>M. oleifera</i> .....	54
7.6 Evaluación del extracto enzimático de <i>P. funiculosum</i> FG1 en la sacarificación de biomasa residual de <i>M. oleifera</i> .....	55
7.6.1 Hidrólisis enzimática del residuo de moringa .....	57
8. DISCUSIÓN .....	58
9. CONCLUSIONES.....	65
10. LITERATURA CONSULTADA.....	66
11. ANEXOS .....	83

## INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Conformación estructural de la biomasa lignocelulósica.....	4
Figura 2. Estructura de la celulosa .....	6
Figura 3. Estructura de la hemicelulosa .....	7
Figura 4. Estructura de la Lignina.....	8
Figura 5. Árbol de <i>Moringa oleifera</i> en Guasave, Sin.....	12
Figura 6. Recreación de las estructuras presentes en el hongo filamentoso <i>Penicillium</i> sp. ....	16
Figura 7. Hidrólisis enzimática de la celulosa.....	18
Figura 8. Mapa de México con las ubicaciones de los muestreos en el estado de Sinaloa. ....	26
Figura 9. Actividad celulolítica cualitativa de los tres microorganismos con mayor actividad en CMC. ....	40
Figura 10. Aislado PDA1a-1 en medio PDA.....	41
Figura 11. Imágenes del aislado PDA1a-1 al microscopio digital (Leica).....	42
Figura 12. Imagen del aislado PDA3-1 en medio PDA.....	42
Figura 13. Imágenes del aislado PDA3-1 al microscopio digital (Leica).....	43
Figura 14. Imagen del aislado PDA2a-2 en medio PDA.....	43
Figura 15. Imagenes del aislado PDA2a-2 en el microscopio digital (Leica).....	44
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR de los aislados seleccionados.....	45
Figura 17. Árbol filogenético de la región ITS del ADNr de los aislados tres aislados seleccionados en esta investigación .....	46
Figura 18. Producción de azúcares reductores de los hongos <i>P. funiculosum</i> FG1, <i>F. verticillioides</i> FG3 y <i>C. cladosporioides</i> FC2, de forma individual en dos fuentes de carbono CMC y Avicel.....	48
Figura 19. Actividad enzimática endoglucanasa de los hongos <i>P. funiculosum</i> FG1, <i>F. verticillioides</i> FG3 y <i>C. cladosporioides</i> FC2, utilizando CMC y Avicel como fuentes de carbono.....	49

Figura 20. Actividad enzimática exoglucanasa de los hongos <i>P. funiculosum</i> FG1, <i>F. verticillioides</i> FG3 y <i>C. cladosporioides</i> FC2, empleando CMC y Avicel como fuentes de carbono. ....	50
Figura 21. Actividad enzimática glucosidasa de los hongos <i>P. funiculosum</i> FG1, <i>F. verticillioides</i> FG3 y <i>C. cladosporioides</i> FC2, utilizando CMC y Avicel como fuentes de carbono. ....	51
Figura 22. Actividades endoglucanasa (a), exoglucanasa (b) y glucosidasa (c) de <i>P. funiculosum</i> FG1 en fermentación sumergida en tres medios minerales distintos (A, B y C), empleando el residuo de moringa sin pretratar (M) y Avicel (A) como fuente de carbono .....	53
Figura 23. Caracterización de la composición (celulosa, hemicelulosa y lignina) del residuo de moringa sin pretratar y pretratado con ácido sulfúrico (2 y 3%).....	55
Figura 24. Actividades enzimáticas de <i>P. funiculosum</i> FG1, gráfica a) actividad Eng, gráfica b) ExG y gráfica c) BG, utilizando residuo de moringa y Avicel como fuente de carbono antes y después de realizarse la concentración por liofilización o ultrafiltración.....	56
Figura 25. Hidrólisis enzimática de moringa utilizando el extracto enzimático concentrado de <i>P. funiculosum</i> FG1. ....	57

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Porcentaje de lignina en hierbas, madera blanda y madera dura.....	8
Cuadro 2. Ubicación de los lugares donde se tomaron las muestras de biomasa aérea de moringa y sus coordenadas geográficas.....	26
Cuadro 3. Criterio de actividad celulolítica propuesto por Ramírez y Cocha (2003)...	28
Cuadro 4. Distribución por ubicación y datos de distribución de los microorganismos aislados de <i>M. oleífera</i> . ....	39
Cuadro 5. Análisis cualitativo de actividad celulolítica de los 48 microorganismos aislados y purificados de biomasa de <i>M. oleífera</i> de acuerdo a la escala propuesta por Ramírez y Cocha (2003).....	40
Cuadro 6. Clasificación científica de los tres hongos seleccionados.....	44
Cuadro 7. Cantidad de sólidos, humedad y ceniza del residuo de moringa sin pretratar y pretratada con ácido sulfúrico. ....	54

## RESUMEN

*Moringa oleifera* es una planta utilizada con múltiples propósitos a nivel mundial. En el estado de Sinaloa se ha validado el cultivo intensivo de moringa en sistema de riego y temporal con excelente producción de biomasa lignocelulósica. En este trabajo se aislaron y purificaron 48 microorganismos de la biomasa aérea de moringa (41 cepas bacterianas y 7 cepas fúngicas). De las cepas purificadas, 42 presentaron actividad celulolítica y las tres con la mayor actividad fueron seleccionadas e identificadas morfológica y molecularmente como: *Penicillium funiculosum* FG1 (KR185322), *Fusarium verticillioides* FG3 (KR185323), y *Cladosporium cladosporioides* FC2 (KR185324). A las tres cepas de hongos filamentosos se les evaluó la capacidad de utilizar celulosa amorfa (Carboximetilcelulosa<sup>®</sup>, CMC) y cristalina (Avicel<sup>®</sup>) como fuente de carbono en fermentación sumergida. Se determinó que las tres cepas produjeron la mayor cantidad de azúcares reductores (1.18 mg/mL) en la fermentación que contenía CMC como fuente de carbono. También, se evaluaron las actividades celulolíticas en los extractos proteícos de las cepas. *P. funiculosum* y *C. cladosporioides* presentaron valores similares de endoglucanasa (606.16 U/L y 604.15 U/L respectivamente) y exoglucanasa (205.73 U/L y 200.96 U/L respectivamente) en medio Avicel, mientras que *F. verticillioides* mostró la máxima actividad de  $\beta$ -glucosidasa (663.78 U/L) en medio con CMC. De estos resultados, *P. funiculosum* fue seleccionado para evaluar la producción de celulasas en tres medios de cultivo (A, B y C) utilizando paja de moringa como fuente de carbono en fermentación sumergida. Las mejores actividades obtenidas fueron empleando el medio C (EnG 1,965.43, ExG 2,015.76 y BG 923.76). Adicionalmente, la paja de moringa fue sometida a un pretratamiento químico con la finalidad de incrementar la accesabilidad a la celulosa y su posterior sacarificación. Se evaluaron diferentes concentraciones de ácido sulfúrico, obteniéndose la máxima concentración de celulosa (63.66%) con 2% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se realizó la hidrólisis enzimática de paja de moringa pretratada y sin pretratar, utilizando el extracto enzimático concentrado de *P. funiculosum*, obteniéndose la máxima cantidad de azúcares (67.93 mg/g) en el tratamiento con paja de moringa sin pretratar.

## ABSTRACT

*Moringa oleifera* is a plant used for multiple purposes worldwide. In the state of Sinaloa has been validated moringa's intensive cultivation in irrigation and temporary system with excellent production of lignocellulosic biomass. In this work, were isolated and purified 48 microorganisms of aerial biomass of moringa (41 bacterial strains and 7 fungal strains). Of the purified strains, 42 presented cellulolytic activity and the three with the highest activity were selected and identified morphologically and molecularly as: *Penicillium funiculosum* FG1 (KR185322), *Fusarium verticillioides* FG3 (KR185323), and *Cladosporium cladosporioides* FC2 (KR185324). To the three strains of filamentous fungi were evaluated their ability to use amorphous (Carboxymethylcellulose®, CMC) and crystalline cellulose (Avicel®) as carbon source in submerged fermentation. It was determined that the three strains produced the highest amount of reducing sugars (1.18 mg/mL) in CMC as carbon source. Also, the cellulolytic enzymatic activities were evaluated in the protein extracts generated by the three strains. *P. funiculosum* and *C. cladosporioides* presented similar values of endoglucanase (606.16 U/L and 604.15 U/L respectively) and exoglucanase (205.73 U/L and 200.96 U/L respectively) in Avicel® medium, while *F. verticillioides* showed the highest level of  $\beta$ -glucosidase activity (663.78 U/L) in medium with CMC. From these results, *P. funiculosum* was selected to evaluate the production of cellulases in three culture media (A, B and C) using moringa straw as a carbon source in submerged fermentation. The best activities obtained were using the medium C (EnG 1,965.43, ExG 2,015.76 and BG 923.76). Additionally, moringa straw was subjected to a chemical pretreatment in order to increase accessibility to cellulose and its subsequent saccharification. Different concentrations of sulfuric acid were evaluated, obtaining the maximum concentration of cellulose (63.66%) with 2% of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The enzymatic hydrolysis of moringa straw pretreated and without pretreatment was performed, using the concentrated enzymatic extract of *P. funiculosum*, obtaining the maximum amount of sugars (67.93 mg/g) in the treatment with moringa straw without pretreatment.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las celulasas juegan un papel clave en la hidrólisis del enlace entre glucosas en la celulosa, estas enzimas representa aproximadamente el 20% del mercado en el mundo (Darabzadeh *et al.*, 2018). Las celulasas tienen potencial biotecnológico en diversas industrias entre ellas: la industria alimentaria (incluyendo, cerveza y vino), industria química, alimentación animal, industria textil y lavandería, industria de la pulpa y papel, agricultura, biocombustibles, así como en investigación y desarrollo de proteínas (Bamforth 2009; Liu *et al.*, 2010; Han y He, 2010; Kuhad *et al.* 2011; Rodríguez y Castillo, 2014). En los últimos años, las investigaciones sobre las enzimas celulasas no sólo han generado conocimientos científicos significativos, sino que han revelado su enorme potencial en biotecnología, generando avances significativos en la tecnología de producción y modificación de enzimas celulasas utilizando varios enfoques (Gupta *et al.*, 2013). En respuesta a la demanda creciente de celulasas, se exhorta a la búsqueda, investigación y estudio de diferentes microorganismos con alta producción de estas proteínas (Martínez-Anaya *et al.*, 2008).

Las celulasas pertenecen principalmente a tres grupos de enzimas conocidas como endoglucanasas (EnG), exoglucanasas (ExG) y  $\beta$ -glucosidasas (BG). El mecanismo de actuación de las celulasas más aceptado implica una acción sinérgica secuencial entre las EnG y ExG sobre la celulosa (Amore *et al.*, 2013). Las EnG actúan hidrolizando aleatoriamente los enlaces  $\beta$ -(1,4) centrales de la cadena de celulosa, creando extremos libres. Las ExG, también llamadas celobiohidrolasas, actúan sobre los extremos de las cadenas liberando monómeros de glucosa, celobiosa y oligosacáridos de bajo peso molecular. Las BG, son las encargadas de hidrolizar las moléculas de celobiosa en dos moléculas de glucosa. También se produce otro sinergismo entre las EnG y ExG y las BG, ya que esta última degrada la celobiosa que tiene un efecto fuertemente inhibitorio sobre EnG y ExG (Yue *et al.*, 2004).

El material celulósico es particularmente atractivo como fuente de carbono y energía. Sin embargo, debido a su estructura muy estable químicamente (carácter cristalino o

recalcitrante) solamente ciertos organismos producen las enzimas necesarias para utilizarlo (Zhao *et al.*, 2012). Se han identificado dos importantes grupos de microorganismos con capacidades celulolíticas: El primero de ellos es el grupo anaeróbico, que comprende especies bacterianas y fúngicas habitantes de aguas residuales, así como en el rumen y tracto intestinal de los animales herbívoros y algunos insectos (Cazemier *et al.*, 2003; Warnecke *et al.*, 2007). El segundo grupo incluye especies aeróbicas habitantes de los suelos, tales como las bacterias *Cellulomonas* (Elberson *et al.*, 2000), *Streptomyces* (Alani *et al.*, 2008) y los hongos basidiomicetos responsables de la pudrición de la madera (Baldrian y Valaskova, 2008; Martínez *et al.*, 2005). *Trichoderma reesei* es el hongo más utilizado y del que se han aislado celulasas y xilanasas con aplicaciones industriales, por lo que sus enzimas han sido ampliamente estudiadas y se presentan como modelo de la degradación de la celulosa (Druzhinina *et al.*, 2006).

El presente trabajo de tesis forma parte del proyecto denominado “Tecnologías para el cultivo, manejo poscosecha, producción de biocombustibles y coproductos de moringa en México”, fondo SAGARPA CONACYT (N° 175519). *Moringa oleifera* pertenece a la familia Moringaceae, un grupo pequeño de plantas dentro del inmenso orden Brassicales que incluye la familia de la col y del rábano, junto con la familia del mastuerzo y de las alcaparras (APG, 2009). Se sabe muy poco de la planta de moringa en estado silvestre, se ha registrado en los bosques tropicales caducifolios del noroeste de la India y en el este de Pakistán (Haines, 1922), en la zona entre Simla en la India y Faisalabad en Pakistán (Verdcourt, 1985); sin embargo, existen pocos registros publicados acerca de la distribución natural de la planta. Este árbol tiene un gran potencial para su cultivo en México así como en muchas partes de América tropical por su combinación singular de propiedades. Las hojas son comestibles, tienen altos niveles de proteínas totales ( $383.0 \pm 13.0$  g kg<sup>-1</sup> de materia seca) y en las semillas se encuentra aceite comestible con ácidos grasos principalmente insaturados (Abdulkarim *et al.*, 2005). Las hojas secas presentan 19 aminoácidos, vitamina E, betacaroteno y minerales (Moyo *et al.*, 2011). Los desechos del prensado de las semillas para obtener el aceite contienen uno de los floculantes o

aglutinantes vegetales más potentes que se conocen y pueden eliminar la turbidez del agua. Se le atribuye a la moringa acción antibiótica, antiparasitaria, estimulante del sistema inmune y antiinflamatorio. Sus hojas ofrecen un forraje nutritivo para los animales, así como también los residuos de las semillas después de la extracción de aceite (Martínez, 1959; Reyes *et al.*, 2006; Moyo *et al.*, 2011).

La moringa proveniente de Asia, fue introducida a México y en el estado de Sinaloa existen ejemplares que se han adaptado a las condiciones climáticas regionales; se han localizado en distintas ciudades de este estado, principalmente en camellones, jardines públicos y panteones; en la mayoría de los casos presentan buen desarrollo, así como tolerancia a plagas y enfermedades. También se ha establecido el cultivo de moringa en Sinaloa, en sistemas intensivos tando de temporal como de riego (Pérez *et al.*, 2010).

Este proyecto tiene como objetivo producir celulasas en fermentación sumergida utilizando microorganismos aislados de *M. oleifera* con potencial aplicación en procesos biotecnológicos, como lo es la producción de bioetanol de segunda generación, donde se utilizan enzimas celulolíticas para hidrolizar la biomasa rica en celulosa y así obtener los azúcares reductores que se requieren para la fermentación alcohólica.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Biomasa lignocelulósica

Los materiales lignocelulósicos (celulosa, hemicelulosa y lignina) (figura 1) son los principales y más abundantes componentes de la biomasa producida por la fotosíntesis, anualmente se forman 200,000 millones de toneladas en el mundo (Ragauskas *et al.*, 2006). La pared celular de las plantas está formada por lignocelulosa, la composición y porcentajes de los polímeros varían entre las especies de plantas, incluso entre la edad y la etapa de crecimiento (Jeffries, 1994).

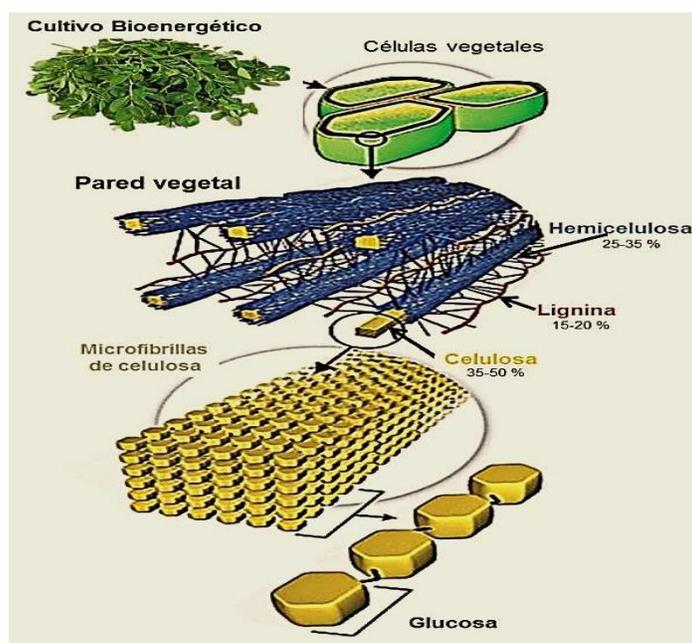


Figura 1. Conformación estructural de la biomasa lignocelulósica (Figura modificada: Genome management information system/ORNL).

La biomasa lignocelulósica puede clasificarse según Sánchez y Cardona (2008) en seis grupos principales: i) residuos agrícolas (bagazo de caña de azúcar, bagazo de maíz, paja de trigo, paja de arroz, paja de cebada), ii) maderas duras (álamo, chopo), iii) maderas blandas (pino, píceas), iv) residuos celulósicos (papel de periódico, lodos de papel reciclado, residuos de papel de oficina), v) biomasa herbácea (alfalfa, alpiste, limoncillo); y vi) residuos sólidos urbanos (RSU).

La biomasa lignocelulósica es una fuente de materia prima renovable, abundante e inagotable, atractiva por su bajo costo y alta disponibilidad en forma de residuos o

desechos del sector agrícola e industrial, es rica en azúcares complejos, que pueden ser convertidos a combustible líquido para el transporte y otros productos químicos reduciendo el impacto en los recursos de la tierra y sin poner en peligro a la seguridad alimentaria (Blaschek *et al.*, 2010).

Generalmente la biomasa lignocelulósica está compuesta de celulosa, hemicelulosa, y lignina (O'Donovan *et al.*, 2013). Sin embargo, el principal impedimento para su utilización es la falta de una tecnología para degradar la fracción recalcitrante de la biomasa. Aunque existen métodos fisicoquímicos que permiten utilizar la biomasa, una alternativa prometedora son los métodos biológicos que utilizan organismos celulolíticos para generar azúcares fermentables a partir de la celulosa y hemicelulosa (Lynd *et al.*, 2002).

La descomposición de la lignocelulosa por microorganismos comprende un paso del ciclo global del carbono, ya que facilita el reciclaje de carbono depositado en forma de polímeros estructurales en las paredes celulares de las plantas (Bayer *et al.*, 1998). Para que esta descomposición se realice con mayor efectividad se puede realizar un pretratamiento de la biomasa lignocelulósica, este pretratamiento tiene como objetivo reducir la cristalinidad de la celulosa, aumentar la celulosa amorfa, disociar el complejo celulosa-lignina, donde la lignina es liberada o descompuesta en unidades elementales, aumentando el área superficial del material y disminuyendo la presencia de aquellas sustancias que dificulten la hidrólisis (Rangel, 2012).

### 2.1.1 Celulosa

La celulosa es un polisacárido constituido por unidades de anhidro glucosa, las cuales se mantienen unidas mediante enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos (figura 2a). La configuración  $\beta$  le permite a la celulosa formar cadenas largas y lineales, las cuales no se presentan aisladas sino unidas entre sí mediante enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares y fuerzas de Van der Waals intramoleculares. Los enlaces de hidrógeno intermoleculares permiten una estructura fibrilar terciaria de alta cristalinidad formando una estructura supramolecular cristalina organizada (o

altamente ordenadas) rígida. También existen regiones amorfas o desordenadas, las cuales son susceptibles a la degradación enzimática (figura 2b) (Béguin y Aubert, 1994; Nishiyama *et al.*, 2002; Ovando y Waliszewski, 2005). La hidrofobicidad de la celulosa hace que sea resistente a la hidrólisis química debido a la formación de una capa acuosa densa cerca de la superficie de celulosa hidratada (Matthews *et al.* 2006).

El tamaño de las moléculas de celulosa (grado de polimerización) varía de 7,000 a 14,000 subunidades de glucosa por molécula en la pared secundaria de las plantas, pero puede estar por debajo de 500 unidades de glucosa por molécula en la pared primaria (Leschine, 1995). Generalmente, el porcentaje y cristalinidad de formas de celulosa dentro de la pared celular de las plantas varía de acuerdo al tipo de célula y al estadio de desarrollo. La celulosa está usualmente asociada con otras sustancias en las plantas, este tipo de asociaciones puede afectar su degradación natural (Zayed *et al.*, 2015).

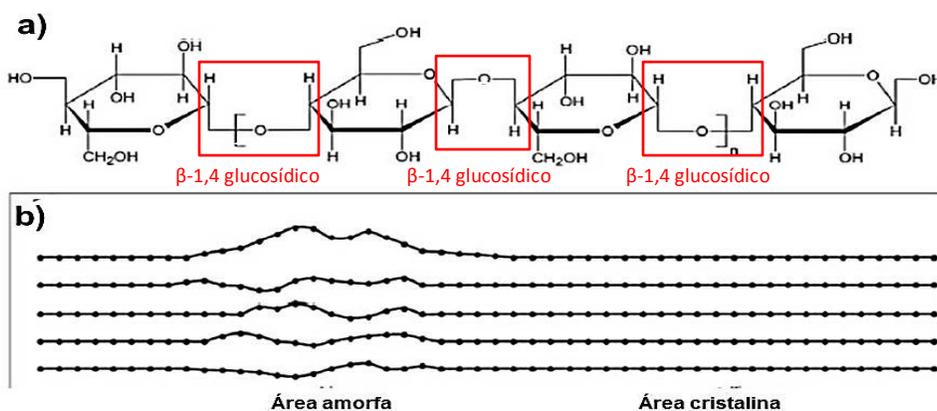


Figura 2. Estructura de la celulosa: a) Unidades de glucosa unidas mediante enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos, b) Fibras de celulosa con áreas amorfas susceptibles a la hidrólisis enzimática y áreas cristalinas de mayor resistencia a la hidrólisis por su acomodo en el espacio de su estructura (Laureano-Pérez *et al.*, 2005).

### 2.1.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) que forman cadenas ramificadas y los ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y

D-glucurónico, los azúcares están unidos por enlaces  $\beta$ -1,4 y ocasionalmente por enlaces  $\beta$ -1,3 (figura 3) (Pérez *et al.*, 2002).

A diferencia de la celulosa y la lignina, las hemicelulosas son solubles e higroscópicas, están estrechamente asociadas con la lignina a través del éster de ácido cinamato y con celulosa a través de enlaces de hidrógeno extensivos. Funcionalmente, hemicelulosa, junto con la celulosa y la lignina, proporciona rigidez y flexibilidad a la pared celular de la planta. Debido a su naturaleza hidrófila, también retiene el agua en la pared celular (Santhanam *et al.*, 2012).

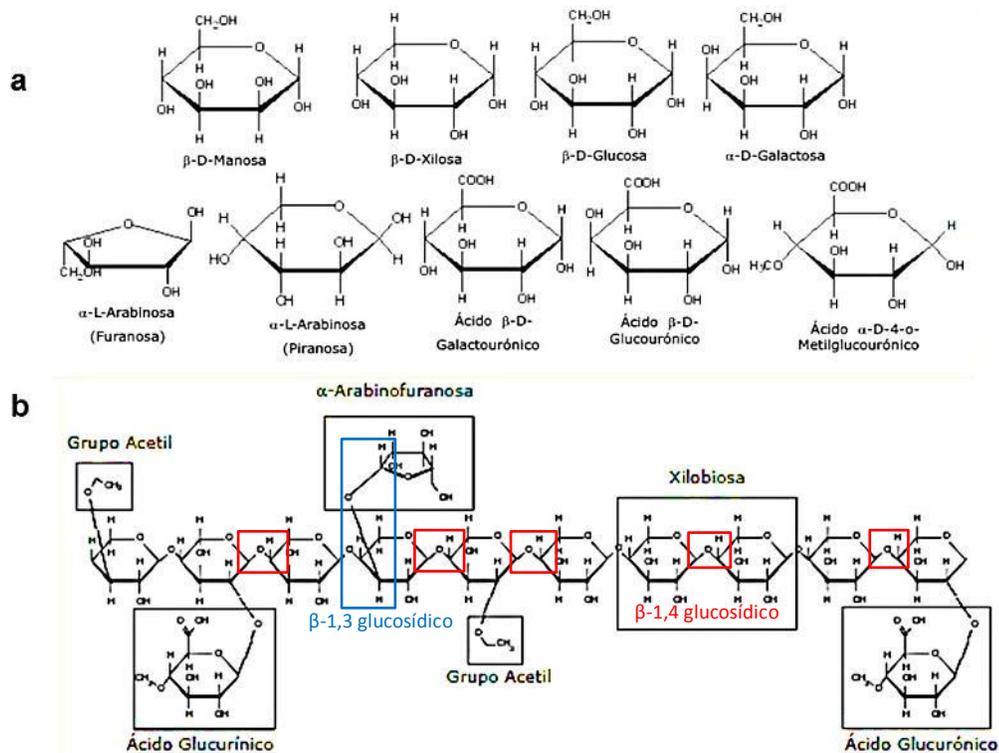


Figura 3. Estructura de la hemicelulosa: a) Monómeros constituyentes de hemicelulosa y b) ejemplo de polímero en hemicelulosa.

### 2.1.3 Lignina

La lignina es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado, formado por copolímeros que se derivan principalmente de tres unidades fenilpropano-monoméricas (monolignoles) básicas: alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico, cuyas estructuras se muestran en la figura 4 (Chávez y Domine,

2013). La lignina da soporte estructural, rigidez, impermeabilidad y protección a los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa) y es altamente resistente a la degradación química y biológica, permite el transporte de agua y nutrientes a través del sistemas vascular y proporciona resistencia a la planta contra tensiones bióticas como patógenos de plantas y estrés abiótico como cambios en la humedad (Aro *et al.*, 2005).

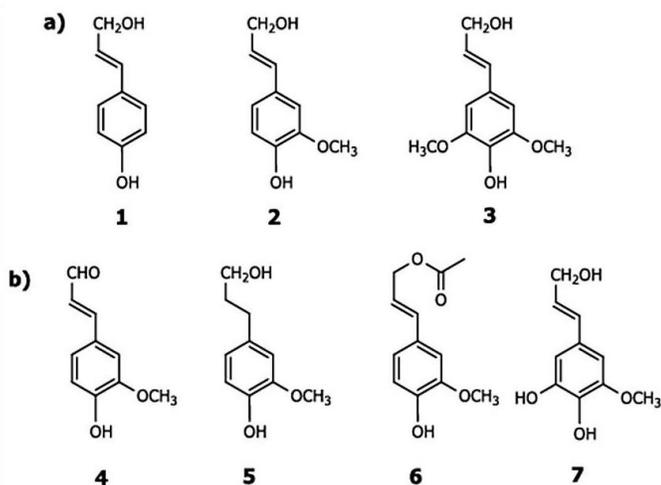


Figura 4. Elementos estructurales de la lignina: a) monolignoles más comunes encontrados en los bloques de construcción de la lignina: 1: alcohol *p*-cumarílico, 2: alcohol coniferílico, 3: alcohol sinapílico, b) otros tipos de monolignoles (coniferil-derivados): 4: coniferaldehído, 5: alcohol dihidroconiferílico, 6: alcohol coniferil-9-acetato, 7: alcohol 5-hidroconiferílico.

El alcohol *p*-cumarílico es un componente menor de las ligninas del tipo hierba y forraje. El alcohol coniferílico es el monómero de lignina predominante en las maderas blandas. Los alcoholes coniferílico y sinapílico son los bloques huecos de la lignina de la madera dura. El cuadro 1, muestra las diferentes cantidades de los componentes de construcción de lignina en tres tipos de fuentes de biomasa lignocelulósicas.

Cuadro 1. Porcentaje de lignina en hierbas, madera blanda y madera dura.

