

Potencial celulolítico de especies de *Pleurotus* aisladas en la región Córdoba-Orizaba.

R. Ambrosio Suárez^{1*}, M. Castillo Morales¹, R. C. Llarena Hernández², R. Uzárraga Salazar^{1*}

¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana, Prol. Oriente 6 No. 1009, C.P. 94340, Orizaba, Veracruz, México

²Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana, C. P. 94945, Amatlán de los Reyes, Veracruz, México

*rocioas122@gmail.com *ruzarraga@uv.mx

Área de participación: Ingeniería Química

Resumen

Los hongos Basidiomicetos son capaces de hidrolizar el material lignocelulolítico, para que esto suceda requiere la acción sinérgica de enzimas extracelulares, las cuales se producen dependiendo de la fuente de carbono utilizada. En este presente estudio se evaluó la producción de celulasas utilizando celulosa soluble (CMC), insoluble (avicel) y la mezcla de ambas (CMC-avicel) en 11 cepas del género *Pleurotus*. Se observó una mayor productividad celulasa en la mezcla (CMC-Avicel) siendo la cepa *P. djamor* (601) la que obtuvo una mayor productividad con 0.049 ± 0.019 FPU/L/d. En la actividad endoglucanasa la cepa con mejor productividad endoglucanasa fue *Pleurotus* sp. (1163) con 0.079 ± 0.03 IU/L/d con CMC como fuente de carbono. Respecto a la mayor productividad enzimática lacasa se obtuvo con la cepa *P. albidus* en CMC con 4.2 ± 0.46 U/L/d. Finalmente en la zimografía se observaron dos isoformas con pesos moleculares de 57 y 39 kDa en las cepas *P. pulmonarius* y *Pleurotus* sp. (HUV15) en la mezcla.

Palabras clave: Fuentes de carbono, lacasa, celulasas, hongos.

Abstract

The Basidiomycete fungi are capable of hydrolyzing the lignocellulolytic material, for this to happen requires the synergistic action of extracellular enzymes, which are produced depending on the carbon source used. In this present study the cellulase production was evaluated using soluble cellulose (CMC), insoluble (avicel) and the mixture of both (CMC-avicel) in 11 strains of the genus *Pleurotus*. A higher cellulase productivity was observed in the mixture (CMC-Avicel), with *P. djamor* (601) being the one that obtained the highest productivity with 0.049 ± 0.019 FPU / L / d. In the endoglucanase activity, the strain with the best endoglucanase productivity was *Pleurotus* sp. (1163) with 0.079 ± 0.03 IU / L / d with CMC as a carbon source. Regarding the highest enzymatic productivity, laccase was obtained with *P. albidus* strain in CMC with 4.2 ± 0.46 U / L / d. Finally, in zymography, two isoforms with molecular weights of 57 and 39 kDa were observed in *P. pulmonarius* and *Pleurotus* sp. (HUV15) in the mixture.

Key words: Carbon sources, laccase, cellulases, fungus.

Introducción

Uno de los principales problemas ambientales en la actualidad es la alta producción de residuos agroindustriales, siendo uno de estos los materiales lignocelulolíticos. La materia lignocelulolítica está compuesta principalmente por celulosa (35-50%), hemicelulosa (25-30%) y lignina (25-30%) [Wang y col., 2011]. Estos residuos podrían ser fácilmente aprovechados como biocombustibles, los residuos lignocelulolíticos generalmente se degradan de manera competitiva por muchos microorganismos [Cuervo y col., 2009], entre estos se encuentran los hongos basidiomicetos. Dichos hongos, conocidos como de la podredumbre blanca son hongos que deben su nombre a la capacidad de producir basidiosporas, estos hongos son los únicos microorganismos conocidos que transforman todos los componentes de la biomasa vegetal, incluyendo lignina, celulosa y hemicelulosa [Mahajan y Master, 2010]. Para llevar a cabo esta degradación son necesarias enzimas lignocelulotíticas como son las lacasas, celulasas, β -glucosidasas, endoglucanasas entre otras. La producción de estas enzimas puede depender de la fuente de carbono que haya sido utilizado como sustrato.

Dentro de los hongos basidiomicetos se encuentran las especies del género de *Pleurotus*, las cuales son cultivadas en zonas tropicales. Una característica atractiva de la producción de este hongo es que produce grandes cantidades de proteína sobre sustratos que consisten principalmente en materiales de desecho, además de que posee una gran capacidad de degradación y actividad enzimática [Velázquez-Cedeño y col., 2001; Elisashvili y col., 2005]. Aunque existen numerosos estudios del potencial lignocelulolítico de estos hongos son escasos los estudios de cepas aisladas en México. Es por lo que en el presente trabajo será evaluado el efecto de diversas fuentes de carbono sobre la capacidad lignocelulolítica de varias especies de *Pleurotus* que han sido aislados en la región de Córdoba-Orizaba.

