



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

PROGRAMA PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**DETERMINACIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA  
CELOBIOHIDROLASA I A PARTIR DE *Moniliophthora roreri*.**

**GENESIS BERENICE SOSA GÓMEZ**

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO

2017



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas  
Campeche-Córdoba-Montecillo-Puebla-San Luis Potosí-Tabasco-Veracruz

## CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el (la) que suscribe Genesis Berenice Sosa Gómez, alumno(a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección del (la) Profesor(a) Dra. Consuelo del Carmen Bautista Muñoz, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis DETERMINACIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA ENZIMA CELOBIOHIDROLASA I A PARTIR DE *Moniliophthora roreri* y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El (la) Consejero(a) o Director(a) de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

H. Cárdenas, Tabasco, a 29 de junio de 2017.

Firma

Dra. Consuelo del Carmen Bautista Muñoz  
Vo. Bo. Profesor(a) Consejero(a) o Director(a) de Tesis

La presente tesis, titulada “**Determinación, purificación y caracterización de la enzima Celobiohidrolasa I a partir de *Moniliophthora roreri***”, realizada por la alumna: Genesis Berenice Sosa Gómez, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

POSTGRADO EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:   
DRA. CONSUELO DEL CARMEN  
BAUTISTA MUÑOZ

ASESOR:   
DR. PEDRO ANTONIO MOSCOSO  
RAMÍREZ

ASESORA:   
DRA. ALEJANDRA SOTO ESTRADA

ASESOR:   
DR. XAVIER MIGUÉL BOLDO LEÓN

ASESORA:   
DRA. ROSA MARGARITA HERNÁNDEZ  
VÉLEZ

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO A 24 DE JULIO DE 2017

# DETERMINACIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA ENZIMA CELOBIOHIDROLASA I A PARTIR DE *Moniliophthora roreri*

Genesis Berenice Sosa Gómez, MC.

Colegio de Postgraduados, 2017.

## RESUMEN

Se estudió la cinética de producción de enzimas celobiohidrolasa I extracelular (CBH I) del hongo *Moniliophthora roreri* cultivado en un sistema de fermentación en estado sólido (FES), utilizando bagazo de caña de azúcar (BCA) y cáscara de cacao (CCA) como sustratos inductores. Los tratamientos evaluados fueron BCA sin inocular, BCA con inóculo de *M. roreri*, CCA sin inocular y CCA con inóculo de *M. roreri*. Se valoró la actividad enzimática de CBH I, proteína total, pH y biomasa cada 24 h durante 30 días, seguido de una medición a los días 35 y 40. La actividad enzimática de CBH I más alta, inducida con BCA y CCA, se detectó el día 27 con 24,193.107 U mg<sup>-1</sup> de proteína total, pH 6.97 del medio de cultivo y el día 29 con 7,443.851 U mg<sup>-1</sup> de proteína total, pH 7.49 del medio de cultivo, respectivamente. Una CBH I extracelular fue aislada y purificada parcialmente a partir de *M. roreri* cultivado en FES con BCA durante 27 días y sujeta a caracterización enzimática. La enzima CBH I fue purificada parcialmente con un factor de 18.04 veces y un rendimiento de 65.72 % en tres pasos de purificación que incluyeron: 1) extracción de la fuente de enzima, 2) precipitación con sulfato de amonio al 60 % de saturación y 3) cromatografía de intercambio iónico. La enzima mostró máxima actividad contra *p*-NPC y fue clasificada como CBH I y llamada MrCBH I. La temperatura y pH óptimos de la MrCBH I fue de 40 °C y 5.0, respectivamente. MrCBH I fue inhibida por ZnCl<sub>2</sub> y CoCl<sub>2</sub> en un 63.37 y 73.5 %, respectivamente. MrCBH I mostró un incremento en actividad aumentada en presencia de EDTA (23 %) y β-mercaptoetanol inhibió a la enzima (19 %). La enzima fue fuertemente inhibida por BaCl<sub>2</sub> (89.87 %), CuCl<sub>2</sub> (93.97 %), CdCl<sub>2</sub> (64.23 %), CaCl<sub>2</sub> (89.1 %), FeCl<sub>2</sub> (73.93 %), HgCl<sub>2</sub> (89.1 %) y AgNO<sub>3</sub> (79.53 %), mientras que MnCl<sub>2</sub> mostró una inhibición reducida (29.8 %). MrCBH I fue activa contra *p*-NPC y avicel, sin embargo, no mostró actividad contra los sustratos CMC-Na y FPase. La estabilidad térmica disminuyó por encima de 40 °C y se perdió completamente después de la incubación a 100 °C. La caracterización bioquímica de la MrCBH I, convierte a esta enzima en un atractivo aditivo de celulasa en la conversión de lignocelulosas en etanol mediante los procesos de sacarificación y fermentación, así como en otras aplicaciones biotecnológicas.

**Palabras claves:** Celobiohidrolasa I (CBH I), fermentación en estado sólido (FES), *Moniliophthora roreri*, Bagazo de caña de azúcar (BCA) y Cáscara de cacao (CCA).

DETERMINATION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A  
CELLOBIOHYDROLASE I PRODUCED BY *Moniliophthora roreri*

Genesis Berenice Sosa Gómez, MC.

Colegio de Postgraduados, 2017.

**ABSTRACT**

The kinetics of the production of extracellular cellobiohydrolase I (CBH I) enzymes produced by *Moniliophthora roreri* cultivated in a solid state fermentation (SSF) using sugarcane bagasse (SCB) and cocoa husk (CH) as inductor substrates was studied. Different treatments were evaluated SCB without inoculated, SCB inoculated with *M. roreri*, CH without inoculation and CH inoculated with *M. roreri*. The enzymatic activity of CBH I, total protein, pH and biomass was assessed every 24 h for 30 days, followed by a measurement at day 35 and 40. The highest enzyme activity of CBH I, induced with SCB and CH, was found at day 27 with 24,193.107 U mg<sup>-1</sup> of total protein, pH 6.97 of the culture medium and in day 29 with 7,443.851 U mg<sup>-1</sup> of total protein, pH 7.49 of the culture medium, respectively. An extracellular CBH I was isolated and partially purified from *M. roreri* cultured in FES with BCA for 27 days and subject to enzymatic characterization. The CBH I enzyme was partially purified with a factor of 18.04 times and a yield of 65.72 % into three purification steps which included: 1) extraction of the enzyme source, 2) ammonium sulfate precipitation at 60 % saturation and 3) Ion exchange chromatography. The enzyme showed maximum activity against *p*-NPC and was classified as CBH I and then called MrCBH I. The optimum temperature and pH of the MrCBH I was 40 °C and pH 5.0, respectively. MrCBH I was inhibited by ZnCl<sub>2</sub> and CoCl<sub>2</sub> by 63.37 and 73.5 %, respectively. MrCBH I showed increased activity with the presence of EDTA (23 %) and β-mercaptoethanol moderately inhibited the enzyme (19%). The enzyme was strongly inhibited by BaCl<sub>2</sub> (89.87 %), CuCl<sub>2</sub> (93.97 %), CdCl<sub>2</sub> (64.23 %), CaCl<sub>2</sub> (89.1 %), FeCl<sub>2</sub> (73.93 %), HgCl<sub>2</sub> (89.1 %) and AgNO<sub>3</sub> (79.53 %), MnCl<sub>2</sub> showed reduced inhibition (29.8 %). MrCBH I was active against *p*-NPC and avicel, however, no activity was observed with CMC-Na and Fpase substrates. The thermal stability decreased above 40 °C and it completely lost activity was observed after incubation at 100 °C. The biochemical characterization of MrCBH I makes it an appealing cellulase additive in the conversion lignocelluloses to ethanol through saccharification and fermentation process, as well as in other biotechnological applications.

**Key Words:** Cellobiohydrolase (CBH I), fermentation (SSF), *Moniliophthora roreri*, sugar cane bagasse (SCB), cocoa husk (CH).

## **DEDICATORIA.**

A mi Dios por las fuerzas que me das para seguir adelante a pesar de la adversidad Gracias  
eternas.

A mis padres José Alfredo Sosa Sosa y Martha Elena Gómez Lopez, por su amor incondicional y  
nunca dejarme sola siempre con una palabra de aliento para seguir, por su ejemplo de lucha y  
esfuerzo (porque lo que se inicia se termina) Gracias los Amo.

A mi esposo Ricardo Guzmán Anaya, por todo su amor comprensión, y siempre tener una  
sonrisa y palabras de apoyo para mi Gracias Te amo.

A mi hija Renata Xareni, Te amo llegaste en el momento indicado.

A mis Hermano Roberto y Grecia por estar siempre conmigo los amo eternamente.

A mis Suegros Doña Roció Anaya y Don Javier Guzman, por su apoyo y motivarme a terminar  
Gracias.

A mí cuñada Susana y sus hijas Susi y Estephi por sus palabras y sonrisas.

A mis Ángeles.

## **AGRADECIMIENTOS.**

**Al Colegio de Postgraduados *Campus* Tabasco:** Por abrirme sus puertas y por los conocimientos aportados de cada profesor para mi formación académica.

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT):** Por la beca otorgada para realizar mis estudios de postgrado en maestría en ciencias.

**A la Dra. Consuelo del Carmen Bautista Muñoz:** Por su tiempo, dedicación y Amistad, porque fue la mejor elección a ver trabajado con usted Gracias.

Agradezco a los miembros de mi consejo particular **Dr. Pedro Antonio Moscoso Ramirez; Dra. Alejandra Soto Estrada, Dr. Xavier Miguel Boldo León y a la Dra. Rosa Margarita Hernández Vélez,** por todo el tiempo invertido en la revisión de la presente Gracias.

A mis compañeros y amigos de generación primavera 2014 con los cuales compartimos excelentes momentos: **Nimi, Bety, Lety, Mari, Felix, Alejandro, Magin, Rebeca.**

A los chicos de servicio social, gracias.

A todos los que contribuyeron en este trabajo, y por todo su tiempo en especial a Q.F.B. Ricarda Ventura Valenzuela, Dra. Aracely Hernández Flores, Dra. María de la Luz Sánchez Mundo.

## CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>6</b>
2.1. Objetivo general.....	6
2.2. Objetivos particulares.....	6
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>7</b>
<b>4. REVISIÓN DE LA LITERATURA</b> .....	<b>8</b>
4.1. Generalidades de <i>Moniliophthora roreri</i> .....	8
4.2. Taxonomía de <i>M. roreri</i> .....	9
4.3. Morfología y Taxonomía de <i>M. roreri</i> .....	9
4.4. Descripción morfológica macroscópica del cultivo de <i>M. roreri in vitro</i> .....	10
4.5. Fuente de inóculo.....	11
4.6. Materiales lignocelulósicos.....	11
4.6.1. Hemicelulosa.....	14
4.6.2. Celulosa.....	14
4.6.3. Lignina .....	16
4.7. Importancia y aplicación de las enzimas celulolíticas.....	18
4.8. Sistema de fermentación en estado sólido.....	20
4.9. Residuos agrícolas y agroindustriales.....	21
4.9.1. Bagazo de caña de azúcar (BCA) .....	22
4.9.2. Cáscara de Cacao (CCA) .....	23
4.10. Purificación de proteínas.....	24
4.10.1 Estrategias y consideraciones para la purificación de proteínas .....	24
4.10.2. Etapas de la purificación de proteínas .....	24
4.11. Técnicas cromatográficas.....	25
4.11.1. Cromatografía de exclusión molecular.....	26
4.11.2. Cromatografía de adsorción selectiva.....	27

4.11.3. Cromatografía de intercambio iónico (IEC) .....	27
4.11.4. Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC).....	31
4.11.5. Cromatografía de afinidad .....	34
4.12. Estructura, función y propiedades de las celobiohidrolasas .....	34
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS. ....</b>	<b>37</b>
5.1 Aislamiento de la cepa <i>M. roreri</i> .....	37
5.2. Medio de cultivo. ....	37
5.3. Cinética de producción de la enzima celobiohidrolasa I .....	37
5.3.1 Composición del sistema de fermentación en estado sólido (FES). ....	37
5.3.2 Preparación de los pre-inóculo e inóculo.....	37
5.3.3. Determinación de la biomasa de <i>M. roreri</i> . ....	38
5.3.4. Determinación de actividad enzimática. ....	38
5.4.1. Preparación del extracto enzimático extracelular. ....	39
5.4.2. Precipitación con sulfato de amonio. ....	39
5.4.3. Diálisis .....	39
5.4.4. Cromatografía de intercambio .....	40
5.5. Caracterización Bioquímica de la Enzima CBH I. ....	40
5.5.1. Pruebas de especificidad de sustratos. ....	40
5.5.2. Efecto de iones metálicos sobre la actividad enzimática. ....	41
5.5.4. Efecto del pH sobre la actividad de la enzima. ....	41
5.5.5. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima y estabilidad térmica.....	42
5.6. Análisis estadístico.....	42
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
6.1 Cinética de producción de la enzima CBH I de <i>M. roreri</i> .....	43
6.2. Purificación y caracterización de la enzima CBH I de <i>M. roreri</i> MROCP .....	46
6.2.1. Purificación de la CBH I.....	46

6.2.2. Determinación de actividad de las exopeptidasas APE, CP y Xaa-Pro-DAP sobre la enzima CBH I parcialmente purificada.....	48
6.2.3. Determinación de actividad de la endopeptidasa aspartil proteasa (AP) en la fracción de la enzima CBH I parcialmente purificada.....	48
6.2.4. Determinación de actividad de celulasas en la fracción de la enzima CBH I parcialmente purificada. ....	49
6.2.5. Efecto de inhibidores sobre la actividad enzimática de la fracción de la enzima CBH I parcialmente purificada.....	49
6.2.6. Efecto de iones metálicos sobre la actividad de CBH I de <i>M. roreri</i> . ....	50
6.2.7. Determinación del peso molecular mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de la CBH I extracelular de <i>M. roreri</i> .....	51
6.2.8. pH óptimo de la CBH I parcialmente purificada. ....	52
6.2.9. Temperatura óptima de la CBH I.....	53
6.2.10. Estabilidad térmica de la enzima CBH I parcialmente purificada. ....	54
<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>55</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>62</b>
<b>9. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>63</b>
<b>10. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>64</b>
<b>11. ANEXOS.....</b>	<b>75</b>

## LISTA DE CUADROS.

	Página.
Cuadro 1. Variedad de algunos substratos, productos y microorganismos involucrados en fermentación en estado sólido.....	21
Cuadro 2. Propiedades de matrices comerciales de intercambio iónico.....	31
Cuadro 3. Efecto de la fermentación del BCA y CCA con inóculo de la cepa MROCP de <i>M. roreri</i> y los días de fermentación en el cambio de pH, actividad enzimática de CBH I y biomasa.....	45
Cuadro 4. Purificación de la enzima CBH I de <i>Moniliophthora roreri</i> MROCP.....	47
Cuadro 5. Actividad de las exopeptidasas APE, CP y Xaa-Pro-DAP en la fracción de la enzima CBH I parcialmente purificada.....	48
Cuadro 6. Actividad de la endopeptidasa AP en la fracción de la enzima CBH I parcialmente purificada.....	48
Cuadro 7. Actividad de las celulasas en la fracción de la enzima CBH I parcialmente purificada.....	49
Cuadro 8. Efecto de los inhibidores y/o activadores de la enzima CBH I de <i>M. roreri</i> ....	49
Cuadro 9. Efecto de iones metálicos de CBH I de <i>M. roreri</i> .....	50
Cuadro 10. Comparación de la producción de exoglucanasa de diferentes hongos crecidos en materiales lignocelulosicos.....	56
Cuadro 11. Propiedades de CBHs de diversas fuentes.....	60

## LISTA DE FIGURAS.

		Página.
Figura 1.	Estructuras morfológicas de <i>Moniliophthora roreri</i> , mostrando: a) micelio septado y b) esporas con pared gruesa.....	10
Figura 2.	Diagrama esquemático de los tres componentes de la lignocelulosa (celulosa, lignina y hemicelulosa).....	13
Figura 3.	Estructura química de la biomasa lignocelulósica: A. Celulosa, B. Hemicelulosa (1. endoxilanasas, 2. arabinofuranosidasas, 3. glucuronidasas, 4. feruloil esterases, 5. Acetil xilano esterases).....	13
Figura 4.	Estructura molecular de la cadena de celulosa.....	15
Figura 5.	Estructura de la microfibrilla de Celulosa.....	16
Figura 6.	Estructura representativa de la lignina.....	17
Figura 7.	Mecanismo del hidrolisis de celulosa a glucosa por enzimas celulasa.....	19
Figura 8.	Las diferentes etapas de un proceso de purificación de proteínas (estrategia CIPP).....	24
Figura 9.	Principios básicos de la cromatografía de exclusión molecular. Las moléculas son separadas de acuerdo a su peso molecular. Las moléculas de alto peso molecular son eluidas en el volumen vacío ( $V_0$ ) y las moléculas de bajo peso molecular son eluidas en el volumen total ( $V_t$ ). Las moléculas dentro del rango de separación de la matriz porosa son fraccionadas y excluidas en el volumen de elución ( $V_e$ ).....	26
Figura 10.	Carga neta de una proteína en función del pH. A un pH por encima de su punto isoeléctrico, una proteína podrá ligarse a una matriz cargada positivamente (intercambiador aniónico); mientras que a un pH por debajo de su pI, una proteína podrá unirse a una matriz cargada negativamente (intercambiador catiónico).....	30
Figura 11.	Principios básicos de la cromatografía de intercambio iónico. Debido a su naturaleza, los contraiones desplazan de la matriz a los grupos funcionales cargados, los cuales determinan el formato de IEC. De manera que en la cromatografía de intercambio aniónico, la fase estacionaria (usualmente una matriz porosa) desplaza a grupos funcionales cargados positivamente con contra-aniones que pueden ser desplazados por un soluto aniónico. En contraste, en la cromatografía de intercambio catiónico, la fase estacionaria desplaza a grupos funcionales cargados negativamente con la ayuda de contra-cationes que son desplazados por un soluto catiónico.....	30
Figura 12.	Principios básicos de la cromatografía de interacción hidrofóbica. La figura representa una proteína unida a un ligando y la expulsión del agua ordenada. La estructura de los enlaces de hidrógeno del agua líquida es perturbada por la presencia de solutos no polares. Las moléculas de agua forman un caparazón alrededor del ligando hidrofóbico y la superficie de la proteína hidrofóbica donde la estructura del enlace de hidrógeno es más ordenada que en la mayoría del solvente.....	33
Figura 13.	Series de Hofmeister.....	33
Figura 14.	Estructura de la exoglucanasa de <i>P. chrysosporium</i> (PDB ID: 1GPI). La proteína tiene una estructura de barril $\beta$ tipo remolino formada por dos	

	largas láminas $\beta$ antiparalelas que empacan una sobre otra.....	36
Figura 15.	Comportamiento de la actividad enzimática específica de CBH I extracelular de la cepa MROCP de <i>M. royeri</i> cultivado en FES con el substrato BCA: pH ( $\blacktriangle$ ) y actividad enzimática con BCA en U mg <sup>-1</sup> de proteína total ( $\blacklozenge$ ).....	43
Figura 16.	Comportamiento de la actividad enzimática específica de CBH I de la cepa MROCP de <i>M. royeri</i> cultivado en FES con el substrato CCA: pH ( $\blacksquare$ ) y actividad enzimática con CCA en U mg <sup>-1</sup> de proteína total ( $\blacklozenge$ ).....	44
Figura 17.	Purificación de la CBH I extracelular de <i>M. royeri</i> MROCP cultivado en FES con BCA como substrato inductor. Las proteínas fueron detectadas por medición de la absorbencia a 280 nm (línea roja); la actividad enzimática extracelular de CBH I fue ensayada contra p-NPC, a pH 5.0 (línea azul); cromatografía de intercambio iónico en QFF con gradiente de NaCl (línea verde).....	47
Figura 18.	Análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de la exoglucanasa CBH I de <i>M. royeri</i> , obtenida del paso de purificación de la cromatografía de intercambio iónico. El gel fue teñido con el método de plata mostrando dos bandas con un peso molecular (MW) estimado de 56 y 63 kDa. LM: Marcadores de proteína; L1, fracción QFFP1 con actividad de CBH I parcialmente purificada.....	51
Figura 19.	Efecto del pH óptimo sobre la CBH I parcialmente purificada fue incubada con p-NPC en diferentes reguladores bajo condiciones de pH indicados durante 30 min a 40 °C. ....	52
Figura 20.	Efecto de la temperatura sobre la actividad de la CBH I extracelular de <i>M. royeri</i> . Para el análisis de la temperatura óptima, la actividad de CBH I contra el substrato p-NPC fue ensayada a las temperaturas indicadas durante 30 min.....	53
Figura 21.	Efecto de la estabilidad térmica sobre la actividad de la CBH I extracelular de <i>M. royeri</i> . Para el análisis de la estabilidad térmica, la CBH I fue pre-incubada a diferentes temperaturas durante 60 min en ausencia del substrato p-NPC. La actividad residual de CBH I fue ensayada con el substrato p-NPC. La actividad de la enzima incubada a 4 °C fue tomada como el 100 %.....	54
Figura 22.	Formula estructural del substrato sintético selectivo <i>p</i> -NPC para determinar la actividad enzimática de CBH I (SIGMA-ALDRICH®).....	57

## ABREVIATURAS

%: Por ciento.

°C: Grados centígrados.

A405: Absorbancia 405 nanómetros.

ADNr: Ácido desoxirribonucleico ribosomal.

BCA: Bagazo de caña de azúcar.

CCA. Cáscara de cacao.

CMC: Carboximetilcelulosa.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

FES: Fermentación en estado sólido.

FPR: “Frosty pod rot”.

g: Gramos.

GenBank: “Banco de genes”.

GH: Glicosil hidrolasas.

h: hora (s).

HIC: Cromatografía de intercambio hidrofóbica.

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta eficiencia

IEX: Cromatografía de intercambio iónico

kDa: kilo Dalton.

M: molar.

mg: miligramo.

min: minuto (s)

mL: Mililitro.

mM: Milimolar.

NCBI: “Centro nacional para información de biotecnología”.

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Sulfato de monio.

pH: potencial de hidrogeno.

*p*-NPC: *p*-Nitrofenil-celobiosa.

rpm: Revoluciones por minuto.

s: Segundos.

SDS: Dodecil sulfato de sódio.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecil sulfato de sódio.

U mg-1 proteína total: unidades por miligramo de proteína total.

V: Volts.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las celulasas son un grupo de enzimas hidrolíticas capaces de hidrolizar la celulosa, a las unidades de glucosa más pequeñas; estas celulasas son principalmente endoglucanasa (EC 3.2.1.4), exoglucanasa (EC 3.2.1.91) y  $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2.1.21) (Navya *et al.*, 2012). Actualmente las celulasas, xilanasas y pectinasas contribuyen el 20 % del mercado de enzimas en el mundo (Polizeli *et al.*, 2005; Navya *et al.*, 2012; Yoon *et al.*, 2014). Estas enzimas tienen un enorme potencial biotecnológico e industrial, y se usan en la industria de alimentos, forraje animal, bebidas, detergentes, tratamiento textil, pulpa y papel, etc. (Juturu y Wu, 2014; Herrera Bravo de Laguna *et al.*, 2015).

La celulosa es el polímero natural más frecuentemente encontrado en la tierra. Es el componente básico de la pared celular vegetal, forma alrededor de la mitad a un tercio de los tejidos de las plantas y se restaura constantemente por la fotosíntesis; se estima que la biosíntesis mundial anual es de  $10^{11}$  toneladas (Sun *et al.*, 2004). Las bacterias y una variedad amplia de algas también sintetizan la celulosa. Este polímero está constituido por moléculas de D-glucosa unidas por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4, y se requieren 8 unidades monoméricas de glucosa para formar un producto insoluble. Dependiendo de la fuente, puede tener entre 8,000 y 15,000 unidades monoméricas por cadena (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2015).

Entre las celulasas, las exoglucanasas o FPasas también tienen aplicaciones potenciales en la bioconversión de materiales de desecho agrícola para la obtención de productos de valor tales como proteína unicelular, biocombustibles, material químico de alimentación, alimentación animal y textiles (Uhlir, 1998).

Las cantidades enormes de residuos celulósicos agrícolas, industriales y municipales se han ido acumulando o se usan de manera ineficiente debido al alto costo de sus procesos de explotación (Kim *et al.*, 2003). Por lo tanto, existe un interés económico considerable para desarrollar procesos para el tratamiento efectivo y la utilización de los residuos celulósicos y las fuentes de carbono de bajo costo (Navya *et al.*, 2012).

La fermentación en estado sólido (FES) tiene un enorme potencial para la producción de enzimas y los residuos agroindustriales generalmente son considerados los mejores sustratos (Abo-State *et al.*, 2010; Ilyas *et al.*, 2011; Irfan *et al.*, 2012). La FES es un medio atractivo para la producción de celulasas debido a su bajo costo de inversión de capital y de operación. Las bacterias y los hongos producen celulasas usando sustratos celulósicos complejos; sin embargo,

las enzimas fúngicas son eficientes para llevar a cabo actividades celulósicas. La producción de celulasas depende de una relación compleja involucrando una variedad de factores como pH, temperatura, periodo de fermentación, cationes y fuentes de carbono y nitrógeno (Immanuel *et al.*, 2006).

Los hongos, las bacterias y en pequeñas proporciones los actinomicetos son los principales microorganismos empleados en la producción de celulasas utilizando la FES bajo condiciones aerobias y anaerobias (Behera y Ray, 2016).

Los hongos filamentosos son preferidos para la producción de enzimas comercialmente importantes, debido a que sus niveles de producción enzimática son más altos que los obtenidos de otros microorganismos (Bakri *et al.*, 2003). Así mismo, estos hongos son responsables de la mayor celulosis en la naturaleza dada la eficiencia y diversidad de sus sistemas celulolíticos, y sus ventajas adaptativas (Ramos y Forchiassin, 1996). Las especies de hongos celulolíticos más estudiados pertenecen al género *Trichoderma*, considerado uno de los mejores productores de enzimas, aunque especies de *Aspergillus* (Bastawde, 1992), *Cladosporium* (Abrha y Gashe, 1992), *Fusarium* (Murali *et al.*, 1994), *Penicillium* (Keskar, 1992), *Neurospora crassa* (Yazdi *et al.*, 1990), entre otras, son buenas productoras de celulasas.

El hongo filamentoso mesófilo *Trichoderma reesei* (teleomorfo *Hypocrea jecorina*) es el organismo de referencia para la producción de celulasas, especialmente para la conversión de biomasa en la industria de enzimas (Paloheimo *et al.*, 2016). Una mezcla completa de celulasas de *T. reesei* está compuesta de celobiohidrolasas (CBH: EC 3.2.1.91), exoglucanasas que liberan celobiosa, como el principal producto, a partir de celulosa cristalina; endoglucanasas (EG: EC 3.2.1.4), que actúan preferentemente sobre celulosa amorfa y algunas cadenas cortas de oligómeros; así como  $\beta$ -glucosidasas (EC 3.2.1.21), que hidrolizan celooligosacáridos y celobiosa a glucosa (Fang *et al.*, 2010; Fang *et al.*, 2013; Fang y Xia, 2013).

