

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE CIENCIAS



**“AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE HONGOS PRODUCTORES DE
CELULASAS NEUTRO ALCALINAS A PARTIR DE BOSQUE
PRIMARIO”**

Presentada por:

KARIN VEGA RIVERA

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

Lima - Perú.

2020

**La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación
(Art. 24 – Reglamento de Propiedad Intelectual)**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE HONGOS PRODUCTORES DE
CELULASAS NEUTRO ALCALINAS A PARTIR DE BOSQUE
PRIMARIO”**

Presentada por:

KARIN VEGA RIVERA

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

Dr. Víctor Meza Contreras
PRESIDENTE

Dra. Doris Zúñiga Dávila
MIEMBRO

Biol. Roberto Ramos Chaupín
MIEMBRO

Ph.D. Marcel Gutierrez Correa
ASESOR

Ph.D. Gretty Villena Chávez
Co-ASESORA

DEDICATORIA

A mis padres Tula, María, Ciro y Raúl por darme y expresarme múltiples formas de amor.

A mi hermana Rubi, mi alma gemela, por su constante apoyo y comprensión incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A los profesores PhD. Marcel Gutiérrez-Correa y PhD. Gretty K. Villena Chávez, patrocinadores de mi tesis. Por guiarme y brindarme la oportunidad de aprender y desarrollar ciencia.

Al Proyecto N° 110 FINCyT FIDECOM PIPEA 2012 y a la empresa CERTINTEX S.A.C quienes contribuyeron con el financiamiento de mi tesis.

Especial agradecimiento a la MSc. Yvette Ludeña Hinojosa y al MSc. Víctor H. Sarmiento Casavilca, compañeros y amigos con quienes compartí gratos momentos, por guiarme e impulsarme constantemente en la realización de la tesis.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. BOSQUE PRIMARIO	3
2.2. LA CELULOSA	4
2.2.1. Generalidades	4
2.2.2. Características	5
2.3. COMPLEJO ENZIMÁTICO CELULASA	6
2.3.1. Componentes y modo de acción.....	6
2.3.2. Determinación de la actividad celulasa	8
2.4. HONGOS PRODUCTORES DE CELULASAS.....	9
2.5. PRODUCCIÓN DE CELULASAS	9
2.6. APLICACIÓN DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS EN LA INDUSTRIA	10
2.7. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS FÚNGICAS.....	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE SUELO.....	15
3.2. AISLAMIENTO Y SELECCIÓN PRIMARIA DE CEPAS FÚNGICAS CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA	15
3.3. CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN GENÉRICA DE CEPAS AISLADAS.....	16
3.3.1. Identificación microscópica	16
3.3.2. Identificación macroscópica.....	16
3.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA EN CONDICIONES NEUTROALCALINAS.....	17
3.4.1. Evaluación cualitativa de la actividad celulasa o selección secundaria	17
3.4.2. Evaluación cuantitativa de la actividad celulolítica	18

3.5. DETERMINACIÓN DE LA BIOMASA PRODUCIDA Y LAS PROTEÍNAS SOLUBLES	19
3.6. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS SELECCIONADAS	20
3.6.1. Extracción de ADN genómico	20
3.6.2. Cuantificación y verificación de la calidad del ADN genómico.....	21
3.6.3. Electroforesis de ADN	21
3.6.4. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	22
3.6.5. Análisis del secuenciamiento de productos del PCR.....	23
3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	23
IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	24
4.1. DATOS GENERALES DE LAS MUESTRAS DE SUELO	24
4.2. AISLAMIENTO Y SELECCIÓN PRIMARIA DE CEPAS FÚNGICAS CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA	24
4.3. CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN GENÉRICA DE CEPAS AISLADAS.....	26
4.3.1. Identificación microscópica y macroscópica	26
4.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULASA EN CONDICIONES NEUTROALCALINAS.....	30
4.4.1. Evaluación cualitativa de la actividad celulolítica o selección secundaria. 30	
4.4.2. Evaluación cuantitativa de la actividad celulolítica (celulasa total y endoglucanasa).....	31
4.4.3. Producción de enzimas celulolíticas en un sistema de cultivo sumergido con lactosa o celulosa microcristalina	31
4.4.4. Determinación de la biomasa producida y proteína total.....	36
4.4.5. Determinación de la cinética enzimática de tres cepas seleccionas	45
4.5. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS FÚNGICAS PRODUCTORAS DE CELULASAS NEUTROALCALINAS	54
V. CONCLUSIONES.....	63
VI. RECOMENDACIONES	65
VII. BIBLIOGRAFÍA	66
VIII. ANEXOS	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Secuencias de los cebadores ITS, usados para la identificación molecular de hongos nativos productores de celulasas neutroalcalinas.	22
Tabla 2	Componentes y volúmenes para la amplificación mediante PCR de la región ITS del ADN fúngico.	22
Tabla 3	Resumen de datos de las coordenadas, temperatura y pH de cada muestra de suelo del bosque primario Macuya-UNU (Ucayali-Perú).	24
Tabla 4	Recuento del número de hongos celulolíticos viables y seleccionados en cada muestra de suelo del bosque primario Macuya (Ucayali-Perú).	26
Tabla 5	Descripción de las características morfológicas, según la clave taxonómica de Barnett y Hunter (1998), de once cepas fúngicas nativas del suelo de bosques primarios Macuya (Ucayali-Perú) seleccionados por su capacidad de producir celulasas neutroalcalinas.	28
Tabla 6	Evaluación cualitativa de la actividad de endoglucanasa de hongos aislados y seleccionados de suelos del bosque Macuya (Ucayali-Perú) expresada en halos hidrolíticos (cm).	31
Tabla 7	Comparación de la producción de biomasa y proteína secretada en cultivo sumergido con lactosa y celulosa microcristalina durante 72 h de 11 cepas aisladas del suelo del bosque primario Macuya (Ucayali-Perú).	36
Tabla 8	Productividad específica de la actividad celulasa total y endoglucanasa a diferente pH a partir de cultivo sumergido con lactosa de 11 cepas fúngicas aisladas y seleccionadas de suelos del bosque Macuya (Ucayali-Perú).	42
Tabla 9	Comparación de los parámetros de productividades de celulasa total (APF), evaluados a pH 4.8 y 9.4, producidos en cultivo sumergido con lactosa por 11 cepas fúngicas aisladas del suelo del bosque primario Macuya (Ucayali-Perú).	43

Tabla 10	Comparación de los parámetros de productividades de endoglucanasa (EG), evaluados a pH 4.8 y 9.4, producidos en cultivo sumergido con lactosa por 11 cepas fúngicas aisladas del suelo del bosque primario Macuya (Ucayali-Perú).	44
Tabla 11	Concentración y pureza del ADN extraído de 11 cepas de hongos aislados del suelo del bosque Macuya Pucallpa con actividad celulasa en condiciones neutroalcalinas.	55
Tabla 12	Análisis de secuencias de la región ITS del ADNr de 11 hongos aislados de suelo del bosque Macuya con actividad celulasa en condiciones neutroalcalinas, comparadas con las secuencias almacenadas en GenBank.	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de la composición y estructura de la celulosa. (a) celobiosa (disacárido) unida por el enlace β -1,4 glucosídico. (b) Cadenas de celulosa con enlaces de hidrógenos intra e intermoleculares (Poletto et al., 2013).	5
Figura 2	Esquema simplificado de la hidrólisis enzimática de la celulosa por un sistema de celulasa fúngica. (a) celulosa con regiones cristalinas y amorfas. (b) celulosa parcialmente hidrolizada. (c) oligosacáridos y celobiosa (disacárido) como un producto intermedio importante. (d) glucosa final reducida. (Figura adaptada de Gusakov et al., 2011).	7
Figura 3	Representación esquemática del grupo de genes del ARN ribosomal (ARNr) y los cebadores de PCR para regiones ITS (espacios de transcritos internos) de hongos (ITS1 e ITS4). Las flechas indican la posición y dirección de los cebadores más comunes para la amplificación de las regiones ITS (Figura adaptada de Embong et al., 2008).	14
Figura 4(a)	Comparación de la actividad de celulasa total evaluada a cuatro pH de 11 cepas fúngicas nativas del suelo del bosque primario Macuya (Ucayali-Perú) cultivadas en sumergido con lactosa.	32
Figura 4(b)	Comparación de la actividad celulasa total evaluada a diferente pH de 11 cepas fúngicas nativas del suelo del bosque primario Macuya (Ucayali-Perú) cultivadas en sumergido con celulosa microcristalina.	33
Figura 5(a)	Comparación de la actividad de endoglucanasa evaluada a diferentes pH de 11 cepas fúngicas nativas del suelo del bosque primario Macuya (Ucayali-Perú) cultivadas en sumergido con lactosa.	33
Figura 5(b)	Comparación de la actividad de endoglucanasa evaluada a diferente pH de 11 cepas fúngicas nativas del suelo de bosque primario Macuya (Ucayali-Perú) cultivadas en sumergido con celulosa microcristalina.	34

Figura 6(a)	Efecto de la fuente de carbono sobre la actividad celulasa total a diferente pH de 11 cepas fúngicas nativas del suelo de bosque primario Macuya (Ucayali-Perú).	35
Figura 6(b)	Efecto de la fuente de carbono sobre la actividad endoglucanasa a diferente pH de 11 cepas fúngicas nativas del suelo de bosque primario Macuya (Ucayali-Perú).	35
Figura 7	Biomasa producida en cultivo sumergido con lactosa y celulosa microcristalina de 11 cepas fúngicas nativas del suelo de bosque primario Macuya (Ucayali-Perú).	37
Figura 8	Proteína extracelular producida en cultivo sumergido con lactosa y celulosa microcristalina de 11 cepas fúngicas aisladas del suelo de bosque primario Macuya (Ucayali-Perú).	37
Figura 9	Efecto de la fuente de carbono y tipo de cepa sobre la producción de proteína extracelular. (a) Efecto de la fuente de carbono; (b) efecto de la cepa; (c) gráfica multivariable.	38
Figura 10	Efecto de la fuente de carbono y tipo de cepa sobre la producción de biomasa. (a) Efecto de la fuente de carbono; (b) efecto de la cepa; (c) gráfica multivariable.	40
Figura 11(a)	Cinética de celulasa total a diferentes pH para la cepa LMHP32 cultivada en sumergido con lactosa durante 120 h.	46
Figura 11(b)	Cinética de endoglucanasa a diferentes pH para la cepa LMHP32 cultivada en sumergido con lactosa durante 120 h.	46
Figura 12(a)	Cinética de celulasa total a diferentes pH para la cepa LMHP32 cultivada en sumergido con celulosa microcristalina durante 168 h.	47
Figura 12(b)	Cinética de endoglucanasa a diferentes pH para la cepa LMHP32 cultivada en sumergido con celulosa microcristalina durante 168 h.	47
Figura 13(a)	Cinética de celulasa total a diferentes pH de la cepa LMHP33 cultivada en sumergido con lactosa durante 120 h.	48
Figura 13(b)	Cinética de endoglucanasa a diferentes pH para la cepa LMHP33 cultivada en sumergido con lactosa durante 120 h.	48

Figura 14(a)	Cinética de celulasa total a diferentes pH para la cepa LMHP33 cultivada en sumergido con celulosa microcristalina durante 168 h.	49
Figura 14(b)	Cinética de endoglucanasa a diferentes pH para la cepa LMHP33 cultivada en sumergido con celulosa microcristalina durante 168 h.	49
Figura 15(a)	Cinética de celulasa total a diferentes pH para la cepa LMHP37 cultivada en sumergido con lactosa durante 120 h.	50
Figura 15(b)	Cinética de endoglucanasa a diferentes pH para la cepa LMHP37 cultivada en sumergido con lactosa durante 120 h.	50
Figura 16(a)	Cinética de celulasa total a diferentes pH para la cepa LMHP37 cultivada en sumergido con celulosa microcristalina durante 168 h.	51
Figura 16(b)	Cinética de endoglucanasa a diferentes pH para la cepa LMHP37 cultivada en sumergido con celulosa microcristalina durante 168 h.	51
Figura 17(a)	Cinética de la producción de biomasa de la cepa LMHP32, LMHP33 y LMHP37 cultivadas en líquido con lactosa.	52
Figura 17(b)	Cinética de la producción de biomasa de la cepa LMHP32, LMHP33 y LMHP37 cultivadas en líquido con celulosa microcristalina.	52
Figura 18	Electroforesis en gel de agarosa al uno por ciento de muestras de ADN de 11 cepas de hongos aislados del suelo del bosque Macuya Pucallpa con actividad celulasa en condiciones neutroalcalinas.	56
Figura 19	Electroforesis en gel de agarosa al uno por ciento de los productos de PCR de la región ITS del ADNr de 11 cepas de hongos aislados del suelo del bosque Macuya Pucallpa con actividad celulasa en condiciones neutroalcalinas.	56
Figura 20	Árbol filogenético basado en secuencias de la región ITS del ADNr de las 11 cepas aislada del suelo del bosque primario Macuya-UNU (Pucallpa, Perú) y seleccionadas como productoras de celulasas neutro alcalinas. Los números en las ramas indican valores de bootstrap.	59

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Fotografías de las 11 cepas fúngicas aisladas de muestras de suelo del bosque primario Macuya (Pucallpa-Ucayali) y seleccionadas como productoras de celulasas que actúan en condiciones neutroalcalinas.	82
Anexo 2	Figura A2-1.	86
Anexo 2	Figura A2-2.	87
Anexo 2	Figura A2-3.	88
Anexo 2	Figura A2-4	89

RESUMEN

Actualmente la mayoría de los procesos en la industria utilizan enzimas versátiles, con un impacto ambiental, económico y socialmente positivos. Asimismo, se sabe que los suelos de los bosques lluviosos de la selva amazónica contienen una gran diversidad de microorganismos, poco estudiados y con características particulares. Por tal motivo, se aisló y seleccionó hongos nativos productores de celulasas neutroalcalinas de suelo del bosque primario Macuya (Pucallpa-Ucayali). Para tal fin, se utilizó el método de dilución seriada en placas con un medio de aislamiento enriquecido (xilosa/carboximetilcelulosa), obteniéndose 50 cepas fúngicas diferentes. Las cepas aisladas se sometieron a una selección cualitativa a través de la formación de halos hidrolíticos en pHs neutroalcalinos (7.4, 8.4 y 9.4); resultando sólo 11 cepas seleccionadas para luego ser evaluadas en cultivos líquidos con lactosa y celulosa microcristalina. Al evaluar la producción de enzimas celulolíticas durante 72 h en medio con lactosa, se determinó que, las cepas LMHP14, LMHP32, LMHP33 y LMHP37 lograron actividades de celulasa total (1.5 U mL^{-1}) y endoglucanasa ($> 0.9 \text{ U mL}^{-1}$) más altos en los pHs evaluados. El efecto del sustrato y cepa sobre la producción de biomasa, proteínas solubles y enzimas celulolíticas, demostró que ambos factores influyen significativamente ($p < 0.05$); siendo lactosa el mejor sustrato y las cepas LMHP32, LMHP33 y LMHP37 los mayores productores de celulasas totales ($> 3 \text{ U mL}^{-1}$) y endoglucanasas (0.5 U mL^{-1}), pero en la mayoría de los casos el factor pH no resultó tener un efecto significativo. Luego, las tres cepas seleccionadas fueron cultivadas en medio líquido, desde las 0 a 120 h con lactosa y de 0 a 168 h con celulosa microcristalina. Los cultivos con lactosa mostraron un comportamiento de la actividad enzimática con tendencia creciente durante las primeras 72 h, luego a las 96 h disminuye; pero, se mantiene o no incrementa significativamente con celulosa microcristalina. En general para las tres cepas seleccionadas la actividad celulasa total fue hasta diez veces más altas y 5 veces más para endoglucanasa, cuando se cultiva con lactosa en comparación con celulosa microcristalina. Asimismo, se logró determinar los géneros de *Aspergillus* y *Penicillium* como predominantes.

Palabras clave: celulasa, endoglucanasa, pH alcalino, lactosa, *Aspergillus*, *Penicillium*.

ABSTRACT

Currently most of the efficient processes in the industry use enzymes, with an environmental, economic and socially positive impact. Also, it is known that the soils of the rain forests of the Amazon rainforest contain a great diversity of microorganisms, still little studied and with particular characteristics. For this reason, native fungi producing neutroalkaline cellulases were isolated and selected from the Macuya primary forest (Pucallpa-Ucayali). For this purpose, the serial dilution method was used in plates with an isolation medium enriched (xylose/carboxymethylcellulose), achieving the isolation of a total of 50 fungal strains. The isolated strains were subjected to a qualitative selection through the formation of hydrolytic haloes at neutral-alkaline pHs (7.4, 8.4 and 9.4); resulting only 11 strains selected to be evaluated in liquid cultures with lactose and microcrystalline cellulose. When evaluating the production of cellulolytic enzymes during 72 h in lactose medium, it was determined that strains LMHP14, LMHP32, LMHP33 and LMHP37 achieved higher total cellulose ($> 1.5 \text{ UmL}^{-1}$) and endoglucanase activities (0.9 UmL^{-1}) in the range of pHs evaluated. Then, the effect of the substrate and strain on the production of biomass, soluble proteins and cellulolytic enzymes, it was demonstrated that both factors influence significantly ($p < 0.05$); lactose being the best substrate and strains LMHP32, LMHP33 and LMHP37 the largest producers of total cellulases ($> 3 \text{ U mL}^{-1}$), endoglucanases (0.5 U mL^{-1}) and therefore with higher specific productivities. However, the pH factor did not prove to have a significant effect for the quantification of cellulase activities. The three selected strains were cultured in liquid medium, from 0 to 120 h with lactose and from 0 to 168 h with microcrystalline cellulose. The cultures with lactose showed a behavior of the enzymatic activity with increasing tendency during the first 72 h, then at 96 h decreases; but, it is maintained or not significantly increased with microcrystalline cellulose. In general, for the three selected strains the total cellulase activity was up to ten times higher and 5 times more for endoglucanase, when it was cultivated with lactose in comparison with microcrystalline cellulose. Also, it was possible to determine the genera of *Aspergillus* and *Penicillium* as predominant.

Keywords: cellulase, endoglucanase, alkaline pH, lactose, *Aspergillus*, *Penicillium*.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad el incremento y la constante demanda de los recursos energéticos, cada vez más escasos y costosos, ha impulsado el desarrollo y evolución de la biotecnología moderna direccionado hacia la obtención de tecnologías más limpias y amigables con el medio ambiente utilizando la menor cantidad de los recursos. Por ejemplo, el desarrollo de los procesos de fermentación y la tecnología de la genética microbiana, dirigidos a la producción de enzimas mediante el uso de cepas seleccionadas ha permitido avances en la búsqueda de enzimas versátiles, que muestran nuevas actividades y que se han adaptado a las condiciones de los procesos, permitiendo un mayor uso industrial.

Los procesos industriales basados en la hidrólisis enzimática de materiales lignocelulolíticos (purificados o pretratados) son amplias. Por ejemplo, las celulasas que son enzimas inducibles y sintetizadas por una gran diversidad de microorganismos, principalmente hongos y bacterias, se producen comercialmente y poseen un amplio rango de potenciales aplicaciones en la industria textil, lavandería, del papel, agricultura, alimentos y combustibles de segunda generación. En las últimas décadas el uso de las celulasas se ha incrementado en la industria textil (Miettinen-Oinonen *et al.*, 2004), especialmente en el bioprocesamiento de la fibra natural, con el propósito de obtener una mejor apariencia y acabado (Hebeish & Ibrahim, 2007; Karmakar & Ray, 2011). En general, estas enzimas actuarían para reducir el grosor de la pared celular y hacer a la fibra más flexible y plegable. También se han empleado con éxito en el proceso del biopulido del demin, para lograr la apariencia desteñida de la tela, en reemplazo del tratamiento con piedras que tiene un efecto abrasivo sobre la fibra (Olson and Stanley, 1990). Otro caso es el proceso del biopulido del algodón, en donde las celulasas eliminan las fibras cortas de la superficie, creando un aspecto suave y liso y mejorando el brillo del color (Moekerbak and Zimmermann, 1998).

Los beneficios de aplicar tratamientos con celulasas es que actúan principalmente sobre la superficie de la fibra, dejando intacto su interior, incluyendo el colorante (Tyndall, 1990; Kochavi *et al.*, 1990). Sin embargo, las celulasas, que normalmente son activas en condiciones ácidas (pH 4-6), tienen un efecto agresivo sobre la fibra, provocando además la redeposición del colorante. Por este motivo, se ha planteado el uso de celulasas neutroalcalinas (Miettinen-Oinonen *et al.*, 2004) beneficiando no sólo en la calidad de la fibra, sino también en el desarrollo de tecnologías amigables con el medio ambiente y la disminución de costos. Por lo tanto, obtener enzimas celulolíticas con actividad neutroalcalina para su aplicación en el acabado textil u otros, requiere como primer paso, la bioprospección y selección de hongos nativos con complejos celulolíticos de elevada actividad enzimática. Actualmente se reconoce y considera que el Perú es un país megadiverso debido a la gran variedad de factores climáticos y territoriales, constituyendo una fuente potencial de estos organismos que aún no han sido estudiados (Gutierrez-Correa, 2007). Por tal motivo, el presente trabajo tiene como propósito aislar y seleccionar hongos nativos de suelo del bosque primario Macuya en Pucallpa-Ucayali, que produzcan enzimas celulolíticas que tengan actividad en condiciones neutroalcalinas para ser aplicados en diversos procesos industriales, principalmente en la industria textil y para este fin se consideraron los siguientes objetivos específicos:

- Aislar y seleccionar cualitativamente hongos celulíticos de muestras de suelo del bosque primario, mediante el desarrollo de las colonias en un medio selectivo que contiene carboximetilcelulosa (CMC) y xilosa.
- Determinar cualitativamente la capacidad celulolítica de las cepas aisladas, a través del revelado con Rojo de Congo, de halos hidrolíticos sobre un medio de tamiz alcalino con 0.5 por ciento de CMC.
- Establecer la productividad y la actividad celulolítica de las cepas seleccionadas mediante ensayos cuantitativos de celulasa total y endoglucanasa en condiciones neutroalcalinas.
- Realizar la identificación morfológica de cepas aisladas y seleccionadas con mayor actividad enzimática.
- Confirmar la identificación morfológica mediante el secuenciamiento de la secuencia ITS (espacios de transcripción interna específicos del ADN ribosomal) de las cepas seleccionadas con mayor actividad celulasa en condiciones neutroalcalinas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. BOSQUE PRIMARIO

Actualmente se define a los bosques primarios, como bosques de especies autóctonas que se regeneran naturalmente, donde no existe la intervención directa de las actividades humanas durante periodos que exceden el tiempo de vida de árboles maduros (según la FAO de 60 a 80 años) (Wadsworth, 2000) y por lo tanto los procesos ecológicos no se han visto alterados significativamente. Según Holling (1973), los bosques primarios tienen resiliencia (la capacidad de adaptarse a cambios y persistir a pesar de ellos) y estabilidad (la capacidad de volver a un estado de equilibrio después de una perturbación temporal). A menudo se atribuyen a los bosques primarios altos niveles de diversidad (Hendrickson, 2003; Mosseler et al., 2003) y en particular los bosques tropicales húmedos, ya que contienen una amplia variedad de especies y ecosistemas terrestres diversos. Una revisión reciente de 138 estudios sobre la biodiversidad de los bosques primarios y otros bosques tropicales de 28 países (la mayoría en América del Sur y Asia) y 92 paisajes, llegó a la conclusión de que los mayores índices de diversidad biológica se encuentran en los bosques primarios, y disminuyen a medida que se incrementa la alteración de estos últimos (Gibson et al., 2011).

Se cree que los bosques primarios alcanzaron su máxima extensión durante una pequeña fracción de los últimos dos millones de años (Whitmore, 1982). Actualmente el área total de bosques primarios supera los 1300 millones de hectáreas, o sea el 36 por ciento de todos los bosques; sin embargo, la mayor extensión mundial de bosques primarios se encuentra en Sudamérica (cuenca del Amazonas) con un 45 por ciento del total, seguida por Norteamérica y Centroamérica (23,3 por ciento) y Europa (19,7 por ciento). Brasil es el país que más bosques primarios tiene (cerca de 477 millones de hectáreas), seguido por la Federación Rusa (256 millones de hectáreas) y Canadá (165 millones de hectáreas). (FAO, 2010).

El Perú es un país que tiene diversos bosques y ocupan una extensión total de alrededor de 72 millones de hectáreas del territorio nacional (Cordero, 2012). A nivel mundial, es el noveno país con mayor extensión de bosques y el cuarto país con mayor superficie de bosques tropicales. Según la FAO (2010), cerca del 89 por ciento de los bosques peruanos son primarios y cubren el 52 por ciento del territorio nacional, ubicándose como el quinto país con mayor extensión de bosques primarios. Sólo en la Amazonía existen 69 millones de hectáreas de bosques primarios (MINAM, 2010); sin embargo, hasta el 2009 se ha reportado una pérdida de aproximadamente 8 millones de hectáreas de bosques primarios ubicados entre Selva Alta y Baja (MINAM, 2011).

2.2. LA CELULOSA

2.2.1. Generalidades

La biomasa vegetal es uno de los recursos renovables más abundantes, compuesto principalmente de tres tipos de polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina los cuales están fuertemente entrelazados y químicamente unidos por fuerzas no covalentes y covalentes. Entre los componentes, la celulosa es el principal biopolímero de la pared de la célula vegetal, constituyendo aproximadamente un 35 a 50 por ciento del peso seco de la planta ((Lynd *et al.*, 2002). Por lo tanto, la celulosa constituye la fuente de carbono renovable más abundante en la naturaleza, representando alrededor de 1.5×10^{12} toneladas de la producción anual de biomasa (Poletto *et al.*, 2013); sin embargo, su potencial uso no es fácilmente accesible, pues depende de la hidrólisis efectiva, a través de un complejo sistema de enzimas denominadas celulasas o celulolíticas (Chang, 2007; Zhang & Lynd, 2004) Los microorganismos que poseen estas enzimas y tienen la capacidad de metabolizar la celulosa son principalmente hongos, bacterias o actinomicetos, aerobios y anaerobios, mesofílicos y termofílicos que ocupan una gran variedad de hábitats principalmente en el suelo (Aubert, 1998; Jarvis, 2003; Zhang & Lynd, 2004; Fan *et al.*, 1987; Bhat, 2000; Schlesinger, 1991; Lynd *et al.*, 2002). Entre ellos, los hongos destacan por la rápida colonización de sustratos, la secreción de las enzimas al medio, la eficiente remoción de productos de hidrólisis y la diversidad de sus sistemas celulolíticos; siendo los géneros más importantes *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp.,

Aspergillus sp. y *Fusarium* sp. (Tyndall, 1990; Jorgensen *et al.* 2005; Kuhad *et al.*, 1999; Lynd *et al.*, 2002).

2.2.2. Características

La celulosa está compuesta de 10.000 a 15.000 unidades de D-glucosa ordenados y unidos linealmente por enlaces del tipo β -1,4 glucosídico (Figura 1(a)), proporcionándole una estructura y características físicas particulares (Lehninger, Nelson & Cox, 2008). En la conformación estructural también participan enlaces intermoleculares (Van der Waals y puentes de hidrógeno) (Figura 1(b)) que permiten mantener una conformación plana y linear, produciéndose un apilamiento en paralelo de las múltiples cadenas de celulosa (Lima *et al.*, 2005; Huber *et al.*, 2006; Moon *et al.*, 2011). Estos enlaces convierten a la celulosa en un polímero de estructura cristalina, rígida, insoluble y recalcitrante (Wilson, 2008; Moon *et al.*, 2011; Van Dyk & Pletschke, 2012).

Naturalmente la celulosa presenta forma heterogénea; pues se alternan regiones con una estructura altamente ordenada (forma cristalina) con pequeñas porciones de cadenas que se encuentran menos organizadas, formando una porción amorfa susceptible a la degradación enzimática (Fan *et al.*, 1987; Juturu & Wu, 2014).

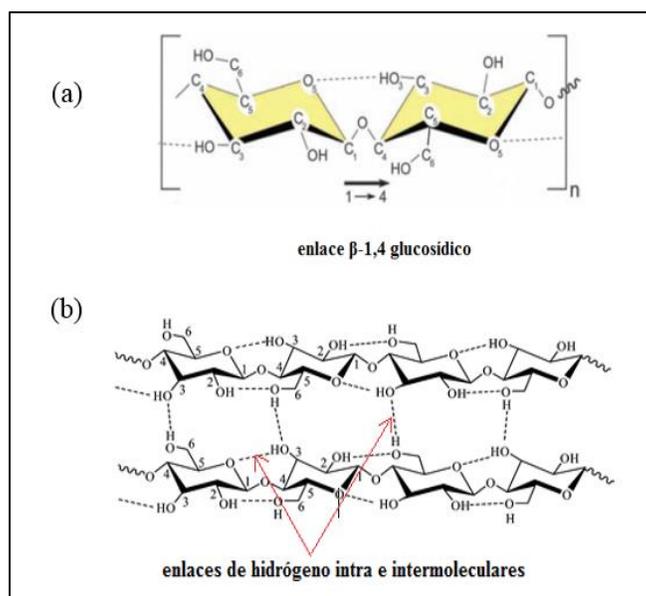


Figura 1: Esquema de la composición y estructura de la celulosa. (a) celobiosa (disacárido) unida por el enlace β -1,4 glucosídico. (b) Cadenas de celulosa con enlaces de hidrógenos intra e intermoleculares (Poletto *et al.*, 2013).

2.3. COMPLEJO ENZIMÁTICO CELULASA

2.3.1. Componentes y modo de acción

La conversión biológica de la celulosa a glucosa, requiere la acción combinada de múltiples enzimas con diferentes especificidades y modos de acción (ver figura 2). Generalmente las celulasas son activas en un rango de temperatura de 30 a 60°C y de acuerdo a su sensibilidad al pH se clasifican como ácidos estables (pH 4.5 a 5.5), neutras (pH 6 a 7) o alcalinas (pH 8 a 10).

El mecanismo ampliamente aceptado para explicar la hidrólisis enzimática de la celulosa por el complejo celulasa involucra la acción coordinada y sinérgica de tres enzimas: endoglucanasa (1,4-β-D-glucano-4-glucanohidrolasa, carboximetilcelulasa o CMCase y EG), exoglucanasa (1,4-β-D-glucano-4-glucohidrolasa, celobiohidrolasa, CBH) y β-glucosidasa (β-D-glucósida-glucohidrolasa, BG) (Yi *et al.*, 1999; Wood, 1989; Bhat & Bhat, 1997, Lyman *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2006; Juturu & Wu, 2014).

Las endoglucanasas hidrolizan aleatoriamente los enlaces glucosídicos intramoleculares en las regiones amorfas de la celulosa generando oligosacáridos de varias longitudes y un incremento de grupos reductores, generándose regiones menos ordenadas de las fibras de modo que sean más susceptibles al ataque de otras enzimas. Luego, las exoglucanasas clivan los extremos terminales no reductores del sustrato previamente fragmentado o de las cadenas de mayor longitud aún adheridas a la matriz de la celulosa, generando unidades de celobiosa o glucosa. Finalmente, la β-glucosidasa completa el proceso hidrolítico convirtiendo los fragmentos de celobiosa soluble a glucosa y en menor grado removiendo glucosa desde los extremos no reductores de pequeños celoligosacáridos (Lyman & Renganathan, 1995; Zhang *et al.*, 2006).

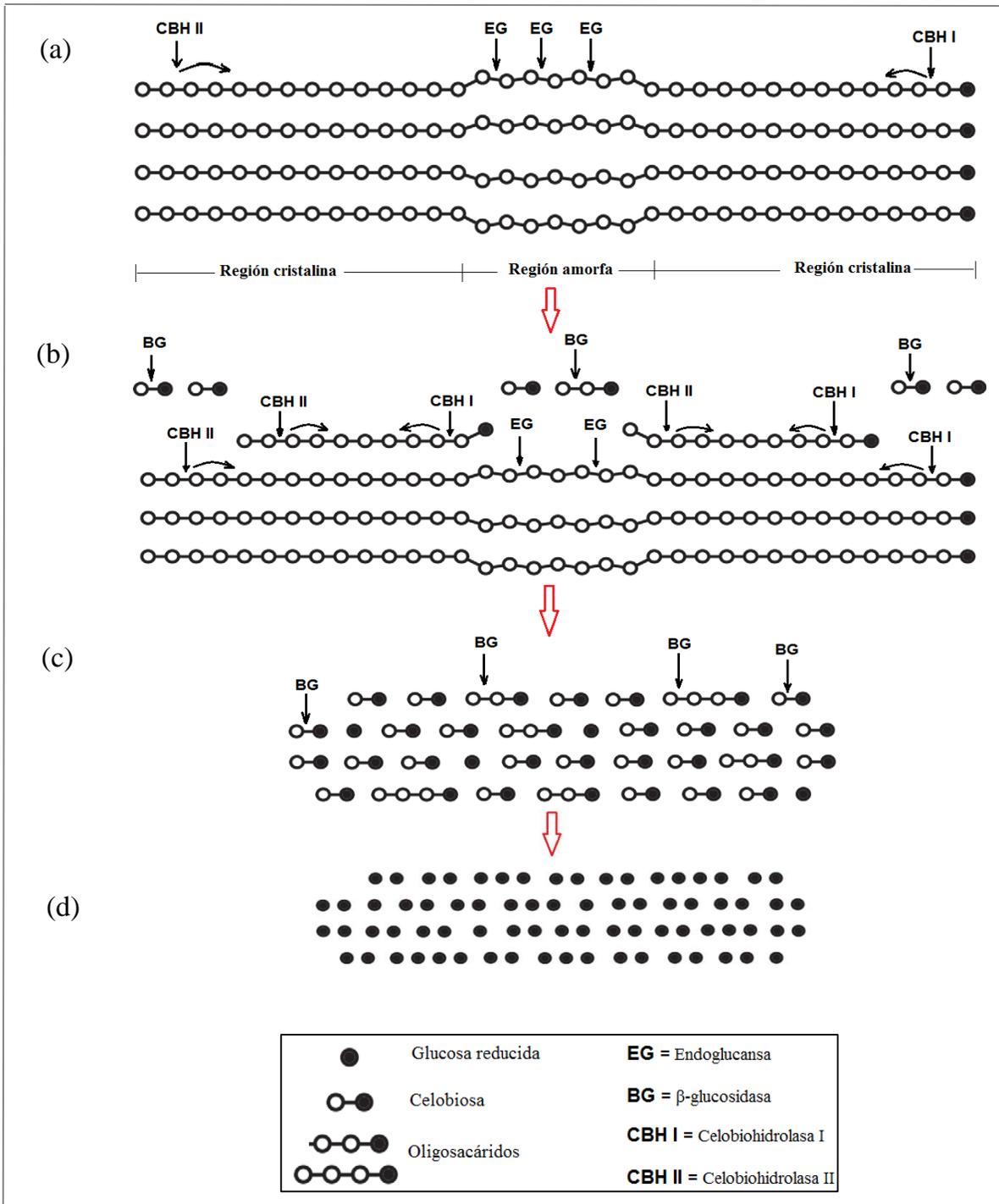


Figura 2: Esquema simplificado de la hidrólisis enzimática de la celulosa por un sistema de celulasa fúngica. (a) celulosa con regiones cristalinas y amorfas. (b) celulosa parcialmente hidrolizada. (c) oligosacáridos y celobiosa (disacárido) como un producto intermedio importante. (d) glucosa final reducida. (Figura adaptada de Gusakov *et al.*, 2011).

