HONGOS EXTREMÓFILOS AISLADOS DE NIXTAMAL CON POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

*Alejandra García-Pérez[1], Yadeneyro de la Cruz Elizondo[1], Benito Hernández-Castellanos[1], Oscar Carmona-Hernández[1] y José Armando Lozada-García[1]**
[1] Facultad de Biología Xalapa, Universidad Veracruzana, Circuito Universitario Gonzalo Aguirre Beltrán s/n. Col. Zona Universitaria, Xalapa, Veracruz, México C. P, 91097; ydelacruz@uv.mx, benihernandez@uv.mx, ocarmona@uv.mx, aloza-da@uv.mx

Área de participación: **Ingeniería Química**

Resumen

Las enzimas producidas por organismos extremófilos son un tema relevante para los biotecnólogos; por que poseen actividad hidrolítica y son útiles para la ingeniería industrial, agrícola y alimentaria. Muchos de estos organismos se encuentran en ambientes extremos, como es el caso del nixtamal que por su naturaleza se considera un ambiente alcalino extremo. En este sentido se aislaron hongos extremófilos de nixtamal y nejayote. Se evaluó la actividad enzimática y antagónica ante hongos mesófilos. Se colectaron muestras de nixtamal en comunidades rurales de Perote, Veracruz. Se aislaron diferentes morfotipos en medio Agar Papa Destroxa a partir de granos de maíz y nejayote. Se determinó la actividad proteolítica, amilolítica, celulolítica, lipídica y la capacidad antagónica contra *Trichoderma harzianum, Fusarium oxysporum, F. solani, Aspergillus niger* y *Colletotrichum gloeosporioides*. De las ocho cepas aisladas, FBX008 presentó mayor actividad antagónica contra las especies confrontadas y FBX004 fue activa contra *T. harzianum* y *F. oxysporum*.

***Palabras clave**: actividad enzimática, hongos extremófilos, antagonismo.*

Abstract

Enzymes produced by extremophilic organisms are a relevant topic for biotechnologists because they possess hydrolytic activity and are useful for industrial, agricultural, and food engineering. Many of these organisms thrive in extreme environments, such as nixtamal, which by its nature is an extreme alkaline environment. In this regard, extremophilic fungi were isolated from nixtamal and nejayote. Their enzymatic and antagonistic activity against mesophilic fungi was evaluated. Samples of nixtamal were collected from rural communities in Perote, Veracruz. Different morphotypes were isolated on Destroxa Potato Dextrose Agar from corn grains and nejayote. Proteolytic, amylolytic, cellulolytic, lipolytic activities, and antagonistic capacity against *Trichoderma harzianum, Fusarium oxysporum, F. solani, Aspergillus niger* and *Colletotrichum gloeosporioides* were determined. Among the eight isolated strains, FBX008 exhibited the highest antagonistic activity against the tested species, and FBX004 was active against *T. harzianum* and *F. oxysporum*.

***Key words:** enzymatic activity, extremophilic fungi.*

Introducción

Recientemente, la industria se ha valido del uso de microorganismos y sus biocatalizadores para aumentar la eficiencia en sus procesos. La mayoría de estos son mesófilos, es decir, que crecen en

condiciones con pH neutros o ligeramente ácidos y temperaturas igualmente moderadas (25 - 45°C). Sin embargo, el uso de enzimas producidas por estos microorganismos está restringido debido a su limitada estabilidad y poca tolerancia a condiciones extremas de temperatura, pH, presión y salinidad [1], provocando que su proliferación y desarrollo sea fácilmente corrompida por el crecimiento de otros organismos indeseados dando pie a disrupciones por contaminación.

Las enzimas que éstos producen no suelen ser las más adecuadas para las condiciones en procesos industriales, ya que no tienen la estabilidad necesaria requerida y son fácilmente desnaturalizadas. Lo cual se traduce como bajas en la cantidad y calidad de productos controlados de tipo alimenticio, farmacéutico o producción de energía [2-3].