Metodología

Microorganismos

Las 11 cepas de hongos del género *Pleurotus* que se utilizaron en este proyecto fueron aisladas en la región de Córdoba-Orizaba e identificadas y donadas por el laboratorio de Hongos de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de Peñuela, de la Universidad Veracruzana.

Pleurotus pulmonarius (1E115) es una cepa comercial que se utilizó como testigo. A continuación, se enlistan las diversas cepas indicando la procedencia en paréntesis. *Pleurotus* sp. (HUV15) (Ayojapan), *Pleurotus* sp. (1163) (Ixtaczoquitlan), *Pleurotus albidus* (1096) (Monte Blanco), *Pleurotus djamor* (MXLD24, MXLD23 y MXLD13) (Amatlán de los reyes) y las cepas de *Pleurotus djamor* (1160, 598, 601 y 1182) (Playa de la junta, Fortín, Tlaquilpa y Peñuela respectivamente).

Medio de cultivo

Para este trabajo se emplearon medios de cultivo en líquido y sólido con la siguiente composición: 0.6 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g/L de KH_2PO_4 , 0.2 g/L de Urea, 1.4 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.3 g/L de CaCl_2 anhidro, 5.0 mg/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.4 mg/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.0 mg/L de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.98 mg/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Para el medio sólido se agregó 15 g/L de agar bacteriológico. Independiente mente de esta composición se adiciono cada fuente de carbono al 2% P/v: (carboximetilcelulosa y avicel). Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121 °C y 15 Lb/in2 por un periodo de 15 minutos.

Influencia de la fuente de carbono sobre las actividades enzimáticas lignocelulolíticas

Para determinar el efecto de la celulosa soluble (Carboximetilcelulosa al 2% P/v) e insoluble (avicel al 2% P/v) y la mezcla de la celulosa soluble e insoluble (Carboximetilcelulosa al 1% P/v y avicel al 1% P/v) como fuente de carbono se evaluó por triplicado en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de medio de cultivo. Los matraces se inocularon con 5 cuadros de 1 cm² de agar con micelio de nuestro correspondiente hongo previamente sembrado. Una vez que los matraces fueron inoculados se incubaron a oscuridad constante a 28° C con agitación de 170 rpm. Se tomo una alícuota de 1 ml de cada uno de los matraces desde el momento de inoculación hasta cada 24 horas durante 10 días, esta muestra se centrifugo a 10000 rpm durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y fue transferido a otro tubo, este tubo se conservó a -20°C para su posterior análisis.

Determinación de la capacidad celulolítica en medio sólido cualitativamente

Para la determinación cualitativa de la actividad celulasa cada hongo se inoculo en un medio de cultivo mineral y como única fuente de carbono se utilizó carboximetilcelulosa al 1% P/v. Se incluyeron tres replicas como control abiótico. Las cepas se incubaron a temperatura ambiente y oscuridad constante por el tiempo que fuera necesario para que las cepas alcanzaran un crecimiento radial de 2/3 partes de la superficie del agar. El diámetro del hongo se midió con un vernier, a este valor se le denominó diámetro micelar.

Para determinar si una cepa logró degradar la CMC en medio sólido se modificaron los protocolos descritos por Meddeb-Mouelhi y col., [2014]; Nargotra y col., [2016] y Batista-Garcia y col., [2017]. En resumen, se retiró el micelio de la superficie del agar raspándolo con una espátula y la superficie se lavó con agua destilada para eliminar los restos de micelio remanente. Se agregó el colorante rojo congo al 1% P/v, hasta que esta solución cubriera por completo toda la caja Petri de forma homogénea. Se dejó reposar durante 30 min, el colorante se desechó y se realizó un lavado adicionando NaCl 1M para arrastrar el colorante remanente en la superficie del

agar, se continuaron haciendo lavados para recuperar el colorante que se desprendió de la celulosa hidrolizada dentro del agar. Posteriormente, se midió el diámetro del halo de decoloración. Para calcular el índice de capacidad celulolítica se dividió el diámetro del halo de decoloración entre el diámetro del crecimiento micelar, un valor menor a 1 indicó una baja capacidad sobre la hidrólisis de la celulosa y mayor a 1, lo contrario.