2.3.2. Determinación de la actividad celulasa

Determinar la actividad celulolítica es importante ya que permite caracterizar su rendimiento y eficiencia. Básicamente los ensayos para cuantificar la actividad del complejo celulasa se puede hacer mediante la evaluación de la actividad individual de cada enzima (endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas) y midiendo la actividad celulasa total (Sharrock, 1988; Zhang *et al.*, 2006; Dashtban *et al.*, 2010). Por ejemplo, la actividad enzimática de las endoglucanasas se mide con frecuencia sobre la celulosa soluble con alto grado de polimerización, como es el caso de la carboximetilcelulosa (CMC) (Dashtban *et al.*, 2010). La acción de las endoglucanasas sobre este sustrato celulósico se caracteriza por la disminución de la viscosidad o el incremento de los extremos reductores determinado por el ensayo de azúcares reductores. (Zhang *et al.*, 2006). De otro lado, para evaluar la actividad total de las celulasas se utilizan sustratos insolubles, tales como papel filtro, celulosa microcristalina entre otros (Zhang *et al.*, 2006). Sin embargo, en 1987 la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) estandarizó el método del papel filtro (FPA), que tradicionalmente utiliza como sustrato una tira (1x6 cm) de papel filtro Whatman N° 1. En general, el método analítico comúnmente utilizado para cuantificar los azúcares reductores, como producto final de la hidrólisis enzimática de las celulasas, es el Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Ghose, 1987; Miller, 1959; Dashtban *et al.*, 2010).

Asimismo, existen métodos cualitativos adecuados para la identificación y enumeración de un gran número de microorganismos capaces de utilizar la celulosa. En donde la actividad enzimática se verifica mediante la formación de halos hidrolíticos sobre los sustratos celulósicos (CMC y celulosa). Estos halos son revelados con la tinción de los polisacáridos residuales con diversos colorantes, pues estos tintes sólo son adsorbidos por largas cadenas de polisacáridos (Fülöp & Ponyi, 1997). Teather y Wood en 1982, reportaron que el rojo Congo podía ser usado en los ensayos para evidenciar la hidrólisis de polisacáridos debido a que este colorante forma complejos con las moléculas aún no hidrolizadas, observando zonas de aclaramiento alrededor de las colonias, por tanto, facilitando la diferenciación entre microorganismos celulolíticos y no celulolíticos (Hendricks *et al.*, 1995; Bradner *et al.*, 1999; Ten *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2005).

2.4. HONGOS PRODUCTORES DE CELULASAS

Muchos microorganismos poseen enzimas capaces de metabolizar y utilizar la celulosa como fuentes de carbono y energía. Entre ellos, los hongos destacan por la rápida colonización de sustratos, la secreción extracelular de las enzimas al medio (Wilson *et al.*, 2008), la eficiente remoción de productos de hidrólisis y la diversidad de sus sistemas celulolíticos.

Las especies de hongos celulolíticos más frecuentemente estudiadas pertenecen al género *Trichoderma* (Kleman-Leyer *et al.*, 1996; Teeri *et al.*, 1998) y *Aspergillus* (Hamilton and Was, 1991) por ser los mejores productores de celulasas. Sin embargo, existen otros géneros y especies fúngicas tales como *Cladosporium* sp. (Abrha & Gashe, 1992), *Fusarium* sp. (Murali *et al.*, 1994; Sulzenbacher *et al.*, 1997; Kuhad *et al.* 1999), *Penicillium* sp. (Keskar *et al.*, 1992; Steiner *et al.*, 1994; Gayal & Khandeparkar 1998; Krogh *et al.*, 2004; Jorgensen *et al.* 2005), *Streptomyces* sp. (Chellapandi & Himanshu, 2008) y *Neurospora* sp. (Yazdi *et al.*, 1990) que también destacan. El objetivo de encontrar nuevas especies de microorganismos celulolíticos altamente productores se debe a que pocas especies pueden producir altos niveles de enzimas extracelulares que permitan degradar in vitro la celulosa insoluble. Por este motivo se plantean alternativas como la búsqueda de nuevas cepas que produzcan celulasas en condiciones naturales a través de una selección de cultivos ya conocidos, luego se podría mejorar la producción mediante la optimización de las condiciones de cultivo o por mutación (Szengyel *et al.*, 2000; Chand *et al.*, 2005; Skomarovsky *et al.*, 2005).

2.5. PRODUCCIÓN DE CELULASAS

La producción de las celulasas depende de factores tales como el tipo y la cantidad del microorganismo a usar, las condiciones de cultivo (pH, temperatura y aireación), la fuente de carbono y nitrógeno, tiempo de cultivo, presencia de inductores y/o inhibidores, aditivos del medio, entre otros (Lynd *et al.*, 2002). La relación entre estas variables tiene un marcado efecto sobre la producción de celulasas; sin embargo, el factor que mayor influencia ejerce es la fuente de carbono (Chahal *et al.*, 1992; Romero *et al.*, 1999; Kubicek & Penttila, 1998), motivo por el cual se han probado diversas fuentes de carbono (CMC, avicel, algodón).

Luego, por razones económicas, se buscan sustratos que a menudo resultan como subproductos de otras industrias (Crueger & Crueger, 1999; Himmel *et al.*, 1999).

De otro lado, se ha determinado que la celulasa es un sistema enzimático inducible (Countinho & Henrissat, 1999; Lynd & Zhang, 2002; Galbe & Zacchi, 2002; De Vries & Visser, 2001) y aunque la mayoría de los microorganismos estudiados han producido significativos niveles de celulasas cuando se cultivan en celulosa como única fuente de carbono (Kubicek *et al.*, 1993; Mach & Zeilinger, 2003) la insolubilidad de este sustrato, probablemente no desencadena directamente en la inducción de celulasas; por este motivo se ha investigado el uso de diversas concentraciones de inductores y sustratos celulósicos (Sehnem *et al.*, 2006). Se conocen otros sustratos solubles, tales como celobiosa (Fritscher *et al.*, 1990), soforosa (Ilmen *et al.*, 1997; Mach *et al.*, 1995), lactosa (Andreotti *et al.*, 1980; Morikawa *et al.*, 1995), tetralosa (Thirumale *et al.*, 2001) y sorbosa (Kwamori *et al.*, 1986; Nogawa *et al.*, 2001) que son conocidos como inductores de la síntesis de celulasas, aumentando principalmente la producción de endo y exoglucanasas (Mandels & Reese, 1960). Entre estos azúcares la lactosa es un disacárido barato y se generan en grandes volúmenes en la industria del queso y otros productos lácteos; por lo general, en la industria de los países en desarrollo, se eliminan directamente al ambiente. Por tal razón, este residuo constituye una fuente potencial de carbono para los procesos de fermentación en la producción de celulasas con la ventaja que es soluble (Seiboth *et al.*, 2002).

2.6. APLICACIÓN DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS EN LA INDUSTRIA

Las celulasas han estado comercialmente disponibles por más de 30 años y han representado un objetivo para la investigación académica e industrial (Singh 1999; Singh *et al.*, 2007). Las celulasas son enzimas industrialmente importantes con un valor de aproximadamente 190 millones de dólares en el mercado actual (Nierstrasz and Warmoeskerken, 2003).

La producción de celulasas se constituye en la tercera industria más grande a nivel mundial debido a sus aplicaciones biotecnológicas variadas (Singhanian *et al.*, 2010), tales como el procesamiento del algodón, el reciclaje de papel, las industrias alimentarias humana y animal, industria textil y de detergentes, industria del papel y pulpa, producción de bioetanol, entre

otros (Godfrey & West, 1996; Galante *et al.*, 1998; Bhat, 2000; Lynd *et al.*, 2002; Bayer *et al.*, 2007; Singhanian *et al.*, 2010; Kuhad *et al.*, 2011; Van Dyk & Pletschke, 2012).

El amplio espectro de usos industriales de las celulasas establece la necesidad de generar enzimas comerciales que tengan diferentes componentes de celulolíticos que sean funcionalmente óptimos en diferentes rangos de pH y temperatura (Arja Miettinen-Oinonen, 2004).

2.6.1. Celulasas neutroalcalinas en la industria textil

Por décadas las enzimas se han incluido en los principales procesos de la industria textil, estas se agrupan en hidrolasas y oxidorreductasas. Dentro de las hidrolasas se incluyen a amilasas, celulasas, proteasas, peptinasas y lipasas. Por ejemplo el uso de amilasas en el desencolado (desinzing) fue una de las primeras aplicaciones en el proceso textil (Covaco-Paulo *et al.*, 1998); sin embargo, la introducción de las celulasas en los procesos de la industria textil se ha desarrollado con éxito en los tratamientos húmedos, principalmente en el acabado de los textiles de origen celulósico (bioestoning, biopolishing y biofinishing), esto gracias a la habilidad de modificar las fibras celulósicas de modo controlado, lo que ha permitido obtener prendas con mejor acabado y apariencia, convirtiéndose así en un referente para las empresas productoras de enzimas (Hebeish & Ibrahim, 2007; Karmakar & Ray, 2011). Se estima que el 10 por ciento del acabado textil se realizan con celulasas y aproximadamente el 80 por ciento de los jeans producidos anualmente son tratados con celulasas como una alternativa al uso de piedra pómez (Buchert & Heikinheimo, 1998).

Durante el proceso del biostoning, las celulasas actúan sobre la tela de algodón al romper pequeñas fibras que sobresalen en la superficie del tejido, esta acción permite liberar fácilmente el colorante durante la abrasión mecánica en el ciclo del lavado. Las ventajas de sustituir los procesos mecánicos (piedra pómez) por aquellos en base a celulasas incluyen un menor daño de las fibras, incremento en la productividad de la maquinaria y por lo tanto un menor sobreesfuerzo de trabajo, y una industria amigable con el medio ambiente (Sukumaran *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2007; Uhlig, 1998; Galante *et al.*, 1998b). Las celulasas utilizadas el proceso del biostoning, tradicionalmente se han clasificado de acuerdo al pH óptimo de la acción enzimática, así tenemos a las celulasas neutras que actúan a un rango de pH de 6 a 8, las celulasas neutro alcalinas en un rango de 7 a 9 y las celulasas ácidas en un pH de 4.5 a 6

(Videbaek *et al.*, 1994, Klahorst *et al.*, 1994). Por ejemplo, las celulasas ácidas producidas por *T. reesei* se caracterizan por su acción sumamente agresiva sobre el tejido de algodón, resultando en la abrasión en un corto tiempo (Galante *et al.*, 1998b; Godfrey, 1996; Kumar *et al.*, 1996); además está asociado al efecto de ‘backstaining’ (Heikinheimo *et al.*, 2000; Heikinheimo, L. & Buchert, 2001). Al contrario, las celulasas neutras o alcalinas utilizadas en el ‘biostoning’ del denim provienen de una variedad de hongos que han sido caracterizados por una acción menos agresiva que las celulasas ácidas (Galante *et al.*, 1998b; Godfrey, 1996; Uhlig, 1998) y con poco o ningún efecto de ‘backstainig’; sin embargo se reporta que se requieren un mayor tiempo de lavado que las celulasas ácidas (Kuhad *et al.*, 2011; Anish *et al.*, 2007; Klahorst *et al.*, 1994; Solovjeva *et al.*, 1998, Cavaco-Paulo *et al.*, 1998; Gusakov *et al.*, 2000a,b)).

En el proceso del biopulido (biopolishing) las celulasas actúan sobre la tela de algodón, hidrolizando las pequeñas fibras terminales que sobresalen en la superficie debido a que son más susceptibles al ataque enzimático. Esta acción debilita las microfibrillas que tienden a desprenderse del cuerpo principal de la fibra, dejando una superficie más suave y lisa, además se elimina la opacidad dándole un brillo superior (Bhat, 2000, Hebeish & Ibrahim, 2007). Contrario al uso de las enzimas, los métodos tradicionales utilizan altas concentraciones de álcalis, peróxido de hidrógeno y otras soluciones que, combinados con elevadas temperaturas, permiten eliminar las impurezas antes del teñido en los procesos del scouring y bleaching. No obstante, estos tratamientos pueden provocar la despolimerización de las fibras de celulosa y la pérdida significativa del peso y resistencia a la tracción del tejido (Buschle-Diller *et al.*, 1998; Li & Hardin, 1997). Asimismo, se utilizan grandes cantidades de agua y energía y los efluentes alcalinos requieren tratamientos especiales. Por tanto, los procesos enzimáticos permiten a la industria textil reducir costos de producción, disminuir el impacto ambiental de todos los procesos y mejorar la calidad y funcionalidad del producto final.

2.7. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS FÚNGICAS

Tradicionalmente, la identificación de especies de hongos se ha determinado a través de la observación de características macro y microscópicas de colonias desarrolladas en medios de cultivos. A pesar de ello, estas técnicas presentan algunos inconvenientes, ya que pueden conducir a una inadecuada representación de la especie fúngica e inclusive a la sobre o subestimación debido a la presencia o ausencia de cuerpos fructíferos, esto por la incapacidad de ciertas especies de prosperar en los medios de cultivo y la dificultad en la identificación a nivel de especie basado en las características microscópicas (Gardes *et al.*, 1996; Bridge *et al.*, 2001; Straatsma *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2003b; O'Brien *et al.*, 2005; Freeman *et al.*, 2009; Frohlich-Nowoisky *et al.*, 2009; Zinger *et al.*, 2009; Pickles *et al.*, 2010). Es así que estudios recientes estiman que, de los 1,5 millones de especies de hongos (aproximadamente) presentes en los ecosistemas naturales, sólo el 5 ó 10 por ciento se han descrito formalmente (Hawksworth, 1991; 2001; Hawksworth & Rossman, 1997).

Los métodos moleculares como la extracción del ADN junto a la amplificación (PCR) y el secuenciamiento de genes conservados o universales han demostrado ser una alternativa fiable frente a los métodos tradicionales (Anderson *et al.*, 2004; Bellemain *et al.*, 2010). Actualmente uno de los elementos más usados en la taxonomía de los hongos corresponde al grupo de genes del ARN ribosomal (ARNr) tales como 18S, 5.8S y 28S, que a pesar de sus limitaciones han sido ampliamente utilizados (White *et al.*, 1990; Borneman and Hartin, 2000). Igualmente existen pequeñas secuencias que pertenecen al clúster del ARNr, conocidas como regiones no codificantes denominados espaciadores de transcritos internos (ITS) como se esquematiza en la figura 3. Estas regiones muestran mucho mayor polimorfismo que las propias regiones génicas, por lo tanto, son importantes al evaluar diferencias entre especies relacionadas o divergencias génicas intraespecíficas (Baagen *et al.*, 2000; Viaud *et al.*, 2000; Down, 2002). Por este motivo la secuencia ITS se ha propuesto como el marcador oficial primario para la identificación de hongos a nivel de especie (Lord *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 2003b; Anderson *et al.*, 2004, Bellemain *et al.*, 2010; Conrad *et al.*, 2012). Adicionalmente se han desarrollado y diseñado una serie de cebadores para la amplificación de la región ITS de hongos, específicamente *Basidiomycetes* y *Ascomycetes* (White *et al.*, 1990; Gardes & Bruns, 1993 Larena *et al.*, 1999; Chen & Cairney, 2002; Lord

et al., 2002; Anderson *et al.*, 2003 a, b). Además, existen más de 100.000 secuencias fúngicas de ITS generadas por secuenciamiento convencional y han sido depositadas en la base internacional de datos de secuencias de nucleótidos (NCBI) y en otras bases de datos, con lo cual se tiene un material de referencia suficiente para la identificación de taxones fúngicos (Nilsson *et al.*, 2009; Bellemain, *et al.*, 2010).

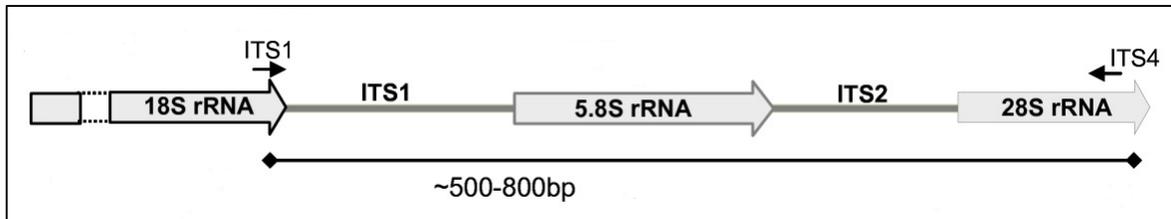


Figura 3: Representación esquemática del grupo de genes del ARN ribosomal (ARNr) y los cebadores de PCR para regiones ITS (espacios de transcritos internos) de hongos (ITS1 e ITS4). Las flechas indican la posición y dirección de los cebadores más comunes para la amplificación de las regiones ITS (Figura adaptada de Embong *et al.*, 2008).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE SUELO

Las muestras de suelo se colectaron en cinco puntos distintos del bosque primario Macuya, cuya área comprende una superficie de 2469.07 hectáreas y está reservada a la Universidad Nacional de Ucayali (UNU). El bosque se encuentra localizado a 8°27'28.5" latitud sur y 74°53'44.33" longitud oeste y políticamente pertenece al distrito de Irazola, provincia de Padre Abad, departamento de Ucayali. El bosque se clasifica como un bosque muy húmedo premontano tropical (bmh-PT), se encuentra a una altura de entre 250 a 300 msnm, temperatura y humedad relativa media anual de 25°C y 85 por ciento y una precipitación pluvial anual de 2000 a 3000 mm.

En cada punto de muestreo se retiró la sobrecapa de materia vegetal y a partir de una profundidad de 20 cm se colectaron aproximadamente 1 kg de suelo con ayuda de una pala pequeña estéril. Con el propósito de retirar los residuos vegetales y rocosos las muestras se tamizaron, luego se dispensaron en bolsas plásticas de polipropileno y se almacenaron en frío (4 a 6°C) para transportarlo. Además, fueron registrados la temperatura y el pH del suelo en los diferentes puntos de muestreo.

3.2. AISLAMIENTO Y SELECCIÓN PRIMARIA DE CEPAS FÚNGICAS CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA

El aislamiento de hongos celulolíticos se realizó en base a la técnica de diluciones seriadas (Benson, 2002), para tal fin se pesaron 5 g de suelo de cada punto de muestreo, luego cada muestra se resuspendió en 45 ml de agua destilada estéril hasta obtener una solución homogénea (stock). A partir del stock se obtuvieron diluciones sucesivas de 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} las cuales fueron sembradas por incorporación en placas Petri con medio de aislamiento

selectivo que contenía Carboximetilcelulosa (CMC) 1 por ciento (p/v) y Xilosa 0.5 por ciento (p/v) ambos como fuentes de carbono e inductores; peptona, 1 g/L; levadura, 1 g/L; K₂HPO₄, 0.5 g/L; MgSO₄.7H₂O, 0.5 g/L; sales traza 0.1 por ciento (v/v) agar, 15 g/L, un pH de 5.5 y tetraciclina (100 µg/mL) después de autoclavar.

Las placas con las muestras se llevaron a incubar por 5 días a 28°C y al término del periodo de incubación se realizó el recuento de colonias (UFC). Una vez aisladas y seleccionadas, las cepas fúngicas se conservaron en tubos inclinados con PDA bajo condiciones de refrigeración a 4°C.

3.3. CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN GENÉRICA DE CEPAS AISLADAS

3.3.1. Identificación microscópica

Para este propósito se aplicó la técnica de microcultivo en lámina o cámara húmeda, que consiste en el cultivo de una pequeña muestra de esporas o micelio dentro de una placa Petri conteniendo un disco de papel filtro y una varilla de vidrio de “U” que soporta dos laminas porta y cubre objetos (Krug, 2004). El sistema preparado se incubó a temperatura ambiente (20 – 25° C) por 72 h, posteriormente las colonias fúngicas se examinaron en el microscopio de luz (10x-40x) y se tomaron fotos a escala de las estructuras vegetativas (hifas diferenciadas, ramificación del micelio, estructuras de reproducción) utilizando el programa Motic 2.0 ®. Estos resultados fueron comparados con claves taxonómicas internacionales (Barnett & Hunter, 1998).

3.3.2. Identificación macroscópica

Se observaron características macroscópicas de las cepas fúngicas a partir de colonias desarrolladas (72 h) en medio PDA. Se realizó la descripción del aspecto externo con ayuda de un estereoscopio (color, textura, secreciones, pigmentos, estructuras de conservación, etc.).

3.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA EN CONDICIONES NEUTROALCALINAS

3.4.1. Evaluación cualitativa de la actividad celulasa o selección secundaria

En base a la selección primaria, aquellas cepas desarrolladas en el medio de aislamiento selectivo se evaluaron en un segundo tamiz, cuya actividad celulolítica se observaron a través de la presencia de halos de hidrólisis (Teather & Wood, 1982). Para tal propósito, pequeñas cantidades de esporas fueron precultivadas en hoyos de una microplaca estéril (Elisa 96 pozos) con 150ul del medio de producción para microorganismos celulolíticos, cuya composición fue 0.14 por ciento NH_4SO_4 ; 0.2 por ciento KH_2PO_4 ; 0.03 por ciento $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.03 por ciento CaCl_2 ; 0.03 por ciento $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$; 0.1 por ciento elementos traza; 0.1 por ciento peptona; 0.1 por ciento extracto de levadura; 0.1 por ciento CMC y 1.5 por ciento agar. En tanto el control se determinó como aquellos hoyos con medio de producción sin esporas, luego las microplacas se llevaron a la incubadora de 28°C por 72 h. Una vez desarrolladas las colonias, el contenido de cada hoyo se retiró asépticamente y se colocaron sobre placas de vidrio (300cm²) con el medio de tamiz solidificado, el cual contiene 0.5 por ciento de CMC; 1.5 por ciento de agar disueltos en soluciones tampón al 0.05M de citrato (pH 4.8) y/o PBS (pH 7.4) y/o Barbitol-HCl (pH 8.4) y/o Glicina-NaOH (pH 9.4).

Las placas se sellaron herméticamente y se incubaron en baño María a 50°C durante 4 h; luego se añadieron 20 ml de la solución colorante Rojo Congo al 0.1 por ciento (p/v) y se dejó reposar por 15 min a temperatura ambiente. Para la visualización de las áreas de aclaramiento (hidrólisis enzimática) se lavaron las placas repetidas veces con una solución de NaCl 1M (Hendricks *et al.*, 1995, Bradner *et al.*, 1999, Zhang *et al.*, 2006). Finalmente se midió el diámetro total (cm) de las zonas claras formadas alrededor de los discos de agar; asumiendo que existe una relación directa entre el diámetro y la actividad celulolítica.

3.4.2. Evaluación cuantitativa de la actividad celulolítica

3.4.2.1. Producción de celulasas en un sistema de fermentación sumergida

De todas las cepas aisladas, se seleccionaron sólo aquellas que resultaron con diámetros de halos considerables (aproximadamente $> 1\text{cm}$), esto con el objetivo de determinar cuantitativamente la actividad celulolítica producida en un sistema de fermentación líquida. Previo a la producción de enzimas, las cepas seleccionadas se cultivaron por incorporación en matraces con PDA por 3 días a 28°C ; luego de este periodo, las esporas desarrolladas se resuspendieron en 10mL (aproximadamente) de solución Tween-80 al 0.1 por ciento (v/v) y se tomaron alícuotas para el conteo de esporas en la cámara de Neubauer hasta llegar a un total de 1×10^6 esporas/mL. Lograda la solución de esporas a la concentración adecuada, se agregó un volumen del 3 por ciento (v/v) a matraces de 125 mL con 70 mL de medio de producción que contenía: Lactosa y/o celulosa microcristalina, 10 g/L; KH_2PO_4 , 2 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.3 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3 g/L; Urea, 0.3 g/L; NH_2SO_4 1.4 mg/L, Tween 80, 2 ml/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 mg/L; $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,6 mg/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,4 mg/L; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 mg/L, a pH 5.5.

Todos los matraces inoculados se incubaron en baño María a 28°C a 175 rev/min durante 72 h y en tiempos sucesivos cada 24 h desde las 0 hasta las 120 h para la cinética con lactosa y desde 0 a 168 h para celulosa microcristalina con dos réplicas por muestra en todos los casos. Concluido el periodo de cultivo, el medio de producción conteniendo la biomasa y las enzimas extracelulares se separó por filtración en vacío.; mientras que la fracción soluble se colectó en tubos estériles y se conservaron a -20°C hasta realizar los ensayos bioquímicos para el análisis enzimático y para la determinación de proteínas solubles.

3.4.2.2. Ensayo de la actividad enzimática celulasa total y endoglucanasa

La actividad celulolítica se determinó utilizando el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959). Este método cuantifica colorimétricamente la cantidad de azúcares reductores liberados como producto de la acción enzimática. Para cuantificar la actividad celulasa total se utilizó la técnica de papel de filtro (Ghose, 1987; Adney, B & Baker J, 1996; Eveleigh *et al.*, 2009) que consiste en mezclar 0.5ml de la dilución enzimática (fracción soluble) y 1ml

de las soluciones tampón a 50mM (acetato de sodio (pH 4.8), barbital-HCl (pH 7.4 - 8.4) y glicina-NaOH (pH 9.4 – 10.4) con tiras de papel de filtro Whatman N°1 (1.0 cm x 6.0 cm) como sustrato. La reacción enzimática se incubó en baño María a 50°C por 60 min, al finalizar el periodo de incubación la reacción se detiene adicionando 3mL del reactivo DNS. Los tubos con la reacción se llevan a hervir por 5 min, rápidamente se enfrían en corriente de agua fría y se agregan 5mL de agua destilada. El contenido final se homogeniza y se lee a una absorbancia de 540nm. La actividad enzimática se expresó en unidades internacionales de papel filtro por mililitro, que se define como los miligramos de glucosa liberados en una hora. De otro lado, para determinar la actividad endoglucanasa se cuantificó la cantidad de azúcares reductores producidos a partir de la hidrólisis del sustrato carboximetilcelulosa (CMC) al 1 por ciento (p/v) (Ghose, 1987). Para este fin, se emplearon 0.5mL de la enzima y 1mL del sustrato CMC 1 por ciento, ambos diluidos en soluciones tampón de 50mM (pH 4.8-10.4). Luego la reacción enzimática se llevó a cabo a 50°C durante 30 min y en seguida se adicionaron 3 ml del reactivo ácido dinitrosalicílico (DNS) para llevar a ebullición por 5 min. Por último, la reacción colorimétrica se diluyó agregando 5mL de agua destilada para leerse a una absorbancia de 540nm. La actividad enzimática se expresará en unidades como la cantidad de enzimas requeridas para liberar 1µmol de glucosa reducida por minuto.

3.5. DETERMINACIÓN DE LA BIOMASA PRODUCIDA Y LAS PROTEÍNAS SOLUBLES

La biomasa producida en el cultivo con lactosa se recuperó en un papel filtro previamente pesado y se llevó a la estufa de secado a 85°C por 24 h, luego la cuantificación de biomasa se determinó por diferencia del peso seco. Por otro lado, la biomasa que se obtiene del cultivo con celulosa microcristalina se determinó indirectamente al calcular la proteína intracelular. Para tal fin, la biomasa se centrifugó a 3000 rev/min por 20 min y se llevó a la estufa de secado a 85°C por 24 h. La biomasa seca se pulverizó con nitrógeno líquido y el polvo se transfirió a tubos de centrífuga de 15mL. A continuación, se adicionaron 5mL del buffer de extracción (10mM Tris HCl pH8; 1mM EDTA, 2 por ciento (p/v) polivinilpolipirrolidona (PVPP)), la mezcla se homogenizó en el vortex y se centrifugó a 8000 rpm a 4°C por 15 min, luego el sobrenadante se colectó en microtubos de 1ml para la precipitación de proteínas (Villena et al., 2009).

La precipitación de proteínas se realizó siguiendo el método propuesto por Wessel y Flugge (Wessel and Flugge, 1984) en donde a las muestras se añadieron sucesivamente, metanol (4 volúmenes), cloroformo (1 volumen) y agua desionizada (3 volúmenes). Toda la combinación se centrifugó a 14000 rev/min a 4°C por 2 min, recuperándose la fase superior y evitando remover la interface, al recuperado se adicionaron 3 volúmenes de metanol seguida por una centrifugación a 14000 rev/min a 4°C por 2 min. Finalmente se descartó el sobrenadante y el pellet se secó al aire a temperatura ambiente por media hora aproximadamente, luego se resuspendió en una solución tampón fosfato salino (pH 7.4). La concentración de proteínas soluble e insoluble se determinaron por el método de Lowry *et al.*, 1951 usando Albúmina de Suero Bovino (BSA) como estándar.

3.6. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS SELECCIONADAS

Los ensayos de identificación molecular se realizaron para aquellas cepas que resultaron tener las mejores actividades celulolíticas, según el siguiente procedimiento:

3.6.1. Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN se realizó siguiendo el método propuesto por Möller *et al.* (1992) a partir de la biomasa producida en cultivo líquido con glucosa por 48 h en agitación a 28°C. Aproximadamente 100 mg de micelio fresco fue pulverizado en un mortero con nitrógeno líquido, la muestra pulverizada se colectó en un tubo de microcentrífuga de 2.0 ml, se agregaron 500ul de la solución TES (100Mm Tris, pH8.0, 10mM EDTA, 2 por ciento de SDS) y 2.5 ul de Proteinasa K (20.2 mg/ml), se mezcló vigorosamente en el vortex y se incubó por 1 hora a 60 °C. Posteriormente se adicionaron 140uL de NaCl 5 M y 65 uL de CTAB 10 por ciento, la mezcla fue homogenizada e incubada por 10 min a 65°C. Después se agregaron 700 uL de la solución SEVAG (Cloroformo: Isoamilalcohol, 24:1), se mezcló suavemente por inmersión y se incubó por 30 min a 0°C. Luego, la suspensión fue centrifugada a 15000 rpm durante 10 min a 4°C para separar el debris celular del contenido soluble, de este modo se recupera el sobrenadante (~ 500 uL) y se transfiere a un nuevo microtubo de 1.5 mL al cual se adicionó 225 uL de Acetato de Amonio 5 M, se mezcló suavemente y se dejó reposar en hielo por 1 hora aproximadamente, se centrifugó

nuevamente a 15000 rpm por 10 min a 4°C. El sobrenadante generado se transfirió a nuevo microtubo añadiéndosele 0.55 vol. de isopropanol (~510 uL), la mezcla fue suavemente homogenizada por inmersión y en seguida se centrifugó a 15000 rpm por 10 min para precipitar el ADN. Luego se retiró el sobrenadante, se agregaron 500uL de etanol frío al 70 por ciento y se centrifugó a máxima revolución durante 5 min en dos oportunidades. Los *pellets* de ADN se llevaron a secar a la cámara de flujo a temperatura ambiente y finalmente el ADN se resuspendió en 50uL de una solución TE y/o agua ultrapura. Opcionalmente la muestra de ADN se trató con 10uL de ARNasa (10 mg/mL) a 37°C por 5 min y se almacenó a -20°C.

3.6.2. Cuantificación y verificación de la calidad del ADN genómico

La concentración y grado de pureza de ADN extraído se determinó por espectrometría en un espectrofotómetro UV (SmartSpec Plus-BioRad). Con los datos de absorbancia a 260nm se calculó la concentración de ADN, mientras que el grado de pureza se determinó a partir de la relación 260/280nm cuyo rango aceptable es de 1.8 - 2.0.

3.6.3. Electroforesis de ADN

Para evaluar la calidad cualitativa del ADN extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa. Para tal efecto se disolvió agarosa al 1por ciento (p/v) en el *buffer* de corrida TAE (Tris-acetato 0.04 M y EDTA 0.001 M, pH 8.5). Antes de solidificar se agregó 1uL del stock de bromuro de etidio (10 ug/mL) y se colocó en una cámara de electroforesis horizontal (BioRad). Para colocar las muestras de ADN en los pozos, se tomaron 3 uL de ADN y se mezclaron con 1.5 uL de *buffer* de carga 6X (Loading dye), además se consideró utilizar el marcador de peso molecular de ADN lineal, Lambda HindIII como patrón estándar. Una vez colocado el sistema en la cámara se conectó a una fuente de poder y la corrida electroforética se realizó a 80 volt por 30 min. Finalmente, el gel se observó en el transiluminador de luz UV y se fotografiaron por medio del fotodocumentador (ChemiDoc™ XRS+System-BioRad).

3.6.4. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la identificación molecular de las cepas aisladas se utilizó la técnica de PCR, que consiste en amplificar exponencialmente fragmentos de un gen de la cadena doble de ADN gracias a la acción enzimática del ADN polimerasa. Se utilizó 100ng/ μ L de ADN como cadena molde y el par de cebadores ITS1 e ITS4 (Tabla 1) que reconocen la región de transcripción interna del ADN ribosomal (White *et al.*, 1990; Seifert, 2009; Bellemain *et al.*, 2010) y la enzima *Taq* ADN polimerasa.

Tabla 1: Secuencias de los cebadores ITS, usados para la identificación molecular de hongos nativos productores de celulasas neutroalcalinas.

Cebadores	Secuencia (5'--3')
ITS 1 (forward)	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS 4 (reverse)	TCCTCCGCTTATTGATATGC

Cada 50 μ L de reacción se preparó con la enzima *Gotaq* ADNpol (PROMEGA), 5U/ μ L; los cebadores ITS1 e ITS4, 10 μ M; dNTP's, 10mM; el *buffer taq*, 5X; MgCl₂, 25mM y ADN, 100ng. Los volúmenes y la concentración final de cada reacción se muestran en el Tabla 2.

Tabla 2: Componentes y volúmenes para la amplificación mediante PCR de la región ITS del ADN fúngico.

Reactivos	Volumen (μ L)	Concentración final
Buffer <i>taq</i> 5X	10	1X
MgCl ₂ 25mM	5	2.5
dNTP's 10mM	2.5	0.5
ITS1 10 μ M	1.0	0.2
ITS4 10 μ M	1.0	0.2
<i>Gotaq</i> ADNpol 5U/ μ L	0.375	
DNA 25ng/ μ L	4	
H ₂ O	26.125	
Volumen final	50	

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un termociclador S1000 (BioRad) con el siguiente protocolo: la desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, 25 ciclos

de denaturación a 95°C por 1 minuto, el alineamiento de los cebadores a 55°C por 1 min, la extensión a 72°C por 90 min y la extensión final a 72°C por 5 min. Luego los productos amplificados fueron verificados mediante electroforesis en 1 por ciento de agarosa.