Componentes de lignina	Hierbas y forraje (%)	Maderas blandas (%)	Madera dura (%)
<i>p</i> - alcohol cumarílico	10-25	0.5-3.5	Traza
Alcohol coniferílico	25-50	90-95	25-50
Alcohol sinapílico	25-50	0-1	50-75

#### 2.1.4 Otros compuestos

La biomasa vegetal incluye también una fracción de bajo peso molecular que engloba diferentes compuestos extraíbles como lipofílicos y polares. Una de las principales funciones de los compuestos extraíbles es la protección de la planta contra patógenos. Los compuestos polares engloban diferentes compuestos fenólicos libres de bajo peso molecular, lignanos (dilignoles y compuestos relacionados), taninos y flavonoides, entre otros. Y dentro de los compuestos lipofílicos se encuentran los ácidos grasos libres, alcoholes grasos libres, hidrocarburos, ceras, grasas, terpenos, y esteroides. Estos, contribuyen al color, olor y difusión de agua (cutina y suberina principalmente). Los compuestos inorgánicos son determinados como las cenizas (Na, K, Ca, Si, Fe, Mg, Mn, Cl y Cr) residuos que permanecen después de quemar la biomasa a altas temperaturas; suelen ser menores a 2% de peso seco de la madera, pero varían de una especie a otra (Cunningham y López, 1994; Taiz y Zenger, 2002; Montoya *et al.*, 2014).

#### 2.1.5 *Moringa oleifera*

*M. oleifera* pertenece a la familia Moringaceae, un grupo pequeño de plantas dentro del inmenso orden Brassicales que incluye la familia de la col y del rábano, junto con la familia del mastuerzo y de las alcaparras (APG, 2009). La familia más cercanamente emparentada con Moringaceae es Caricaceae, la de la papaya, con la cual comparte la característica de presentar glándulas en la punta del peciolo (Olson, 2002b). Moringaceae comprende únicamente un género, *Moringa*. Dentro de *Moringa* hay 13 especies (Verdcourt, 1985; Olson, 2002a), las cuales abarcan una gama muy diversa de hábitos o formas de crecimiento, desde pequeñas hierbas y arbustos hasta árboles grandes (Olson y Razafimandimbison, 2000). Si bien varían mucho en su forma, es muy fácil distinguir un miembro de *Moringa* de cualquier otra planta. Se sabe muy poco de *M. oleifera* en estado silvestre, se ha registrado en los bosques tropicales caducifolios del noroeste de la India y en el este de Pakistán (Haines, 1922), en la zona entre Simla en la India y Faisalabad en Pakistán (Verdcourt, 1985); sin embargo, existen pocos registros publicados acerca de la distribución natural de la planta.

*M. oleífera* es un árbol perenne pero poco longevo, que a lo sumo puede vivir 20 años, aunque se han obtenido variedades en la India que son anuales y permiten el cultivo mecanizado. Es una especie de muy rápido crecimiento. Alcanza de 7-12 m de altura y de 20-40 cm de diámetro, con una copa abierta tipo paraguas y fusto recto, la corteza es blanquecina (figura 5a). Aporta una elevada cantidad de nutrientes al suelo, además de protegerlo de factores externos como la erosión, la desecación y las altas temperaturas. Las hojas son compuestas de unos 20 cm de largo con hojuelas delgadas oblongas u ovaladas de 1 a 2 cm de largo de color verde claro (figura 5b). Las flores son bisexuales, con pétalos de color crema y estambres amarillos, muy numerosas y fragantes (figura 5c). En algunas regiones florece una sola vez al año, pero puede florecer dos veces al año; tal es el caso de los países del Caribe, como Cuba. Generalmente en el Chaco Central (área que se extiende entre Argentina y Bolivia) florece una vez por año. Las flores son polinizadas por abejas, otros insectos y algunas aves. Los frutos en cápsulas trilobuladas (figura 5b), dehiscentes, de 20 a 40 cm de longitud. Contienen de 12 a 25 semillas por fruto. Las semillas son de forma redonda y color castaño oscuro, con tres alas blanquecinas. Cada árbol puede producir de 15,000 a 25,000 semillas por año. Las vainas maduras permanecen en el árbol por varios meses antes de partirse y de liberar las semillas, las cuales son dispersadas por el viento, agua y probablemente animales. Las semillas son carnosas cubiertas por una cáscara fina de color café. Poseen tres alas o semillas aladas de 2.5 a 3 mm de largo. Al quitar la cáscara se obtiene el endospermo que es blanquecino y muy oleaginoso. Cuando se almacenan las semillas por más de dos meses disminuye su poder germinativo. La raíz principal mide varios metros y es carnosa en forma de rábano. Es pivotante y globosa lo que le brinda a la planta cierta resistencia a la sequía en periodos prolongados. Si se le hacen cortes a la corteza, produce una goma de color rojizo parduzco (Falasca y Bernabé, 2009).

Este árbol tiene un gran potencial para su cultivo en México así como en muchas partes de América tropical por su combinación singular de propiedades. Las hojas son comestibles, tienen altos niveles de proteínas totales ( $383.0 \pm 13.0$  g kg<sup>-1</sup> de

materia seca) y en las semillas se encuentra aceite comestible con ácidos grasos principalmente insaturados (oleico 67.9–70.0%, palmitoleico, linoleico, linolénico y eicosenoico) (Abdulkarim *et al.*, 2005). Las hojas secas presentan 19 aminoácidos, vitamina E (77 mg/100 g), betacaroteno (18.5 mg/100 g) y los siguientes contenidos minerales: calcio (3.65%), fósforo (0.3%), magnesio (0.5%), potasio (1.5%), sodio (0.164%), azufre (0.63%), zinc (13.03 mg/kg), cobre (8.25%) y manganeso (86.8%) (Moyo *et al.*, 2011). Los desechos del prensado de las semillas para obtener el aceite contienen uno de los floculantes o aglutinantes (proteína catiónica) vegetales más potentes que se conocen y pueden eliminar la turbidez del agua (Kebreab *et al.*, 2005). Se le atribuye a la moringa acción antibiótica, antiparasitaria, estimulante del sistema inmune y antiinflamatorio. Sus hojas ofrecen un forraje nutritivo para los animales, así como también los residuos de las semillas después de la extracción de aceite (Martínez, 1959; Reyes *et al.*, 2006; Moyo *et al.*, 2011, Velázquez *et al.*, 2016).

La moringa fue introducida a México probablemente desde 1519 proveniente de Asia, desde entonces han persistido ejemplares en el estado de Sinaloa, que están perfectamente adaptados a las condiciones climáticas regionales; se han localizado en distintas ciudades de este estado, principalmente en camellones, jardines públicos y panteones; en la mayoría de los casos presentan buen desarrollo, así como tolerancia a plagas y enfermedades (Pérez *et al.*, 2010). Se ha establecido el cultivo de moringa en Sinaloa, el sistema intensivo en temporal produce dos cosechas por temporada, con un rendimiento de 80 toneladas de biomasa por hectárea (una cosecha de 50 toneladas en verano y otra de 30 en invierno). La planta de moringa resiste hasta seis meses de sequía, por lo que puede mantenerse viva de una temporada de lluvias a otra. El sistema intensivo en riego produce hasta 210 toneladas de biomasa por hectárea, distribuidas en siete cosechas anuales, con promedio de 30 toneladas por corte. La planta de moringa bajo este sistema se puede mantener por varios ciclos productivos (Pérez *et al.*, 2010).

En los cultivos intensivos de moringa no se permite que la planta se desarrolle como un árbol, se mantiene como un arbusto y al realizar los cortes se genera paja residual

principalmente de tallos de madera blanda. Estos pueden ser aprovechados como fuente de carbono económica para los microorganismos celulolíticos en fermentación sumergida en el proceso de producción de enzimas.

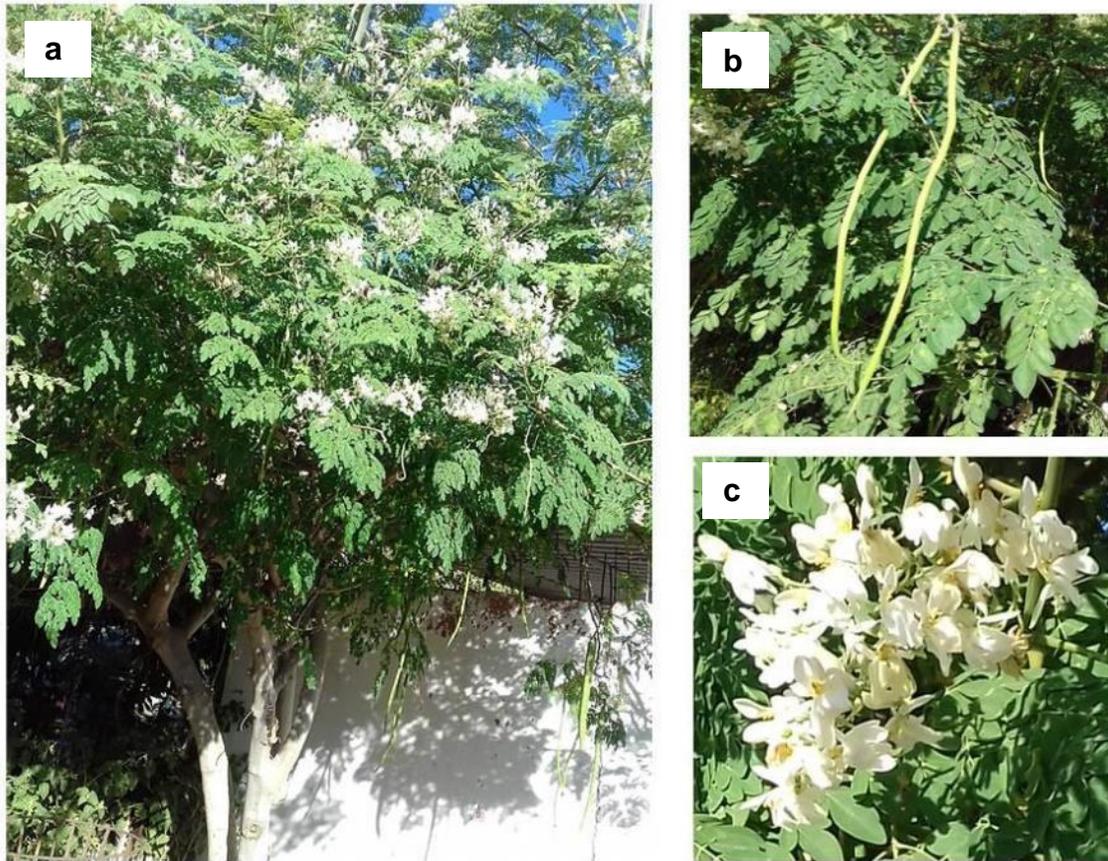


Figura 5. Árbol de *Moringa oleifera* en Guasave, Sin. a) Árbol de moringa presenta copa abierta tipo paraguas y fusto recto, b) hojas compuestas y frutos en cápsulas trilobuladas, c) flores bisexuales, con pétalos de color crema y estambres amarillos.

## 2.2 Fermentación sumergida o líquida

Fermentación, es un término que deriva del latín fermentar (hervir), inicialmente reservado a la actividad microbiana anaerobia, se fue aplicando asimismo a procesos aerobios y finalmente también a aquéllos que utilizan células animales y vegetales. En la actualidad se está haciendo muy general, no se puede aplicar con precisión a un determinado tipo de proceso biológico. Un proceso de fermentación típico es esencialmente un proceso que se lleva a cabo en un recipiente llamado fermentador o en general, biorreactor, mediante el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivo y son transformados por acción microbiana en metabolitos y

biomasa. El microorganismo va aumentando en su concentración en el transcurso del proceso al mismo tiempo que el medio se va modificando y se forman productos nuevos como consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas. Los dos fenómenos crecimiento y formación de producto, tienen lugar durante el desarrollo del proceso simultáneamente o no según los casos (OEA, 2006).

La fermentación puede realizarse en medio sólido o líquido. En el cultivo en medio sólido los microorganismos crecen sobre la superficie de materiales sólidos porosos y bajos niveles de humedad (límite inferior  $\approx 12\%$ ) (Nigam y Singh, 1994). Este cultivo presenta desventajas como: la determinación de biomasa y la reproducibilidad de los experimentos es difícil por la heterogeneidad de los sustratos empleados, asimismo los gradientes de temperatura, oxígeno y pH no pueden ser controlados (Krishna, 2005). Por consiguiente, la mayoría de las enzimas utilizadas en procesos industriales se producen por fermentación en medio líquido o fermentación sumergida (en inglés como SmF) (Rendueles y Díaz, 2014).

La fermentación en estado líquido o fermentación sumergida, es una técnica de cultivo de células microbianas dispersas en forma homogénea en un recipiente agitado que puede ser o no aireado por medios mecánicos. La forma de fermentación líquida más utilizada en los laboratorios es en matraz agitado. El desarrollo de esta técnica ha sido importante porque ha permitido el cultivo de organismos aeróbicos en condiciones homogéneas con una densidad moderada de la biomasa y ha simplificado el estudio de la fisiología de los organismos (Henzler y Schedel, 1991). A su vez, el cultivo de suspensiones de células en fermentadores agitados ha evolucionado a gran escala, siendo éstos los más utilizados industrialmente, donde se pueden ver fermentadores con volúmenes de 10 litros o más, en los cuales se producen compuestos derivados del metabolismo microbiano. En estos sistemas, la agitación mecánica permite mezclar el cultivo de forma homogénea y aumentar la transferencia del gas a la biomasa (Vásquez, 2013). En este tipo de fermentación pueden controlarse más variables (temperatura, aireación y pH), se mantiene estable el medio de crecimiento y el producto final es fácil de

recuperar (Crueger y Crueger, 1993). Los productos metabólicos y el calor se disipan fácilmente, por lo que, no son un factor que afecte negativamente el crecimiento del microorganismo. Algunos factores que afectan en la transferencia de oxígeno son las características geométricas y operacionales de los recipientes de fermentación, la composición del medio de cultivo, la viscosidad, la tensión superficial, la concentración de oxígeno en la corriente de gas, la morfología del microorganismo y el área superficial que proveen las burbujas (Raimbault, 1998; Soler y Buitrago, 2010).

### **2.3 Biodegradación enzimática de la celulosa**

La naturaleza cristalina de la celulosa hace que sea altamente resistente a descomposición enzimática. La accesibilidad a la celulosa en las paredes de las células vegetales es obstruida por el hecho de que los biopolímeros no celulósicos son extensamente unidos por puentes de hidrógeno a la superficie de microfibrillas de celulosa y forman una barrera física compleja protegiéndola del ataque biótico externo (Liyama *et al.*, 1994). La mayor parte de la celulosa de árboles y plantas caídos en el suelo es degradada por hongos aerobios y bacterias usando enzimas denominadas celulasas. También, diversos organismos han evolucionado y a través de asociaciones simbióticas presentan la capacidad para degradar la celulosa. Un ejemplo, son las termitas que en simbiosis con protozoos en sus tractos digestivos hidrolizan la celulosa (Watanabe y Tokuda 2001; Warnecke *et al.*, 2007; Hess *et al.*, 2011). La masticación del forraje por herbívoros como vacas, ciervos y ovejas también desempeña un papel importante en la degradación de la biomasa. La fibra vegetal se retiene en sus tractos digestivos durante un tiempo suficientemente largo y es digerido por las bacterias rúmbiales anaerobias y hongos (Desvaux 2006).

#### **2.3.1 Microorganismos productores de celulasas**

Algunos microorganismos aerobios producen celulasas con diferentes modos de acción para hidrolizar la celulosa (Henrissat, 1991). Los hongos basidiomicetos y las bacterias aerobias degradan el material celulósico a través de la producción de

celulasas extracelulares (Lynd *et al.*, 2002). Las bacterias del género *Cellulomonas* (Elberson *et al.*, 2000), *Bacillus* (Kim *et al.*, 2012), *Acetobacter* (Czaja *et al.*, 2007) y *Streptomyces* (Alani *et al.*, 2008), así como los hongos basidiomicetos responsables de la pudrición de la madera (Baldrian y Valaskova, 2008), son los organismos más estudiados en esta área porque producen celulasas que dominan las aplicaciones industriales. Entre estos últimos se encuentran *Sclerotium rolfsii*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Volvariella volvacea*, *Schizophyllum commune*, *Pycnoporus sanguineus*, *Bjerkandera adusta*, y algunos ascomicetos como *Trichoderma reesei*, y especies de *Aspergillus*, y *Penicillium* (Sternberg, 1976; Duff y Murray, 1996; Ding *et al.*, 2006; Quiroz *et al.*, 2009). Los hongos y bacterias anaerobias degradan la celulosa a través de celulosomas, habitan en aguas residuales, en el rumen y el tracto intestinal de los animales herbívoros e insectos como escarabajos y termitas (Cazemier *et al.*, 2003; Warnecke *et al.*, 2007). Géneros de bacterias pertenecientes a este grupo son *Clostridium* y *Ruminococcus*, y de los hongos *Anaeromyces mucronatus*, *Caecomyces communis*, *Cyllumyces aberencis*, *Neocallimastix frontalis*, *Orpinomyces* sp. y *Piromyces* sp. (Teunissen y Op den Camp, 1993; Cha y Doi, 2008).

### 2.3.2 Hongos celulolíticos

Los hongos son organismos heterótrofos, a diferencia de las plantas necesitan alimentarse a partir de otros organismos (vivos o muertos). Esta característica los hace más parecidos a los animales y del punto de vista filogenético, los hongos están más emparentados con los animales que con las plantas. Los hongos poseen modo de nutrición absorptiva, pero el modo en que interactúan con otros organismos es muy variable. Por ejemplo, pueden ser saprófitos y descomponer la materia orgánica muerta, infectar a otros organismos, incluyendo plantas y animales, o formando relaciones simbióticas con un amplio espectro de organismos biológicos, desde bacterias, animales y plantas (líquenes, micorrizas, hormigas cultivadoras de hongos entre otros), y parásitos. Los hongos son organismos generalmente microscópicos, unicelulares o pluricelulares filamentosos. Dentro del reino de los Hongos, existen cinco grupos principales: Chytridiomycota (hongos quitridios), Mucoromycotina

(mohos), Glomeromycota (hongos micorrícicos arbusculares), Ascomycota (ascomicetes) y Basidiomycota (basidiomicetes) (Urcelay *et al.*, 2012).

Según su morfología, los hongos se pueden dividir en dos grupos: levaduras y mohos (hongos filamentosos). Las levaduras son unicelulares y generalmente presentan reproducción asexual por gemación. Los hongos filamentosos presentan una estructura vegetativa denominada micelio, el cual está formado por una serie de tubos rígidos ramificados, dentro de los cuales se encuentra el citoplasma multinucleado. Estos tubos reciben el nombre de hifas. De esta forma a partir de una espora en germinación se desarrolla una hifa, esta se ramifica y forma un micelio. El crecimiento del hongo se prolonga hasta que los nutrientes son consumidos. Las hifas pueden ser de dos tipos: vegetativas que penetran el substrato con el fin de absorber nutrientes e hifas aéreas que son las portadoras de las estructuras reproductoras: forman esporas sexuales endógenas (ascosporas) contenidas en pequeños sacos llamados ascos y esporas asexuadas exógenas (conidios) (figura 6). La clasificación de los hongos se hace según las características de las hifas, la formación de esporas asexuales, las estructuras que contienen éstas y la capacidad de producir esporas sexuales (Schlegel y Zaborosch, 1997).

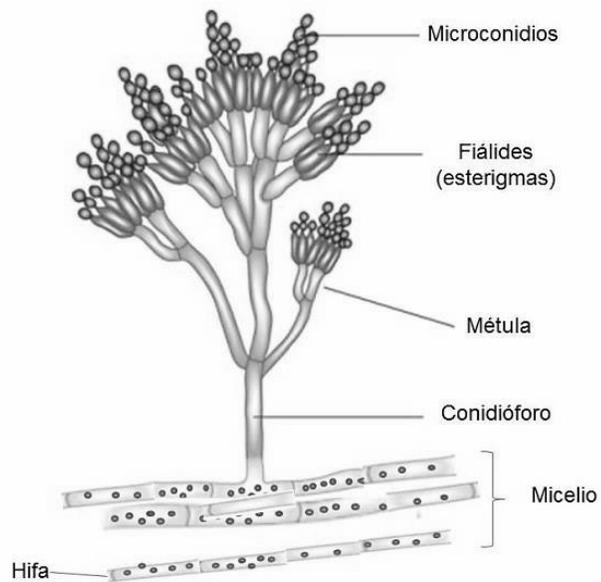


Figura 6. Recreación de las estructuras presentes en el hongo filamentoso *Penicillium* sp. (Figura modificada: Bonifaz, 2015).

## 2.4 Celulasas

Las celulasas son enzimas producidas por hongos y bacterias, así como también por algunos animales. Estas proteínas poseen un rol muy importante en la biósfera, ya que son responsables de la degradación de la celulosa. Las celulasas son un complejo de glicoproteínas que catalizan la hidrólisis del enlace  $\beta$ -1,4 glucosídico dentro del polímero de celulosa y no requieren cofactor en la actividad enzimática. Los hongos y bacterias aerobias producen mezclas de celulasas individuales que son capaces de degradar completamente la celulosa y son significativamente diferentes en su estructura y funciones. Las celulasas pertenecen principalmente a tres grupos de enzimas conocidas como endoglucanasas (EnG, EC.3.2.1.4), exoglucanasas (ExG, EC.3.2.1.74) o celobiohidrolasas (ExG, EC.3.2.1.91) y  $\beta$ -glucosidasas (BG, EC 3.2.1.21). Para la efectiva hidrólisis de la celulosa, las enzimas fúngicas han evolucionado con mecanismos sinérgicos que les permite contender con su recalcitrancia o cristalinidad (Henrissat *et al.*, 1985; Merino *et al.*, 2007; Kostyley *et al.*, 2012), observándose que la actividad máxima de degradación de la celulosa no se da por enzimas individuales, sino por mezclas de tres o más enzimas (Nidetzky *et al.*, 1994; Carrad *et al.*, 2000; Borastor *et al.*, 2004).

El mecanismo de actuación de las celulasas más aceptado implica una acción sinérgica secuencial entre las EnG y ExG sobre la celulosa (Amore *et al.*, 2013). Las EnG actúan hidrolizando aleatoriamente los enlaces  $\beta$ -1,4 centrales o intramoleculares de la cadena de celulosa creando extremos libres. Las ExG, también llamadas celobiohidrolasas, actúan sobre los extremos de las cadenas liberando monómeros de glucosa, celobiosa y oligosacáridos de bajo peso molecular. Las BG, son las encargadas de hidrolizar las moléculas de celobiosa en dos moléculas de glucosa (figura 7). También, Se han descrito cuatro tipos de sinergia: 1) endo-exo sinergia entre endoglucanasas y exoglucanasas; 2) exo-exo sinergia entre exoglucanasas que procesan los extremos reductores y no reductores de la cadena; 3) sinergia entre exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas que eliminan celobiosa y celodextrinas, y 4) sinergia intramolecular entre los dominios catalíticos y los dominios de unión a la celulosa (Gutiérrez *et al.*, 2015).

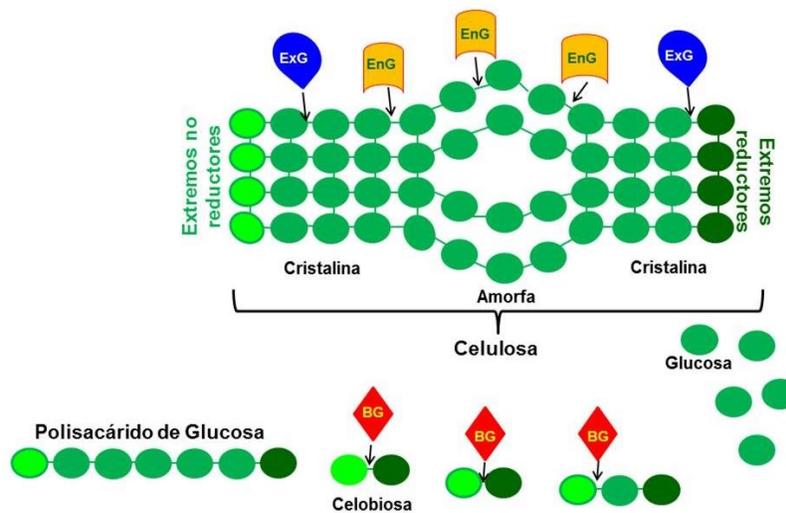


Figura 7. Hidrólisis enzimática de la celulosa. Las EnG generan extremos libres en la parte interna del polímero las ExG liberan monómeros de glucosa, celobiosa y oligosacáridos de bajo peso molecular en los extremos. Y las BG hidrolizan las moléculas de celobiosa en dos moléculas de glucosa.

También se produce otro sinergismo entre las EnG y ExG y las BG, ya que ésta última degrada la celobiosa que tiene un efecto fuertemente inhibitorio sobre EnG y ExG (Yue *et al.*, 2004). Las glicosil hidrolasas se clasifican en base a su secuencia de aminoácidos. Se clasifican por familias, esto permite identificar las características estructurales de las enzimas, deducir su mecanismo de acción y determinar relaciones evolutivas entre ellas (Davies y Henrissat, 1995). Los 10 dominios catalíticos de las celulasas se encuentran en 16 familias de glicosil hidrolasas, entre las 108 familias existentes en la base de datos de CAZY (Carbohydrate Active Enzymes, [www.cazy.org](http://www.cazy.org)).

#### 2.4.1 Propiedades de las celulasas

Las celulasas fúngicas son glicosil hidrolasas, enzimas modulares que se componen de un mínimo de dos dominios estructurales, el dominio catalizador (CD) y el módulo de unión a la celulosa (Carbohydrate Binding Domain, CBM) de aproximadamente 35 residuos de aminoácidos, mientras que dominios adicionales también pueden estar presentes. El CD y el CBM suelen estar unidos por un péptido corto rico en serina y treonina (Gupta *et al.*, 2013). Esta organización resulta importante por aumentar la

sinergia entre el dominio catalítico y el dominio de unión a la celulosa (CBD) con su sustrato natural, ya que la eliminación del enlace disminuye drásticamente la actividad enzimática sobre la celulosa cristalina (Hui *et al.*, 2002). El rol específico de este dominio no está del todo claro, se le atribuyen las funciones de participar en la degradación de la celulosa, de aumentar los sitios catalíticos al que están unidos y se cree que este dominio es necesario para la secreción de la enzima al medio extracelular (Violot *et al.*, 2005).

Cada celulasa microbiana posee un óptimo pH, un contenido significativo de hidratos de carbono, solubilidad y composición de aminoácidos similares (Whitaker, 1971; Beldman *et al.*, 1985). La estabilidad térmica y especificidad exacta del sustrato puede variar, las preparaciones de celulasas generalmente contienen otras actividades enzimáticas además de la celulasas y éstas también pueden afectar las propiedades de los preparativos (tasas de conversión de la celulosa). Las preparaciones de celulasas son eficaces entre pH 3 y 7, mientras que la temperatura óptima varía de 40 a 50 °C. Las celulasas pueden inhibirse por sus productos de reacción (glucosa y celobiosa), así como también con algunos metales. El mercurio (Hg) inhibe completamente las celulasas, mientras que los iones manganeso (Mn), plata (Ag), cobre (Cu) y zinc (Zn) son sólo ligeramente inhibidores (Clarke y Adams, 1987; Mawadza *et al.*, 2000).

#### 2.4.2 Aplicaciones de las celulasas

Las enzimas son proteínas especializadas capaces de acelerar la velocidad de una reacción química, promoviendo así la transformación de diferentes moléculas en productos específicos. La alta especificidad con la que se realizan dichas transformaciones, el volumen reducido de desechos que generan los procesos y las condiciones poco agresivas en las que se operan, han permitido que estos biocatalizadores se utilicen como elementos importantes en diversos sectores industriales. En el 2013 se calculó que el mercado global de las enzimas fue de alrededor de 4.5 billones de dólares y se espera que crezca para el 2020 a un ritmo del 8.3% y llegue a más de 7.5 billones de dólares. Dentro de este mercado se

estima que las enzimas destinadas al procesamiento de alimentos y bebidas captan alrededor de 40% del mercado global y que dentro de este sector al menos 45% están destinadas a la modificación de carbohidratos, particularmente, aquellas destinadas a la transformación de almidones. En segundo lugar, se calcula que la industria de los detergentes capta alrededor del 30% del mercado, la industria textil y la industria del papel entre del 12 y el 10% del mercado respectivamente y el resto del mercado se divide en aplicaciones diversas para industria química, farmacéutica y biológica (Rodríguez y Castillo, 2014).