Cuantificación de actividades enzimáticas

La actividad enzimática celulasa total (expresadas como Unidades de Papel Filtro, FPU) se determinó adaptando los protocolos descritos por Ghose, [1987] (IUPAC) y Xiao y col., [2005] para realizarla en microvolúmenes. En resumen, se utilizó como sustrato un círculo de papel filtro Whatman No. 1 con un diámetro de 4-5 mm en buffer de acetatos 50 mM pH 4.8, finalmente, se adicionó la muestra problema diluida apropiadamente. Las muestras se incubaron a 50 °C por 1 hora en un termociclador. Posteriormente se determinaron los azúcares liberados cuantificándolos por el método DNS a 550 nm.

Para la cuantificación de la actividad enzimática Endo-1,4- β -Glucanasa se siguió el protocolo descrito por Li y Yu, [2013] con algunas modificaciones. La muestra problema se adicionó a una solución de CMC de baja viscosidad (Sigma-Aldrich C5678) al 2 % P/V preparada en buffer de acetatos 50 mM con un pH de 4.8. Las muestras se incubaron a 50 °C por 30 minutos en un termociclador. Posteriormente se determinaron los azúcares liberados cuantificándolos por el método DNS a 550 nm.

La actividad enzimática lacasa se cuantificó por espectrofotometría monitoreando la oxidación del 2,6-dimetoxifenol a 450 nm, donde una unidad de actividad enzimática lacasa se define como los μ moles de sustrato oxidado por minuto.

Detección de actividad lacasa en zimograma

Se obtuvieron los perfiles electroforéticos en geles no desnaturalizantes (zimograma) para detectar la o las bandas con actividad catalítica de la enzima lacasa. Para esto, se prepararon geles de poliácridamida: uno separador al 12 % y uno concentrador al 5 %, tal y como lo describe Fragner y col., [2009]. El gel se enjuagó con buffer de acetatos 0.1 M con pH 5.0 y se dejó equilibrando en la misma solución en agitación suave durante 15 min. Para revelar las bandas de la actividad enzimática lacasa se eliminó el buffer y se adicionó DMP 7.06 mM.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa STATGRAPHICS centurión XVI versión 16.1.18. En el cual se realizó un análisis de varianza (ANOVA) simple al igual que una prueba de rangos múltiples para determinar cuáles medias son significativamente diferentes por el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, esta prueba tiene un nivel de 95.0% de confianza.

En las figuras que corresponda, las diferencias significativas entre los tratamientos se representan con letras mayúsculas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos tratamientos que comparten una misma letra.

Cálculo de productividad enzimática

Para todas las actividades enzimáticas se realizó un cálculo de la productividad enzimática el cual se calculó tomando el valor máximo de actividad enzimática y dividiéndolo por el número de días necesario para alcanzar dicha actividad.

Resultados y discusión

Determinación de la capacidad celulolítica cualitativa en medio sólido

Se realizó una determinación cualitativa de la capacidad celulolítica de cada una de las cepas de *Pleurotus*, esta se realizó por triplicado para comprobar la veracidad de los resultados.

En la figura 1 se puede verificar que las 11 cepas presentaron un halo de decoloración (amarillo-anaranjado) sobre el colorante rojo congo, el cual es manifestado por una hidrólisis en la molécula de celulosa por el rompimiento del enlace glicosídico β -1,4, que es el enlace al cual el colorante rojo congo se une. Es así como el complejo colorante-celulosa se rompe y el colorante es eliminado mediante los lavados de NaCl. Un resultado negativo se basaría en la ausencia del halo de decoloración.

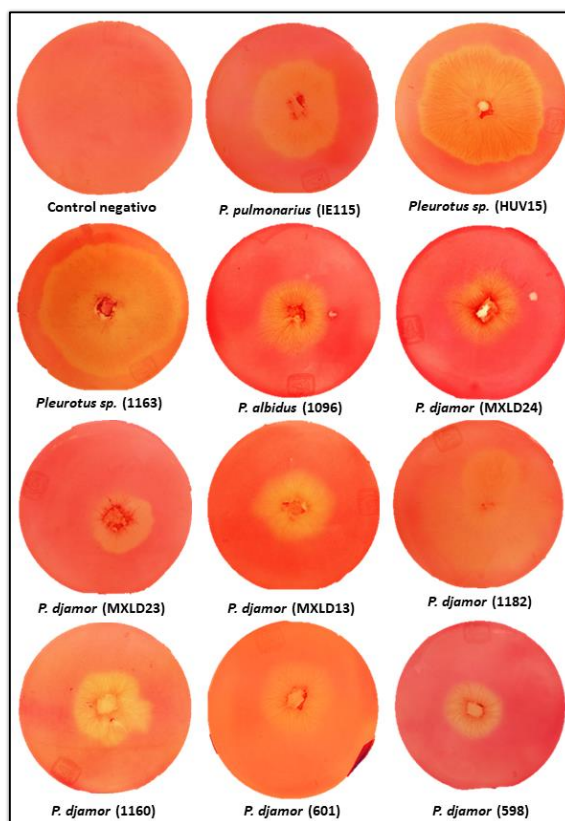


Figura 1. Halos de degradación de CMC para las diversas cepas de *Pleurotus*.