3.6.5. Análisis del secuenciamiento de productos del PCR

La purificación y el secuenciamiento de los productos de PCR de las 11 cepas seleccionadas se realizaron en la empresa Macrogen Inc., Seoul, Korea del Sur (<http://www.macrogen.com>). Luego con el programa bioinformático BioEdit 7.0.9 y Sequencher v.4.8 (Genes Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA) se editaron y se construyeron las secuencias consenso para de los cebadores (ITS1 e ITS4), para tal propósito se evaluaron las identidades preliminares por comparación con las bases de los datos del NCBI GenBank (The National Center for Biotechnology Information U. S., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y la base de datos IDS (BOLD Identification System; <http://www.boldsystems.org>) para secuencias ITS considerándose solamente aquellas secuencias que resultan con un porcentaje de identidad mayor o igual al 98 por ciento. El alineamiento de estas secuencias, con las generadas en este trabajo, se realizó con el programa ClustalX 2.0.11. Para el análisis filogenético se utilizó el método de Neighbor-Joining (NJ) con 10000 iteraciones con el fin de determinar los valores de *bootstrap*. Asimismo, las distancias genéticas fueron calculadas por el modelo de Kimura 2-parámetros utilizando el programa Mega v 5.0 (Tamura *et al.*, 2011).

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados mediante el software Statgraphics Centurion XVI (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). Para evaluar el efecto de los factores (sustrato, pH y cepas), en el experimento se aplicó el método estadístico de análisis de varianza (ANOVA) bajo el diseño categórico multivariable, en donde la actividad enzimática (EG y/o APF) y la biomasa fueron las variables respuestas.

Luego, si el análisis estadístico demostró que existieron diferencias significativas por el efecto de los factores se usó la prueba de diferencias múltiples de Duncan. Finalmente, todos los análisis se realizaron con un nivel de confianza del 95 por ciento ($\alpha=0.05$).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. DATOS GENERALES DE LAS MUESTRAS DE SUELO

En el Tabla 3 se muestran las coordenadas de ubicación, temperatura y pH de las muestras de suelos colectados en el bosque primario Macuya-UNU (Ucayali-Perú). Las cinco muestras de suelo tuvieron en promedio una temperatura de 24.5°C y un pH que varió de 6.0 a 6.5.

Tabla 3: Resumen de datos de las coordenadas, temperatura y pH de cada muestra de suelo del bosque primario Macuya-UNU (Ucayali-Perú).

Suelo	Coordenadas de ubicación	Temperatura (°C)	pH
1	8°52'35.9'' S; 75°00'37.1'' O	24.4 ± 1,8	6.5 ± 0,1
2	8°52'39.6'' S; 75°00'29.7'' O	23.8 ± 2,2	6.5 ± 0,05
3	8°53'0.33'' S; 75°00'27.3'' O	24.2 ± 3,0	6.5 ± 0,2
4	8°53'14.1'' S; 74°59'31.9'' O	25.3 ± 1,3	6.0 ± 0,1
5	8°53'23.5'' S; 74°59'24.5'' O	24.9 ± 1,0	6.0 ± 0,1

Los valores de temperatura y pH, son promedios de tres réplicas ± desviación estándar (DS).

4.2. AISLAMIENTO Y SELECCIÓN PRIMARIA DE CEPAS FÚNGICAS CON ACTIVIDAD CELULOLÍTICA

A partir de las cinco muestras de suelo del bosque primario Macuya (Ucayali-Perú) se logró aislar un total de 50 colonias fúngicas diferentes según sus características morfológicas, las cuales fueron codificadas con las iniciales LMHP seguida por una enumeración. Debido a que el medio de aislamiento selectivo contenía CMC y xilosa como inductores y fuentes de carbono, existe la certeza de que las colonias desarrolladas poseen enzimas celulolíticas capaces de hidrolizar los sustratos complejos.

Se sabe que las mejores fuentes para la obtención de organismos productores de celulasa deseables, son aquellos hábitats ricos en sustratos celulósicos (Huang & Monk, 2004). Por ejemplo, las muestras de suelo de bosques destacan por presencia de residuos de plantas y otros componentes orgánicos (Sylvia, 2005), estos elementos influyen en el predominio de una comunidad microbiana capaz de degradar y utilizar estos sustratos (Tin & Chan, 2008). Además, de su amplia disponibilidad, facilidad de procesamiento y la rentabilidad también juega un papel importante para su selección.

Dentro de la diversidad microbiana del suelo, los hongos cumplen diversas funciones; estos incluyen roles activos, tales como la degradación de la materia vegetal muerta o roles inactivos en donde los propágulos se encuentran en estado de dormancia. Asimismo, una serie de estudios reportan a los hongos como los mejores descomponedores de la materia orgánica, tales como la celulosa y hemicelulosa (Lynd *et al.*, 2002; Da Silva *et al.*, 2003; Pfenning & Abreu, 2006). Por lo tanto, los suelos han sido los entornos preferidos para el aislamiento de hongos productores de celulasa (Lynd *et al.*, 2002). Dada la alta rotación de carbono en los suelos de la selva tropical y las características particulares de estos ambientes, es probable encontrar hongos con actividades celulasas diversas e interesantes en muestras de suelo del bosque primario Macuya (Pucallpa-Ucayali).

De otro lado, según Mueller *et al.*, (2004) el método de dilución en placa es una de las técnicas más rápidas y sencillas para estimar de la microcarga de los suelos; además, permite la enumeración y el aislamiento de un mayor número de hongos esporulantes en un medio selectivo. El Tabla N° 4, muestra el número total de colonias fúngicas aisladas mediante el método de dilución en placa en medio con CMC y xilosa. Los valores de las unidades formadoras de colonias (UFC) en las 5 muestras de suelo son similares ($4.5 - 7.0 \times 10^4$ UFC/g de suelo); sin embargo, estos resultados son altos en comparación a los reportados en otros lugares con diferentes tipos de suelos, lo que indica una alta actividad celulolítica sobre la biomasa vegetal. (Gochenaur, 1975; Mukerji, 1966; Varghese, 1972; Pfenning & Abreu, 2006).

Tabla 4: Recuento del número de hongos celulolíticos viables y seleccionados en cada muestra de suelo del bosque primario Macuya (Ucayali-Perú).

Muestra de suelo	UFC.g ⁻¹ *	Selección primaria'	Género (Número de colonias)
S1	4.5 x 10 ⁴	13	<i>Aspergillus</i> (1), <i>Byssochlamys</i> (1), <i>Fusarium</i> (1), <i>Penicillium</i> (5), <i>Trichoderma</i> (1), <i>Cladosporium</i> (2), no identificado (2)
S2	3.5 x 10 ⁴	8	<i>Acremonium</i> (1), <i>Alternaria</i> (1), <i>Penicillium</i> (2), <i>Trichoderma</i> (2), <i>Geotrichum</i> (1), no identificado (1).
S3	6.5 x 10 ⁴	17	<i>Aspergillus</i> (4), <i>Paecilomyces</i> (1), <i>Cladosporium</i> (1), <i>Mucor</i> (2), <i>Penicillium</i> (2), <i>Fusarium</i> (1), <i>Geotrichum</i> (1), no identificados (5)
S4	7.0 x 10 ⁴	6	<i>Penicillium</i> (3), <i>Trichoderma</i> (1), <i>Acremonium</i> (1), <i>chaetomium</i> (1)
S5	6.5 x 10 ⁴	6	<i>Aspergillus</i> (1), <i>Penicillium</i> (1), <i>Alternaria</i> (1), <i>Chrysonilia</i> (1), <i>Talaromyces</i> (1), no identificado (1)

(*) Unidad formadora de colonia por gramo de suelo.

(') Número total de cepas aisladas por cada muestra de suelo en medio selectivo (CMC y Xilosa) y que presentan diferencias morfológicas.

4.3. CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN GENÉRICA DE CEPAS AISLADAS

4.3.1. Identificación microscópica y macroscópica

La identificación inicial de las cepas fúngicas se hizo en base a la observación microscópica y a la descripción de las características de las colonias. De acuerdo a los criterios mencionados, se observaron con mayor frecuencia, colonias del género *Penicillium* (13) y *Aspergillus* (6), esto posiblemente por el diseño del medio y al corto periodo de incubación (Petrovic *et al.*, 2000; Khalid *et al.*, 2006); además se conoce que estos géneros son saprobios cosmopolitas y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza especialmente en el suelo. Sin embargo, los aislados se agruparon dentro de 14 géneros tales como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Acremonium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Paecilomyces*, *Chaetomium*, *Geotrichum*, *Byssochlamys*, *Talaromyces* y *Chrysonilia* (Tabla 4).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se puede confirmar que la mayoría de las cepas anteriormente mencionadas corresponden a la microcarga normal de los suelos de bosque tropical, además estos géneros se reportan como verdaderos productores de celulasas (Gautam *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2006).

Identificar con exactitud la diversidad de hongos presentes en una muestra de suelo no es tarea fácil; uno de los principales inconvenientes se debe a que hay una gran diversidad de especies que no prosperan usando métodos convencionales de prospección (Bridge and Spooner, 2001). De otro lado, la diversidad de los hongos en hábitats tropicales es un tema escasamente explorado; la mayoría de los estudios son trabajos pioneros y por lo general tienen una orientación regional y temática (Pfenning & Abreu, 2006). Asimismo, existen pocos reportes sobre la diversidad de hongos del suelo del Perú (Gochenauer, 1970), y particularmente en suelos de la selva amazónica del país.

Si bien se aislaron un total de 50 colonias fúngicas como potenciales productores de celulasas, sólo se seleccionaron 11 cepas que hidrolizan el sustrato celulósico en condiciones neutroalcalinas. Estas cepas se identificaron morfológicamente y corresponden a los géneros *Aspergillus* (4) y *Penicillium* (7) (figuras del anexo 1) distribuidos en los suelos S1, S2 y S3 según lo reportado en los Tablas 4 y 5. Lo anterior demuestra que no sólo la distribución en el suelo influye en el porcentaje de incidencia o frecuencia de aparición, sino también las diversas características fúngicas como, la esporulación, tasa de crecimiento, el sistema enzimático, los requerimientos nutricionales y la toleración a diversas condiciones de estrés, los que hacen en última instancia ser los responsables del porcentaje de aparición de los microorganismos en un ecosistema (Khalid *et al.*, 2006).

Tabla 5: Descripción de las características morfológicas, según la clave taxonómica de Barnett y Hunter (1998), de once cepas fúngicas nativas del suelo de bosques primarios Macuya (Ucayali-Perú) seleccionados por su capacidad de producir celulasas neutroalcalinas.

Muestra de suelo (Selección secundaria'')	Género (código)	Características de la colonia	Características de las estructuras sexuales (conidióforo, fiálides y conidios)
S1 (3)	<i>Penicillium</i> (LMHP14)	Crecimiento lento, colonia de aspecto flocoso y algodonoso, micelio de color blanco (hifa vegetativa) a amarillo pastel. Incrustaciones de gránulos color naranja en las hifas (coloración característica en el reverso). Escasa o moderada presencia de estructuras conidiales.	Conidióforos que emergen de hifas sumergidas y de color verde oscuro. Penicilios biverticilados. Conidio elipsoidal, de aspecto liso, de hialino a verdoso.
	<i>Penicillium</i> (LMHP43)	Colonia de crecimiento lento, micelio de color amarillo intenso y en los bordes amarillo claro (hifa vegetativa). En el centro acumulación de conidios de color verde oscuro y textura pulverulenta, extremo de aspecto algodonoso.	Conidióforos cortos. Penicilios monoverticilados. Fiálides estrechas entre sí. Métulas ensanchadas. Conidios grandes, elípticos de color verde oscuro, formados en cadenas.
	<i>Aspergillus</i> (LMHP44)	Colonias de color marrón, aspecto granular y densa. Micelio blanco. Presencia de estructuras escleróticas.	Conidióforos uniseriados de color marrón, sin métula. Fiálides medianas que cubren a toda la superficie de la vesícula globosa. Los conidios son esféricos o elipsoidales, con textura rugosa.
S2 (2)	<i>Penicillium</i> (LMHP37)	Colonias de crecimiento lento, con conidios de color verde gris y micelio amarillo-naranja. El reverso toma rápidamente color rojo. Hifas gruesas con granos de pigmento naranja.	Penicilios monoverticilados. Conidios pequeños, globosos y lisos dispuestos en cadenas sobre las fiálides.
	<i>Penicillium</i> (LMHP21)	Colonia de textura algodonosa y blanca en los bordes. Conidios de color verde gris. Reverso amarillo-crema.	Presentan conidióforos cortos y se dividen en 2 o 3 ramas. Penicilios monoverticilados. Fiálides cortas de donde nacen conidios divergentes de forma globular y de color verde.

Continuación...

S3 (6)	<i>Paecilomyces</i> (LMHP06)	Colonia inicialmente de color blanco hasta alcanzar un rosa pálido. Micelio aéreo, denso, de textura algodonosa, flocosa y pulverulenta. Reverso de color blanco hasta tonos lila.	Conidióforos ramificados, en cuyos extremos se desarrollan grupos de fiálides. Fiálides largos, fusiformes y hialinos. Conidios pequeños y hialinos, agrupados en largas cadenas, unicelulares, elipsoidales y lisos.
	<i>Penicillium</i> (LMHP19)	Colonias de crecimiento lento, con conidios de color verde gris y micelio amarillo-naranja. El reverso toma rápidamente color rojo. Hifas gruesas con granos de pigmento naranja.	Penicilios monoverticilados. Conidios pequeños, globosos y lisos dispuestos en cadenas sobre las fiálides.
	<i>Aspergillus</i> (LMHP29)	Colonias de crecimiento lento, de color crema. Reverso de color amarillo y centro de color café. Hifa de aspecto algodonoso y color blanco.	Los conidióforos parten del micelio sumergido. Conidios esféricos y lisos. Vesícula globosa cubierta de fiálides estrechas.
	<i>Aspergillus</i> (LMHP32)	Colonia blanca, algodonosa, radiada con segmentos verdosos.	Conidióforos ordenados verticalmente con terminación globosa. Presenta fiálides en todo el ápice (superficie globosa), de donde se generan conidias grandes, esféricos y semirugosos.
	<i>Penicillium</i> (LMHP33)	Crecimiento con aspecto aterciopelado de color verde, con borde de color amarillo-naranja.	Conidióforos largos de paredes lisas. Penicilios monoverticilados. Conidios globosos, lisos dispuestos en cadenas sobre las fiálides.
	<i>Aspergillus</i> (LMHP34)	Colonia de color negro, aspecto denso y granular. Micelio de color amarillo claro en el centro y extremos blancos, aspecto veloso y elevado.	Conidióforos biseriados y vesícula esférica. Métulas y fiálides dispuestas radialmente cubriendo toda la vesícula. Conidios en cadenas, pardos oscuros, rugosos y esféricos.

(") Número de cepas seleccionadas en medio de tamiz con CMC bajo condiciones neutroalcalinas y que presentan diferencias morfológicas.

4.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULASA EN CONDICIONES NEUTROALCALINAS

4.4.1. Evaluación cualitativa de la actividad celulolítica o selección secundaria.

La evaluación cualitativa de la actividad celulolítica de los hongos aislados se realizó en diferentes pH (4.8; 7.4; 8.4 y 9.4), en base al diámetro de halos hidrolíticos en un medio con CMC teñidos con Rojo Congo. Muchos de los aislados fúngicos mostraron actividad celulolítica incluso a pH 9.4. Sin embargo, de las 50 cepas aisladas, sólo se seleccionaron 11 los cuales presentaron diámetros de halos mayores a 1.0 cm en todo el rango de pH evaluado (ver Tabla N° 6 y figuras del Anexo 2). Así, las cepas LMHP14; LMHP32; LMHP33, LMHP34, LMHP37 y LMHP43 destacaron con diámetros de halos de entre 1.2 y 1.5 cm.

Aunque este ensayo nos revela cualitativamente la actividad celulolítica, brinda una relación directa con los ensayos de producción en cultivos líquidos y por lo tanto resulta útil para la detección rápida de grandes números de colonias de hongos en diversas condiciones (Teather & Wood, 1982; Montenecourt & Eveleigh, 1977, Ten *et al.*, 2004).

Las 11 cepas seleccionadas como potenciales productores de celulasas neutroalcalinas fueron identificadas dentro de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, posiblemente debido al procedimiento empleado; ya que, estos hongos crecen rápidamente y son altamente esporulantes. De acuerdo con los resultados, estudios previos han reportado algunos representantes de estos géneros, aislados de suelos, y que presentan enzimas alcalófilas (Sandhu & Sing, 1981; Picart *et al.*, 2007; Dutta *et al.*, 2007).

Tabla 6: Evaluación cualitativa de la actividad de endoglucanasa de hongos aislados y seleccionados de suelos del bosque Macuya (Ucayali-Perú) expresada en halos hidrolíticos (cm).

Cepa	pH 4.8	pH 7.4	pH 8.4	pH 9.4
LMHP06	1.2 ± 0.07	1.1 ± 0.07	1.2 ± 0.07	1.3 ± 0.00
LMHP14	1.4 ± 0.00	1.2 ± 0.04	1.4 ± 0.04	1.3 ± 0.14
LMHP19	1.2 ± 0.04	0.9 ± 0.07	1.2 ± 0.00	1.1 ± 0.04
LMHP21	1.3 ± 0.00	1.0 ± 0.00	0.9 ± 0.00	1.4 ± 0.04
LMHP29	1.0 ± 0.00	1.0 ± 0.00	1.1 ± 0.14	1.1 ± 0.07
LMHP32	1.4 ± 0.00	1.4 ± 0.00	1.5 ± 0.00	1.5 ± 0.00
LMHP33	1.2 ± 0.07	1.1 ± 0.00	1.2 ± 0.00	1.3 ± 0.07
LMHP34	1.3 ± 0.07	1.4 ± 0.00	1.6 ± 0.04	1.5 ± 0.00
LMHP37	1.3 ± 0.00	1.3 ± 0.00	1.3 ± 0.00	1.4 ± 0.07
LMHP43	1.0 ± 0.00	1.2 ± 0.00	1.4 ± 0.00	1.4 ± 0.00
LMHP44	0.0 ± 0.00	1.0 ± 0.00	1.3 ± 0.00	1.3 ± 0.0

Los valores representan el promedio de cuatro réplicas ± (DS)

4.4.2. Evaluación cuantitativa de la actividad celulolítica (celulasa total y endoglucanasa).

4.4.2.1. Producción de enzimas celulolíticas en un sistema de cultivo sumergido con lactosa o celulosa microcristalina

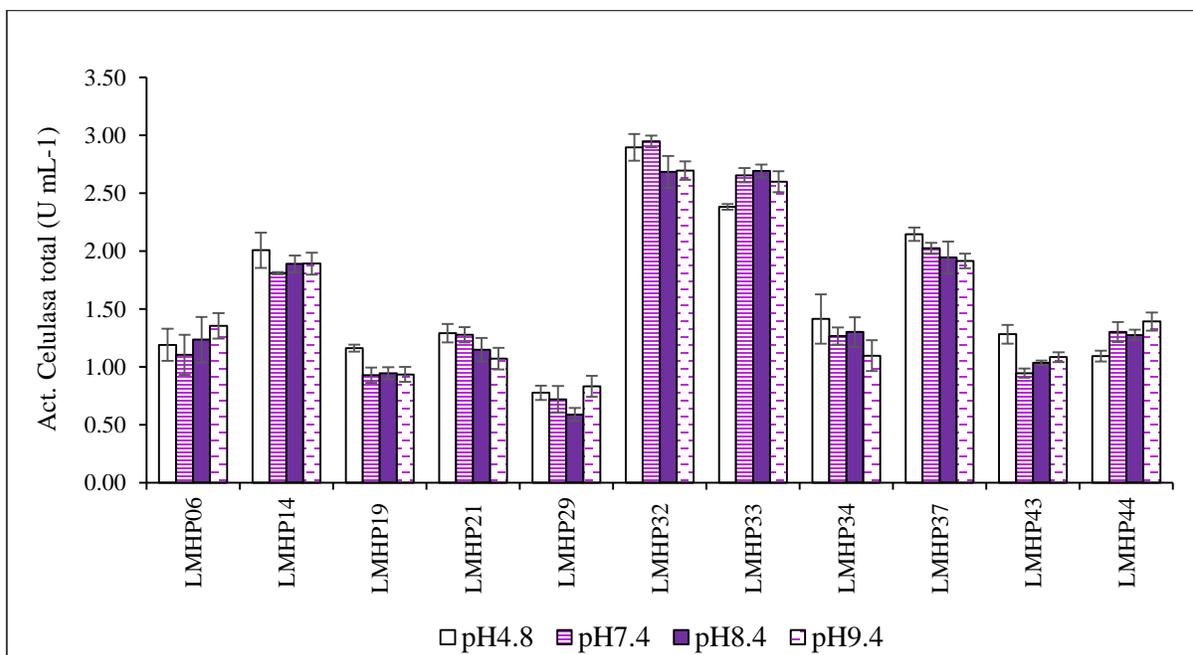
Con el fin de determinar cuantitativamente la capacidad de producción de enzimas celulolíticas de las 11 cepas seleccionadas, se realizaron cultivos con agitación en medio líquido con lactosa o celulosa microcristalina como fuentes de carbono por 72 h a 28 °C.

Al evaluarse las actividades enzimáticas (celulasa total y endoglucanasa) se observó que todas las cepas producen títulos enzimáticos a pH neutroalcalinos, sugiriendo que estos microorganismos podrían ser verdaderos productores de celulasas alcalinas. Además, muchos de ellos tenían actividades enzimáticas superiores cuando fueron cultivados en medio con lactosa en comparación con celulosa microcristalina (figuras 4(a, b) y 5(a, b)).

Los resultados de la actividad celulasa total de los cultivos con lactosa muestran que las cepas LMHP14, LMHP32, LMHP33 y LMHP37 fueron los mayores productores enzimáticos ($> 1.5 \text{ U mL}^{-1}$) a los pH evaluados; mientras que LMHP19 y LMHP29 reportan actividades por debajo de 1.0 U mL^{-1} (figura 4(a)). Del mismo modo, los resultados para de actividad endoglucanasa, también indican que las cepas LMHP32, LMH33 y LMHP37 destacan con valores de $0.913 \pm 0.159 \text{ U mL}^{-1}$, $0.924 \pm 0.104 \text{ U mL}^{-1}$ y $0.973 \pm 0.085 \text{ U mL}^{-1}$ a pH 9.4 respectivamente (figura 5(a)).

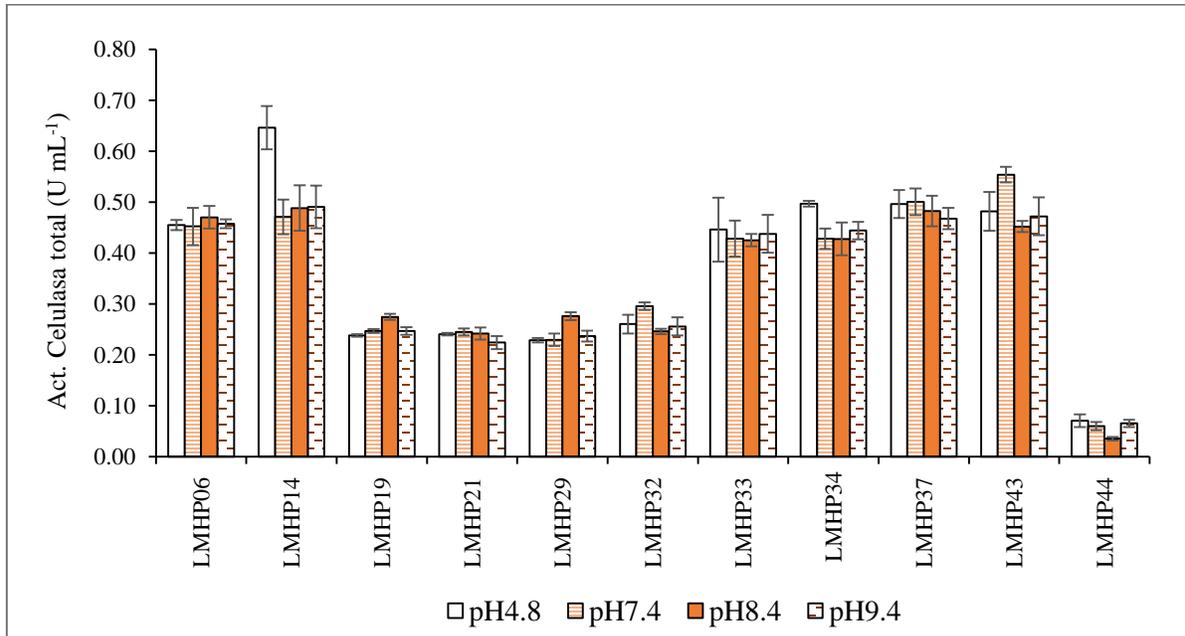
En contraste, la mayoría de las cepas crecidas con celulosa microcristalina no superaron las 0.550 U mL^{-1} para la actividad celulasa total (figura 4(b)), ni los 0.200 U mL^{-1} para endoglucanasa en los mismos pH (figura 4(a)). Luego, las cepas LMHP19, LMHP21 y LMHP29 tuvieron los valores más bajos para celulasa total ($< 0.300 \text{ U mL}^{-1}$) e incluso no se detectaron actividades endoglucanasa en ninguno de los pH probados.

Figura 4(a): Comparación de la actividad de celulasa total evaluada a cuatro pH de 11 cepas fúngicas nativas del suelo del bosque primario Macuya (Ucayali-Perú) cultivadas en sumergido con lactosa.



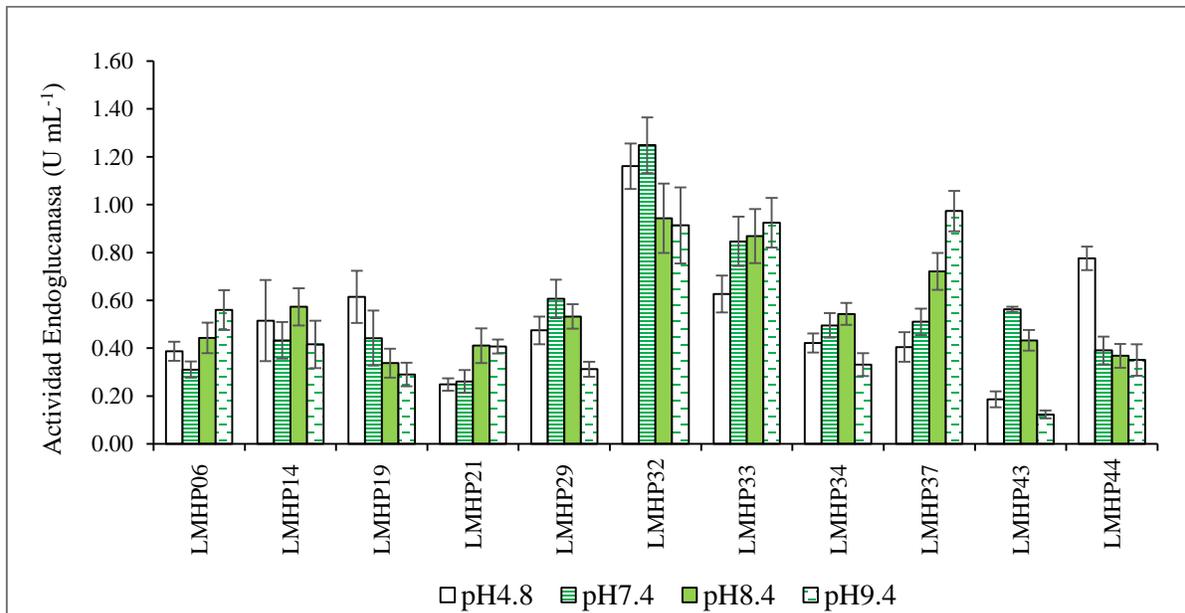
Barras sobre el gráfico representa la DS de cuatro réplicas.

Figura 4(b): Comparación de la actividad celulasa total evaluada a diferente pH de 11 cepas fúngicas nativas del suelo del bosque primario Macuya (Ucayali-Perú) cultivadas en sumergido con celulosa microcristalina.



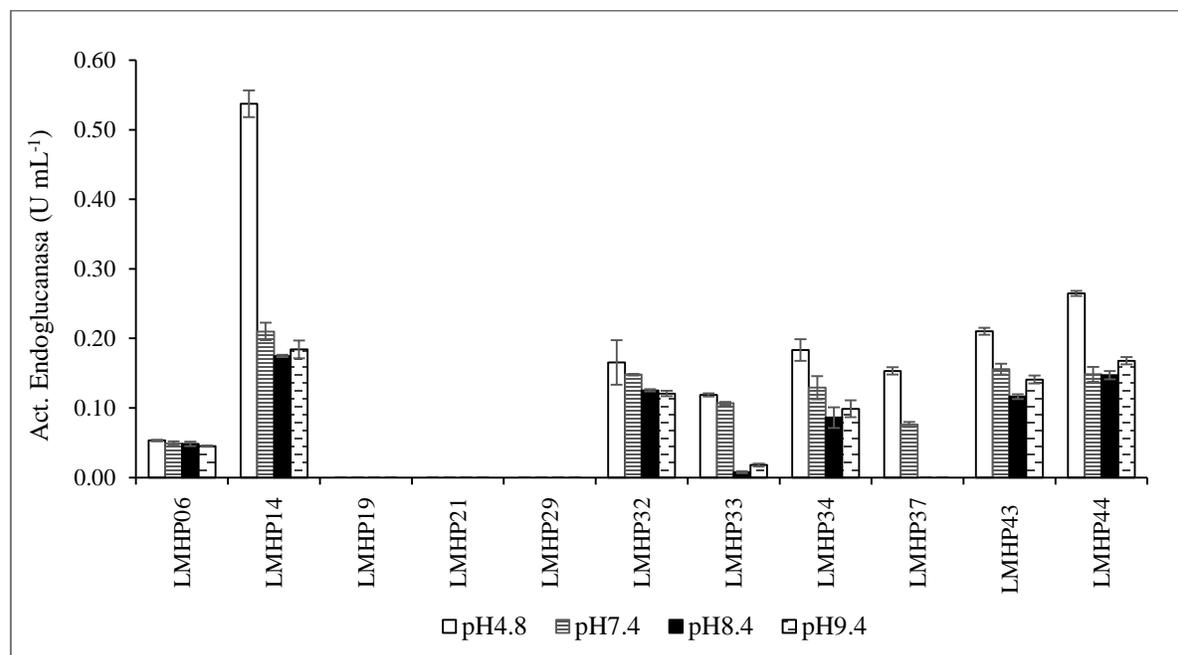
Barras sobre el gráfico representa la DS de cuatro réplicas.

Figura 5(a): Comparación de la actividad de endoglucanasa evaluada a diferentes pH de 11 cepas fúngicas nativas del suelo del bosque primario Macuya (Ucayali-Perú) cultivadas en sumergido con lactosa.



Barras sobre el gráfico representa la DS de cuatro réplicas.

Figura 5(b): Comparación de la actividad de endoglucanasa evaluada a diferente pH de 11 cepas fúngicas nativas del suelo de bosque primario Macuya (Ucayali-Perú) cultivadas en sumergido con celulosa microcristalina.



Barras sobre el gráfico representa la DS de cuatro réplicas.

Las diferencias de los valores enzimáticos presentados pueden explicarse por la relación que existe entre el periodo de incubación del experimento (72 h) y el tipo de sustrato, pues la celulosa microcristalina al ser un sustrato insoluble requeriría un mayor tiempo de crecimiento para su degradación y consumo total. En relación a esto, los estudios sugieren que la formación de celulasas es dependiente de la inducción de disacáridos derivados de la celulosa, pero también de otros carbohidratos que inducen la expresión de celulasas en varias especies de hongos (Sehnem *et al.*, 2006; Seiboth *et al.*, 2007; Kubicek *et al.*, 2009). Efectivamente, autores como Kathiresan y Manivannan (2006) precisan que la lactosa tiene un efecto de inducción sobre la producción de celulasas y en relación a esta información el costo de producción de estas enzimas resultaría eficaz al utilizar este sustrato.

Con el fin de determinar si los factores cepa, pH y fuente de carbono influyen en las actividades celulolíticas, se realizó un diseño estadístico categórico multifactorial. Los resultados que se muestran en las figuras 6(a) y (b) indican que el pH no afecta significativamente la actividad celulasa, corroborando que todas las cepas son verdaderos productores de celulasa; y además el factor cepa y fuente de carbono, como se esperaba, son

los factores más importantes. De otro lado, el gráfico del análisis multivariable indica que tanta lactosa y las cepas LMHP32, LMHP33, y LMHP37 resultan ser el mejor sustrato y las mejores cepas para la producción de celulasa total y endoglucanasa con actividad alcalina.

Figura 6 (a): Efecto de la fuente de carbono sobre la actividad celulasa total a diferente pH de 11 cepas fúngicas nativas del suelo de bosque primario Macuya (Ucayali-Perú).

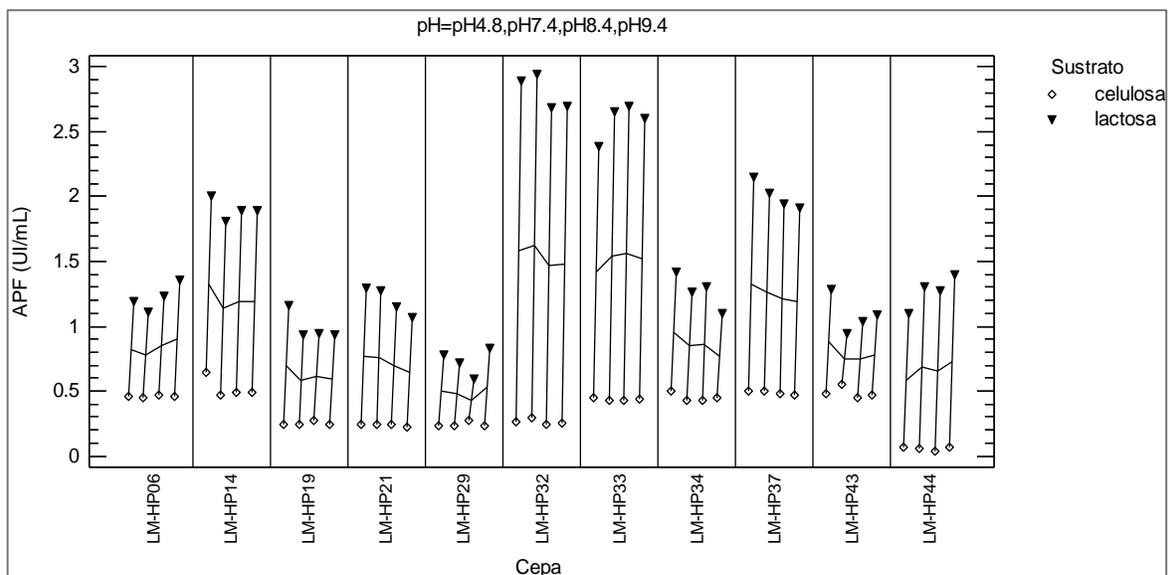
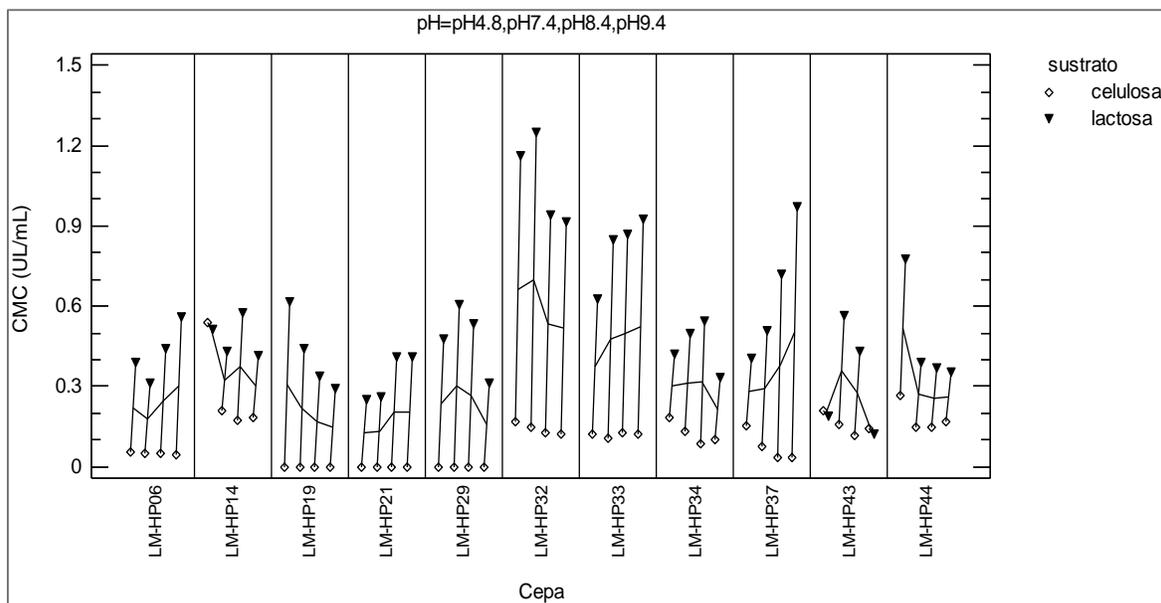


Figura 6 (b): Efecto de la fuente de carbono sobre la actividad endoglucanasa a diferente pH de 11 cepas fúngicas nativas del suelo de bosque primario Macuya (Ucayali-Perú).