Durante el desarrollo de las actividades productivas de la mayoría de los cultivos agrícolas y de los procesos industriales relacionados con su transformación, se generan grandes cantidades de residuos que, por lo general, son considerados subproductos de muy baja importancia económica. Los desechos agrícolas representan un recurso natural no utilizado y en algunos casos presentan serios problemas de disposición, de ahí que se busquen alternativas para convertirlos en productos útiles (Barragán *et al.*, 2008). El bagazo de caña de azúcar (BCA) es un material lignocelulósico abundante, de bajo costo y es un subproducto de la industria azucarera

(Takahashi *et al.*, 2000; Ferrara *et al.*, 2002). El uso apropiado del BCA realza el valor de este material, provee una solución para la remoción de este desecho agroindustrial tan abundante, así mismo, resuelve un problema de disposición de la industria azucarera y aumenta el rendimiento económico de esta actividad agroindustrial (Gámez *et al.*, 2006). Actualmente, el 60 % del BCA, se usa para la alimentación animal, obtención de pasta de celulosa (proceso Kraft), fabricación de tableros aglomerados y fertilizantes; el 40 % restante se desecha como residuo sólido (Samsuri *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2004). El BCA contiene celulosa (43.8 %), hemicelulosa (28.6 %), lignina (23.5 %), cenizas (1.3 %) y otros componentes (2.8 %) (Ui-Haq *et al.*, 2006). Esta biomasa es una fuente potencial de materia prima para su conversión en compuestos a base de azúcar tales como combustibles y productos químicos finos (Binder y Raines, 2009). Por otra parte, el cacao (*Theobroma cacao L.*) es una de las especies más importantes de los bosques húmedos tropicales (Kalvatchev *et al.*, 1998). Es uno de los productos agroalimentarios de origen neotropical de mayor penetración en el mercado internacional y sus exportaciones en grano han representado más de 71 % de volumen producido, situación derivada del alto valor agregado promocionado por la industria del chocolate y sus derivados (Cartay, 1999). En la explotación cacaotera, solo se aprovecha económicamente la semilla, que representa aproximadamente un 10 % del peso del fruto fresco. Esta circunstancia se ha traducido en serios problemas ambientales tales como la aparición de olores fétidos y el deterioro del paisaje, así como también problemas de disposición. Los desechos generados están constituidos en su mayoría por la cáscara, que además se considera un foco para la propagación de *Phytophthora spp* y *Moniliophthora roreri*, si se dejan dentro de las plantaciones ya que ambos patógenos provocan pérdidas económicas a la actividad cacaotera (López *et al.*, 1984; Phillips-Mora *et al.*, 2007). El principal uso que se le ha dado a la cáscara de cacao (CCA) es en la fertilización de suelos; esto debido a su degradación que sirve para mejorar el mismo, no obstante existe el escepticismo de los agricultores por su aplicación (Padrón-Gamboa *et al.*, 2004). Como consecuencia de lo anterior, varios investigadores han efectuado trabajos para la caracterización y procedimiento de uso de algunos substratos orgánicos en forma pura y en mezclas. Estos estudios revelaron que la CCA posee varias cualidades: i) buen poder de absorción y retención de agua; ii) alto contenido en grupos OH, provenientes de las ligninas y celulosas, y iii) es altamente biodegradable (Figuiera *et al.*, 1993; Padrón- Gamboa *et al.*, 2003).

Por lo anterior, el BCA y la CCA podrían ser substratos económicos rentables para el cultivo de hongos comestibles, así como productores de enzimas entre otros, a gran escala, cultivados bajo FES.

El hongo *M. roreri* es el agente causal de una enfermedad del cacao conocida como la moniliasis o la pudrición acuosa de la mazorca (FRP, del inglés Frosty pod rot;). Este hongo es extremadamente dañino para la producción de cacao en los países del noroeste de América del Sur, como Colombia, Perú, Ecuador y Venezuela, así como en América Central y el Caribe (Phillips-Mora, 2003). El patógeno infecta solamente a las mazorcas de cacao en todos los estados de desarrollo y tiene una fase biotrófica extendida de hasta 60 días, terminando con la necrosis de la mazorca y la esporulación del hongo, sin llegar a producir un basidiocarpo (Meinhardt *et al.*, 2014).

Sánchez-Sánchez *et al.* (2011), reportaron la presencia de endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanasas en la cepa MRO1 de *M. roreri* cultivado en FES utilizando BCA como sustrato. La actividad enzimática endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanasas más alta se encontró el día 28 con 258.55 mU mg<sup>-1</sup> de proteína total. Además se obtuvo un fragmento de 747 pb del gen *MrGLU1* predicho que codifica una endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanasa y se registró con el número de acceso JN029800 en el GenBank de la NCBI. Dicho fragmento fue traducido a la secuencia de proteína, obteniéndose un fragmento de proteína (mrGLU1) de 249 aminoácidos, que presentó una identidad máxima de 87 % con respecto a la secuencia de aminoácidos con número de acceso XP002389355 de endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanasa putativa de *M. pernicioso*, depositada en la base de datos GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (National Center for Biotechnology Information; NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Datos autorizados por el autor Sánchez-Sánchez *et al.*, 2011).

Concepcion-Brindis *et al.* (2015), reportaron la presencia de  $\beta$ -glucosidasa en la cepa MROCP de *M. roreri* cultivado bajo FES utilizando BCA y CCA como sustratos inductores. Se evaluó la actividad enzimática de  $\beta$ -glucosidasa, proteína total, pH y biomasa durante 30 días. El estudio fue completado con un análisis *in silico* de la secuencia de seis genes codificantes de enzimas  $\beta$ -glucosidasas predichas, depositadas en el GenBank del NCBI. La actividad enzimática de  $\beta$ -glucosidasa más alta, inducida con BCA y CCA, se encontró el día 18 con 332.69 U mg<sup>-1</sup> de proteína total, pH 6.73 del medio de cultivo y el día 27 con 27.6 U mg<sup>-1</sup> de proteína total, pH 7.46 respectivamente. Se obtuvo un fragmento de 1737 pb del gen 18S ADNr, mismo que fue

registrado en el GenBank (NCBI) con el número de acceso KM998972. La secuencia presentó 100% de identidad con respecto a la secuencia AY996745 de *M. roreri*. La cepa fue denominada MROCP. El análisis *in silico* confirmó que las seis proteínas  $\beta$ -glucosidasa predichas contenidas en el genoma de *M. roreri*, pertenecen a las glicosil hidrolasas de la familia 1 y 3: GH1 (ESK96275, ESK95676, ESK92642) y GH3 (ESK95149, ESK88175 y ESK84536), además de predecir sus características fisicoquímicas y bioquímicas. Las  $\beta$ -glucosidasa de la familia GH1 forman tres subgrupos (1a, 1b y 1c), bien definidos de *M. roreri*. Las  $\beta$ -glucosidasa de la familia GH3 forman tres subgrupos (2a, 2b y 2c), bien definidos de *M. roreri*. La proteína GH1 con número de acceso GenBank ESK95676, de localización extracelular, podría ser la responsable de la actividad  $\beta$ -glucosidasa de *M. roreri* MROCP expresada en el sistema FES usando BCA y CCA como substratos inductores. Los resultados del presente trabajo serán de ayuda en la purificación y caracterización bioquímica de esta familia de enzimas con potenciales aplicaciones biotecnológicas e industriales.

Por lo anterior y dado que se ha demostrado la presencia de la enzima endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanasa, y  $\beta$ -glucosidasa que forman parte del sistema celulolítico para la conversión de celulosa a glucosa, en este trabajo se propuso determinar la actividad enzimática de una exoglucanasa expresada por el hongo *M. roreri*, cultivado en un sistema FES, así como purificar y caracterizar bioquímicamente dicha enzima. Los resultados del presente trabajo serán de ayuda en la purificación y caracterización bioquímica de otras enzimas de esta familia con potenciales aplicaciones biotecnológicas e industriales.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general.

Determinar, purificar y caracterizar bioquímicamente una enzima extracelular con actividad de celobiohidrolasa I, a partir del hongo fitopatógeno *Moniliophthora roreri*, cepa MROCP cultivado bajo el sistema de fermentación en estado sólido (FES) usando bagazo de caña de azúcar (BCA) y cáscara de cacao (CCA) como substrato inductor.

### 2.2. Objetivos particulares.

- ❖ Determinar la cinética de actividad enzimática de celobiohidrolasa I de *M. roreri* cultivado en un sistema de fermentación en estado sólido usando bagazo de caña de azúcar (BCA) y cáscara de cacao (CCA) como substrato inductor.
- ❖ Purificar una enzima con actividad enzimática de celobiohidrolasa I de *M. roreri* cultivado en un sistema de fermentación en estado sólido.
- ❖ Determinar el peso molecular, pH óptimo, temperatura óptima y estabilidad térmica sobre la actividad de la enzima purificada para su caracterización bioquímica.
- ❖ Probar el efecto de diferentes iones metálicos y químicos, substratos específicos, inhibidores, activación con cationes divalentes sobre la actividad de la enzima purificadas para su caracterización bioquímica.

### **3. HIPÓTESIS**

*Moniliophthora roreri* es capaz de producir enzimas celobiohidrolasa I codificadas en su genoma e inducidas en substratos de residuos agrícolas mediante fermentación en estado sólido, alcanzando niveles que permitirán aislar, purificar y caracterizar bioquímicamente al menos una enzima.

## 4. REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 4.1. Generalidades de *Moniliophthora roreri*

*Moniliophthora roreri* Cif. y Par. , es el agente causal de la enfermedad conocida como pudrición acuosa de la mazorca of *Theobroma cacao* L. (Evans, 2007; Philips-Mora y Wilkinson, 2007). Actualmente se encuentra distribuida en Ecuador, Colombia, Perú, Venezuela, países de américa central, El Salvador y México (Torres de la cruz *et al.*, 2011). En México se reportó en el 2005 (Phillips-Mora *et al.*, 2006) y actualmente se encuentra distribuida en las principales regiones productoras de cacao en los estados de Tabasco y Chiapas, tomando el estatus de la principal limitante parasítica de la producción de cacao en el país, con pérdidas que alcanzan el 75% de la producción (Torres de la cruz *et al.*, 2011). *M. roreri* es un hongo hemibiotrófico que durante la fase biotrófica se aloja y coloniza lentamente el fruto causando malformaciones y se posiciona para explotar los recursos nutritivos liberados cuando se desencadena la necrosis. Se produce un cambio importante en la expresión génica de *M. roreri* entre las fases biotrófica y necrotrófica y los metabolitos de la mazorca son rápidamente metabolizados por el patógeno durante la fase necrotrófica y finalmente ocurre la esporulación (Bailey *et al.*, 2013). Se cree que la dicarionización del micelio fúngico de un estado haploide ocurre en asociación con el cambio a la fase necrotrófica (Ali *et al.*, 2015).

#### 4.2. Taxonomía de *M. roreri*

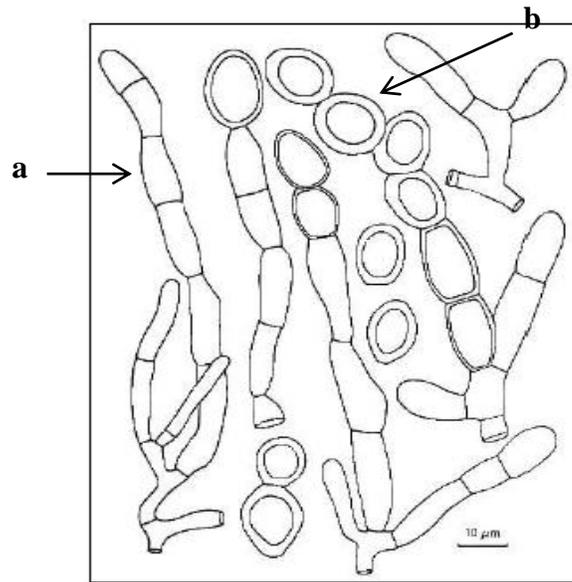
Actualmente en la base de datos de la National Center for Biotechnology Information (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), se encuentra disponible la clasificación taxonómica que se indica a continuación:

Súper reino:	Eukaryota
Reino:	Fungi
Subreino:	Dikarya
Phylum:	Basidiomycota
Clase:	Agaricomycetes
Subclase:	Agaricomycetidae
Orden:	Agaricales
Familia:	Marasmiaceae
Género:	Moniliophthora
Especie:	Moniliophthora roreri

#### 4.3. Morfología y Taxonomía de *M. roreri*

La posición taxonómica de *M. roreri* ha sido polémica a lo largo de los años debido principalmente a su falta de producción de una fase sexual observable (Díaz-Valderrama y Aime, 2016). Inicialmente, se describió como un hongo ascomiceto anamórfico, *Monilia roreri*, debido a similitudes en la sintomatología y morfología al ascomiceto patógeno vegetal *Monilia fructigena* (Ciferri y Parodi, 1993). Sin embargo, las observaciones ultraestructurales del septo doliporo condujeron su transferencia a Basidiomycota y la creación de un nombre nuevo de género, *Moniliophthora*, para acomodarlo aunque su colocación taxonómica específica dentro del phylum permanecía incierta (Evans *et al.*, 1978). Thorold (1975), Kranz *et al.* (1978) y Evans *et al.* (1978), describen que el hongo posee hifas hialinas y septadas, las septas sin conexiones de gancho pero con doliporo, de 1.5 a 5  $\mu\text{m}$  de ancho (Figura. 1). Los conidios, se producen en cadenas con maduración basipétala (Evans, 1981) y se desprenden fácilmente del micelio; su pared es gruesa y son amarillo-pálido o café cuando forman masa de esporas, su forma varía de globosa a elipsoidal, se presentan en una proporción aproximada al 60 y 30 % y miden de 7 a 10  $\mu\text{m}$  de ancho por 9 a 14  $\mu\text{m}$  de largo. Los conidióforos son más o menos verticales, ligeramente

ramificados, ocasionalmente aislados y erectos y forman cadenas de cuatro a diez conidias (Phillips-Mora, 2003).



**Figura 1. Estructuras morfológicas de *Moniliophthora roreri*, mostrando: a) micelio septado y b) esporas con pared gruesa (tomado de Evans *et al.*, 1978).**

#### **4.4. Descripción morfológica macroscópica del cultivo de *M. roreri* *in vitro***

Cuando el hongo crece en medio V8 clarificado, las colonias alcanzan un diámetro de 8 a 15 cm después de dos semanas, y muestran un borde levemente levantado. El crecimiento en forma de tapete de aspecto lanoso a fieltro, de color salmón pálido a rosa, finalmente se vuelve de color beige canela a arcilla, o en ocasiones café lanoso a chabacano pálido, esto se debe a la formación de muchas esporas. Ocasionalmente, el tapete es de inicio suave a harinoso, de color blanco a crema o con matices ocráceos. No produce olor. En la zona avanzada, la hifa es hialina, de pared delgada, septada y algunas veces es levemente irregular con hinchamientos de 1.5 a 5 μm de ancho. La hifa aérea es de dos tipos: a) como en la zona avanzada, pero con paredes levemente engrosadas, y b) hialina densa de color parduzco pálido, no septada de 1 a 1.5 μm y 2 a 3 μm de ancho y el esqueleto raramente ramificado (Evans *et al.*, 1978). Los conidióforos ramificados dan lugar a cadenas maduras de conidios, de color amarillo pálido y de color café en masa. Los conidios cilíndricos de paredes delgadas también están presentes y probablemente se derivan a partir de cadenas inmaduras (Evans *et al.*, 1978; Evans, 1981; Phillips-Mora *et al.*, 2006).

Las hifas se sumergen en el medio de cultivo como en la zona avanzada, pero con hinchamientos más frecuentes. El hongo también crece y esporula bien, grumos de color crema compactos, de micelio estéril con gotitas de exudado amarillo que se forman frecuentemente y los parches rojo púrpura compuestos de hifas rojas pesadamente incrustadas que están presentes en los cultivos viejos. Las temperaturas de crecimiento óptimas son de 25 a 26 °C y máximo 33 °C (Evans *et al.*, 1978).

#### **4.5. Fuente de inóculo**

*M. roreri* sobrevive en frutos infectados momificados que permanecen en el árbol de cacao después de la cosecha, los que aportan niveles elevados de inóculo durante todo el periodo de fructificación (Evans, 1981; Phillips-Mora, 2003). Las esporas son los únicos propágulos infectivos de *M. roreri*, y son diseminadas principalmente por el viento. Se desprenden una vez que están secas mediante cualquier estímulo físico (como corrientes de aire y vibraciones del árbol durante la cosecha o la poda, etc.) (Evans, 1981), se impactan sobre el dosel de los árboles, tronco, cojinetes florales, y se desplazan por distancias considerables mientras no existan importantes barreras naturales (Phillips-Mora, 2003).

#### **4.6. Materiales lignocelulósicos**

La biomasa representa una fuente renovable de energía, con gran potencial para la producción de biocombustibles. Según la estimación, la naturaleza produce 200 millones de toneladas métricas de biomasa lignocelulósica con una capacidad de carga de  $3 \times 10^{18}$  kJ por año mediante la fotosíntesis, que es alrededor de 10 veces el consumo de energía anual presente y del mundo (Hu *et al.*, 2015). La biomasa lignocelulósica es la fuente de biomasa mas abundante de energía renovable en el mundo. La hidrólisis enzimática de la celulosa en azúcar fermentable ha sido ampliamente estudiada para la utilización de la lignocelulosa en procesos de bioenergía. Sin embargo, la conversión de la celulosa en glucosa, que es el proceso inicial de la biorefinería, ha creado un cuello de botella en términos de la tasa de conversión inicial. Para superar ésto, la alta dosis de celulosa y el tiempo de proceso prolongado aumentará la tasa de conversión, resultando en un alto costo de proceso. Las dosificaciones de celulosa constituyen una contribución significativa al coste total de producción de etanol. Por lo tanto, es importante encontrar métodos

para reducir la dosificación de celulasa y acortar el tiempo de proceso sin disminuir la tasa de conversión (Wang *et al.*, 2013). En el medio ambiente, la lignocelulosa se encuentra en los subproductos de la industria agrícola y alimentaria, residuos agrícolas, residuos forestales, madera, hierba, residuos de pulpa y papel, residuos sólidos urbanos, desecho de animales y aguas residuales (Dashtban *et al.*, 2009; Maki *et al.*, 2009; Vrije *et al.*, 2009). La conversión de estos materiales lignocelulósicos en productos valiosos (etanol o biocombustibles de hidrógeno, químicos y alimentación animal), reduce la crisis energética y los problemas de contaminación ambiental (Hu y Zhong, 2003). La degradación biológica de la biomasa lignocelulósica es llevada a cabo por varias enzimas como amilasa, celulasa, proteasa, queratinasa y lipasa (Taherzadeh y Karimi, 2008). De las nombradas anteriormente, la celulasa es la enzima clave para la degradación biológica del material lignocelulósico, y han sido ampliamente usadas en piensos, alimentación, fabricación de cervezas, fermentación, industria textil y otras. Sin embargo, la celulasa tiene baja eficiencia de degradación, baja estabilidad en la adaptación a diversas condiciones de aplicación, baja actividad enzimática y alto costo de producción, lo cual restringe sus aplicaciones más amplias en la producción industrial. Consecuentemente, la celulasa necesita alta capacidad de adsorción, eficiencia catalítica y estabilidad térmica, así como inhibición del producto final bajo, para lograr la bioconversión de la lignocelulosa. Los hongos son reconocidos como agentes de descomposición de la materia orgánica en general y de la celulosa en particular, para lo cual producen una gran variedad de enzimas hidrolíticas esenciales para soportar su crecimiento, ya sea como saprófitos o como patógenos (Archer y Wood 1995). La actividad celulolítica está ampliamente distribuida en el reino Fungi; se ha reportado en hongos anaeróbios de los géneros *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Caecomyces*, *Orpinomyces*, *Anaeromyces*, y en hongos aerobios de los géneros *Bulgaria*, *Chaetomium*, *Helotium*, *Neurospora*, *Coriolus*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Poria*, *Schizophyllum*, *Serpula*, *Aspegillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* y *Trichoderma* (Tian *et al.*, 2009; Lynd *et al.*, 2002). El material lignocelulósico natural está compuesto por celulosa, hemicelulosa, y lignina, es el componente principal de las paredes celulares vegetales. Los tres polímeros estructurales de la lignocelulosa presentan una configuración compleja como se muestra en la Figura 2. Además de los tres componentes principales, la lignocelulosa contiene proteínas, lípidos, cenizas, agua, pectina, carbohidratos de bajo peso molecular y otros elementos (Chen, 2012).



#### **4.6.1. Hemicelulosa**

Las hemicelulosas representan aproximadamente 20 a 30 % de la biomasa en la naturaleza y son en general más cortos que los polímeros de celulosa (Börjesson y Westman, 2016). La hemicelulosa esta ramificada con polisacáridos de cadena corta, que varían dependiendo de las especies vegetales (Lan *et al.*, 2011) (Figura. 3), dentro de estos polisacáridos se encuentran monosacáridos tales como las pentosas (xilosa, ramnosa y arabinosa), hexosa (glucosa, manosa y galactosa) y ácido urónico (Jung *et al.*, 2015). A diferencia de la celulosa, las hemicelulosas no forman microfibrillas, pero, pueden formar enlaces de hidrógeno con la celulosa y la lignina y por lo tanto se les conoce como "glucanos de reticulación" (Pasangulapati *et al.*, 2012). Las xilanasas estan involucradas en la degradación de hemicelulosa. De forma similar a las celulasas, estas enzimas pueden actuar de forma sinérgica para alcanzar la hidrólisis. Predominantemente, las enzimas dentro del sistema son endoxylanases las cuales atacan a la columna del polisacárido y  $\beta$ -xilosidasas las cuales hidrolizan xilo-oligosacáridos cortos a xilosa (Kim y Kim, 2012; Montoya *et al.*, 2012).

#### **4.6.2. Celulosa**

La celulosa es la fuente de carbono renovable más abundante de la Tierra. Sin embargo, la estructura de este polímero constituye una barrera física y química para acceder al carbono, lo que ha limitado el aprovechamiento del mismo. En la naturaleza, un pequeño porcentaje de microorganismos pueden degradarla a través de la expresión de celulasas. Dentro de estos microorganismos, uno de los grupos más activos y eficientes son los hongos filamentosos (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 2015). Hace más de 150 años, Anselme Payen, un químico francés, descubrió y aisló la celulosa a partir de plantas verdes. La celulosa contribuye alrededor del 20-40 % del peso seco en las paredes celulares primarias (Jia *et al.*, 2014). Generalmente aumenta hasta un 50% en las paredes celulares secundarias, excepto para algunos casos como el pelo de semilla de algodón, que contiene 100% de celulosa (Watanabe y Tokuda, 2010). Estructuralmente, la celulosa es un homopolisacárido no ramificado, insoluble en agua, compuesto por unidades repetidas de  $\beta$ -D-glucopiranosas interconectadas por enlaces  $\beta$ -1,4 glicosídicos (Read y Bacic, 2002), cada unidad esta unida a otra molécula de glucosa en una orientación de  $180^\circ$  y se requieren 8 unidades monoméricas de glucosa para formar un producto insoluble. La celobiosa es la unidad repetitiva más pequeña de celulosa y puede ser convertida en unidades de glucosa y dependiendo de la fuente, puede tener entre 8,000 y 15,000 unidades

monoméricas de glucosa anhidra por cadena (Brown, 2004). El polisacárido está localizado en la pared celular, donde se encuentra como unidades submicroscópicas de forma alargada llamadas micelas. Estas micelas se organizan en estructuras más grandes, las microfibrillas, las cuales aparecen como entidades de varios tamaños dependiendo de su fuente. En las plantas, cada microfibrilla tiene en promedio 36 cadenas individuales de sección transversal, pero las microfibrillas de algas pueden formar cables grandes o redondos o cintas aplanadas de varios cientos de cadenas. Las microfibrillas de angiospermas están generalmente entre 5 y 12 nm de ancho. Las microfibrillas se empaquetan formando una estructura cristalina altamente ordenada, en la cual todos los átomos están fijos en posiciones discretas uno con respecto a otro; este empaquetamiento previene la penetración no solo de enzimas, sino de pequeñas moléculas como el agua. Esta estructura se encuentra rodeada por polisacáridos hemicelulósicos que se unen a la celulosa por puentes de hidrógeno y enlaces covalentes (enlaces de Van der Waals), haciéndola aún más resistente a la hidrólisis química y biológica (Lynd *et al.*, 2002). No toda la estructura de la celulosa es cristalina, existen regiones desordenadas, denominadas regiones amorfas, con una composición heterogénea caracterizada por una variedad de enlaces. Este arreglo asimétrico que caracteriza las regiones amorfas es crucial para la biodegradación de la celulosa (Malherbe y Cloete, 2002). Además de estas regiones, las fibras de celulosas contienen varios tipos de irregularidades, como torceduras y espacios, en las cuales se forman microporos y capilares lo suficientemente amplios como para permitir la penetración de moléculas relativamente grandes, incluyendo en algunos casos las enzimas celulolíticas (Lynd *et al.*, 2002). En la Figura 4 se muestra la estructura molecular de la cadena de celulosa, mientras que en la Figura 5 se muestra la estructura de las microfibrillas de celulosa, las cuales están ensambladas en superestructuras tales como pared celular, fibras, pellicles entre otras.

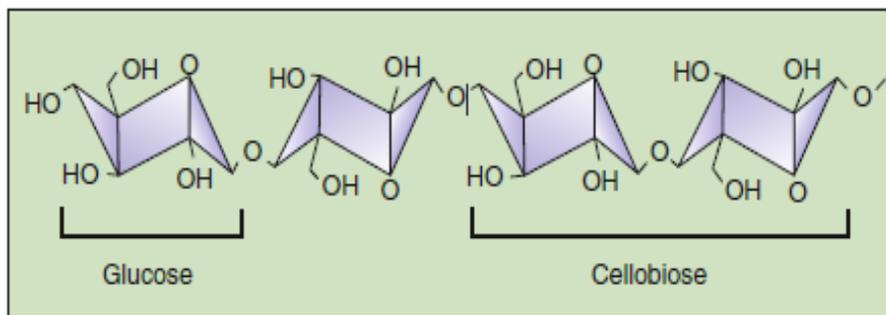


Figura 4. Estructura molecular de la cadena de celulosa (tomado de Chen, 2012).

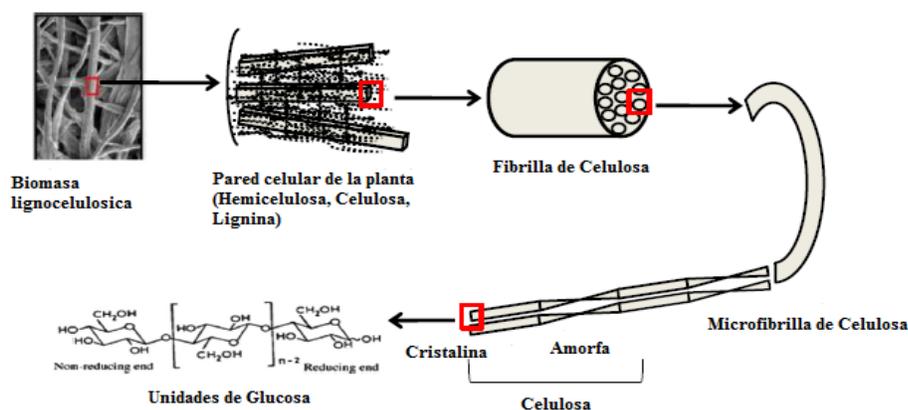


Figura 5. Estructura de la microfibrilla de Celulosa (tomado de Kuhad *et al.*, 2016).