En este sentido, se vuelve destacable el uso de biocatalizadores aislados de organismos de ambientes considerados extremófilos, ya que las enzimas que éstos producen tienen ventajas sobre las extraídas de organismos mesófilos por su mayor capacidad de soportar condiciones presentes en los procesos industriales [4], además de soportar condiciones no moderadas, el tener una mayor resistencia frente a diversos agentes químicos, una vida media más prolongada, la viscosidad de los medios de reacción es menor cuanto más se eleva la temperatura, aumenta la solubilidad de sustratos y productos, la posibilidad de reducir la necesidad de refrigeración y una menor contaminación por estar a temperaturas muy altas. Lo anterior se debe al desarrollo de fuerzas adaptativas que les confieren la capacidad de sobrevivir en ambientes “inhóspitos”, es así como proliferan a altas temperaturas, con ingentes cantidades de sal y/o bajo exposición de pH extremos [3-6], siendo notoria la diferencia con los mesófilos, los cuales no soportan vivir en dichas condiciones.

Al decir que un organismo es extremófilo, nos referimos a que es capaz de vivir en una sola condición extrema o también a una combinación de diferentes condiciones [7]. Lo anterior les adjudica una bioquímica peculiar con gran potencial de búsqueda de nuevas fuentes biotecnológicas con fines industriales [3-6]. Las extremoenzimas producidas por estos organismos que recientemente se han robado el foco de atención de los biotecnólogos son las de carácter hidrolítico, tales como celulasas, proteasas, lipasas y amilasas, puesto que han demostrado ser enzimas útiles para la fabricación de diversos productos útiles para industria. Éstos tienen ventajas sobre organismos mesófilos en procesos industriales y biotecnológicos ya que producen enzimas con mayor estabilidad en condiciones extremas, por lo que están siendo cada vez más estudiadas como biocatalizadores.

Particularmente, los hongos de tipo filamentosos llegan a ser competitivos en la ingeniería agrícola e industrial por su gran potencial de secreción de enzimas hidrolíticas, así como por su tolerancia a baja actividad del agua y su resistencia a condiciones de alta presión osmótica, sin mencionar su bajo costo de producción [8].

Una vez que definimos el carácter de organismos que pueden crecer en ambientes extremos, podemos hablar del nixtamal, el cual es una preparación tradicionalmente usada en América para el consumo de maíz, tanto, que en comunidades rurales se sigue preparando, siguiendo fielmente los métodos tradicionales. La nixtamalización consiste en someter el grano de maíz a altas temperaturas para su cocción, con la adición de cal que propicia un medio alcalino al preparado [6-9]. Así, los hongos que en este medio pudieran encontrarse posterior a su preparación, pudieran tener características de ser de tipo extremófilo. Algunos de ellos pueden ser especies de hongos filamentosos capaces de inhibir el crecimiento de hongos mesófilos [10-14]. Por dichas razones, en el presente trabajo se valió del nixtamal como una fuente poco explorada para la búsqueda de hongos productores de enzimas de interés biotecnológico, con actividad proteolítica, amilolítica, celulolítica, lipídica y actividad antagonica contra *Trichoderma harzianum, Fusarium oxysporum, F. solani, Aspergillus niger* y *Colletotrichum gloeosporioides*.

Metodología

Aislamiento y purificación de cepas fúngicas

Se visitaron las comunidades rurales del “El Conejo” y “Los Pescados” del municipio de Perote, Veracruz, donde actualmente se sigue realizando el proceso de nixtamalización de manera tradicional y cotidiana para el consumo familiar, con el fin de obtener la información necesaria para conocer cómo se elabora el nixtamal; ambiente que estaría fungiendo como nuestra fuente primaria de hongos filamentosos extremófilos.

Para el aislamiento de hongos extremófilos se colectaron muestras en condiciones asépticas de nixtamal y nejayote, las cuales fueron trasladadas al laboratorio de Biotecnología y Productos Naturales de la Facultad de Biología, Región Xalapa, Veracruz, donde se incubaron a 27 ° C hasta que hubo presencia de micelio, el cual fue sembrado en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) (BD Bioxon©) con antibiótico (Ampicilina), todo lo anterior se hizo por triplicado.

Pruebas hidrolíticas de hongos extremófilos aislados

La actividad proteolítica, amilolítica, celulolítica y lipídica se realizaron conforme se muestran en la Tabla 1, con algunas modificaciones [15]. Estas pruebas se hicieron en medio triptona de agar (10 g triptona (BD Bioxon©), 5 g NaCl (Mayer©), 12 g agar (BD Bioxon©) + 10 g de celulosa/almidón/leche baja en grasas/azúcares/ aceite minetal). Se colocó un inóculo del micelio sobre el centro de las placas de agar con tres repeticiones por cada prueba. Consecutivamente se incubaron a 27 °C durante 24 horas, para verificar la actividad enzimática, la presencia de halo se consideró positiva (+) y la ausencia de este se consideró negativa (-), cada ensayo se realizó por triplicado.