4.4.2.2. Determinación de la biomasa producida y proteína total

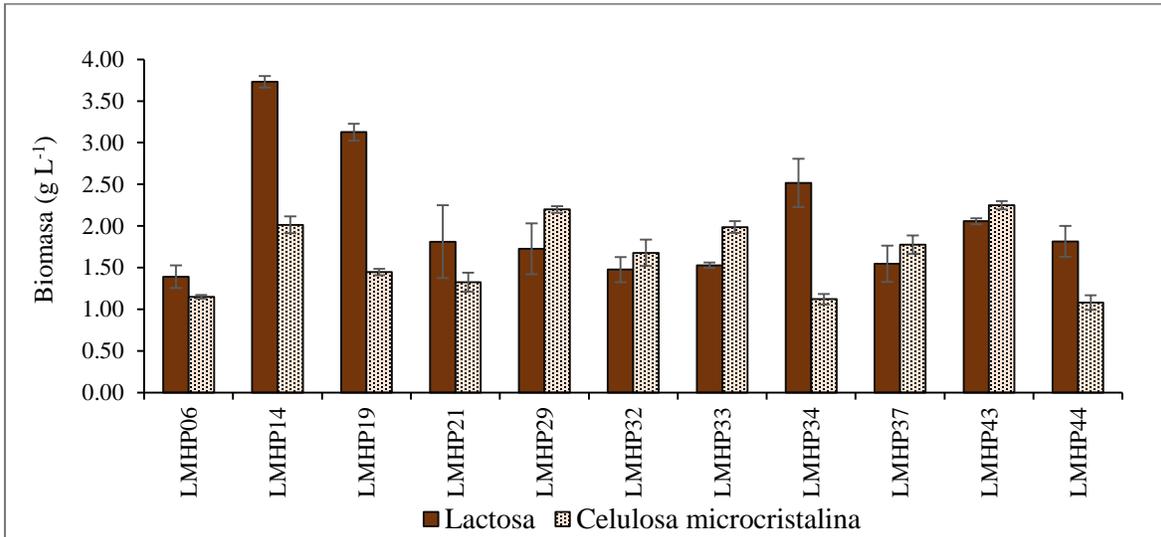
En general, los resultados de la tasa de crecimiento de las cepas muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) presentándose un mejor crecimiento en lactosa que en celulosa microcristalina durante las 72 h de cultivo (Figura 7), así la cepa LMHP14 alcanzó el nivel más alto de biomasa en ambos medios de cultivo ($3.73 \pm 0.04 \text{ gL}^{-1}$ en lactosa y $2.01 \pm 0.01 \text{ gL}^{-1}$ en celulosa microcristalina) y LMHP06 el valor más bajo ($1.39 \pm 0.08 \text{ gL}^{-1}$ en lactosa y $1.15 \pm 0.02 \text{ gL}^{-1}$ en celulosa microcristalina) como se observa en el Tabla 7. De igual manera, la producción de proteína extracelular es mayor en lactosa que en celulosa para la mayoría de las cepas, excepto para LMHP06 y LMHP14 que resultaron con valores de $0.279 \pm 0.002 \text{ mg mL}^{-1}$ y $0.207 \pm 0.001 \text{ mg mL}^{-1}$ respectivamente (Figura 8).

Tabla 7: Comparación de la producción de biomasa y proteína secretada en cultivo sumergido con lactosa y celulosa microcristalina durante 72 h de 11 cepas aisladas del suelo del bosque primario Macuya (Ucayali-Perú).

Cepas	Biomasa (gL^{-1})		Proteína extracelular (mg mL^{-1})	
	Lactosa	Celulosa microcristalina	Lactosa	Celulosa microcristalina
LMHP06	1.39 ± 0.08^a	1.15 ± 0.02^b	0.25 ± 0.01^f	0.28 ± 0.00^g
LMHP14	3.73 ± 0.04^g	2.01 ± 0.01^e	0.14 ± 0.01^b	0.21 ± 0.00^f
LMHP19	3.13 ± 0.06^f	1.45 ± 0.00^c	0.16 ± 0.00^d	0.07 ± 0.00^c
LMHP21	1.81 ± 0.25^b	1.33 ± 0.00^b	0.17 ± 0.01^d	0.11 ± 0.00^e
LMHP29	1.73 ± 0.18^a	2.20 ± 0.00^f	0.19 ± 0.01^e	0.09 ± 0.00^d
LMHP32	1.48 ± 0.09^a	1.68 ± 0.00^d	0.15 ± 0.00^c	0.05 ± 0.00^b
LMHP33	1.53 ± 0.02^a	1.99 ± 0.00^e	0.13 ± 0.00^a	0.11 ± 0.01^e
LMHP34	2.52 ± 0.17^c	1.12 ± 0.00^a	0.14 ± 0.01^c	0.07 ± 0.01^c
LMHP37	1.55 ± 0.13^a	1.77 ± 0.00^d	0.13 ± 0.01^a	0.02 ± 0.00^a
LMHP43	2.06 ± 0.02^c	2.25 ± 0.00^g	0.18 ± 0.01^e	0.12 ± 0.00^e
LMHP44	1.82 ± 0.11^d	1.08 ± 0.00^a	0.13 ± 0.01^a	0.07 ± 0.00^c

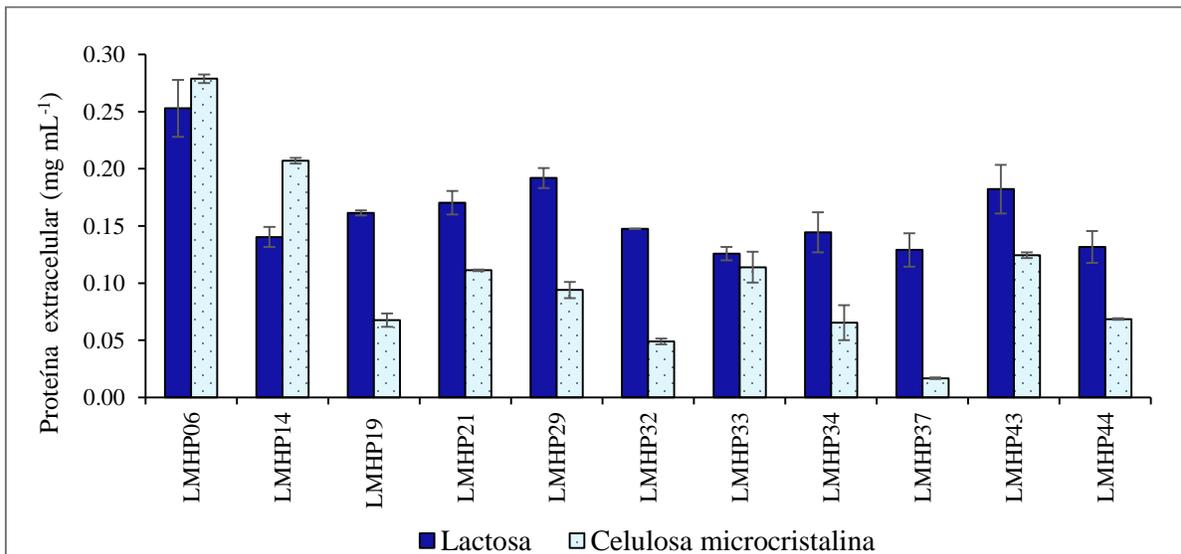
Los valores representan el promedio de cuatro repeticiones \pm SD. Las medias con las mismas letras dentro de una fila no son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Los datos fueron evaluados por la prueba de ANOVA y de Duncan.

Figura 7: Biomasa producida en cultivo sumergido con lactosa y celulosa microcristalina de 11 cepas fúngicas nativas del suelo de bosque primario Macuya (Ucayali-Perú).



Barras de error a partir de cuatro réplicas.

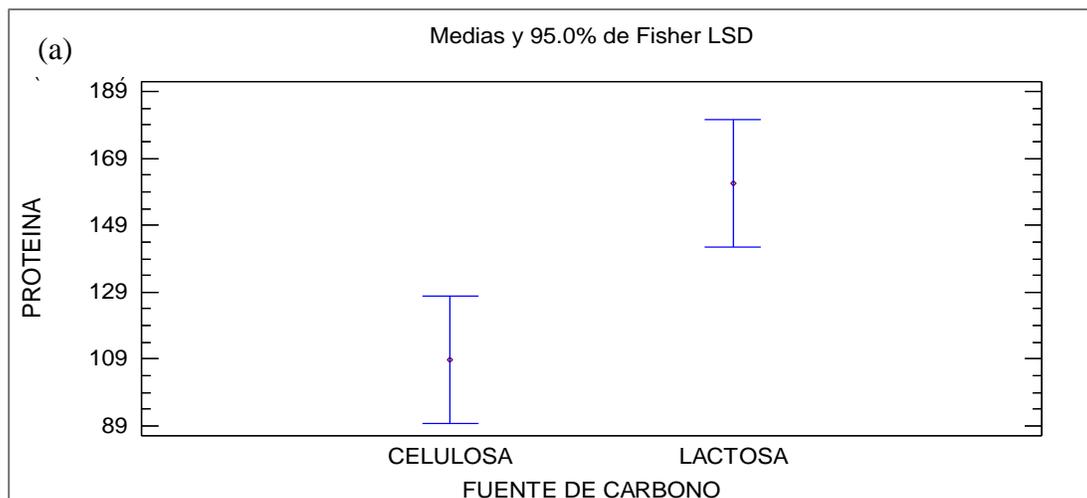
Figura 8. Proteína extracelular producida en cultivo sumergido con lactosa y celulosa microcristalina de 11 cepas fúngicas aisladas del suelo de bosque primario Macuya (Ucayali-Perú).



Barras de error a partir de cuatro réplicas.

Estos resultados se corroboran con los estudios de Pakula (2005) y Karaffa (2006), quienes indican que la expresión de enzimas celulolíticas durante el crecimiento con lactosa, resulta ser un proceso dependiente de la tasa de crecimiento; es decir que el mayor nivel de expresión de celulasas se encuentra a bajas tasas de crecimiento, principio ampliamente utilizado en la producción industrial de celulasas. De otro lado, la producción de proteína extracelular se encuentra afectada significativamente por la fuente de carbono y tipo de cepa (figuras 9a, 9b y 9c) con un nivel de significancia del 95 por ciento, encontrándose dos grupos para la fuente de carbono y tres grupos para el tipo de cepa. Sin embargo, no se encontró diferencias estadísticas para la producción de la biomasa por el efecto del sustrato y tampoco por el tipo de cepa (figuras 10a, 10b y 10c).

Figura 9: Gráfica de efecto de la fuente de carbono y tipo de cepa sobre la producción de proteína extracelular. (a) Efecto de la fuente de carbono; (b) efecto de la cepa; (c) gráfica multivariable.



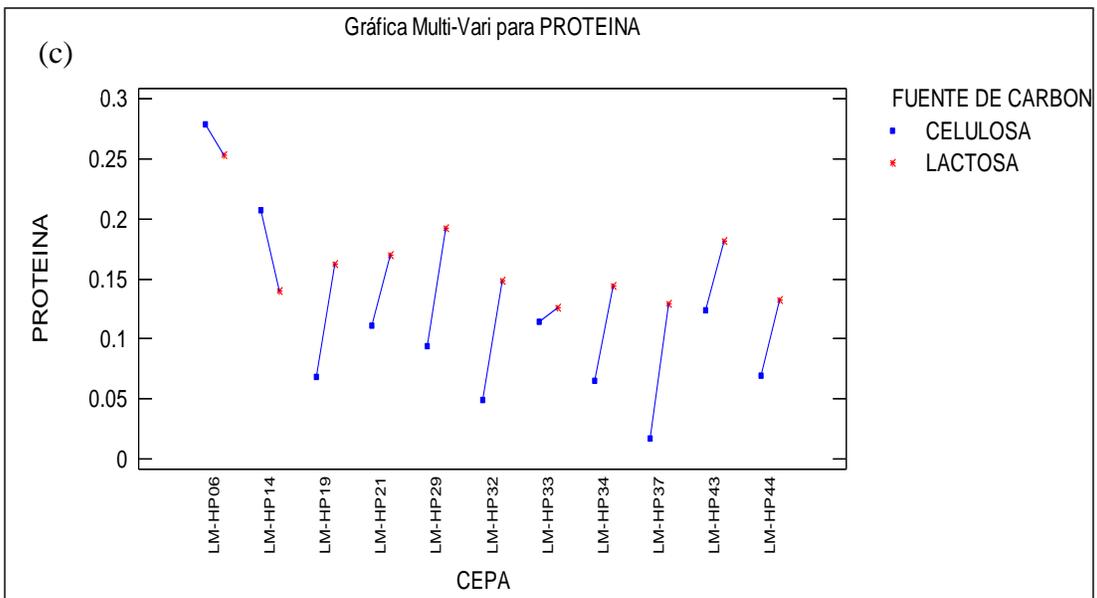
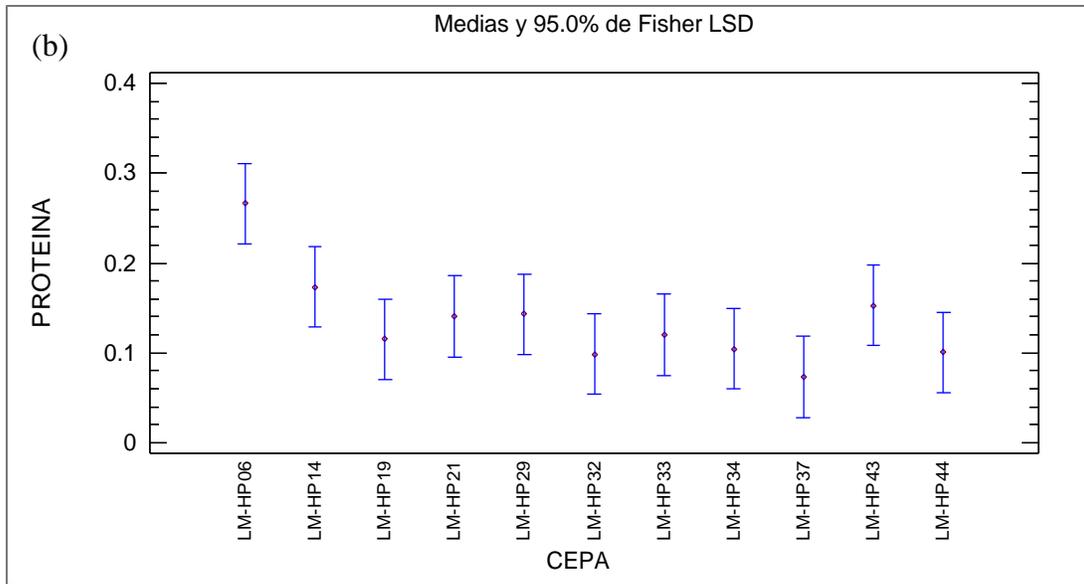
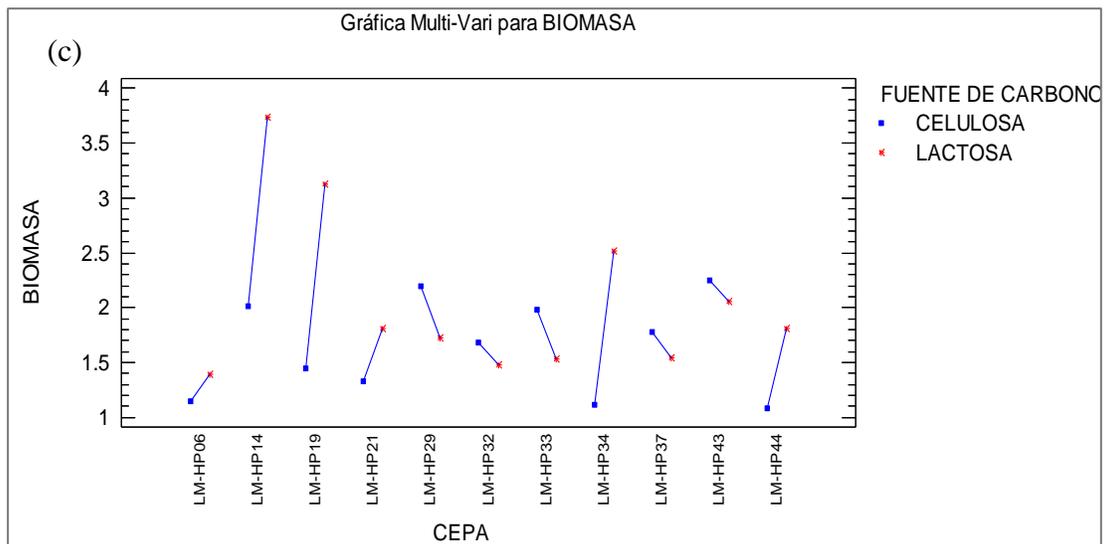
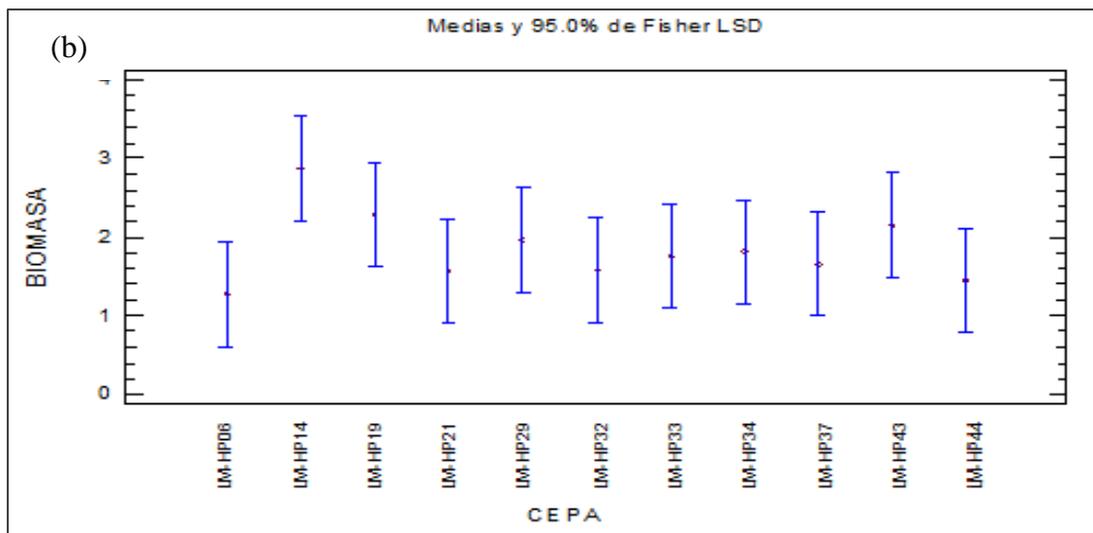
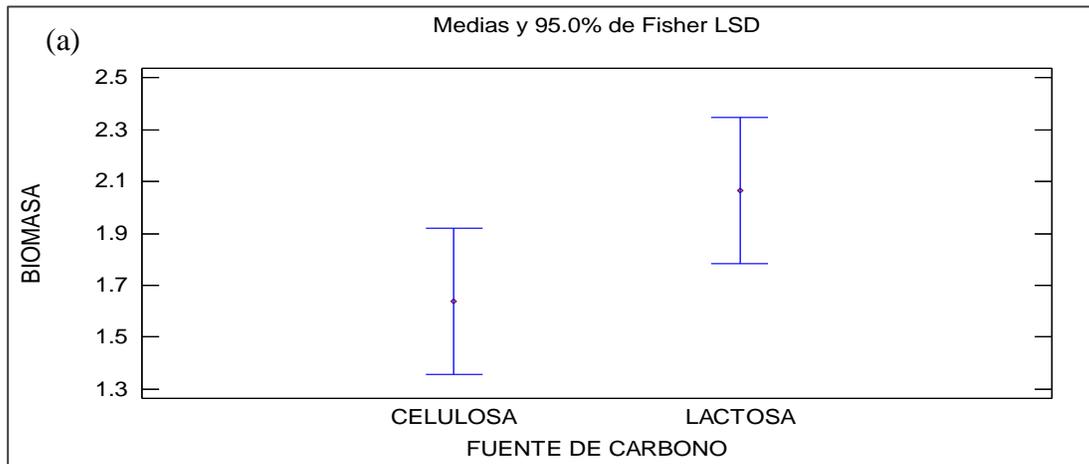


Figura 10: Gráfica de efecto de la fuente de carbono y tipo de cepa sobre la producción de biomasa. (a) Efecto de la fuente de carbono; (b) efecto de la cepa; (c) gráfica multivariable.



A partir de los resultados mostrados se determina que las productividades específicas, tanto para la celulasa total y endoglucanasa, fueron más altos en lactosa que en celulosa microcristalina (Tabla 8). En este sentido, las cepas LMHP32, LMHP33, y LMHP37 han demostrado ser adecuados para la producción de celulasa alcalinas, ya que tienen productividades específicas superiores, siendo este un parámetro importante a nivel industrial.

En los Tablas 9 y 10 se muestran los parámetros de productividades de celulasa total y endoglucanasa respectivamente a pH 4.8 y 9.4 de las 11 cepas seleccionadas y cultivadas con lactosa, en donde los rendimientos ($Y_{APF/x}$, $Y_{EG/x}$, $Y_{APF/prot}$, $Y_{EG/prot}$) y las productividades volumétricas (Γ_{APF} y Γ_{EG}) fueron estimados a partir de la biomasa y la proteína soluble a las 72 h. De igual modo, los resultados demuestran que, para ambas actividades, los rendimientos fueron mayores para las cepas LMHP32, LMHP33 y LMHP37 incluso a pH 9.4; sin embargo, las productividades para celulasa total fueron 3,0; 2,8 y 2,0 veces mayores, respectivamente, en comparación con la actividad de endoglucanasa. Asimismo, se observó que la productividad volumétrica presenta el mismo comportamiento para las mismas cepas y en las mismas proporciones. En el caso de las cepas LMHP33 y LMHP37 reportados como posibles integrantes del género *Penicillium*, presentan concentraciones de proteínas que se correlacionan con una alta actividad celulasa total y endoglucanasa y por lo tanto un rendimiento de $Y_{APF/prot}$ y $Y_{EG/prot}$ de 1,39 y 2,34 Umg^{-1} de proteína respectivamente que es significativamente más alta que lo reportado por otras cepas de *Penicillium sp.* (Jorgensen et al., 2005; Jorgensen & Olsson, 2006; De Castro et al., 2010).

Tabla 8: Productividad específica de la actividad celulasa total y endoglucanasa a diferente pH a partir de cultivo sumergido con lactosa de 11 cepas fúngicas aisladas y seleccionadas de suelos del bosque Macuya (Ucayali-Perú).

Cepa	Productividad específica (U g ⁻¹ h ⁻¹)							
	pH4.8		pH7.4		pH8.4		pH9.4	
	APF	EG	APF	EG	APF	EG	APF	EG
LMHP06	11.9 ± 1.4	3.9 ± 0.4	11.0 ± 1.5	3.1 ± 0.3	12.3 ± 1.9	4.4 ± 0.6	13.5 ± 1.1	5.6 ± 0.8
LMHP14	7.5 ± 0.6	1.9 ± 0.6	6.7 ± 0.5	1.6 ± 0.3	7.0 ± 0.3	2.1 ± 0.3	7.0 ± 0.4	1.6 ± 0.4
LMHP19	5.2 ± 0.1	2.7 ± 0.5	4.1 ± 0.3	2.0 ± 0.5	4.2 ± 0.2	1.5 ± 0.3	4.2 ± 0.3	1.3 ± 0.2
LMHP21	10.0 ± 0.6	1.9 ± 0.2	9.8 ± 0.5	2.0 ± 0.6	8.8 ± 0.8	3.2 ± 0.6	8.2 ± 0.7	3.1 ± 0.2
LMHP29	6.3 ± 0.5	3.8 ± 0.5	5.8 ± 0.7	4.9 ± 0.8	4.7 ± 0.5	4.3 ± 0.4	6.7 ± 0.7	2.5 ± 0.3
LMHP32	27.3 ± 1.1	10.9 ± 0.9	27.7 ± 0.8	11.8 ± 0.6	25.3 ± 1.3	8.9 ± 1.4	25.4 ± 0.8	8.6 ± 1.5
LMHP33	21.7 ± 0.2	5.7 ± 0.7	24.1 ± 1.4	7.7 ± 1.3	24.5 ± 0.5	7.9 ± 1.0	23.6 ± 0.8	8.4 ± 0.9
LMHP34	7.8 ± 1.2	2.3 ± 0.2	7.0 ± 0.9	2.7 ± 0.3	7.2 ± 0.7	3.0 ± 0.3	6.1 ± 0.7	1.8 ± 0.3
LMHP37	19.3 ± 0.5	3.6 ± 0.6	18.2 ± 0.7	4.6 ± 0.7	17.5 ± 1.2	6.5 ± 0.7	17.2 ± 0.6	8.8 ± 0.8
LMHP43	8.7 ± 0.5	1.3 ± 0.2	6.4 ± 1.3	3.8 ± 0.07	7.0 ± 0.1	2.9 ± 0.3	7.3 ± 0.3	0.8 ± 0.1
LMHP44	8.4 ± 0.4	5.9 ± 0.4	10.0 ± 0.7	3.0 ± 0.4	9.8 ± 0.4	2.8 ± 0.4	10.7 ± 0.6	2.7 ± 0.5

Los valores representan la media de cuatro réplicas ± DS.

Tabla 9: Comparación de los parámetros de productividades de celulasa total (APF), evaluados a pH 4.8 y 9.4, producidos en cultivo sumergido con lactosa por 11 cepas fúngicas aisladas del suelo del bosque primario Macuya (Ucayali-Perú).

Cepa	pH	APF (U L ⁻¹)	Y _{APF/x} (U g ⁻¹)	Y _{APF/prot} (U g ⁻¹)	Γ _{APF} (U L ⁻¹ h ⁻¹)
LMHP06	4.8	1191 ± 139 ^{ef}	856 ± 100 ^d	4709 ± 551 ^g	16.5 ± 1.9 ^{ef}
	9.4	1355 ± 110 ^c	974 ± 79 ^d	5359 ± 434 ^h	18.8 ± 1.5 ^c
LMHP14	4.8	2008 ± 153 ^c	538 ± 41 ^g	14303 ± 1091 ^c	28 ± 2.1 ^c
	9.4	1892 ± 95 ^b	507 ± 26 ^{hg}	13480 ± 681 ^d	26.3 ± 1.3 ^b
LMHP19	4.8	1162 ± 29 ^{ef}	372 ± 9.3 ⁱ	7193 ± 182 ^f	16 ± 0.4 ^{ef}
	9.4	935 ± 64 ^e	299 ± 20 ⁱ	5790 ± 395 ^{gh}	13 ± 0.9 ^e
LMHP21	4.8	1290 ± 80 ^{de}	712 ± 44 ^e	7579 ± 469 ^{ef}	18 ± 1.1 ^{de}
	9.4	1071 ± 94 ^d	591 ± 52 ^f	6287 ± 550 ^g	15 ± 1.3 ^d
LMHP29	4.8	776 ± 61 ^g	450 ± 36 ^h	4045 ± 319 ^{fg}	10.8 ± 0.9 ^g
	9.4	832 ± 90 ^e	482 ± 52 ^{hg}	4335 ± 467 ⁱ	12.0 ± 1.3 ^e
LMHP32	4.8	2896 ± 117 ^a	1962 ± 79 ^a	19623 ± 787 ^a	40 ± 1.6 ^a
	9.4	2696 ± 81 ^a	1827 ± 55 ^a	18269 ± 546 ^b	38 ± 1.1 ^a
LMHP33	4.8	2382 ± 26 ^b	1559 ± 17 ^b	18923 ± 206 ^a	33 ± 0.4 ^b
	9.4	2600 ± 90 ^a	1701 ± 59 ^b	20651 ± 716 ^a	36 ± 1.3 ^a
LMHP34	4.8	1415 ± 213 ^d	563 ± 85 ^{fg}	9793 ± 1475 ^d	20 ± 3.0 ^d
	9.4	1097 ± 113 ^d	436 ± 53 ^h	7596 ± 922 ^f	15 ± 1.9 ^d
LMHP37	4.8	2146 ± 57 ^c	1389 ± 37 ^c	16634 ± 442 ^b	30 ± 0.8 ^c
	9.4	1915 ± 62 ^b	1240 ± 40 ^c	14847 ± 483 ^c	27 ± 0.9 ^b
LMHP43	4.8	1282 ± 81 ^{de}	623 ± 39 ^f	7037 ± 443 ^f	18 ± 1.1 ^{de}
	9.4	1085 ± 43 ^d	527 ± 21 ^{fg}	5954 ± 236 ^{gh}	15 ± 0.6 ^d
LMHP44	4.8	1094 ± 47 ^f	603 ± 26 ^{fg}	8316 ± 354 ^e	15.2 ± 0.7 ^f
	9.4	1392 ± 79 ^c	767 ± 43 ^e	10578 ± 599 ^e	19.3 ± 1.1 ^c

Parámetros de productividad: Y_{APF/x} (U g⁻¹) = celulasa total (APF) producida (U.L⁻¹)/biomasa formada (g.L⁻¹); Y_{APF/prot.} (U g⁻¹) = celulasa total (APF) producida (U.L⁻¹)/proteína extracelular (g. L⁻¹); Γ_{APF} (U L⁻¹ h⁻¹) = productividad volumétrica; q_{APF} (U g⁻¹ h⁻¹)= tasa específica de formación de celulastas. Los valores representan el promedio de cuatro repeticiones ± SD. Las medias con las mismas letras dentro de una fila no son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Los datos fueron evaluados por la prueba de ANOVA y de Duncan.

Tabla 10: Comparación de los parámetros de productividades de endoglucanasa (EG), evaluados a pH 4.8 y 9.4, producidos en cultivo sumergido con lactosa por 11 cepas fúngicas aisladas del suelo del bosque primario Macuya (Ucayali-Perú).

Cepa	pH	EG (U L ⁻¹)	Y _{EG/x} (U g ⁻¹)	Y _{EG/prot} (U g ⁻¹)	Γ _{EG} (U L ⁻¹ h ⁻¹)
LMHP06	4.8	387 ± 40 ^e	278 ± 29 ^c	1531 ± 159 ^g	5.4 ± 0.6 ^e
	9.4	559 ± 83 ^b	402 ± 60 ^b	2212 ± 327 ^{cde}	7.8 ± 1.2 ^b
LMHP14	4.8	515 ± 170 ^{cd}	138 ± 46 ^{ef}	3672 ± 1210 ^{de}	7.2 ± 2.4 ^{cd}
	9.4	416 ± 98 ^c	111 ± 26 ^{ef}	2962 ± 701 ^c	5.8 ± 1.4 ^c
LMHP19	4.8	614 ± 110 ^c	196 ± 35 ^d	3802 ± 676 ^d	8.5 ± 1.5 ^c
	9.4	289 ± 49 ^c	93 ± 16 ^f	1793 ± 304 ^{de}	4.0 ± 0.7 ^c
LMHP21	4.8	248 ± 27 ^f	137 ± 15 ^{ef}	1457 ± 156 ^g	3.5 ± 0.4 ^d
	9.4	407 ± 29 ^c	225 ± 16 ^c	2391 ± 173 ^{cde}	5.7 ± 0.4 ^c
LMHP29	4.8	474 ± 58 ^{de}	275 ± 34 ^c	2471 ± 303 ^f	6.6 ± 0.8 ^{ed}
	9.4	312 ± 31 ^c	181 ± 18 ^{cde}	1625 ± 164 ^e	4.3 ± 0.4 ^c
LMHP32	4.8	1161 ± 95 ^a	787 ± 65 ^a	7865 ± 645 ^a	16.1 ± 1.3 ^a
	9.4	913 ± 159 ^a	619 ± 108 ^a	6190 ± 1075 ^b	12.3 ± 2.2 ^a
LMHP33	4.8	627 ± 77 ^c	410 ± 51 ^b	4977 ± 613 ^c	8.7 ± 1.1 ^c
	9.4	924 ± 104 ^a	605 ± 68 ^a	7341 ± 828 ^a	12.8 ± 1.5 ^a
LMHP34	4.8	422 ± 40 ^{de}	168 ± 16 ^{de}	2918 ± 274 ^{ef}	5.9 ± 0.6 ^{de}
	9.4	331 ± 48 ^c	132 ± 19 ^{def}	2291 ± 329 ^{cde}	4.6 ± 0.7 ^c
LMHP37	4.8	405 ± 62 ^{de}	262 ± 40 ^c	3138 ± 479 ^{def}	5.6 ± 0.9 ^{de}
	9.4	973 ± 85 ^a	630 ± 55 ^a	7545 ± 656 ^a	13.6 ± 1.2 ^a
LMHP43	4.8	187 ± 33 ^f	91 ± 16 ^f	1025 ± 182 ^g	2.6 ± 0.5 ^f
	9.4	123 ± 16 ^d	60 ± 7.9 ^f	675 ± 89 ^f	1.7 ± 0.2 ^d
LMHP44	4.8	775 ± 49 ^b	427 ± 27 ^b	5892 ± 375 ^b	10.8 ± 0.7 ^b
	9.4	351 ± 66 ^c	193 ± 36 ^{cd}	2667 ± 502 ^{cd}	4.9 ± 0.9 ^c

Parámetros de productividad: Y_{EG/x} (U g⁻¹) = Endoglucanasa (EG) producida (U.L⁻¹)/biomasa formada (g.L⁻¹); Y_{EG/prot.} (U g⁻¹) = Endoglucanasa (EG) producida (U.L⁻¹)/proteína extracelular (g. L⁻¹); Γ_{EG} (U L⁻¹ h⁻¹) = productividad volumétrica; q_{EG} (U g⁻¹ h⁻¹) = tasa específica de formación de endoglucanasas. Los valores representan el promedio de cuatro repeticiones ± SD. Las medias con las mismas letras dentro de una fila no son significativamente diferentes ($p < 0.05$). Los datos fueron evaluados por la prueba de ANOVA y de Duncan.