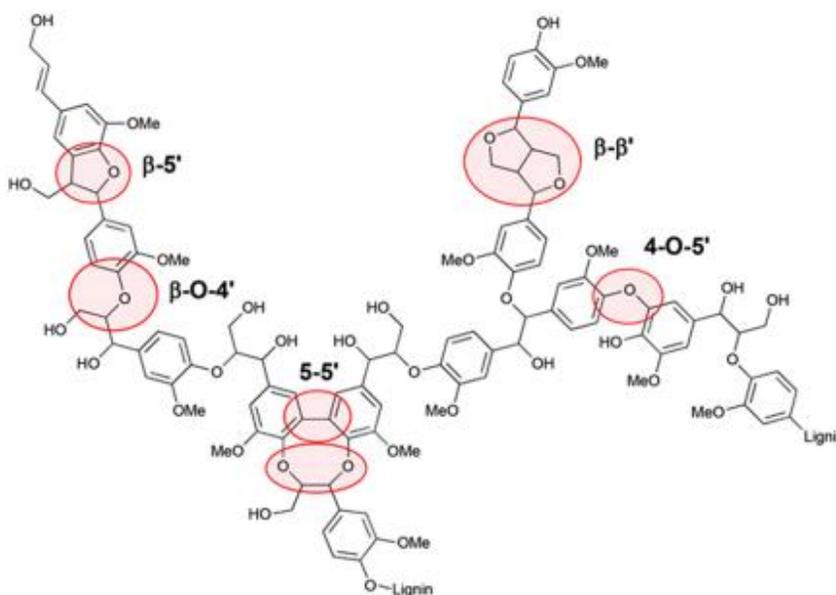
#### 4.6.3. Lignina

La lignina es el segundo más abundante después de la celulosa; que constituye del 20-30 % del peso de la biomasa lignocelulósica. Desde la perspectiva de alto contenido energético y la estructura del polímero, la lignina se considera una fuente promisoría de combustibles renovables y productos químicos (Yunpu *et al.*, 2016).

Se trata de un polímero polifenólico sin una composición estereoquímica regular, con una función protectora de la celulosa y la hemicelulosa (Chen, 2012). Los grupos hidroxilo y el anillo aromático/fenólico son las funciones más características de la lignina, que determinan su reactividad y constituyen los sitios reactivos para ser explotada en la química macromolecular (Mahmood *et al.*, 2016). Debido a que casi todo el proceso de deslignificación incluye la ruptura del enlace covalente de la lignina natural, con diferentes métodos y condiciones de separación, la estructura de la lignina tendría grandes diferencias. Por lo tanto, se usó un modelo estructural para presentar la estructura de la lignina. Este tipo de modelo estructural sólo describe una estructura hipotética deducida de los resultados promedio. Además, diferentes fuentes vegetales, o incluso la lignina aislada de la misma planta pero de diferentes maneras, podrían tener diferentes categorías de enlaces y composición de grupos funcionales, dando como resultado la complicada estructura de la lignina. La Figura 6 representa un modelo estructural de lignina de maderas blandas (Qiu y Chen, 2006) que sólo describe una estructura hipotética deducida de los resultados promedio.

La lignina se compone de tres unidades típicas de monómero de fenilpropano llamadas alcohol *p*-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico; así también unidades de *p*-hidroximetil (en plantas herbáceas), a través de enlaces éter (principalmente  $\beta$ -*o*-4) y enlaces C-C. La proporción

de estos enlaces depende del tipo de madera. En muchos casos, aproximadamente dos tercios de los enlaces en la lignina son enlaces éter, mientras que los enlaces restantes son enlaces C-C. Puesto que hay un número de unidades de monómeros de fenilpropano y los grupos funcionales OH, la lignina puede ser despolimerizada en compuestos fenólicos de bajo peso molecular, que pueden convertirse en productos químicos finos de alto valor añadido. Las relaciones entre las unidades monoméricas de fenilpropano en la estructura de lignina incluyen principalmente enlaces éter tales como  $\beta$ -O-4,  $\alpha$ -O-4, y 4-O-5, así como enlaces C-C tal como  $\beta$ -1,  $\beta$ -5, 5-5' y  $\beta$ - $\beta$ . La lignina tiene 48-60 % de enlaces  $\beta$ -O-4 y aproximadamente 25 % de enlaces 5-5', que son los principales tipos de enlaces en la lignina (Chakar y Ragauskas, 2004; Pandey y Kim, 2011). El porcentaje de enlaces éter en la lignina de maderas blandas y duras es de 56 y 72 %, respectivamente (Mahmood *et al.*, 2016). Por lo tanto, la separación efectiva de enlaces  $\beta$ -O-4 y enlaces 5-5' es clave para la descomposición de la lignina (Chakar y Ragauskas, 2004; Pandey y Kim, 2011). Este polímero es usualmente degradado por una familia de peroxidasas ligninolíticas las cuales incluyen lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) (Fernandez-Fueyo *et al.*, 2012; Ruiz-Dueñas *et al.*, 2013) y más recientemente las peroxidasas versátiles (VP) (Pérez-Boada *et al.*, 2005).



**Figura 6.** Estructura representativa de la lignina, reimpresso (adaptada) con permiso de (tomado de Forsythe *et al.*, 2013). Derechos de autor © (2013) Royal Society of Chemistry.

#### **4.7. Importancia y aplicación de las enzimas celulolíticas.**

La investigación activa sobre las celulasas y las polisacaridasas relacionadas comenzó a principios de los años cincuenta, debido a su enorme potencial para convertir la lignocelulosa, la fuente de energía más abundante y renovable en la Tierra, en glucosa y azúcares solubles (Reese, 1976; Reese y Mandels, 1984; Coughlan, 1985a, b; Mandels, 1985).

Las celulasas son un componente crucial de diversos procesos industriales, como la fabricación de algodón y papel, como enzimas de detergentes, en la extracción de zumos y como aditivos para piensos (Bhat, 2000). Además, las celulasas están ganando cada vez más interés por la agricultura, la biotecnología y los usos de la bioenergía (Phitsuwan *et al.*, 2013), especialmente en la utilización de biomasa celulósica para la producción de biocombustibles líquidos renovables como el etanol, butanol u otros productos fermentativos de azúcar. Con estos usos, las celulasas tienen el potencial de convertirse en el mayor grupo de enzimas de uso industrial en todo el mundo (Wilson, 2009).

En los últimos años se ha observado un aumento de las actividades de bioprospección para aislar y desarrollar nuevas mezclas de enzimas fúngicas, que pueden adaptarse para degradar eficientemente la lignocelulosa recalcitrante en azúcares monoméricos con la ayuda de un pretratamiento termoquímico leve o nulo (Gupta *et al.*, 2016).

Las enzimas lignocelulolíticas producidas por hongos están ampliamente difundidas, las especies pertenecen al género ascomycetos (p. ej. *Trichoderma reesei*) y basidiomicetos, incluidos los hongos de la pudrición blanca (p. ej. *Phanerochaete chrysosporium*), los hongos de la podredumbre parda (*Fomitopsis palustris*) y algunos anaerobios (p. ej. *Orpinomyces* sp.) los cuales degradan celulosa en tracto gastrointestinal de animales rumiantes (Kuhad *et al.*, 2016). Las especies de hongos celulolíticos más estudiados, pertenecen al género *Trichoderma*, considerado uno de los mejores productores de enzimas, aunque especies de *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Neurospora crassa*, entre otras, son buenos productores de celulasas (Ferrer-Marcelo *et al.*, 2011).

La celulosa es comúnmente degradada por la acción hidrolítica de un sistema de enzimas celulasas multicomponentes, mismas que representan. El sistema celulolítico complejo consta de tres categorías de enzimas básicas: endoglucanasa o carboximetilcelulasa (endo-1,4- $\beta$ -D-glucanasa, EG, EC 3.2.1.4), celobiohidrolasa o exoglucanasa (exo-1,4- $\beta$ -D-glucanasa, CBH, EC 3.2.1.91) y celobiasa o  $\beta$ -glucosidasa (1,4- $\beta$ -D-glucosidoglucohidrolasa, BG, EC 3.2.1.21), que

actúan sinérgicamente para degradar la celulosa insoluble en glucosa (Sadhu *et al.*, 2013) (Figura 7).

Para estos procesos se necesitan microorganismos termofílicos y/o alcalofílicos o acidofílicos como fuente de una gama amplia de enzimas estables a un amplio intervalo de pH y termoestable, debido a su mayor estabilidad y actividad a un amplio rango de pH y temperatura y de enzimas estables al pH, debido a su mayor estabilidad y actividad en un rango más amplio de temperaturas y pH (Bakare *et al.*, 2005; Viikari *et al.* 2007).

Las enzimas del sistema celulolítico tienen en común la capacidad de hidrolizar los enlaces 1,4- $\beta$ -glucosídico entre las moléculas de D-glucosa, pero difieren en su punto de partida y el sustrato a hidrolizar. Las endoglucanasas separan los enlaces internos de la fibra de celulosa para producir celodextrinas; las exoglucanasas actúan en la región externa (extremos reductores y no reductores) de la cadena de celulosa para producir celobiosa, y finalmente la  $\beta$ -glucosidasa (celobiasa) hidroliza celobiosa y oligosacáridos solubles a unidades de glucosa (Lynd *et al.*, 2002).

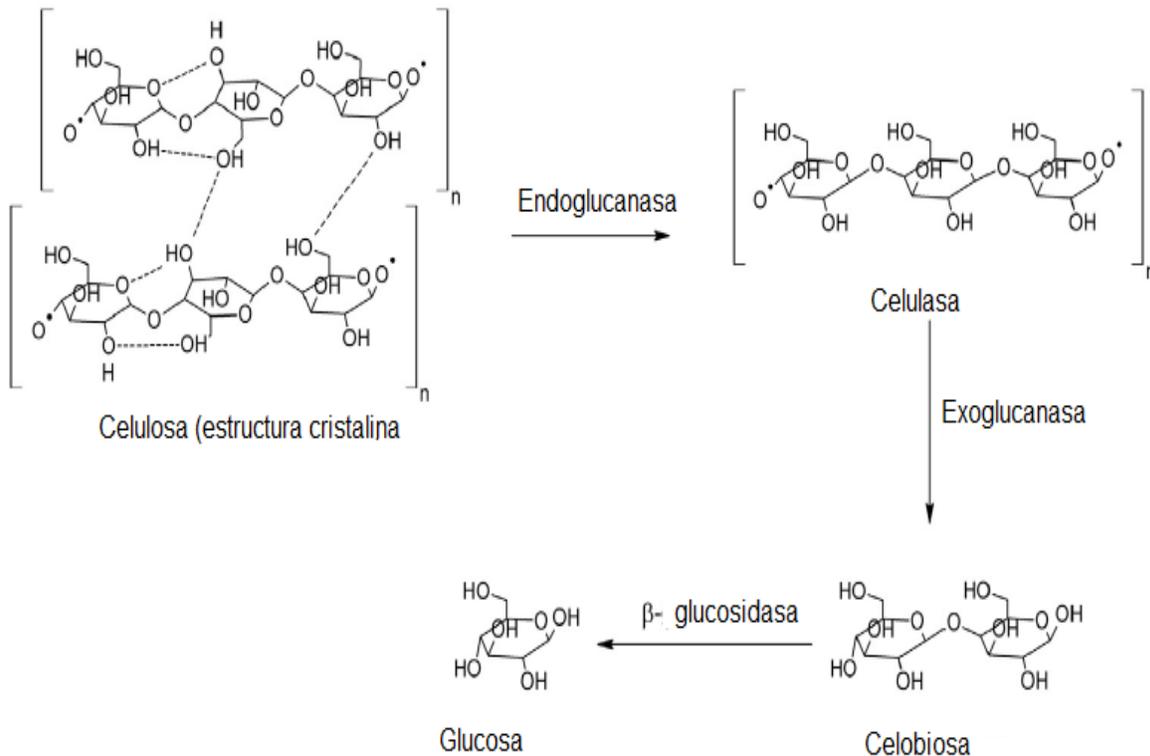


Figura 7. Mecanismo del hidrólisis de celulosa a glucosa por enzimas celulasa (tomado de Yoon *et al.*, 2014).

#### **4.8. Sistema de fermentación en estado sólido.**

La fermentación en estado sólido FES (también conocido como bioprocesamiento en estado sólido) ha surgido como una tecnología potencial para la producción de productos de alto valor añadido, por ejemplo enzimas, a partir de subproductos agroindustriales. La FES se refiere al proceso en el que el crecimiento microbiano y la formación de producto ocurre en la superficie de materiales sólidos húmedos. Este proceso implica la ausencia (o casi ausencia) de agua "libre". Sin embargo, la humedad se absorbe en el substrato sólido para soportar el crecimiento y el metabolismo microbiano (Pandey, 2003; Singhanian *et al.*, 2009).

La FES tiene muchas ventajas sobre la fermentación en estado líquido, incluyendo alta productividad volumétrica, concentración relativamente mas alta de productos, generación de menos efluente, requerimiento mínimo de equipos de fermentación, (Pandey *et al.*, 1999), mayor estabilidad del producto, bajo riesgo de contaminación. Otra ventaja es el uso de residuos agro-lignocelulósicos de bajo costo, los cuales actúan como fuente de carbono y energía. Además, reduce la necesidad de medios de cultivo caros (Mitchell, *et al.*, 2006). La capacidad de la FES para minimizar la represión catabólica ya ha sido descrito para varias enzimas (Camassola y Dillon, 2007). También es un método preferible para la producción de enzimas fúngicas debido a que el crecimiento de hongos filamentosos se considera ventajosa ya que el medio sólido simula su hábitat natural. Las cepas de hongos filamentosos son fuertes productores de celulasas y xilanasas con mejor rendimiento usando FES, debido a que el medio sólido podría simular el hábitat natural de los hongos (Mitchell, *et al.*, 2006). Por lo tanto, la FES se está convirtiendo en un método popular para la producción comercial de enzimas (Camassola y Dillon, 2007; Da Silva Delabona *et al.*, 2012; Ang *et al.*, 2013; Coradi *et al.*, 2013;).

La eficacia de la fermentación de materiales lignocelulósicos presenta dos retos principales. En primer lugar, la estructura cristalina de la celulosa, que es altamente resistente a la hidrólisis y la asociación de lignina-celulosa, que forma una barrera física que impide el acceso enzimático a las fibras de celulosa. Además, la hidrólisis ácida de la celulosa requiere el uso de altas temperaturas y presiones, que conduce a la destrucción de parte de los hidratos de carbono, que se convierten principalmente en compuestos furánicos, y la generación de sustancias tóxicas como consecuencia de la degradación parcial de la lignina (Jacobsen y Wyman, 2000).

El uso de residuos agrícolas y agroindustriales lignocelulósicos abundantemente disponibles, tales como paja de arroz, salvado de arroz, paja de trigo y bagazo de caña de azúcar, para el

cultivo de microorganismos productores de celulasas, ofrece un alternativa para alcanzar esta meta (Cuadro 1) (I-Son *et al.*, 2010).

**Cuadro 1. Variedad de algunos substratos, productos y microorganismos involucrados en fermentación en estado sólido (tomado de Hölker *et al.*, 2004).**

Substrato	Producto	Microorganismo	Referencia
Harina de almendra	Lipasas	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Ul-Haq <i>et al.</i> , 2002
Orujo de manzana, Mazorca de maíz, Cáscara de cebada	Degradación de tintes	Hongos de pudrición blanca	Robinson <i>et al.</i> 2002
Residuos del plátano	Enzimas lignolíticas	<i>Pleurotus sp.</i>	Reddy <i>et al.</i> , 2003
Materia de engorde	Materia de biocontrol	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Adams <i>et al.</i> , 2002
Jalea de cacao	Endo-poligalacturonasa	<i>Peacilomyces clavissporus</i>	Souza <i>et al.</i> 2003
Mandioca, soja, grano de amaranto	Aroma	<i>Rhizopus oryzae</i>	Christen <i>et al.</i> , 2000
Torta de coco	Lipasas	<i>Candida rugosa</i>	Benjamin y Pandey 1997
Residuos de café	Seta comestible	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Fan <i>et al.</i> , 2000
Rastrojo de maíz	Enzimas celulolítica	<i>Fusarium oxysporum</i>	Panagiotou <i>et al.</i> , 2003
Pulpa de eucalipto	Xilanasa	<i>Streptomyces sp.</i>	Beg <i>et al.</i> , 2000
Garbanzo	Tempeh	<i>Aspergillus sp.</i>	Reyes-Moreno <i>et al.</i> , 2000
Lignito	Carbón solubilizado	<i>Trichoderma atroviride</i>	Hölker y Höfer 2002
Bagazo naranja	Pectinasa	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Martins <i>et al.</i> , 2002
Piña, fruta mezclada, residuos maosmi	Ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	Kumar <i>et al.</i> , (2003)
Caucho	Reciclaje	<i>Gordonia sp.</i>	Arenskötter <i>et al.</i> , 2003
Torta de soja	Proteasa	<i>Penicillium sp.</i>	Germano <i>et al.</i> , 2003
Tahití	Pectinasas	<i>Aspergillus sp.</i>	Dartora <i>et al.</i> , 2002
Rava de Trigo con polvo de semilla de frambuesa	Neomicina	<i>Streptomyces marinensis</i>	Ellaiah <i>et al.</i> , 2003

#### 4.9. Residuos agrícolas y agroindustriales

Durante el desarrollo de las actividades productivas de la mayoría de los cultivos agrícolas y de los procesos industriales relacionados con su transformación, se generan grandes cantidades de residuos que, por lo general, son considerados subproductos de muy baja importancia económica (Barragan *et al.*, 2008); la creciente toma de conciencia de los problemas ambientales y la escasez de recursos explica el creciente interés que rodea el uso de materiales de origen biológico en una amplia variedad de aplicaciones. Uno de los mayores desafíos medioambientales es encontrar nuevas maneras de utilizar los desechos y residuos procedentes de procesos industriales o agrícolas. En 2012, la cantidad total de residuos generados en todo el mundo fue de  $1.2 \times 10^{12}$  kg, aproximadamente la mitad de los cuales fue material orgánico (Väisänen *et al.*, 2016). En México, los residuos que se obtienen a partir de cultivos principales incluyen maíz, trigo, sorgo, frijol, arroz, soya, caña de azúcar, cebada y cacahuete, mientras que de los productos secundarios están el algodón cártamo, agave, maguey y café (Godoy y Fabián, 2014). Saval (2012), reportó

que en México se producen alrededor de 75.73 millones de toneladas de materia seca proveniente de 20 cultivos, de los cuales 60.13 millones de toneladas corresponden a residuos primarios, obtenidos al momento de la cosecha, entre los que están: hojas y tallos del maíz, tallos y vaina de sorgo, puntas y hojas de caña de azúcar, paja de trigo, paja de cebada y de frijol, así como cáscara de algodón. El resto, 15.60 millones de toneladas corresponde a residuos secundarios obtenidos del procesamiento post-cosecha, entre los que están: bagazo de caña de azúcar, mazorcas y olotes, bagazo de maguey o agave, así como pulpa de café.

#### **4.9.1. Bagazo de caña de azúcar (BCA)**

La agroindustria de la caña de azúcar genera, por cada tonelada de tallos molidos, 250 kg de bagazo, 6 kg de cenizas, 45 kg de melaza y 30 kg de cachaza. La cachaza o bagacillo es acumulada en los alrededores de la fábrica causando efectos ambientales adversos, por lo cual, debe trasladarse a campos marginales; esta labor ocasiona cuantiosos gastos a las industrias azucareras (Madrid y Castellanos, 1998). El BCA es un material lignocelulósico constituido principalmente por celulosa (43.8 %), hemicelulosa (28.6 %), lignina (23.5 %), cenizas (1.3 %) y otros componentes (2.8 %). Representa aproximadamente entre el 25 y 40% del total de la materia procesada (Contreras y Córdoba, 2012; Shweta, 2015).

Actualmente, el BCA se consume como combustible en las calderas del ingenio para generar electricidad, a través de la cogeneración. El BCA es un material de bajo costo, y podría ser una materia prima muy prometedora usada como fuente de carbono en el medio de fermentación para la producción de enzimas celulasas (Camassola y Dillon, 2007; Vargas-Radillo *et al.*, 2015).

#### 4.9.2. Cáscara de Cacao (CCA)

El cacao (*Theobroma cacao L.*) es uno de los productos agroalimentarios de origen neotropical de mayor penetración en el mercado internacional y sus exportaciones en grano han representado más de 71 % de volumen producido, situación derivada del alto valor agregado promocionado por la industria del chocolate y sus derivados (Barazarte *et al.*, 2008). El cultivo del cacao produce, desde la etapa de recolección hasta la de procesamiento, 10 toneladas de desechos frescos, los cuales están constituidos por la cáscara del fruto y la pulpa de las semillas (Crescente *et al.*, 1999). Del fruto del cacao sólo se aprovecha económicamente el grano que corresponde alrededor de un 10 % del peso del fruto fresco (Abarca *et al.*, 2010).

La cáscara es un producto de desecho de la industria del cacao, y representa un grave problema para las industrias el deshacerse de él. Este desecho se convierte en una fuente significativa de enfermedades cuando es usado como abono en las plantaciones (Kalvatchev *et al.*, 1998).

La CCA es un residuo que se acumula en grandes pilas junto con la plantación. El principal uso que se le ha dado a este material es el abona de suelos, debido a que sirve como mejorador del mismo (Figuiera *et al.*, 1993; Padrón-Gamboa *et al.*, 2003). Además, se han utilizado en la alimentación de porcinos y aves (Oddoye *et al.*, 2010; Olubamiwa *et al.*, 2002), como fuente comercial de pectinas (Barazarte *et al.*, 2008), en la producción de espumas de poliuretano para uso hortícola (Padrón-Gamboa *et al.*, 2004) y algunos hacen referencia a la actividad antibacteriana de extractos de la CCA frente a *Streptococcus mutans* (Osawa *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2003).

## 4.10. Purificación de proteínas

### 4.10.1 Estrategias y consideraciones para la purificación de proteínas

El desarrollo de técnicas y métodos para la separación y purificación de macromoléculas biológicas, tales como proteínas, ha sido un requisito previo importante para muchos de los avances realizados en la biociencia y biotecnología en las últimas tres décadas (Jan-Crister y Lars, 1989). La purificación de una proteína es un ejercicio multifactorial, donde los factores tales como la composición de la muestra, la concentración y el volumen, la combinación de técnicas, medios de cromatografía (resinas), de unión, lavado, y las condiciones de elución (incluyendo pH, fuerza iónica, temperatura y aditivos) todos desempeñan un papel importante (Jagschies *et al.*, 2010).

### 4.10.2. Etapas de la purificación de proteínas

Un proceso de purificación de proteínas se puede estructurar en diferentes etapas (Figura 8); captura, purificación intermedia, y el pulido de la proteína. (Jagschies *et al.*, 2010).

**Preparación, extracción y clarificación** de la proteína de interés.

**Captura:** Aislamiento, concentración y estabilización de la proteína de interés en la etapa inicial de captura.

**Purificación intermedia:** Eliminación de impurezas en masa.

**Purificación:** Lograr la pureza final de alto nivel de la proteína. En esta etapa se eliminan las impurezas mas difíciles tales como los agregados de las proteínas blanco.

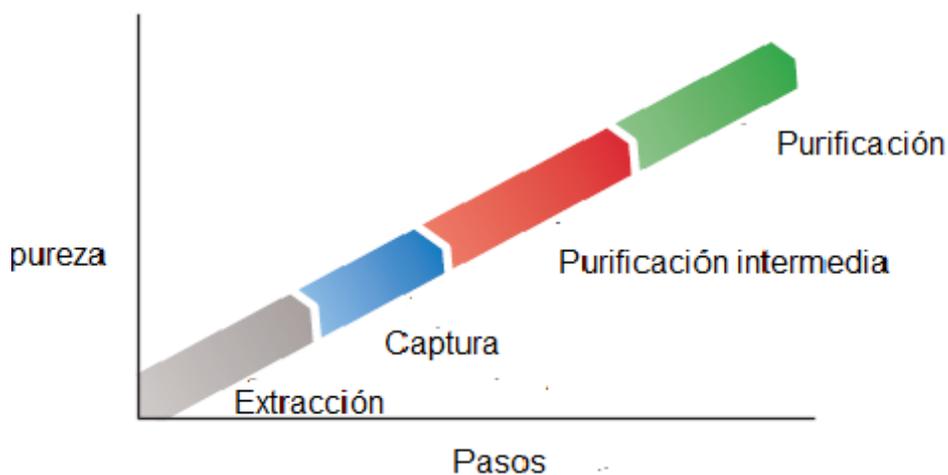


Figura 8. Las diferentes etapas de un proceso de purificación de proteínas (estrategia CIPP) (tomado de Jagschies *et al.*, 2010).

En un entorno de investigación, los requisitos de pureza son a menudo modestos y, en tales casos, sólo puede requerirse un paso de captura. También en los casos en que las exigencias de pureza son mayores, la etapa de captura puede ser suficientemente eficaz para ser seguida inmediatamente por la etapa de pulido. El número de etapas de purificación dependerá del resultado deseado del proceso de purificación global y de la eficacia de las etapas individuales. Incluso en el caso más simple, donde nuestro objetivo es un solo paso de purificación, un enfoque DoE puede ser beneficioso. Aumentar el número de etapas de purificación disminuirá el rendimiento global de la proteína. Las etapas de purificación adicionales también significan un tiempo de purificación más largo, que puede ser perjudicial para la actividad del producto. De este modo, un mayor número de etapas de purificación aumentará la pureza al coste de un rendimiento reducido de proteína activa (Jagschies *et al.*, 2010).

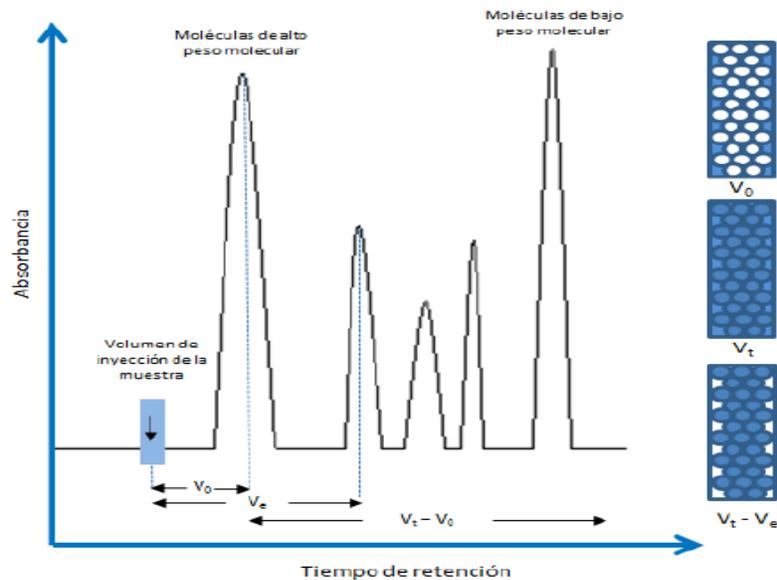
#### **4.11. Técnicas cromatográficas**

El término cromatografía se refiere a un grupo de técnicas de separación que se caracterizan por una distribución de las moléculas a ser separadas entre dos fases, una fija y otra móvil. Las moléculas con tendencia a permanecer en la fase estacionaria se moverán a través del sistema a una velocidad menor que aquellas que favorecen la fase móvil (Jan-Crister y Lars, 1989). La cromatografía no es una técnica nueva; sin embargo, es una de las técnicas más explotadas para la elucidación de mezclas de proteínas (Mayolo-Deloisa *et al.*, 2012), así como otros productos biológicos a escala preparativa.