#### 2.4.2.1 Celulasas en la industria de la extracción de productos vegetales

La degradación enzimática de los polisacáridos de la pared celular de los vegetales es importante en el proceso de extracción de los compuestos presentes en los vegetales y frutas, porque los preparados enzimáticos, al degradar los polisacáridos del tejido, incrementan la formación de los poros, el tamaño del poro y la porosidad total del sustrato permitiendo una mejor difusión del solvente a través del tejido de las frutas o vegetales obteniendo una mayor y rápida recuperación de los productos de interés (Ovando-Chacón y Waliszewski, 2005), como en los siguientes procesos:

1) *Jugo de naranja*. Las mezclas enzimáticas tienen un enorme potencial en el incremento de extracción del jugo y el jugo presenta un mejor sabor (Das *et al.*, 1994).

2) *Leche de coco*. Las celulasas degradan los polisacáridos en el coco liberando la leche de coco extra, que se encuentra retenida en el residuo del fruto extraído. Por otra parte los azúcares, principalmente la glucosa que es un producto de la degradación enzimática de los polisacáridos, adiciona a la leche de coco un mejor sabor, debido a que le entregan mayor dulzura a la leche (Rastogi *et al.*, 1998).

3) *Antioxidantes*. La degradación de los polisacáridos que constituyen la pared de la cáscara de uva con extractos enzimáticos con actividad mixta (pectinasa, celulasa y hemicelulasa), amplían la extracción de los fenoles y mejoran la actividad

antioxidante de los extractos fenólicos, ya que la oxidación de las lipoproteínas se aplaza por un mayor tiempo (Meyer *et al.*, 1998).

4) *Almidón*. El uso de preparados enzimáticos facilitan la liberación de los gránulos de almidón que se encuentran en las células del parénquima (Mohd *et al.*, 2001).

5) *Colorantes*. El tratamiento enzimático es una opción para mejorar la producción de xantofilas extraídas de los pétalos de caléndula (Sarker *et al.*, 1999).

6) *Aceites*. La hidrólisis enzimática de soya (Sosulski *et al.*, 2000) ajonjolí, cacahuate, girasol (Sarker *et al.*, 1999) y olivo (Garrido *et al.*, 2001) generan un aumento en el contenido de aceite extraído e incrementan la velocidad de extracción del aceite.

#### 2.4.2.2 Celulasas en la industria de la alimentación animal

Un sector en crecimiento y que se coloca rápidamente en los primeros lugares del mercado de las enzimas. En las últimas dos décadas, enzimas de tipo xilanasas y  $\beta$ -glucanasas se establecieron como aditivos en formulaciones basadas en cereales y destinadas a la alimentación de animales monogástricos, los cuales no degradan de manera eficiente alimentos basados en fibra vegetal con alto contenido de celulosa y hemicelulosa (Rodríguez y Castillo, 2014).

#### 2.4.2.3 Celulasas en la industria cervecera

La elaboración de la cerveza radica en maltear la cebada, seguida de la preparación y fermentación del mosto en la cervecería. El malteado consiste en la germinación de semillas, seguido de la biosíntesis y activación de amilasas, carboxipeptidasas y celulasas: Las cuales actúan en sinergia en condiciones óptimas para producir malta de alta calidad. Por lo tanto, la adición de celulasas mejora no sólo las cualidades de cerveza, sino también su producción (Galante *et al.*, 1998).

#### 2.4.2.4 Celulasas en la agricultura

Se utilizan hongos celulolíticos tales como *Trichoderma* sp., *Geocladium* sp., *Chaetomium* sp. y *Penicillium* sp. para incrementar la germinación de las semillas, estimulando el crecimiento rápido de las plantas y aumentando la producción de los cultivos (Bailey y Lumsden 1998; Harman y Bjorkman 1998; Bhat 2000; Fontaine *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2009). La  $\beta$ -1,3-glucanasa de *T. harzianum* CECT 2413 impide el crecimiento de *Rhizopus solani* y *Fusarium* sp. (Benitez *et al.*, 1998). Asimismo, el uso de las celulasas sobre los residuos de los cultivos incrementa la fertilidad del suelo (nitrógeno y fósforo) a corto plazo, lo cual representa un potencial para disminuir la dependencia de los fertilizantes minerales (Han y He, 2010).

#### 2.4.2.5 Celulasas en la industria textil y lavandería

Las celulasas son las enzimas más utilizadas en el procesamiento textil húmedo, especialmente para el acabado de los textiles a base de celulosa, con el objetivo de perfeccionar la calidad y apariencia (Hebeish y Ibrahim, 2007; Karmakar y Ray, 2011). Las celulasas se han utilizado para la lapidación de jeans y el pulido de algodón y otros tejidos celulósicos. Las ventajas de la sustitución de piedras pómez por un tratamiento a base de celulosa incluyen menos daño de las fibras, mayor productividad de las máquinas y menos trabajo intensivo. Las preparaciones de celulasas ricas en endoglucanasas son las más idóneas para mejorar la apariencia, el tacto, el color de la tela sin necesidad de recubrimiento químico de fibras y en los desechos un proceso respetuoso con el medio ambiente (Kuhad *et al.*, 2011).

#### 2.4.2.6 Celulasas en la Industria de pulpa y el papel

Las enzimas modifican la pasta gruesa y ayuda en el proceso mecánico, generando un ahorro energético significativo. Las celulasas también modifican las propiedades de las fibras para mejorar el drenaje y funcionamiento del papel (Noe *et al.*, 1986, Pommier *et al.*, 1990). Al utilizar las celulasas en el reciclaje residuos de libros, revistas y periódicos, beneficia en el desentintado y no se usa álcali. También reprimen el amarillamiento alcalino, simplifica el proceso de desentintado, modifica el tamaño de partícula de la tinta y minimiza la contaminación ambiental. Igualmente se

mejora el brillo de la fibra, las propiedades de resistencia y limpieza de la pulpa (Kirk *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010; Kuhad *et al.*, 2010c).

#### 2.4.2.7 Celulasas en investigación y biotecnología

La celulasas se usa ampliamente en el aislamiento de protoplastos vegetales, frecuentemente en combinación con Macerozyme R10 (cat. 28302). A los protoplastos se les elimina la pared celular y se utilizan en estudios de virus, investigaciones metabólicas, así como en experimentos de modificaciones genéticas (Kuhn y Stumpf, 1980; Evans y Bravo, 1983; Tewes *et al.*, 1984; Potrykus y Shillito, 1986; Pandey *et al.*, 2002).

#### 2.4.2.8 Celulasas en biocombustibles

Debido a la disminución de los combustibles fósiles y al aumento en la demanda de fuentes alternativas de energía renovable han desarrollado interés en la producción de celulasas (Pandey *et al.*, 2012), las cuales se pueden usar para convertir la porción de celulosa de la biomasa no alimentaria, tal como residuos agrícolas y cultivos energéticos (por ejemplo caña de azúcar, sorgo dulce, acaulipto y algas marinas), en azúcares fermentables para su conversión en combustibles renovables y productos químicos (Nava y Doldán, 2014; Payne *et al.*, 2015). El biocombustible más importante es el bioetanol, el cual puede ser utilizado como sustituto de la gasolina o en combinación con ella como oxigenante, lo que permite una mayor combustión de la misma (Sánchez y Cardona, 2005). Dentro del proceso de producción del bioetanol se utilizan celulasas que hidrolizan la celulosa hasta glucosa (sacarificación). La mayoría de las celulasas comerciales son producidas a partir de *T. reesei* (Zhag y Lynd, 2004).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las aplicaciones de celulasas en la industria se incrementa constantemente a nivel mundial, ya que se utilizan para liberar diferentes productos de interés tanto en la industria alimentaria como en la de biocombustibles, también se aplican para optimizar procesos mediante predigestión enzimática y para mejorar diversos productos en la industria textil, jabonera, papelera y agrícola entre otras. Sin embargo, en diferentes estudios se ha observado una baja eficiencia de las celulasas comerciales sobre la celulosa cristalina o recalcitrante, por lo que se requiere utilizar grandes cantidades de enzimas, aumentando con ello los costos de producción. Por lo antes expuesto, existe la necesidad de contar con microorganismos productores de celulasas que actúen con mayor eficiencia y eficacia sobre la estructura cristalina de la celulosa, así como también buscar alternativas para aumentar la producción de estas enzimas con materias primas económicas y abundantes como la biomasa residual de la agricultura. Con la cual se pueden también generar productos con aplicaciones biotecnológicas y apoyar en la reducción del impacto al medio ambiente al disminuir la cantidad de residuos.

Por lo tanto, en el presente trabajo se plantea buscar en la biomasa de *M. oleifera* microorganismos, con la capacidad de actuar sobre la celulosa (cristalina y amorfa) de los residuos de moringa, el cual es un árbol multipropósito que ha sido validado en sistema de temporal y riego en el estado de Sinaloa con buenos rendimientos, quedando un residuo o desecho (paja) de biomasa rica en celulosa. La paja de este cultivo también se podría utilizar como fuente de carbono económica para microorganismos celulolíticos en la producción de enzimas mediante fermentación sumergida. Igualmente, la celulosa que contiene la paja se podría utilizar para generar glucosa que pueda ser empleada como materia prima en el proceso de la producción de bioetanol de segunda generación.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Aislar microorganismos con capacidad celulolítica en biomasa de *Moringa oleifera* y producir celulasas a partir de estos en fermentación sumergida utilizando como sustrato el mismo cultivo, para su aplicación potencial en procesos biotecnológicos.

### **4.2 Objetivos específicos**

1. Aislar, evaluar e identificar los microorganismos celulolíticos presentes en la biomasa de *M. oleifera*.
2. Evaluar las actividades celulolíticas cuantitativas de microorganismos aislados, utilizando fuentes de carbono sintéticas en fermentación sumergida.
3. Cuantificar las actividades celulolíticas de los microorganismos aislados, utilizando el residuo de *M. oleifera* como fuente de carbono en fermentación sumergida.
4. Establecer las condiciones de pretratamiento del residuo de *M. oleifera* para disminuir su recalcitrancia y aumentar la biodisponibilidad de celulosa.
5. Evaluar el extracto enzimático de *P. funiculosum* FG1 en la sacarificación de biomasa de *M. oleifera*.

## **5. HIPÓTESIS**

Algunos microorganismos con capacidad de producir celulasas se encuentran presentes en la biomasa de *M. oleifera* y al menos uno de ellos tiene potencial biotecnológico para hidrolizar la biomasa residual del mismo cultivo en fermentación sumergida.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Aislamiento, evaluación e identificación de microorganismos celulolíticos presentes en la biomasa de *M. oleifera*

#### 6.1.1 Localización y condiciones de muestreo

Para llevar a cabo el aislamiento de microorganismos con potencial celulolítico se tomaron muestras de biomasa aérea de moringa durante el mes de mayo 2013. El muestreo se efectuó en el estado de Sinaloa: en dos sitios del municipio de Guasave (CIIDIR-SIN y Fracc. Sta. María), un sitio en Sinaloa municipio (Ejido Tetameche) y uno más en el municipio de Culiacán (figura 8) (cuadro 2).



Figura 8. Mapa de México con las ubicaciones de los muestreos en el estado de Sinaloa.

Las muestras de biomasa de moringa se recolectaron manualmente y se depositaron en bolsas plásticas, se trasladaron al laboratorio de Bioenergéticos en el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa (CIIDIR IPN-Unidad Sinaloa) para su procesamiento.

Cuadro 2. Ubicación de los lugares donde se tomaron las muestras de biomasa aérea de moringa y sus coordenadas geográficas.

Ubicación	Coordenadas
CIIDIR-Sin	Latitud 25°32'48.53" N Longitud 108°28'56.01" O
Fracc. Sta. María	Latitud 25°31'36.41" N Longitud 108°29'31.20" O
Ejido Tetameche	Latitud 25°47'17.92" N Longitud 108°35'37.10" O
Culiacán	Latitud 24°46'49.10" N Longitud 107°27'10.73" O

### 6.1.2 Aislamiento de microorganismos a partir de biomasa aérea de *M. oleifera*

Los trozos de tejido se lavaron en agua estéril, posteriormente se cortaron en cuadrados de 2-5 mm y utilizando una pinza (esterilizada a la llama) se transfirieron a placas de Petri estériles que contenían hipoclorito de sodio (1%), se dejaron en inmersión durante 30-60 s y se lavaron en agua estéril dos o tres veces (Narayanasamy, 2001). El tejido tratado se molió, se colocó 1 g de muestra en 10 mL de agua estéril a temperatura ambiente y se agitó. Se prepararon diluciones en serie hasta  $10^{-7}$  de cada muestra en agua destilada estéril. Después, se inoculó 0.1 mL de esa muestra diluida, en placas que contenían agar papa dextrosa (PDA) (anexo A2) para el aislamiento de hongos y agar Luria-Bertani (LB) (anexo A1) para aislamiento de bacterias. Todos los cultivos se incubaron a  $30 \pm 2$  °C durante cuatro días.

Los cultivos de hongos se purificaron mediante el método de punta de hifas única (Narayanasamy, 2001). Se transfirió un trozo de agar pequeño que contenía crecimiento fúngico al centro de placas de Petri que contenían medio PDA, usando una aguja de inoculación esterilizada a la llama, y se incubó a 30 °C durante algunos días. A medida que el hongo creció, el borde de avance del crecimiento fúngico presentó puntas de hifas bien separadas que se transfirieron con una aguja de inoculación esterilizada a la llama a tubos inclinados de agar PDA donde formó una colonia pura. Para purificar las bacterias se utilizó la técnica de placa de dilución en serie (Narayanasamy, 2001).

### 6.1.3 Selección de microorganismos con actividad celulolítica cualitativa

Los microorganismos purificados se evaluaron por su capacidad celulolítica cualitativa, según su crecimiento en cajas Petri con medio agar carboximetilcelulosa (CMC) (anexo C1) con un espesor de 5 mm aproximadamente. Una vez solidificado el medio en las cajas, se marcaron cuatro cuadrantes por fuera de la base de la caja. En el centro de cada caja, en el medio se realizó un orificio de 6 mm de circunferencia, con ayuda de un sacabocados previamente esterilizado. A partir de cada cepa purificada, se realizó un cultivo en medio líquido como inóculo inicial. Se tomó por punción parte de la colonia con un palillo estéril y se colocó en 50 mL de

medio líquido LB para bacterias y PD (papa dextrosa) para hongos, se incubaron a una temperatura de 30 °C a 200 rpm por 18 h. Al término de la incubación se inoculó una caja por cepa, se depositaron 50 µL de inóculo inicial en cada uno de los pozos de la caja Petri y se colocó papel parafilm alrededor de la caja para evitar la deshidratación del medio. Posteriormente, cada caja se rotuló y se incubaron a 30 °C por tres días. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizó una tinción con la adición de 5 mL de rojo Congo al 1% (anexo B1) (Teather y Wood, 1982) como revelador. Se dejó actuar el colorante por 15 min, se retiró el exceso y se lavó con 5 mL de solución de NaCl 2 M (anexo B2), durante 15 min. Después de eliminar el exceso de solución salina se determinó la actividad celulolítica cualitativa por la presencia de zonas de aclaramiento (halos) correspondiente a la hidrólisis de la celulosa en el medio, la cual se midió en milímetros con la ayuda de un Vernier manual. Los microorganismos se agruparon de acuerdo al criterio de actividad celulolítica del cuadro 3.

Cuadro 3. Criterio de actividad celulolítica propuesto por Ramírez y Cocha (2003).

<b>Actividad celulolítica</b>	<b>Criterio mm</b>
<b>Muy buena</b>	++++ (4+)
<b>Buena</b>	+++ (3+)
<b>Regular</b>	++ (2+)
<b>Escasa</b>	+ (1+)
<b>Ausencia de actividad</b>	---

En base al análisis del halo de hidrólisis de celulosa, se seleccionaron los tres aislados que presentaron la mayor actividad a nivel cualitativo. El diseño experimental fue unifactorial completamente al azar, donde el factor fue el tipo de microorganismo y la variable de respuesta la actividad celulolítica, utilizando cuatro repeticiones por tratamiento. Se realizó un análisis de varianza y análisis de medias por el Test de Rangos Múltiples de Duncan con el software SAS para Windows versión 9.0. Los datos se consideraron significativamente diferentes cuando  $p < 0.05$ .

#### 6.1.4 Conservación de microorganismos

Los microorganismos que presentaron actividad celulolítica muy buena se conservaron en refrigeración a 4 °C, los tres que se seleccionaron se conservaron en medio PDA en incubadora a 30 °C y cada 20-30 d se reactivaron.

Se criopreservaron a -20 °C los tres aislados que presentaron las mejores actividades celulolíticas a nivel cualitativo, se realizaron cortes de cubos de 1 cm<sup>3</sup> de un cultivo esporulado en medio PDA, que luego fueron colocados dentro de frascos estériles de 1.5 mL que contenían glicerol estéril al 10% (utilizado como crioprotector) (López *et al.*, 2001).

#### 6.1.5 Identificación morfológica de los microorganismos seleccionados

La identificación morfológica de los microorganismos seleccionados se realizó con base en la observación de las colonias crecidas en medio PDA, para lo cual se realizaron preparaciones con las estructuras de los hongos y el colorante azul de metileno sobre portaobjetos para llevar a cabo observaciones microscópicas. Se utilizó un microscopio digital Leica DM6000CS y un software de análisis de imagen Leica LAS. Con las imágenes obtenidas se realizaron comparaciones utilizando las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998).

#### 6.1.6 Identificación molecular de los microorganismos seleccionados

##### a) Extracción de ADN

Cada hongo se identificó por individual, se tomó con un bisturí estéril un trozo 0.5 cm<sup>2</sup> de tejido fúngico que crecía en medio PDA y se depositó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se le agregaron 200 µL de DNazol (Marca Invitrogen) y se maceró manualmente con un pistilo estéril, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL nuevo, al cual se le agregaron 15 µL de RNAsa y se incubó por 30 min a 37 °C, después se le agregaron 100 µL de cloroformo-alcohol-isoamílico y se centrifugó por 8 min a 10,000 rpm a 4 °C. Enseguida se decantó y se le adicionó 1 mL de etanol al 75%, se centrifugó 10,000 rpm durante 3 min a 4 °C,

después se decantó y se repitió el lavado con 1 mL de etanol al 75%. Se decantó y se dejó secar la pastilla de ADN a temperatura ambiente. La pastilla resultante se diluyó en 50 µL de agua ultrapura, la calidad del ADN se cuantificó en un NanoDrop™ 2000 espectrofotómetro (marca Thermo Scientific) y se visualizó por electroforesis un gel de agarosa al 1% teñido con Naranja G 6X bajo luz UV en un transiluminador.

#### b) Amplificación de ADN

Se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los oligonucleótidos generalistas para eucariontes ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' e ITS4: 5'-TCCTCCGCTTAGATATGC-3' (White *et al.*, 1990), que amplifican la región del espaciador transcrito interno ("Internal Transcribed Spacer" ITS) ITS1, 5.8S e ITS2 del ADN ribosomal en un fragmento de aproximadamente 600 pb. Se tomaron 10 ng del ADN eluido y se mezcló en la reacción para PCR que contenía a destilada estéril, 0.5 µM de cada uno de los oligonucleótidos, 1 x de buffer para PCR, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>; 500 µM de cada uno de los dNTPs y 0.5 U de Taq ADN polimerasa (Cat. No. 10966-030 Invitrogen, EUA) en un volumen final de 30 µL (Cordero *et al.*, 2012).

La amplificación se realizó en un termociclador (marca Veriti AB 96 Well), bajo las siguientes condiciones:

1 ciclo	95 °C	4 min (inicio de desnaturalización)
29 ciclos	95 °C	1 min (desnaturalización de DNA)
	60 °C	1 min (para alineación de oligonucleótidos)
	72 °C	2 min (extensión)
1 ciclo	72 °C	5 min (para finalizar extensión)
	4 °C	Mantener a baja temperatura al término del PCR

#### c) Electroforesis

Cada uno de los productos de PCR se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Para determinar el tamaño de los fragmentos amplificados, se utilizó como referencia el marcador de pares de bases, 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, USA No. 10787-018). Las bandas de ADN se tiñeron con bromuro de etidio (0.05 µg/mL) y se visualizaron bajo luz UV en un transiluminador. La calidad y

cuantificación del ADN se realizó en un NanoDrop™ 2000 espectrofotómetro (marca Thermo Scientific).

#### d) Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR fueron purificados con el kit comercial QIAquick® PCR Purification (Marca QUIAGEN catalogo No. 28106). Se tomaron 65 µL de la reacción de PCR y se depositaron en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, también se le adicionaron 325 µL de solución PB del kit, se homogenizó en vórtex y se centrifugó unos segundos a temperatura ambiente para bajar toda la solución al fondo del tubo, posteriormente se pasaron los 390 µL a una columna con filtro del kit y su tubo colector, se centrifugó a temperatura ambiente a 13,000 rpm por un min. Se desechó el líquido que quedó en el tubo colector, se adicionaron 750 µL de solución PE del kit a la columna con filtro y se centrifugó a 13,000 rpm a temperatura ambiente por un min, se decantó el líquido del tubo colector y se repitió la centrifugación a 13,000 rpm a temperatura ambiente por un min, el tubo colector se desechó y se colocó la columna en un tubo Eppendorf de 1.5 mL nuevo, enseguida se adicionaron 50 µL de solución EB del kit y se dejó incubar por 2 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 13,000 rpm durante un min, se repitió la centrifugación y se recuperó el ADN diluido en la solución EB del kit. La calidad y cuantificación del ADN se realizó en un NanoDrop™ 2000 espectrofotómetro (marca Thermo Scientific), utilizando la solución EB del kit como blanco.

#### e) Secuenciación y análisis

La secuenciación del DNA amplificado por PCR se realizó en el laboratorio de ingeniería genética del CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato donde utilizaron el kit Dye Terminator Cycle Sequencing, Ready Reaction (Applied Biosystems®), en un secuenciador ABI PRISM 377 PERKINELMER (Cetus, Norwalk, CT). Las secuencias obtenidas pasaron por un proceso de edición, el cual consistió en verificar la calidad de las secuencias y la corrección de posibles errores de lectura o artefactos creados durante la secuenciación. La edición de las secuencias se realizó con la ayuda del programa Chromas lite 2.1. Las secuencias editadas se sometieron a comparación

con secuencias reportadas en el Banco de genes (GenBank), del centro internacional para la información en Biotecnología (NCBI-National Center for Biotechnology information) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, empleando el programa BLAST-N de dicha página, para conocer el nivel de identidad genética existente con secuencias ya reportadas y depositadas en el banco de genes.

#### f) Análisis filogenético

Para la elaboración del árbol filogenético se utilizó la secuencia de las regiones ITS1, 5.8S e ITS2 del rADN (generada con la amplificación con los oligonucleótidos ITS1 e ITS4) de cada uno de los microorganismos seleccionados, más las secuencias de diferentes aislamientos de hongos de la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para el análisis filogenético, las secuencias consenso se compilaron en un archivo fasta, se alineó con el programa Muscle (Edgar 2004), se analizaron con el método Kimura (2 parámetros) (Kimura, 1980), se utilizó el método de Neighbor Joining (Saitou y Nei, 1987) y se estimó un análisis de bootstrap con 1,000 repeticiones (Felsenstein, 1985) con el software MEGA 7 (Kimura *et al.*, 2016). Los gap/missing se consideraron como completas deleciones.

## **6.2 Evaluación de las actividades celulolíticas cuantitativas de los microorganismos aislados, utilizando fuentes de carbono sintéticas en fermentación sumergida**

### 6.2.1 Fermentación de los microorganismos en medio líquido

Los tres microorganismos seleccionados fueron cultivados individualmente, en medio mineral A (anexo C1) más una fuente de carbono sintética, pudiendo ser: carboximetilcelulosa (CMC), que es celulosa amorfa, o 2) Avicel que corresponde a celulosa cristalina.

#### a) Inóculo

Los microorganismos fueron sembrados por separado, se inoculó el aislado con un palillo estéril en cajas Petri con medio PDA y se incubaron a  $30 \pm 2$  °C por siete días.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se adicionaron 8 mL de Tween 80 (0.1 v/v) (anexo C2) y se realizó un raspado superficial con un portaobjetos estéril. Posteriormente, se colectó la suspensión que se encontraba dentro de la caja, se colocó en un tubo de ensayo cada aislado por separado y se cuantificaron las esporas en una cámara de Neubauer.

Se preparó un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio mineral A (anexo C1) por aislado, utilizando glucosa como fuente de carbono, se incorporaron  $10^6$  esporas/mL de la suspensión colectada anteriormente y se incubaron a 30 °C y 200 rpm durante 48 h.

#### b) Condiciones en la fermentación

Se prepararon tres matraces Erlenmeyer de 250 mL con 70 mL de medio mineral A (anexo C1) más CMC o Avicel como fuente de carbono para cada uno de los microorganismos seleccionados, se rotularon y se adicionó 10% (v/v) de inóculo. Todo este sistema se mantuvo en incubación a 30 °C y 200 rpm durante 192 h. Se tomaron muestras cada 24 h desde el inicio de la fermentación, se depositaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se conservaron a -20 °C para su posterior análisis.

Se utilizó un diseño factorial integrado por tres factores: microorganismo (tres niveles: *P. funiculosm* FG1., *F. verticillioides* FG3 y *C. cladosporioides* FC2) fuente de carbono (dos niveles: medio CMC y medio Avicel) y el tiempo de fermentación (nueve niveles: 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 y 192 h.). Se emplearon tres réplicas por tratamiento y las variables de respuesta fueron, la producción de azúcares reductores y la actividad celulasas (endoglucanasa, exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa).

### 6.2.2 Determinaciones analíticas

#### a) Determinación de azúcares reductores.

Las muestras almacenadas a -20 °C se descongelaron y posteriormente se centrifugaron a 10,000 rpm por 20 min. Del sobrenadante libre de células se tomó un volumen de 250  $\mu$ L y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se adicionó 250  $\mu$ L

de DNS (anexo D1), esta mezcla se sometió a ebullición por 10 min en un termoblock (Marca Thermo Scientific) en seco a 100 °C, transcurrido este tiempo, los tubos se colocaron en un recipiente con hielo molido, enseguida se tomaron 200 µL de cada muestra y se examinó por duplicado en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan Go) a una longitud de onda de 570 nm. Se registró la absorbancia generada, la cual se reemplazó en la ecuación de la línea recta arrojada por la curva patrón de glucosa (anexo D2 y D3) previamente realizada, para medir la concentración de glucosa residual en cada hora de muestreo (Miller, 1959).

b) Determinación de actividades enzimáticas.

A los aislados seleccionados se les determinó las actividades enzimáticas celulolíticas:  $\beta$ -1,4 endoglucanasa,  $\beta$ -1,4 exoglucanasa y  $\beta$ -1,4 glucosidasa implicadas en la degradación de celulosa conforme a lo reportado por Zhao *et al.* (2016) con modificaciones, las cuales se describen adelante. Las muestras almacenadas a -20 °C se descongelaron y se centrifugaron a 10,000 rpm por 20 min. En el sobrenadante libre de células se midió la actividad enzimática.

Actividad  $\beta$ -1,4 endoglucanasa (EnG). Se tomaron 200 µL del sobrenadante de la muestra y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se adicionaron 875 µL de CMC 1% y 25 µL de buffer acetato de sodio 1.0 M con pH 6.0 (anexo C3). Se incubaron a 50 °C durante 50 min. Posteriormente, se midió la liberación de azúcares reductores por el método DNS (Miller, 1959).

Actividad  $\beta$ -1,4-exoglucanasa (ExG). Se colocaron 12.5 mg de papel filtro Whatman No.1 en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, se le adicionaron 200 µL de buffer acetato de sodio 0.6 M con pH 6.0 (anexo C4) y 800 µL de líquido libre de células. Se incubó a 50 °C durante 50 min y se determinó la liberación de azúcares reductores por el método DNS (Miller, 1959).

Actividad  $\beta$ -1,4-glucosidasa (BG). Esta actividad se determinó utilizando 250 µL de sobrenadante y 250 µL de salicina 10 mM en buffer acetato de sodio 1 M (pH 6.0)

(anexo C5). Se incubó a 50 °C durante 50 min y se determinó la liberación de azúcares reductores por el método DNS (Miller, 1959).

Las actividades enzimáticas fueron calculadas de acuerdo a la fórmula reportada por Silveira *et al.* (2012), para el cálculo de la actividad EnG, ExG y BG, los azúcares reductores del tiempo cero fueron restados a los valores de los siguientes tiempos de fermentación. Las actividades enzimáticas se expresaron en unidades internacionales (U) por L, considerando una unidad como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu\text{mol}$  de glucosa por minuto.