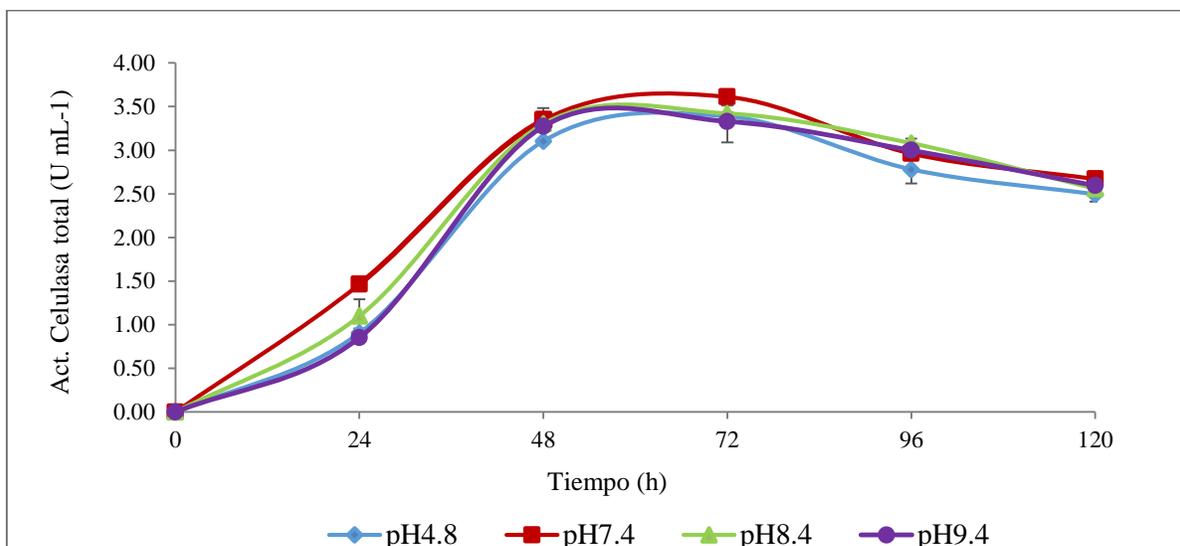
4.4.2.3. Determinación de la cinética enzimática de tres cepas seleccionadas

En base a los mejores resultados del análisis cuantitativo de las enzimas celulolíticas producidas a las 72 h de las 11 cepas previamente seleccionadas, se resolvió la selección de las cepas LMHP32, LMHP33 y LMHP37 para determinar la cinética de producción en medio con lactosa y/o celulosa microcristalina durante un periodo de 120 y 168 h respectivamente. Para el cultivo con lactosa, los títulos más altos de celulasa total y endoglucanasa de las tres cepas se registraron a las 72 h e incluso se anticipan en las primeras 48 h; sin embargo, después de las 96 h decrece (Figuras 11, 13, 15 (a, b)). En cambio, los cultivos con celulosa microcristalina la máxima producción resultó después de las 72 h y se mantiene o no incrementa significativamente luego de las 168 h (Figuras 12, 14, 16 (a, b)). A partir de esto, se observa que la cinética más lenta para ambas actividades, se registró utilizando celulosa microcristalina. Este comportamiento podría indicar que existe un período de aclimatación inicial de las células al sustrato.

Asimismo, las figuras 11 (a y b), 13 (a y b) y 15 (a y b) representan un aumento gradual de la actividad de celulasa total y endoglucanasa para cada cepa evaluada, respectivamente, hasta alcanzar un valor máximo de $3.61 \pm 0.07 \text{ U mL}^{-1}$ y $1,22 \pm 0.04 \text{ U mL}^{-1}$ (ambos a pH 7.4) para la cepa LMHP32; $3.10 \pm 0.01 \text{ U mL}^{-1}$ (pH 8.4) y $1,73 \pm 0.09 \text{ U mL}^{-1}$ (pH 9.4) para la cepa LMHP33 y $3.37 \pm 0.11 \text{ U mL}^{-1}$ (pH 7.4) y $0.97 \pm 0.07 \text{ U mL}^{-1}$ (pH 8.4) para la cepa LMHP37 cultivadas con lactosa. En contraste, los cultivo con celulosa microcristalina, cuya máximas actividades fueron registrada después de 72 h, para ambas actividades evaluadas, se obtuvieron valores máximos de $0.31 \pm 0.01 \text{ U mL}^{-1}$ (pH7.4) y $0.170 \pm 0.001 \text{ U mL}^{-1}$ (pH 4.8) para la cepa LMHP32; $0.560 \pm 0.022 \text{ U mL}^{-1}$ (pH7.4) y $0.189 \pm 0.003 \text{ U mL}^{-1}$ (pH4.8) para LMHP33 y en el caso de LMHP37 $0.602 \pm 0.011 \text{ U mL}^{-1}$ (pH7.4) y $0.198 \pm 0.001 \text{ U mL}^{-1}$ (pH4.8) (Figuras 12, 14 y 16 (a y b)).

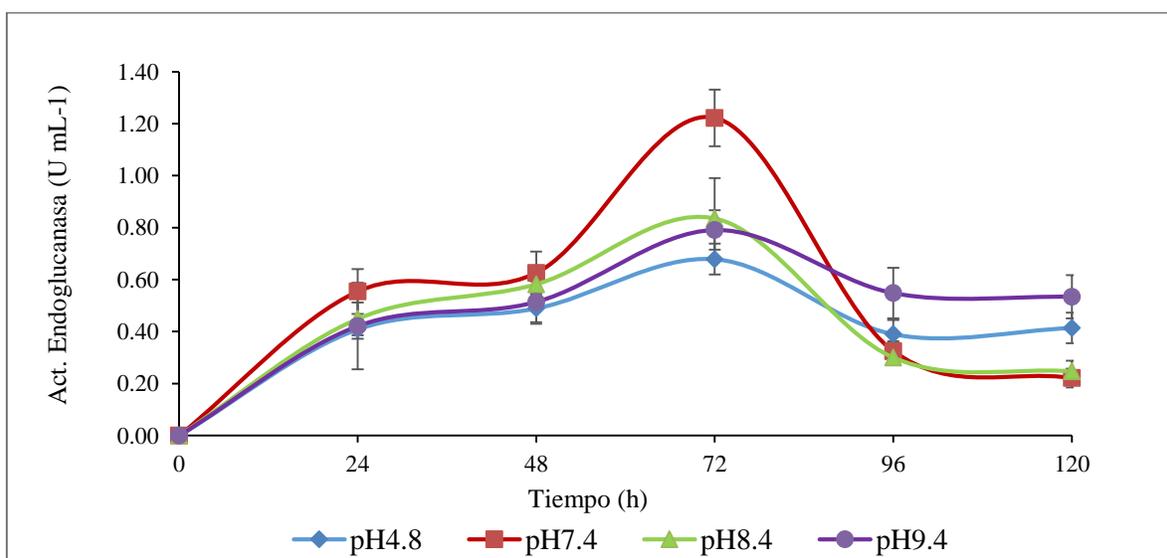
Como se observa, la actividad de celulasa total para las tres cepas seleccionadas fueron hasta diez veces más altas cuando se cultiva con lactosa en comparación con celulosa microcristalina. Esto se puede justificar por el hecho de que la lactosa es una molécula más corta y soluble y por lo tanto se reduce en menor tiempo.

Figura 11a: Cinética de celulasa total a diferentes pH para la cepa LMHP32 cultivada en sumergido con lactosa durante 120 h.



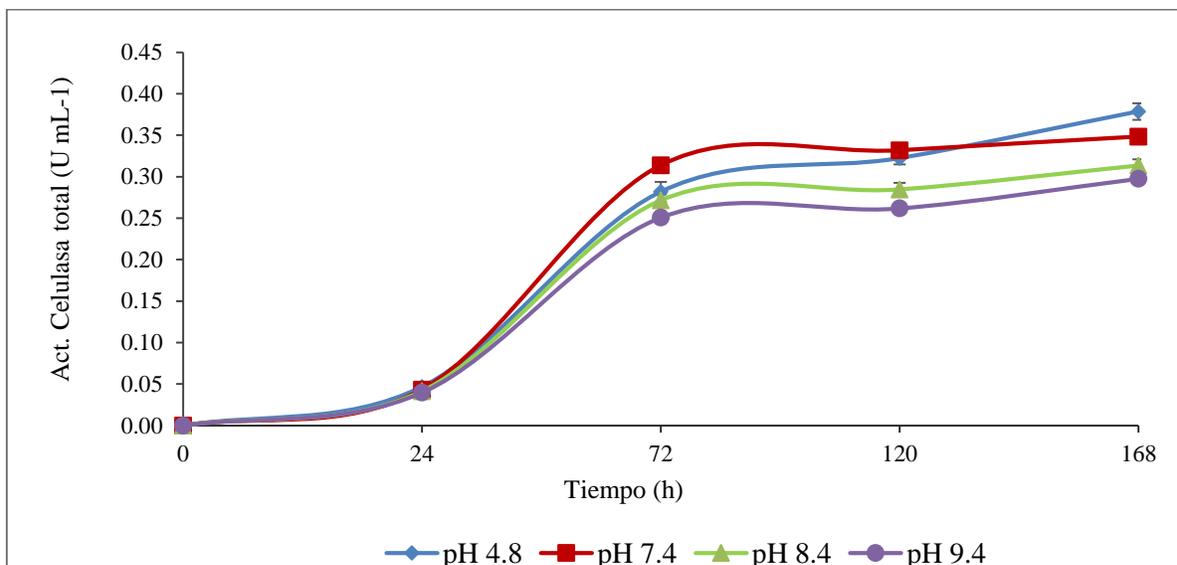
Las barras sobre el gráfico representan la DS para cuatro réplicas.

Figura 11b: Cinética de endoglucanasa a diferentes pH para la cepa LMHP32 cultivada en sumergido con lactosa durante 120 h.



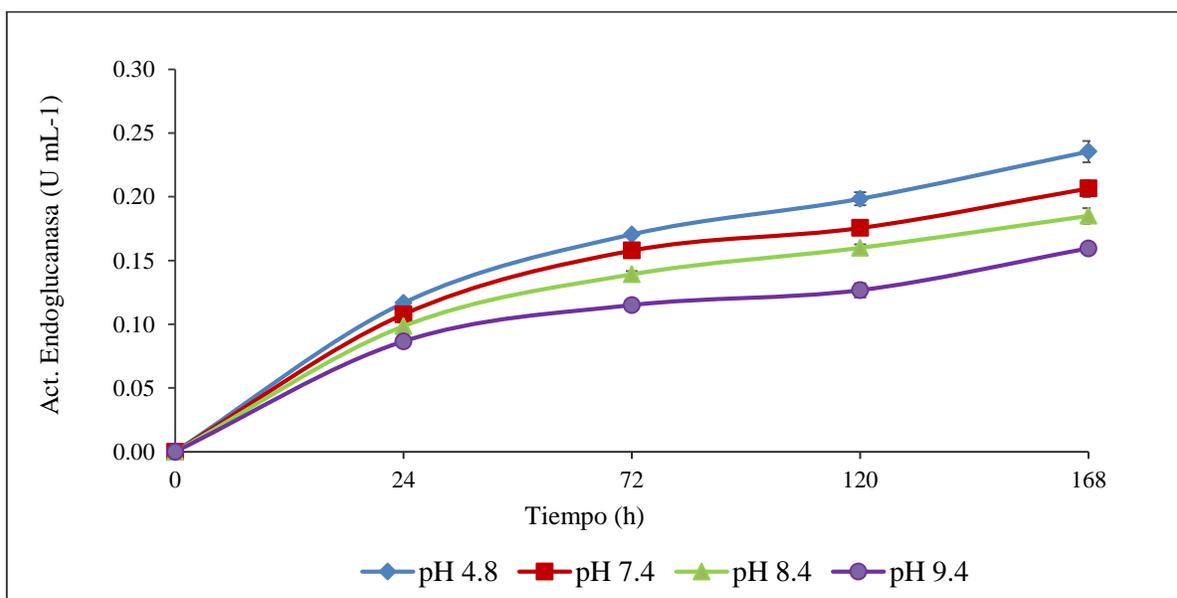
Barras sobre el gráfico representan la DS de cuatro réplicas.

Figura 12a: Cinética de celulasa total a diferentes pH para la cepa LMHP32 cultivada en sumergido con celulosa microcristalina durante 168 h.



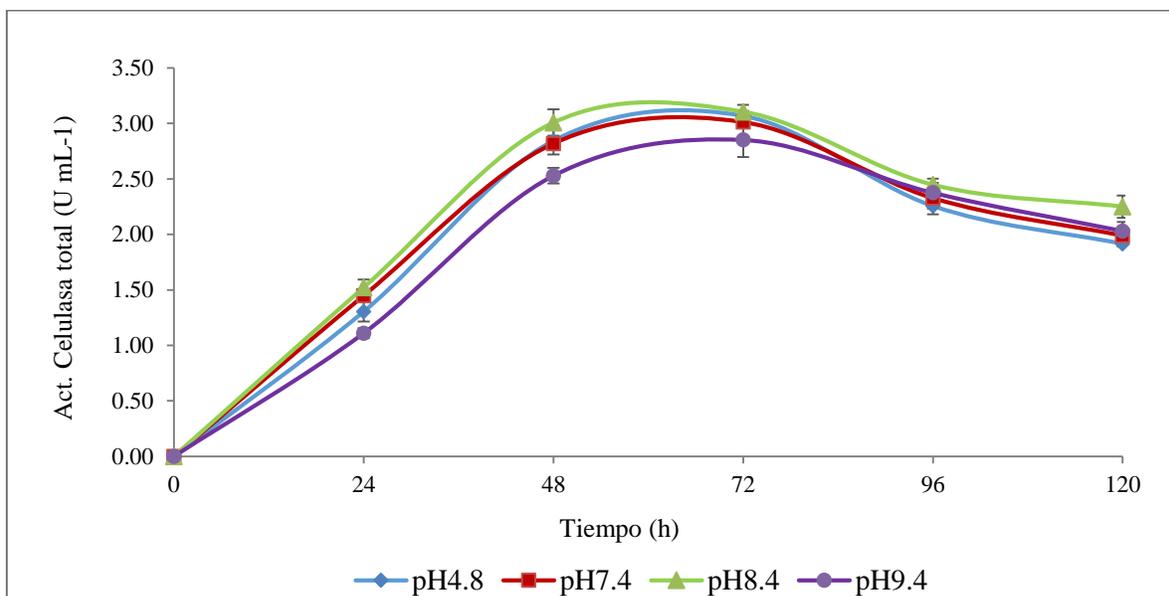
Barras sobre el gráfico representan la DS de cuatro réplicas.

Figura 12b: Cinética de endoglucanasa a diferentes pH para la cepa LMHP32 cultivada en sumergido con celulosa microcristalina durante 168 h.



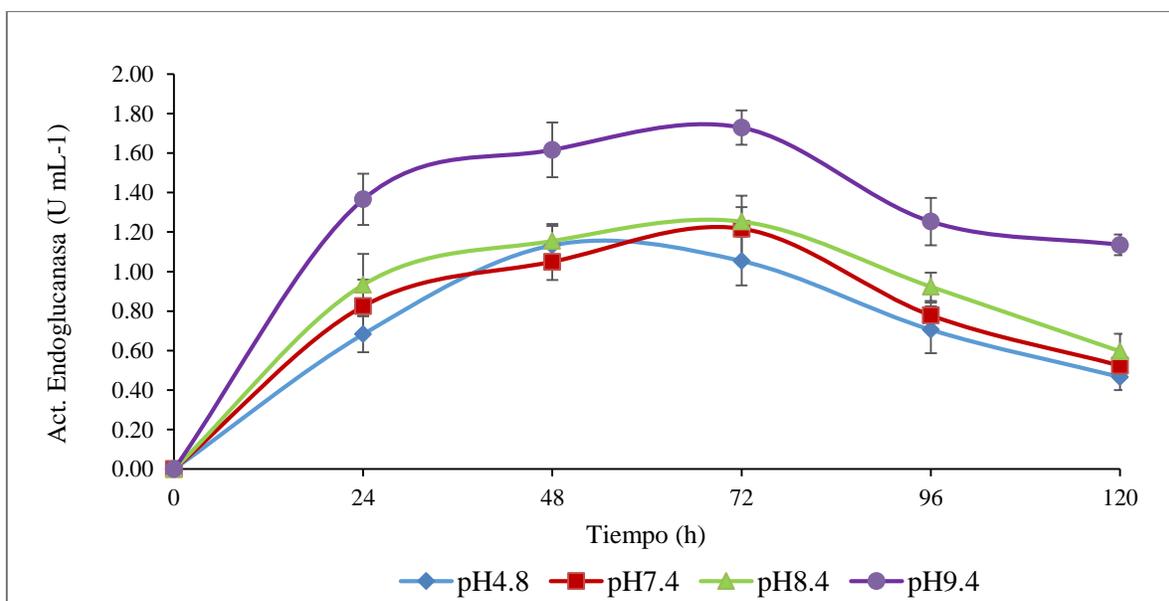
Barras sobre el gráfico representan la DS de cuatro réplicas.

Figura 13a: Cinética de celulasa total a diferentes pH de la cepa LMHP33 cultivada en sumergido con lactosa durante 120 h.



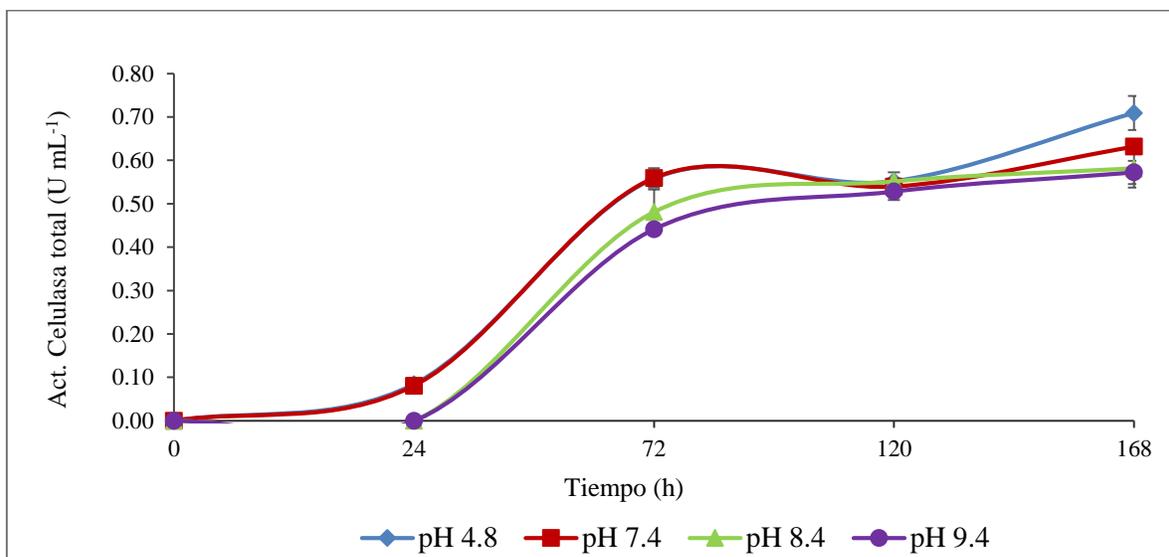
Barras sobre el gráfico representan la DS de cuatro réplicas.

Figura 13b: Cinética de endoglucanasa a diferentes pH para la cepa LMHP33 cultivada en sumergido con lactosa durante 120 h.



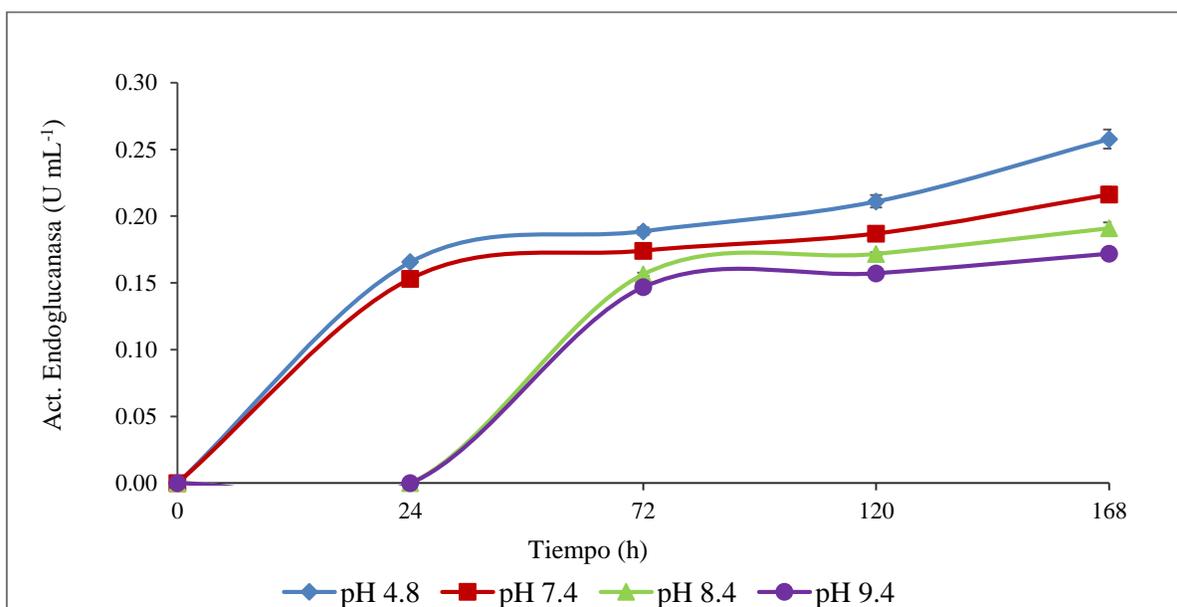
Barras sobre el gráfico representan la DS de cuatro réplicas.

Figura 14a: Cinética de celulasa total a diferentes pH para la cepa LMHP33 cultivada en sumergido con celulosa microcristalina durante 168 h.



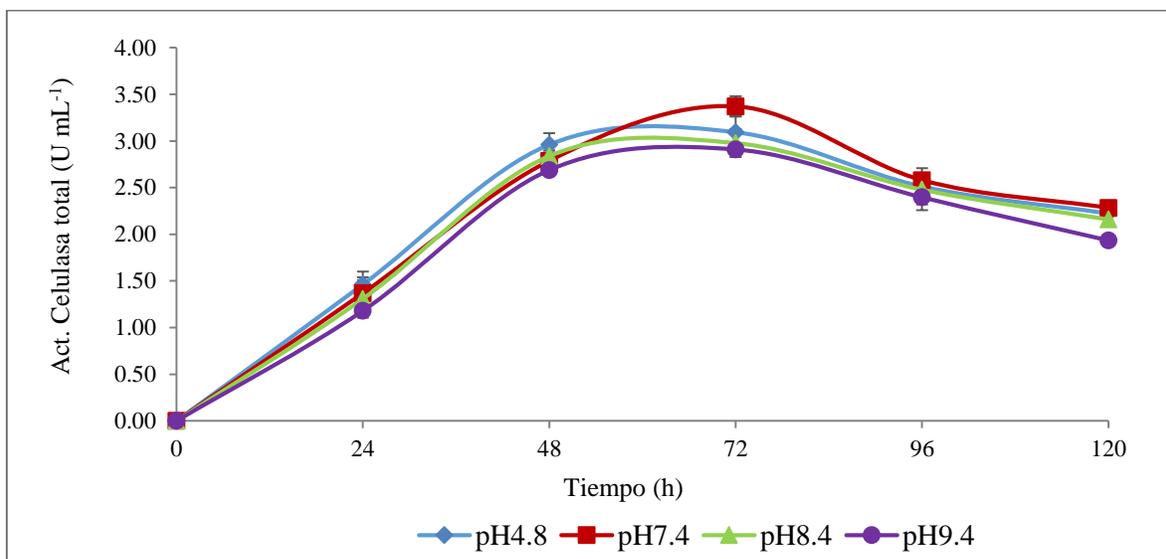
Barras sobre el gráfico representan la DS de cuatro réplicas.

Figura 14b: Cinética de endoglucanasa a diferentes pH para la cepa LMHP33 cultivada en sumergido con celulosa microcristalina durante 168 h.



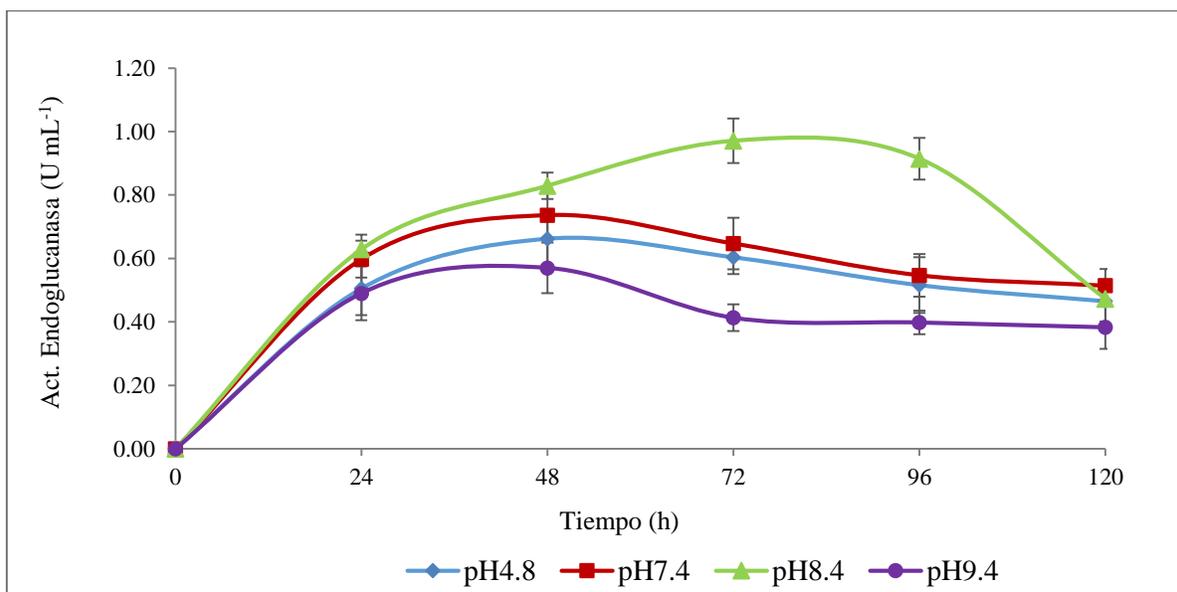
Barras sobre el gráfico representan la DS de cuatro réplicas.

Figura 15a: Cinética de celulasa total a diferentes pH para la cepa LMHP37 cultivada en sumergido con lactosa durante 120 h.



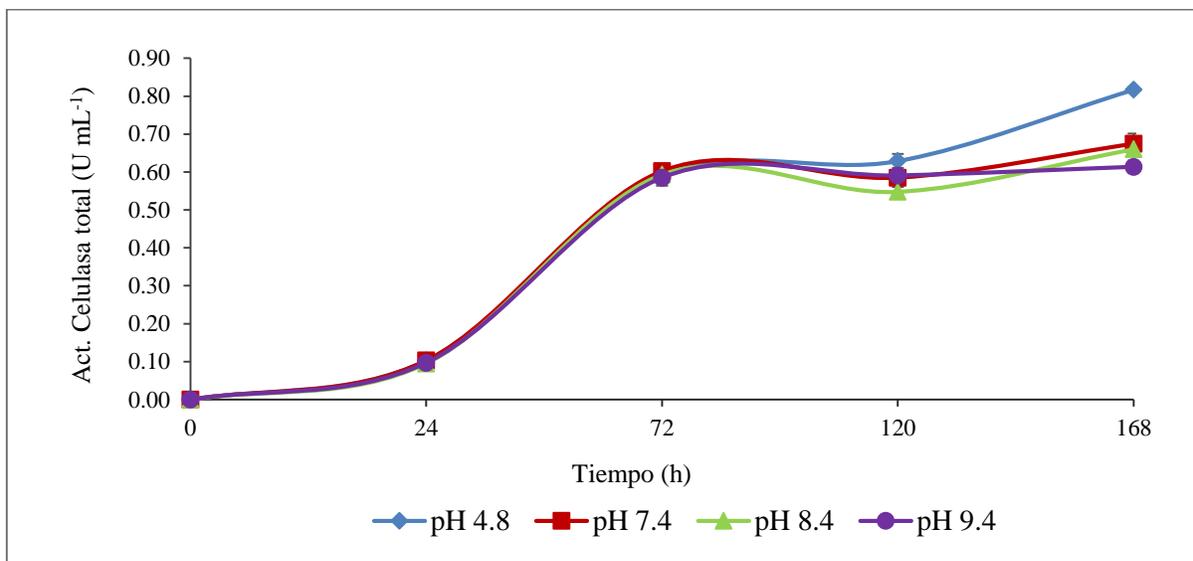
Barras sobre el gráfico representan la DS de cuatro réplicas.

Figura 15b: Cinética de endoglucanasa a diferentes pH para la cepa LMHP37 cultivada en sumergido con lactosa durante 120 h.



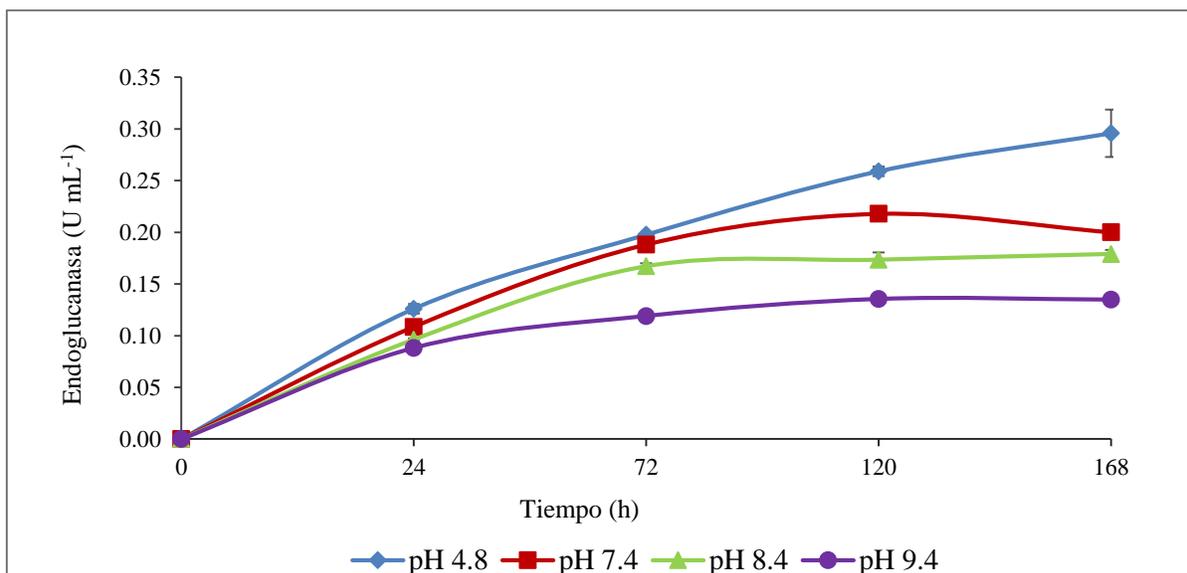
Barras sobre el gráfico representan la DS de cuatro réplicas.

Figura 16a: Cinética de celulasa total a diferentes pH para la cepa LMHP37 cultivada en sumergido con celulosa microcristalina durante 168 h.



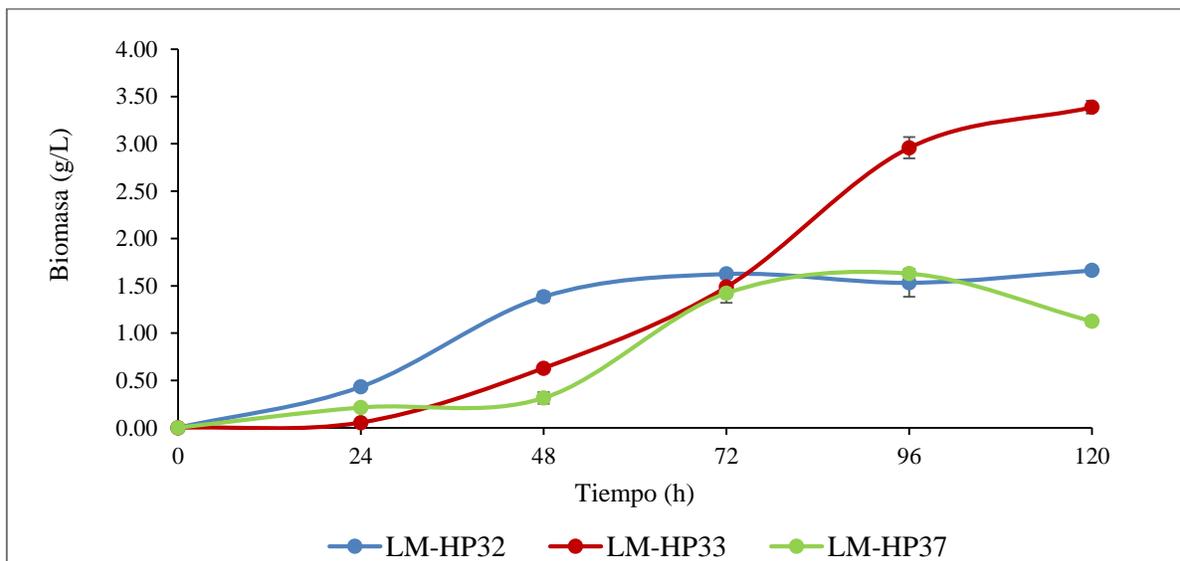
Barras sobre el gráfico representan la DS de cuatro réplicas.

Figura 16b: Cinética de endoglucanasa a diferentes pH para la cepa LMHP37 cultivada en sumergido con celulosa microcristalina durante 168 h.