Con los diámetros del crecimiento micelar y del halo de decoloración se realizó el cálculo del índice de la capacidad celulolítica (Figura 2).

De acuerdo con los resultados todas las cepas tuvieron resultados positivos, siendo la cepa *P. djamor* (601) procedente de Tlaquilpa la que presenta un mayor índice de capacidad celulolítica, sin embargo, un índice menor a 1 indica una baja capacidad sobre la hidrólisis de la celulosa siendo el índice de esta cepa 0.7. Las cepas *Pleurotus* sp. (HUV15 y 1163), *P. albidus* (1096) y *P. djamor* (XMLD13, 1160, 601 y 598) que son cepas provenientes del área orgánica presentan una mayor capacidad sobre la hidrólisis de la celulosa que *P. pulmonarius* (IE115) la cual es una cepa comercial, esto puede deberse a que las condiciones del suelo donde fueron aisladas pudieron contener materia orgánica que favoreciera la hidrólisis de la celulosa [Guzmán y col., 2014].

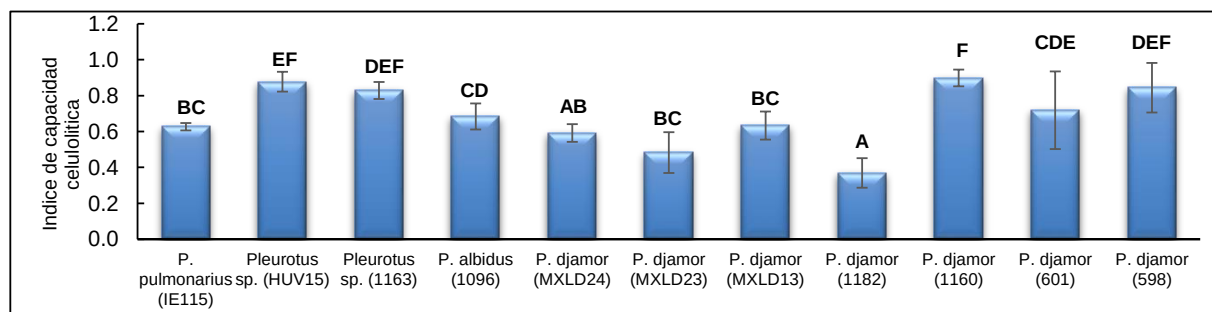


Figura 2. Índice de la capacidad celulolítica para las 11 cepas de *Pleurotus*.

Efecto de la fuente de carbono sobre la productividad enzimática.

En el análisis estadístico es importante resaltar que se realizó para comparar 3 niveles, que fueron las fuentes de carbono (CMC, Avicel, CMC-Avicel), para cada cepa. Es por ello que la comparación de medias, mediante la prueba de diferencias mínimas significativas (LSD) de Fisher, solo debe hacerse por cada hongo.

Como se observa en la Figura 3 al realizar una comparativa se puede observar que las fuentes de carbono que tuvieron mejor desempeño fueron CMC y la mezcla CMC-avicel en la productividad de celulasa total. Las cepas que obtuvieron mayor productividad enzimática de celulasa total (FPU) en la mezcla CMC-avicel fueron *P. djamor* (601 y MXLD13) y *Pleurotus sp.* (HUV15), siendo *P. djamor* (601) la que obtuvo una mayor productividad de 0.049 FPU/L/d, mientras que *P. djamor* (MXLD13) y *Pleurotus sp.* (HUV15) tuvieron una productividad de 0.028 FPU/L/d y 0.036 FPU/L/d respectivamente. Corona [2017] reporta una productividad enzimática para *P. djamor* (601) de 48.3 FPU/L/d utilizando salvado de trigo como fuente de carbono siendo mucho mayor a la obtenida por la misma cepa en la mezcla CMC-avicel.

En CMC las cepas que tuvieron un mejor desempeño fueron *P. pulmonarius*, *P. albidus* y *P. djamor* (MXLD24, MXLD23 y 1182), *P. pulmonarius* fue el que obtuvo una mayor productividad en la fuente de carbono CMC la cual fue de 0.033 FPU/L/d. En el caso de las cepas *Pleurotus sp.* (1163) y *P. djamor* (1160) obtuvieron una productividad muy similar en CMC y en la mezcla CMC-avicel.