Tabla 1. Pruebas utilizadas para evaluar la actividad enzimática.

Actividad enzimática estudiada	Sustrato	Revelador/Indicador
Amilolítica	Almidón (Meyer©)	Lugol
Proteolítica	Leche baja en grasas y azúcares (Alpura ©)	Halo
Lipolítica	Aceite mineral (Sigma Aldrich©)	Halo
Celulolítica	Celulosa	Rojo Congo

Antagonismos de cepas extremófilas contra hongos mesófilos

Se realizaron confrontaciones *in vitro* contra cinco cepas de hongos que crecen en condiciones mesófilas: *Trichoderma harzianum, Fusarium oxysporum, Fusarium solani, Aspergillus niger* y *Colletotrichum gloeosporioides*, para evaluar su capacidad antagónica, siguiendo la metodología de Cubilla-Ríos y colaboradores [16]; cada prueba se realizó por triplicado.

Las pruebas se realizaron en placas de PDA, se tomaron discos de 0.5 cm de diámetro del micelio correspondiente a cada cepa fúngica, a una distancia de 7.5 cm enfrentando cada cepa correspondiente. Se incubaron a 27 °C durante 72 horas para evaluar sus porcentajes de inhibición cada prueba se realizó por triplicado. Para determinar dicho porcentaje se utilizó la Ecuación 1:

$$\%I=((ABCc-ABCe))/ABCc \times 100$$

Ecuación 1. Porcentaje de Inhibición. Donde, %I es el porcentaje de inhibición. ABCe es el área del crecimiento del micelio enfrentado al antagonista. ABCc es el área del crecimiento del control no enfrentado con el antagonista.

Análisis de datos

Para el análisis de los resultados se realizó una prueba de Kruskall Wallis de comparaciones múltiples, seguida de una prueba post hoc de Dunn en el software SPSS 26. Se consideró actividad antagónica positiva cuando el porcentaje de inhibición fue igual o mayor al 60%.

Resultados y discusión

Cepas fúngicas extremófilas aisladas

Se aislaron ocho morfotipos procedentes del nixtamal y de nejayote, que permanecen bajo resguardo en el Laboratorio de Biotecnología y Productos Naturales de la Facultad de Biología, Xalapa de la Universidad Veracruzana y se denominaron con las siglas FBX001, FBX003, FBX004, FBX005, FBX006, FBX007, FBX008 y FBX011.

Pruebas de actividad enzimática

La actividad enzimática amilolítica fue la predominante en todas las cepas, seguida de la proteolítica y celulolítica (Tabla 2). Las cepas FBX001 y FBX005 fueron las que presentaron la menos tres de las cuatro actividades enzimáticas analizadas. De la cepa FBX-008 no se obtuvieron resultados ya que no proliferó en el medio utilizado para la evaluación enzimática.

Tabla 2. Actividad enzimática para hongos extremófilos aislados del nixtamal.

Cepa	Amilolítica	Proteolítica	Lipolítica	Celulolítica
FBX001	+	+	-	+
FBX003	+	-	-	+
FBX004	+	-	-	+
FBX005	+	+	-	+
FBX006	+	+	-	-
FBX007	+	+	-	-
FBX011	+	+	-	-

Actividad enzimática presente (+), actividad enzimática ausente (-)

La actividad lipolítica estuvo ausente en todas las cepas estudiadas. La razón de esto puede deberse a que el medio original de estas cepas es el nixtamal y/o nejayote, donde el almidón presente en el maíz es su principal fuente de energía. Lo cual puede ser parte de diferentes estrategias adaptativas, para aprovechar la mayor cantidad de carbono como fuente de energía, seguido de otras biomoléculas presentes en el maíz como las proteínas y la celulosa, en contraste con los lípidos, que son menos abundantes en el nixtamal [17]. Así mismo, puede ser que el aceite mineral sea de mayor dificultad para degradar comparado con el aceite vegetal.