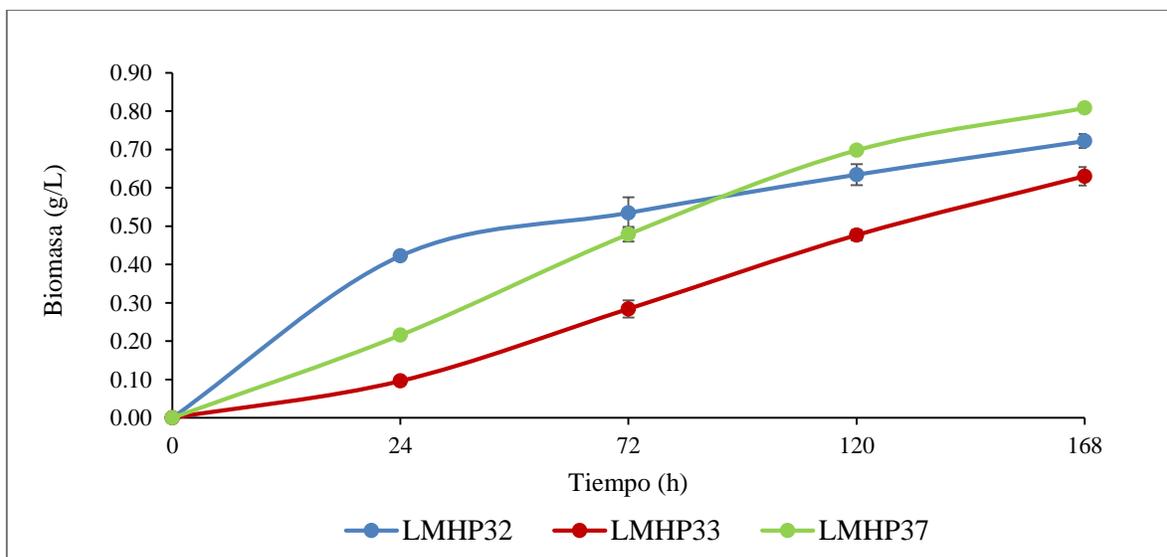
Barras sobre el gráfico representan la DS de cuatro réplicas.

Figura 17a: Cinética de la producción de biomasa de la cepa LMHP32, LMHP33 y LMHP37 cultivadas en líquido con lactosa.



Barras sobre el gráfico representan la DS de cuatro réplicas.

Figura 17b: Cinética de la producción de biomasa de la cepa LMHP32, LMHP33 y LMHP37 cultivadas en líquido con celulosa microcristalina.



Barras sobre el gráfico representan la DS de cuatro réplicas.

No obstante, se observó escaso crecimiento en las primeras 48 h en las tres cepas evaluadas se produjeron tres veces más biomasa en lactosa que en la celulosa por lo menos después de las 72 h (Figura 17 a y b); por tanto, se podría señalar que existe la activación de genes

relacionados con el metabolismo de la lactosa. Existen estudios que han demostrado que *P. chrysogenum* y otras especies de hongos tienen una doble estrategia de asimilación de lactosa, empleando simultáneamente la hidrólisis extracelular e intracelular (Jónás et al., 2014, Seiboth et al., 2007).

Si bien la producción comercial de celulasas se debe a principalmente a cepas ampliamente estudiadas y conocidas como *Trichoderma reesi* y *Aspergillus niger*, también existen pocas especies de *Penicillium* descritas como productoras de celulasas a nivel comercial. En este trabajo, las cepas LMHP33 y LMHP37 identificadas morfológicamente y molecularmente dentro del género *Penicillium*, reportan títulos de celulasa total altas en lactosa en un breve período de cultivo (Figura 15a) comparado con los resultados de la mayoría de especies de *Penicillium* ya estudiados (Gusakov y Sinitsyn, 2012). Sin embargo, en celulosa microcristalina se produce aproximadamente cinco veces menos actividad celulasa total que en lactosa (Figura 16a), razón por la cual confirmaríamos que lactosa es un buen inductor para la producción de celulasas en estas cepas del género *Penicillium*. Asimismo, ambas cepas cultivadas con lactosa, resultaron obtener actividades de celulasa total mucho más altas a pH neutroalcalino (3.10 ± 0.01 y 3.37 ± 0.1 U mL⁻¹ a pH 8.4 y 7.4 respectivamente) entretanto para endoglucanasas estas alcanzaron niveles de actividad altas a pH alcalinos (1.73 ± 0.09 a pH 9.4 y 0.97 ± 0.07 U mL⁻¹ a pH 8.4 respectivamente).

Estos resultados indicarían a LMHP33 y LMHP37 como buenos productores de celulasas alcalinas. Si bien se han identificado varias especies de *Penicillium* como buenos productores de celulasas, sólo algunos de ellos se destacan para la producción de celulasas alcalinas (Sechnem et al., 2006, Pereira et al. 2013, Camassola y Dillon 2014, Marjamaa et al., 2013). En comparación a otras especies de *Penicillium*, reportados como buenos productores de celulasas, la cepa LMHP37 produce 1,3 veces más celulasa total que *P. funiculosum* pero similar a *P. janthinellum* (Gusakov y Sinitsyn, 2012). Asimismo, de 2.1 a 2.5 veces más que la cepa mutante *P. echinulatum* 9A02S1 (Sechnem et al., 2006, Camassola y Dillon 2014) y aproximadamente 3,7 veces más que *P. simplicissimum* TUB-F-2378 y *P. pulvillorum* TUB-F-2220 (Marjamaa et al., 2013). Asimismo, la cantidad de endoglucanasas producidas por las tres cepas seleccionadas fue menor que el nivel de celulasa total, indicando que probablemente estas cepas producen más celobiohidrolasas activas; no obstante, como se

muestran en las figuras 11b, 13b, y 15b, los picos de actividad de endoglucanasa se muestran a diferentes valores de pH y tiempos de fermentación; por tanto, podríamos inferir que existe un conjunto de enzimas celulolíticas que podrían estar codificadas y expresadas por diferentes genes.

Investigaciones sobre el sistema celulolítico de especies de *Penicillium*, indican que son similares a otras especies fúngicas; además, han determinado que las celulasas y beta glucosidasas, como en especies de *Penicillium*, pertenecen a diferentes familias de glicohidrolasas (GH) y han descrito que algunas endoglucanasas corresponden a las familias 5, 6, 7, 12 y 45 de las GH; dos o más celobiohidrolasas son integrantes de las familias 6 y 7 (celobiohidrolasas II y I respectivamente) y dos beta glucosidasas de la familia 1 y 3 (Gusakov y Sinitsyn, 2012). Por ejemplo, la actividad de endoglucanasa más alta de LMHP37 fue a pH 8,4 ($0.97 \pm 0.07 \text{ U mL}^{-1}$) a las 72h y en segundo lugar a pH 7,4 ($0.74 \pm 0.07 \text{ U mL}^{-1}$) a las 48h, además casos como el de *P. citrinum* MTCC 6489 también reportan actividades similares de endoglucanasa a pH neutro (Dutta et al., 2008).

4.5. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS FÚNGICAS PRODUCTORAS DE CELULASAS NEUTROALCALINAS

Después de realizar observaciones microscópicas y de describir las características macroscópicas de las 11 colonias seleccionadas, se realizó la identificación taxonómica a nivel molecular mediante la amplificación de la secuencia ITS. La calidad del ADN extraído se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 por ciento (Figura 18) y con los valores obtenidos de la relación A_{260}/A_{280} cuyo rango debe estar de 1.8 a 2.0 (Tabla 11), en tanto la concentración se cuantificó indirectamente midiendo la absorbancia a 260nm.

Tabla 11: Concentración y pureza del ADN extraído de 11 cepas de hongos aislados del suelo del bosque Macuya Pucallpa con actividad celulasa en condiciones neutroalcalinas.

Cepa	ADN (ng/uL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
LMHP06	2715 ± 35	1.98 ± 0.051
LMHP14	1854 ± 193	1.86 ± 0.134
LMHP19	2938 ± 177	1.89 ± 0.114
LMHP21	1564 ± 118	1.99 ± 0.011
LMHP29	4288 ± 159	1.94 ± 0.086
LMHP32	2649 ± 189	1.81 ± 0.353
LMHP33	13219 ± 30	1.94 ± 0.037
LMHP34	2868 ± 88	2.05 ± 0.153
LMHP37	1114 ± 80	1.86 ± 0.236
LMHP43	2906 ± 143	1.85 ± 0.195
LMHP44	683 ± 57	1.85 ± 0.224

Valores de promedio y desviación estándar de 2 réplicas.

Los productos amplificados con los cebadores (ITS1 e ITS4) fueron corroborados mediante la electroforesis al observarse una sola banda y la ausencia de productos inespecíficos, asimismo se determinó que el tamaño aproximado de las bandas estuvo entre 500 a 600 pb (Figura 19), lo cual se encuentra dentro del rango de tamaño esperado tal como lo indican White (1990) y Bellemain (2010).

Figura 18: Electroforesis en gel de agarosa al 1 por ciento de muestras de ADN de 11 cepas de hongos aislados del suelo del bosque Macuya Pucallpa con actividad celulasa en condiciones neutroalcalinas. (M) Marcador de peso molecular Lambda Hind III; (1) LMHP06; (2) LMHP14; (3) LMHP19; (4) LMHP21; (5) LMHP29; (6) LMHP32; (7) LMHP33; (8) LMHP34; (9) LMHP37; (10) LMHP43; (11) LMHP44.

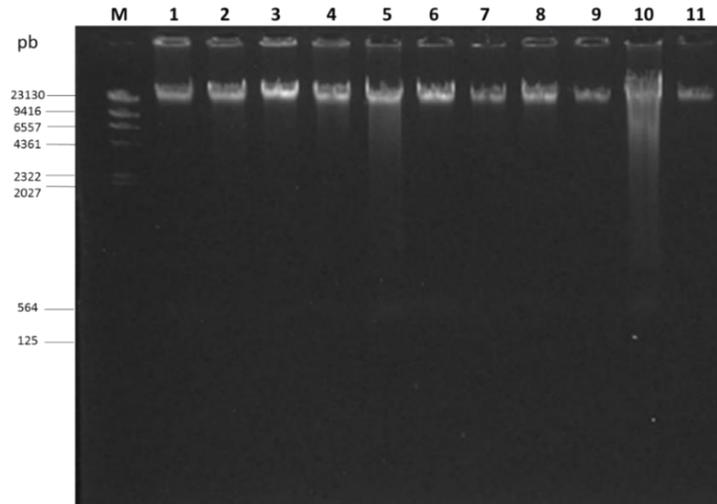
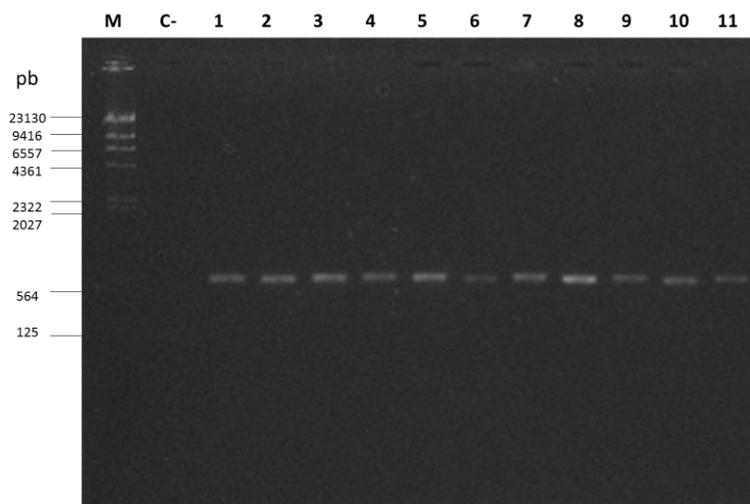


Figura 19: Electroforesis en gel de agarosa 1 por ciento de los productos de PCR de la región ITS del ADNr de 11 cepas de hongos aislados del suelo del bosque Macuya Pucallpa con actividad celulasa en condiciones neutroalcalinas. (M) Marcador de peso molecular Lambda Hind III; (C-) control negativo; (1) LMHP06; (2) LMHP14; (3) LMHP19; (4) LMHP21; (5) LMHP29; (6) LMHP32; (7) LMHP33; (8) LMHP34; (9) LMHP37; (10) LMHP43; (11) LMHP44.



Del análisis y edición de los resultados del secuenciamiento, se obtuvieron las secuencias consenso que fueron empleadas para evaluar el porcentaje de similitud con otras especies encontradas en las bases de datos del NCBI y BoldSystem. En el Tabla 12 se resume la o las posibles especies que están relacionadas con las 11 cepas evaluadas en base a los porcentajes de similitud más altos (≥ 98 por ciento). En la mayoría de los casos, por lo menos a nivel de género, se reconfirma lo reportado en la evaluación micro y macroscópica; es decir, los géneros predominantes fueron *Aspergillus* y *Penicillium* (Tabla 5). Por lo tanto, los análisis moleculares coinciden con las figuras presentadas en el anexo 1.

Tabla 12: Análisis de secuencias de la región ITS del ADNr de 11 hongos aislados de suelo del bosque Macuya con actividad celulasa en condiciones neutroalcalinas, comparadas con las secuencias almacenadas en GenBank.

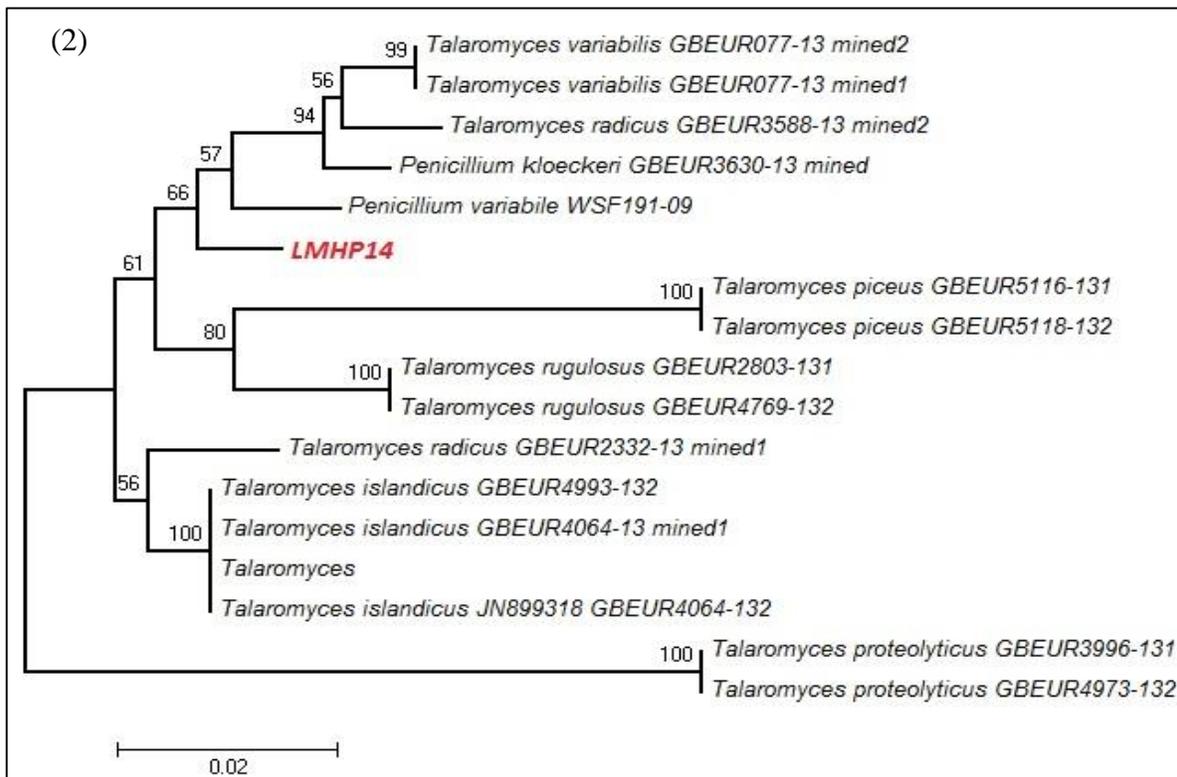
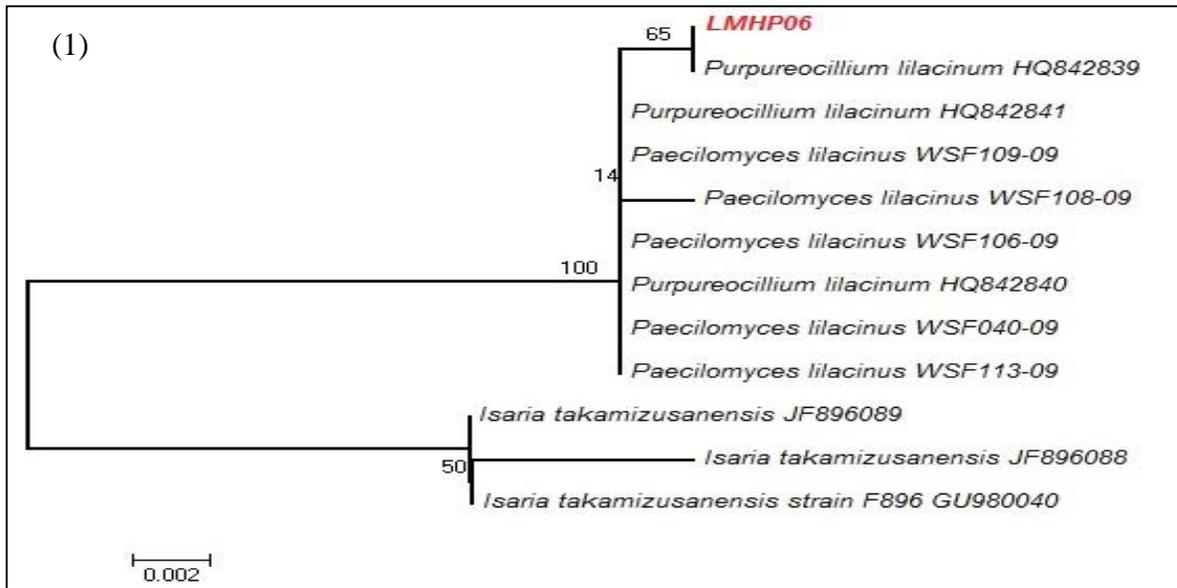
Cepa	Fragmento (pb)*	Especies en GenBank (NCBI) y/o BoldSystem	Número de accesión	Identidad (por ciento)
LMHP06	604	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	WSF113-09	100 por ciento
		<i>Purpureocillium lilacinum</i>	HQ842839	100 por ciento
LMHP14	609	<i>Penicillium variabile</i>	WSF191-09	98 por ciento
LMHP19	620	<i>Penicillium multicolor</i>	JN799647	100 por ciento
LMHP21	609	<i>Penicillium simplicissimum</i>	JN246043	100 por ciento
LMHP29	631	<i>Aspergillus sp. NRRL 58570</i>	HQ288052.1	100 por ciento
LMHP32	631	<i>Aspergillus nomius</i>	KC253960	100 por ciento
LMHP33	609	<i>Penicillium maximae</i>	EU427298	100 por ciento
LMHP34	620	<i>Aspergillus niger</i>	AY373852	100 por ciento
LMHP37	604	<i>Penicillium mallochii</i>	LC057417.1	99 por ciento
LMHP43	620	<i>Talaromyces islandicus</i>	JN899318	98 por ciento
LMHP44	578	<i>Penicillium aculeatus</i>	JX501412	100 por ciento

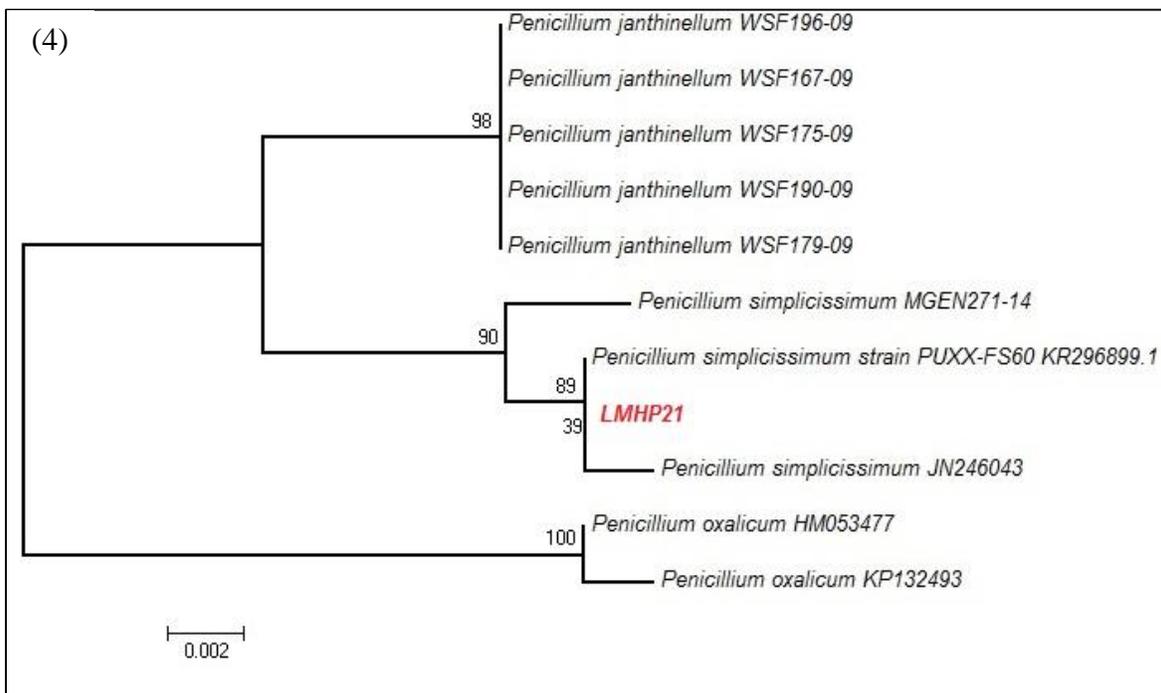
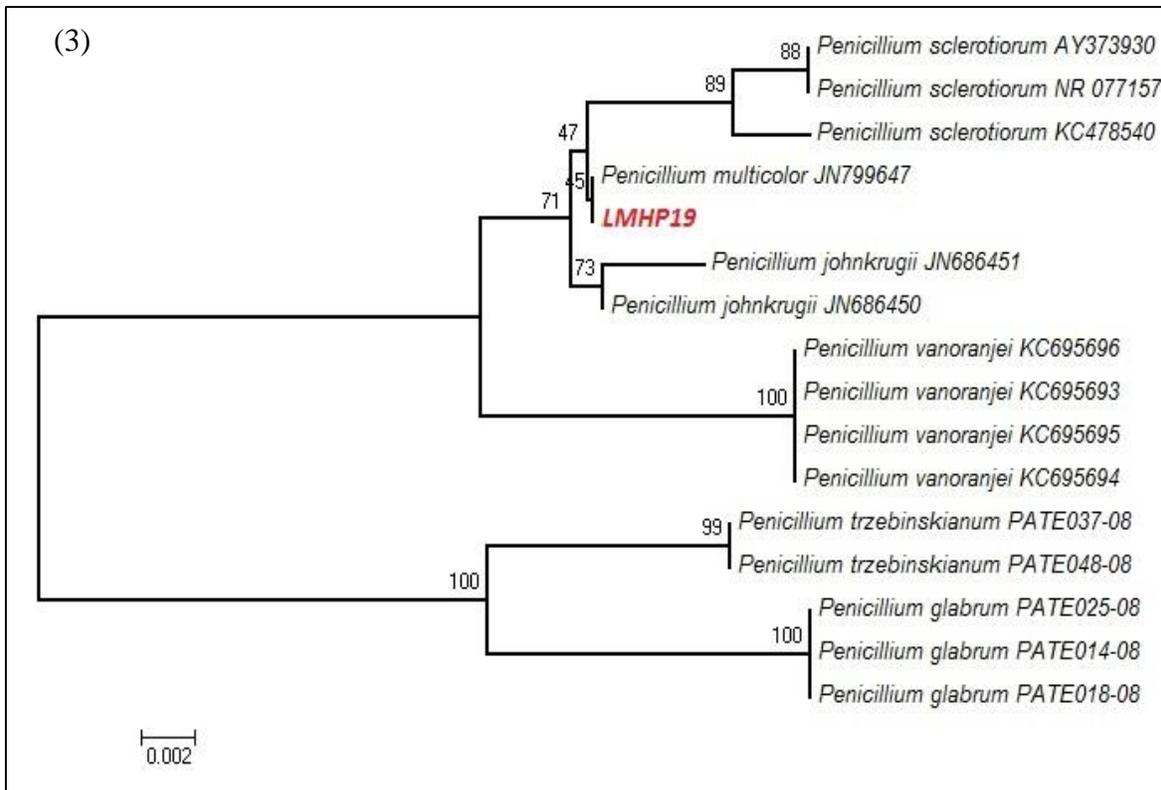
*Tamaño del fragmento de ADN amplificado en pares de bases (pb).

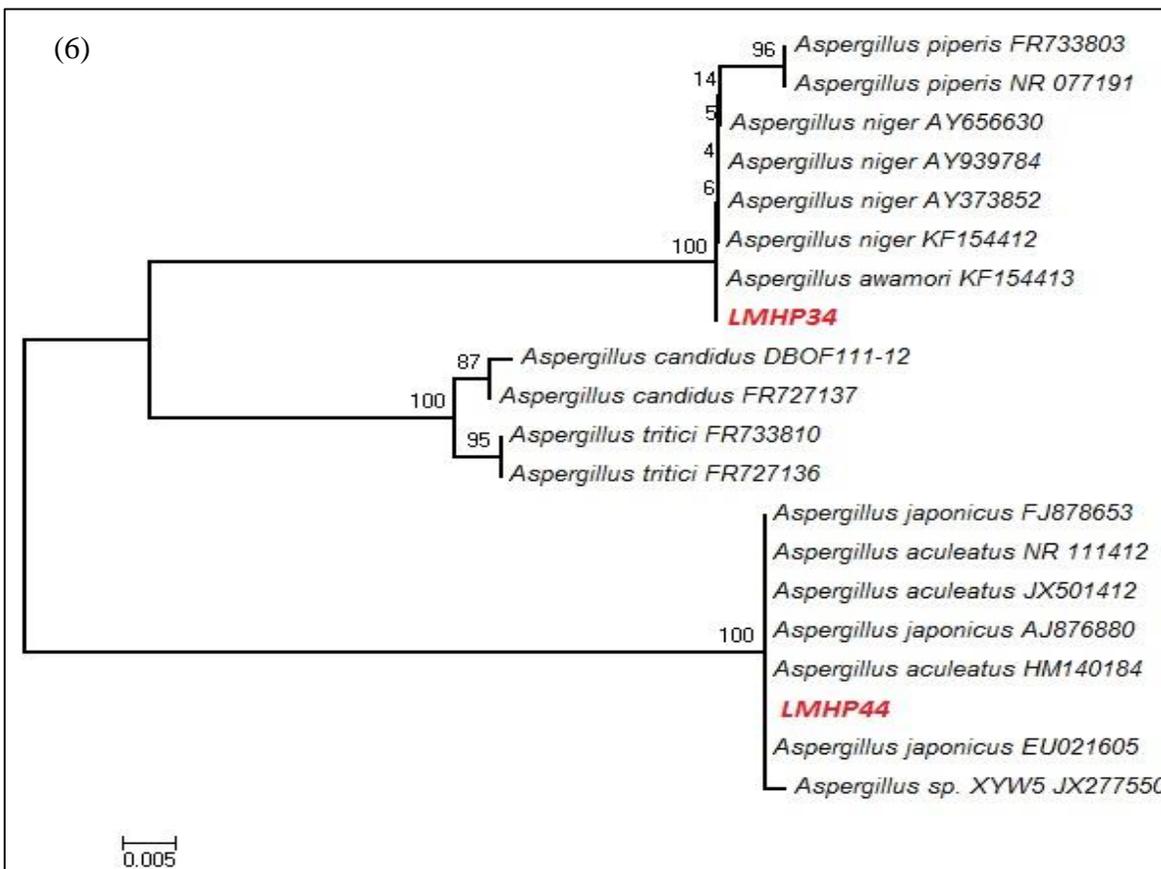
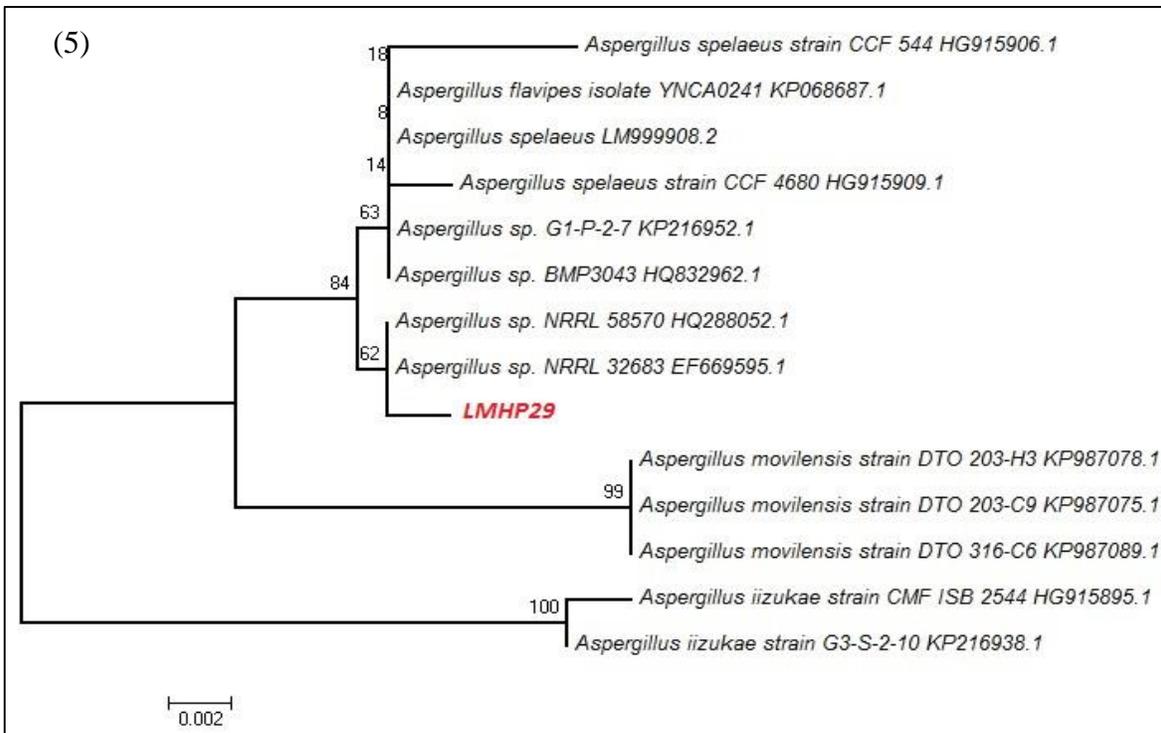
El análisis filogenético muestra que el género predominante en las cinco muestras de suelo fue *Penicillium* seguido por *Aspegillus*. Estos resultados concuerdan con previos estudios sobre aislamiento de microorganismos de suelo; además, estos géneros se reportan como los más comunes e importantes para los propósitos industriales.

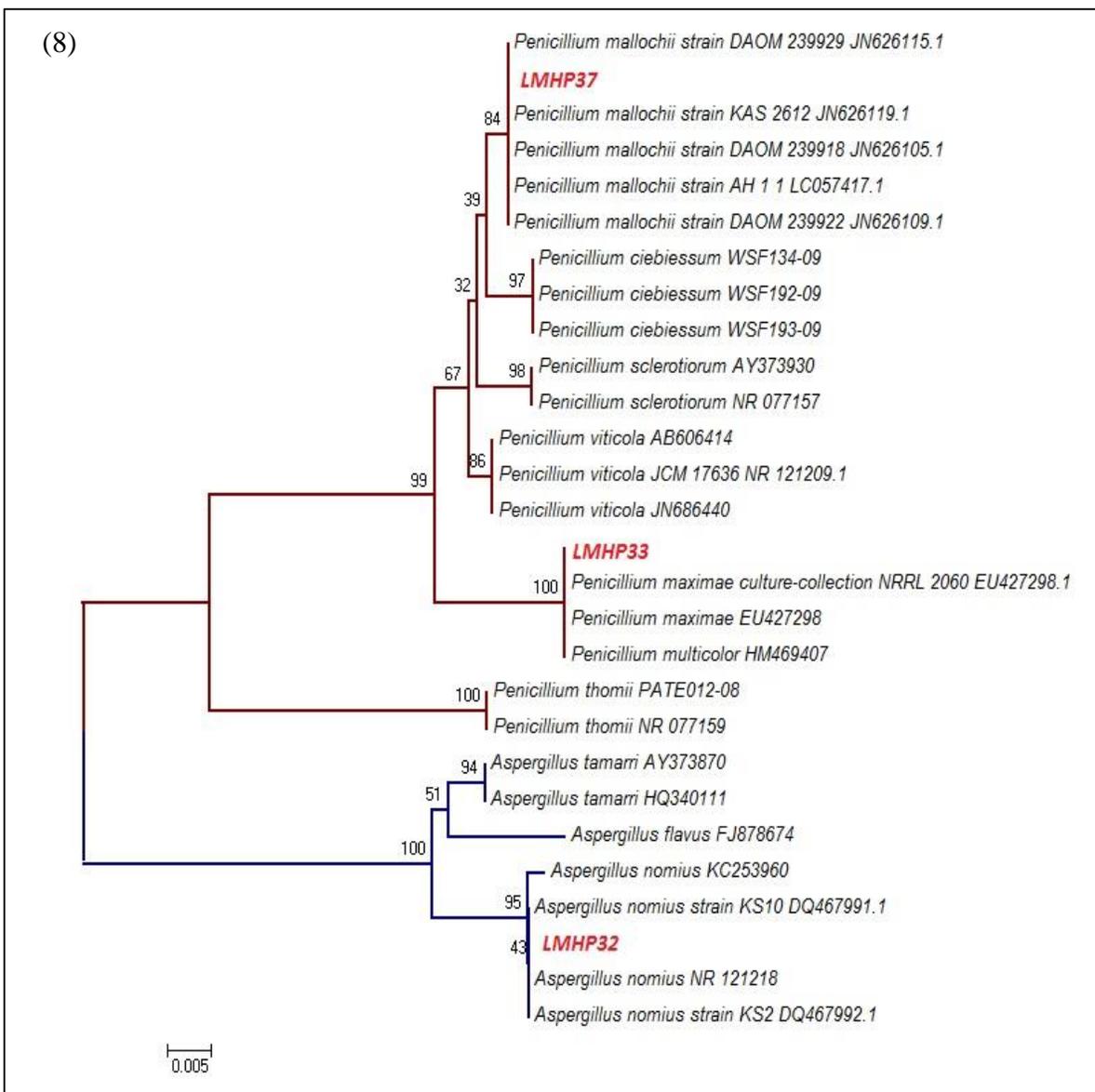
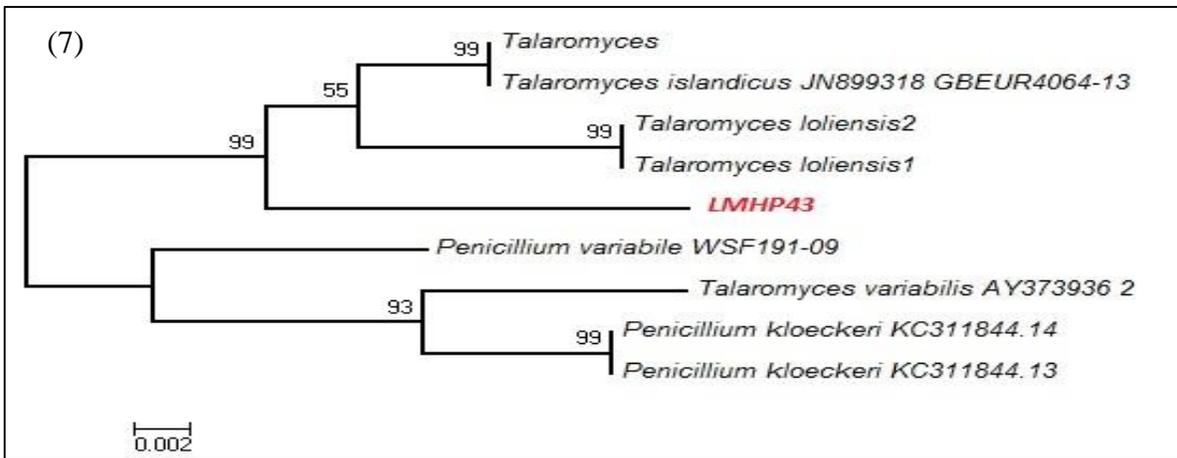
Las cepas LMHP19, LMHP33 y LMHP37 muestran características morfológicas similares a los miembros de la sección Sclerotiora del género *Penicillium*; es decir, presentan conidióforos monovigilados, masas conidiales de color gris verdoso y presencia de pigmento naranja en las placas con PDA (Ver Tabla 5 y Anexo 1) (Visage et al., 2013). Sin embargo, los resultados de la alineación múltiple y el análisis filogenético los ubican dentro de grupos de especies diferentes y podrían ser asignados como *Penicillium multicolor*, *Penicillium maximae* y *Penicillium mallochii* respectivamente (Figura 20). Asimismo, la identificación preliminar de las cepas LMHP14 y LMHP43 también los agrupaban dentro del género *Penicillium*. No obstante, en el análisis filogenético, ambas cepas no logran formar *clusters* de especies a pesar que se estos se alinean con clados el género *Talaromyces* (*Penicillium*) (Samson et al., 2011) con un 98 por ciento de similitud. Probablemente se requiere utilizar otras secuencias génicas para una identificación taxonómica más precisa.