### 6.2.3 Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza y análisis de medias por el test de Rangos Múltiples de Duncan con el software SAS 9.0 para Windows. Los datos se consideraron significativamente diferentes cuando el valor  $p < 0.05$ .

## **6.3 Cuantificación de las actividades celulolíticas de *P. funiculosum* FG1, utilizando el residuo de *M. oleifera* como fuente de carbono en fermentación sumergida**

*P. funiculosum* FG1, fue el microorganismo que se seleccionó para continuar con la investigación y observar el efecto del residuo de moringa como fuente de carbono en fermentación sumergida. Inicialmente los tres hongos seleccionados se evaluaron cuantitativamente en fermentación sumergida utilizando medio mineral A (anexo C1), en este apartado se incluyeron dos medios minerales más: el medio mineral B propuesto por Maeda *et al.* (2010) (anexo F1) y el medio mineral C propuesto por Mandels y Weber (1969) (anexo F2). En las tres condiciones se incorporó el residuo de moringa (sin pretratar) como fuente de carbono en un 2%.

Las condiciones de la fermentación fueron similares a las descritas en el apartado 6.2.1, así como las determinaciones analíticas incluidas en el apartado 6.2.2 con

ajustes en el pH óptimo y tiempo en la reacción para las enzimas de *P. funiculosum* FG1.

#### **6.4 Establecimiento de las condiciones de pretratamiento del residuo de *M. oleífera* para disminuir su recalcitrancia y aumentar la biodisponibilidad de celulosa**

##### 6.4.1 Secado y tratamiento mecánico

Los residuos (tallos finos y gruesos) de moringa fueron reducidos con un desmenuzador de paleta, obteniendo fragmentos con una longitud de 4 mm por 2 mm de ancho. Posteriormente se colocaron en un deshidratador con aire caliente (70 °C), hasta obtener a un 6% de humedad en el sustrato. Enseguida se colocó el sustrato en un molino de martillo con una malla 0.5 mm y se conservó a temperatura ambiente en bolsas de polietileno selladas, hasta el momento de ser utilizado. Esta parte del proyecto se realizó en las instalaciones de Industrias Centli S. A. de C. V. ubicada en carretera internacional México Nogales No. 1691, zona industrial Ahome, Sinaloa, México, CP 81255.

##### 6.4.2 Tratamiento hidrólisis ácida

Se realizó una revisión de los antecedentes y en base a ello, se decidió para este pretratamiento: ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) en concentración de 2% y 3% (v/v) como catalizador.

En un matraz Erlenmeyer de 2,000 mL se adicionaron 750 mL de agua destilada, 75 g de moringa (obtenida de acuerdo al paso 6.5.1) y el ácido sulfúrico [2% ó 3% (v/v)], el matraz se llevó a la autoclave (marca Yamato modelo SK100C) a 130 °C por 5 min. Posteriormente se separó la parte líquida y sólida por centrifugación a 4,500 rpm por 10 min. La parte sólida se colectó en un vaso de precipitado de 1 L y se le adicionó 500 mL de agua destilada, repitiéndose la separación y lavado en tres ocasiones, en el último lavado se ajustó a pH 5 utilizando hidróxido de sodio 5 M. Cada tratamiento se realizó con tres réplicas.

Se realizó un análisis mediante la prueba t de student, para comparar las medias del contenido de celulosa en la moringa pretratada con ácido sulfúrico [2% y 3% (v/v)]. Se utilizó el software SAS 9.0 para Windows. Los datos se consideraron significativamente diferentes cuando  $p < 0.05$ .

#### 6.4.3 Caracterización estructural del residuo de *M. oleífera*

Al residuo de moringa sin pretratar y pretratado, se le realizó el análisis del contenido de cenizas (anexo E2), lignina (anexo E4), celulosa (anexo E5) y hemicelulosa (anexo E6) por la metodología recomendada por National Renewable Energy Laboratory (2011).

### **6.5 Evaluación del extracto enzimático de *P. funiculosum* FG1 en la sacarificación de biomasas de *M. oleífera***

#### 6.5.1 Concentración del extracto crudo

##### a) Ultrafiltración

En base a los resultados del apartado 6.3 se obtuvieron las condiciones para preparar los extractos enzimáticos de *Penicillium* sp. (matraz Erlenmeyer de 500 mL con volumen de 200 mL), posteriormente el extracto se centrifugó para separar las células del medio líquido. La parte líquida (550 mL) se ultrafiltró utilizando una membrana de 5 kDa (Amicon), con el equipo Micon 8400 a 70 psi de presión y en la etapa final del proceso se utilizó 50 mL buffer acetato de sodio 0.05 M y pH 4.

##### b) Liofilización

Con el extracto libre de células, se realizó el concentrado a través de liofilización. Se utilizó un liofilizador marca Labconco (modelo 111252152S, número de catálogo 7934022), se adicionaron 200 mL en cada uno de los tubos del equipo y se congelaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , posteriormente los tubos se colocaron en el equipo y se liofilizó bajo las siguientes condiciones:  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 0.02 mbar durante 72 h. Las determinaciones analíticas se realizaron en el producto del liofilizado en 10 mL de buffer acetato de sodio 0.05 M a pH 4.

### 6.5.2 Sacarificación

Se colocó 1 g de moringa (bajo dos tratamientos: sin pretratar y pretratada con ácido sulfúrico al 2%) en un matraz Erlenmeyer de 125 mL y se esterilizó. Enseguida se adicionó 8 mL del extracto enzimático concentrado, 12 mL de buffer acetato de sodio 50 mM pH 4 y se dejó en incubación a 50 °C, se tomó muestra cada tres horas, finalizando a las 24 h. Se realizaron tres réplicas por tratamiento. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 min y se midieron los azúcares reductores por DNS (Miller, 1959) (Anexo D).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Aislamiento y selección de microorganismos celulolíticos de biomasa de *M. oleífera*

#### 7.1.1 Aislamiento de microorganismos a partir de biomasa de *M. oleífera*

La biomasa de moringa se colectó en tres municipios del estado de Sinaloa, de esta biomasa se aislaron un total de 120 microorganismos y se purificaron 48, de los cuales 41 pertenecen al dominio de las bacterias y siete al reino de los hongos. En el cuadro 4 se muestra la distribución y porcentajes de los microorganismos obtenidos en el aislamiento primario para cada ubicación de colecta.

Cuadro 4. Distribución por ubicación y datos de los microorganismos aislados de *M. oleífera*.

Ubicación	Municipio	Aislados	% de aislados	Bacterias	Hongos
<b>CIIDIR-SIN</b>	Guasave	21	43.75	18	3
<b>Fracc. Sta. María</b>	Guasave	7	14.58	6	1
<b>Ej. Tetameche</b>	Sinaloa de Leyva	12	25.00	10	2
<b>Culiacán</b>	Culiacán	8	16.66	7	1

#### 7.1.2 Actividad celulolítica cualitativa de los microorganismos aislados y purificados

Después la purificación de los microorganismos, se realizó la determinación cualitativa de su actividad celulolítica, la cual se llevó a cabo en cajas Petri con medio mínimo con CMC utilizando rojo Congo como revelador del potencial celulolítico. La actividad celulolítica resultante de los microorganismos se indica de acuerdo a la escala propuesta por Ramírez y Cocha (2003) en el cuadro 5. Los resultados indican que 42 de los 48 microorganismos presentan actividad celulolítica. Un 81.25% de los aislados presentaron una actividad celulolítica muy buena de acuerdo a la escala utilizada.

El análisis de varianza de los resultados de la actividad celulolítica de los microorganismos aislados sobre medio sólido de CMC (anexo G1) indicó que existe diferencia significativa entre los microorganismos al hidrolizar la celulosa ( $p < 0.0001$ ). Y para conocer cual microorganismo presentó mayor halo de degradación se efectuó una comparación de medias con la prueba de Duncan  $\alpha = 0.05$  (anexo G2) y se

observó que los tres microorganismos que presentaron la mayor actividad celulolítica fueron hongos: PDA3-1 perteneciente al Fracc. Sta. María en el municipio de Guasave, el aislados PDA1a-2 de Culiacán y PDA1a-1 de CIIDIR-SIN municipio de Guasave (figura 9), estos microorganismos fueron seleccionados para continuar con la investigación.

Cuadro 5. Análisis cualitativo de actividad celulolítica de los 48 microorganismos aislados y purificados de biomasa de *M. oleifera* de acuerdo a la escala propuesta por Ramírez y Cocha (2003).

Actividad celulolítica	Rango de halo de hidrólisis (cm)	No. de aislados	% de microorganismos
<b>Muy buena</b>	≥1.4	39	81.25
<b>Buena</b>	1.20-1.39	1	2.09
<b>Regular</b>	1.00-1.19	2	4.16
<b>Escasa</b>	0.80-0.99	0	0.0
<b>Ausencia de actividad</b>	0.60-0.79	6	12.5
	Total	48	100



Figura 9. Actividad celulolítica cualitativa de los tres microorganismos con mayor actividad en CMC, después de 48 h de incubación a 30 °C utilizando rojo Congo como revelador.

## 7.2 Identificación morfológica y molecular de los microorganismos que se seleccionaron por su actividad celulolítica cualitativa

### 7.2.1 Identificación morfológica de los microorganismos seleccionados

Los tres aislados que se seleccionaron por presentar la mejor actividad celulolítica cualitativa fueron hongos filamentosos. Para su identificación morfológica se

realizaron preparaciones de las estructuras de cada hongo sobre portaobjetos con azul de metileno, estas preparaciones se observaron y se capturaron imágenes utilizando el microscopio digital Leica DM6000CS y el software de análisis de imagen Leica LAS, estas imágenes se utilizaron para la comparación de las estructuras de los hongos con las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998), resultando lo siguiente:

#### PDA1a-1 CIIDIR-SIN

Este aislado se sembró en medio PDA, las colonias fueron de color verde seco de aspecto polvoriento y con pequeños haces (fascículos) de conidióforos (figura 10). Al observar las estructuras de este aislado al microscopio se encontró que forman conidios en una estructura ramificada semejante a un pincel que termina en células conidiógenas llamadas fiálides de forma biverticiliada, características particulares del género *Penicillium*. En la fiálide, al dividirse el núcleo, se extiende simultáneamente el extremo apical que luego se estrangula separando a la espora recién formada, que se unen entre sí a los conidios permitiendo la formación de cadenas. Los filamentos o hifas alcanzan un diámetro entre dos a tres  $\mu\text{m}$ . La pared de las fiálides es lisa y tienen forma de ánfora, el tamaño de las fiálides oscilan entre 22 a 25  $\mu\text{m}$ . Los conidios son elipsoidales, unicelulares, hialinos que en masa se ven de color verde aceituna o gris y la pared de los conidios es lisa. Los conidióforos presentan una longitud entre los 22 y 53  $\mu\text{m}$  (figuras 11 a y b).



Figura 10. Aislado PDA1a-1 en medio PDA, en donde se observan las estructuras macroscópicas después de siete días de incubación a 30 °C.

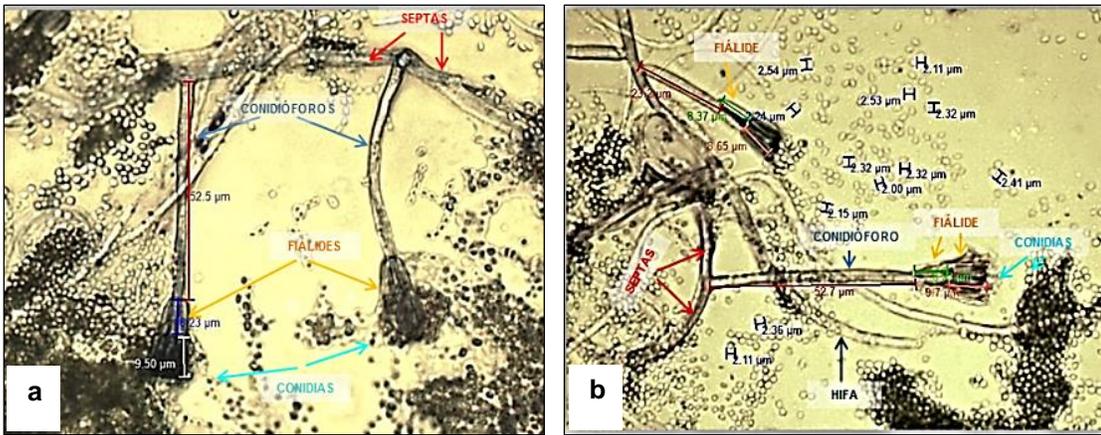


Figura 11. Imágenes del aislado PDA1a-1 al microscopio digital (Leica) aumentos: 400, donde se observan los conidióforos, fiálides, conidias e hifas del hongo.

PDA3-1 Fracc. Sta. María Guasave

Este hongo se sembró en medio PDA, las colonias presentaron escaso micelio aéreo de color blanco y de color rosado a púrpura especialmente en el reverso de la colonia que gradualmente difunde en el medio (figura 12). Los macroconidios son levemente curvados y pluriseptados, con una célula apical levemente puntiaguda y con una célula basal en forma de pie en los macroconidios que se considera característica de del género *Fusarium* (figura 13 a y b).

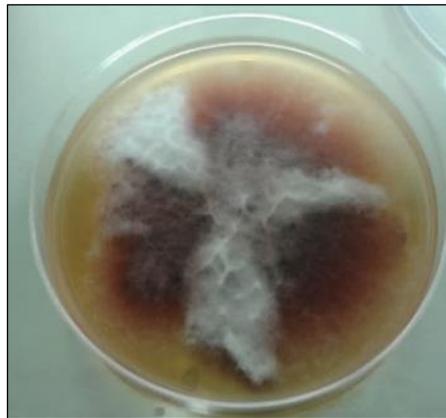


Figura 12. Imagen del aislado PDA3-1 en medio PDA, en donde se observan las estructuras macroscópicas después de siete días de incubación a 30 °C.

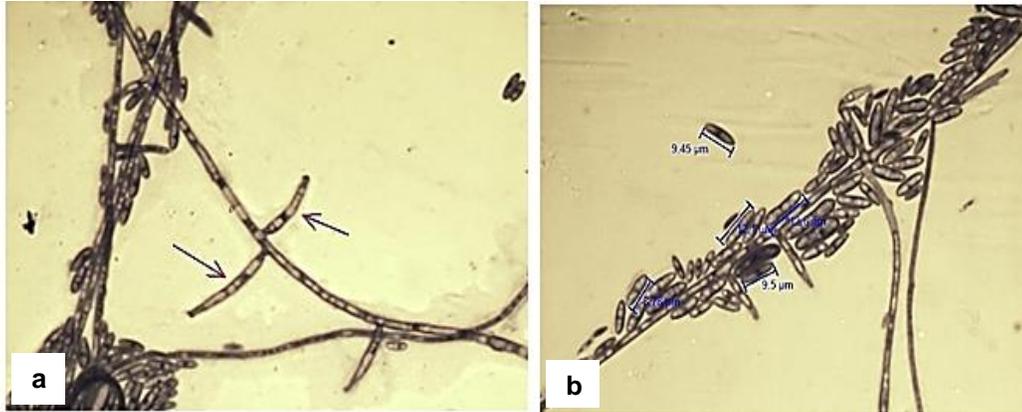


Figura 13. Imágenes del aislado PDA3-1 al microscopio digital (Leica) aumentos: 400, en la imagen “a” se observan los macroconidios indicados con una flecha y en la imagen “b” las conidiosporas del hongo.

### PDA2a-2 Culiacán

Este microorganismo se sembró sobre medio PDA, en donde formó colonias circulares de color oliváceo, aterciopeladas (figura 14), y micelio largo y corto de hifas gruesas septadas y oscuras. La célula conidiógena es poliblastica, generalmente integrada y simpodial; da lugar a conidios que quedan en cadenas acrópetas, o a veces se presentan solitarios en forma variada (elipsoidales, limoniformes, esféricos y fusiformes), con una cicatriz en la base, hay unicelulares o septadas; poseen pared lisa de color oliváceo a marrón oscuro (Figura 15 a, b y c), estas son características del género *Cladosporium*.

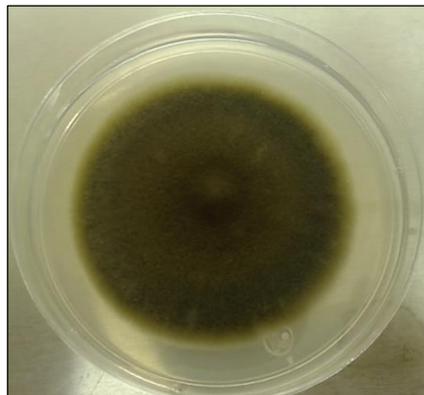


Figura 14. Imagen del aislado PDA2a-2 en medio PDA, en donde se observan las estructuras macroscópicas después de catorce días de incubación a 30 °C.

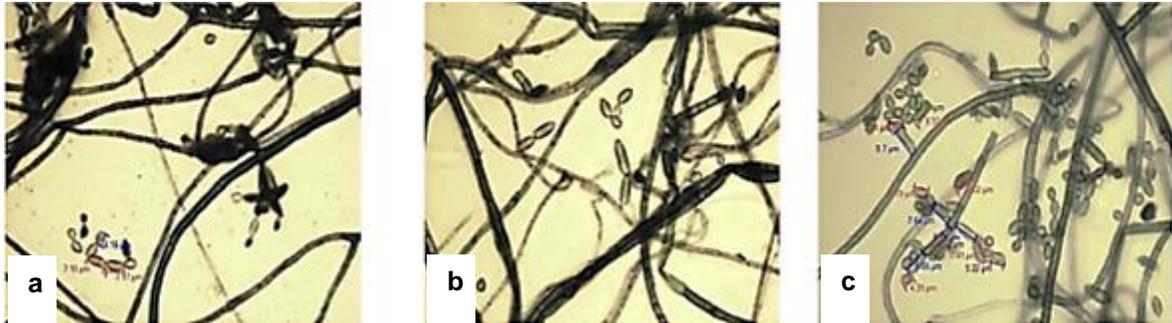


Figura 15. Imágenes del aislado PDA2a-2 en el microscopio digital (Leica) aumentos: 400, donde se observan las hifas y conidios del hongo.

En base a la identificación morfológica, la clasificación científica de los hongos seleccionados se muestra en el cuadro 6.

Cuadro 6. Clasificación científica de los tres hongos seleccionados.

AISLADO	REINO	FILO	CLASE	ORDEN	FAMILIA	GÉNERO
H1 PDA1a-1	Fungi	Ascomycota	Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae	<b><i>Penicillium</i></b> Link, 1809
H2 PDA3-1	Fungi	Ascomycota	Sordariomycetes	Hypocreales	Nectriaceae	<b><i>Fusarium</i></b> Link, 1821
H3 PDA2a-2	Fungi	Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Davidiellaceae	<b><i>Cladosporium</i></b> Pers, 1816

### 7.2.2 Identificación molecular de los microorganismos seleccionados

En la identificación molecular de los hongos se obtuvo lo siguiente:

1) Los productos de PCR, donde se utilizó ADN de cada microorganismo (H1= PDA1a-1 CIIDIR Guasave, H2= PDA3-1 Fracc. Sta. María Guasave y H3= PDA2a-2 Culiacán) y los oligonucleótidos ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990), fueron analizados por electroforesis observándose bandas de aproximadamente 600 pb, tal como se esperaba (figura 16).

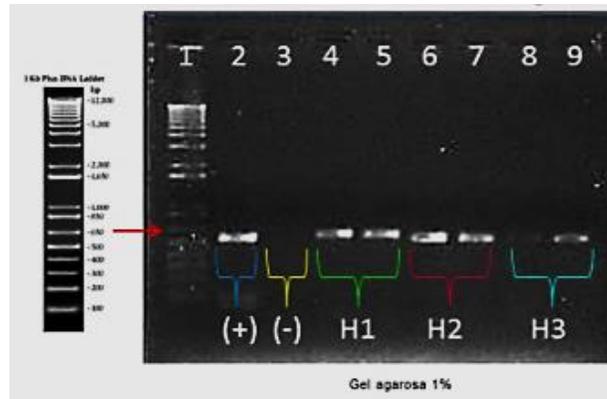


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de PCR de los aislados seleccionados. Carril 1 marcador de peso molecular; 2, (+)= control positivo; 3, (-)= control negativo; 4 y 5, H1= PDA1a-1; 6 y 7, H2= PDA3-1; 8 y 9, H3= PDA2a-2.

2) Las secuencias editadas se depositaron en el GenBank (NCBI) y se sometieron a comparación con secuencias almacenadas en este mismo banco de datos. El aislado PDA1a-1 CIIDIR Guasave de 521 pb (clave GenBank KR185322, anexo H), presentó una homología del 98% con *Talaromyces funiculosus* anamorfo de *Penicillium funiculosum* (Xu *et al.*, 2014) con una cobertura del 100%. El aislado PDA3-1 Fracc. Sta. María Guasave de 481 pb (clave GenBank KR185323, anexo H), presentó una homología del 98% con *Fusarium verticillioides* con una cobertura de 100%. Y el aislado PDA2a-2 Culiacán de 541 pb (clave GenBank KR185324, anexo H), presentó una homología del 99% con *Cladosporium cladosporioides* con una cobertura del 100%.

3) El análisis filogenético se realizó mediante la construcción de un árbol filogenético, elaborado con las secuencias de los tres aislados seleccionados en esta investigación (clave GenBank KR185322, KR185323 y KR185324) y 18 secuencias seleccionadas del GenBank. Al observar el árbol encontramos que el aislado con clave KR185322, correspondiente al aislado PDA1a-1, se agrupó con las secuencias del género *Penicillium*, el aislado con clave KR185323, correspondiente al aislado PDA3-1, se alineó con el género *Fusarium*, y el aislado con clave KR185324 correspondiente al aislado PDA2a-2, se acopló con secuencias del género *Cladosporium* (Figura 17).

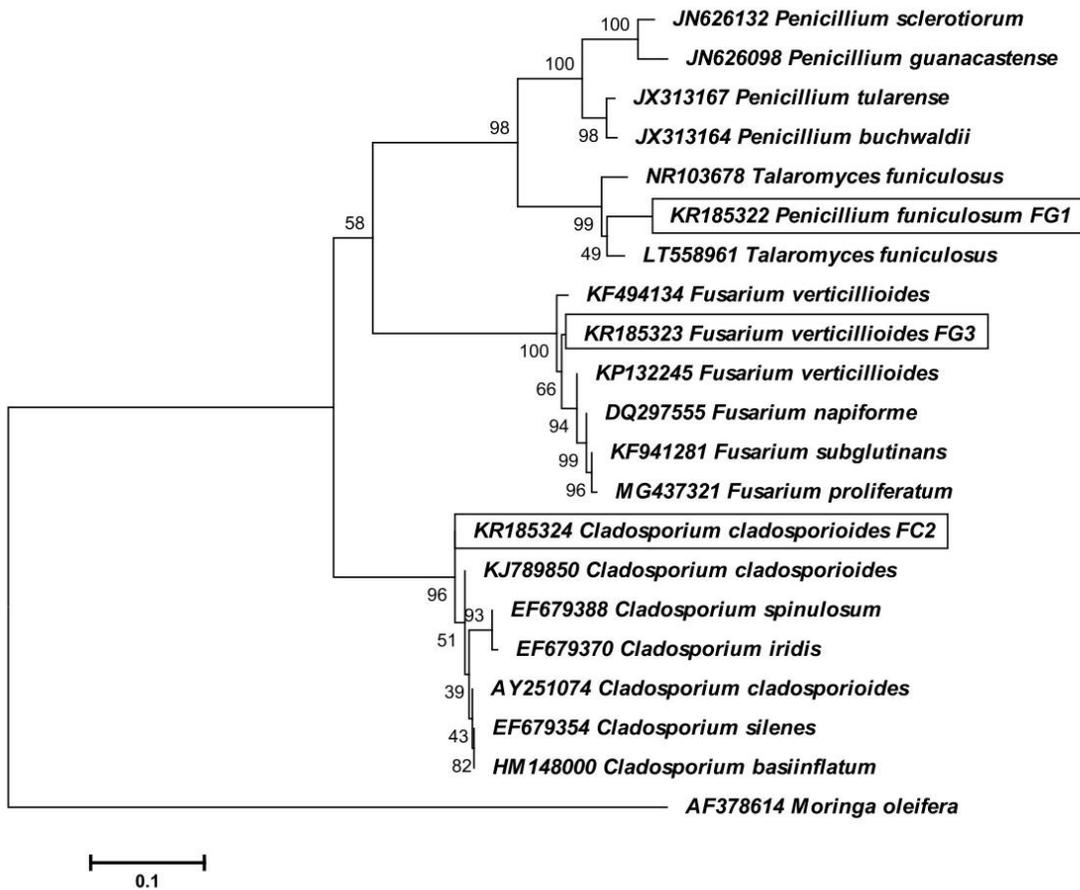


Figura 17. Árbol filogenético de la región ITS del ADNr de los aislados tres aislados seleccionados en esta investigación (clave KR185322 (PDA1a-1), KR185323 (PDA3-1) y KR185324 (PDA2a-2)), más 18 secuencias de diferentes aislamientos de la base de datos del NCBI GenBank.

### 7.3 Efecto de fuentes de carbono sintéticas sobre la producción de azúcares reductores y actividades enzimáticas de los microorganismos seleccionados

Los tres hongos seleccionados fueron cultivados en fermentación sumergida individualmente en medio mineral A (anexo C1) más una fuente de carbono sintética (CMC como celulosa amorfa o Avicel como celulosa cristalina).

### 7.3.1 Efecto de dos fuentes de carbono (CMC y Avicel) sobre la producción de azúcares reductores

En la figura 18 se presenta la producción de azúcares reductores de los tres hongos crecidos en diferentes fuentes de carbono. Se observó que la producción de azúcares reductores depende de la fuente de carbono utilizada, es decir, cuando los tres hongos fueron crecidos en CMC se obtuvo la mayor producción de estos azúcares: 1.22, 1.14 y 1.13 mg/mL equivalentes de glucosa para los hongos *P. funiculosum* FG1, *F. verticillioides* FG3 y *C. cladosporioides* FC2 respectivamente. Existe diferencia en la producción de azúcares reductores en los dos medios de cultivo a partir de las 48 h, donde se observa un incremento en la producción de azúcares en CMC. Se obtuvo una producción de azúcares reductores de tres veces más por cada hongo crecido en CMC comparado con el medio Avicel. Las máximas producciones de azúcares reductores se obtuvieron entre las 120-168 h de cultivo (figura 18).

El análisis de varianza mostró que no hay un efecto significativo del factor tipo de hongo ( $p=0.1069$ ); pero si hay un efecto de los factores tipo de medio y tiempo ( $p<0.0001$ ), más no en las otras interacciones (anexo I), por lo tanto se realizó un análisis de medias por Duncan de la interacción que fue significativa ( $\alpha=0.05$ ).

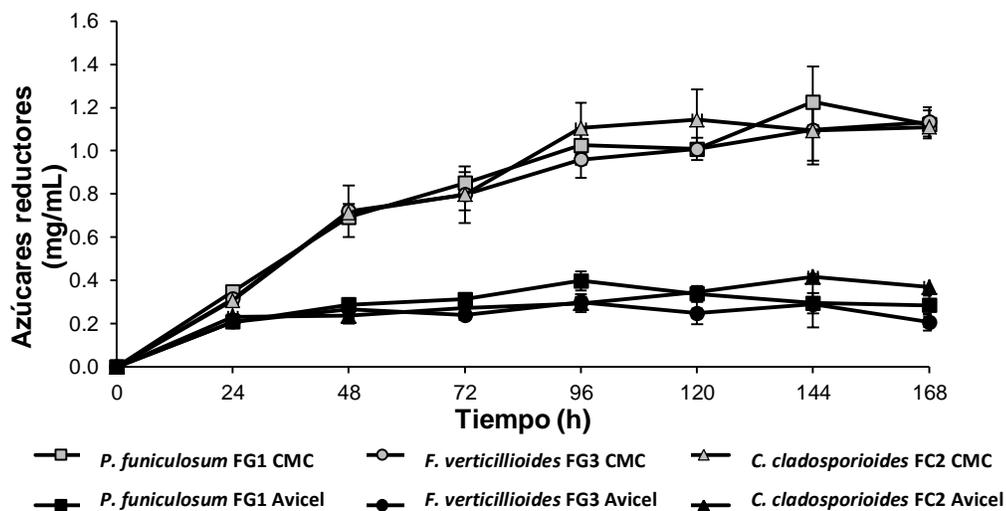


Figura 18. Producción de azúcares reductores de los hongos *P. funiculosum* FG1, *F. verticillioides* FG3 y *C. cladosporioides* FC2, de forma individual en dos fuentes de carbono CMC y Avicel.