En el caso del avicel las únicas cepas que tuvieron actividad celulolítica fueron *Pleurotus sp.* (HUV15) y *P. djamor* (1182 y 601) siendo *Pleurotus sp.* (HUV15) la cepa que tuvo una mayor productividad en avicel, esto es debido a que la cristalinidad del avicel afecta la accesibilidad de las enzimas hacia el sustrato [Gutiérrez y col., 2015].

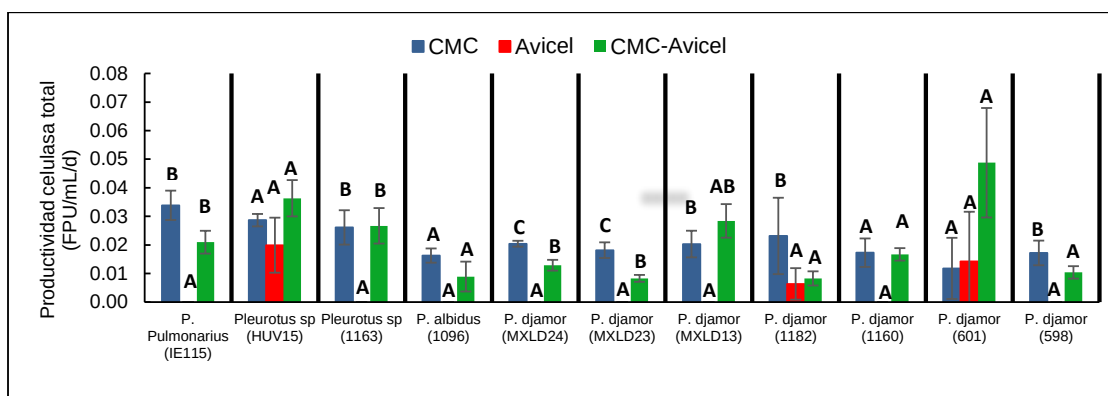


Figura 3. Resumen de la productividad de actividad enzimática celulosa total para las 11 cepas de *Pleurotus* cultivadas en las tres fuentes de carbono.

Para la actividad endoglucanasa (Figura 4) se puede observar que hay una mayor productividad de actividad enzimática endoglucanasa en aquellas fuentes de carbono que contienen carboximetilcelulosa, esto es debido a que la carboximetilcelulosa (CMC) al ser una celulosa amorfa induce la actividad endoglucanasa, la cual tiene su especificidad en las regiones amorfas de la celulosa.

En la carboximetilcelulosa como fuente de carbono las cepas que presentaron mayor productividad enzimática endoglucanasa fueron *P. pulmonarius*, *Pleurotus sp.* (HUV15 y 1163), *P. albidus* y *P. djamor* (MXLD24) siendo el único en su especie dentro de las cepas evaluadas que presenta una mejor productividad enzimática de endoglucanasa en la fuente CMC, la cepa que obtuvo mayor productividad en esta fuente fue *Pleurotus sp.* (1163) produciendo 0.079 U/L/d que al compararla a las 440 U/L/d obtenidas por Corona [2017] de la misma cepa son mucho menores. La mayor productividad enzimática en la mezcla CMC-avicel la presentaron las cepas de *P. djamor* con excepción de la cepa XMLD24, siendo la cepa 598 la que obtuvo la mayor productividad con 0.036 U/L/d.

En avicel las cepas tuvieron muy poca productividad de endoglucanasa siendo la cepa *Pleurotus sp.* (HUV15) con 0.01 U/L/d la que obtuvo mayor productividad en esta fuente de carbono. Esto es debido a que el avicel es una celulosa cristalina y por lo tanto solo los sustratos de estructura amorfa pueden ser despolimerizados por la endoglucanasa [Ortiz y col., 2011].

La productividad enzimática fue diferente entre las cepas de *Pleurotus djamor*, esto puede indicar la existencia de subespecies o a las condiciones ambientales en donde las cepas fueron aisladas.