Figura 20: Árbol filogenético basado en secuencias de la región ITS del ADNr de las 11 cepas aislada del suelo del bosque primario Macuya-UNU (Pucallpa, Perú) y seleccionadas como productoras de celulasas neutro alcalinas. Los números en las ramas indican valores de bootstrap. (1) LMHP06; (2) LMHP14; (3) LMHP19; (4) LMHP21; (5) LMHP29; (6) LMHP34 y LMHP44; (7) LMHP43; (8) LMHP32, LMHP33 y LMHP37.









V. CONCLUSIONES

1. Se han aislado un total de 50 cepas del suelo de bosque primario Macuya (Pucallpa, Ucayali) con capacidad celulolítica y corresponden a 15 géneros diferentes según su identificación morfológica; los géneros de mayor incidencia fueron *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp.
2. Se determinó cualitativamente que, de las 50 cepas aisladas, 11 presentaron actividad hidrolítica sobre carboximetilcelulosa (CMC) a pH neutroalcalinos, pues presentaron diámetros de halos mayores a 1cm de diámetro. Las cepas que destacaron fueron LMHP14, LMHP32, LMHP33, LMHP34, LMHP37 y LMHP43.
3. Si bien la prueba cualitativa en placa resultó ser una fuente importante de información preliminar para la detección de hongos celulolíticos, algunas de las cepas seleccionadas no resultaron ser los mejores productores en medio líquidos.
4. Al evaluar el efecto de las variables sustrato y tipo de cepa en la producción de enzimas celulolíticas, se determinó que ambos influyen significativamente; además lactosa, en comparación con celulosa microcristalina, resultó ser el mejor sustrato para obtener una respuesta de mayor de actividad enzimática.
5. Se determinó que el factor pH no tiene efecto significativo en la cuantificación de actividad papel filtro y endoglucanasa, lográndose en promedio actividades de 1.5 UmL⁻¹ y 0.5 UI mL⁻¹ respectivamente.
6. Las tres cepas que presentaron la mayor actividad papel filtro y endoglucanasa en condiciones neutroalcalinas fueron LMHP32, LMHP33 y LMHP37.
7. La identificación molecular de las 11 cepas seleccionadas reconfirma la presencia de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* en la mayoría de los casos.
8. En base al análisis de los resultados del secuenciamiento de la región ITS se logró determinar con un 99 por ciento de identidad, que las cepas LMHP32, LMHP33 y

LMHP37 corresponden a las especies de *Aspergillus nonius*, *Penicillium maximae* y *Penicillium mallochii* respectivamente.

9. LMHP14 y LMHP43 no logran formar grupos de especies a pesar de que se alinean con clados el género *Talaromyces* (*Penicillium*) con un 98 por ciento de similaridad.
10. Los suelos de los bosques de la amazonia resultan ser buena fuente de hongos industriales con características particulares; además la diversidad de hongos de suelos ha sido escasamente estudiada y requiere mayor atención.

VI. RECOMENDACIONES

1. Evaluar la producción de celulasas de las tres cepas seleccionadas a diferentes niveles de concentraciones de los componentes del medio de producción con el fin de determinar el medio óptimo para maximizar la producción enzimática y de este modo definir su grado de utilidad en los procesos industriales.
2. Profundizar el estudio de endoglucanasas de las tres cepas seleccionadas mediante la caracterización bioquímica y técnicas de biología molecular para determinar el perfil enzimático e identificar aquellos genes implicados en la expresión de dicha enzima y su posibilidad de aplicación en procesos de la industria.
3. Utilizar otras secuencias génicas conocidas como beta-tubulina y calmodulina para precisar la identificación filogenética de las 50 cepas aisladas y asimismo generar un banco de información sobre la diversidad fúngica en suelos de selva del Perú.
4. Evaluar si los hongos aislados presentan una fuente de contaminación toxicológica mediante la selección e identificación de genes que intervienen en la producción de metabolitos secundarios como micotoxinas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abrha, B. and Gashe, BA. 1992. Cellulase production and activity in a species of *Cladosporium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 8 (2):164-166.
- Adney, B; Baker, J. 1996. Measurement of cellulase activities. National Renewable Energy Laboratory, Technical Report NREL/TP-510-42628. 11 p.
- Anderson, IC; Campbell, CD and Prosser, JI. 2003a. Diversity of fungi in organic soils under a moorland – Scots pine (*Pinus sylvestris L.*) gradient. *Environmental Microbiology*. 5 (11):1121–1132.
- Anderson, IC; Campbell, CD and Prosser, JI. 2003b. Potential bias of fungal 18S rDNA and internal transcribed spacer polymerase chain reaction primers for estimating fungal biodiversity in soil. *Environmental Microbiology*. 5 (1):36–47.
- Anderson, IC and Cairney, JWG. 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology*. 6 (8):769–779.
- Andreotti, RE; Mederios, JE; Roche, C and Mandels, M. 1980. Effects of strain and substrate on production of cellulases by *Trichoderma reesei* mutants. In: Ghose TK (Ed.) *Bioconversion Bioengineering Symposium 2*, New Delhi, BERG, IIT. 353–371.
- Anish, R; Rahman, MS; Rao M. 2007. Application of cellulases from an alkalothermophilic *Thermomonospora* sp. In biopolishing of denims. *Biotechnol Bioeng*. 96 (1):48–56.
- Aubert, J. (1998). *Biochemistry and Genetics of Cellulose degradation*. *Academis Press. USA*. pp. 11.
- Barnett, HL and Hunter, BB. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th edition. APS Press, St. Pau, Minnesota, 218 p.
- Bayer, EA; Lamed, R; Himmel, M. 2007. The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management. *Current Opinion in Biotechnology*. 18 (3):237-245.

- Begerow, D; Nilsson, H; Unterseher, M; Maier, W. 2010. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Appl Microbiol Biotechnol.* 87 (1):99–108.
- Bellemain, E; Carlsen, T; Brochmann, C; Coissac, E; Taberlet, P and Kauserud, H. 2010. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology* 10:189.
- Benson, HJ. 2002. *Microbiological Applications: Laboratory Manual in General Microbiology.* 8th Edition, McGraw Hill, New York, 4.
- Bhat, MK. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances.* 18 (5): 355-383.
- Bhat, MK and Bhat, S. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances,* 15 (3-4): 583-620.
- Borneman, J and Hartin, RJ. 2000. PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 66 (10): 4356–4360.
- Bradner, JR; Gillings, M and Nevalainen, KM. 1999. Qualitative assessment of hydrolytic activities in antarctic microfungi grown at different temperatures on solid media. *World Journal of Microbiology and Biotechnology,* 15 (1): 131-132.
- Bridge, PD and Spooner, BM. 2001. Soil fungi: diversity and detection. *Plant and Soil* 232(1-2):147–154.
- Buchert, J and Heikinheimo, L. 1998. New cellulase processes for the textile industry. EU-project report. *Carbohydrates in Europe.* 22:32-34.
- Buschle-Diller, G., El Mogashzy, Y; Inglesby, MK and Zeronian, SH. 1998. Effects of scouring with enzymes, organic solvents, and caustic soda on the properties of hydrogen peroxide bleached cotton yarn. *Textile Research Journal,* 68(12): 920–929, ISSN 0040-5175.
- Camassola, M and Dillon, AJP. 2014. Effect of different pretreatment of sugar cane bagasse on cellulase and xylanases production by the mutant *Penicillium echinulatum* 9A02S1 grown in submerged culture. *Bio Med Res Int.* 2014:1-9.
- Cavaco-Paulo, A; Morgado, J; Almeida, L and Kilburn, D. 1998. Indigo backstaining during cellulase washing. *Textile Research Journal.* 68(6):398–401.

- Chahal, PS; Chahal, DS and André G. 1992. Cellulase production profile of *Trichoderma reesei* on different cellulosic substrates at various pH levels. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 74:126–128.
- Chand, P; Aruna, A; Maqsood, AM and Rao, LV. 2005. Novel mutation method for increased cellulase production. *Journal of Applied Microbiology*. 98(2):318–323.
- Chellapandi, P; Himanshu, MJ. 2008. Production of endoglucanase by the native strains of *Streptomyces* isolates in submerged fermentation. *Brazilian J Microbiol*. 39: 122-127.
- Chen, DM and Cairney, JWG. 2002. Investigation of the influence of prescribed burning on ITS profiles of ectomycorrhizal and other soil fungi at three Australian sclerophyll forest sites. *Mycol Res*. 106: 532–540.
- Conrad, L; Schoch, KA; Seifert, SH; Vincent Robert, JL; Spouge, C; André Levesque, WCh and Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 109(16): 6241–6246.
- Coutinho PM, Henrissat B. 1999. Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. In: *Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering* (eds. H. J. Gilbert, G. Davies, B. Svensson, B. Henrissat). The Royal Society of Chemistry, Cambridge. 3–12p.
- Cordero, D. (ed.) (2012). *Una mirada integral a los bosques del Perú*. UICN, Quito, Ecuador. 50p.
- Crueger, W and Crueger, A. 1984. *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*. T.D. Brock Ed.; Science Technology Inc., Madison. 49–53p.
- Dashtban, M; Maki, M; Leung, KT; Mao, C; Qin, W. 2010. Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. *Critical Reviews in Biotechnoogyl*. 30:302–309.
- De Castro, AM; De Albuquerque; De Carvalho, ML; Leite, SG; Pereira, NJ. 2010. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*. 37:151-158.
- De Vries, RP and Visser, J. 2001. Aspergillus enzymes involve in degradation of plant cell Wall polysaccharides. *Microbiology Molecular Biology Review*. 65:497-522.
- Dutta, T; Sengupta, R; Sahoo, R; Sinha Ray, S; Bhattacharjee, A. and Ghosh, S. (2007). A novel cellulase free alkaliphilic xylanase from alkali tolerant *Penicillium citrinum*:

- production, purification and characterization. *Letters in Applied Microbiology*. 44:206–211.
- Dutta, T; Sahoo, R; Sengupta, R; Ray, SS; Bhattacharjee, A; Ghosh, S. 2008. Novel cellulases from an extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrinum*: production and characterization. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:275–82.
 - Embong, Z; Wan Hitam, WH; Yean, CY. 2008. Specific detection of fungal pathogens by 18S rRNA gene PCR in microbial keratitis. *BMC Ophthalmol*. 2008:7.
 - Eveleigh, D; Mandels, M; Andreotti, R and Roche, C. 2009. Measurement of saccharifying cellulase. *Journal Biotechnology for biofuels*. 2:21.
 - Fan, LT; Gharpuray, MM; Lee, YH. 1987. Cellulose hydrolysis. Springer-Verlag, Berlin, 1–68p.
 - FAO. 2010. Forest resources assessment 2010. FAO Forestry Paper 163. FAO, Rome, Italy.
 - Fülöp, L; Ponyi, T. 1997. Rapid screening for endo-b-1,4-glucanase and endo-b-1,4-mannanase activities and specific measurement using soluble dye-labelled substrates. *Journal of Microbiology Methods*. 29:15–21.
 - Freeman, K; Martin, A; Karki, D, Lynch, R; Mitter, M; Meyer, A; Longcore, J; Simmons, D; Schmidt, S. 2009. Evidence that chytrids dominate fungal communities in high-elevation soils. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 106(43):18315-18320.
 - Frohlich-Nowoisky, J; Pickergill, D; Despres, V; Poschl, U. 2009. High diversity of fungi in air particulate matter. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA*, 106:12814-12819.
 - Fritscher, C; Messner, R and Kubicek, CP. 1990. Cellobiose metabolism and cellobiohydrolase I biosynthesis by *Trichoderma reesei*. *Experimental Mycology*. 14:405–15.
 - Galbe, M and Zacchi, G. 2002. A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59:618-628.
 - Galante, YM; De Conti, AD and Monteverdi, R. 1998a. Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries. In: *Trichoderma and Gliocladium*, vol.2. G. E.

- Harman & C. P. Kubicek (eds), pp. 327-342, Taylor & Francis, London, United Kingdom.
- Galante, Y; Conti, AD. & Monteverdi, R. 1998b. Application of Trichoderma enzymes in the textile industry. In: Trichoderma and Gliocladium, vol. 2. G. E. Harman & C. P. Kubicek (eds), pp. 311-325, Taylor & Francis, London, United Kingdom.
 - Gardes, M and Bruns TD. 1996. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: Above- and below-ground views. *Can. J. Bot.* 74:1572–1583.
 - Gardes, M and Bruns, TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhiza and rusts. *Mol Ecol* 2: 113–118.
 - Gautam, SP; Bundela, PS; Pandey, AK; Jamaluddin, MK; Awasthi and Sarsaiya S. 2012. Diversity of Cellulolytic Microbes and the Biodegradation of Municipal Solid Waste by a Potential Strain. *International Journal of Microbiology.* 1-12p.
 - Gayal, SG; Khandeparkar. 1998. Production of cellulase by *Penicillium funiculosum*. *Indian J Microbiol.* 38:167-168.
 - Gibson, L; Lee, T and Koh, L. 2011. Primary forests are irreplaceable for sustaining tropical biodiversity. *Nature* (478): 378–381.
 - Ghose, TK. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59: 257-268.
 - Gochenauer, SE. 1970. Soil fungi of Peru. *Mycopathologia et Mycologia Applicata.* 42:259–272.
 - Gochenauer, SE. 1975. Distributional patterns of mesophilous and thermophilous microfungi in two bahamian soils. *Mycopathologia.* 57(3):155–164.
 - Godfrey, T. 1996. Textiles. In: *Industrial enzymology*, 2nd ed. Edited by Godfrey T. and West S. Macmillan Press Ltd. London. pp. 360–71.
 - Godfrey, T. and West, SI.1996). Introduction to industrial enzymology. In: *Industrial Enzymology*, 2nd edn. Edited by Godfrey, T and West S. Macmillan Press Ltd. London pp. 1-8.
 - Grey, M and Brendel, M. 1992. Rapid and simple isolation of DNA from agarose gels. *Current Genetics.* 22:83-84.

- Gusakov, AV; Sinitsyn, AP; Markov, AV; Sinitsyna, OA; Ankudimova, NV; Berlin, AG. 2000a. Study of protein adsorption on indigo particles confirms the existence of enzyme–indigo interaction sites in cellulase molecules. *J Biotechnol* 87:83–90.
- Gusakov, AV; Sinitsyn, AP; Markov, AV; Skomarowsky, AA; Sinitsyna, OA; Berlin, AG. 2000b. Indigo-binding domains in cellulase molecules. In: Lunin VV, editor. *Biocatalysis-2000: fundamentals and applications*, Khimiya: Vestnik Moskovskogo Universiteta. 41(6):77– 80.
- Gusakov, AV. 2011. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends in Biotechnology*. 29(9):419-425.
- Gusakov, AV and Sinitsyn, AP. 2012. Cellulases from *Penicillium* species for producing fuels from biomass. *Biofuels* 3:463–477.
- Gutierrez-Correa, M. 2007. *Biotecnología, Biodiversidad y Bioeconomía*. Perú Económico. Enero, 26-27p.
- Ilmen, M; Saloheimo, A; Onnela, ML and Penttilä, ME. 1997. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(4):1298-1306.
- Hamilton, JA and Was, D. 1991. Some components of cellulases from two different strains of *Aspergillus fumigates*. *Process Biochem*. 26:287-290.
- Hawksworth, DL. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol Res* 95: 641–655.
- Hawksworth, DL. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res* 105: 1422–1432.
- Hawksworth, DL and Rossman, AY. 1997. Where are all the undescribed fungi? *Phytopathology* 87: 888–891.
- Hebeish, A and Ibrahim, NA. 2007. The impact of frontier sciences on textile industry. *Colourage*. 54:41–55.
- Heikinheimo, L and Buchert, J. 2001. Synergistic effects of *Trichoderma reesei* cellulases on the properties of knitted cotton fabric. *Textile Res. J.* 71:672-677.
- Heikinheimo, L; Buchert, J; Miettinen-Oinonen, A and Suominen, P. 2000. Treating denim fabrics with *Trichoderma reesei* cellulases. *Textile Res. J.* 70:969-973.

- Hendricks, C; Doyle, J and Hugley, B. 1995. A New Solid Medium for Enumerating Cellulose-Utilizing Bacteria in Soil. *Applied Environmental Microbiology*. 61(5): 2016-2019.
- Hendrickson, O. 2003. Old-growth forests: Data gaps and challenges. *The Forestry Chronicle*. 79(3):645–651.
- Himmel, ME; Ruth MF; Wymann, CE. 1999. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. *Current Opinion of Biotechnology*. 10:358–64.
- Holling, C. 1973. Resilience and Stability of Ecological Systems *Annual Review of Ecology and Systematics* 4: 1-23.
- Huang, XP and Mon, C. Purification and characterization of a cellulase (CMCase) from a newly isolated thermophilic aerobic bacterium *Caldibacillus cellulovorans* gen. nov., sp. nov. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 20(2004): 85–92.
- Huber, GW; Iborra, S and Corma, A. 2006. Synthesis of transportation fuels from biomass: chemistry, catalysts, and engineering. *Chemical Reviews*. 106(9):4044-4098.
- Jarvis, M. (2003). Cellulose stacks up. *Science*. 426:611–612.
- Jónás, Á; Fekete, E; Flippi, M; Sándor, E; Jäger, S; Molnár, ÁP; Szentirmai, A; Karaffa L. 2014. Extra- and intracellular lactose catabolism in *Penicillium chrysogenum*: Phylogenetic and expression analysis of the putative permease and hydrolase genes. *J Antibiot*. 67:489–497.
- Jorgensen, H; Morkeberg, A; Krogh, KBR and Olsson, L. 2005. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: Effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis. *Enzyme Microbial Technology*. 36:42-48.
- Jorgensen, H and Olsson, L. 2006. Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888: Effect of substrate on hydrolytic performance. *Enzymes and Microbial Technology*. 38:381-390.
- Juturu, V; Wu, JCh. 2014. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 33:188–203
- Kawamori, M; Morikawa, Y and Takasawa, S. 1986. Induction and production of cellulases by L-sorbose in *Trichoderma reesei*. *Applied of Microbiology and Biotechnology*. 24:449–453.

- Karaffa, L; Fekete, E; Gamauf, C; Szentirmai, A; Kubicek, CP; Seiboth B. 2006. D-Galactose induces cellulase gene expression in *Hypocrea jecorina* at low growth rates. *Microbiology*. 152: 1507–1514.
- Karmakar, M and Ray, RR. 2011. Current trends in research and application of microbial cellulases. *Research Journal of Microbiology*. 6(1):41–53.
- Kathiresan, K., Manivannan, S., 2006. Cellulase production by *Penicillium fellutanum* isolated from coastal mangrove rhizosphere soil. *Research Journal of Microbiology* 1: 438-442.
- Keskar, SS. 1992. Cellulase production by *Penicillium janthinellum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 8:534-535.
- Khalid; Yang, WJ; Kishwar, N; Rajput, ZI and Arijio, AG. 2006. Study of cellulolytic soil fungi and two nova species and new medium. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*. 7(6): 459-466.
- Klahorst, S; Kumar, A and Mullins, M. 1994. Optimizing the use of cellulase enzymes. *Textile Chemistry and Colorist*. 26:2
- Kleman-Leyer, K; Siikaaho, M; Teri, T and Kirk, K. 1996. The cellulases endoglucanase I and cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* act synergistically to solubilize native cotton cellulose but not to decrease its molecular size. *Applied of Environment and Microbiology*. 62:2883-2887.
- Krug, JC. 2004. Moist Chambers for the development of fungi. In: Mueller, G.M., Bills, G.F. and Foster, M.S. (eds). *Biodiversity of fungi: Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier, Amsterdam, pp. 271-302.
- Kochavi, D; Videbaek, T and Cadroni, D. 1990. Optimizing processing conditions in enzymatic stonewashing. *American Dyestuff Reporter*, pp. 26–28.
- Krogh, KB; Morkeberg, A; Jorgensen, H; Frisyad, JC; Olsson, L. 2004 Screening genus *Penicillium* for producers of cellulolytic and xylanolytic enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*. 113-116: 389-401.
- Kubicek, CP; Messner, R; Gruber, F; Mach, RL and Kubicek-Pranz, EM. 1993. The *Trichoderma reesei* cellulase regulatory puzzle: from the interior life of a secretory fungus. *Enzyme Microbiology and Technology*. 15:90–99.
- Kubicek, CP and Penttila, ME. 1998. Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. In: Harman, GE, Kubicek, CP, editors. *Trichoderma*

- and *Gliocladium*, Enzymes, biological control and commercial applications, Bristol: Taylor & Francis Ltd. 2: 49–67 [Chapter 3].
- Kubicek, CP; Mikus, M; Schuster, A; Schmoll, M. and Seiboth, B. 2009. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnology for Biofuels*. 2(1):1–14.
 - Kuhad, RC; Manchanda, M and Singh, AV. 1999. Hydrolytic potential of extracellular enzymes from a mutant strain of *Fusarium oxysporum*. *Bioprocess Engineer*. 20:133-135.
 - Kuhad, RC; Gupta, R; Singh, A. 2011. Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research*. 2011:10.
 - Kumar, A; Purtell, C; Yoon, MY. 1996. Performance characterisation of endo-riched cellulase enzymes in the treatment of 100 por ciento lyocell and lyocell-blended fabrics. In: *Proceedings of the Textile Institute's 77th World Conference*, May 21–24, Tampere, Finland. pp. 177–89.
 - Larena, I; Salazar, O; González, V; Julián, MC and Rubio, V. 1999. Design of a primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. *J Biotechnol*. 75:187–194.
 - Li, Y; Hardin, IR. 1997. Enzymatic Scouring of Cotton: Effects on Structure and Properties. *Textile Chemist and Colorist & American Dyestuff Reporter*. 29(8):71-76.
 - Lowry, OH; Rosebrough, NJ; Farr, AL and Randall, RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193(1):265–275.
 - Lord, NS; Kaplan, CW; Shank, P; Kitts, CL and Elrod, SL. 2002. Assessment of fungal diversity using terminal restriction fragment (TRF) pattern analysis: comparison of 18S and ITS ribosomal regions. *FEMS Microbiol Ecol*. 42:327–337.
 - Lu, W; Wang, H; Yang, S; Wang, Z; Nie, Y. 2005. Isolation and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co-composting system. *J. Gen. Applied Microbiol*. 51:353-360.
 - Lyman, E; Li, B and Renganathan, V. 1995. Purification and Characterization of a cellulose-binding β -glucosidase from cellulose degrading cultures of *Phanaerochaete chrysosporium*. *Applied Environmental Microbiology*. 8:2976-2980.

- Lynd, LR; Weimer, PJ; Van Zyl, WH; Pretorius, IS. 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology Molecular Biology Review*. 66(3):506-577.
- Lynd, LR and Zhang, Y. 2002. Quantitative determination of cellulase concentration as distinct from cell concentration in studies of microbial cellulose utilization: analytical framework and methodological approach. *Biotechnology Bioengineering*. 77:467-475.
- Mach, RL and Zeilinger, S. 2003. Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 60:515-522.
- Mach, RL; Seiboth, B; Myasnikov, A; Gonzalez, R; Strauss, J; Harkki, AM; et al. 1995. The Bgl1 gene of *Trichoderma reesei* QM-9414 encodes an extracellular, cellulose inducible beta-glucosidase involved in cellulose induction by sophorose. *Molecular Biology*. 16:687-97.
- Mandels, M and Reese, ET. 196). Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *Journal Bacteriology*. 79:816-826.
- Marjamaa, K; Toth, K; Bromann, PA; Szakacs, G; Kruus, K. 2013. Novel *Penicillium* cellulases for total hydrolysis of lignocellulosics. *Enzyme Microb Technol*. 52:358-369.
- Poletto, M; Pistor, V and Zattera, AJ. 2013. Structural Characteristics and Thermal Properties of Native Cellulose. *Cellulose - Fundamental Aspects*. Theo Van de Ven and Louis Godbout (Ed.), ISBN: 978-953-51-1183-2, InTech.
- Miettinen-Oinonen, A; Londesborough, J; Joutsjoki, V; Lantto, R and Vehmaanpera, J. 2004. Three cellulases from *Melanocarpus albomyces* for textile treatment at neutral pH. *Enzyme and Microbial Technology*. 34(3-4):332-344.
- MINAM, 2010. El Perú y el Cambio Climático: Segunda Comunicación Nacional Del Perú a la CMNUCC. MINAM, Lima, Perú.
- MINAM – MINAG, 2011. El Perú de los Bosques. MINAM – MINAG. Lima, Perú.
- Miller, GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31(3):426-428.
- Moekerbak, AL and Zimmermann, W. 1998. Applications of Enzymes in Paper Deinking Processes. In: *Enzyme Applications in fiber Processing*, Eriksson, K. and A. A. Cavaco-Paulo (Eds.). Vol. 687. American Chemical Society, Washington, D.C., ISBN-13: 9780841235472e, pp: 133-141.

- Möller, EM; Bahnweg, G; Sandermann, H and Geiger, HH. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research*. 22:6115-6116.
- Montenecourt, BS and Eveleigh, DE. 1977. Semiquantitative plate assay for determination of cellulase production by *Trichoderma viride*. *Applied and Environmental Microbiology*. 33(1):178–183.
- Moon, RJ; Martini, A; Nairn, J; Simonsen, J; Youngblood, J. 2011. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chem. Soc. Rev.* 40: 3941-3994.
- Morikawa, Y; Ohashi, T; Mantani, O and Okada, H. 1995. Cellulase induction by lactose in *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Applied Biochemical Biotechnology*. 44:106–11.
- Mosseler, A; Thompson, I and Pendrel, B. 2003. Overview of old-growth forests in Canada from a science perspective. *Environmental Review* (11):1–7.
- Mueller, GM and Bills GF. 2004. Introduction. In: Mueller, GM; Bills, GF; Foster, MS. (eds). *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Elsevier Academic Press, San Diego. pp 1–4.
- Murali, HS; Mohan, MS; Manja, KS and Sankaran, R. 1994. Cellulolytic activity of four *Fusarium sp.* *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 10:487.
- Mukerji, KG. 1966. Ecological studies on the microorganic population of usar soils. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*. 29(3-4):339–349.
- Nelson, DL; Nelson, D L; Lehninger, AL and Cox, MM. 2008. *Lehninger principles of biochemistry*. New York: W.H. Freeman.
- Nierstrasz, V and Warmoeskerken, M. 2003. Process engineering and industrial enzyme applications. In: Cavaco-Paulo, A. and G,bitz, G. (eds.) *Textile processing with enzymes*, Woodhead Publishing Ltd., England. pp. 120:157.
- Nilsson, R; Ryberg, M; Abarenkov, K; Sjökvist, E; Kristiansson, E. 2009. The ITS región as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. *FEMS Microbiology Letters*. 296:97-101.
- Nogawa, M; Goto, M; Okada, H and Morikawa, Y. 2001. L-sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. *Current Genetic*. 38:329–334.

- O'Brien, H; Parrent, J; KJackson, J; Moncalvo, J; Vilgalys, R. 2005. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(9):5544-5550.
- Olson, L and Stanley, P. 1990. Compositions and methods to vary color density. Pat. WO 90/02790.
- Pakula, TM; Salonen, K; Uusitalo, J; Penttila, M. 2005. The effect of specific growth rate on protein synthesis and secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Microbiology*. 151:135–143.
- Pereira, BMP; Alvarez, TM; Da Silva Delabona, P; Dillon, AJP; Squina, FM; Da Cruz Pradella, JG. 2013. Cellulase On-Site Production from Sugar Cane Bagasse Using *Penicillium echinulatum*. *BioEnergy Research*. 6:1052–1062.
- Pfenning, LH and De abreu, LM. 2006. Diversity of Microfungi in Tropical Soils. In: Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems. Moreira, FMS and Siqueira, JO and Brussaard, L (eds). Cromwell Press, UK, Trowbridge.
- Picart, P; Diaz, P and Pastor, FIJ. 2007. Cellulases from two *Penicillium sp.* strains isolated from subtropical forest soil: production and characterization. *Letters in Applied Microbiology*. 45(1):108–113.
- Pickles, B; Genney, D; Potts, J; Lennon, J; Anderson, I and Alexander I. 2010. Spatial and temporal ecology of Scots pine ectomycorrhizas. *New Phytologist*.
- Romero, MD; Aguado, J; González, L; Ladero, M. 1999. Cellulase production by *Neurospora crassa* on wheat straw. *Enzyme Microbiology Technology*. 25:244 –50.
- Sandhu, DK and Singh, S. 1981. Distribution of thermophilous microfungi in forest soils of Darjeeling (Eastern Himalayas). *Mycopathologia*. 74(2):79–85.
- Schlesinger, WH. 1991. Biogeochemistry: an analysis of global change. Academic, San Diego. pp. 443.
- Samson, R.A., Yilmaz, N., Houbraken, J., Spierenburg, H., Seifert, K.A., Peterson, S.W., Varga, J., Frisvad, J.C., 2011. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Stud. Mycol.* 70:159–183.

- Szengyel, Z; Zacchi, G; Varga, A; Reczey, K. 2000. Cellulase production of *Trichoderma reesei* Rut C-30 using steam-pretreated spruce. Hydrolytic potential of cellulases on different substrate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 84-86:679–691.
- Skomarovsky, AA; Gusakov, AV; Okunev, ON; Solovéva, IV; Bubnova, TV; Kondratéva, EG; Sinitsyn, AP. 2005. Studies of hydrolytic activity of enzyme preparations of *Penicillium* and *Trichoderma* fungi. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 41, 182–184.
- Sehnem, NT; Bittencourt, LR; Camassola, M and Dillon, AJP. 2006. Cellulase production by *Penicillium echinulatum* on lactose. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72:163–167.
- Seiboth, B; Pakdaman, BS; Hartl, L and Kubicek, CP. 2007. Lactose metabolism in filamentous fungi: how to deal with an unknown substrate. *Fungal Biology Reviews*. 21(1):42–48.
- Seiboth, B; Hoffman, CP and Kubicek, CP. 2002. Lactose metabolism and cellulase production in *Hypocrea jecorina*: the gal7 gene, encoding galactose-1-phosphate uridylyltransferase, is essential for growth on galactose but not for cellulase induction. *Molecular Genetic Genomics*. 267:124–132.
- Seifert, K. 2009. Progress towards DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Resources*. 9(1): 83- 89.
- Sylvia, DM; Fuhrmann, JJ; Hartel, PG; Zuberer, DA. 2005. Principles and applications of soil microbiology (2nd ed.). Upper Saddle River, N.J.: Prentice Hall.
- Singh, A; Kuhad, RC and Ward, OP. 2007. Industrial application of microbial cellulases in Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects. Kuhad, RC and Singh, A. (Eds.). I.K.International Publishing House, New Delhi, India. pp. 345– 358.
- Singh, A. (1999). Engineering enzyme properties. *Indian Journal of Microbiology*. 39(2):65–77.
- Singhanian, RR; Sukumaran, RK; Patel, AK; Larroche, C; Pandey, A. 2010. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases *Enzyme and Microbial Technology*. 46: 541–549.
- Solovjeva, I; Ben-Bassat, A; Burlingame, R and Chernoglazov, V. 1998. *Chrysosporium* cellulase and methods of use. Pat. WO 98/15633.

- Sukumaran, RK; Singhania, RR and Pandey, A. 2005. Microbial cellulases production, applications and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 64(11):832–844.
- Sulzenbacher, G; Schulein, M; Davis, GJ. 1997. Structure of the endoglucanase I from *Fusarium oxysporum*: native, cellobiose, and 3, 4-epoxybutyl beta-D-cellobioside-inhibited forms, at 2.3 Å resolution. *Biochem*. 36 (19): 5902-5911.
- Steiner, J; Socha, C; Eyzaguirre, J. 1994. Culture conditions for enhanced cellulase production by a native strain of *Penicillium purpurogen*. *World J Microbiol Biotechnol*. 10: 280-284.
- Straatsma, G; Ayer, F and Egli, S. 2001. Species richness, abundance, and phenology of fungal fruit bodies over 21 years in a Swiss forest plot. *Mycol. Res*. 105:515–523.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5, molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731e2739.
- Teather, R and Wood, P. 1982. Use of Congo red – polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied Environmental Microbiology*. 43(4): 777-780.
- Teeri, TT; Koivula, A; Linder, M; Wohlfahrt, G; Divne, C; Jones, TA. 1998. *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose? *Biochemical Society. Trans*. 26:173–178.
- Ten, LN; Ima, W-T; Kanga, M-KS and Leea, S-T. (2004). Development of a plate technique for screening of polysaccharide degrading microorganism by using a mixture of insoluble chromogenic substrates. *Journal of Microbiological Methods*. 56(3): 375-382.
- Thirumale, S; Swaroopa, RD and Nand, K. 2001. Control of cellulase formation by trehalose in *Clostridium papyrosolvens* CFR-703. *Process Biochemical*. 37:241–245.
- Ting, ASY; De Cruz G and Chan HY. 2008. Comparison of forest soils and waste-contaminated soils as sources of polysaccharide-degrading microbes. *Journal of Applied Biosciences*. 3:67 - 75.