En la actualidad, la mayoría de las cromatografías se realizan en lechos de empacados llenos de partículas adsorbentes porosas y esféricas. Estas partículas son preparadas a partir de materiales de base inorgánicas o polímeros sintéticos o naturales tales como agarosa y dextran o poliestiréno y polimetacrilato. Si bien estos materiales de fase estacionaria ofrecen alta capacidad de unión y alta eficiencia de separación, hay varias desventajas con respecto a la escala preparativa de bioseparaciones. Dado que la mayoría de los sitios de unión en estos materiales están situados dentro de las partículas adsorbentes, sólo son accesibles a través de la difusión. Esto da lugar a limitaciones de difusión, en particular para las moléculas más grandes con baja difusividad, tales como proteínas. Las camas empacadas llenas con tales materiales de fase estacionaria presentan altas densidades de empaquetado y altas caídas de presión (Winderl *et al.*, 2016).

#### 4.11.1. Cromatografía de exclusión molecular

Cromatografía de exclusión molecular (también conocido como filtración en gel, cromatografía de exclusión por tamaño o tamiz molecular) consiste en la separación de las moléculas presentes en una mezcla con base en sus diferencias de tamaño. La filtración en gel se aplica generalmente para el fraccionamiento de macromoléculas solubles en agua cuando pasan a través de una matriz de perlas porosas hechas de un polímero altamente hidratado insoluble empaquetado en una columna (Pontis, 2017). El proceso de separación depende del tamaño y el volumen hidrodinámico (volumen que ocupa una molécula en solución), el cual define la capacidad de la molécula de penetrar o no en los poros de la fase estacionaria. De tal forma que, las moléculas de alto peso molecular son excluidas de los poros debido a un efecto estérico y pasan rápidamente a través de la matriz. En el caso de biomoléculas pequeñas, estas tienen diferente accesibilidad en las cavidades de la matriz porosa. En la figura 9 se observa que las moléculas que son completamente excluidas eluyen primero en el volumen vacío ( $V_0$ ). El volumen de elución de las moléculas que pueden entrar en los poros libremente es designado como volumen total ( $V_t$ ). El volumen de elución de una proteína que esta entre  $V_0$  y  $V_t$  es designado como  $V_e$  (Mayolo-Deloisa, *et al.*, 2012).



**Figura 9.** Principios básicos de la cromatografía de exclusión molecular. Las moléculas son separadas de acuerdo a su peso molecular. Las moléculas de alto peso molecular son eluidas en el volumen vacío ( $V_0$ ) y las moléculas de bajo peso molecular son eluidas en el volumen total ( $V_t$ ). Las moléculas dentro del rango de separación de la matriz porosa son fraccionadas y excluidas en el volumen de elución ( $V_e$ ) (tomado de Mayolo-Deloisa, *et al.*, 2012).

#### **4.11.2. Cromatografía de adsorción selectiva**

Es la cromatografía más antigua, se basa en la distribución de proteína entre un material sólido (adsorbente o la fase estacionaria) y una solución. El adsorbente tiene la propiedad de fijar moléculas en su superficie. En este proceso, fuerzas de atracción de van der Waals, las interacciones débiles de enlaces no iónicos y de hidrógeno tienen lugar en sitios específicos, que son capaces de discriminar entre moléculas diferentes. Durante el proceso cromatográfico, estos sitios están ocupados por moléculas de eluyente o de los compuestos presentes en la mezcla, dependiendo de la fuerza relativa de las interacciones. En general, está más influenciada por grupos específicos que por el tamaño de las moléculas debido a que la interacción con los sitios de adsorción es producida por esos grupos. Esta técnica se utiliza principalmente para separar las moléculas no iónicas, insolubles en agua (Horacio Points, 2017).

#### **4.11.3. Cromatografía de intercambio iónico (IEC)**

La cromatografía de intercambio iónico (Ion Exchange Chromatography, IEC) separa las moléculas en base a su carga iónica neta. La separación se lleva a cabo por la competencia entre proteínas con diferente carga superficial por grupos cargados opuestamente sobre un adsorbente o una matriz de intercambio iónico. Actualmente, IEC es una de las técnicas de purificación de proteínas más usadas. En una separación utilizando IEC, las interacciones hidrofóbicas reversibles entre los solutos son controladas con el objetivo de favorecer la unión o elución de moléculas específicas logrando su separación. Una proteína que no tiene carga neta a un pH equivalente a su punto isoeléctrico (pI) no podrá interactuar con la matriz o fase estacionaria cargada (Figura 10). Sin embargo, a un pH por encima de su punto isoeléctrico una proteína podrá ligarse a una matriz cargada positivamente o intercambiador aniónico mientras que a un pH por debajo de su pI, una proteína podrá unirse a una matriz cargada negativamente o intercambiador catiónico (Handbook GEa 2004; Cummins *et al.*, 2011).

Dichos intercambiadores existen en estado de equilibrio entre la fase móvil y la fase estacionaria, dando lugar a dos tipos de IEC, llamados aniónicos y catiónicos (Figura 11). La matriz intercambiadora puede incluir protones ( $H^+$ ), grupos hidroxilo ( $OH^-$ ), iones monoatómicos cargados ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$ ), iones monoatómicos doblemente cargados ( $Ca_2^+$ ,  $Mg_2^+$ ) e iones poliatómicos inorgánicos ( $SO_4^{2-}$ ,  $PO_4^{3-}$ ), además de bases orgánicas ( $NR_3H^+$ ) y ácidos ( $R-COO^-$ ) (Cummins *et al.*, 2011).

Fase estacionaria o matriz. La elección de una matriz de intercambio iónico adecuada es probablemente uno de los aspectos más importantes y debe estar basada en diversos factores, que incluyen los siguientes: 1) la fuerza del intercambiador de iones, 2) el flujo y/o volumen de muestra y 3) las propiedades de la muestra. Como se mencionó anteriormente, los grupos funcionales de intercambio iónico pueden caer dentro de dos categorías Cuadro 2. Los grupos funcionales cargados positivamente como dietilaminoetil (DEAE) y amonio cuaternario (Q), por ejemplo, son empleados rutinariamente en cromatografía de intercambio aniónico, mientras que grupos cargados negativamente como carboximetil (CM), sulfometil (S) y sulfopropil (SP) son utilizados como intercambiadores catiónicos. Ambos tipos de intercambiadores pueden ser categorizados como fuertes o débiles. Los nombres se refieren a los valores de pKa de los grupos cargados. Los intercambiadores iónicos fuertes están totalmente ionizados sobre un amplio rango de pH. Consecuentemente, con intercambiadores fuertes las proteínas pueden adsorberse a varios sitios, necesitando condiciones de elución severas para su desorción (de hasta 1.0 M de NaCl) que puede comprometer la estabilidad de la muestra y la resolución. Los intercambiadores fuertes son por lo tanto utilizados en la optimización de los protocolos de purificación (y para ligar proteínas con valores de pI hacia el extremo final de la escala de pH). En contraste, los intercambiadores iónicos débiles son más flexibles en términos de selectividad, son comúnmente elegidos para la separación de proteínas que retienen su funcionalidad sobre un rango de pH de 6 a 9, así también como para purificar proteínas lábiles que requieren condiciones de elución débiles. El tamaño, la porosidad y la capacidad de unión de las partículas son también importantes cuando se selecciona una matriz de intercambio iónico (Cummins *et al.*, 2011).

Varios factores son importantes en la selección de la fase móvil, que pueden incluir: 1) la carga del buffer, 2) la fuerza iónica del buffer y 3) el pH. El buffer de tris es utilizado con intercambiadores DEAE, mientras que los buffers de fosfatos y acetatos son frecuentemente utilizados con intercambiadores CM. Por otra parte, la fuerza iónica mínima del buffer recomendado para intercambio iónico es de aproximadamente 10 mM. El pH de la fase móvil puede ser alterado para favorecer la adsorción o elución de las proteínas. En general, el valor del pH es elegido de manera que permita la unión reversible de la proteína de interés a la matriz o fase estacionaria. Esto es usualmente alrededor de 1 unidad arriba o abajo del pI de la proteína.

Las ventajas de la IEC son: 1) alto poder de resolución, 2) las separaciones pueden ser rápidas, 3) en general, las recuperaciones son altas, 4) los componentes de los reguladores no son

desnaturalizantes y frecuentemente compatibles con posteriores pasos de separación cromatográficos o sistemas de prueba, 5) los procesos pueden ser usados como un paso de concentración, para recuperar proteína a partir de una solución diluída (Mayolo-Deloisa *et al.*, 2012).

Las desventajas de la IEC son pocas pero incluyen: 1) La muestra debe ser aplicada a un soporte de IEC bajo condiciones de baja fuerza iónica y pH controlado, los cuales algunas veces requiere de un paso extra de intercambio de buffer para ser insertado, 2) la instrumentación cromatográfica debe ser resistente a la corrosión inducida por la sal, y 3) la concentración postcromatográfica de las soluciones diluídas de proteínas recuperadas puede resultar en altas concentraciones de sal (>1M ) inapropiado por ejemplo, en pruebas biológicas, a menos que el regulador de intercambio sea eliminado (Stanton, 2004).

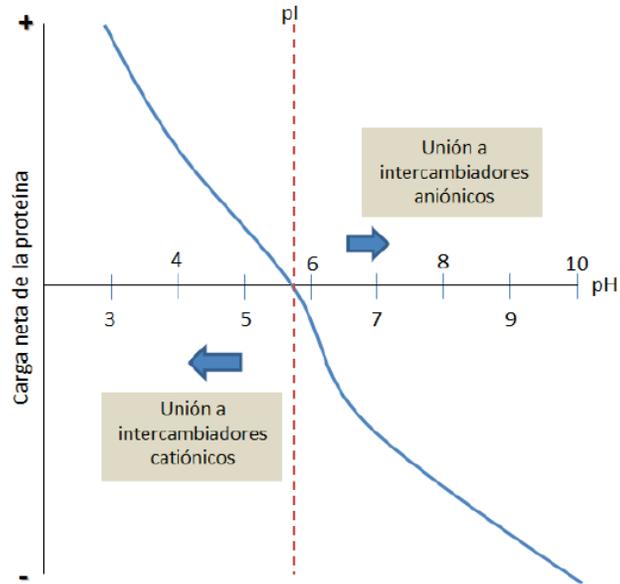


Figura 10. Carga neta de una proteína en función del pH. A un pH por encima de su punto isoeléctrico, una proteína podrá ligarse a una matriz cargada positivamente (intercambiador aniónico); mientras que a un pH por debajo de su pI, una proteína podrá unirse a una matriz cargada negativamente (intercambiador catiónico) (tomado de Mayolo-Deloisa *et al.*, 2012).

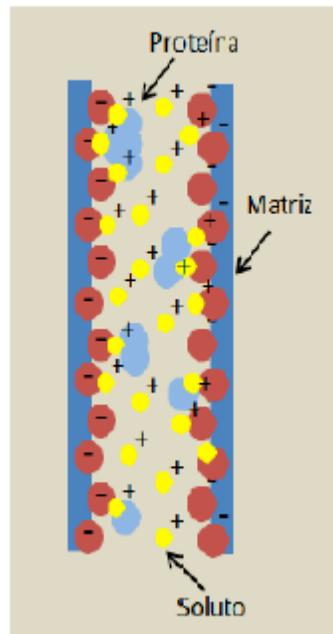


Figura 11. Principios básicos de la cromatografía de intercambio iónico. Debido a su naturaleza, los contraiones desplazan de la matriz a los grupos funcionales cargados, los cuales determinan el formato de IEC. De manera que en la cromatografía de intercambio aniónico, la fase estacionaria (usualmente una matriz porosa) desplaza a grupos funcionales cargados positivamente con contra-iones que pueden ser desplazados por un soluto aniónico. En contraste, en la cromatografía de intercambio catiónico, la fase estacionaria desplaza a grupos funcionales cargados negativamente con la ayuda de contra-cationes que son desplazados por un soluto catiónico (tomado de Cummins *et al.*, 2011).

**Cuadro 2. Propiedades de matrices comerciales de intercambio iónico (tomado de Mayolo-Deloisa *et al.*, 2012).**

Tipo de intercambiador	Grupo intercambiador	Grupo funcional	Buffer (contra-iones)	Resinas comerciales	Rango de pH
Anión fuerte	Amonio cuaternario (Q)	$\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	$\text{Cl}^-$ $\text{HCOO}^-$ $\text{CH}_3\text{COO}^-$ $\text{SO}_4^{2-}$	Q Sepharose® Capto Q Dowex® 1x2 Amberlite®/ Amberjet® QAE Sephadex	2-12
Anion débil	Dietilaminoetil (DEAE)	$\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{N}^+\text{H}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	$\text{Cl}^-$ $\text{HCOO}^-$ $\text{CH}_3\text{COO}^-$ $\text{SO}_4^{2-}$	DEAE-Sepharose® Capto® DEAE DEAE cellulose	2-9
Catión fuerte	Sulfopropil (SP)	$(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3^-$	$\text{Na}^+, \text{Li}^+, \text{H}^+$	Capto ®S SPSepharose® SPSephadex® TSKgel SP-5PW	4-13
Catión débil	Carboximetil (CM)	$\text{OCH}_2\text{COO}^-$	$\text{Na}^+, \text{Li}^+, \text{H}^+$	CMCellulose® CMSepharose® CMSephadex® CL6B TSKgel CM-5PW	6-10

#### 4.11.4. Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)

La HIC es uno de los métodos de purificación de macromoléculas biológicas más utilizado, especialmente para proteínas terapéuticas (Mahn *et al.*, 2005; Lienqueo *et al.*, 2007). Los mecanismos de adsorción en el cual están basados las interacciones hidrofóbicas de las moléculas con la fase estacionaria fueron primeramente demostradas por Tiselius en 1940 (Porath, 1987).

La HIC explota la interacción reversible entre la superficie hidrofóbica de una proteína y una matriz cromatográfica con un ligando hidrofóbico a moderadamente altas concentraciones de sal, como el sulfato de amonio. Este tipo de sales tiene alta polaridad y se unen fuertemente al agua, lo cual induce la exclusión del agua sobre la proteína y la superficie del ligando lo que promueve las interacciones hidrofóbicas y la precipitación de la proteína (salting-out) (Xia *et al.*, 2004; Lienqueo *et al.*, 2007).

Las interacciones hidrofóbicas son las fuerzas no covalentes más importantes que pueden estar relacionadas con diferentes procesos, como la estabilización de la estructura de las proteínas, la unión de enzimas a un sustrato y el repliegamiento de proteínas. Este tipo de interacción aparece cuando compuestos no polares son colocados dentro de un ambiente acuoso (Figura 12) (Queiroz *et al.*, 2001; Lienqueo *et al.*, 2007).

Fase estacionaria o matriz. La fase estacionaria en HIC presenta pequeños grupos no-polares unidos a estructuras de polímeros hidrofílicos. Por lo tanto, existen varios tipos de fases estacionarias en HIC que pueden diferir en la naturaleza química del ligando, las superficie o concentración del ligando sobre el soporte y la naturaleza química y el tamaño de partícula del soporte base (Queiroz *et al.*, 2001; Lienqueo *et al.*, 2007). El soporte por sí mismo debe ser inerte y no debe tener grupos funcionales capaces de ligarse a la proteína. Los ligandos más ampliamente usados son alcanos de cadena lineal (como butil y octil) y algunos grupos aromáticos (e.g. fenil). Un incremento en la longitud de la cadena de un ligando alquilo aumenta la fuerza de la interacción hidrofóbica entre la proteína y la resina. Por otro lado, un incremento en el grado de sustitución de la resina lleva a un aumento en la capacidad de unión de la fase estacionaria, debido a la alta probabilidad de que se formen múltiples puntos de unión y en ocasiones esto puede hacer difícil la elución de la proteína ligada sin desnaturalizarla (Lienqueo *et al.*, 2007). La elección del ligando es esencialmente empírica, pero se puede hacer uso del conocimiento básico que se tenga sobre la proteína de interés. Una proteína hidrofóbica débil puede requerir de un ligando hidrofóbico fuerte para asegurar la unión. Con una proteína muy hidrofóbica, es preferible un ligando hidrofóbico débil para evitar la desnaturalización (O'Farrell, 2008). La unión y/o la elución en HIC son logradas por la adición o remoción de sales u otros solutos. La estructura formada por las sales aumenta la fuerza de las interacciones hidrofóbicas. Las series de Hofmeister (o liotrópicas), organiza a los iones desde los que promueven las interacciones hidrofóbicas hasta los que las disminuyen (Figura 13). Esto se refiere tanto a la capacidad de las sales para hacer que una proteína se precipite (salting-out), así como a sus interacciones en HIC (Xia *et al.*, 2004; O'Farrell, 2008). Cualquier sal liotrófica puede ser utilizada en HIC, sin embargo el sulfato de amonio es usado a menudo debido a su alta solubilidad y buenas propiedades liotrópicas (Roettger y Ladisch, 1989; O'Farrell, 2008). En la mayoría de las aplicaciones, la unión se logra mediante la carga a la columna de una alta concentración de sal. La elución se lleva a cabo mediante la reducción de la concentración de sal, ya sea a través de un gradiente o en forma escalonada. A pesar de que con la elución en gradiente se puede lograr una mejor separación, en ocasiones los picos pueden ser amplios debido a la agregación de las proteínas y la lenta asociación/disociación. Esto puede resultar en una baja resolución. En tales circunstancias, se recomienda utilizar un método de elución por pasos.

También se ha reportado que se pueden lograr picos más nítidos mediante la inclusión de una pequeña cantidad de solvente (e.g. etanol 0.1-5 %) en el buffer de elución (O'Farrell, 2008).

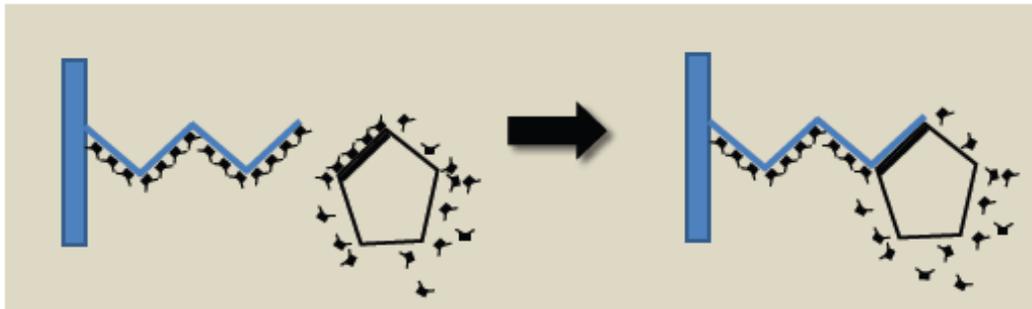


Figura 12. Principios básicos de la cromatografía de interacción hidrofóbica. La figura representa una proteína unida a un ligando y la expulsión del agua ordenada. La estructura de los enlaces de hidrógeno del agua líquida es perturbada por la presencia de solutos no polares. Las moléculas de agua forman un caparazón alrededor del ligando hidrofóbico y la superficie de la proteína hidrofóbica donde la estructura del enlace de hidrógeno es más ordenada que en la mayoría del solvente (tomado de O'Farrell, 2008).

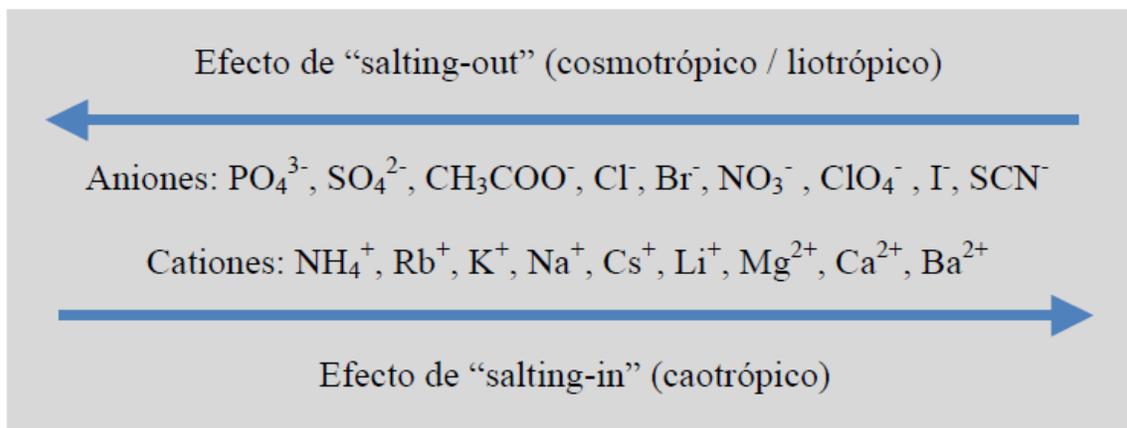


Figura 13. Series de Hofmeister (tomado de Mayolo-Deloisa *et al.*, 2012).

#### **4.11.5. Cromatografía de afinidad**

La cromatografía de afinidad permite el aislamiento de un analito diana a partir de una mezcla compleja y puede utilizarse para purificar proteínas, carbohidratos, fármacos, haptenos o cualquier analito de interés una vez que esté disponible un par de afinidad. Implica la explotación de interacciones específicas entre la unión de un par de afinidad por ejemplo, la afinidad entre un anticuerpo y su antígeno asociado, o entre cualquier ligando y su receptor / proteína de unión asociado. Con el descubrimiento de la proteína A en 1970, y posteriormente de las proteínas G y L, la cromatografía de inmunoafinidad ha crecido en popularidad y ahora es la metodología estándar para la purificación de anticuerpos que puede implementarse para una selección de diferentes aplicaciones, tales como inmunodiagnósticos (Darcy *et al.*, 2011).

La cromatografía de afinidad se introdujo por primera vez por Cuatrecasas, Antinson y Wilchek en 1968. Utilizando el concepto básico de que cada bio-molécula suele reconocer otra molécula natural o artificial, desarrollaron una técnica que se utiliza ampliamente en la mayoría de los campos científicos como la biotecnología y biología molecular. En términos generales, la cromatografía de afinidad es una técnica de separación en la que una molécula con una afinidad de unión selectiva es acoplada covalentemente a una matriz de soporte. Esto permite al ligando para unirse a, y extraer su blanco complementario a partir de una mezcla en solución o suspensión. La cromatografía de afinidad usa interacciones biológicas específicas y reversibles entre un ligando y una molécula diana complementaria. Se utiliza con frecuencia en el procesamiento y el aislamiento de anticuerpos y tiene la ventaja de ser una técnica amigable con el usuario, ya que es "fácil de usar", rápido, y selectiva para la captura de proteínas diana (Darcy *et al.*, 2011).

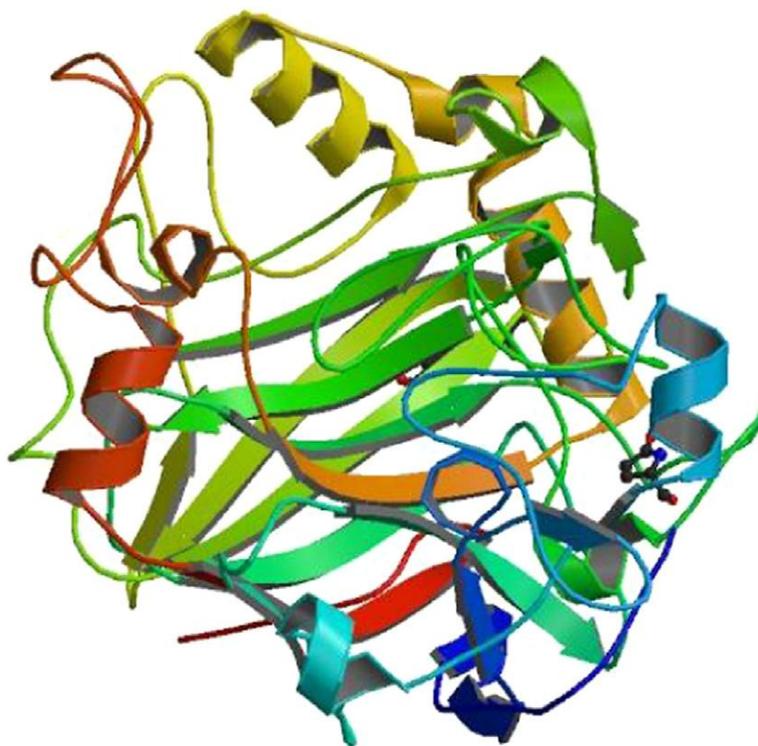
#### **4.12. Estructura, función y propiedades de las celobiohidrolasas**

Las celobiohidrolasas (CBH) son componentes clave de los sistemas multienzimáticos de celulasas de hongos; junto con las endo-1,4- $\beta$ -glucanasas de acción aleatoria, hidrolizan celulosa a través de un mecanismo de procesamiento, formando la celobiosa como producto principal (Teeri, 1997; Payne *et al.*, 2015). La celobiosa es convertida por  $\beta$ -glucosidasas a glucosa; el último producto puede además fermentarse a etanol u otros combustibles líquidos y químicos. Recientemente la producción de bioetanol obtenido a partir de residuos lignocelulósicos se ha convertido en una realidad comercial (Gusakov, 2013). Debido a lo anterior, encontrar y seleccionar nuevas celulasas (y CBHs, en particular), así como la ingeniería de las enzimas

conocidas para mejorar su actividad y otras propiedades importantes siguen siendo un tema muy importante entre los investigadores que trabajan en esta área. Las CBH fúngicas pertenecen a las familias 6 y 7 de las glucósido hidrolasas, y la mayoría de ellas tienen una estructura bimodular, es decir, consisten en un dominio catalítico (CD) y un dominio de unión a la celulosa (CBD). El CD está conectado al CBD por medio de un enlazador peptídico. El CBD se ancla al sustrato celulosa permitiendo al CD realizar su función catalítica. El CBD no está involucrado en la hidrólisis, pero su eliminación reduce significativamente la actividad enzimática hacia el sustrato (Teeri, 1997; Payne *et al.*, 2015). Se han reportado diferentes enfoques para generar CBHs manipuladas con estabilidad y actividad óptimas (Bommarius *et al.*, 2014). Las estructuras de las celulasas se explican tomando las enzimas representativas cuyas estructuras y funciones han sido bien elucidadas en la base de datos de proteínas ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)).