Es así como la producción de enzimas hidrolíticas en hongos es influida por factores clave como la disponibilidad nutricional y las condiciones ambientales entorno a su medio. De manera particular esto ha sido caracterizado en hongos filamentosos que a diferencia de los aquí presentados cuyo crecimiento se da en un medio rico predominantemente de almidón, viven en entornos ricos en material vegetal. Es el caso de los hongos endófitos de las palmeras *Euterpe precatoria*, cuya constitución principal de sus hojas es la celulosa y el almidón [18]. Por lo que la producción enzimática de los hongos es compleja y está configurada por diversos factores como el pH, temperatura y condiciones ambientales específicas, así como por el carácter de las biomoléculas energéticas del medio en el que proliferan.

En la industria, los hongos son ampliamente usados por sus enzimas como potenciadores de productividad, tal es el caso de *Aspergillus oryzae* y *A. niger* aislados de cultivos ricos en almidón como lo son los de trigo, arroz, papa, y maíz. Dichas enzimas se han usado ampliamente en la industria para la producción enzimática de amilasas útiles en reacciones de sacarificación. Particularmente en la obtención de glucosa a partir del almidón en la industria alimentaria, método que actualmente provee el 90% de la producción del jarabe de fructosa [19]. No obstante, a pesar de que las amilasas de estas cepas son capaces de soportar relativamente altas temperaturas de hasta 60 °C, se ha manifestado la necesidad de amilasas con mayor termoestabilidad para mejorar la capacidad productiva disminuyendo los tiempos de reemplazo de las enzimas por su rápida desnaturalización.

Es en dicha área donde las cepas aisladas de nixtamal podrían resultar útiles en la obtención de un mejor rendimiento en los procesos de sacarificación, usando específicamente sus enzimas de tipo amilolíticas.

También se ha señalado la importancia de las enzimas amilasas producidas por los hongos mesófilos *C. gloeosporioides* cultivados en medio de arroz semi sólido en fermentación. Para lo cual las cepas aisladas del nixtamal en este trabajo serían una mejor opción puesto que son termoestables, soportando temperaturas de hasta 100 °C por las características de su medio de origen, el nixtamal. En contraste con las amilasas producidas de *C. gloeosporioides*, cuyas condiciones óptimas de producción son de 30 °C. Dichas situaciones son un motor de búsqueda de enzimas con potencial industrial, cuya termoestabilidad es el principal factor de importancia. Además, en el contexto mexicano, resultaría más accesible el aislamiento de los hongos del nixtamal, producto étnico, en comparación con el medio de fermentación de arroz para *C. gloeosporioides* [20].

Pruebas de antagonismo in vitro

Se observó que la cepa FBX008 logró antagonizar con una tasa mayor al 60% a cuatro de los cinco hongos mesófilos (Figura 1). *C. geosporoides* y *A. niger* fueron las cepas más sensibles ante todos los

morfotipos aislados. FBX001 y FBX007 fueron los morfotipos que presentaron mayor antagonismo contra *C. geosporoides*, en más del 50%.

La cepa FBX008 presentó mayor actividad contra *A. niger*, con un porcentaje de inhibición superior al 60%. *F. solani* fue la cepa menos sensible a todos los morfotipos aislados, excepto a FBX008, que la inhibió con un porcentaje mayor al 50. FBX004 y FBX008 redujeron entre el 65% y 80% el crecimiento de *F. oxysporum* y *T. harzianum* respectivamente; mientras que el resto de las cepas presentaron un porcentaje de inhibición inferior al 30%, pata todos los casos se encontraron diferencias significativas.