7.3.2 Actividades enzimáticas celulolíticas (EnG, ExG y BG) de los microorganismos seleccionados utilizando dos fuentes de carbono (CMC y Avicel) en fermentación sumergida

Actividad EnG. El análisis de varianza mostró que existe un efecto de los factores tipo de hongo, medio y tiempo ( $p < 0.0001$ ) (anexo J), enseguida se analizaron las medias de la interacción de los tres factores por Duncan ( $\alpha = 0.05$ ). Al realizar el análisis se observó que los tres aislados presentaron la actividad EnG desde las primeras 24 h de fermentación utilizando las dos fuentes de carbono. Los máximos valores de la actividad los presentó *P. funiculosum* FG1 en el medio Avicel con 606.16 U/L a las 120 h, sin existir diferencia significativa con *C. cladosporioides* FC2 en el mismo medio con 604.15 U/L, pero este las produjo a las 144 h. La cepa de *F. verticillioides* FG3 exhibió la actividad EnG con un valor de 457.49 U/L en medio CMC y su actividad en el medio Avicel permaneció sin cambio a partir de las 24 h con una máxima de 210.77 U/L (figura 19).

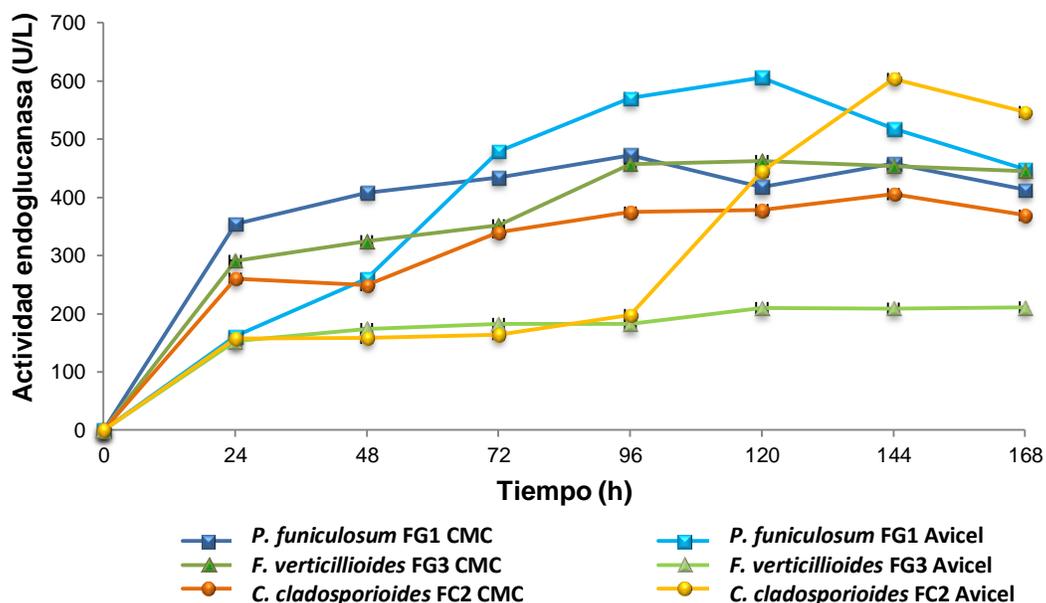


Figura 19. Actividad enzimática endoglucanasa de los hongos *P. funiculosum* FG1, *F. verticillioides* FG3 y *C. cladosporioides* FC2, utilizando CMC y Avicel como fuentes de carbono.

Actividad ExG. El análisis de varianza mostró que existe un efecto de los factores tipo de hongo, medio y tiempo ( $p < 0.0001$ ) (anexo K), analizándose las medias de la interacción de los tres factores por Duncan ( $\alpha = 0.05$ ). Los resultados obtenidos para esta actividad (figura 20), muestran que la actividad enzimática estuvo presente a partir de las 24 horas de la fermentación de los tres aislados en el medio CMC y de las 48 h hasta el término de la fermentación permanecieron constantes entre 88 y 105 U/L. *P. funiculosum* FG1 en Avicel mostró su mayor actividad ExG con 205.73 U/L a las 96 h sin presentar diferencia significativa con *C. cladosporioides* FC2 en el mismo medio con 200.96 U/L a las 144 h.

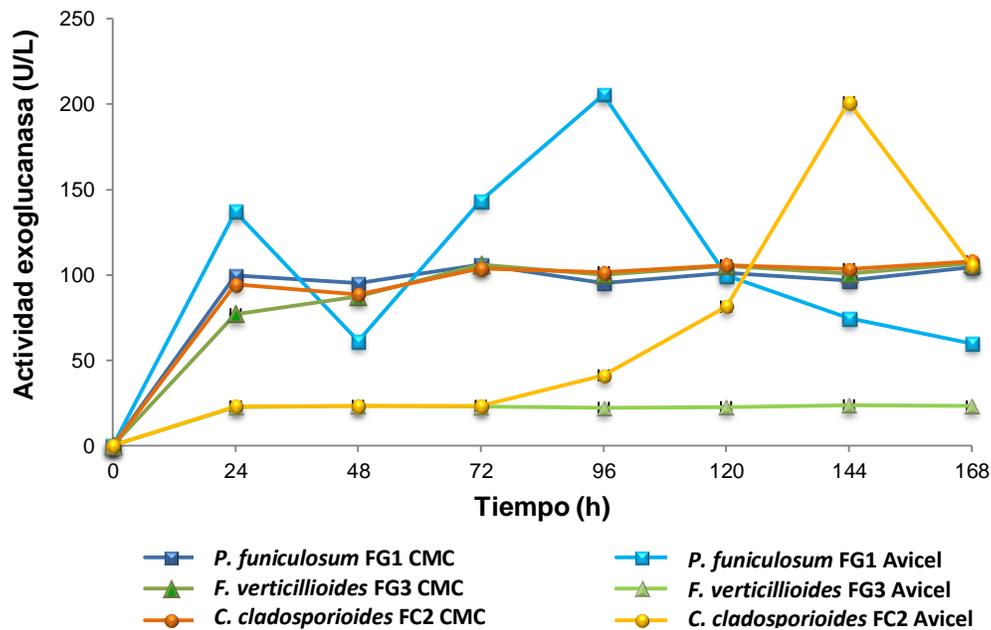


Figura 20. Actividad enzimática exoglucanasa de los hongos *P. funiculosum* FG1, *F. verticillioides* FG3 y *C. cladosporioides* FC2, empleando CMC y Avicel como fuentes de carbono.

Actividad BG. Esta actividad es importante ya que es la que causa la hidrólisis de la celobiosa a glucosa y porque, las EnG y ExG son inhibidas al acumularse la celobiosa. El análisis de varianza mostró que existe un efecto de los factores tipo de hongo, medio y tiempo ( $p < 0.0001$ ) (anexo L), por lo que se analizaron las medias de la interacción de los tres factores por Duncan ( $\alpha = 0.05$ ). El aislado *F. verticillioides* FG3 en el medio CMC fue quien generó la mayor actividad BG desde el inicio del cultivo con una máxima de 663.78 U/L a las 168 h, presentando diferencia significativa con los demás tratamientos (figura 21) y en el medio Avicel no presentó la actividad. El aislado *P. funiculosum* FG1 presentó su máxima actividad en el medio Avicel con 401.42 U/L a las 96 h y en el medio CMC 275.27 U/L a las 120 h. *C. cladosporioides* FC2 exhibió su máxima actividad BG a las 144 h con 365.56 U/L en el medio Avicel y en CMC 240.70 U/L a las 168 h de cultivo.

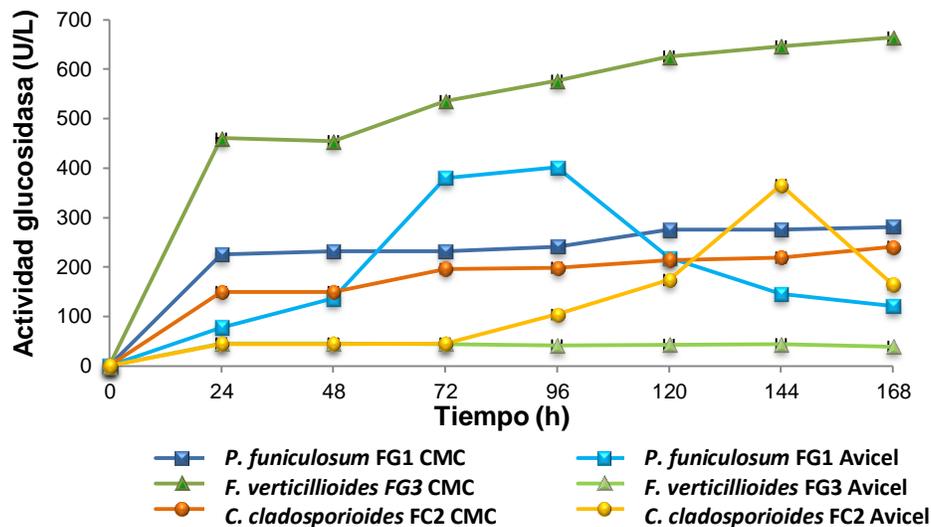


Figura 21. Actividad enzimática glucosidasa de los hongos *P. funiculosum* FG1, *F. verticillioides* FG3 y *C. cladosporioides* FC2, utilizando CMC y Avicel como fuentes de carbono.

#### 7.4 Actividad celulolítica de *P. funiculosum* FG1 utilizando residuos de *M. oleífera* como fuente de carbono

De los 48 microorganismos aislados y purificados de biomasa de moringa *P. funiculosum* FG1, *F. verticillioides* FG3 y *C. cladosporioides* FC2 fueron seleccionados por presentar la mayor actividad celulolítica a nivel cualitativo. Al evaluar las actividades celulolíticas a nivel cuantitativo de estos tres hongos filamentosos, *P. funiculosum* FG1 y *C. cladosporioides* FC2 presentaron las máximas actividades EnG y ExG en el medio que contenía Avicel (celulosa cristalina) como fuente de carbono, de estos dos últimos el aislado *P. funiculosum* FG1 fue quien obtuvo sus máximos valores en un menor tiempo de incubación y su actividad BG fue mayor que *C. cladosporioides* FC2 utilizando la misma fuente de carbono. Por lo antes expuesto el aislado identificado como *P. funiculosum* FG1 fue seleccionado para continuar la siguiente etapa de la investigación.

Para realizar los experimentos con *P. funiculosum* FG1 en fermentación sumergida, se utilizaron tres medios minerales distintos (A, B y C) (anexo C y F) y se emplearon dos fuentes de carbono: Avicel (A) y *M. oleífera* sin pretratar (M). A cada una de las

reacciones enzimáticas se les restó los azúcares reductores que tenía el extracto enzimático (anexo M) en la hora cero y las condiciones para evaluar la actividad fueron: pH 4 y 15 min de tiempo de incubación en la reacción enzimática para EnG y ExG, mientras que para BG fueron pH 4.5 y 50 min (anexo N). Al analizar el resultado de la actividad celulolítica de *P. funiculosum* FG1 se observó que las tres actividades celulolíticas se presentaron en todos los tratamientos a excepción del tratamiento medio B con Avicel (BA) (figura 22). Los tratamientos que presentaron los valores máximos en la actividad EnG fueron: el tratamiento medio C y Avicel (CA) (1,965.43 U/L) a las 192 h de incubación, seguido por el tratamiento medio C y moringa (CM) (1,618.86 U/L) a partir las 96 h (figura 22a).

Los tratamientos que contenían medio C, fueron los que presentaron la mayor actividad ExG de *P. funiculosum* FG1 desde las 48 h de incubación (figura 22b) y donde se observó la actividad ExG menor fue en los tratamientos con medio B. La mayor actividad ExG fue de 2,015.76 U/L correspondiente al tratamiento medio C y Avicel (CA) a las 168 h, seguido del tratamiento medio C y moringa (CM) con 1,700.08 U/L a las 96 h de fermentación.

*P. funiculosum* FG1 en los tratamientos medio A y Avicel (AA), medio B y Avicel (BA), medio B y moringa (BM), y medio C y Avicel (CA), se presentó la actividad BG con valores por debajo de 180 U/L desde las 24 h hasta finalizar la fermentación. Por el contrario, en los tratamientos con el medio C y moringa (CM) y medio A y moringa (AM) a partir de las 72 h incrementaron sus valores en la actividad BG, presentando la máxima de 923.76 U/L a las 144 h del tratamiento medio C y moringa (CM) seguido del tratamiento medio A y moringa (AM) con 712.53 U/L en el mismo tiempo de incubación (figura 22c).

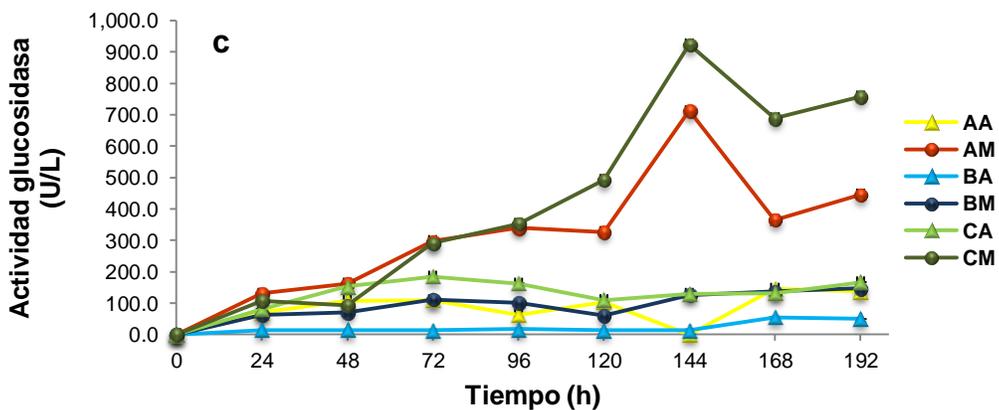
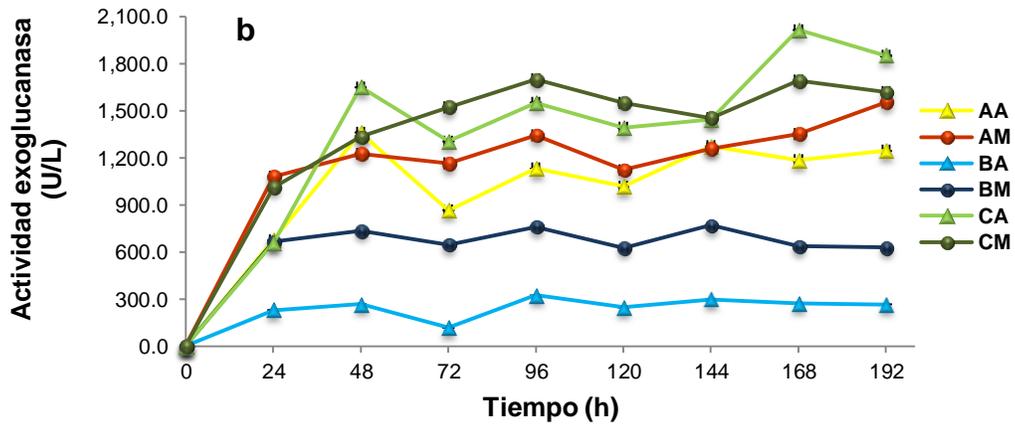
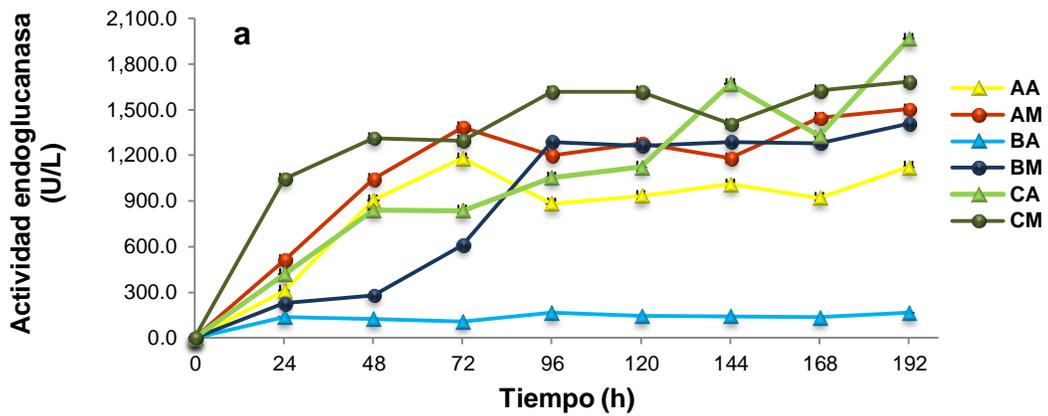


Figura 22. Actividades endoglucanasa (a), exoglucanasa (b) y glucosidasa (c) de *P. funiculosum* FG1 en fermentación sumergida en tres medios minerales distintos (A, B y C), empleando el residuo de moringa sin pretratar (M) y Avicel (A) como fuente de carbono.

### 7.5 Pretratamiento y caracterización estructural del residuo de *M. oleifera*

Enseguida del pretratamiento de residuo de moringa con ácido sulfúrico, se procesaron las muestras (sin pretratar y pretratadas) para conocer el porcentaje de sólidos que se pierde en el pretratamiento. En los resultados obtenidos se observó que cuando la cantidad de ácido sulfúrico fue mayor (3%) la recuperación de sólidos fue menor (62.74%) y la cantidad de cenizas se concentró (10.51%) (cuadro 7).

Cuadro 7. Cantidad de sólidos, humedad y ceniza del residuo de moringa sin pretratar y pretratada con ácido sulfúrico.

PRETRATAMIENTO	Recuperación de sólidos (%)	Humedad (%)	Sólidos totales (%)	Ceniza (%)
Moringa sin pretratar	<b>100</b>	<b>5.88±0.66</b>	<b>94.22</b>	<b>6.29±0.64</b>
Moringa pretratada (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2%)	<b>65.68</b>	<b>5.07±0.04</b>	<b>94.93</b>	<b>6.40±0.03</b>
Moringa pretratada (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3%)	<b>62.74</b>	<b>1.59.038</b>	<b>98.41</b>	<b>10.51±0.39</b>

En esta investigación se caracterizó estructuralmente la moringa sin pretratar y pretratada (2% y 3% ácido sulfúrico). El residuo de moringa sin pretratar presentó un 50.92% de celulosa, 34.68% de hemicelulosa y un 14.39% de lignina.

En el residuo de moringa pretratado con 2% de ácido sulfúrico fue donde hubo una reducción mayor de hemicelulosa quedando en 24.99% y en ese mismo tratamiento fue donde se obtuvo el mayor porcentaje de celulosa 63.66% (figura 25). La mayor reducción del porcentaje de lignina se presentó en el tratamiento con 3% de ácido sulfúrico quedando 8.42% (figura 23).

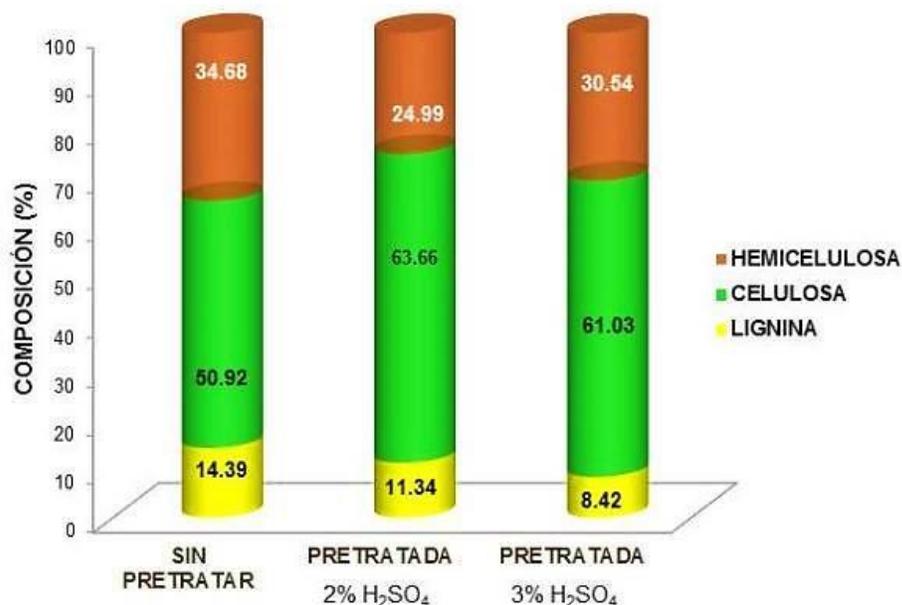


Figura 23. Caracterización de la composición (celulosa, hemicelulosa y lignina) del residuo de moringa sin pretratar y pretratado con ácido sulfúrico (2 y 3%).

### 7.6 Evaluación del extracto enzimático de *P. funiculosum* FG1 en la sacarificación de biomasa residual de *M. oleifera*

En el apartado 7.4 de este trabajo se indicó que el aislado *P. funiculosum* FG1 presentó sus mejores valores de actividades EnG, ExG y BG utilizando el residuo del cultivo de *M. oleifera* sin pretratar como fuente de carbono en el medio C. Con esta información se preparó un extracto enzimáticos en fermentación sumergida, también se preparó un extracto enzimáticos utilizando Avicel como fuente de carbono en medio C con el mismo aislado y tiempo de fermentación.

Los dos extractos se concentraron por ultrafiltración y liofilización. En la ultrafiltración el volumen del extracto se redujo a un 9% y en la liofilización a un 5%. En la figura 24 se presentan los valores de las actividades enzimáticas EnG, ExG y BG antes de la concentración de los dos extractos, posterior a la concentración (ultrafiltración y liofilización) y también en el residuo o sobrante de la ultrafiltración.

Con los dos métodos empleados para concentrar el extracto enzimático, se logró incrementar las actividades celulolíticas. El incremento más alto para la actividad EnG se observó al utilizar la liofilización (12 veces) en el extracto con moringa como fuente de carbono (figura 24a), sin embargo, el método no fue tan efectivo en la actividad del extracto que utiliza Avicel como fuente de carbono (incremento 7.7 veces). El incremento en la actividad EnG utilizando la ultrafiltración fue similar para los dos extractos enzimáticos. Al evaluar el incremento de la actividad ExG, se observó el mayor incremento de actividad al utilizar la liofilización en el extracto que integró Avicel como fuente de carbono (12 veces) (figura 24b), similar al incremento en la actividad BG utilizando la misma metodología pero en el extracto que utilizó moringa como fuente de carbono (figura 24c).

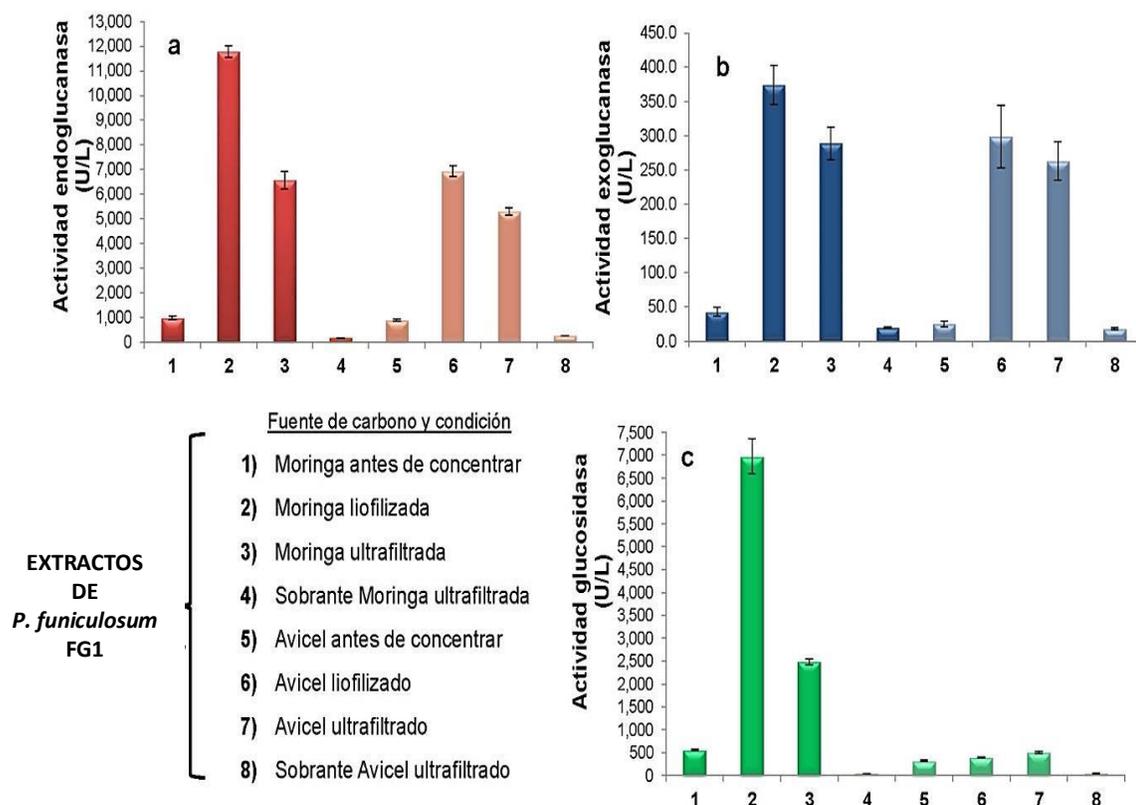


Figura 24. Actividades enzimáticas de *P. funiculosum* FG1, gráfica a) actividad Eng, gráfica b) ExG y gráfica c) BG, utilizando residuo de moringa y Avicel como fuente de carbono antes y después de realizarse la concentración por liofilización o ultrafiltración.

### 7.6.1 Hidrólisis enzimática del residuo de moringa

En la hidrólisis enzimática del residuo de moringa sin pretratar y pretratado (2% ácido sulfúrico), se utilizó el extracto enzimático de *P. funiculosum* FG1 utilizando la paja de moringa como fuente de carbono, el extracto se concentró por ultrafiltración. La máxima cantidad de azúcares (67.93 mg/g) se observó en el tratamiento con moringa sin pretratar (figura 25). La producción de azúcares reductores se observaron desde las primeras tres horas de hidrólisis en las dos condiciones, pero a partir de las nueve horas la hidrólisis el tratamiento con moringa sin pretratar presentó un incremento del 35% de los azúcares reductores con respecto a los generados en la moringa pretratada.

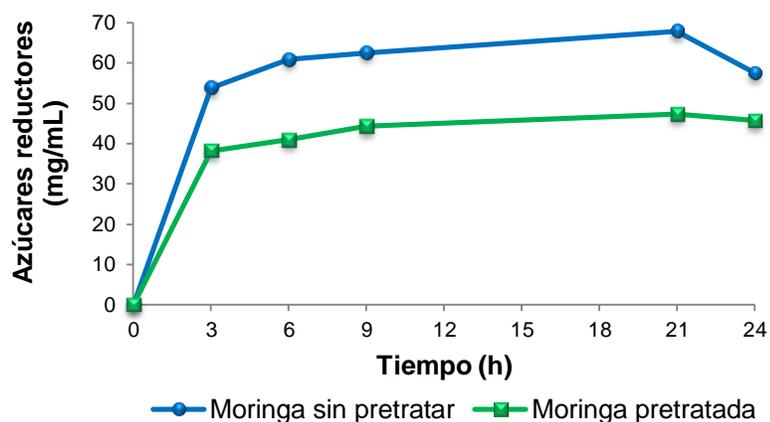


Figura 25. Hidrólisis enzimática de moringa utilizando el extracto enzimático concentrado de *P. funiculosum* FG1.

## 8. DISCUSIÓN

Al realizar el aislamiento de microorganismos en la biomasa de moringa, el grupo que predominó fue el de las bacterias. Según, Fredrickson *et al.* (2004) las bacterias pueden sobrevivir en la mayoría de los ambientes, inclusive en estrés físico-químico extremo. También se aisló un grupo pequeño de hongos filamentosos los cuales tienen distribución cosmopolita (Aguirre *et al.*, 2013). La poca presencia de los hongos se debe posiblemente a la época en que se obtuvieron los aislados fúngicos (mayo de 2013), en este mes el clima fue caluroso y con escasas de lluvia (INEGI, 2013). Guzmán (1998a) indica que la diversidad fúngica mexicana es mayor en los bosques y menor en las zonas áridas.