Las CBHs son los principales componentes de los sistemas celolíticos fúngicos; su contenido puede alcanzar hasta un 70-80 % del total de la proteína secretada. A diferencia de la mayoría de endoglucanasas, que actúan preferentemente sobre las regiones amorfas de la celulosa, las celobiohidrolasas pueden hidrolizar tanto celulosa amorfa y cristalina. Los hongos celolíticos producen dos tipos de CBHs llamadas CBH I y CBH II, muchas de las cuales pertenecen a las familias 6 y 7 de las glucósido hidrolasas (GHs) (Gao *et al.*, 2011). CBHs de tipo I (EC 3.2.1.176), pertenecientes a la familia 7 de glucósido hidrolasa (GH7), eliminan los residuos de celobiosa a partir del extremo reductor de la molécula de celulosa vía un mecanismo procesivo, mientras que las celobiohidrolasas GH6 de tipo II (EC 3.2.1.91) actúan procesivamente sobre los extremos no reductores (Lynd *et al.*, 2002). La estructura de las CBHs se explica tomando la estructura cristalina de la celobiohidrolasa de *Phanerochaete chrysosporium* (Cel 7A) (PDB ID: 1GPI). Esta enzima pertenece a la familia GH 7. Después de las modificaciones post-traduccionales la cadena peptídica que tiene 431 aminoácidos de largo moldea en una enzima funcional con una estructura tridimensional de barril  $\beta$  tipo remolino (Figura 14). Las dimensiones de este barril  $\beta$  tipo remolino son de 62 Å X 41 Å X 48 Å. Cada barril  $\beta$  tipo remolino tiene dos láminas  $\beta$  largas antiparalelas de frente una a la otra, con una interfaz hidrofóbica entre estas dos hojas. Cada lámina  $\beta$  está compuesta de seis hebras, ligeramente curvadas que desarrollan caras convexas y cóncavas. Estas láminas  $\beta$  están interconectadas por medio de 4 hélices  $\alpha$ . Los bucles originados en el lado cóncavo de las láminas  $\beta$  se estabilizan mediante nueve puentes disulfuro. Los bucles de las hojas  $\beta$  determinan la forma del sitio de

unión del sustrato. Los residuos de aminoácidos (427-430) en el extremo C de cada monómero interactúan por medio de puentes de hidrógeno con los mismos cuatro residuos de otro monómero creando una interacción de hebra  $\beta$  antiparalela. En estas interacciones Ser 431 participa activamente. A toda la proteína intacta un enlazador y al modelo de unión a celulosa (CBM) se conectan a la región C terminal del dominio catalítico. Se espera que Asn 286 tenga grupos azúcares adicionales que interfieran en la formación de dímero in vivo. El primer aminoácido N-terminal glutamina se cicla produciendo un residuo de piroglutamato. Existen dos sitios potenciales de glicosilación en Asn 188 y Asn 286. Asn 286 está unido a una N-acetilglucosamina. Glu 207 es el nucleófilo y Glu 212 es el ácido / base que dona el protón al oxígeno glicosídico en el primer paso de la reacción. En el mecanismo de reacción ácido / base, Glu 207 está cargado negativamente, y Asp 209 sería protonado y no cargado. Asp 209 es probable que esté involucrado en el mantenimiento de los valores de pKa apropiado para los otros residuos catalíticos, asegurando el estado de carga correcta del sitio activo durante la catálisis (Juturu y Wu, 2014).



**Figura 14.** Estructura de la exoglucanasa de *P. chrysosporium* (PDB ID: 1GPI). La proteína tiene una estructura de barril  $\beta$  tipo remolino formada por dos largas láminas  $\beta$  antiparalelas que empacan una sobre otra (tomado de Juturu y Wu, 2014).

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **5.1 Aislamiento de la cepa *M. roreri***

En el presente trabajo de investigación se utilizó la cepa MROCP de *M. roreri*, aislada de mazorcas infectadas e identificada mediante la amplificación y secuenciación de un fragmento del gen 18S ARNr (Número de acceso GenBank: KM998972) (Concepción-Brindis et al., 2015).

### **5.2. Medio de cultivo.**

El medio de cultivo empleado para la conservación y purificación específica de la cepa MROCP de *M. roreri* fue el medio sólido V8 clarificado compuesto de jugo de verduras con antioxidantes naturales y vitaminas A y C, 200 mL<sup>-1</sup> y CaCO<sub>3</sub>, 3 g L<sup>-1</sup>.y agar, 15 g L<sup>-1</sup>.

### **5.3. Cinética de producción de la enzima celobiohidrolasa I**

#### **5.3.1 Composición del sistema de fermentación en estado sólido (FES).**

La FES se desarrolló en frascos de 100 mL con 25 g de medio de fermentación, el cual contenía en gr por 100 gr lo siguiente: urea, 0.3; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.65; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.26; MgSO<sub>4</sub>, 0.02; FeSO<sub>4</sub>, 0.029, bagazo de caña de azúcar (BCA) o cáscara de cacao (CCA), 24.6 y 70 mL de agua destilada, conteniendo 70% de humedad inicial. El pH se ajustó a 4.5. El BCA y CCA se tamizaron y lavaron con agua caliente para eliminar los azúcares residuales. El medio de cultivo y el substrato inductor (BCA o CCA) se esterilizaron por separado a 120°C durante 15 min. Una vez enfriadas, ambas fracciones se mezclaron (Hölker *et al.*, 2004; Deswal *et al.*, 2012).

#### **5.3.2 Preparación de los pre-inóculo e inóculo.**

La cepa MROCP de *M. roreri* se cultivó en cajas Petri, hasta alcanzar aproximadamente 8.5 cm de diámetro (15-21 días de edad de la colonia). Con la finalidad de favorecer la germinación de las esporas y el crecimiento de micelio del hongo, se prepararon cultivos pre-inoculados a partir de una suspensión de esporas, agregando 5 mL del medio de fermentación a cada caja Petri, y removiendo cuidadosamente los conidios con un pincel. La suspensión de esporas, se transfirió a un matraz de 500 mL con 100 g de medio de cultivo de fermentación y se incubó a 28°C, en un agitador orbital a 150 rpm durante 24 h (Phillips-Mora, 2003). Posteriormente, las esporas germinadas se contaron y los matraces problema de 250 mL con 25 g de medio, fueron inoculados con una concentración de 1x10<sup>6</sup> esporas germinadas/g de materia seca (Lipa y

Slizynki, 1973). Finalmente, todos los matraces problemas y testigos (sin inocular) se incubaron a 28°C sin agitación y bajo condiciones naturales de luz-obscuridad. Posteriormente, las muestras se filtraron cada 24 h durante los primeros 30 días. A continuación, una muestra fue obtenida los días 35 y 40. El líquido filtrado constituyó el extracto crudo y se usó para la determinación de pH, proteína total y actividad enzimática extracelular de CBH I; el material sólido se usó para determinar la biomasa celular del hongo. (Hölker *et al.*, 2004; Deswal *et al.*, 2012). La producción de enzimas extracelulares CBH I, biomasa celular y pH, fueron determinados por triplicado cada 24 h durante todo el proceso de la FES.

### **5.3.3. Determinación de la biomasa de *M. roreri*.**

La producción de biomasa de la cepa MROCP de *M. roreri*, se determinó en los matraces problemas preparados como se indicó en la sección anterior. El micelio se cosechó cada 24 h, empleando un sistema de filtración al vacío en un sistema Millipore y papel Whatman número 3. El micelio filtrado se secó en un horno Scorpion Cientific a 65°C durante 72 h. Finalmente, las muestras de los matraces problemas y testigos, se pesaron en una balanza analítica Marca AE (Modelo AEP). La biomasa de *M. roreri* calculada en gramos fue el resultado del peso de la biomasa de la muestra problema menos la muestra testigo (Concepción-Brindis *et al.*, 2015). Adicionalmente, el pH se midió con un potenciómetro digital marca Conductronic PC 18 (Mahmood *et al.*, 2016).

### **5.3.4. Determinación de actividad enzimática.**

Las muestras fueron filtradas en una unidad de filtración al vacío en un sistema Millipore y papel Whatman número 3, para la determinación de la actividad enzimática extracelular de CBH I, proteína total (Lowry, 1951) y pH. La actividad enzimática extracelular de CBH I se determinó midiendo la hidrólisis del sustrato *p*-nitrofenil-celobiosa (*p*-NPC) (Sigma). La mezcla de reacción (1 ml) contenía *p*-NPC 2 mM, preparado en regulador de acetato de sodio 50 mM (pH 5.0) y una solución de enzima apropiadamente diluida. Después de incubado a 40 °C durante 30 min, la reacción se detuvo agregando 60 µl de carbonato de sodio 60 mM, y el color de la mezcla formado se leyó a 405 nm (GENESYS 10uv). Una unidad de actividad enzimática de CBH I se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 µmol de *p*-nitrofenol por min bajo las condiciones de ensayo. La actividad específica es definida como el número de unidades por miligramo de proteína total (Han y Chen, 2010). Adicionalmente, la proteína total se midió

siguiendo el método descrito por Lowry *et al.*, (1951), empleando albúmina sérica bovina como patrón.

## **5.4. Purificación de la enzima CBH I.**

### **5.4.1. Preparación del extracto enzimático extracelular.**

La enzima CBH I de la cepa MROCP de *M. royeri* cultivado bajo FES fue purificada a partir del día y del sustrato inductor que mostró el nivel más alto de actividad enzimática extracelular. El extracto enzimático extracelular obtenido como se describe en el apartado 5.3.5, fue tratado con fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF) 0.2 mM y constituyó el extracto crudo para la determinación de la actividad enzimática de CBH I (Han y Chen, 2010), proteína total (Lowry, 1951) y purificación de la enzima, siguiendo los métodos descritos en la literatura (Gusakov *et al.*, 2005; Han y Chen, 2010; Gao *et al.*, 2011; Volkov *et al.*, 2014,).

### **5.4.2. Precipitación con sulfato de amonio.**

El extracto enzimático extracelular, obtenido como se describe en el apartado 5.4.1., fue precipitado con sulfato de amonio a diferentes porcentajes de saturación ( 60, 70, 80, 90 %) en agitación durante 24 h a 4 °C. El precipitado fue colectado mediante centrifugación a 10,000 x g durante 20 min a 4 °C y disuelto en un volumen mínimo de regulador Tris-HCl 20 mM / NaCl 20 mM (pH 8.0) (Davy *et al.*, 2000, Han y Chen, 2010). A partir de esta fracción proteica, se llevó a cabo el aislamiento y purificación de la enzima CBH I, así como su caracterización bioquímica correspondiente.

### **5.4.3. Diálisis**

Las fracciones de proteínas obtenidas por precipitación con sulfato de amonio fueron dializadas en Membranas de celulosa Spectra/6 de 10,000 MWCO contra un regulador de Tris-HCl 20 mM / NaCl 20 mM (pH 8.0) (Sánchez-Mundo *et al.*, 2010). Posteriormente, se le determinó la concentración de proteína total y actividad enzimática.

#### **5.4.4. Cromatografía de intercambio**

La fracción proteica obtenida en el apartado 5.4.3, fue aplicada a una columna de HiTrap™ (1.6 x 2.5 cm), empacada con el intercambiador aniónico fuerte Q sepharose Fast Flow (QFF), comercialmente disponible, equilibrada con regulador de Tris-HCl 20mM / NaCl 20 mM (pH 8.0). Se colectaron fracciones de 0.5 mL/min con el mismo regulador; la proteína unida fue eluída con un gradiente de 0-1.0 M NaCl en regulador Tris-HCl 20 mM (pH 8.0) a una velocidad de flujo 0.5 ml/min, con monitoreo a 280 nm (FPLC-ÄKTAprime plus, GE Healthcare Amersham Biosciences, USA).

#### **5.4.5. Determinación del peso molecular mediante SDS-PAGE**

La purificación de la enzima fue monitoreada por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de acuerdo a Laemmli (1970). La electroforesis se realizó en un gel de poliacrilamida concentrador y separador al 4 y 12 % (p/v) respectivamente, usando un equipo Mini Protean II (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Para su realización, se tomarán 20 µl de la muestra para depositarlas en cada carril del gel. La migración se llevó a cabo a 110 V durante 2 h. Los geles se tiñeron con plata usando el kit comercial SilverQuest™ (Invitrogen™). El peso molecular de las bandas proteicas fue calculado usando proteínas estándares de peso molecular de amplio rango (10 a 220 kDa) (BenchMark™ Protein ladder, Invitrogen).

### **5.5. Caracterización Bioquímica de la Enzima CBH I.**

#### **5.5.1. Pruebas de especificidad de sustratos.**

La actividad de la enzima celulolítica CBH I frente a sustratos fue determinada en la fracción purificada. Los sustratos cromogénicos usados en el análisis de exopeptidasas fueron Benzoil-tirosina-*p*-nitroanilida (Bz-Tyr- *p*NA) para la actividad de carboxipeptidasa, Leucina-*p*-nitroanilida (Leu-*p*NA) y Lisina-*p*-nitroanilida (Lys-*p*NA) para la actividad de aminopeptidasa, y Alanina-prolina-*p*-nitroalida (Ala-pro-*p*NA) para la actividad de Xaa-Pro-DAP; todos ensayados a una concentración de 0.3 mM (Sánchez-Mundo *et al.*, 2010; Mercado-Flores *et al.*, 2004). Para la actividad enzimática de la endopeptidasa aspartil proteinasa fue ensayada con Albúmina Sérica Bovina como sustrato (Saheki y Holzer, 1975; Milewski *et al.*, 1994; Mercado-Flores *et al.*, 2004; Sánchez-Mundo *et al.*, 2010; ).

La actividad enzimática de CBH I fue ensayada contra los sustratos celulolíticos carboximetilcelulosa-Na (CMC-Na), *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-Glucopiranosido (PNPG), avicel, papel filtro (Whatman No.1). La actividad de la enzima CBH I ensayada con el sustrato *p*-NPC, fue tomada como el 100% (Karnchanatat *et al.*, 2007; Han y Chen, 2010). La actividad enzimática de CBH I sobre CMC-Na, avicel y papel filtro fue determinada mediante el monitoreo de los azúcares reductores liberados con el método con el kit Glucosa assay GAGO-20 (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

#### **5.5.2. Efecto de iones metálicos sobre la actividad enzimática.**

El efecto de varios iones metálicos sobre la actividad de la enzima CBH I purificada fue ensayada con diferentes iones metálicos. Las muestras se preincubaron con los iones metálicos a concentraciones de 0.1 a 37°C durante 30 min. Dichos iones fueron BaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, NaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, AlCl<sub>3</sub> y AgNO<sub>3</sub>. La actividad de la enzima en ausencia de los iones metálicos fue considerada como el 100 % (Han y Chen, 2010; Sánchez-Mundo *et al.*, 2010).

#### **5.5.3. Efecto de inhibidores y agentes reductores sobre la actividad enzimática.**

Para el estudio del efecto de los inhibidores sobre la actividad de la enzima CBH I purificada se utilizó ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y  $\beta$ -mercaptoetanol a concentraciones de 0.1 y 1.0 mM. La enzima se incubó en presencia de cada inhibidor durante 30 min a 37°C, seguida de la determinación enzimática con el sustrato *p*-NPC específico de la CBH I como se describe en la sección 5.3.5. La actividad de la enzima ensayada en ausencia de inhibidores y agentes reductores fue tomada como el 100% (Han y Chen, 2010).

#### **5.5.4. Efecto del pH sobre la actividad de la enzima.**

Este efecto se determinó mediante diferentes valores de pH durante el experimento, usando regulador de acetato de sodio 100 mM (pH4-5), regulador de fosfato de sodio 100 mM (pH 6-7) y regulador de Tris-HCl 100 mM (pH 7, 8 y 9). La actividad de la enzima extracelular CBH I fue determinada como se indica en la sección 5.3.5. La actividad de la enzima CBH I ensayada a pH 5.0, se consideró como el 100% (Han y Chen, 2010; Sánchez-Mundo *et al.*, 2010).

### **5.5.5. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima y estabilidad térmica.**

La temperatura óptima para la actividad de la enzima CBH I purificada, fue determinada siguiendo el método descrito en el apartado 5.3.5 e incubando la mezcla de reacción a diferentes temperaturas (30-80 °C), según la técnica de Muzziotti (2008). Para los ensayos de estabilidad térmica, la enzima exoglucanasa purificada fue pre-incubada a diferentes temperaturas (30, 37, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 °C durante 60 min sin sustrato, así mismo, el control fue incubado a 4 °C. La actividad residual de la enzima fue determinada siguiendo el método descrito en el apartado 5.3.5. La actividad de la enzima CBH I purificada ensayada con pre-incubación a 4 °C y pH 5.0 fue tomada como el 100% (Han y Chen, 2010; Sánchez-Mundo *et al.*, 2010).

### **5.6. Análisis estadístico.**

Se utilizaron dos tratamientos (T) con tres repeticiones por tratamiento. En el T1 se estudió la fermentación del CCA inoculado con la cepa MROCP de *M. roreri* y T2 se estudió la fermentación de la BCA inoculado con la cepa MROCP de *M. roreri*, cada 24 h durante 30 días, seguido de las determinaciones a los días 35 y 40 para ambos casos. El diseño estadístico para la actividad enzimática fue completamente aleatorio. se realizó un ANOVA para conocer el efecto de interacción entre los sustratos inductores BCA y CCA con una  $\alpha=0.05$ , mediante la herramienta PROC GLM del programa estadístico SAS®STUDIO, versión 3.5 (2016).

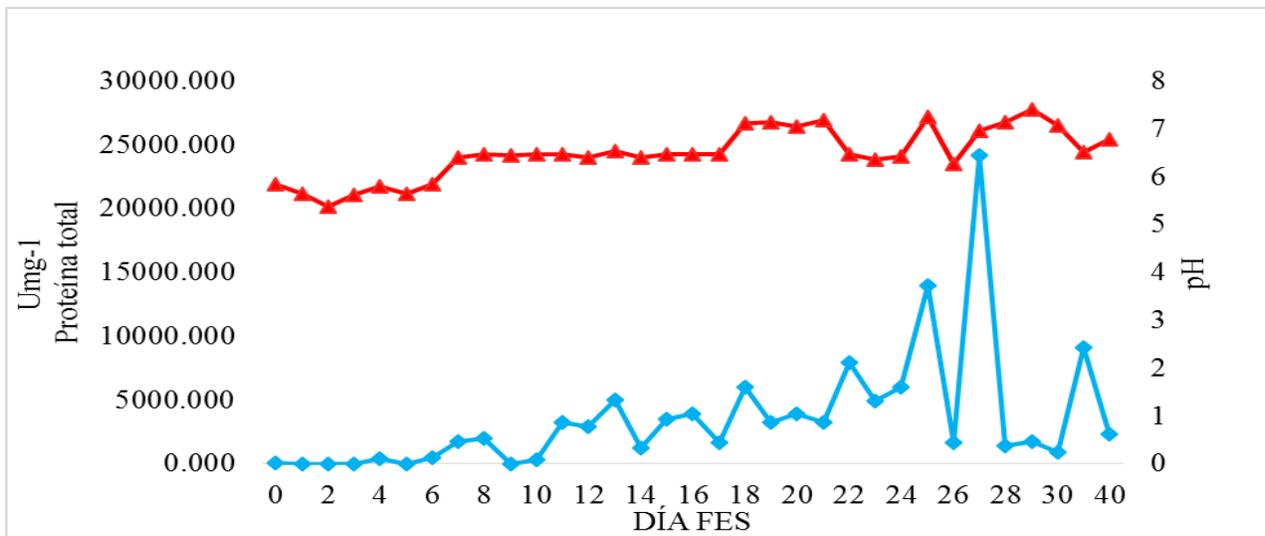
## 6. RESULTADOS

### 6.1 Cinética de producción de la enzima CBH I de *M. royeri*

Los resultados que a continuación se presentan, muestran el comportamiento del valor de pH, biomasa celular y actividad enzimática de CBH I extracelular de la cepa MROCP de *M. royeri*.

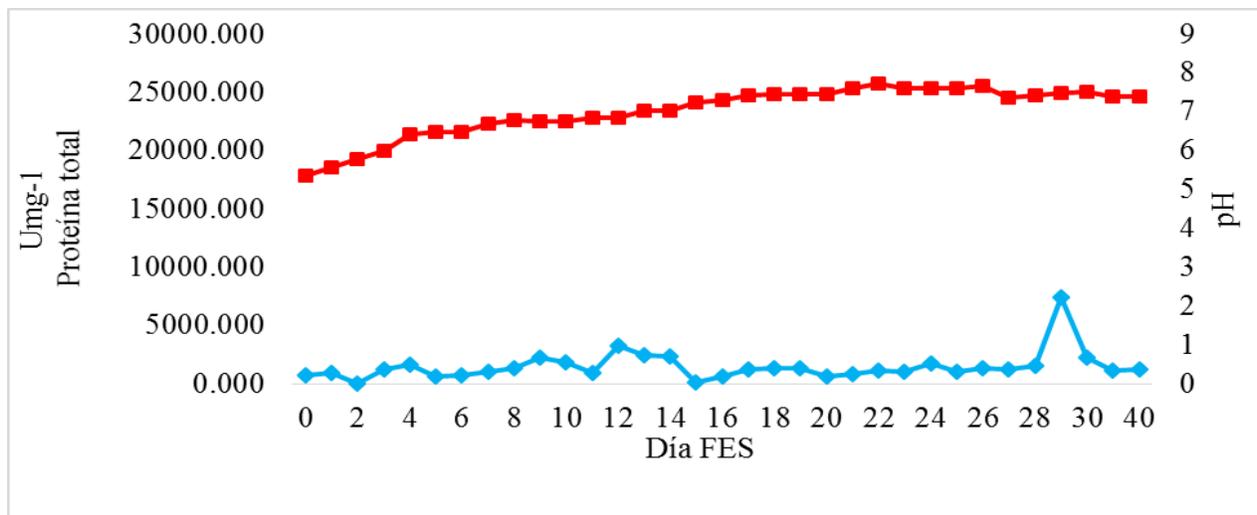
En el ensayo de FES con BCA inoculado con *M. royeri* MROCP, el valor de pH mostró un valor inicial de 5.85 en el día cero e incrementó progresivamente hasta alcanzar un valor de 6.78 al día 40 de la FES (Figura 15). En el ensayo de FES con CCA inoculado con *M. royeri* MROCP, el pH inicial fue de 5.35 en el día cero, incrementando progresivamente hasta alcanzar un valor de 7.52 al día 30, y posteriormente descendió a 5.35 al día 40 de la FES (Figura 16).

La actividad enzimática específica de CBH I extracelular (Figura 15), mostró durante los primeros 26 días de fermentación con BCA, niveles bajos de actividad enzimática; sin embargo, el día 27, la actividad se incrementó, alcanzando un valor máximo de 24,193.107 U mg<sup>-1</sup> de proteína total. En los días, del 28 al 40, la actividad de CBH I disminuyó notablemente.



**Figura 15.** Comportamiento de la actividad enzimática específica de CBH I extracelular de la cepa MROCP de *M. royeri* cultivado en FES con el substrato BCA: pH (▲) y actividad enzimática con BCA en U mg<sup>-1</sup> de proteína total (◆).

La determinación de actividad enzimática específica de CBH I extracelular (Figura 16), mostró que durante los primeros 28 días de fermentación con CCA, hubo niveles bajos de actividad enzimática, sin embargo, el día 29 la actividad se incrementó, alcanzando un valor máximo de 7,443.851 U mg<sup>-1</sup>, de proteína total, en los días 30 al 40 la actividad de la enzima CBH I disminuyó notablemente.



**Figura 16. Comportamiento de la actividad enzimática específica de CBH I de la cepa MROCP de *M. royeri* cultivado en FES con el sustrato CCA: pH (■) y actividad enzimática con CCA en U mg<sup>-1</sup> de proteína total (◆).**

El análisis de varianza mostró un efecto estadísticamente significativo ( $p = 0.0185$ ), entre los dos tratamientos BCA y CCA inoculados con la cepa MROCP de *M. royeri* (anexos II).

La gráfica del anexo II, contiene la variabilidad de los datos, mostrando una similitud en el grupo de valores de CCA (T1), es decir, los datos presentan menor dispersión y tienden a estar más cercanos del valor de la media de  $1,458.07 \text{ U mg}^{-1}$  de proteína total y una desviación estándar de  $1,272.21 \text{ U mg}^{-1}$  de proteína total. Por el contrario, el grupo de valores de BCA los datos presentan mayor dispersión y tienden a estar más alejados del valor de la media de  $3,553.47 \text{ U mg}^{-1}$  proteína total y una desviación estándar de  $4,814.44 \text{ U mg}^{-1}$  proteína total.

Dicho análisis nos indica que el BCA es el mejor sustrato inductor para la producción de CBH I extracelular de la cepa de *M. royeri* MROCP cultivado en un sistema de fermentación en estado sólido.

En el ensayo de FES con BCA inoculado con *M. royeri* MROCP, la biomasa celular inicio con un valor de 222 mg en el día cero (Cuadro 2), incrementó hasta un valor de 296 mg en el día 25 y posteriormente disminuyó a un valor de 244 mg en el día 40 de la FES. Así mismo, para el ensayo de FES con CCA inoculado con *M. royeri* MROCP, la biomasa celular inició con un valor de 220 mg en el día cero (Cuadro 2), incrementó hasta un valor de 287 mg en el día 16 y posteriormente disminuye a un valor de 251 mg en el día 40 de la FES.

**Cuadro 3. Efecto de la fermentación del BCA y CCA con inóculo de la cepa MROCP de *M. roreri* y los días de fermentación en el cambio de pH, actividad enzimática de CBH I y biomasa.**

Factores  Días de fermentación	pH		Actividad enzima exoglucanasa ( U mg <sup>-1</sup> proteína total)		Biomasa (g)	
	BCA	CCA	BCA	CCA	BCA	CCA
0	5.85	5.35	94.228	717.624	0.222	0.220
1	5.64	5.56	14.581	910.672	0.244	0.221
2	5.37	5.78	2.833	0.000	0.250	0.197
3	5.62	6.00	16.417	1191.941	0.269	0.195
4	5.80	6.41	382.615	1614.759	0.273	0.224
5	5.64	6.49	12.451	644.247	0.205	0.211
6	5.85	6.49	474.353	704.624	0.254	0.219
7	6.40	6.70	1758.266	986.667	0.283	0.247
8	6.47	6.79	1977.573	1333.103	0.264	0.258
9	6.45	6.74	0.000	2249.087	0.222	0.197
10	6.46	6.76	291.714	1883.219	0.225	0.194
11	6.46	6.83	3241.835	901.102	0.253	0.184
12	6.41	6.85	2906.267	3302.028	0.262	0.277
13	6.530	7.04	5020.209	2474.360	0.227	0.255
14	6.41	7.03	1201.837	2312.320	0.227	0.268
15	6.46	7.25	3495.770	83.734	0.246	0.270
16	6.46	7.31	3917.512	644.413	0.271	0.287
17	6.47	7.43	1685.042	1190.208	0.255	0.206
18	7.12	7.45	5983.316	1290.764	0.283	0.198
19	7.13	7.45	3233.466	1358.658	0.284	0.223
20	7.06	7.46	3928.789	656.594	0.291	0.254
21	7.19	7.61	3275.590	799.578	0.224	0.267
22	6.48	7.72	7939.201	1111.815	0.271	0.230
23	6.35	7.59	4940.242	1053.405	0.267	0.195
24	6.43	7.60	6052.588	1712.489	0.273	0.211
25	7.25	7.61	13979.703	1003.950	0.296	0.274
26	6.28	7.66	1694.569	1292.573	0.273	0.259
27	6.97	7.35	24193.107	1200.925	0.271	0.201
28	7.13	7.43	1406.185	1497.621	0.265	0.272
29	7.41	7.49	1772.428	7443.851	0.221	0.270
30	7.08	7.52	890.864	2220.145	0.285	0.277
35	6.51	7.38	9133.230	1103.897	0.201	0.239
40	6.78	5.35	2347.717	1225.876	0.244	0.251

## **6.2. Purificación y caracterización de la enzima CBH I de *M. royeri* MROCP**

### **6.2.1. Purificación de la CBH I**

La CBH I extracelular fue aislada y purificada parcialmente a partir del hongo *M. royeri* cultivado en FES con BCA durante 27 días, tiempo en el que se detectaron los niveles máximos de actividad enzimática. La enzima fue parcialmente purificada, a partir de las proteínas extracelulares contenidas en el extracto crudo preparado en tres pasos que incluyeron los procedimientos de 1) extracción de la fuente de enzima, 2) precipitación con sulfato de amonio al 60 % de saturación y 3) cromatografía de intercambio iónico. Como se resume en el cuadro 4, la actividad específica de CBH I extracelular, incrementó a 17,527.91 U mg<sup>-1</sup> de proteína total después de la cromatografía de intercambio iónico.