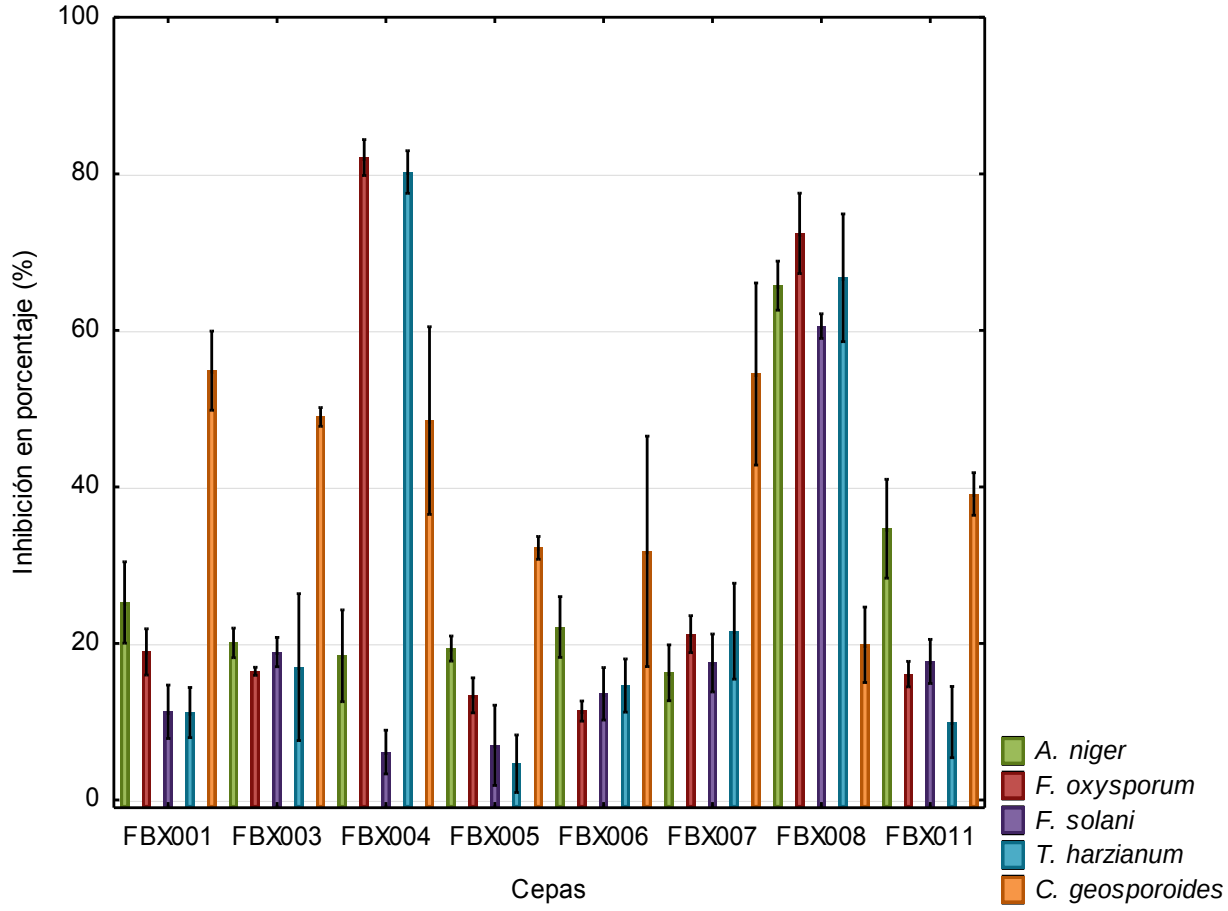


Figura 1. Antagonismo de los morfotipos extremófilos aislados contra hongos mesófilos (KW=P<0.05)

En la mayoría de los reportes se registra que algunos géneros de hongos son antagonistas a otros hongos, como ejemplo está el género *Trichoderma*, que es usado como agente antagonista para *Fusarium* spp [21]. Dicho ejemplo se llevó a cabo con dos especies de hongos mesófilos, mientras que en este estudio se evaluó el efecto antagonista de dos hongos extremófilo contra *F. oxysporum*, resultando las cepas FBX004 y FBX008 la de mayor actividad antagónica, lo cual sugiere que producen enzimas y metabolitos con interés biotecnológico y con un posible uso industrial. Caso parecido ocurrío con las cepas FBX007, FBX008 y FBX011 que fueron antagonistas contra *C. gloeosporioides*.

Esta inhibición de crecimiento a ciertos hongos mesófilos, aunado a la producción de ciertas enzimas hidrolíticas es particularmente destacable considerando que los hongos filamentosos comerciales más importantes por su amplia producción de celulasas son del género *Trichoderma*, particularmente de la especie *Trichoderma reesei* ha sido considerada por largo tiempo como una opción para degradar celulosa. No obstante, a pesar de este rendimiento, su condición de hongos mesófilos con crecimiento óptimo de 25-20 °C lo limita a realizar los procesos en condiciones de fácil contaminación, por lo que ha provocado la valoración de nuevas alternativas con el mismo rendimiento celulolítico adicionado de una mayor resistencia a condiciones de procesamiento industrial [22].