En la evaluación cualitativa de los microorganismos aislados y purificados, los hongos filamentosos presentaron un mayor halo de hidrólisis de celulosa (anexo G), lo cual coincide con lo reportado por Gutierrez *et al.* (2015) quienes indican que los hongos filamentosos son uno de los grupos más activos y eficientes para degradar la celulosa a través de la expresión de celulasas. Es importante identificar a los organismos que presentaron la mayor actividad celulolítica, se realizó la identificación morfológica y molecular lo que nos permitió identificarlos como: *P. funiculosum*, *F. verticillioides* y *C. cladosporioides*. Jahangeer *et al.* (2005), confirman la capacidad de degradar la celulosa de *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp., los cuales aislaron de tejido vegetal. También, Machado *et al.* (2010) y Maeda *et al.* (2010, 2013) trabajaron con cepas de *P. funiculosum* e indican que tienen un gran potencial en la producción de celulasas. De la misma forma De Almeida *et al.* (2013) presentaron una cepa de *F. verticillioides* aislada de semilla de maíz y la describen como buena productora de EnG. Por otra parte Ji *et al.* (2014), investigaron la actividad enzimática celulolítica de *C. cladosporioides* Ch2-2 y determinaron que presenta actividad ExG.

En la producción de celulasas, la fuente de carbono puede tener efectos represores o inductores sobre la cantidad y calidad de las enzimas, reflejando su efecto sobre la producción de azúcares reductores (Gupta *et al.*, 2010). El medio CMC fue el mejor sustrato para la producción de azúcares reductores (figura 18). El CMC es un

dereivado de la celulosa pretratada con álcali o ácido para darle una estructura amorfa, este tratamiento provee una estructura que permite un mayor acceso a las celulasas, permitiendoles la liberación de los azúcares que lo conforman (Ortíz y Uribe, 2011). Estos resultados fueron consistentes con lo reportado por Ramanathan *et al.* (2010), quienes informan que CMC representa un importante papel en la actividad celulolítica de *F. oxysporum*.

Los resultados obtenidos de la actividad EnG de *F. verticillioides* FG3 (figura 19), son similares con los datos reportados por Dar *et al.* (2013), quienes analizaron el efecto de diferentes fuentes de carbono (incluida la celulosa cristalina) sobre la producción de celulasas por *F. oxysporum* e informaron que la mejor actividad EnG se encontró en CMC. Syed *et al.* (2013), presentaron al hongo *Penicillium* sp. NFCCI 2862 utilizando distintos sustratos y ellos reportaron la máxima actividad EnG de su aislado a las 144 h utilizando celulosa cristalina, coincidiendo el resultado con *P. funiculosum* FG1 en el mismo tiempo y misma fuente de carbono (figura 19). Una tendencia similar ha sido reportada por Carvalho *et al.* (2014) quienes evaluaron tres sustratos celulósicos (Avicel, CMC y celobiosa) e investigaron su potencial como fuentes de carbono para la producción de celulasas por *P. funiculosum*, ellos reportaron que Avicel promovió una mayor actividad EnG. Un estudio muy similar realizaron Rao *et al.* (1988), donde evaluaron la inducción de la actividad EnG de *P. funiculosum* con celobiosa, lactosa, Avicel y CMC. Ellos reportaron que CMC indujo la actividad, pero Avicel fue el mejor inductor, lo cual coincide con nuestros resultados de actividad EnG de *P. funiculosum* FG1. También, Santa *et al.* (2018), reportan a *Penicillium* sp. LMI01 con valores de 604 U/L para la actividad EnG, similar al valor obtenido por *P. funiculosum* FG1, a partir de las primeras 72 horas de cultivo (figura 19), pero ellos utilizaron CMC como fuente de carbono. Los investigadores Abraha y Gashe (1992), observaron una gran cantidad de actividad celulolítica en una especie de *Cladosporium* cuando el hongo fue cultivado en agitación con CMC, también reportaron una disminución significativa de actividad cuando cultivaron el hongo con Avicel como sustrato. La hidrólisis de la celulosa cristalina por las celulasas es un paso crítico y se espera que las ExG actúen sobre

ella. *P. funiculosum* FG1 y *C. cladosporioides* FC1 presentaron la mayor actividad EnG utilizando Avicel como fuente de carbono (figura 19). Zhang *et al.* (2018), reportaron a la bacteria termofila *Clostridium cellulosi* CcCel9A, la cual despliega una endoglucanasa multimodal, con un módulo de la familia 9 de glucósido hidrolasa (GH) con una hendidura abierta y cinco módulos de unión a carbohidratos (CBM) que hidroliza la celulosa cristalina de manera procesiva.

Los resultados del análisis de la actividad ExG utilizando CMC y Avicel como fuente de carbono, nos indican que *P. funiculosum* FG1 mostró una mayor actividad en el medio Avicel (figura 20), lo cual concuerda con lo reportado por Syed *et al.* (2013), quienes evaluaron la actividad ExG de un aislado de *Penicillium* sp. utilizando celulosa cristalina como sustrato. Otro caso similar es el de Faria *et al.* (2008), ellos trabajaron con *P. echinulatum* y reportaron su mayor actividad ExG en celulosa cristalina. Los resultados que se obtuvieron en la actividad ExG de *P. funiculosum* FG1 (205.73 U/L) fueron superiores a los mostrados por Machado *et al.* (2010), quienes estudiaron a *P. funiculosum* y reportaron 170 U/L de actividad, utilizando Avicel como sustrato.

La enzima BG generalmente es responsable de la regulación del proceso celulolítico y limita la velocidad en la hidrólisis enzimática de la celulosa. La actividad EnG y ExG frecuentemente son inhabilitadas por la celobiosa. La enzima BG no solo produce glucosa a partir de celobiosa, también reduce la inhibición de la celobiosa, lo que permite la actividad más eficiente de EnG y ExG (Harhangi *et al.*, 2002; Kaur *et al.*, 2007). *P. funiculosum* FG1, *C. cladosporioides* FC2 y *F. verticillioides* FG3 presentaron la actividad BG, los dos primeros mostraron sus máximos valores en Avicel como fuente de carbono, mientras que *F. verticillioides* FG3 lo presentó en el sustrato CMC y exhibió el valor más alto de actividad BG (663.78 U/L) (figura 21). Este resultado, supera a lo reportado por Ramírez y Cocha (2003) que trabajaron con diez actinomicetos termófilos de Perú, utilizando CMC como fuente de carbono. En el trabajo de Bai *et al.* (2013), se evaluó la actividad BG en *P. simplicissimum* H-11 y reportaron que al utilizar CMC como fuente de carbono el aislado no presentó

actividad y al utilizar celulosa cristalina (1%) si se observó la actividad. Las actividades enzimáticas celulolíticas para cada cepa estudiada se presentan de una forma muy particular. Gutiérrez *et al.* (2015) al investigar varias metodologías para producir actividades celulolíticas, sistemas de activación y represión de las mismas actividades en distintos hongos filamentosos, indican que se puede presentar alta variabilidad entre las actividades celulolíticas de microorganismos del mismo género y especie, aun cuando son evaluadas en los mismos sustratos. Ellos indican que puede deberse a diferencias entre las condiciones de ensayo que utiliza cada investigador, al uso de preparados con diversos grados de pureza u obtenidos usando diferentes protocolos de purificación.

Con el objetivo de incrementar las actividades celulolíticas, se han realizado estudios sobre el efecto del medio de cultivo en la producción de celulasas, utilizando diferentes combinaciones de macrominerales y microminerales, fuentes de nitrógeno y fuentes de carbono económicas, incluidos bagazo de caña de azúcar (Maeda *et al.*, 2010), salvado de trigo, rastrojo de maíz (Gao *et al.*, 2008) y paja de arroz (Chiranjeevi *et al.*, 2012). En ese contexto, una parte de este trabajo de tesis se dedicó al estudio del incremento de las actividades celulolíticas de *P. funiculosum* FG1, el cual se seleccionó sobre otros aislados, por presentar altas actividades EnG, ExG y BG utilizando Avicel como fuente de carbono en medio mineral A (figuras 19, 20 y 21). Buscando el incremento de las actividades celulolíticas *del hongo antes mencionado* e implementando una fuente de carbono alternativa a las sintéticas (CMC y Avicel) que se utilizan a nivel laboratorio, se utilizó la paja residual del cultivo de moringa, más la integración de los medios minerales B y C. En el extracto enzimático producto de las fermentaciones antes mencionadas, se realizó la evaluación de las tres actividades celulolíticas, observándose un incremento significativo en las actividades enzimáticas en los tratamientos que contenían el medio mineral C utilizando las dos fuentes de carbono (figura 22), este medio a diferencia del medio B y A contenía Peptona y Tween 80, este último compuesto es ampliamente utilizado en formulaciones fungicas para mejorar la dispersión de las esporas en el agua, ya que es un tensoactivo no ionico que disminuye la tensión

superficial del agua favoreciendo la homogenización, puede inferir en el aumento de la viabilidad de las esporas y en la esporulación (Tequida *et al.*, 2002; Morales y Cazorla, 2017), y también favorece a un mayor contacto entre las estructuras del hongo con la fuente de carbono. Ribeiro *et al.* (2012), estudiaron el perfil del secretoma de *P. echinulatum* después de cultivarlo en bagazo de caña de azúcar sin pretratar, en celulosa microcristalina y también en tres tipos de bagazo de caña de azúcar pretratados. Sus resultados evidenciaron que el el bagazo de caña de azúcar sin pretratar, promovió la secreción de un repertorio más amplio de enzimas, lo que se tradujo a una mayor actividad celulolítica, aun cuando la composición de este bagazo fue el más heterogéneo y recalcitrante. Un comportamiento similar a lo antes descrito, se ha observado en los extractos enzimáticos de *P. funiculosum* FG1 de esta investigación.

Al trabajar con la biomasa lignocelulósica y desear introducirla en un sistema biotecnológico de producción de celulasas o de azúcares reductores, es necesario pretratar a la biomasa para obtener una estructura menos recalcitrante, la cual permita a las enzimas celulolíticas acceder con mayor facilidad a la celulosa. Uno de los pretratamientos más utilizados es el que se realiza con ácido sulfúrico, este hidroliza la hemicelulosa a xilosa y otros azúcares, también altera la estructura de la lignina y en consecuencia aumenta la porosidad de la biomasa lignocelulósica (Menon y Rao, 2012). Se ha utilizado el ácido sulfúrico en el pretratamiento de diversos residuos (árbol de oliva, paja de colza, pasto switchgrass, bagazo de caña y cascarilla de arroz), las concentraciones del ácido y sus consecuencias en la producción de glucosa llegan a diferentes resultados dependiendo del tipo de materia prima y la cantidad de ácido utilizado (Cara *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2009). Sin embargo, si se utiliza el ácido sulfúrico en menores concentraciones y sin incrementar los pasos adicionales al proceso de pretratamiento, se tendrán mayores beneficios tanto en el costo de producción como en la disminución de desechos. Para conocer el impacto del tratamiento sobre el sustrato, se cuantificó también la celulosa, hemicelulosa y lignina de moringa antes del pretratamiento y los resultados obtenidos fueron muy similares a los reportados Cobas y Molina (2004), que

reportaron que la madera de moringa contiene 53.4% de celulosa y 17.7% de lignina, la diferencia que se observa en la lignina posiblemente se debió a que la muestra que ellos utilizaron tenía más días de cultivo. En esta investigación se realizó el pretratamiento de moringa con ácido sulfúrico diluido y se observó que el tratamiento más efectivo en la hidrólisis de hemicelulosa fue el tratamiento que contenía 2% del ácido (27% de reducción) y al cuantificar la celulosa en este mismo tratamiento fue donde se presentó la mayor cantidad de esta, sin embargo el mayor decremento de lignina se obtuvo con el tratamiento del 3% de ácido (disminución de un 41.40%) (figura 23). Sharma *et al.* (2015), pretrataron paja de trigo con ácido sulfúrico al 2.5% y reportaron valores de 67.5% en celulosa, 30.0% de lignina y 3.5% de hemicelulosa, en sus resultados se observa una reducción significativa de hemicelulosa mayor a la obtenida en este trabajo al utilizar la dosis más alta de ácido.

Los resultados de la hidrólisis enzimática de moringa sin pretratar y pretratada (ácido sulfúrico 2%), utilizando extracto enzimático concentrado por ultrafiltración de *P. funiculosum* FG1, mostraron que aun cuando el residuo de moringa pretratada contenía un mayor porcentaje de celulosa, el extracto enzimático actuó sobre este residuo con menor eficiencia para generar azúcares reductores (figura 25). Contrario a lo reportado por Salcedo *et al.* (2011), que evaluaron la hidrólisis enzimática de residuos del cultivo de la caña de azúcar (hojas y cogollos) sin pretratar y pretratados utilizando celulasas comerciales; reportando que el residuo pretratado facilitó el ataque de las enzimas a la matriz lignocelulósica generando la mayor hidrólisis. Sin embargo existen reportes como los de Sharma *et al.* (2015), quienes describen que las celulasas de *P. janthinellum* EMS-UV-8 fueron más efectivas cuando utilizaron paja de trigo no tratado como fuente de carbono en comparación a las generadas al utilizar paja de trigo severamente pretratada y celulosa-II. Ogunmolu *et al.* (2018) examinaron exhaustivamente la dinámica del secretoma de una cepa de *P. funiculosum* utilizando Avicel y Avicel combinado con salvado de trigo como inductores de celulasas, ellos reportaron al hongo como hipercelulolítico cuando utilizó Avicel y salvado de trigo [celobiohidrolasa I (GH7-CBM1), celobiohidrolasa II (GH6-CBM1),  $\beta$ -glucosidasa (GH3), arabinofuranosidasa (GH51) y  $\beta$ -xylosidasa

(GH3)]. Ellos también presentaron cómo la maquinaria enzimática del hongo responde produciendo celulasas poliméricas en las dos fases; las iniciales actúan para hidrolizar los sustratos compuestos en el entorno de cultivo y la segunda ola de proteínas tienden a adaptarse más al sustrato específico en los medios de cultivo. El extracto enzimático de *P. funiculosum* FG1 que se utilizó en este trabajo posiblemente contiene las enzimas que Ogunmolu *et al.* (2018) reportaron, lo que permitió al complejo enzimático hidrolizar con mayor eficiencia la moringa sin pretratar.

## 9. CONCLUSIONES

✚ Se aislaron y purificaron cuarenta y dos microorganismos con actividad celulolítica cualitativa de la biomasa aérea de *M. oleifera*. Del total de los microorganismos aislados, las bacterias fueron las que predominaron, pero fueron los hongos quienes mayor actividad celulolítica presentaron. De estos últimos, se seleccionaron las tres cepas con mayor actividad y se identificaron como hongos filamentosos *P. funiculosum* FG1, *F. verticillioides* FG3 y *C. cladosporioides* FC2.

✚ *P. funiculosum* FG1 y *C. cladosporioides* FC2 presentaron sus máximas actividades celulolíticas (EnG, ExG y BG) en Avicel, siendo esta la fuente de carbono la más recalcitrante, evidenciando un potencial deseado en la industria de las celulasas. Por el contrario, *F. verticillioides* FG3 utilizó CMC mostrando una significativa actividad BG, que en un trabajo futuro se puede optimizar para complementar los cocteles celulolíticos comerciales como los de *T. reesei*.

✚ *P. funiculosum* FG1 y el residuo de *M. oleifera* se proponen como una alternativa en la industria de las celulasas.

✚ Los pretratamientos con ácido sulfúrico utilizados en los residuos de *M. oleifera* permitieron alterar la estructura lignocelulósica, aumentando con ello la biodisponibilidad de celulosa y disminuyendo tanto a la hemicelulosa como la lignina.

✚ El extracto enzimático concentrado de *P. funiculosum* FG1 se utilizó sobre el residuo del cultivo de *M. oleifera*. El resultado que se obtuvo indica que las enzimas presentes en el extracto, hidrolizan con mayor facilidad y eficiencia la celulosa presente en el residuo de moringa sin pretratar. Por otra parte, es necesario el estudio de la arquitectura molecular y los mecanismos de regulación involucrados en la biosíntesis de estas enzimas.

## 10. LITERATURA CONSULTADA

- Abdulkarim S. M., Long K., Lai O. M., Muhammad S. K. S. y Ghazali H. M. 2005. Some physico-chemical properties of *Moringa oleifera* seed oil extracted using solvent and aqueous enzymatic methods. *Food Chem.* 93: 253-263.
- Abrha B. y Gashe B. A. 1992. Cellulase production and activity in a species of *Cladosporium*. *World J Microbiol Biotechnol.* 8: 164-166.
- Aguirre A. E., Ulloa M., Aguilar S., Cifuentes J. y Valenzuela R. 2013. Biodiversidad de hongos en México. *Rev Mex Biodivers.* doi.10.7550/rmb.33649
- Ahmed S., Bashir A., Saleem H., Saadia M. y Jamil A. 2009. Production and purification of cellulose-degrading enzymes from a filamentous fungus *Trichoderma harzianum*. *Pak J Bot.* 41(3): 1411-1419.
- Alani F., Anderson W. y Moo-Young M. 2008. New isolate of *Streptomyces* sp. with novel thermoalkalotolerant cellulases. *Biotechnol Lett.* 30: 123-126.
- Angiosperm Phylogeny Group (APG) 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot J Linn Soc.* 161: 105-121.
- Amore A., Giacobbes S. y Faraco V. 2013. Regulation of cellulase and hemicellulase gene expression in fungi. *Curr Genom.* 14: 230-49.
- Aro N., Pakula T. y Penttila M. 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev.* 29: 719–739.
- Bai H., Wang H., Sun J., Irfan M., Han M., Huang Y. y Yang Q. 2013. Production, purification and characterization of novel beta glucosidase from newly isolated *Penicillium simplicissimum* H-11 in submerged fermentation. *EXCLI J.* 12: 528-540.
- Bailey B. A. y Lumsden R. D. 1998. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens. In: Harman G.F., Kubicek C. P. (Eds) *Trichoderma & Gliocladium —Enzymes, biological control and commercial applications*, vol 2. Taylor & Francis, London, pp 327-342.
- Baldrian P. y Valaskova V. 2008. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiol Rev Epub.* doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00106.x.

- Bamforth C. 2009. Beer: Tap into the Art and Science of Brewing Hardcover. Oxford University Press (Eds). New York, NY.
- Barnett H. L. y Hunter B. B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th Edition. APS PRESS. St. Paul, Minnesota.
- Beldman G., Searle-van Leeuwen M. F., Rombouts F. M. y Voragen F. G. J. 1985. The cellulase of *Trichoderma viride*. Purification, characterization and comparison of all detectable endoglucanases, exoglucanases and  $\beta$ -glucosidases. Eur J Biochem. 146(2): 301-8.
- Benítez T., Delgado-Jarana J., Rincón A. M., Rey M. y Limón M. C. 1998. Biofungicidas: *Trichoderma* as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi. In: Pandalai SG (Eds) Recent research developments in microbiology, vol. 2. Research Signpost, Trivandrum, pp 129-150.
- Bhat M. K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. Biotechnol Adv. 18: 355-383.
- Blaschek H. P., Ezeji T. C. y Sdcheffran J. 2010. Biofuels from agricultural wastes and byproducts: an introduction, in biofuels from agricultural wastes and byproducts. Wiley-Blackwell (Eds), Oxford, UK. doi.10.1002/9780813822716.ch1
- Bonifaz T. J. A. 2015. Propiedades generales de los hongos. Sánchez M. R. M. (Ed). En: Micología médica básica. Quinta Edición. Ed. McGraw-Hill, México, D. F. 30 p.
- Cara C., Ruiz E., Oliva J. M., Sáez F. y Castro E. 2008. Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. Bioresour Technol. 99: 1869-1876.
- Cazemier A. E., Verdoes J. C., Reubsaet F. A., Hackstein J. H., Van der Drift C. y Op den Camp H. J. 2003. *Promicromonospora pachnodae* sp. nov., a member of the (hemi) cellulolytic hindgut flora of larvae of the scarab beetle *Pachnoda marginata*. Antonie Van Leeuwenhoek. 83: 135-48.
- Cha J. y Doi R. H. (2008). Effect of Multiple Copies of Cohesins on Cellulase and Hemicellulase Activities of *Clostridium cellulovorans* Mini-cellulosomes. Korean Society Biotechnol Bioeng. 10: 66-96.

- Chávez M. S. y Domine M. E. 2013. Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Av Cienc Ing.* 4(4): 15-46.
- Chiranjeevi T., Rani G., Chandel A. K., Sekhar P. V., Prakasham R. S. y Addepally U. 2012. Optimization of holocellulolytic enzymes production by *Cladosporium cladosporioides* using Taguchi-L'16 orthogonal array. *J Biobased Mater Bioenergy.* 6(2): 148-157.
- Clarke A. J. y Adams L.S. 1987. Irreversible inhibitttransition metal ions. *BBA-Protein Structure and Molecular Enzymology.* 916: 213-219.
- Cobas A. C. y Molina L. B. 2004. Aptitud papelera de *Moringa oleifera*. V Jornadas de Desarrollo e Innovación. Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI).
- Crueger, W. y Crueger A. 1993. Biotecnología. Manual de Microbiología Industrial, Ed. Acribia. Madrid, España.
- Cunningham R. y López G. 1994. Etanol de lignocelulósicos: Tecnología y perspectivas. Programa CYTED.
- Czaja W. K., Young D. J., Kaweck I. M. y Brown R. M. 2007. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. *Biomacromolecules.* 8: 1-12.
- Davies G. y Henrissat B. 1995. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure.* 3:853-859. doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00220-9
- Darabzadeh N., Hamidi-Esfahani Z. y Hejazi P. 2018. Improvement of cellulase production and its characteristics by inducing mutation on *Trichoderma reesei* 2414 under solid state fermentation on rice by-products. *Appl Food Biotechnol.* 5:1. doi.org/10.22037/afb.v%vi%i.18651
- Dar R. A., Saba I., Shahnawaz M., Sangale M. K., Rather S. A. y Qazi P. H. 2013. Isolation, purification and characterization of carboxymethyl cellulase (CMCase) from endophytic *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin. *Adv Enzyme Rev.* 1(04): 91. doi.10.4236/aer.2013.14010
- De Almeida M. N., Guimarães V. M., FalKoski D. L., Paes G. B. T., Ribeiro J. I. Jr., Visser E. M., Alfenas R. F., Pereira O. L. y de Rezande S. T. 2013. Optimization of endoglucanase and xylanase activities from *Fusarium verticillioides* for simultaneous saccharification and fermentation of

- sugarcane bagasse. *Appl Biochem Biotechnol.* doi.10.1007/s12010-013-0572-9
- De Castro A. M., de Albuquerque de Carvalho M. L., Leite S. G. F., Gomes S. F. y Pereira N. Jr. 2010. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 37: 151. doi.org/10.1007/s10295-009-0656-2
- Desvaux M. 2006. Unravelling carbon metabolism in anaerobic cellulolytic bacteria. *Biotechnol Prog.* 22: 1229.
- Ding M. G., Di Rago J. P. y Trumpower B. L. 2006. Investigating the Qn site of the cytochrome bc1 complex in *Saccharomyces cerevisiae* with mutants resistant to ilicicolin H, a novel Qn site inhibitor. *J Biol Chem.* 281(47): 36036-43.
- Duff S. B. y Murray W.D. 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol- A review. *Biores Technol.* 55: 1-33.
- Druzhinina I. S., Schmoll M., Seiboth B. y Kubicek C. P. 2006. Global carbon utilization profiles of wild-type, mutant, and transformant strains of *Hypocrea jecorina*. *Appl Environ Microbiol.* 72: 2126-2133.
- Edgar R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research.* 32: 1792-1797. doi. 10.1093/nar/gkh340
- Elberson M., Malekzadeh F., Yazdi M., Kameranpour N., Noori-Dalooi M., Matte M., Shahamat M., Colwell R. y Sowers K. 2000. *Cellulomonas persica* sp. nov. and *Cellulomonas iranensis* sp. nov., mesophilic cellulose-degrading bacteria isolated from forest soils. *Int J Syst Evol Microbiol.* 50: 993-996.
- Evans D. A. y Bravo J. E. 1983. Plant protoplast isolation and culture. *Int Rev Cyt Suppl.* 16: 33-53.
- Falasca S. L. y Bernabé M. A. 2009. Zonificación agrolimática de la moringa (*Moringa oleifera*) en Argentina para producir biodiesel y bioetanol. *Av Energ Renovables y Medio Ambiente.* 13: 65-70.
- Faria M., Kolling D., Camassola M., Pinheiro D. A. y Pereira R. 2008. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Biores Technol.* 99: 1417-1424.

- Fazenda, M. L., Seviour R., McNeil B. y Harvey L. M. 2008. Submerged Culture Fermentation of "Higher Fungi": the macrofungi. *Adv in Appl Microbiol.* 63: 33-103. doi.10.1016/S0065-2164(07)00002-0
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evol.* 39: 783-791.
- Fontaine S., Bardoux G., Benest D., Verdier B., Mariotti A. y Abdadie L. 2004. Mechanisms of the priming effect in the Savannah soil amended with cellulose. *Soil Sci Soc Am J.* 68: 125-131.
- Fredrickson J., Zachara J. y Balkwill D. 2004. Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the hanford site, Washington state. *Appl Environ Microbiol.* 70 (7): 4230-41.
- Galante Y. M., De Conti A. y Monteverdi R. 1998. Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries. In: Harman G. F, Kubicek C. P. (Eds) *Trichoderma & Gliocladium-Enzymes, biological control and commercial applications*, vol 2. Taylor & Francis, London, pp 327-342.
- Gao J., Weng H., Zhu D., Yuan M., Guan F. y Xi Y. 2008. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. *Bioresour Technol.* (16): 7623-7629.
- Garrido A., García A., Brenes M., Moyano M. J., Alba J. y García P. 2001. Improvement of phenolic compound content in virgin olive oils by using enzymes during malaxation. *J Food Eng.* 48: 189-194.
- Genome management information system/ORNL. In: Ritter S.K. 2008. Lignocellulose: A complex biomaterial. *Chem Eng News.* 86 (49): 15.
- Gou B.; Liang Y. y Zhue Y. 2009. Does salicylic acid regulate antioxidant defense system, cell death, cadmium uptake and partitioning to acquire cadmium tolerance in rice. *J Plant Physiol.* 166(1): 20-31. doi.10.1016/j.jplph.2008.01.002
- Gupta R., Mehta G., Deswal D., Sharma S., Kumar K. J., Singh A. y Kuhad R. 2013. Cellulases and their biotechnological applications. In: *Biotechnology for*

- environmental management and resource recovery, Kuhad R.C. and Singh A. (Eds.). doi.10.1007/978-81-322-0876-1\_6, Springer India cap 6
- Guzmán G. 1998a. Análisis cualitativo y cuantitativo de la diversidad de los hongos en México (Ensayo sobre el inventario fúngico del país). En: La diversidad biológica de Iberoamérica II, G. Halffter (Ed.). Acta Zool Mex. CYTED e Instituto de Ecología, Xalapa. pp 111-175.
- Gutiérrez R. I., Moreno S. N. y Montoya D. 2015. Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. Rev Iberoam Micol. 32:1-12. doi. org/10.1016/j.riam.2013.10.009
- Haines H. H. 1922. Botany of Bihar and Orissa. Part III. Calyciflorae. Adlard y Son (Eds). West Newman, London, p 316.
- Han W. y He M. 2010. The application of exogenous cellulase to improve soil fertility and plant growth due to acceleration of straw decomposition. BioresTechnol. 101: 3724-3731.
- Harman G. E. y Bjorkman T. 1998. Potential and existing uses of *Trichoderma* and *Gliocladium* for plant disease control and plant growth enhancement. *Trichoderma* and *Gliocladium*: enzymes, biological control and commercial applications, vol 2. Taylor y Francis Ltd (Eds), London, pp 229-265.
- Hebeish A. y Ibrahim N. A. 2007. The impact of frontier sciences on textile industry. Egyptian J Chem. 50(3): 259-286.
- Henrissat B. 1991. A classification of glycosyl hydrolases based on aminoacid sequence similarities. Biochem J. 280: 309-316.
- Hess M., Sczyrba A., Egan R., Kim T.W., Chokhawala H., Schroth G., Luo S., Clark D. S., Chen F., Zhang T., Mackie R. I., Pennacchio L. A., Tringe S. G., Visel A., Woyke T., Wang Z. y Rubin E. M. 2011. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. Sci. 331: 463-467.
- Hui J. P. M., White T. C. y Thibault P. 2002. Identification of glycan structure and glycosylation sites in cellobiohydrolase II and endoglucanase I and II from *Trichoderma reesei*. Glycobiol. 12: 837-849.

- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI) 2013.  
<http://www3.inegi.org.mx/sistemas/temas/default.aspx?s=est&c=21385>  
Consultado: noviembre 18 de 2013.
- Jahangeer S., Knhan N., Jahangeer S., Sohail M., Shahzad S., Ahmad A. y Khann A. A. 2005. Screening and characterization of fungal cellulases isolated from the native environmental source. *Pak J Bot.* 37(3): 739-748.
- Jaworska M. y Vogt O. 2013. Sorbitol and cellulose derivatives as gelling agents. *Chemik.* 67(3): 242-249.
- Jeffries T. W. 1994. Biodegradation of lignin and hemicelluloses. In: *Biochemistry of microbial degradation.* Ratledge C (Ed) Kluwer, Dordrecht, pp. 233-277.
- Ji L., Yang J., Fan H., Yang Y., Li B., Yu X., Zhu N y Yuan H. 2014. Synergy of crude enzyme cocktail from cold-adapted *Cladosporium cladosporioides* Ch2-2 with commercial xylanase achieving high sugars yield at low cost. *Biotechnol Biofuels.* 7: 130.
- Jung J. R., Park J. M., Heo S. Y., Hong W. K., Lee S. M., Oh B. R., Park S. M., Seo J. W. y Kim C. H. 2015. Cellulolytic enzymes produced by a newly isolated soil fungus *Penicillium* sp. TG2 with potential for use in cellulosic ethanol production. *Renewable Energy.* 76: 66-71.
- Harhangi H. R., Steenbakkens P. J., Akhmanova A., Jetten M. S., Van der Drift C. y Op den Camp H. J. 2002. A highly expressed family 1  $\beta$ -glucosidase with transglycosylation capacity from the anaerobic fungus *Piromyces* sp. E2. *Biochim Biophys Acta.* vol. 1574, 3: 293-303.
- Henzler H. J. y Schedel M. 1991. Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbial cultures. *Bioprocess Eng.* 7: 123-1 31.
- Kaur J., Chadha B. S., Kumar B. A., Kaur G. S y Saini H. S. S. 2007. Purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from *Melanocarpus* sp. MTCC 3922. *Electron J Biotechn.* Vol.10 No.2, doi.10.2225/vol10-issue2-fulltext-4
- Karmakar M. y Ray R. R. 2011. Current trends in research and application of microbial cellulases. *Res J Microbiol.* 6(1): 41-53.

- Kebreab A. G., Gunaratna K. R., Hongbin H., Harry B. y Gunnel D. 2005. A simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed, *Water Res.* 39(11): 2338-2344. doi.org/10.1016/j.watres.2005.04.012.
- Kim Y. K., Lee C., Cho Y., Oh H. y Ko Y. 2012. Isolation of cellulolytic *Bacillus subtilis* strains from agricultural environments. *ISRN Microbiol.* doi.10.5402/2012/650563
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 16: 111-120.
- Kirk O., Borchert T. V. y Fuglsang C. C. 2002. Industrial enzyme application. *Curr Opin Biotechnol.* 13: 345:351.
- Krishna C. 2005. Solid-state fermentation systems-an overview. *Crit Rev Biotechnol.* 25 (1-2): 1-30.
- Kuhad R. C., Gupta R. y Singh A. 2011. Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Res.* pp. 1-10. doi.10.4061/2011/280696
- Kuhad R. C., Mehta G., Gupta R. y Sharma K. K. 2010c. Fed batch enzymatic saccharification of newspaper cellulosic improves the sugar content in the hydrolysates and eventually the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass Bioenerg.* 34: 1184-1194.
- Kuhn D. N. y Stumpf P. K. 1980. Preparation and use of protoplasts for studies of lipid metabolism. *Methods Enzymol.* 72: 774-83.
- Kumar S., Stecher G. y Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 33: 1870-1874. doi.10.1093/molbev/msw054
- Laureano-Pérez L., Teymouri F., Alizadeh H. y Dale B. E. 2005. Understanding Factors that Limit Enzymatic Hydrolysis of Biomass: Characterization of Pretreated Corn Stover. *App Biochem Biotechnol.* 121–124. doi: 10.1385/ABAB:124:1-3:1081
- Lehninger A. L. 1991. *Biochemistry: The molecular basis of structure and function.* Chapter 37. The origin of life. Omega (Eds), pp. 1060-1061.

- Liu R. H., Dai S. A., Chang F. J., Cheng W. T. y Shih Y. F. 2009. Investigation on solubility of polymeric binder of xerographic toner and de-inking by emulsion process. *J Taiwan Inst Chem Eng.* 40: 84-90.
- Liu R. H., Dai S. A., Chang F. J., Cheng W. T. y Shih Y. F. 2010. Highly efficient PET film assisted adsorption process for the de-inking of xerographic waste paper. *J Taiwan Inst Chem Eng.* 40: 84-90.
- Liyama K., Lam TB-T. y Stone B. A. 1994. Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol.* 104: 315.
- López L. C. C., Hajek A. E. y Humber R.A. 2001. Effects of two cryopreservation techniques on viability and pathogenicity of entomophthoralean fungi. *Can J Bot.* 79: 861-864.
- Lu X., Zhang Y. y Angelidaki I. 2009. Optimization of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-catalyzed pretreatment of rapeseed straw for bioconversion to ethanol: Focusing on pretreatment at high solids content. *Biores Technol.* 100:3048–3053.
- Lynd L., Weimer P., Van Z. W. y Pretorius I. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 3: 506-577.
- Machado D. C. A., De Albuquerque D. C. M. L., Gomes F. L. S. y Pereira N. 2010. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. *J Microbiol Biotechnol.* 37: 151-158.
- Maeda R. N., Mello P., Da S. M., Melo S. yand Pereira N. Jr. 2010. Nitrogen source optimization production by *Penicillium funiculosum*, using a sequential experimental desing methodology and the desirability function. *Appl Biochem Biotechnol.* 161: 411-422. doi.10.1007/s12010-009-8875-6
- Maeda R. N., Araújo B., Melo S. y Pereira N. Jr. 2013. Cellulase production by *Penicillium funiculosum* and its application in the hydrolysis of sugar cane bagasse for second generation ethanol production by fed batch operation. *J Biotechnol.* 163: 38-44. doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.10.014
- Mandels M. y Weber J. 1969. The production of cellulases. In: Hajny GJ, Reese ET, (Eds). *Cellulases and their applications.* Am Chem Soc. pp. 391-414.
- Martínez M. 1959. Plantas útiles de la flora mexicana. Botas, México, D. F. p. 621.

- Martínez A. C., Balcázar L. E., Dantán G. E. y Folch M. J. L. 2008. Celulasas fúngicas: Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. *Rev Latino Americana Microbiol.* 50: 119-131.
- Martínez A. T., Speranza M., Ruiz-Dueñas F. J., Ferreira P., Camarero S., Guillén F., Martínez M. J., Gutiérrez A. y del Río J. C. 2005. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol.* 8: 195-204.
- Mattews J. F., Skopec C. E., Mason P. E., Zuccatp P., Torget R. W., Sugiyama J., Himmer M. E. y Brady J. W. 2006. Computer simulation studies of microcrystalline cellulose I $\beta$ . *Carbohydr Res.* 341(1): 138-152.
- Mawadza C., Hatti-Kaul R., Zvauya R. y Mattiasson B. 2000. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *J Biotechnol.* 83: 177-187. doi.10.1016/S0168-1656(00)00305-9
- Meyer A. S, Jepsen S. M. y Sorensen N. S. 1998. Enzymatic release of antioxidants for human low-density lipoprotein from grape pomace. *J Agricult Food Chem.* 46: 2439-2446.
- Menon V. y Rao M. 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals. *Prog Energy Combust Sci.* 38(4): 522-550.
- Merino S. T. y Cherry J. 2007. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 108: 95-120.
- Miller G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.* 31: 426-428.
- Morales M. P. y Cazorla P. D. 2017. Efectos de dos surfactantes sobre la germinación in vitro de 13 aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* sensu lato (Ascomycota), patógenos para *Rhodnius prolixus* (Triatominae). *Saber, Universidad de Oriente, Venezuela*, 29: 83-90. ISSN: 2343-6468 Digital / Depósito Legal ppi 198702SU4231 ISSN: 1315-0162 Impreso / Depósito Legal pp 198702SU187
- Moyo B., Masika J. P., Hugo A. y Muchenje V. 2011. Nutritional characterization of Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *African J Biotechnol.* 10(60): 12925-12933.

- National Renewable Energy Laboratory (NREL) 2013. Process design and economics for the conversion of lignocellulosic biomass to hydrocarbons: Dilute-acid and enzymatic deconstruction of biomass to sugars and biological conversion of sugars to hydrocarbons. Technical Report NREL/TP-5100-60223.
- Nava G. F. J. y Doldán G. X. R. 2014. Cultivos energéticos. *Agric Soc Desarrollo*. 11(1): 25-34.
- Nigam P. y Singh C. 1994. Solid-state (substrate) fermentation systems and their applications in biotechnology. *J Basic Microbiol*. 34: 405-423.
- Nishiyama Y., Langan P. y Chanzy H. 2002. Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose I $\beta$  from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *J Am Chem Soc*. 124(31): 9074-82.
- Noe P., Chevalier J., Mora F. y Comtat J. 1986. Action of enzymes in chemical pulp fibres. Part II: enzymatic beating. *J Wood Chem Technol*. 6: 167-84.
- Olson M. E. 2002a. Combining data from DNA sequences and morphology for a phylogeny of Moringaceae. *Syst Bot*. 27: 55-73.
- Olson M. E. 2002b. Intergeneric relationships within the Caricaceae-Moringaceae clade (Brassicales), and potential morphological synapomorphies of the clade and its families. *Int J Plant Sci*. 163: 51-65.
- Olson M. E. y Razafimandimbison S. G. 2000. *Moringa hildebrandtii*: A tree extinct in the wild but preserved by indigenous horticultural practices in Madagascar. *Adansonia*. 22(3): 217-221.
- Organización de los Estados Americanos (OEA) 2006. Microbiología industrial, Capítulo 3. Departamento de Educación, Cultura, Ciencia y Tecnología. Washington, D.C. USA.
- Ovando-Chacón S. L. y Watiszewski K. N. 2005. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Biotechnología y Bioquímica*. 21(42): 111-120.
- Ortiz M. M. L. y Uribe V. D. 2011. Nuevo método para la cuantificación de la actividad endoglucanasa basado en el complejo celulosa-rojo congo. *Orinoquia*. 15(1): 7-15.

- O'Donovan A., Gupta V. K. y Tuohy M. G. 2013. Recent updates in acid pretreatments and SEM analysis of acid pretreated grass biomass. In: Gupta V. K. y Tuohy M.G. (Eds.). *Biofuel Technologies; Recent Developments*. Springer Science Publishers, USA, pp. 97- 118.
- Pandey A., Srivastava N. y Sinha P. 2012. Optimization of photo-fermentative hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* NMBL-01. *Biomass Bioenerg.* 37: 251-256.
- Pandey S., Wang X. Q., Coursol S. A. y Assmann S. M. 2002, Preparation and applications of *Arabidopsis thaliana* guard cell protoplasts. *New Phytol.* 153: 517-526. doi.10.1046/j.0028-646X.2001.00329.x
- Payne C. M., Knott B. C., Mayes H. B., Hansson H., Himmel M. E., Sandgren M., Stahlberg J. y Beckham G. T. 2015. Fungal cellulases. *Chem Rev.* 115: 1308-1448.
- Pérez A. R., De la Cruz B. J., Vázquez G. E. y Obregón, J. F. 2010. *Moringa oleifera*, una alternativa forrajera para Sinaloa. Resultados de proyectos: Fundación Produce Sinaloa A. C.
- Pérez J., Muñoz, D. A., De la Rubia T. y Martínez E. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int Microbiol.* 5: 53-63.
- Pommier J. C., Goma G., Fuentes J. L., Rousset C. y Jokinen O. 1990. Using enzymes to improve the process and the product quality in the recycled paper industry. Part 2: industrial applications. *Tappi J.* 73: 197-202.
- Potrykus J. y Shillito R. D. 1986. Protoplasts: Isolation, culture, plant regeneration. *Methods Enzymol.* 118: 549-78.
- Qaisar S., Zohra R. R., Aman A. y Qader S. A. U. 2014. Enhanced production of cellulose degrading CMCase by newly isolated strain of *Aspergillus versicolor*. *Carbohydr Polym.* 104: 199-203.
- Quiroz C. R. E., Balcázar L. E., Dantán G. E., Martínez A., Folch M. J. L. y Martínez A. C. 2009. Characterization of cellulolytic activities of *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus* on solid wheat straw medium. *Electronic J Biotechnol.* [online]. <http://www.ejbiotechnology.cl/content/vol12/issue4/full/3/index.html>

- Ragauskas A. J., Williams C. K., Davison B.H., Britovsek G., Cairney J., Eckert C. A., Frederick W. J. Jr., Hallett J. P., Leak D. J., Liotta C. L., Mielenz J. R., Murphy R., Templer R. y Tschaplinski T. 2006. The path forward for biofuels and biomaterials. *Sci*. 311: 484-489.
- Raimbault M. 1998. General and microbiological aspects of solid state fermentation, process biochemistry. *Electronic J Biotechnol*. 1: 1-20.
- Ramanathan G., Banupriya S. y Abirami D. 2010. Production and optimization of cellulase from *Fusarium oxysporum* by submerged fermentation. *J of Scient and Ind Research*. 69: 454-459.
- Rangel S. 2012. Estudio del efecto de enzimas ligninolíticas y celolíticas obtenidas del hongo *Pleurotus ostreatus* sobre una gramínea forrajera tropical. Tesis de grado, Universidad Nacional de Colombia.
- Rastogi N. K., Rajesh G. y Shamala T. R. 1998. Optimization of enzymatic degradation of coconut residue. *J Sci Food Agricult*. 76: 129-134.
- Ramírez P. y Cocha J. M. 2003. Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización y determinación de la actividad celolítica. Facultad de ciencias biológicas. *Rev Perú Biol*. 10(1): 67-77.
- Ramírez R. J. y Ayala A. M. 2014. Enzimas: ¿Qué son y cómo funcionan?. *Revista digital universitaria*. Vol. 15, Núm. 12, ISSN pp. 1607-6079. <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art91/#>
- Rao M., Gaikwad S. y Mishra, C. 1988. Induction and catabolite repression of cellulase in *Penicillium funiculosum*. *Appl Biochem Biotechnol*. 19: 129-137. [doi.org/10.1007/BF02921478](https://doi.org/10.1007/BF02921478)
- Renduelez M. y Díaz M. (2014). Biotecnología industrial. *Arbor*. 190 (768): a155. doi: <http://dx.doi.org/10.3989/arbor.2014.768n4009>
- Reyes N. E., Spörndly E. y Ledin I. 2006. Effect of feeding different levels of foliage of *Moringa oleifera* to creole dairy cows on intake, digestibility, milk production and composition. *Livestock Sci*. 101:24-31.
- Ribeiro D. A., Cota J., Alvarez T. M., Bröchli F., Bragato J., Pereira B. M. P., Pauletti P., Jackson G., Pimenta M., Murakami M., Camassola M., Ruller R., Dillon A.,

- Pradella J., Paes Leme A. y Squina F. 2012. The *Penicillium echinulatum* secretome on sugar cane bagasse. PLoS ONE 7. 12: e50571. doi.org/10.1371/journal.pone.0050571
- Rodríguez A M. E. y Castillo R. E. 2014. Enzimas aplicadas en procesos industriales. Revista Digital Universitaria. vol.15, No.12. <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art96/> Revisada 9 mayo 2017
- Saitou N. y Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol. 4: 406-425.
- Sánchez O. J. y Cardona C. A. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. Biores Technol. 99: 5270-5295.
- Santa R. P. S., Souza A. L., Roque R. A., Andrade E. V., Astolfi F. S., Mota A. J. y Nunes S. C. G. 2018. Production of thermostable  $\beta$ -glucosidase and CMCase by *Penicillium* sp. LMI01 isolated from the Amazon region. Elec J Biotechnol. 31: 84-92. doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.11.005.
- Santhanam N., Badri D. V., Decker S. R., Manter D. K., Reardon K. F. y Vivanco M. J. 2012. Lignocellulose decomposition by microbial secretions. Vivanco J.M. and Baluska F. (Eds.). Secretions and exudates in biological systems and communication in plants 12. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 125-153.
- Salcedo M. J. G., López G. J. E. y Flórez P. L. M. 2011. Evaluación de enzimas para la hidrólisis de residuos (hojas y cogollos) de la cosecha caña de azúcar. DYNA 78, 169:182-190. ISSN 0012-7353
- Sarker B. C., Singh R. K., Kumbhar B. K., Agrawal Y. C. y Kulshreshtha M. K. 1999. Response surface analysis of enzyme assisted oil extraction factors for sesame, groundnut and sunflower seeds. J Food Sci Technol. 36: 511-514.
- Scharma B., Agrawal R., Singhania R., Satlewal A., Mathur A., Tuli D. y Adsul M. 2015. Untreated wheat straw: Potential source for diverse cellulolytic enzyme secretion by *Penicillium janthinellum* EMS-UV-8 mutant. Biores Technol. 196: 518-524. doi: org/10.1016/j.biortech.2015.08.012
- Schlegel G. H. y Zaborosch C. 1997. Microbiología general. Omega SA (Eds). Barcelona, p 169.

- Sharma B., Agrawal R., Rani R., Sattlewal A., Mathur A., Tuli D. y Adsul M. 2015. Untreated wheat straw: Potential source for diverse cellulolytic enzyme secretion by *Penicillium janthinellum* EMS-UV-8 mutant. *Biores Technol.* 196: 518-524.
- Silveira M., Raua M., Pinto da Silva E. y Andreausa U. 2012. A simple and fast method for the determination of endo- and exo-cellulase activity in cellulase preparations using filter paper. *Enzyme Microb Technol.* 51: 280- 285.
- Soler A. y Buitrago H. G. 2010. Evaluación de la transferencia de oxígeno en cultivos con *Lactococcus lactis* empleando un sistema de fermentación con aireación externa. *Rev Colomb. Biotecnol.* 12( 2): 124-138.
- Sosulski K., Bargale P. C. y Sosulski F. W. 2000. Enzymatic hydrolysis of soybean for solvent and mechanical oil extraction. *J Food Process Eng.* 23: 321-327.
- Srivastava N., Rawat R., Oberoi H. S. y Ramteke P.W. 2015a. A review on fuel ethanol production from lignocellulosic biomass. *Int J Green En.* 12: 949-960.
- Sternberg D. 1976. Production of cellulase by *Trichoderma*. *Biotechnol Bioeng Symp Ser.* 6: 35-53.
- Syed S., Syed R. y Sarojini J. 2013. A novel cellulase from an endophyte, *Penicillium* sp. NFCCI 2862. *Am J Microbiol Res.*1(4): 84-91.
- Teather R. M. y Wood P. J. 1982. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ Microbiol.* 43: 777-780.
- Taiz L. y Zeiger E. 2002. *Plant Physiology*. Chapter 13 Secondary metabolites and defense. Thirth ed.: Sinauer Associates. 690 p.
- Tequida M. M., Cortez R. M., Rosas B. E. C., López S. S. y Corrales M. C. 2002. Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. *Rev Iberoam Micol.* 19: 84-88.
- Teunissen M. J. y Op den Camp H. J. M. 1993. Anaerobic fungi and their cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 63: 63-76.

- Tewes A., Glund K., Walther R. y Reinbothe H. 1984. Highyield isolation and rapid recovery of protoplasts from suspension cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Z Pflanzenphysiol.* 113: 141-50.
- Urcelay C., Robledo G., Heredia F., Morera G. y García M. F. 2012. Hongos de la madera en el arbolado urbano de Córdoba. Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (Eds). Córdoba Argentina.
- Vásquez V. A. M. 2013. Producción de xilanasas por *Aspergillus* sp. en fermentación sumergida y fermentación en medio sólido. Universidad Iberoamericana. México, D.F. <http://ri.ibero.mx/handle/ibero/537>
- Velázquez Z. M., Peón E. I. E., Zepeda B. R. y Jiménez A. M. A. (2016). Moringa (*Moringa oleifera* Lam.): potential uses in agriculture, industry and medicine. *Revista Chapingo Serie Horticultura.* 22(2): 95-116. doi: 10.5154/r.rchsh.2015.07.018
- Verdcourt B. 1985. A synopsis of Moringaceae. *Kew Bulletin.* 40: 1-23.
- Violot S., Aghajari N., Czjzek M., Feller G., Sonan G., Gouet P., Gerday C., Haser R. and Receveur-Brechot V. 2005. Structure of full length psychrophilic cellulase from *Pseudoalteromonas haloplanktis* revealed by X-ray diffraction and small angle X-ray scattering. *J Mol Biol.* 348: 1211-1224.
- Warnecke F., Luginbühl P., Ivanova N., Ghassemian M., Richardson T. H., Stege J. T., Cayouette M., McHardy A. C., Djordjevic G., Aboushadi N., Sorek R., Tringe S. G., Podar M., Martin H. G., Kunin V., Dalevi D., Madejska J., Kirton E., Platt D., Szeto E., Salamov A., Barry K., Mikhailova N., Kyrpides N. C., Matson E. G., Ottesen E. A., Zhang X., Hernández M., Murillo C., Acosta L. G., Rigoutsos I., Tamayo G., Green B. D., Chang C., Rubin E. M., Mathur E. J., Robertson D. E., Hugenholtz P. y Leadbetter J. R. 2007. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nat.* 450: 560-565.
- Watanabe H. y Tokuda G. 2001. Animal cellulases. *Cell Mol Life Sci.* 58:1167.
- Wei H., Xu Q., Taylor L. E. II, Baker J. O., Tucker M. P. y Ding S. 2009. Natural paradigms of cell wall degradation. *Curr Opin Biotechnol.* 20: 330-338.

- Whitaker D. R. 1971. The Enzymes. Boyer, P.D. (Ed). Academic Press. Vol. V, pp 273-90.
- White T. J., Bruns T., Lee S. y Taylor W. J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to methods and applications. Innis M. A., Gelfand D. H. J., Sninsky J. y White T. J. (Eds.). Academic Press, Inc., New York, pp. 315-322.
- Xu X., Chen J., Xu H. y Li D. 2014. Role of a major facilitator superfamily transporter in adaptation capacity of *Penicillium funiculosus* under extreme acidic stress. Fungal Genet Biol. 69: 65-83.
- Yue Z., Bin W., Baixu Y. y Peiji G. 2004. Mechanism of cellobiose inhibition in cellulose hydrolysis by cellobiohydrolase. Sci China Life Sci. 47: 18-24.
- Zayed S. E., Adam A. B. A., Hassan E. A. y El-Kady M. 2015. Renewable Egyptian lignocellulosic materials as alternative raw material for particleboard manufacturing. Int J Innovation Sci Res. 18(2): 262-272.
- Zhang K. D., Li W., Wang Y. F., Zheng Y.L., Tan F. C., Ma X. Q., Yao L. S., Bayer E. A., Wang L. S. y Li F. L. 2018. Processive degradation of crystalline cellulose by a multimodular endoglucanase via a wirewalking mode. Biomacromolecules. 19(5): 1686-1696. doi: 10.1021/acs.biomac.8b00340.
- Zhang Y. H. P. y Lynd L. R. 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. Biotechnol Bioeng. 88(7): 797-824.
- Zhao X. Q., Zi L. H., Bai F. W., Lin H. L., Hao X. M., Yue G. J. y Ho N., W., Y. 2012. Bioethanol from lignocellulosic biomass. Adv Biochem Engin Biotechnol. 120: 25-51. doi.10.1007/10\_2011\_129.

## 11. ANEXOS

### Anexo A

#### 1. Medio Luria Bertani (LB) 1 L

LB 20 g

Agar 15 g

Agua destilada 1 L

En el caso de reactivación de los aislados crioconservados se usó el mismo medio pero sin agar.

#### 2. Medio Agar Papa Dextrosa (PDA) 1L

PDA 39 g

Agua destilada 1 L

### Anexo B

#### 1. Rojo Congo 1% (p/v)

En un vaso de precipitado se pesó 1 g del indicador rojo Congo, se añadió 100 mL de agua destilada y se agitó hasta que el color se homogenizó. Se aforó en un matraz de 100 mL.

#### 2. Solución de NaCl 2 M

En un vaso de precipitado se adicionó 11.69 g de NaCl, 100 mL de agua destilada y se agitó hasta que el NaCl se disolvió. Se aforó en un matraz de 100 mL.

### Anexo C

#### 1. Medio mineral A 1L

Fosfato de potasio  $K_2HPO_4$  1.0 g

Sulfato de magnesio  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.7 g

Cloruro de sodio NaCl 0.5 g

Sulfato ferroso  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.7 g

Nitrato de amonio  $NH_4NO_3$  0.3 g

Sulfato de manganeso  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.3 g

Agar 15 g

Agua destilada 1 L

Fuente de carbono [Carboximetilcelulosa (CMC) 1% ó Avicel 1% (p/v) o moringa 2%]. Para las fermentaciones se utilizó este medio sin agar y se llevó a pH 4 con ácido fosfórico.

## 2. Tween 80 (0.1 v/v)

Tween 80 0.1 mL  
Agua destilada estéril 99.9 mL

NOTA: Todos los medios de cultivo se esterilizaron a una temperatura de 121 °C y 15 Lb por 20 min en una autoclave (Yamato modelo SK100C).

## 3. Buffer acetato de sodio 1.0 M pH 6.0

Se pesó 1 mol de CH<sub>3</sub>COONa (8.203 g) y se disolvió en 60 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 6.0 con HCl 1M. Se aforó en matraz de 100 mL.

## 4. Buffer acetato de sodio 0.6 M pH 6.0

Buffer acetato de sodio 1.0 M  
Fórmula  $C_1V_1=C_2V_2$ . (1 M) (V<sub>1</sub>)= (0.6 M) (50 mL)  
Despe:  
 $V_1= [(0.6 M) (50 mL)] / (1 M)$   
V<sub>1</sub>= 30 mL buffer acetato de sodio 1 M

30 mL de buffer acetato de sodio 1M y se aforó en matraz 50 mL con agua destilada.

## 5. Salicina 10 mM en buffer acetato de sodio 1 M pH 6.0

0.01 M de salicina (2.8628 g), se disolvió en 30 mL de buffer acetato de sodio 1 M pH 6.0 y se aforó en matraz 50 mL con el mismo buffer.

## **Anexo D**

Determinación de azúcares reductores por el método de ácido 3,5- dinitrosalicílico (DNS)

### 1. Reactivo de DNS

A 50 mL de agua destilada en un vaso de precipitado de 250 mL, se adicionó 1.6 g de hidróxido de sodio, se agitó en una plancha magnética a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó lentamente 43.8 g de tartrato de sodio y potasio hasta que se diluyó. Lentamente se adicionó 1 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico. Se aforó en un matraz balón 100 mL con agua destilada. Se colocó en un frasco ámbar y se agitó durante 12 h.

## 2. Preparación de la solución stock de glucosa

Se preparó una solución inicial de 50 mL 40 mM de glucosa. 0.04 M de glucosa (0.36032 g) se disolvió en 30 mL de agua destilada y se aforó en matraz 50 mL con agua destilada.

## 3. Curva de calibrado de glucosa

A partir de la solución stock de glucosa 40 mM y por dilución con agua destilada, se preparó una gama de soluciones del azúcar de distinta concentración, tal y como se indica en el siguiente cuadro.

Tubo	Concentración (mM)	Agua destilada (mL)	Glucosa 40 mM (mL)
0	0	5.0	0.0
1	2	4.75	0.25
2	4	4.5	0.5
3	6	4.25	0.75
4	8	4.0	1.0
5	10	3.75	1.25
6	20	2.5	2.5
7	40	0.0	5.0

Las diluciones se realizaron en tubos de ensayo, una vez hechas las mezclas se agitaron en vortex. De cada tubo se tomó 0.1 mL y se transfirió a un tubo Eppendorf. Se adicionó 1 mL del reactivo DNS, se incubó en bloque seco a 100 °C durante 10 min; se enfrió en hielo y se determinó la absorbancia a 570 nm utilizando como blanco la mezcla del tubo 0.