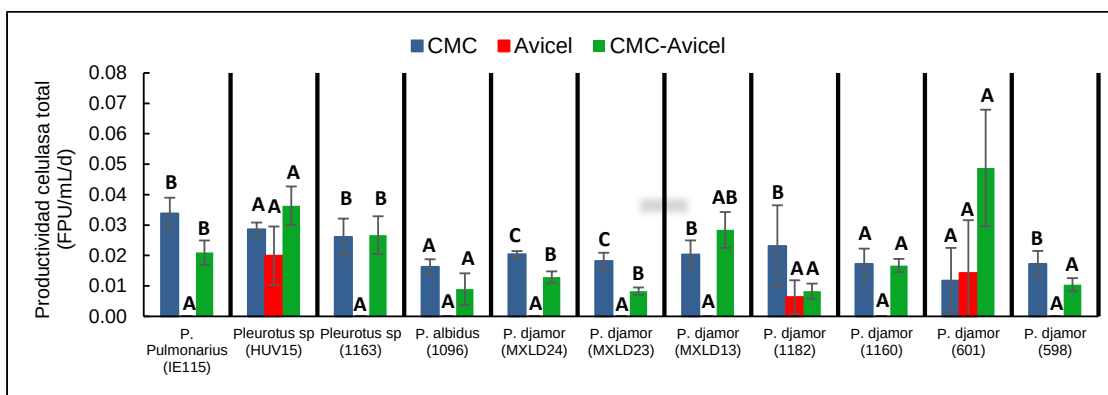


Figura 4. Resumen de la productividad de actividad enzimática celulasa total para las 11 cepas de *Pleurotus* cultivadas en las tres fuentes de carbono.

Al hacer una comparativa directa en la productividad enzimática lacasa de los hongos sobre las tres fuentes de carbono (Figura 5) se puede observar que la que obtuvo un mejor desempeño fue carboximetilcelulosa (CMC), siendo las cepas que destacan *P. pulmonarius* (IE115), *Pleurotus* sp. (1163) y *P. albidus* (1096). El siguiente en desempeño es la mezcla CMC-avicel esto es normal ya que la CMC se encuentra en una concentración en 1%^{P/v} a diferencia de la fuente de mayor desempeño que tiene una concentración de CMC al 2%^{P/v}, sin embargo, en la cepa *P. djamor* (XLMD23) se observa una preferencia por la mezcla. Las cepas *P. djamor* (MXLD24, MXLD23, MXLD13, 1182, 1160, 601 y 598) fueron las cepas que presentaron menor productividad de la enzima lacasa en las tres fuentes de carbono.

Los resultados de *Pleurotus* sp. (HUV15) en CMC fueron menores a los obtenidos por Corona [2017], el *Pleurotus* sp. (HUV15) obtuvo una productividad de 222.3 U/L/d en donde se utilizó salvado de trigo como sustrato mientras que con CMC se obtuvieron 3.2 U/L/d.

El avicel como fuente de carbono fue el sustrato mas pobre para la productividad de actividad enzimática lacasa, Mikiashvili y col., [2006] señala que la celulosa insoluble es un sustrato pobre para la producción de lacasa, mientras que los compuestos fácilmente metabolizables aseguran una actividad enzimática comparativamente alta.

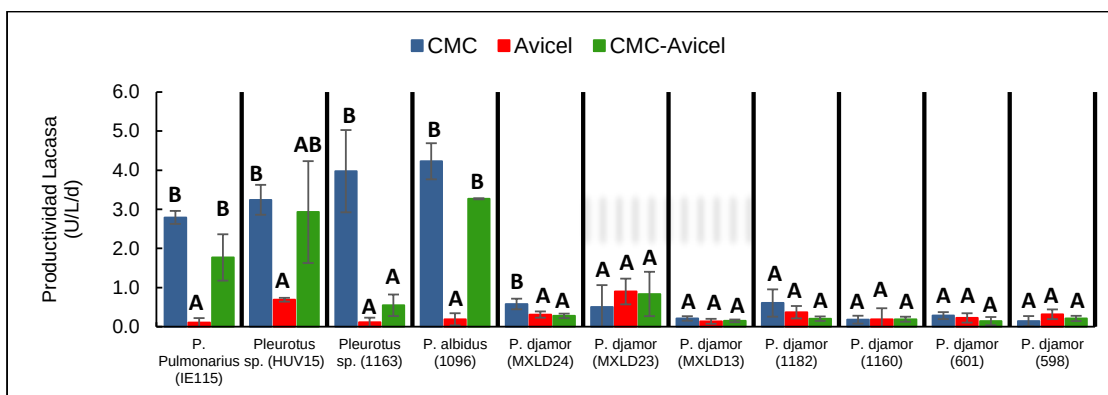


Figura 5. Resumen de la productividad de actividad enzimática lacasa para las 11 cepas de *Pleurotus* cultivadas en las tres fuentes de carbono.

Detección de actividad lacasa en zimograma

Se realizó un zimograma en gel separador de poliacrilamida al 12 % para detectar la actividad ligninolítica de la enzima lacasa en el secretoma de las cepas que presentaron una actividad enzimática destacable. Se analizaron las cepas *P. pulmonarius* (1E115), *Pleurotus sp.* (1163 y 1096) y *P. albidus* (HUV15) en los dos sustratos con mayor actividad los cuales son CMC y la mezcla CMC-avicel.