El perfil de elución de la cromatografía de intercambio iónico mostró tres picos: QFFP1, QFFP2 y QFFP3. Los picos QFFP1 (17,527.91 U/mg de proteína total) y QFFP2 (2,915.47 U/mg de proteína total<sup>-1</sup>) presentaron actividad de CBH I (Figura 17). El pico QFFP1 (fracciones 6-9) eluyó a 500 mM de NaCl; por tanto la fracción fue medianamente retenida en la columna QFF. El pico QFFP2 (fracción 16-21), eluyó a 750 mM de NaCl; y por tanto, fue retenido fuertemente por la columna QFF, presentando menor actividad enzimática de CBH I. Finalmente el pico QFFP3 (fracción 26-30) eluyó a 1000 mM de NaCl con una actividad de CBH I extracelular nula. El pico QFFP1 mostró la mayor actividad enzimática específica de CBH I (17,527.91 U/mg de proteína total<sup>-1</sup>) y fue utilizado para realizar la caracterización bioquímica de la CBH I. La enzima fue purificada 18.04 veces con un rendimiento de 65.72 % y una actividad específica de 17,527.91 U/mg de proteína total). Los resultados del procedimiento de purificación están resumidos en el Cuadro 4.

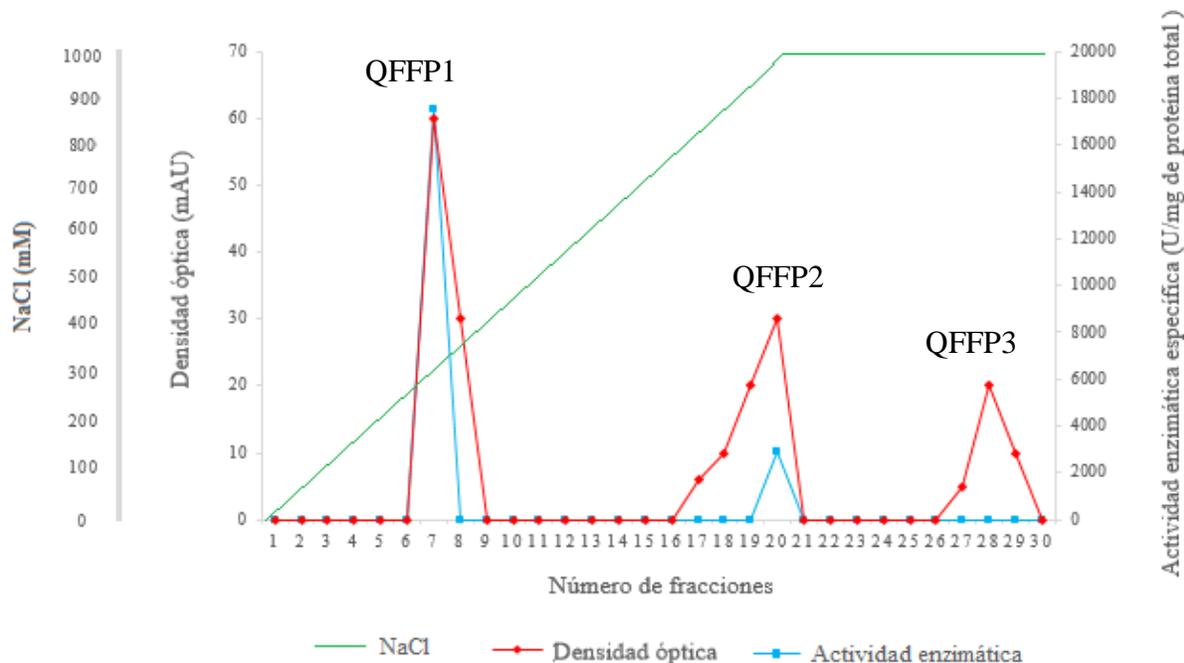


Figura. 17 Purificación de la CBH I extracelular de *M. roleri* MROCP cultivado en FES con BCA como sustrato inductor. Las proteínas fueron detectadas por medición de la absorbencia a 280 nm (línea roja); la actividad enzimática extracelular de CBH I fue ensayada contra p-NPC, a pH 5.0 (línea azul); cromatografía de intercambio iónico en QFF con gradiente de NaCl (línea verde).

Cuadro 4. Purificación de la enzima CBH I de *Moniliophthora roleri* MROCP.

Estado de Purificación	Actividad Total (U <sup>a</sup> /ml)	Proteína Total (mg)	Actividad Específica <sup>a</sup> (U mg <sup>-1</sup> de proteína total)	Factor de Purificación	Rendimiento %
Extracto crudo	1146.8	1.180	971.86	1	100
Precipitación con sulfato de amonio (60 %)	870.6	0.875	994.97	1.022	75.91
Intercambio iónico con QFF	753.7	0.043	17,527.91	18.04	65.72

<sup>a</sup> Una de actividad enzimática está definida como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μmol p-nitrofenol por minuto, usando p-NPC como sustrato.

### 6.2.2. Determinación de actividad de las exopeptidasas APE, CP y Xaa-Pro-DAP sobre la enzima CBH I parcialmente purificada.

En relación a los substratos Leucina-*p*-nitroanilida (Leu- *p*NA) y Lisina-*p*-nitroanilida (Lys *p*NA) para detectar actividad de aminopeptidasa; Alanina-prolina-*p*-nitroanilida (Ala-pro-*p*NA) para detectar la dipeptil aminopeptidasa; y Benzoil-tirosina-*p*-nitroanilida (Bz-Tyr-*p*NA) para detectar actividad de carboxipeptidasa en ambas concentraciones 1 y 10 mM, no se detectó actividad de las enzimas mencionadas con ninguno de los substratos ensayados (Cuadro 5).

**Cuadro 5. Actividad de las exopeptidasas APE, CP y Xaa-Pro-DAP en la fracción de la enzima CBH I parcialmente purificada.**

Substrato	Actividad específica (U mg <sup>-1</sup> de proteína total) 1mM – 10mM
H-Leu- <i>p</i> NA <sup>a</sup>	n.d
H-Lys- <i>p</i> NA <sup>a</sup>	n.d
H-Ala-pro- <i>p</i> NA <sup>a</sup>	n.d
Bz-Tyr- <i>p</i> NA <sup>a</sup>	n.d

n.d= No detectada

<sup>a</sup> Una unidad de actividad enzimática es definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación del equivalente a 1 µg de tirosina por minuto.

### 6.2.3. Determinación de actividad de la endopeptidasa aspartil proteasa (AP) en la fracción de la enzima CBH I parcialmente purificada.

En relación al substrato BSA, no se detectó actividad de la endopeptidasa AP en la fracción de la enzima parcialmente purificada (Cuadro 6).

**Cuadro 6. Actividad de la endopeptidasa AP en la fracción de la enzima CBH I parcialmente purificada.**

Substrato	Actividad específica (U mg <sup>-1</sup> de proteína total)
BSA <sup>a</sup>	n.d

n.d= No detectada

<sup>a</sup> Una unidad de actividad enzimática es definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar un µmol del *p*NA por minuto en condiciones de ensayo descritas.

#### 6.2.4. Determinación de actividad de celulasas en la fracción de la enzima CBH I parcialmente purificada.

En el Cuadro 7 se muestra la actividad específica de CBH I sobre diferentes sustratos de celulasas. La CBH I tuvo una actividad residual comparativamente muy baja sobre los sustratos avicel y PNPG, 0.479 y 175.88 U mg<sup>-1</sup> de proteína total respectivamente. Asimismo, no se observó actividad sobre los sustratos carboximetil celulosa-Na (CMC-Na) y papel fitro (FPase).

**Cuadro 7. ctividad de las celulasas en la fracción de la enzima CBH I parcialmente purificada.**

Substrato	Actividad específica (U mg <sup>-1</sup> de proteína total)
CMC-Na <sup>b</sup>	n.d
FPase <sup>b</sup>	n.d
Avicel <sup>b</sup>	0.479
PNPG <sup>a</sup>	175.88
<i>p</i> -NPC	17,527.91

n.d= No detectada

<sup>a</sup> Una unidad de actividad enzimática es definida como a cantidad de enzima necesaria para liberar un μmol del pNA por minuto en condiciones de ensayo descritas.

<sup>b</sup> Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de glucosa liberada por ml de solución enzimática por minuto en condiciones de ensayo.

#### 6.2.5. Efecto de inhibidores sobre la actividad enzimática de la fracción de la enzima CBH I parcialmente purificada.

El Cuadro 8 muestra el efecto de los inhibidores sobre la actividad de la enzima CBH I parcialmente purificada. Los inhibidores evaluados tuvieron un efecto inhibitorio mínimo sobre la actividad de la enzima CBH I parcialmente purificada, 2-β-mercaptoetanol (19 y 19 %) a las concentraciones de 0.1 y 1 mM, respectivamente. El agente quelante EDTA causó la activación de la enzima en 23 y 17 % a las concentraciones de 0.1 mM y 1 mM, respectivamente, con respecto a la actividad máxima considerada como el 100 %.

**Cuadro 8. Efecto de los inhibidores y/o activadores de la enzima CBH I de *M. royeri*.**

Inhibidores	Actividad relativa <sup>a</sup> (%)	
	0.1 mM	1 mM
2-β-mercaptoetanol	81	81
EDTA <sup>b</sup>	123	117

<sup>a</sup> Expresada como un porcentaje de la hidrólisis del sustrato *p*-NPC en la ausencia de cualquier inhibidor de proteínasa añadido, al cual fue dado el valor de 100 %.

<sup>b</sup> EDTA, ácido etilen diamino tetracético.

### 6.2.6. Efecto de iones metálicos sobre la actividad de CBH I de *M. roreri*.

El Cuadro 9 muestra el efecto de iones metálicos sobre la actividad de la enzima CBH I parcialmente purificada. La actividad de CBH I aumentó en presencia de MgCl<sub>2</sub> y NaCl a las concentraciones de 0.1 mM. Por lo contrario, la CBH I de *M. roreri* fue sensible a las sales de metales pesados, y la actividad disminuyó severamente con la adición de BaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, AgNO<sub>3</sub> y ligeramente con MnCl<sub>2</sub>.

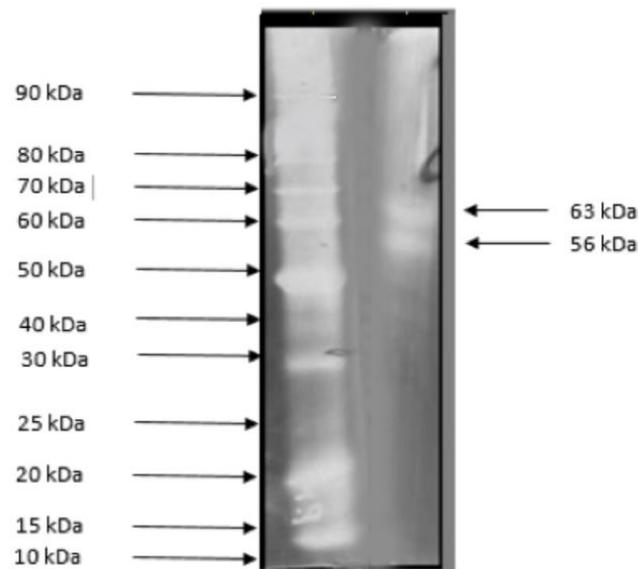
**Cuadro 9. Efecto de iones metálicos de CBH I de *M. roreri*.**

Metales	Actividad relativa <sup>a</sup> (%) 0.1 mM
BaCl <sub>2</sub>	10.13
ZnCl <sub>2</sub>	36.63
CuCl <sub>2</sub>	6.03
CoCl <sub>2</sub>	26.50
CdCl <sub>2</sub>	35.77
MgCl <sub>2</sub>	107.73
CaCl <sub>2</sub>	10.99
NaCl	102.13
MnCl <sub>2</sub>	70.20
FeCl <sub>2</sub>	26.07
HgCl <sub>2</sub>	10.99
AgNO <sub>3</sub>	20.47

<sup>a</sup> Expresada como un porcentaje de la hidrólisis del sustrato p-NPC en la ausencia de cualquier inhibidor de proteínasa añadido, al cual fue dado el valor de 100 %.

### 6.2.7. Determinación del peso molecular mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de la CBH I extracelular de *M. royeri*.

En la Figura 18 se muestra la fracción activa (QFFP1) de la CBH I de *M. royeri*, obtenida de la cromatografía de intercambio iónico. El pico QFFP1 mostró la mayor actividad enzimática específica de CBH I ( $17,527.91 \text{ U/mg de proteína total}^{-1}$ ) y fue utilizado para realizar la caracterización bioquímica de la enzima. El análisis de SDS-PAGE mostró dos bandas con un peso molecular (MW) estimado de 56 y 63 kDa.



**Figura 18.** Analisis de electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de la exoglucanasa CBH I de *M. royeri*, obtenida del paso de purificación de la cromatografía de intercambio iónico. El gel fue teñido con el método de plata mostrando dos bandas con un peso molecular (MW) estimado de 56 y 63 kDa. LM: Marcadores de proteína; L1, fracción QFFP1 con actividad de CBH I parcialmente purificada.

### 6.2.8. pH óptimo de la CBH I parcialmente purificada.

Como se muestra en la Figura 19, el pH óptimo para la CBH I de *M. roreri* sobre el sustrato *p*-NPC fue alrededor de 5.0. Basado en la actividad relativa del 100 % a pH 5.0, la actividad relativa disminuyó un 52.37 a pH 4.0. La actividad de CBH I disminuyó rápidamente por arriba de pH 5.0 a 60.13, 53.23, 48.49 y 45.69 % a pH 6.0, 7.0, 8.0 y 9.0, respectivamente.

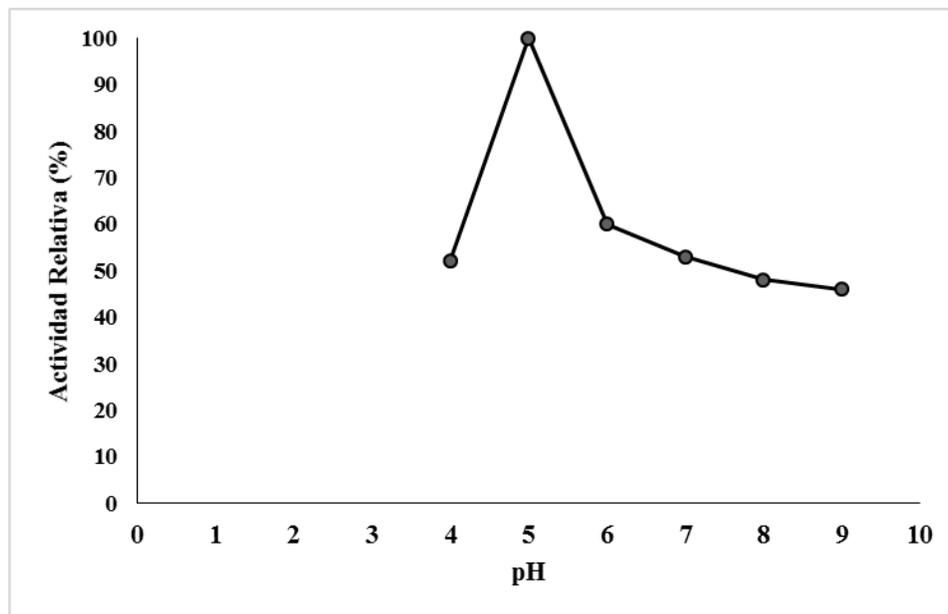


Figura 19. Efecto del pH óptimo sobre la CBH I parcialmente purificada fue incubada con *p*-NPC en diferentes reguladores bajo condiciones de pH indicados durante 30 min a 40 °C.

### 6.2.9. Temperatura óptima de la CBH I.

Como se muestra en la Figura 20, se observa que la actividad de la CBH I parcialmente purificada, fue sensible a la temperatura, mostrando actividad máxima a una temperatura de 40 °C. Con base en la actividad relativa de 100 % a 40 °C. La actividad de la enzima disminuyó a niveles de 30, 50, 70 y 80 °C, respectivamente con una actividad relativa de 17.89, 35.56, 11.42 y 0, 0 %, respectivamente. La actividad disminuyó severamente a temperaturas inferiores y superiores a 40 °C, hasta perderse completamente a temperaturas superiores a 70 °C.

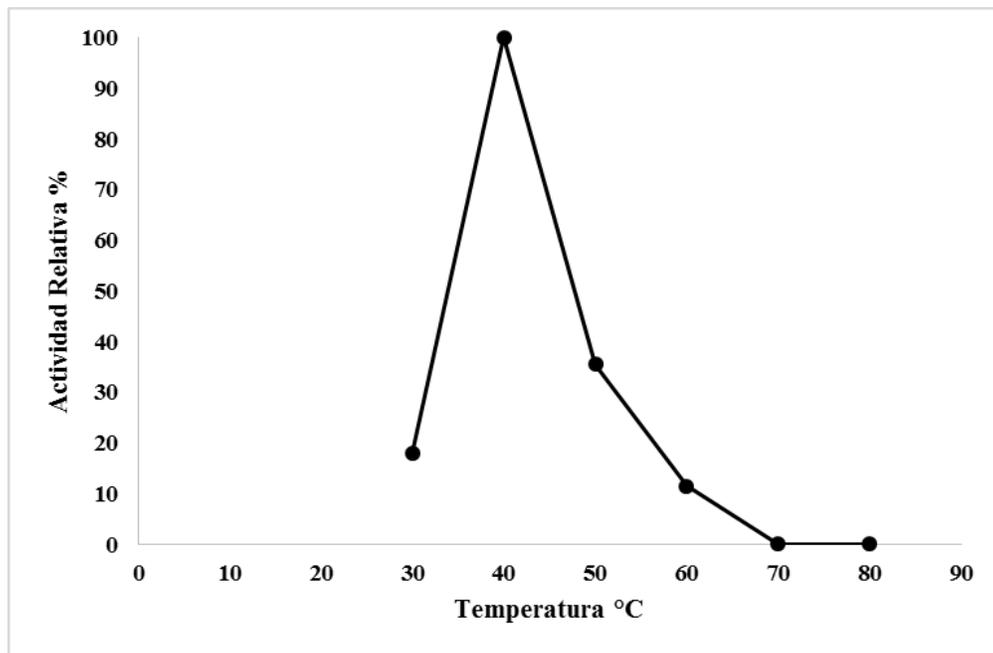


Figura 20. Efecto de la temperatura sobre la actividad de la CBH I extracelular de *M. roreri*. Para el análisis de la temperatura óptima, la actividad de CBH I contra el substrato *p*-NPC fue ensayada a las temperaturas indicadas durante 30 min.

### 6.2.10. Estabilidad térmica de la enzima CBH I parcialmente purificada.

La figura 21, muestra en el análisis de estabilidad térmica, la actividad de la CBH I parcialmente purificada disminuyó con el aumento de la temperatura. Basados en la estabilidad a 4 °C como 100 %, la actividad residual disminuyó a 67.83, 78.96 y 93.27 a 30, 37 y 40 °C, respectivamente. La estabilidad térmica de la enzima disminuyó rápidamente a 6.62, 8.48, 2.91, 6.89, 1.59, 4.24 a 50, 60, 70, 80, 90 y 100 °C, respectivamente.

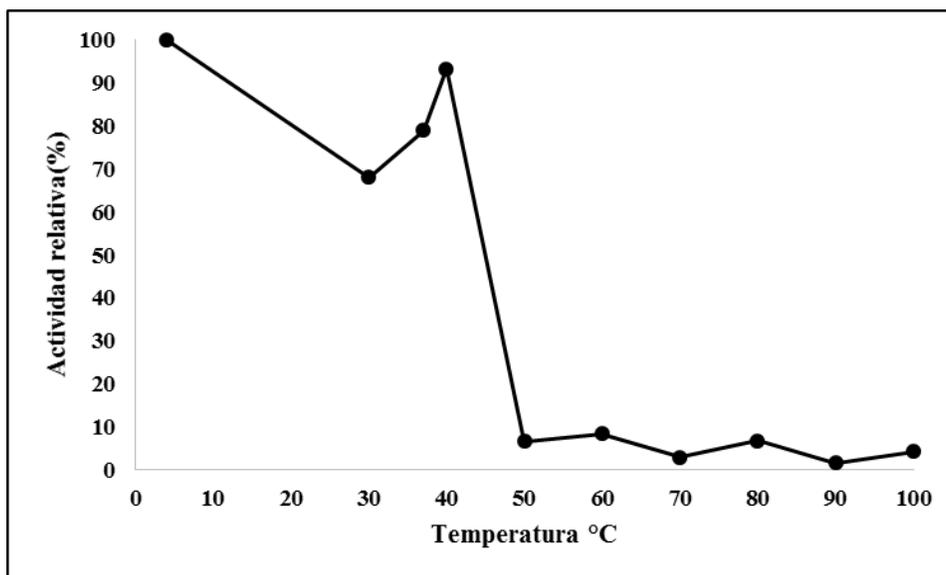


Figura 21. Efecto de la estabilidad térmica sobre la actividad de la CBH I extracelular de *M. royeri*. Para el análisis de la estabilidad térmica, la CBH I fue pre-incubada a diferentes temperaturas durante 60 min en ausencia del sustrato *p*-NPC. La actividad residual de CBH I fue ensayada con el sustrato *p*-NPC. La actividad de la enzima incubada a 4 °C fue tomada como el 100 %.

## 7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, el cultivo del hongo *M. roreri* en FES realizado con los substratos inductores, BCA y CCA, para la producción de la enzima celulasa CBH I extracelular, fue realizada a un intervalo de pH 5.0 a 7.6. Este comportamiento de pH, es similar a lo encontrado por Herrera-Murillo *et al.*, (1988), quienes reportaron que el hongo es capaz de crecer en medios con intervalos de pH de 4.9 a 7.3. Asimismo, Barros (1975), reportó que *M. roreri* crece en medios con intervalos de pH de 3.5 a 8.0, siendo el óptimo de 5.0 a 6.5, pero es capaz de crecer a pH de 7.0.

Debido a la dificultad de monitorizar el pH a través de la FES, éste parámetro normalmente no es controlado durante y se ajusta al inicio de la FES. Si el valor inicial de pH del medio de fermentación es ajustado, las variaciones de pH durante la FES normalmente no son tomadas en cuenta (Chen, 2013). El pH puede variar ligeramente durante el curso de la FES y esta variación está relacionada con las actividades metabólicas de los hongos. Se ha reportado que durante la fermentación, el pH inicial disminuyó después de 4 días de fermentación y aumentó de nuevo al final de la FES en el octavo día (Khan *et al.*, 2007). La disminución del pH podría ser debido a la formación de ácidos orgánicos y el consumo de sal de amonio en el medio de fermentación (Khan *et al.*, 2007; Ingold, 2012). En general, la mayoría de los hongos de la podredumbre blanca (WRF) y hongos de la pudrición parda (BRF) requieren un pH inicial de aproximadamente 5.0 para la producción de celulasas (Yoon *et al.*, 2014). Cabe señalar que la mayoría de los substratos lignocelulósicos tienen propiedad de regulación de pH en la que pueden minimizar la variación del mismo durante la FES. La sal inorgánica conteniendo nitrógeno en el medio de fermentación, tal como la urea, también puede compensar la variación en el pH a través del proceso de FES (Chen, 2013). Debido a estos factores colectivos, es común que la producción de celulasa se lleve a cabo sin ajuste de pH en la etapa inicial (Yoon *et al.*, 2014).

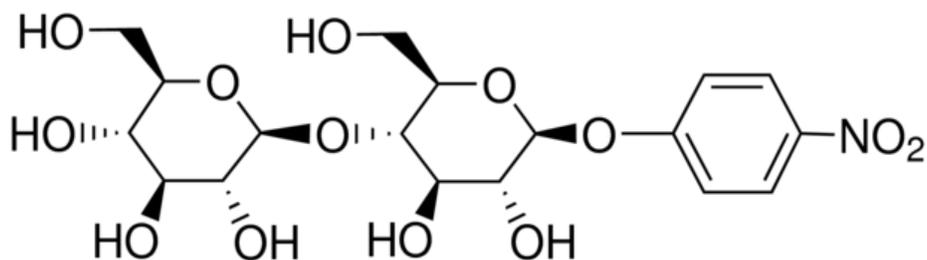
Yoon *et al.* (2014), mencionan que los hongos son los productores de celulasas más adecuados debido a su capacidad para producir un sistema de celulasa completo. La FES por hongos es una ruta de producción preferible para la celulasa, ya que impone un menor costo y permite la producción de celulasa con mayor título.

El cuadro 10 resume la actividad enzimática de exoglucanasa reportada para muchos hongos cultivados con diferentes sustratos inductores. Los niveles de actividad enzimática detectados para la cepa MROCP de *M. royeri*, permite considerar al hongo dentro de los microorganismos más celulolíticos, comparados con muchas investigaciones, siendo el BCA el mejor inductor sobre el CCA.