- Tyndall, M. 1990. Upgrading garment washing techniques. *American Dyestuff Reporter*. May, 22–30.
- Uhlig, H. 1998. *Industrial Enzymes and Their Applications*. John Wiley & Sons, New York, NY, USA.
- Van Dyk, JS; Pletschke, BI. 2012. A review of lignocellulose bioconversion. *Biotechnology Advances*. 30:1458–1480.
- Varghese, G. 1972. Soil microflora of plantations and natural rain forest of West Malaysia. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*. 48 (1):43–61.
- Visagie CM, Houbraeken J, Rodrigues C, Pereira CS, Dijksterhuis J, Seifert KA, Jacobs K, Samson RA. 2013. Five new *Penicillium* species in section *Sclerotiora*: A tribute to the Dutch Royal family. *Persoonia*. 31:42–62.
- Wadsworth, FH. 2000. Producción forestal para América Tropical. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Washington D.C.
- White, TJ; Bruns, T; Lee, S and Taylor, JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322.
- Wilson D. 2008. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1125:289-297.
- Villena, GK; Venkatesh, L; Yamazaki, A; Tsuyumu, S and Gutiérrez-Correa M. 2009. Initial intracellular proteome profile of *Aspergillus niger* biofilms. *Revista Peruana de Biología*. 16:101–108.
- Wessel, D and Flugge, UI. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry*. 138(1):141–143.
- Whitmore, T. 1982. On pattern and process in forest. In: E.I. Newman (Editor), *The Plant Community as a Working Mechanism*. Blackwell, Oxford, pp. 45-59.
- Wood, TM. 1989. Mechanisms of Cellulose Degradation by Enzymes from Aerobic and Anaerobic Fungi. In: *Enzyme Systems for Lignocellulose Degradation*, Coughlan, M.P. (Ed). *Elsevier Applied Science*, London, pp: 17-35.
- Yazdi, MT; Woodward, JC and Radford, A. 1990. The cellulase complex of *Neurospora crassa*: activity, stability and release. *Journal of General Microbiology*. 136:1313-1319.

- Yi, JC; Sandra, JC; John, AB and Shuting, C. 1999. Production and distribution of endoglucanase, cellobiohydrolase and β -glucosidase components of the cellulolytic system of *Volvariella volvacea*, the edible straw mushroom. *Applied Environmental Microbiology*. 65: 553-559.
- Zhang, Y-HP and Lynd, LR. 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. *Biotechnology and Bioengineering*. 88:797–824.
- Zhang, Y; Himmel, M and Mielenz, J. 2006. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*. 24: 452- 481.
- Zinger, L; Coissac, E; Choler, P; Geremia, R. 2009. Assessment of microbial communities by graph partitioning in a study of soil fungi in two alpine meadows. *Applied and Environmental Microbiology*. 75:5863-5870.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Fotografías de las 11 cepas fúngicas aisladas de nuestras de suelo del bosque primario Macuya (Pucallpa-Ucayali) y seleccionadas como productoras de celulosas que actúan en condiciones neutroalcalinas.

Las siguientes fotografías muestran las características macroscópicas de la colonia fúngica ((A) haz y (B) envés) en un periodo de desarrollo de 3 a 5 días; luego en las microfotografías (C) se exponen las estructuras reproductivas (conidióforos, fiálides y conidias) de los hongos filamentosos con un aumento de 40X del lente objetivo.

Figura A1-1. Cepa LMHP06

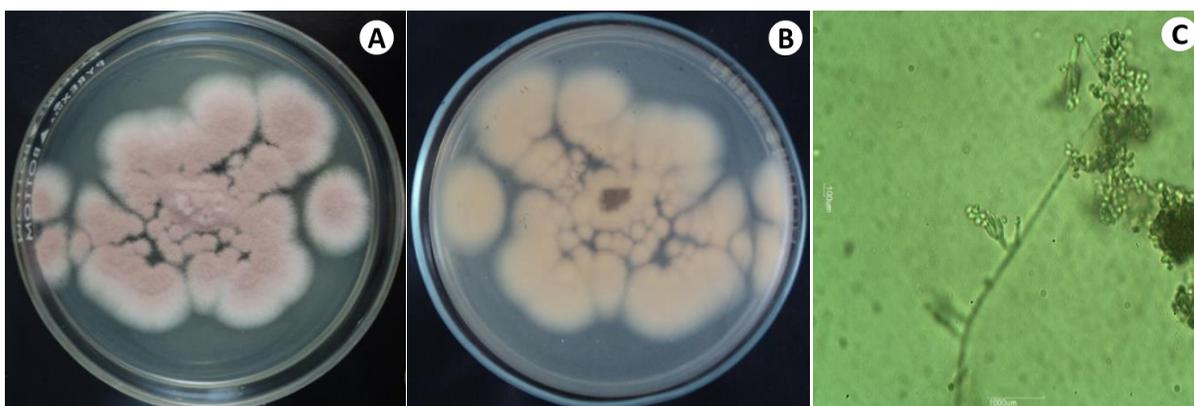


Figura A1-2. Cepa LMHP14

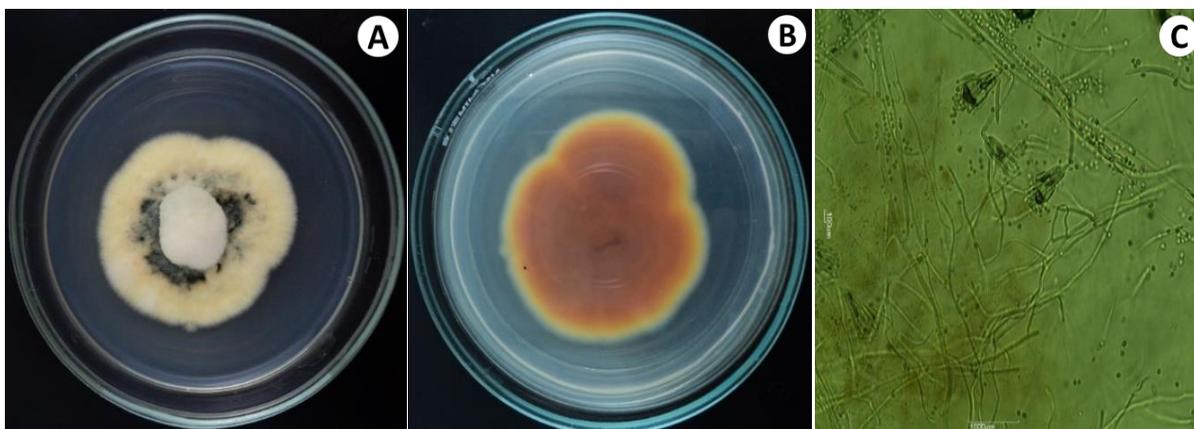


Figura A1-3. Ceba LMHP19

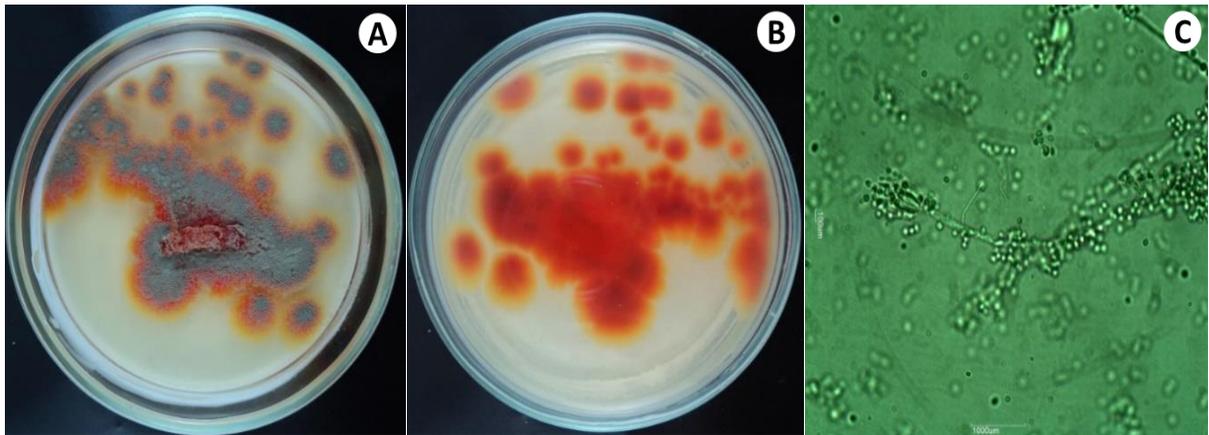


Figura A1-4. Ceba LMHP21

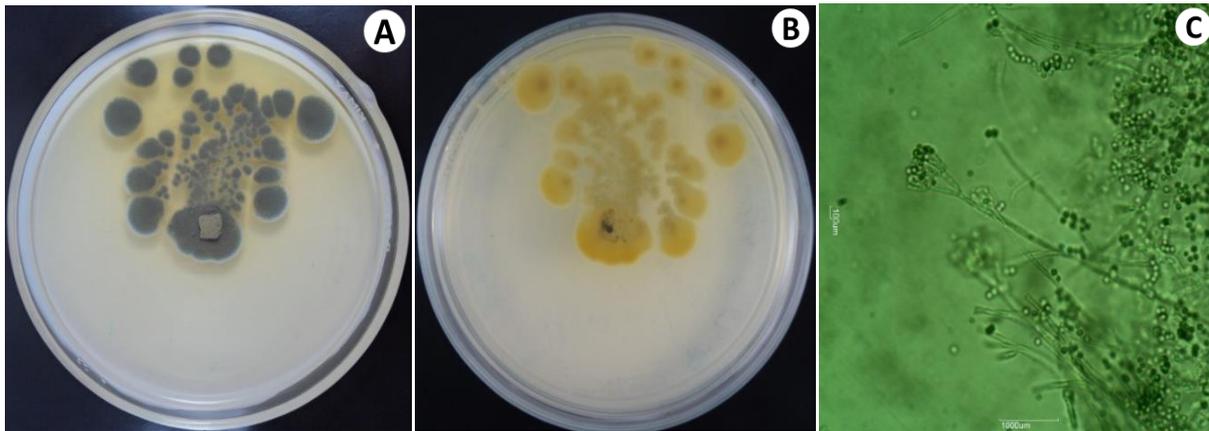


Figura A1-5. Ceba LMHP29

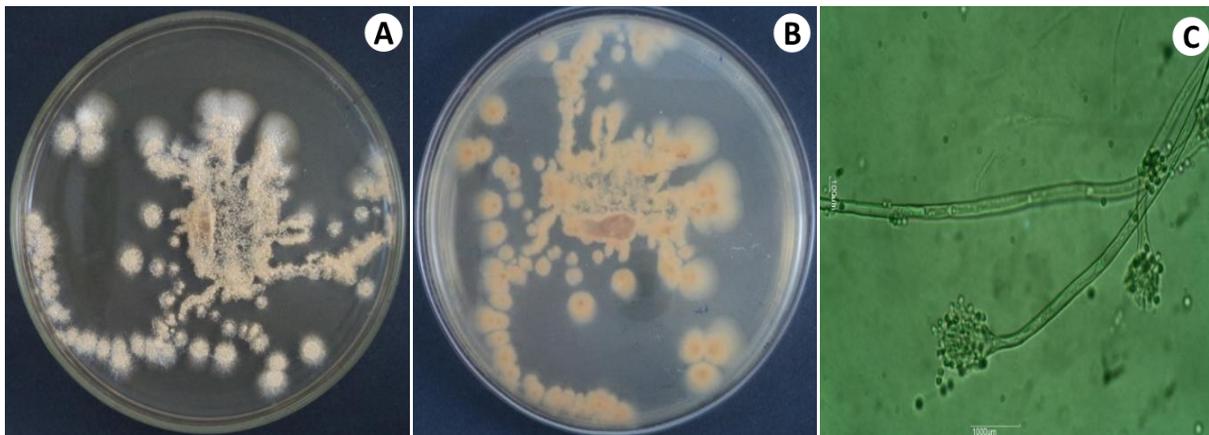


Figura A1-6. Ceba LMHP32

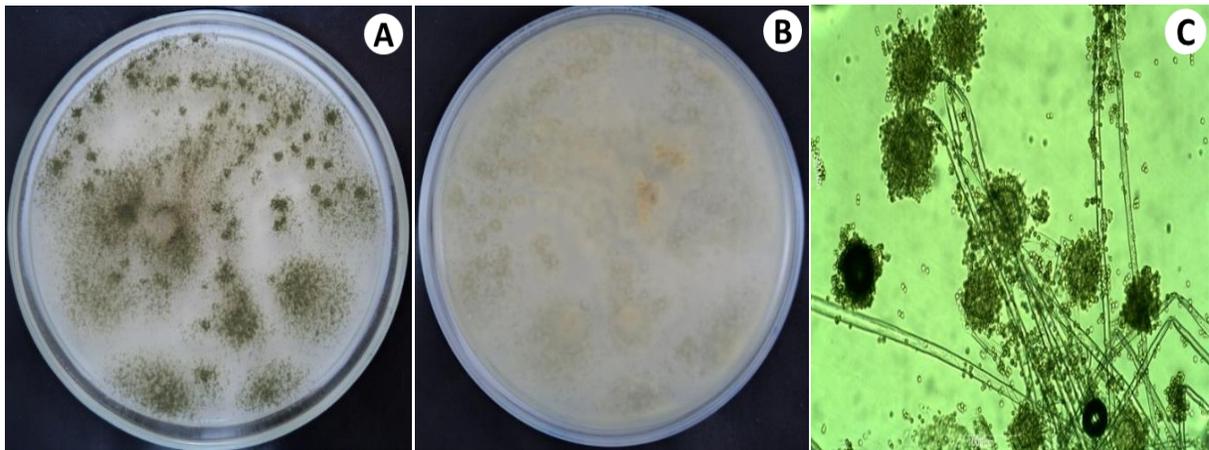


Figura A1-7. Ceba LMHP33

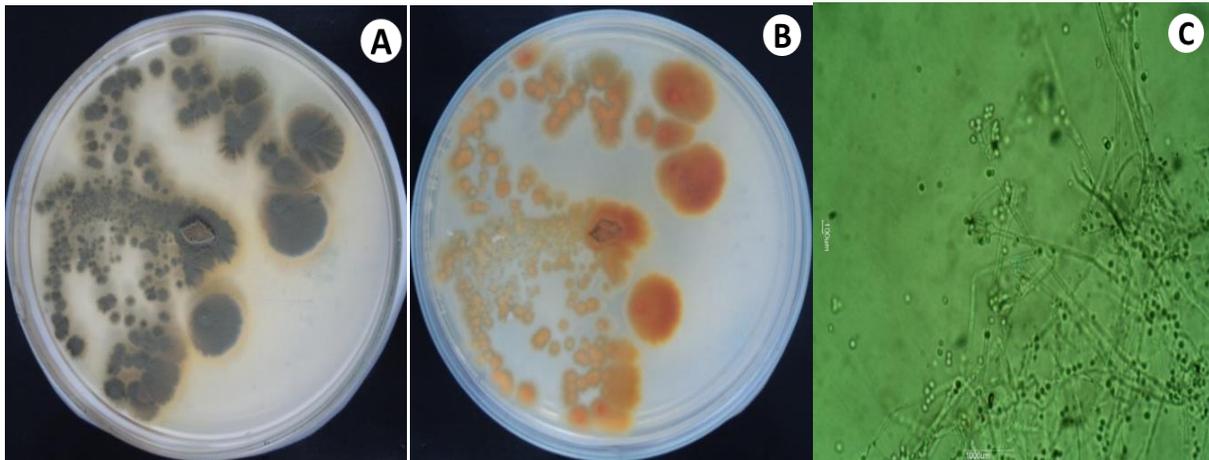


Figura A1-8. Ceba LMHP34

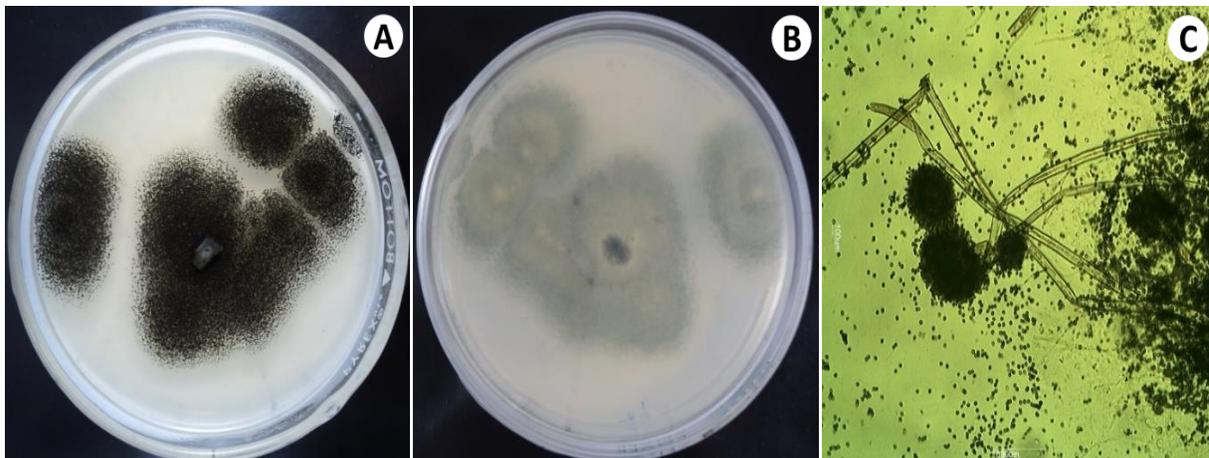


Figura A1-9. Ceba LMHP37

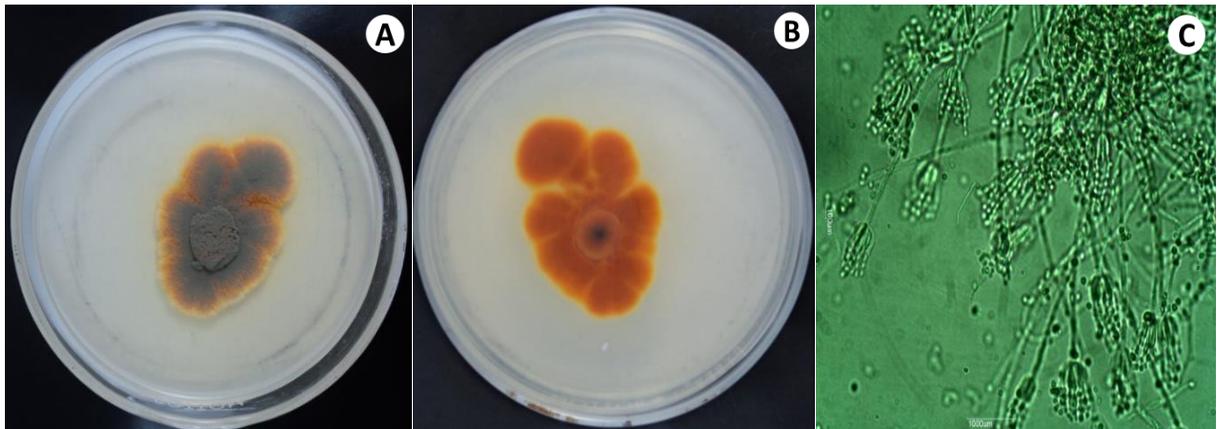


Figura A1-10. Ceba LMHP43

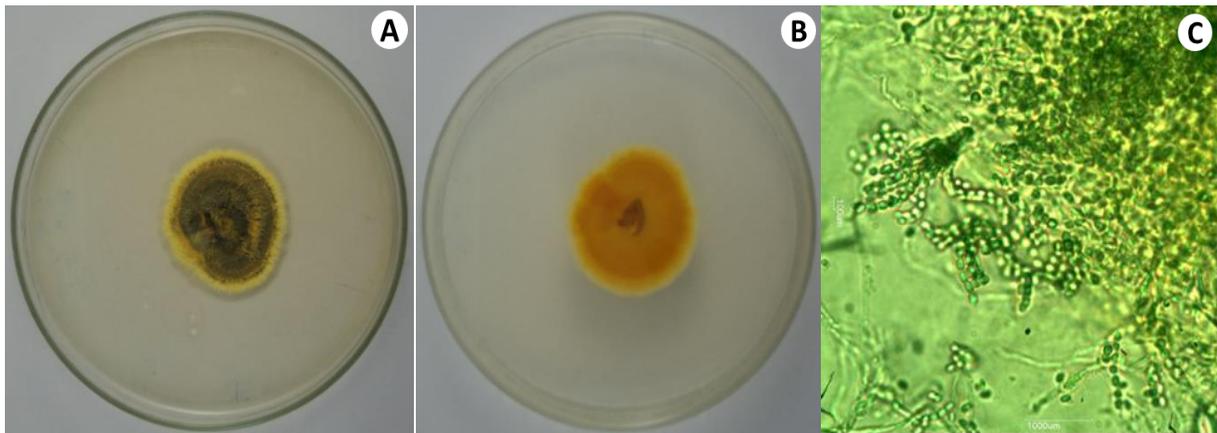
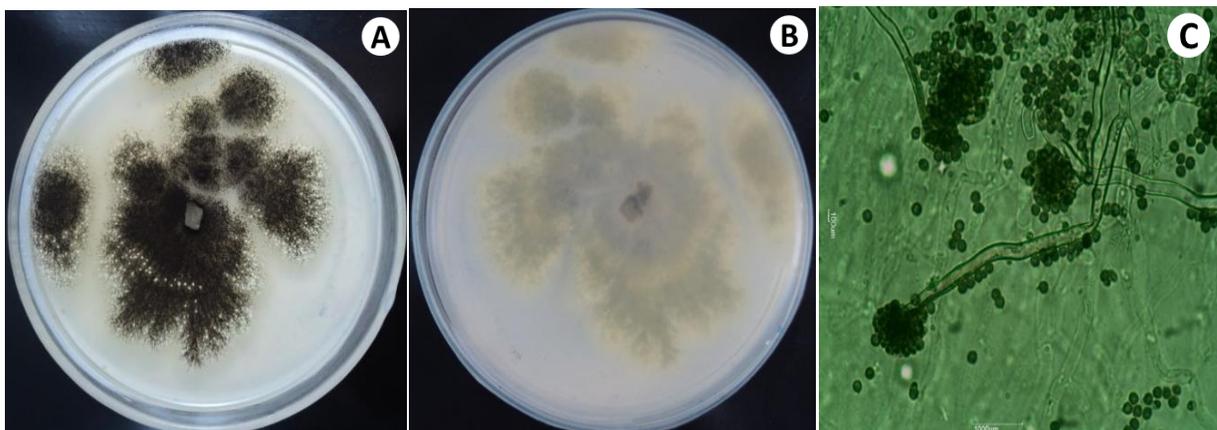


Figura A1-11. Ceba LMHP44



ANEXO 2.

Figura A2-1. Fotografía de halos de hidrólisis producidos por la actividad celulolítica de hongos aislados a partir de muestras de suelo del bosque primario Macuya (Pucallpa-Ucayali) sobre medio de tamiz con carboximetilcelulosa al 0.5 por ciento (p/v) a pH 4.8 y revelados con rojo Congo.

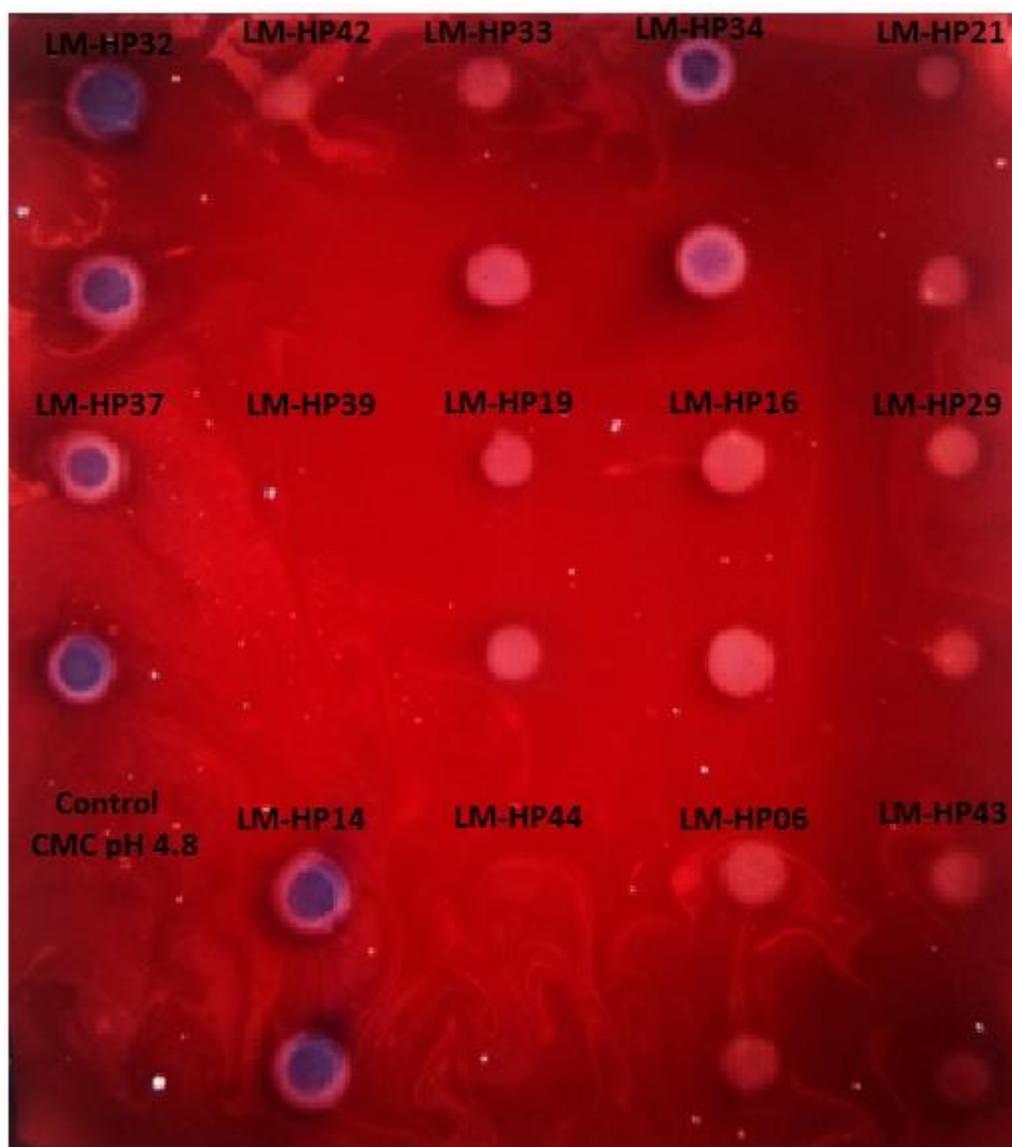


Figura A2-2. Fotografía de halos de hidrólisis producidos por la actividad celulolítica de hongos aislados a partir de muestras de suelo del bosque primario Macuya (Pucallpa-Ucayali) sobre medio de tamiz con carboximetilcelulosa al 0.5 por ciento (p/v) a pH 7.4 y revelados con rojo Congo.

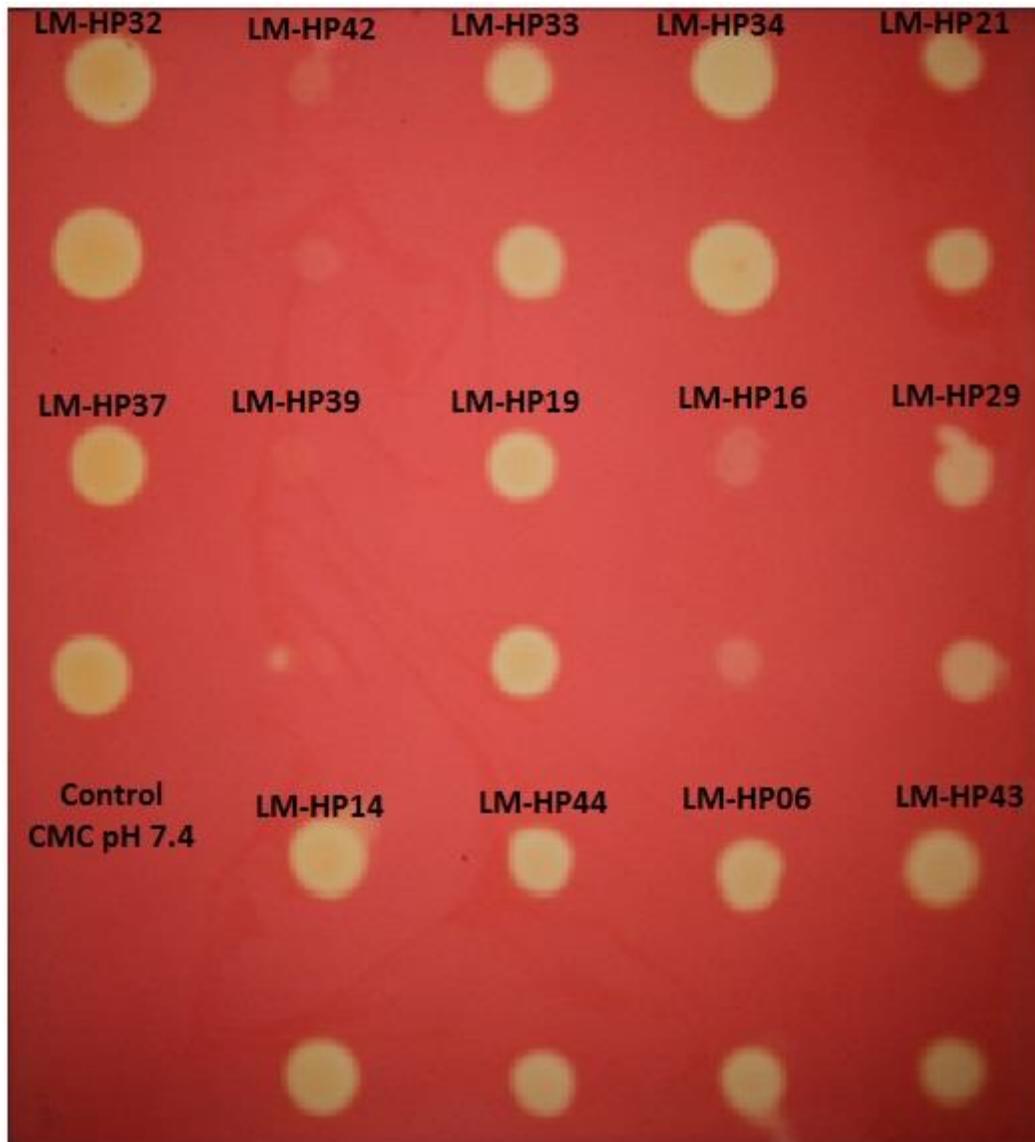


Figura A2-3. Fotografía de halos de hidrólisis producidos por la actividad celulolítica de hongos aislados a partir de muestras de suelo del bosque primario Macuya (Pucallpa-Ucayali) sobre medio de tamiz con carboximetilcelulosa al 0.5 por ciento (p/v) a pH 8.4 y revelados con rojo Congo.

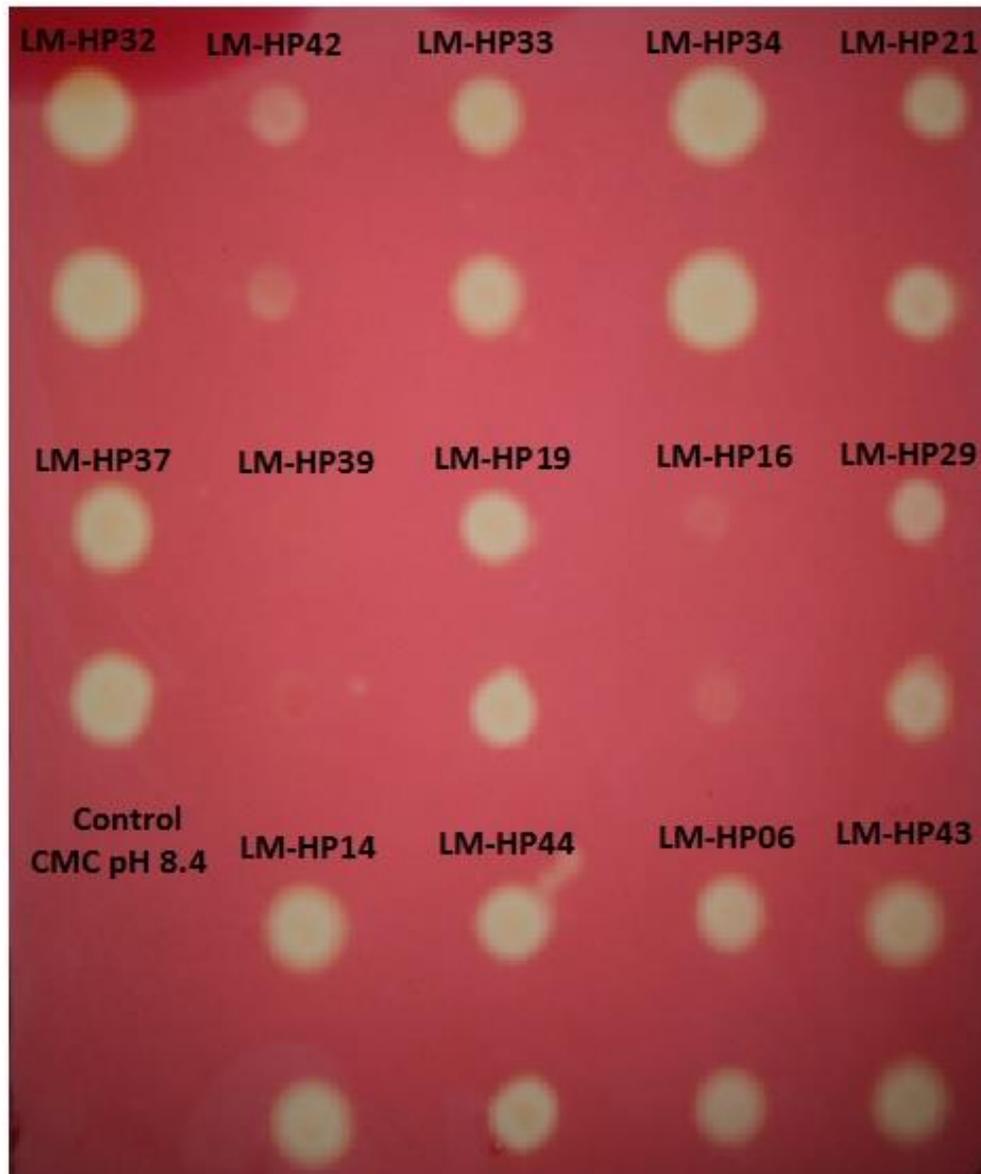


Figura A2-4. Fotografía de halos de hidrólisis producidos por la actividad celulolítica de hongos aislados a partir de muestras de suelo del bosque primario Macuya (Pucallpa-Ucayali) sobre medio de tamiz con carboximetilcelulosa al 0.5 por ciento (p/v) a pH 9.4 y revelados con rojo Congo.