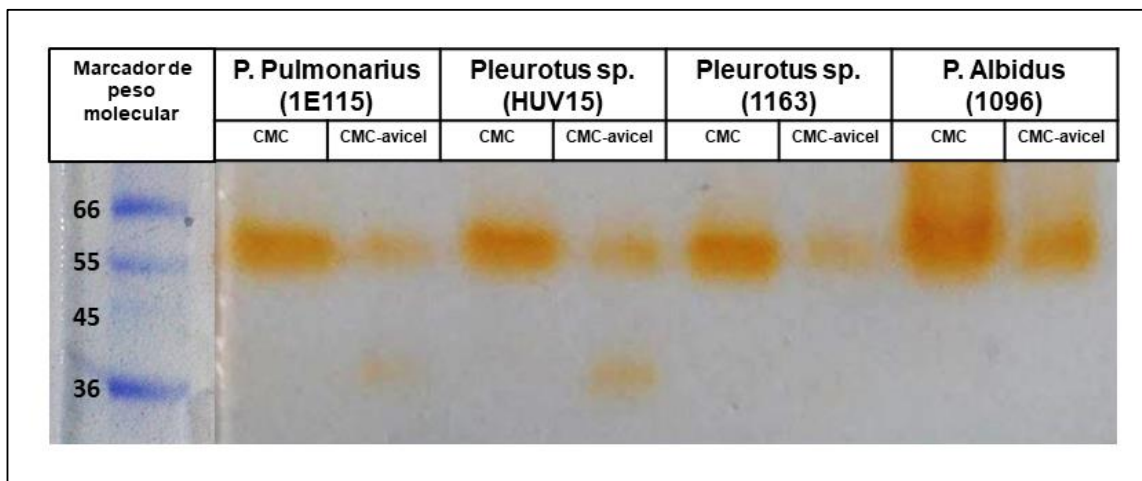


Figura 6. Zimografía para la enzima lacasa en gel de poliacrilamina al 12%.

Las bandas más marcadas se presentaron en las muestras de CMC, mientras que las más tenues pertenecen a la mezcla CMC-avicel, esto es de esperarse debido a que existe una relación entre la intensidad de las bandas con su valor de actividad enzimática, en este caso las muestras de CMC presentan mayor actividad enzimática lacasa que las de la mezcla CMC-avicel. La banda más marcada y definida la presenta la cepa *Pleurotus albidus* en CMC como fuente de carbono, la cual fue la cepa con mayor actividad enzimática lacasa (42.3 U/L).

Las cepas *P. pulmonarius* (1E115) y *Pleurotus sp* (HUV115) presentaron una segunda isoforma de 39 KDa de peso molecular en la mezcla CMC-avicel como fuente de carbono, la presencia de isoenzimas de lacasa es un evento común entre hongos de pudrición blanca. La cantidad de isoenzimas que se pueden llegar a presentar dependen de las condiciones del medio de cultivo [Rojas, 2010]. En el trabajo realizado por Corona [2017] la cepa *Pleurotus sp.* (1163) en la cual el salvado de trigo fue utilizado como fuente de carbono presenta dos isoformas de 45 y 30 KDa (Figura 9) mientras que en el presente trabajo la misma cepa no presentó más de una isoforma.

Trabajo a futuro

Realizar las cuantificaciones enzimáticas de xilanas y β -glucosidasa, puesto que son las enzimas principales (al igual que las cuantificadas) en la degradación de la lignocelulosa.

Estandarizar el protocolo para obtener los zimogramas de las actividades enzimáticas de endoglucanasa, xilanas y β -glucosidasa para corroborar la presencia de dichas enzimas y visualizar si presentan o no isoformas.

Conclusiones

De acuerdo con los resultados se determina que la fuente de carbono es un factor muy influyente en la producción de enzimas ligninolíticas, dado que dependiendo de la naturaleza de la fuente de carbono se producirán las enzimas necesarias para la asimilación del sustrato. Al igual que esta es un factor influyente en el número de isoformas que se formen con distinto peso molecular. De igual manera se decreta que existe una mayor actividad enzimática en sustratos con menor grado de cristalinidad (carboximetilcelulosa) y una menor actividad enzimática en aquellos sustratos con mayor grado de cristalinidad (avicel), esto es debido a que la cristalinidad afecta la accesibilidad de las enzimas hacia el sustrato y por lo tanto al aumentar la cristalinidad la celulosa comienza a ser resistente a la hidrólisis.