**Cuadro 10. Comparación de la producción de exoglucanasa de diferentes hongos crecidos en materiales lignocelulosicos.**

Hongo	Substrato	Exoglucanasas	Referencia
<i>M. royeri</i>	BCA	24,193.107 U mg <sup>-1</sup> proteína total	El presente trabajo
<i>M. royeri</i>	CCA	7,443.851 U mg <sup>-1</sup> proteína	El presente trabajo
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Palma de aceite	3.36 U/g de sustrato	Ang <i>et al.</i> , 2013
<i>RhizopusStolonifer</i>	Cascara de café	80.74 U/ml	Navya <i>et al.</i> , 2012
<i>Penicillium decumbens</i>	Salvado de trigo, celulosa microcristalina y residuos de maíz	0.05 IU mg <sup>-1</sup> proteína	Gao <i>et al.</i> , 2011
<i>Penicillium purpurogenum</i>	Paja de arroz y maíz molido	2.6 U mg <sup>-1</sup> proteína	Lee <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus fimigatus fresenius</i>	Bagazo de zolka	15 U/g de sustrato	Soni <i>et al.</i> , 2010
<i>Bjerkandera adusta</i>	Paja de trigo	0.3 mg <sup>-1</sup> proteína	Quiroz-Castañeda <i>et al.</i> , 2009
<i>Penicillium Janthinellum</i>	Caña de azúcar	0.55 U/ml	Adsul <i>et al.</i> , 2004
<i>Trichoderma Viridae</i>	Caña de azúcar	1.0 U/ml	Adsul <i>et al.</i> , 2004
<i>Aspergillus Niger</i>	Salvado de trigo	3.3 mg <sup>-1</sup> proteína	Hanif <i>et al.</i> , 2003

El presente trabajo, constituye el primer reporte sobre la purificación de una enzima con actividad de CBH. En relación a la clasificación de la enzima, se ha descrito que la CBH II reacciona en los extremos no reductores de la cadena de celulosa. Considerando que el *p*-nitrofenol (*p*NP) se conecta a los extremos reductores de la celobiosa (Figura 22), teóricamente, la CBH II no puede hidrolizar *p*-NPC. La actividad enzimática de la CBH II es muy baja cuando *p*-NPC es usada como sustrato (Limam *et al.*, 1995). Por lo anterior, la enzima purificada en el presente trabajo ha sido llamada MrCBH I. CBH I de *M. royeri* fue purificada 18.04 veces con un rendimiento de 65.72 % y una actividad específica de 17,527.91 U/mg de proteína total.



**Figura 22.** Formula estructural del sustrato sintético selectivo *p*-NPC para determinar la actividad enzimática de CBH I (SIGMA-ALDRICH®).

Respecto a la producción de la enzima exoglucanasa, en el día 27 de la FES con BCA inoculado con la cepa MROCP de *M. royeri*, se detectó la expresión significativa de la enzima, alcanzando una actividad enzimática específica de 24,193.107 U mg<sup>-1</sup> proteína total, mientras que el CCA indujo niveles más bajos, alcanzando un valor de 7,443.851 U mg<sup>-1</sup> proteína total de actividad enzimática específica, el día 29.

Los resultados del presente trabajo tienen un comportamiento similar a los reportes previos. En 2011, Gao *et al.* reportaron la purificación de una nueva celobiohidrolasa (PdCel6A) ácida de *Penicillium decumbens* JU-A10 para la producción de bioetanol. La secuencia de aminoácidos internos, deducida de la nueva CBH tuvo un grado alto de identidad de secuencia con la CBH II de *Aspergillus fumigatus*. PdCel6A mostró características comparables a CBH I así como a CBH II. De forma similar a CBH I, la nueva CBH tuvo una actividad específica de 1.9 IU/mg contra *p*-NPC. La enzima retuvo cerca del 80 % de su actividad máxima después de 4 h de incubación a pH 2.0. Usando residuos de mazorca de maíz como sustrato, la concentración de etanol incrementó un 20 % durante la sacarificación simultánea y fermentación cuando fue suplementada con bajas dosis de PdCel6A (0.2 mg/g de sustrato). Dicho trabajo constituyó el primer reporte involucrando a una CBH II semejante a CBH I, proporcionando una evidencia del papel de CBH II en la degradación de celulosa.

PdCel6A purificada con actividad contra *p*-NPC fue clasificada como CBH y fue detectada como una banda única con una masa molecular de 60KDa en análisis SDS-PAGE. La enzima fue purificada 38 veces con una actividad específica de 1.9 IU mg<sup>-1</sup> contra *p*-NPC. La MrCBH I de *M. royeri* fue purificada 18.04 veces, con un rendimiento del 65.72 %. MrCBH I resultó ser una enzima con mayor actividad específica (17,527.91 U mg<sup>-1</sup> de proteína total) que PdCel6A purificada a partir de *P. decumbers*, ambas contra *p*-NPC. De acuerdo con el peso molecular reportado para PdCel6A, es probable que MrCBH I corresponda a la banda de 63 kDa. La

temperatura y pH óptimo de PdCel6A purificada fue de 50 °C a pH 5.0; TVCel7a, celobiohidrolasa descrita en *Trametes versicolor*, mostró máxima actividad a 40 °C y pH 5.0. De igual forma, MrCBH I purificada mostró máxima actividad a 40 °C y pH 5.0. La mayoría de las CBHs reportadas muestran actividad en pH ácido en un rango 4,0-6,0 (Baldrian y Valaskova, 2008; Lahjouji *et al.*, 2007; <http://www.brenda.uni-koeln.de>). Es importante resaltar que MrCBH I fue purificada parcialmente con un rendimiento de 65.72 %, mientras que PdCel6A fue purificada a homogeneidad con un rendimiento de 1 %, lo que significa que 99 % de la enzima se perdió completamente durante los pasos de purificación.

En el 2011, Lee *et al.* aislaron una cepa de alta producción de celobiohidrolasa (CBH), misma que fue identificada como *Penicillium purpurogenum* KJS506. Se obtuvo una actividad máxima de CBH de 2.6 U mg-proteína<sup>-1</sup>, cuando utilizaron la paja de arroz y maíz molido como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, por lo que *P. purpurogenum* KJS506 fue descrito como uno de los más altos entre los microorganismos productores de CBH. La temperatura y pH óptimos para la producción de CBH fueron 30 °C y 4.0, respectivamente. El aumento de la producción de CBH en el cultivo de *P. purpurogenum* a 30 °C se confirmó mediante electroforesis bidimensional seguido de secuenciación de péptidos por MS/MS. Las secuencias de aminoácidos internos de CBH de *P. purpurogenum* mostró una homología significativa a hidrolasas de la familia GH7, mismas que corresponden a CBH I. CBH extracelular purificada a partir de *P. purpurogenum* resultó ser una proteína monomérica con un peso molecular de 61 kDa y mostró una amplia especificidad de sustrato con actividad máxima hacia *p*-NPC. La enzima fue purificada 4.2 veces con un rendimiento de 9.9 % y una actividad enzimática específica de 10.8 U mg-proteína<sup>-1</sup> contra *p*-NPC. Es importante resaltar que MrCBH I fue purificada parcialmente, 18.04 veces con un rendimiento de 65.72 %, mientras que CBH de *P. purpurogenum* fue purificada a homogeneidad con un rendimiento muy bajo, lo que significa que 90.1 % de la enzima se perdió completamente durante los pasos de purificación.

La temperatura y pH óptimo de CBH de *P. purpurogenum* purificada fue de 60 °C a pH 5.0, mientras que MrCBH I purificado fue de 50 °C y pH de 5.0. El ZnCl<sub>2</sub> y CoCl<sub>2</sub> (0.1 mM) inhibieron a la actividad de CBH en un 21.2 y 33.7 %, respectivamente, mientras que EDTA inhibió la actividad de la enzima un 24.6 %. Fe<sup>2+</sup> y Hg<sup>2+</sup> causaron inhibición completa y β-mercaptoetanol activo a la enzima CBH de *P. purpurogenum* purificada un 36.5 %. Comparativamente, la actividad de MrCBH I parcialmente purificada fue inhibida por el ZnCl<sub>2</sub> y

CoCl<sub>2</sub> en un 63.37 y 73.5 % respectivamente. La MrCBH I aumentó su actividad en un 23 % en presencia de EDTA y β-mercaptoetanol inhibió a la enzima en un 19 %. De forma similar a los resultados de efecto de iones y agentes químicos sobre la actividad de una β-exoglucanasa purificada a partir de rastrojo de maíz (Han y Chen, 2010), la actividad de MrCBH I fue fuertemente inhibida por BaCl<sub>2</sub> (89.87 %), CuCl<sub>2</sub> (93.97 %), CdCl<sub>2</sub> (64.23 %), CaCl<sub>2</sub> (89.1 %), FeCl<sub>2</sub> (73.93 %), HgCl<sub>2</sub> (89.1 %) y AgNO<sub>3</sub> (79.53 %), mientras que MnCl<sub>2</sub> mostró una inhibición reducida (29.8 %). De acuerdo a los resultados obtenidos y de forma similar a lo reportado por Han y Chen (2010), parece improbable que la enzima requiera un ion metálico específico para su actividad catalítica. El efecto positivo del EDTA sobre la actividad de la MrCBH I podría atribuirse a la reducción de iones metálicos en la solución mediante quelación (Han y Chen, 2010). Además de las características innatas de la celulasa, los iones metálicos que están presentes en materiales ligocelulósicos naturales pueden desempeñar un papel importante en el proceso de degradación de la celulosa (Tejirian y Xu, 2010). Algunos iones metálicos, como Fe<sup>3+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> y Hg<sup>2+</sup> son conocidos por su inhibición de la actividad de la celulasa (Mandels y Reese, 1965).

La CBH purificada de *P. purpurogenum* mostró actividad contra *p*-NPC (10.8 U mg-proteína<sup>-1</sup>), avicel (6.5 U mg proteína<sup>-1</sup>) y papel de filtro (8.1 U mg-proteína<sup>-1</sup>) (Lee *et al.*, 2011). Mientras que MrCBH I mostró actividad contra los substratos *p*-NPC (17,527.91 U mg<sup>-1</sup> de proteína total), avicel (0.479 U mg<sup>-1</sup> de proteína total) y PNPG (175.88 U mg<sup>-1</sup> de proteína total); sin embargo, MrCBH I no mostró actividad contra los substratos CMC-Na y FPase. Se sabe que estos substratos son preferidos por CBHs y, en menor grado, para las endoglucanasas (EG). Por el contrario, CMC, substrato ampliamente usado para la detección de endoglucanasas (Teri *et al.*, 1987), no fue un substrato para MrCBH I y CBH purificada de *P. purpurogenum* (Lee *et al.*, 2011). Por lo anterior, en este trabajo se confirma la actividad de exoglucanasa I de MrCBH I, sin actividad de endoglucanasa. Este resultado sugiere que la enzima es una CBH. Es importante señalar que la fracción de la enzima parcialmente purificada mostró actividad residual (175.88 U mg<sup>-1</sup> de proteína total) contra el substrato PNPG. Dado que no se han reportado ninguna CBH con actividad contra PNPG, no se descarta la posible contaminación con enzimas β-glucosidasa (Lee *et al.*, 2011; Volkov *et al.*, 2014; Lahjouji *et al.*, 2007; Liman, 1995). Por otra parte, ensayos con substratos proteolíticos para la determinación de actividad residual, no se detectó actividad de aminopeptidasa, carboxipeptidasas, dipeptil aminopeptidasa y aspartil proteasa en la fracción

de la enzima MrCBH I parcialmente purificada, por lo que se comprobó la ausencia de contaminación con proteasas.

En el análisis de estabilidad térmica, la actividad de la CBH purificada disminuye con el aumento de la temperatura. La actividad máxima de la enzima fue obtenida a 4 °C, siendo considerada como un 100 %. La estabilidad térmica disminuyó rápidamente por encima de los 40 °C y se perdió completamente después de la incubación a 100 °C. Estos resultados son similares a lo reportado para la estabilidad térmica de una exoglucanasa purificada a partir de rastrojo de maíz (Han y Chen, 2010).

El Cuadro 11, resume las propiedades de varias BCHs de diversos hongos previamente reportados.

**Cuadro 11. Propiedades de CBHs de diversas fuentes.**

fuelle	kDa	Structura cuaternaria	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)	Actividad específica (U mg <sup>-1</sup> )	pI	Referencia
<i>M. royeri</i>	63	NR	5	40	17,527.91	NR	El presente trabajo
<i>Penicillium purpurogenum</i>	60	Monómero	5	60	10.8	4.8	Lee <i>et al.</i> , 2011
<i>Trametes versicolor</i>	55	Monómero	5	40	0.8	NR	Lahjouji <i>et al.</i> , 2007
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	48	NR	6	65	0.11	NR	Hong <i>et al.</i> , 2003
<i>Talaromyces emersonii</i> CBH IA	66	Monómero	3.6	78	7.7	4.54	Tuohy <i>et al.</i> , 2002.
<i>Talaromyces emersonii</i> CBH IB	56	Monómero	4.1	66	2.4	3.7	Tuohy <i>et al.</i> , 2002.
<i>Talaromyces emersonii</i> CBH II	56	Monómero	3.8	68	NR	6.09	Tuohy <i>et al.</i> , 2002.
<i>Penicillium occitanis</i> CBH I	60	NR	4-5	60	1.09	5.2	Limam <i>et al.</i> , 1995.
<i>Penicillium occitanis</i> CBH II	55	NR	4-5	65	0.03	5.9	Limam <i>et al.</i> , 1995.
<i>Dichomitus Squalens</i> Ex-1	39	Monómero	5	60	13.64	4.6	Rouau y Odier, 1986
<i>Dichomitus Squalens</i> Ex-2	36	Monómero	5	60	12.06	4.5	Rouau y Odier, 1986.

A nuestro conocimiento, MrBCH I es la primera celulasa de *M. roreri* que ha sido purificada y caracterizada. Bajo las condiciones óptimas de cultivo, la cepa MROCP de *M. roreri* resultó ser una cepa potentemente productora de CBH. Aunque se han reportado muchos microorganismos productores de CBH, la cepa MROCP de *M. roreri* se ha distinguido por su alta actividad específica de CBH inducida bajo FES suplementado con BCA, lo cual convierte a la cepa MROCP de *M. roreri* como un buen candidato para las aplicaciones industriales, incluyendo refinamiento textil, pulpa/papel y sacarificación para la producción de bioetanol.

## 8. CONCLUSIONES

1. La cepa MROCP de *M. roreri* es capaz de producir enzimas extracelulares con actividad de exoglucanasa, usando residuos CCA y BCA como sustrato inductor, cultivado en un sistema de FES.
2. El BCA es el mejor inductor de enzimas con actividad de exoglucanasa de *M. roreri* crecido bajo el sistema de FES.
3. La cepa MROCP de *M. roreri* expresa el nivel más alto de actividad de exoglucanasa extracelular, a los 27 días de cultivo de FES usando BCA como sustrato inductor.
4. MrCBH I fue purificada parcialmente, en tres pasos de purificación que incluyeron: 1) extracción de la fuente de enzima, 2) precipitación con sulfato de amonio al 60 % de saturación y 3) cromatografía de intercambio iónico, con un factor de purificación de 18.04 veces y un rendimiento de 65.72 %.
5. La enzima exoglucanasa parcialmente purificada a partir de la cepa MROCP de *M. roreri*, fue clasificada como CBH I, por lo que fue nombrada como MrCBH I, de acuerdo a su preferencia por el sustrato *p*-NPC.
6. La enzima MrCBH I parcialmente purificada mostró una actividad máxima a pH 5.0 y 40 °C.
7. La enzima MrCBH I parcialmente purificada mostró una estabilidad térmica a 4 °C, y termicamente lábil a temperaturas por encima de 40 °C y menores a 30 °C.
8. La enzima MrCBH I parcialmente purificada mostró una alta especificidad por el sustrato *p*-NPC confirmando su actividad de exoglucanasa, diferente de endoglucanasa.
9. La enzima MrCBH I parcialmente purificada no mostró requerimiento de un ion metálico específico para su actividad catalítica. El efecto positivo del EDTA sobre la actividad de la MrCBH I podría atribuirse a la reducción de iones metálicos en la solución mediante quelación.
10. La producción de enzimas celulasas de la cepa MROCP de *M. roreri* usando BCA y CCA, representa un recurso potencial para el aprovechamiento biotecnológico de residuos agrícolas agroindustrial.

## 9. PERSPECTIVAS

1. Continuar los experimentos de purificación para obtener fracción homogénea de la enzima MrCBH I.
2. Realizar la identificación de la enzima por LC- MS/MS (Cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas) para verificar si la MrCBH I tiene características similares a CBH I y/o II.
3. Realizar ensayos de hidrólisis de  $\beta$ -D-glucanos para verificar la acción *endo* de MrCBH I.
4. Probar el efecto de la enzima purificada en sacarificación de la celulosa para la producción de biocombustible, elaboración de alimento animal, entre otras aplicaciones, a partir de la degradación de biomasa lignocelulósica mediante FES.

## 10. LITERATURA CITADA

- Abarca D., Martínez R., Muñoz J.J., Torres M.P., y Vargas G. 2010. Residuos de café, cacao y cladodio de tuna: Fuentes promisorias de fibra dietaria. *Revista Tecnológica-ESPOL*. 23(2): 63-69.
- Abo-State M.A.M., Hammad, A.I., Swelim M., y Gannam R.B. 2010. Enhanced production of cellulase (S) by *Aspergillus* spp. isolated from agriculture wastes by solid state fermentation. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*. 8(4):402-410.
- Abrha B., y Gashe B.A. 1992. Cellulase production and activity in a species of *Cladosporium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 8(2): 164-166.
- Adsul M.G., Ghule J.E., Singh R., Shaikh H., Bastawde K.B., Gokhale D.V., y Varma A.J. 2004. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulase and xylanase production. *Carbohydrate Polymers*. 57(1): 67-72.
- Ali S. S., Shao J., Strem M.D., Phillips-Mora W., Zhang D., Meinhardt L.W., y Bailey B.A. 2015. Combination of RNAseq and SNP nanofluidic array reveals the center of genetic diversity of cacao pathogen *Moniliophthora roreri* in the upper Magdalena Valley of Colombia and its clonality. *Frontiers in Microbiology*. 6.
- Álvarez-Gutiérrez P.E., Corzo-González Z., Yañez-Ocampo G., y del Carmen Pérez-Luna Y. 2014. Actividades Enzimáticas de Hongos para el Pre-tratamiento de Residuos Lignocelulósicos. *BioTecnología*. 18(3):11-29.
- Ang S.K., Shaza E.M., Adibah Y., Suraini A.A., y Madihah M.S. 2013. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid state fermentation. *Process Biochemistry*. 48(9): 1293-1302.
- Archer D. B., y Wood D. A. 1995. Fungal exoenzymes. *In: The Growing Fungus* ed: Chapman & Hall, London ISBN 0412 46600. (pp. 137-162). Springer Netherlands.
- Bailey B.A., Crozier J., Sicher R.C., Strem M.D., Melnick R., Carazzolle M.F., y Gultinan M. 2013. Dynamic changes in pod and fungal physiology associated with the shift from biotrophy to necrotrophy during the infection of *Theobroma cacao* by *Moniliophthora roreri*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 81: 84-96.
- Bakare M.K., Adewale I.O., Ajayi A., y Shonukan O.O. 2005. Purification and characterization of cellulase from the wild-type and two improved mutants of *Pseudomonas fluorescens*. *African Journal of Biotechnology*. 4(9).
- Bakri Y.P., y Jacques P.T. 2003. Xylanase production by *Penicillium canescens* 10-10C in solid state fermentation. *Appl Biochem Biotechnol*. 108:737-748.
- Baldrian P., 6 Valášková V. 2008. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*. 32(3): 501-521.
- Barazarte H., Sangronis E. y Unai E. 2008. La cascara de cacao (*Theobroma cacao* L.): una posible fuente comercial de pectinas. *Órgano oficial de la sociedad Latinoamericana de Nutrición*. 58:64-70.
- Barragan B., Tellez A., y Laguna A. 2008. Utilización de residuos agroindustriales. *Revista Sistemas Ambientales*. 2(1): 44-50.
- Barros N., O. 1975. Influencia del pH en el crecimiento del hongo *Monilia roreri* Cif. & Par. *Noticias Fitopatológicas*. 4:78-88.
- Bastawde K.B. 1992. Cellulolytic enzymes of a thermotolerant *Aspergillus terreus* strain and their action on cellulosic substrates. *World journal of Microbiology and Biotechnology*. 8(1): 45-49.

- Bhat M.K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*. 18(5): 355-383.
- Behera S.S., y Ray R.C. 2016. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies. *International Journal of Biological Macromolecules*. 86: 656-669.
- Binder, J.B., y Raines R.T. 2009. Simple chemical transformation of lignocellulosic biomass into furans for fuels and chemicals. *Journal of the American Chemical Society*. 131(5): 1979-1985.
- Bommarius A.S., Sohn M., Kang Y., Lee J.H., y Realff M.J. 2014. Protein engineering of cellulases. *Current Opinion in Biotechnology*. 29: 139-145.
- Börjesson M., y Westman G. 2016. Branching of hemicelluloses through an azetidinium salt ring-opening reaction. *Carbohydrate Research*. 428: 23-30.
- Brown R.M. 2004. Cellulose structure and biosynthesis: what is in store for the 21st century?. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 42(3): 487-495.
- Camassola M., y Dillon A.J.P. 2007. Production of cellulases and hemicellulases by *Penicillium echinulatum* grown on pretreated sugar cane bagasse and wheat bran in solid- state fermentation. *Journal of Applied Microbiology*. 103(6): 2196-2204.
- Cartay R. 1999. El cacao venezolano en el mercado mundial: situación mundial y perspectivas.[Informe final]. Venezuela: CONICIT Agenda Cacao.
- Ciferri R., y Parodi, E. 1934. Descrizione del fungo che causa la Moniliasi del cacao. *Phytopathologische Zeitschrift*. 6: 539-542.
- Chakar F.S., y Ragauskas A.J. 2004. Review of current and future softwood kraft lignin process chemistry. *Industrial Crops and Products*. 20(2): 131-141.
- Chen H. 2012. Brief Introduction to the Biotechnology of Lignocellulose. In *Biotechnology of Lignocellulose* Springer Netherlands. (pp. 1-24).
- Chen H. 2013. *Modern solid state fermentation: theory and practice*. New York: Springer Science y Business Media Netherlads.
- Concepción-Brindis. 2015. Actividad enzimática expresada en residuos agrícolas y análisis *in silico* de genes de  $\beta$ -glucosidasa de *Moniliophthora roreri*. [Tesis]. Colegio de Postgraduados.
- Contreras F.T., y Córdoba M. E. M. 2012. Evaluación del rendimiento de la hidrólisis enzimática de bagazo, con pretratamiento alcalino. *Ingeniería: Revista de la Universidad de Costa Rica*. 22(2): 29-44.
- Coradi G.V., Da Visitação V. L., De Lima E. A., Saito L. Y. T., Palmieri D. A., Takita M. A., Neto P y De Lima, V. M. G. 2013. Comparing submerged and solid-state fermentation of agro-industrial residues for the production and characterization of lipase by *Trichoderma harzianum*. *Annals of Microbiology*. 63(2): 533-540.
- Coughlan M.P., Wood T.M., y Montencourt B.S. 1985a. Cellulases: production, properties and applications. *Biochem. Soc. Trans.* 13(part 2): 405-406.
- Coughlan M.P. 1985b. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. *Biotechnology and genetic engineering reviews*. 3(1): 39-110.
- Crescente O., Acosta M., Guevara M., y Estaba A. 1999. Aprovechamiento de los desechos de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Saber*. 11(2): 28-30.
- Cummins P.M., y O'Connor B.F. 2011. Hydrophobic interaction chromatography. *Protein Chromatography: Methods and Protocols*. 431-437.

- Da Silva Delabona P., Pirota R.D.B., Codima C.A., Tremacoldi C.R., Rodrigues A., y Farinas C.S. 2012. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. *Biomass and bioenergy*. 37: 243-250.
- Darcy E., Leonard P., Fitzgerald J., Danaher M., y O’Kennedy R. 2011. Purification of antibodies using affinity chromatography. *Protein Chromatography: Methods and Protocols*. In: Dermot W., y Sinéad T.L. . ed: HumanaPress (pp:369-382).
- Dashtban M., Schraft H., y Qin W. 2009. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities y perspectives. *Int J Biol Sci*. 5(6): 578-595.
- Davy A., Thomsen K.K., Juliano M.A., Alves L.C., Svendsen I., y Simpson D.J. 2000. Purification and characterization of barley dipeptidyl peptidase IV. *Plant Physiology*. 122(2): 425-432.
- Deswal D., Khasa Y.P., y Kuhad R.C. 2011. Optimization of cellulase production by a brown rot fungus *Fomitopsis sp.* RCK under solid state fermentation. *Bioresource Technology*. 102(10): 6065-6072.
- Díaz-Valderrama J.R., y Aime M.C. 2016. The cacao pathogen *Moniliophthora roreri* (Marasmiaceae) produces rhexolytic thallic conidia and their size is influenced by nuclear condition. *Mycoscience*. 57(3): 208-216.
- Evans H.C., Stalpers J.A., Samson R.A., y Benny G.L. 1978. On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. *Can. J. Bot.* 56: 2528-2532.
- Evans H.C. 1981. Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora roreri* (Monilia) London, UK: Commonwealth Micological Institute. *Phytopathological*. 24: 44.
- Evans, H.C. 2007. Cacao diseases-the trilogy revisited. *Phytopathology*. 97: 1640-1643.
- Fang H., Zhao C., y Song X.Y. 2010. Optimization of enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover by two approaches: Response surface methodology or using cellulase from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* NL02. *Bioresource technology*. 101(11):4111-4119.
- Fang H., y Xia L. 2013. High activity cellulase production by recombinant *Trichoderma reesei* ZU-02 with the enhanced cellobiohydrolase production. *Bioresource technology*. 144: 693-697.
- Fang H., Zhao C., Song X.Y., Chen M., Chang Z., y Chu J. 2013. Enhanced cellulolytic enzyme production by the synergism between *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* NL02 and by the addition of surfactants. *Biotechnology and bioprocess engineering*. 18(2):390-398.
- Fernandez-Fueyo E., Ruiz-Dueñas F.J., Ferreira P., Floudas D., Hibbett D.S., Canessa P., y Polanco R. 2012. Comparative genomics of *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium* provide insight into selective ligninolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(14): 5458-5463.
- Ferrara M.A., Bon E.P., y Neto J.S.A. 2002. Use of steam explosion liquor from sugar cane bagasse for lignin peroxidase production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Biochem Biotechnol*. 98:289-300.
- Ferrer-Marcelo Y., León-Rodríguez M., Michelena-Álvarez G., Dustet-Mendoza J.C., Duque-Ortiz A., Ibañez-Fuentes M. L., Tortoló-Cabañas K. 2011. Selección de hongos aislados de bagazo de caña con actividad celulasa sobre celulosa cristalina para posibles aplicaciones industriales. *ICIDCA*. 45(1): 3-12.
- Figuiera A., Janick J., BeMiller J., N. 1993. New products from *Theobroma cacao*: Seed Pulp and Pod Gum. *New Crops*. Wiley, New York. 475-478.