## **Anexo E**

### 1. Método estandar para la determinación de sólidos totales en la biomasa (NREL/TP-510-42621) National Renewable Energy Laboratory (NREL)

#### *Equipos*

Estufa de secado por convección, con control de temperatura de  $105 \pm 3$  °C

Balanza de precisión (0.1 mg)

Desecador con desecante

Charolas de aluminio

#### *Procedimiento*

1. Se secaron las charolas de aluminio a 105 °C durante cuatro horas.

2. Se enfriaron las charolas en un desecador, se utilizaron guantes y pinzas para manejar las charolas y pesarlas con precisión de 0.1 mg. Se pesó 2 g (0.1 mg) de paja residual de moringa. Se realizó por triplicado.
3. Se utilizó un blanco (una charola sin muestra). La diferencia en peso fue menor a un 0.5% de error.
4. Se colocó la muestra en el horno a  $105\pm 3$  °C durante cuatro horas.
5. Se sacó la muestra de la estufa y se dejó enfriar en un desecador a temperatura ambiente. Se pesó la charola y la muestra. Se colocó la muestra y la charola en la estufa hasta que se alcance el peso constante (0.1% de cambio en el porcentaje de sólidos totales después de una hora de recalentamiento).
6. Se sacó la muestra de la estufa y se dejó enfriar en un desecador a temperatura ambiente. Posteriormente se pesó la charola que contiene la muestra y se anotó el peso.

#### *Cálculos*

% Sólidos totales =  $[\text{Peso de la muestra seca más el plato} - \text{peso del plato} / \text{Peso de muestra antes del secado}] \times 100$

Se calculó también el % de humedad: % Humedad =  $100 - \% \text{ sólidos totales}$

#### 2. Determinación de cenizas en biomasa (NREL/TP-510-42622)

Antes de este análisis se realizó el procedimiento “Preparación de muestras de análisis composicional de biomasa”. La moringa se secó a 105 °C según el LAP 001, antes del ensayo de cenizas.

#### *Procedimiento.*

1. Se utilizaron crisoles de porcelana marcados. Se determinó la tara de los crisoles, introduciéndolos 4 h en la mufla a  $575\pm 25$  °C hasta peso constante. Se enfriaron en un desecador y se pesaron con precisión de 0.1 mg.
2. Se pesó 2.0 g de moringa y se anotó el peso descontando la tara del crisol ( $P_1$ ). Se metió el crisol en la mufla a  $575 \pm 25$  °C durante 6 horas.
3. Se apagó la estufa y 6 h después se sacaron las muestras en un desecador y se pesaron con precisión de 0.1 mg. Descontando el peso del crisol  $P_2$ .

## *Cálculos*

Para muestra secadas a 105 °C: % cenizas =  $(P_2/P_1) \times 100$

### 3. Determinación de extractivos en biomasa (NREL/TP-510-42619)

#### *Procedimiento-Método Soxhlet.*

La muestra fué de 2 a g de paja residual de moringa molida con tres replicas.

1. Se secó el dedal de extracción del Soxhlet y el matraz de fondo redondo a 105 °C hasta peso constante y se añadieron las perlas de ebullición al matraz, se etiquetó y pesó con precisión de 0.1 mg.
2. Se pesó el matraz de recogida de muestra, con una precisión de 0.1 mg.
3. Se añadió la muestra al dedal (2 g), procurando no llenar el dedal hasta el borde (dejando aproximadamente 1 cm). La altura de la biomasa en el dedal no excedió la altura del tubo sifón del Soxhlet.

#### *Extractivos en agua*

4. Se preparó el Soxhlet utilizando 190±5 mL de agua grado HPLC, se insertó el dedal y calentó a reflujo durante 8 horas. Periódicamente ajustó la velocidad de calentamiento para se producir de 4 a 5 cambios de disolvente por hora.
5. Una vez finalizado el tiempo de extracción, se dejó enfriar a temperatura ambiente.
6. Se realizó una posterior extracción con etanol y se dejó el dedal en el extractor Soxhlet, extrayendo el agua residual

#### *Extractivos en etanol*

7. Se añadió 190±5 mL de alcohol en un matraz de fondo redondo previamente tarado y colocó en una temperatura adecuada para producir 6-10 cambios de alcohol 1 h.
8. Se sometió a reflujo por 24 h.
9. Al terminar las 24 h de reflujo se dejó enfriar a temperatura ambiente.
10. Se retiró el dedal y se lavó con aproximadamente 100 mL de alcohol. Se dejó secar los sólidos al aire.

### *Separación del disolvente de los extractivos*

1. Se separó por destilación utilizando un condensador, utilizando como base el punto de ebullición del alcohol. Una vez evaporado todo el disolvente, se colocó el matraz en una estufa a 40 °C durante 24 horas. Se enfrió a temperatura ambiente en un desecador y se pesó.

### *Cálculos*

1. El peso seco de la muestra se calculó, utilizando el dato del contenido en sólidos:

$$\text{Peso seco (PS)} = \frac{(\text{Peso dedal y muestra} - \text{peso dedal}) \times \% \text{ de sólidos totales}}{100}$$

$$\% \text{ de extractivos} = \frac{\text{Peso matraz de recogida más residuo} - \text{peso del matraz} \times 100}{\text{PS}}$$

### 4. Determinación de carbohidratos estructurales y lignina en biomasa (NREL/TP-510-42618)

#### *Preparación de la muestra*

Antes de este análisis se realizó el procedimiento “Preparación de muestras de análisis composicional de biomasa”.

#### *Procedimiento*

##### A) Preparación de la muestra para el análisis e hidrólisis

1. Se pesó 0.3±0.01 g de la muestra libre de extractivos y se colocó en un tubo. Al mismo tiempo se realizó la determinación de sólidos totales, para medir con precisión el porcentaje de sólidos para la corrección. Se realizó por triplicado.

2. Se añadió 3.00±0.01 mL (4.92± 0.01 g) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72%, y se agitó con una varilla de agitación de teflón durante 1 min.

3. Se colocó el tubo en un baño María a 30±1 °C por 60± 5 min.

4. Se agitó la muestra cada 5-10 min con la varilla de agitación, sin sacar el tubo del baño, para asegurar una mezcla completa.

5. Una vez transcurridas la hora de hidrólisis, se sacaron los tubos del baño. Se diluyó a 4% la concentración de ácido añadiendo 84.0±0.04 mL de agua desionizada,

utilizando una bureta. El peso total añadido al tubo fue de 89.22 g (0.3 g de muestra, 4.92 g de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72%, y 84.0 g de agua desionizada). Puesto que la densidad de la solución de 4% de ácido es 1.0250g/mL, el volumen total de la solución (Vf) es 87.0 mL.

6. Se colocó la taparroscas a cada uno de los tubos y se colocaron en la autoclave durante 1 h a 121±3 °C.

7. Se dejó enfriar los tubos a temperatura ambiente antes de abrirlos.

#### B) Análisis de la muestra para lignina ácido insoluble

1. Se preparó una serie de crisoles de fondo poroso (15 micras) y se calentaron a 575 °C durante 4 h. Se sacaron los crisoles de la mufla a un desecador. Se pesaron hasta conseguir un peso constante después de enfriar.

2. Se filtraron las muestras utilizando los crisoles de porcelana con fondo poroso de filtración de porosidad media y se colectó el filtrado en un matraz.

3. Se transfirió una alícuota de aproximadamente 50 mL a una botella para muestra. Esta muestra se utilizó para determinar la lignina soluble en ácido. La lignina soluble en ácido se realizó en un periodo de no más de 6 h desde la hidrólisis.

4. Se utilizó agua desionizada para transferir todos los sólidos del tubo al dispositivo de filtración. Se lavaron los sólidos en el filtro con un mínimo de 50 mL de agua desionizada caliente.

5. Se secaron los crisoles de filtración y su contenido a 105 °C±3 °C durante 2 h hasta peso constante.

6. Se enfriaron en un desecador y se anotó el peso del crisol (para utilizar en: lignina ácido insoluble, y cenizas ácido insolubles).

7. Se colocaron los crisoles y su contenido en la mufla a 575±25 °C durante 3 h, se calentó lentamente (10 °C/min) para evitar la aparición de llamas.

8. Se sacaron los crisoles en un desecador y se pesaron con precisión de 0.1 mg.

#### C) Análisis de la muestra para lignina ácido soluble

1. Utilizando el líquido de hidrólisis obtenido en la etapa anterior, se midió la absorbancia de la muestra en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 210

nm. La muestra se diluyó para llevar la absorbancia en el intervalo de 0.7-1.0. Se utilizó agua desionizada para diluir la muestra y para la muestra blanco. Se analizó cada muestra por triplicado.

3. Se calculó el porcentaje en lignina soluble en ácido siguiendo los cálculos descritos.

### *Cálculos*

Calcular el peso de residuo insoluble en ácido (RIA) y lignina insoluble en ácido (LIA) de la siguiente manera:

$$\% \text{ RIA} = \frac{\text{Peso del crisol} + \text{el residuo a } 105^\circ\text{C} - \text{peso crisol} \times 100}{\text{Peso de la muestra referida a Ps a } 105^\circ\text{C}}$$

$$\% \text{ LAI} = \frac{[(\text{Peso del crisol} + \text{el residuo a } 105^\circ\text{C}) - \text{peso crisol}] - [(\text{peso crisol} + \text{cenizas}) - \text{peso crisol}] - \text{peso proteínas} \times 100}{\text{Peso de la muestra referida a Ps a } 105^\circ\text{C}}$$

Donde:

% LAI es el residuo ácido insoluble, corregido con las cenizas [(peso crisol+cenizas)-peso crisol] y el peso de las proteínas, donde: Peso proteínas es la cantidad de proteínas en el residuo insoluble en ácido, determinado según el LAP: Determinación de proteínas en biomasa.

Calculo de la cantidad de lignina soluble en ácido (LAS) según la fórmula:

$$\% \text{ LAS} = \frac{A \times \text{Volumen del filtrado} \times \text{Dilución}}{\epsilon \times \text{Peso seco muestra referido a Ps a } 105^\circ\text{C}} \times 100$$

Donde:

A= Absorbancia de la muestra a la correspondiente longitud de onda

Df = Factor de dilución

$\epsilon$  = 25 Es el coeficiente de absorptividad de la biomasa a longitud de onda específica para este tipo de biomasa

Calculo de la cantidad total de lignina como la suma de la lignina ácido insoluble y el ácido soluble.

### Estadísticos del análisis

Para calcular la diferencia de porcentaje relativa (RPD) entre dos muestras, se utilizó el siguiente cálculo:

$$RPD = \frac{x_1 - x_2}{x_{media}} \times 100$$

Donde:

$x_1$  y  $x_2$ : son los valores medidos

$x_{media}$ : es la media de  $x_1$  y  $x_2$

### 5. Contenido porcentual de celulosa mediante el método de Kûrshner-Höffer

#### Procedimiento

1. A 2 g del material libre de sustancias extraíbles se le agregó 25 mL de ácido nítrico: etanol (1:4, v/v).
2. Se colocará a reflujo en baño María de agua durante una hora.
3. Enseguida se centrifugó durante 1 minuto y se decantó, se agregó nuevamente la mezcla reactiva, repitiendo esta operación tres veces.
3. Se agregó 25 mL de KOH al 1% durante 30 min y se filtró.
4. El sólido resultante se secó hasta obtener masa constante.

### 6. Estimación de contenidos de hemicelulosa totales

*Procedimiento.* Se sumaron el porcentaje de celulosa y el porcentaje de lignina en muestra libre de extractivos, así las hemicelulosas totales se estimaron por la diferencia en 100%.

#### Anexo F

1. Medio mineral B para 1 L (Maeda <i>et al.</i> , 2010)	2. Medio mineral C para 1 L (Mandels y Weber, 1969)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2.0 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2.0 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 0.4	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 0.3
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0.3	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0.3
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0.005	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1.4
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O 0.0016	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0.005
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0.0014	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O 0.0016
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O 0.002	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0.0014
Extracto de levadura 0.36	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O 0.002
Urea 0.97	Extracto de levadura 0.2
pH 5.0	Peptona 0.75
	Urea 0.3
	Tween 80 1 mL
	pH 5.5

Nota: La glucosa 4 g/L se utilizó como fuente de carbono en la preparación del inóculo.

### Anexo G

1. ANDEVA del análisis de los resultados de la actividad celulolítica cualitativa de los microorganismos aislados de *M. oleífera*.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-valor	Pr > F
Tratamiento	47	577.3547917	12.2841445	30.11	<.0001
Error	144	58.7450000	0.4079514		
Total correcto	191	636.0997917			

2. Prueba de Duncan que indica la diferencia estadística entre las medias de cada microorganismo aislado y cuál de ellos presentó mayor halo de degradación de celulosa. Medias con letras iguales significan que no son estadísticamente diferentes.

Duncan Agrupamiento	Media	N	TM	(Aislado)
TRES MEJORES AISLADOS	8.1250	4	43	PDA3-1 Sta. María
	6.5000	4	46	PDA2a -2 Culiacán
	6.2500	4	44	PDA1a-1 CIIDIR-SIN
	5.5000	4	41	LB1c-1 CIIDIR
	5.5000	4	30	LB1c-2 CIIDIR
	5.0000	4	45	PDA4-2 TETAMEC
	4.6250	4	48	PDA1b-1 CIIDIR-SIN
	3.7500	4	47	PDA1c-1 CIIDIR-SIN
	3.7500	4	33	LB1d-4 CIIDIR-SIN
	3.6250	4	7	LB1-5 CIIDIR-SIN
3.3750	4	34	LB3b-1 Sta. María	
3.3750	4	8	LB4-3 Tetameche	
3.3750	4	35	LB1c-3 CIIDIR-SIN	
3.3750	4	6	LB4-4 Tetameche	
3.3750	4	24	LB3b-4 Sta. María	
3.3750	4	32	LB1d-3 CIIDIR-SIN	
3.2500	4	25	LB3b-5 Sta. María	
3.2500	4	40	LB1d-5 CIIDIR-SIN	
3.1250	4	13	LB4-2 Tetameche	
2.8750	4	17	LB2-3b Culiacán	
2.8750	4	36	LB3b-2 Sta. María	
2.8750	4	12	LB4-6 Tetameche	
2.6250	4	27	LB1b-3 CIIDIR-SIN	
2.5000	4	31	LB1d-6 CIIDIR-SIN	
2.5000	4	29	LB1b-1 CIIDIR-SIN	
2.5000	4	16	LB4-5 Tetameche	
2.5000	4	15	LB4-1 Tetameche	
2.3750	4	42	PDA4-1 Tetameche	
2.3750	4	26	LB1b-2 CIIDIR-SIN	
2.2500	4	11	LB3-3 Sta. María	
2.2500	4	38	LB1d-1 CIIDIR-SIN	
2.1250	4	23	LB3-6 Sta. María	
2.1250	4	22	LB3b-3 Sta. María	
2.0250	4	1	LB2-3a Culiacán	
1.8750	4	37	LB1d-2 CIIDIR-SIN	
1.6250	4	18	LB1a-2 CIIDIR-SIN	
1.5000	4	5	LB3-2 Sta. María	
1.5000	4	2	LB2-4 Culiacán	
1.5000	4	19	LB1a-1 CIIDIR-SIN	
1.1250	4	28	LB1b-4 CIIDIR-SIN	
1.0000	4	21	LB2-1 Culiacán	
1.0000	4	39	LB1c-4 CIIDIR-SIN	
0.7500	4	20	LB2-2b Culiacán	
0.0000	4	10	LB1-5-1 CIIDIR-SIN	
0.0000	4	9	LB2a-1 Culiacán	
0.0000	4	14	LB3-1 Sta. María	
0.0000	4	3	LB3-4 Sta. María	
0.0000	4	4	LB2-2a Culiacán	

  MUY BUENA ACTIVIDAD  
   BUENA ACTIVIDAD  
   REGULAR ACTIVIDAD  
   NULA ACTIVIDAD

## Anexo H

Secuencias de pares de bases editadas de la región ITS de los aislados: H1= PDA1a-1 CIIDIR-SIN, H2= PDA3-1 Fracc. Sta. María y H3= PDA2a-2 Culiacán.

>H1

ACCCTTGTCTACTCTACACGCGTAGTTGCTTTGGCGGGCCCACTGGGGCTCCCT  
GGTCGCCGGGGGACACCCGTCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGCGCTTCGTG  
AACCTGATGAAGAAGGGCTGTCTGAGTACTATGAAAATTGTCAAACCTTTCAAC  
AATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA  
ATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCC  
CTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCTGCCCTCAAGCACG  
GCTTGTGTGTTGGGTGTGGTCCCCCGGGGACCTGCCCAAAGGCAGCGGCGA  
CGTCCGTCTGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTCTGTCACTCGCTCGGGAAGGACC  
TGCGGGGGTTGGTCACCACCACATTTTCCATTATGGTTGACCTCGGATCAGGTA  
GGAGTTACCCGCTGAACTTATGCATATCATTAACCGGA

521 pb

>H2

AATTGTATGCCTGCAGGCAGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCC  
GCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAAACCATAAA  
TAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA  
GCAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG  
AACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATT  
TCAACCCTCAAGCCCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGAGTCAAATCGCGTTCCCC  
AAATTGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCTCGTTA  
CTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCG  
GAGGGGTAGGAATAACCCCTGAACTTAAGCATATCAATAACCGGAG

481 pb

>H3

CGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACAAGTGACCCCGGTCTAACCACCGG  
GATGTTTCATAACCCTTTGTTGTCCGACTCCCTCCGGGGCGACCCTGCCTTCGGG  
CGGGGGCTCCGGGTGGACACTTCAAACCTTTGCCTAACTTTGCAGTCTGAGTAA  
ACTTAATTAATAAATTA AAACTTTTAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATG  
AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC  
GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCG  
AGCGTCATTTCACCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGGCAACGCGGTCCGCCGC  
GTGCCTCAAATCGACCGGCTGGGTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTGGAAACTAT  
TCGCTAAAGGGTGTTCGGGAGGCTACGCCGTAAAACAACCCCATTTCTAAGGTT  
GACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGA  
541 pb

### Anexo I

Análisis de varianza de los resultados de la producción de azúcares reductores de los microorganismos seleccionados, en CMC y Avicel como fuentes de carbono.

FUENTE	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-valor	Pr > F
Hongo	2	17.428916	8.714458	2.29	0.1069
Medio	1	5189.517207	5189.517207	1363.20	<0.0001
Tiempo	7	2546.541366	363.791624	95.56	<0.0001
Inter. Hongo*medio	2	3.193056	1.596528	0.42	0.6587
Inter. Hongo*tiempo	14	31.070634	2.219331	0.58	0.8724
Inter. medio*tiempo	7	1584.486963	226.355280	59.46	<0.0001
Inter. Hongo*medio*tiempo	14	48.944665	3.496047	0.92	0.5422

### Anexo J

ANDEVA de la actividad endoglucanasa de los microorganismos seleccionados, en los medios de cultivo CMC y Avicel.

FUENTE	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-valor	Pr > F
Hongo	2	608.954886	304.477443	240.44	<0.0001
Medio	1	274.332969	274.332969	216.64	<0.0001
Tiempo	7	2082.184407	297.454915	234.90	<0.0001
Inter. Hongo*medio	2	482.818554	241.409277	190.64	<0.0001
Inter. Hongo*tiempo	14	559.835226	39.988230	31.58	<0.0001
Inter. medio*tiempo	7	220.974399	31.567771	24.93	<0.0001
Inter. Hongo*medio*tiempo	14	582.328710	41.594908	32.85	<0.0001

### Anexo K

ANDEVA de la actividad exoglucanasa de los microorganismos seleccionados, en los medios de cultivo CMC y Avicel.

FUENTE	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-valor	Pr > F
Hongo	2	1253.602026	626.801013	74.84	<0.0001
Medio	1	909.927225	909.927225	108.64	<0.0001
Tiempo	7	2415.957327	345.136761	41.21	<0.0001
Inter. Hongo*medio	2	1192.517334	596.258667	71.19	<0.0001
Inter. Hongo*tiempo	14	2060.729478	147.194963	17.57	<0.0001
Inter. medio*tiempo	7	435.494223	62.213460	7.43	<0.0001
Inter. Hongo*medio*tiempo	14	1913.533722	136.680980	16.32	<0.0001

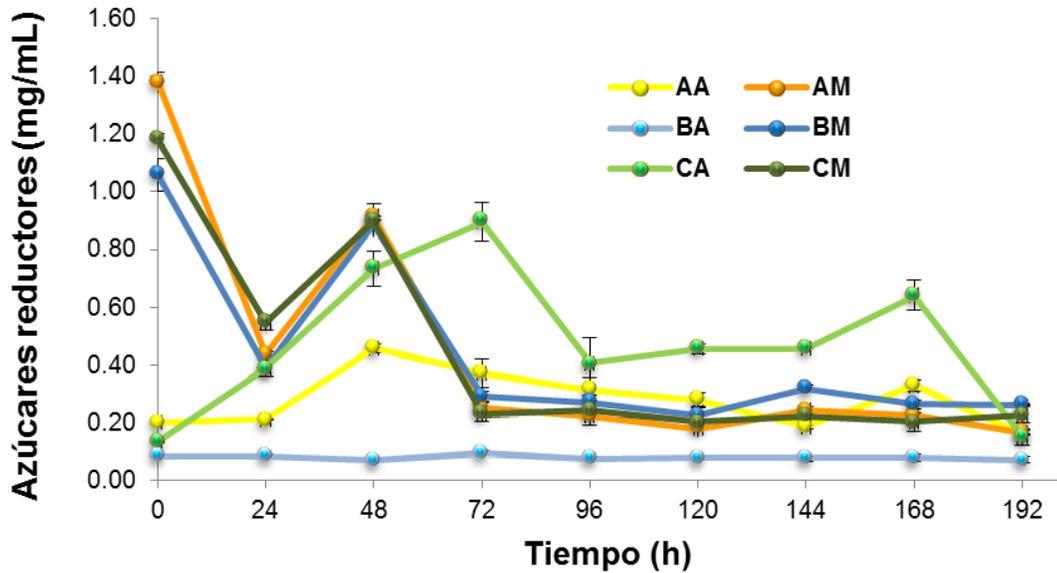
### Anexo L

ANDEVA de la actividad glucosidasa de los microorganismos seleccionados, en los medios de cultivo CMC y Avicel.

FUENTE	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-valor	Pr > F
Hongo	2	5022.10334	2511.05167	447.22	<0.0001
Medio	1	16338.89828	16338.89828	2909.96	<0.0001
Tiempo	7	9386.01634	1340.85948	238.81	<0.0001
Inter. Hongo*medio	2	18460.65223	9230.32612	1643.92	<0.0001
Inter. Hongo*tiempo	14	2750.10962	196.43640	34.99	<0.0001
Inter. medio*tiempo	7	2500.24326	357.17761	63.61	<0.0001
Inter. Hongo*medio*tiempo	14	5656.54799	404.03914	71.96	<0.0001

### Anexo M

Azúcares reductores generados en fermentación sumergida, utilizando *P. funiculosum*, dos fuente de carbono (moringa sin pretratar y Avicel) y tres medios minerales distintos (A, B y C).



AA= medio A y Avicel 1%

AM= medio A y moringa sin pretratar 2%

BA= medio B y Avicel 1%

BM= medio B y moringa sin pretratar 2%

CA= medio C y Avicel 1%

CM= medio C y Moringa sin pretratar 2%

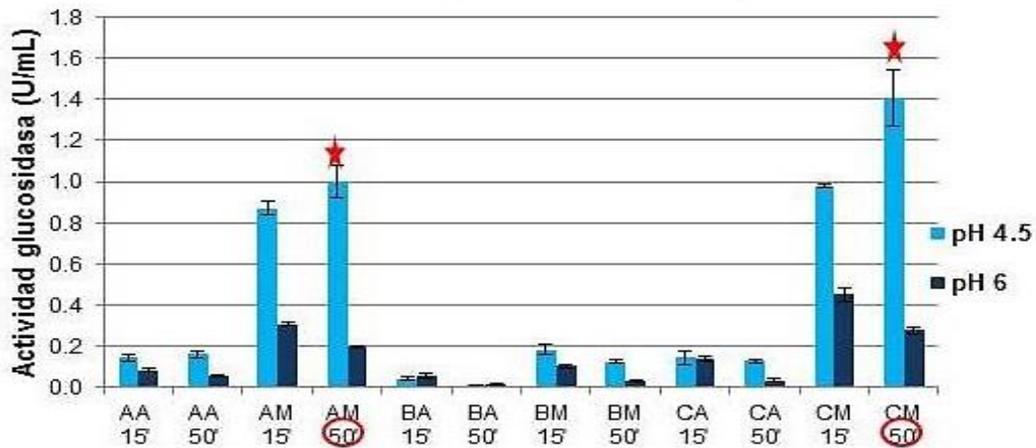
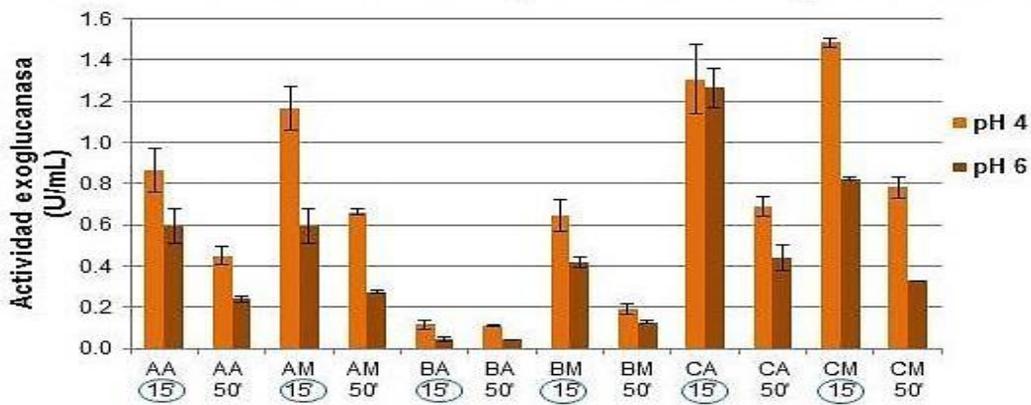
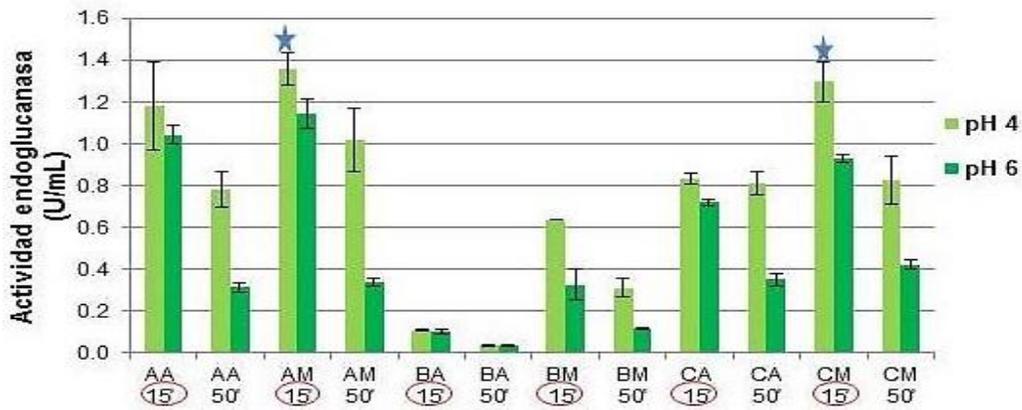
**Medio A:** Laboratorio Bioenergéticos (anexo C )

**Medio B:** Maeda *et al.*, 2010 (anexo F )

**Medio C:** Mandels y Weber 1969 (anexo F)

### Anexo N

Con el objetivo de encontrar las condiciones óptimas de pH y tiempo de incubación de la actividad EnG, ExG y BG de *P. funiculosum* FG1, se evaluaron las actividades en las muestras que se tomaron a las 144 h de cultivo en los 6 tratamientos que se indican en las siguientes gráficas.



AA= medio A y Avicel 1%  
 AM= medio A y moringa sin pretratar 2%  
 BA= medio B y Avicel 1%  
 BM= medio B y moringa sin pretratar 2%  
 CA= medio C y Avicel 1%  
 CM= medio C y Moringa sin pretratar 2%

Medio A : Laboratorio Bioenergéticos

Medio B: Maeda *et al.*, 2013

Medio C: Mandels y Weber 1969