En las cepas *Pleurotus djamor* existen una diferencia en la productividad enzimática entre las cepas de la misma especie, esto puede estar relacionado a las condiciones ambientales en donde las cepas fueron aisladas o a la existencia de subespecies.

En los resultados de productividad enzimática algunas cepas silvestres presentaron una mayor productividad que la cepa *Pleurotus pulmonarius* la cual es una cepa comercial, estas cepas posiblemente presentan una ventaja fisiológica que podría ser aprovechada.

Referencias

1. Batista-García, R. A.; Sutton, T.; Jackson, S. A.; Tovar-Herrera, O. E.; Balcázar-López, E.; Sánchez-Carbente, M. R.; Sánchez-Reyes, A.; Dobson, A. and Folch-Mallol, J. L. (2017). Characterization of lignocellulolytic activities from fungi isolated from the deep-sea sponge *Stelletta normani*. *Plos one*. **(12)** 5-6.
2. Corona, J. E. (2017). Identificación molecular y caracterización enzimática de especies silvestres del género *Pleurotus*. Tesis para obtener el grado de: maestro en horticultura tropical. Universidad Veracruzana Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. **(48)** 29-40.
3. Cuervo, L.; Folch, J. L. y Quiroz, R. E. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *BioTecnología*. **(13)** 11-13.
4. Elisashvili, V.; Penninckx, M.; Kachlishvili, E.; Asatiani, M. and Kvesitadze, G. (2006). Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. *Enzyme and Microbial Technology*. **(38)** 998-1004.
5. Fagner, D.; Zomorodi, M.; Kües, U. and Majcherzyk, A. (2009). Optimized protocol for the 2-DE of extracellular proteins from higher basidiomycetes inhabiting lignocellulose. *Electrophoresis*. **(30)** 2431-2441.
6. Ghose (1987). Measurement of Cellulase Activities. *Pure & Appl. Chem.* **(59)** 257-268.
7. Gutiérrez, R. I.; Moreno, S. N. y Dolly, M. (2015). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*. **(32)** 1-12.
8. Guzmán, C. A.; Zambrano, P. D.; Rondón, A.; Laurencio, S. M.; Pérez, Q. M.; Aguilar, R. y Rivera, F. R. (2014). Aislamiento, selección y caracterización de hongos celulolíticos a partir de muestras de suelo en Manabí-Ecuador. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo*. **(46)** 177-189.
9. Li, X. and Yu, H-Y. (2013). Characterization of a halostable endoglucanase with organic solvent-tolerant property from *Haloarcula* sp. G10. *International Journal of Biological Macromolecules*. **(62)** 101-106.
10. Mahajan, S. and Master, E. R. (2010). Proteomic characterization of lignocellulose-degrading enzymes secreted by *Phanerochaete carnosae* grown on spruce and microcrystalline cellulose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **(86)** 1903-1914.
11. Meddeb-Mouelhi, F.; Moisan, J. K. and Beauregard, M. (2015). A comparison of plate assay methods for detecting extracellular cellulase and xylanase activity. *Enzyme and Microbial Technology*. **(66)** 16-19.
12. Mikiashvili, N.; Wasser, S. P.; Nevo, E. and Elisashvili, V. (2006). Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. **(22)** 999-1002.
13. Nargotra, P.; Vaid, S. and Bajaj, B. B. (2016). Cellulase Production from *Bacillus subtilis* SV1 and Its Application Potential for Saccharification of Ionic Liquid Pretreated Pine Needle Biomass under One Pot Consolidated Bioprocess. *Fermentation*. **(2)** 1-19.
14. Ortiz, M. L. y Uribe, V. D. (2011). Nuevo método para la cuantificación de la actividad endoglucanasa basado en el complejo celulosa-rojo congo. *Orinoquia*. **(15)** 7-15.
15. Rojas, V. G. (2010). Producción de enzimas lignolíticas por hongos de pudrición blanca aislados en nuevo león. Tesis para obtener el grado de: DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en BIOTECNOLOGÍA. Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Ciencias Biológicas.
16. Velázquez-Cedeño, M. A.; Mata, G. and Savoie, J. M. (2001). Waste-reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulp: changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. **(18)** 201-207.
17. Wang, W.; Yan, L.; Cui Z.; Gao, Y.; Wang, Y. and Jing, R. (2011). Characterization of a microbial consortium capable of degrading lignocellulose. *Bioresource Technology*. **(102)** 1.
18. Xiao, Z.; Storms, R. and Tsang A. 2005. Microplate-based carboxymethylcellulose assay for endoglucanase activity. *Analytical Biochemistry*, **(342)** 176-178.