- Forsythe W.G., Garrett M.D., Hardacre C., Nieuwenhuyzen M., y Sheldrake G.N. 2013. An efficient and flexible synthesis of model lignin oligomers. *Green Chemistry*. 15(11): 3031-3038.
- García-Maraver A., Salvachúa D., Martínez M.J., Díaz L.F., y Zamorano M. 2013. Analysis of the relation between the cellulose, hemicellulose and lignin content and the thermal behavior of residual biomass from olive trees. *Waste management*. 33(11): 2245-2249.
- Gámez S., González-Cabriales J.J., Ramírez J.A., Garrote G., y Vázquez M. 2006. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *Journal of food engineering*. 74(1):78-88.
- Gao L., Wang F., Gao F., Wang L., Zhao J., y Qu Y. 2011. Purification and characterization of a novel cellobiohydrolase (PdCel6A) from *Penicillium decumbens* JU-A10 for bioethanol production. *Bioresource technology*. 102(17): 8339-8342.
- Godoy L.C., y Fabián G.C. S. 2014. Enzimas en la valorización de residuos agroindustriales. *Rdu*. 15 (12): 2-15.
- Gupta V.K., Kubicek C.P., Berrin J.G., Wilson D.W., Couturier M., Berlin A., y Ezeji T. 2016. Fungal enzymes for bio-products from sustainable and waste biomass. *Trends in biochemical sciences*. 41(7): 633-645.
- Gusakov A.V., Sinitsyn A.P., Salanovich T.N., Bukhtjarov F.E., Markov A.V., Ustinov B.B., y Burlingame R. 2005. Purification, cloning and characterisation of two forms of thermostable and highly active cellobiohydrolase I (Cel7A) produced by the industrial strain of *Chrysosporium lucknowense*. *Enzyme and Microbial Technology*. 36(1): 57-69.
- Gusakov A.V., Sinitsyna O.A., Rozhkova A.M., y Sinitsyn A.P. 2013. N-Glycosylation patterns in two  $\alpha$ -l-arabinofuranosidases from *Penicillium canescens* belonging to the glycoside hydrolase families 51 and 54. *Carbohydrate research*. 382: 71-76.
- Gutierrez-Rojasa I., Moreno-Sarmiento N., y Montoya D. 2015. Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Rev iberoam Micol.*, 32(1):1-12.
- Han Y., y Chen H. 2010. Biochemical characterization of a maize stover  $\beta$ -exoglucanase and its use in lignocellulose conversion. *Bioresource technology*. 101(15): 6111-6117.
- Handbook GEa H. 2004. *Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing: Principles and Methods*. GE Healthcare. Uppsala Sweden.
- Hanif A., Yasmeen A., y Rajoka M.I. 2004. Induction, production, repression, and de-repression of exoglucanase synthesis in *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*. 94(3): 311-319.
- Herrera Bravo de Laguna I., Toledo Marante F.J., y Mioso R. 2015. Enzymes and bioproducts produced by the ascomycete fungus *Paecilomyces variotii*. *Journal of applied microbiology*. 119(6): 1455-1466.
- Hidalgo E., Bateman R., Krauss U., Ten Hoopen, M., y Martínez A. 2003. A field investigation into delivery systems for agents to control *Moniliophthora roreri*. *European Journal of Plant Pathology*. 109(9), 953-961.
- Hölker U., Höfer M., y Lenz J. 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64(2): 175-186.
- Hong J., Tamaki H., Yamamoto K., y Kumagai, H. 2003. Cloning of a gene encoding thermostable cellobiohydrolase from *Thermoascus aurantiacus* and its expression in yeast. *Applied microbiology and Biotechnology*. 63(1): 42-50.
- Horacio G.P. 2017. Protein and carbohydrate separation and purification. *Plants, Green cyanobacteria*. 45-63.

- Hu L.Y., y Zhong W.H. 2003. Advances of the research on gene cloning and functional amino-acid of cellulose. *Biotechnol. China*. 13(2): 43–45 (in Chinese).
- Hu L., Lin L., Wu Z., Zhou S., y Liu S. 2015. Chemocatalytic hydrolysis of cellulose into glucose over solid acid catalysts. *Applied Catalysis B: Environmental*. 174: 225-243.
- Ilyas U., Majeed A., Hussain K., Nawaz K., Ahmad S., y Nadeem M. 2011. Solid State fermentation of Vignamungo for cellulase production by *Aspergillus niger*. *World Applied Science Journal*. 12:1172-1178.
- Immanuel G., Dhanusha R., Prema P., y Palavesam A. 2006. Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. *Int. J. Environ. SCi. Technol.* 3:25-34.
- Ingold C. T. (Ed.). 2012. *The biology of fungi*. Springer Science & Business Media.
- Ito K., Nakamura Y., Tokunaga T., Iijima D., y Fukushima K. 2003. Anti-cariogenic properties of a water-soluble extract from cacao. *Biosci Biotechnol Biochem*. 67: 2567-2573.
- I-Son N., Chen-Wei L., Shuang-Pi C., Jiun-Ly C., Po-Ting C., Chii-Gong T., Su-May Y., y Tuan-Hua D.H. 2010. High-level production of a thermoacidophilic b-glucosidase from *Penicillium citrinum* YS40-5 by solid-state fermentation with rice bran. *Bioresource Technology*. 101: 1310-1317.
- Irfan M., Nadeem M., y Syed Q. 2012. Influence of nutritional conditions for endoglucanase production by *Trichoderma viride* in SSF. *Global Journal of Biotechnology y Biochemistry*. 7(1):07-12.
- Jacobsen S., E., Wyman C., E. 2000. Cellulose and hemicellulose hydrolysis models for application to current and novel pretreatment processes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 84:86-96.
- Jagschies G., Sofer G.K., y Hagel, L. 2010. *Handbook of process chromatography: Strategies for protein purification*. Academic Press
- Jan–Crister J., y Lars R. 1989. *Protein Purification. Principles, high resolution methods, and applications*, pp: 695.
- Jia X., Chen Y., Shi C., Ye Y., Abid M., Jabbar S., y Wu T. 2014. Rheological properties of an amorphous cellulose suspension. *Food Hydrocolloids*, 39: 27-33.
- Jung S.J., Kim S.H., y Chung I.M. 2015. Comparison of lignin, cellulose, and hemicellulose contents for biofuels utilization among 4 types of lignocellulosic crops. *Biomass and Bioenergy*, 83:322-327.
- Juturu V., y Wu J.C. 2014. Microbial cellulases: engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 33: 188-203.
- Kalvatchev Z., Garzaro D. y Guerra F. 1998. *Theobroma cacao L.*: Un nuevo enfoque para nutrición y salud. *Agroalimentaria*. 6:23-25.
- Karnchanatat A, Petsom A, Sangvanich P (2007) Purification and biochemical characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase from the wood-decaying fungus *Daldinia eschscholzii* (Ehrenb.: Fr.) Rehm. *FEMS Microbiol Lett*. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00662.x
- Keskar S.S. 1992. Cellulase production by *Penicillium janthinellum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 8(5): 534-535.
- Khan M.H., Ali S., Fakhru'l-Razi A., y Alam Z. 2007. Use of fungi for the bioconversion of rice straw into cellulase enzyme. *Journal of Environmental Science and Health Part B*. 42(4): 381-386.
- Kim S., y Kim C.H. 2012. Production of cellulase enzymes during the solid-state fermentation of empty palm fruit bunch fiber. *Bioprocess and biosystems engineering* 35(1-2): 61-67.

- Kim K.C., Yoo S.S., Oh Y.A., y Kim S.J. 2003. Isolation ad characteristics of *Trichoderma harzianum* FJ1 producing cellulases and xylanase. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13:1-8.
- Kranz J., Schmutterer H. y Coch W. 1978. Diseases, pests and weeds in tropical crops. John Wiley and Sons, New York, USA. 219-220.
- Kuhad R.C., Deswal D., Sharma S., Bhattacharya A., Jain K.K., Kaur A., y Karp M. 2016. Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 55: 249-272.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Lahjouji K., Storms R., Xiao Z., Joung K.B., Zheng Y., Powlowski, J., y Varin, L. 2007. Biochemical and molecular characterization of a cellobiohydrolase from *Trametes versicolor*. *Applied microbiology and Biotechnology.* 75(2): 337-346.
- Lan W., Liu C.F., y Sun R. C. 2011. Fractionation of bagasse into cellulose, hemicelluloses, and lignin with ionic liquid treatment followed by alkaline extraction. *Journal of agricultural and food chemistry.* 59(16): 8691-8701.
- Lee K. M., Joo A.R., Jeya M., Lee K.M., Moon H.J., y Lee J.K. 2011. Production and characterization of cellobiohydrolase from a novel strain of *Penicillium purpurogenum* KJS506. *Applied biochemistry and Biotechnology.* 163(1): 25-39.
- Lee H.V., Hamid S.B.A., y Zain S.K. 2014. Conversion of lignocellulosic biomass to nanocellulose: structure and chemical process. *The Scientific World Journal.*
- Limam F., Chaabouni S. E., Ghrir R., y Marzouki N. 1995. Two cellobiohydrolases of *Penicillium occitanis* mutant Pol 6: Purification and properties. *Enzyme and microbial technology.* 17(4): 340-346.
- Lipa J.J., y Slizynsky K. 1973. Wskazówki metodyczne I. Terminologóa do wyznaczania sredniej dawki smiertelnej (LD50) W Patologia Owadow I Tksykologia. *Prace Navkome Instytutu ochrony Roslin Tom. XV, Seszyti.* 59-83.
- Lienqueo M.E., Mahn A., Salgado J.C., y Asenjo J.A. 2007. Current insights on protein behaviour in hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography B.* 849(1): 53-68.
- López A.S., Ferreira H., Llamosas A., Romeu A. 1984. Present status of cacao by-products utilization in Brazil. *Rev Theobroma.* 14(4): 271-291.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lynd L.R., Weimer P.J., Van Zyl W.H., y Pretorius I.S. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews.* 66(3):506-577.
- Madrid C., y Castellanos Y. 1998. Efecto de activadores sobre la calidad de composts elaborados con cachaza y bagazo de la caña de azúcar. *Venesuelos.* (1 y 2) 6: 22-28.
- Mahmood N., Yuan Z., Schmidt J., y Xu C. C. 2016. Depolymerization of lignins and their applications for the preparation of polyols and rigid polyurethane foams: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 60: 317-329.
- Mahn A., Zapata-Torres G., y Asenjo J.A. 2005. A theory of protein–resin interaction in hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A.* 1066(1): 81-88.
- Malherbe S., y Cloete T.E. 2002. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology.* 1(2): 105-114.
- Mandels M. 1985. Applications of cellulases. *Biochem Soc Trans.* 13:414-5.

- Mandels M., y Reese E.T. 1965. Inhibition of cellulases. Annual review of Phytopathology. 3(1): 85-102.
- Mayolo-Deloisa K., Martínez L.M., y Rito-Palomares M. 2012. Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas. Revista mexicana de ingeniería química. 11(3): 415-429.
- Maki M., Leung K.T., y Qin W. 2009. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. Int J Biol Sci. 5(5): 500-516.
- Meinhardt L.W., Lacerda C.G.G., Thomazella P.T.D., Teixeira P.J., Falsarella C.M., Schuster C.S., Carlson J.E., Gultinan M.J., Mieczkowski P., Farmer A., Ramaraj T., Crozier J., Davis R.E., Shao J., Melnick R.L., Pereira G.A.G., y Bailey B.A. 2014. Genome and secretome analysis of the hemibiotrophic fungal pathogen, *Moniliophthora roreri*, which causes frosty pod rot disease of cacao: mechanisms of the biotrophic and necrotrophic phases. BMC Genomics. 15:164.
- Mercado-Flores Y., Noriega-Reyes Y., Ramírez-Zavala B., Hernández-Rodríguez C., y Villa-Tanaca L. 2004. Purification and characterization of aminopeptidase (pumAPE) from *Ustilago maydis*. FEMS microbiology letters. 234(2): 247-253.
- Milewski S., Mignini F., Covelli I., y Borowski E. 1994. Specific inhibition of acid proteinase secretion in *Candida albicans* by Lys-Nva-FMDP. Journal of medical and veterinary mycology. 32(1): 1-11.
- Mitchell D.A., Kriger N., y Berovic M. 2006. Solid-State Fermentation Bioreactors-Fundamentals of Design and Operation. Mitchell DA.
- Montoya S., Orrego C.E., y Levin L. 2012. Growth, fruiting and lignocellulolytic enzyme production by the edible mushroom *Grifola frondosa* (maitake). World Journal of Microbiology and Biotechnology. 28(4): 1533-1541.
- Murali H.S., Mohan M.S., Manja K.S., y Sankaran R. 1994. Cellulolytic activity of four *Fusarium* spp. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 10(4): 487-487.
- Muzziotti D. 2008. Selección de microorganismos productores de Enzimas proteolíticas (Doctoral dissertation, Tesis. Universidad de los Andes. Argentina). P. 32-33.
- Navya P.N., Bhoite R.N., y Murthy P.S. 2012. Bioconversion of coffee husk cellulose and statistical optimization of process for production of Exoglucanase by *Rhizopus stolonife*. World applied sciences journal. 20(6):781-789.
- Oddoye E., Rhule S., Agyente-Badu K., Anchirinah V., Ansah F. 2010. Fresh cocoa pod husk as an ingredient in the diets of growing pigs. Sci Res Essays. 5: 1141-1144.
- O'Farrell P.A. 2008. Hydrophobic interaction chromatography. Molecular Biomethods Handbook. 731-739.
- Olubamiwa O., Otun A., y Longe O. 2002. Dietary inclusion rate of cocoa husk for starter cockerels. Lnt J Poult Sci. 1: 133-135.
- Osawa K., Miyazaki K., Shimura S., Okuda J., Matsumoto M., Ooshima T. 2001. Identification of cariostatic substances in the cacao bean husk: their anti-glucosyltransferase and antibacterial activities. J Dent Res. 80: 2000-2004.
- Padrón-Gamboa G., Romero G., Benavides A., Ramírez H., y Maiti R. 2003. Crop Research. 2: 291-302.
- Padrón-Gamboa G., Arias-Marín E.M., Romero-García J., Benavides-Mendoza A., Zamora-Rodríguez J., y García-Rodríguez S.P. 2004. Efecto de la cáscara de cacao en la obtención de espumas de poliuretano para uso hortícola. Propiedades físicas y de biodegradabilidad. Revista de la sociedad Química de Mexico. 48(2):156-164.

- Paloheimo M., Haarmann T., Mäkinen S., y Vehmaanperä J. 2016. Production of Industrial Enzymes in *Trichoderma reesei*. In Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications (pp. 23-57). Springer International Publishing.
- Pandey A., Selvakumar P., Soccol C.R., y Nigam P. 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current science*. 77(1): 149-162.
- Pandey A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 13(2): 81-84.
- Pandey M.P., y Kim C.S. 2011. Lignin depolymerization and conversion: a review of thermochemical methods. *Chemical Engineering y Technology*. 34(1): 29-41.
- Pasangulapati V., Ramachandriya K.D., Kumar A., Wilkins M.R., Jones C.L., y Huhnke R.L. 2012. Effects of cellulose, hemicellulose and lignin on thermochemical conversion characteristics of the selected biomass. *Bioresource technology*. 114:663-669.
- Payne C.M., Knott B.C., Mayes H.B., Hansson H., Himmel M.E., Sandgren M., y Beckham G.T. 2015. Fungal cellulases. *Chemical reviews*. 115(3): 1308-1448.
- Perez-Boada M., Ruiz-Duenas F.J., Pogni R., Basosi R., Choinowski T., Martínez M. J., y Martínez A.T. 2005. Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways. *Journal of molecular biology*. 354(2): 385-402.
- Phillips-Mora W. 2003. Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans *et al.* As determined using molecular, phytopathological and morpho-physiological evidence. Ph.D. Thesis. University of Reading, Reading. UK. 349.
- Phillips-Mora W., Coutiño A., Ortiz C.F., López A.P., Hernández J., Aime M.C. 2006. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa in Mexico. *Plant Pathology*. 55:584.
- Phillips-Mora W., Aime M.C., y Wilkinson, M.J. 2007. Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America *Plant Pathology*. 56(6): 911-922.
- Phillips-Mora, W y Wilkinson M. 2007. Frosty pod of cacao: a disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. *Phytopathology*. 97: 1644-1647.
- Phitsuwan P., Laohakunjit N., Kerdchoechuen O., Kyu K.L., y Ratanakhanokchai K. 2013. Present and potential applications of cellulases in agriculture, biotechnology, and bioenergy. *Folia microbiológica*. 58(2): 163-176.
- Polizeli M.L.T.M., Rizzatti A.C.S., Monti R., Terenzi H.F., Jorge J.A., y Amorim D.S. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied microbiology and Biotechnology*. 67(5): 577-591.
- Pontis H. 2017. hapter 3 – Protein and Carbohydrate Separation and Purification. *Plants, Green Algae and Cyanobacteria*, pp 46-63.
- Porath J. 1987. Metal Ion—Hydrophobic, Thiophilic and II-Electron Governed Interactions and their Application to Salt-Promoted Protein Adsorption Chromatography. *Biotechnology progress* 3(1): 14-21.
- Qiu WH, Chen HZ. Structure, function and higher value application of lignin. *J. Cellul Sci Technol*. 2006;14(1):52–9.
- Queiroz J.A., Tomaz C. T., y Cabral J. M. S. 2001. Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Journal of Biotechnology*. 87(2): 143-159.
- Quiroz-Castañeda R.E., Balcázar-López E., Dantán-González E., Martinez A., Folch-Mallol J., y Martínez-Anaya C. 2009. Characterization of cellulolytic activities of *Bjerkandera adusta*

- and *Pycnoporus sanguineus* on solid wheat straw medium. *Electronic Journal of Biotechnology*. 12(4):5-6.
- Ramos A.M., Forchiassin F. 1996. Producción de endoglucanasa en cuatro especies del género *Saccolobus*. *Rev. Argentina de Microbiología*. 28: 55-62.
- Read S.M., y Bacic T. 2002. Prime time for cellulose. *Science*, 295(5552): 59-60.
- Reese E.T. 1976. History of the cellulase program at the US Army Natick development centre. *Biotechnol Bioeng Symp.* (6): 9-20.
- Reese E.T, Mandels M. Rolling. 1984. With the time: production and applications of *Trichoderma reesei* cellulase. *Annual Report of Fermentation Processes.* (7): 1-20.
- Roettger B.F., y Ladisch M. R. 1989. Hydrophobic interaction chromatography. *Biotechnology advances.* 7(1): 15-29.
- Rouau X., y Odier E. 1986. Purification and properties of two enzymes from *Dichomitus squalens* which exhibit both cellobiohydrolase and xylanase activity. *Carbohydrate research.* 145(2): 279-292.
- Ruiz-Dueñas F.J., Lundell T., Floudas D., Nagy L.G., Barrasa J.M., Hibbett D.S., y Martínez A.T. 2013. Lignin-degrading peroxidases in Polyporales: an evolutionary survey based on 10 sequenced genomes. *Mycologia.* 105(6): 1428-1444.
- Sadhu S., Saha P., Sen S.K., Mayilraj S., y Maiti T.K. 2013. Production, purification and characterization of a novel thermotolerant endoglucanase (CMCase) from *Bacillus* strain isolated from cow dung. *SpringerPlus.* 2(1):10.
- Saheki T., y Holzer H. 1975. Proteolytic activities in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology.* 384(1): 203-214.
- Sánchez-Mundo M.L., Bautista-Muñoz C., y Jaramillo-Flores M.E. 2010. Characterization of the exopeptidase activity existing in *Theobroma cacao* L. during germination. *Process Biochemistry.* 45(7): 1156-1162.
- Sánchez-Sánchez H. 2011. Determinación de la actividad enzimática extracelular de endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanasa y amplificación de genes endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanasa a partir de *moniliophthora roreri*. [Tesis]. Colegio de Postgraduados.
- Samsuri M., Gozan M., Mardias R., Baiquni M., Hermansyah A., Wijanarko A., y Nasikin, M. 2007. Utilization of cellulosic bagasse for the production of ethanol via simultaneous saccharification and fermentation with xylanase enzyme. *Makara, Technology Journal.* 1(1): 17-24.
- Stanton P. (2004). Ion-exchange chromatography. *HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols.* 23-43.
- Saval S. 2012. Aprovechamiento de residuos agroindustriales: Pasado, presente y futuro. *BioTecnología.* 16(2): 14-46.
- Singhania R.R., Patel A.K., Soccol C.R., y Pandey A. 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal.* 44(1): 13-18.
- Soni R., Nazir A., y Chadha B.S. 2010. Optimization of cellulase production by a versatile *Aspergillus fumigatus* fresenius strain (AMA) capable of efficient deinking and enzymatic hydrolysis of Solka floc and bagasse. *Industrial Crops and Products.* 31(2): 277-283.
- Sun J. X., Sun X.F., Zhao H., y Sun R.C. 2004. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse, *Polym. Degrad. Stab.* 84:331–339.
- Shweta A. 2015. Solid state fermentation for cellulase production. *Biotechnological Research.* 1(1): 108-112.

- Taherzadeh M.J., y Karimi K. 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International journal of molecular sciences*. 9(9): 1621-1651.
- Takahashi C.M., de Carvalho Lima K.G., Takahashi D.F., y Alterthum F. 2000. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate and sugar mixtures to ethanol by recombinant *Escherichia coli* KO11. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 16(8-9): 829-834.
- Teeri T.T., Lehtovaara P., Kauppinen S., Salovuori I., y Knowles J. 1987. Homologous domains in *Trichoderma reesei* cellulolytic enzymes: gene sequence and expression of cellobiohydrolase II. *Gene*. 51(1): 43-52.
- Teeri T.T. 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology*. 15(5): 160-167.
- Tejirian A., y Xu F. 2010. Inhibition of cellulase-catalyzed lignocellulosic hydrolysis by iron and oxidative metal ions and complexes. *Applied and environmental microbiology*. 76(23): 7673-7682.
- Thorold C.A. 1975. *Disease of cocoa* Clarendon Press, Oxford, England. 27-31.
- Tian C., Beeson W.T., Lavarone A.T., Sun J., Marletta M.A., Cate J.H., y Glass N.L. 2009. Systems analysis of plant cell wall degradation by the model filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106(52): 22157-22162.
- Torres de la Cruz M, Ortiz-Garcia CF, Teliz-ortiz D, Mora- Aguilera A. y Nava- Diaz C. 2011. Temporal progress and integrated management of frosty pod rot [*Moniliophthora roreri* (Cify Par.) Evans et al.] Of cocoa (*Theobroma cacao*) in Tabasco, Mexico. *Journal of Plant Pathology* 93:31-36.
- Tuohy M.G., Walsh D.J., Murray P.G., Claeysens M., Cuffe M.M., Savage A.V., y Coughlan M.P. 2002. Kinetic parameters and mode of action of the cellobiohydrolases produced by *Talaromyces emersonii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1596(2): 366-380.
- Uhlig H. 1998. *Industrial enzymes and their applications*. New York: John Wiley and Sons, Inc. USA. pp: 435.
- Ui-Haq U., Javed M.M., y Khan T.S. 2006. Sugar cane bagasse pretreatment: an attempt to enhance the production potential of cellulases by *Humicola insolens* TAS-13. *Biokemistri*. 18(2):83-88.
- Väisänen T., Haapala A., Lappalainen R., y Tomppo L. 2016. Utilization of agricultural and forest industry waste and residues in natural fiber-polymer composites: A review. *Waste Management*. 54: 62-73.
- Vargas-Radillo J., Salazar-Rios E., Barrientos-Ramirez L., Perez-Centeno A., Renteria-Urquiza M., Rodriguez-Rivas A., Navarro-Arzate F., y Rutiaga-Quinones J. 2015. Bleached pulp and fermentable sugars from sugarcane pith bagasse. *Madera y Bosques*. 21(2): 117-130.
- Volkov P.V., Rozhkova A.M., Gusakov A.V., y Sinitsyn A.P. 2014. Homologous cloning, purification and characterization of highly active cellobiohydrolase I (Cel7A) from *Penicillium canescens*. *Protein expression and purification*. 103: 1-7.
- Viikari L., Alapuranen M., Puranen T., Vehmaanperä J., y Siika-Aho M. 2007. Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. In *Biofuels*. (pp. 121-145). Springer Berlin Heidelberg.
- Vrije T., Bakker R.R., Budde M.A., Lai M.H., Mars A.E., y Claassen P.A. 2009. Efficient hydrogen production from the lignocellulosic energy crop *Miscanthus* by the extreme

- thermophilic bacteria *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga neapolitana*. *Biotechnol. for biofuels*. 2(1): 12.
- Wang H., Mochidzuki K., Kobayashi S., Hiraide H., Wan, X., y Cui, Z. 2013. Effect of bovine serum albumin (BSA) on enzymatic cellulose hydrolysis. *Applied biochemistry and Biotechnology*. 170(3): 541-551.
- Watanabe H., y Tokuda G. 2010. Cellulolytic systems in insects. *Annual review of entomology*. 55: 609-632.
- Wilson D.B. 2009. Cellulases and biofuels. *Current opinion in Biotechnology*. 20(3): 295-299.
- Winderl J., Hahn T., y Hubbuch J. 2016. A mechanistic model of ion-exchange chromatography on polymer fiber stationary phases. *Journal of Chromatography A*. 1475: 18-30.
- Xia F., Nagrath D., Garde S., y Cramer S. M. 2004. Evaluation of selectivity changes in HIC systems using a preferential interaction based analysis. *Biotechnology and bioengineering*. 87(3): 354-363.
- Yazdi M.T., Woodward J.R., y Radford A. 1990. The cellulase complex of *Neurospora crassa*: activity, stability and release. *Microbiology*. 136(7): 1313-1319.
- Yoon L.W., Ang T.N., Ngoh G.C., y Chua A.S.M. 2014. Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. *biomass and bioenergy*. 67:319-338.
- Yunpu W.A.N.G., Leilei D.A.I., Liangliang F.A.N., Shaoqi S.H.A.N., Yuhuan L.I.U., y Roger R.U.A.N. 2016. Review of microwave-assisted lignin conversion for renewable fuels and chemicals. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 119:104-113.

## 11. ANEXOS.

### Anexo I: Fórmula para calcular la actividad enzimática.

Actividad total (U ml<sup>-1</sup>)

$$U \text{ ml}^{-1} = \frac{(\text{Abs } 405 \text{ nm}) (\text{factor de dilución de técnica}) (\text{factor de dilución de muestra})(\text{factor de la curva})}{(\text{Tiempo de incubación})}$$

Actividad específica (U mg<sup>-1</sup> proteína total)

$$U \text{ mg}^{-1} \text{ Proteína total} = \frac{U \text{ ml}^{-1}}{\text{mg ml}^{-1} \text{ de proteína}}$$

### Anexo II: Salida del SAS®STUDIO, versión 3.5 (2016).

#### The GLM Procedure

Class Level Information		
Class	Levels	Values
a1	2	1 2

Number of Observations Read	66
Number of Observations Used	66

### The GLM Procedure

Dependent Variable: T1

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	72446671.8	72446671.8	5.84	0.0185
Error	64	793515490.0	12398679.5		
Corrected Total	65	865962161.8			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	T1 Mean
0.083660	140.5228	3521.176	2505.769

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
a1	1	72446671.81	72446671.81	5.84	0.0185

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
a1	1	72446671.81	72446671.81	5.84	0.0185

### The MEANS Procedure

Analysis Variable : T1						
a1	N Obs	N	Mean	Std Dev	Minimum	Maximum
1	33	33	1458.07	1272.21	0	7443.85
2	33	33	3553.47	4814.44	0	24193.11