Entre ellos se han sugerido algunas especies de *Penicillium* como *P. verruculosum* y *P. funiculosum* que soportan temperaturas de hasta 50°C [23]. Es en este sentido, sugerimos como una posible alternativa, las cepas extremófilas con actividad enzimática hidrolítica de tipo celulasa en las cepas FBX001, FB003, FBX004 y FBX005 extraídas del nixtamal preparado en las comunidades rurales de Perote, Ver. Particularmente destacando FBX004, que inhibió de manera importante el crecimiento de *Trichoderma harzianum* [24].

Trabajo a futuro

Realizar la identificación molecular de las cepas, así como una caracterización química más amplia. En el mismo sentido se propone un estudio en campo para evaluar el antagonismo contra hongos patógenos de cultivos de importancia, así como la evaluación de su capacidad para degradar carbohidratos en la industria alimentaria.

Conclusiones

Se aislaron ocho cepas de las comunidades de Perote, Veracruz, provenientes del proceso de nixtamal, considerado un ambiente extremófilo por su proceso de elaboración. Las cepas FBX001 y FBX005 presentaron tres de cuatro tipos de actividades enzimáticas estudiadas (amilolítica, proteolítica y celulolítica), mientras que las demás sólo presentaron dos tipos. Ninguna presentó actividad lipolítica.

En las pruebas de antagonismo, sólo dos cepas obtuvieron un mayor crecimiento ante hongos mesófilos: La cepa extremófila FBX004 vs *F. oxysporum* y *T. harzianum*. y la cepa FBX008 vs *A. niger, F. Oxysporum, F. solani* y *T. harzianum*. Siendo FBX004 la que obtuvo los mayores porcentajes de inhibición y por ende de crecimiento, y FBX008 que inhibió a tres de cinco hongos mesófilos. Dado que las cepas fueron aisladas de un medio extremófilo, se considera que las enzimas que estos hongos producen pueden ser una fuente de interés y uso industrial.

Referencias

[1] A. G. González y R. P. y. Terrón, “Importance of extremophilic microorganisms in biogeochemical cycles”, *GSC Adv. Res. Rev.*, vol. 9, núm. 1, pp. 082–093, 2021.

[2] A. K. Wani et al., “Contribution of yeast and its biomass for the preparation of industrially essential materials: A boon to circular economy”, Bioresour. *Technol. Rep.*, vol. 23, núm. 101508, p. 101508, 2023.

[3] G.-Q. Chen y X.-R. Jiang, “Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria”, Curr. Opin. Biotechnol., vol. 50, pp. 94–100, 2018.

[4] C. Schröder, C. Burkhardt, y G. Antranikian, “What we learn from extremophiles”, *ChemTexts,* vol. 6, núm. 1, 2020.

[5] R. S. Thombre, P. A. Vaishampayan, y F. Gomez, “Applications of extremophiles in astrobiology”, en *Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles*, Elsevier, 2020, pp. 89–104.

[6]R. M. Oliart-Ros, Á. Manresa-Presas, y M. G. Sánchez-Otero, “Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico”, *CienciaUAT*, vol. 11, núm. 1, pp. 79–90, 2016.

[7] M. Blackwell, “The Fungi: 1, 2, 3 … 5.1 million species?”, *Am. J. Bot.,* vol. 98, núm. 3, pp. 426–438, 2011.

[8] I. Gutiérrez-Rojas, N. Moreno-Sarmiento, y D. Montoya, “Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos”, *Rev. Iberoam.* Micol., vol. 32, núm. 1, pp. 1–12, 2015.

[9] M. Ibrar, M. W. Ullah, S. Manan, U. Farooq, M. Rafiq, y F. Hasan, “Fungi from the extremes of life: an untapped treasure for bioactive compounds”, *Appl. Microbiol. Biotechnol*., vol. 104, núm. 7, pp. 2777–2801, 2020.

[10] J. J. Coleman, “The Fusarium solani species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance”, *Mol. Plant Pathol*., vol. 17, núm. 2, pp. 146–158, 2016.

[11] M. I. Infanzón-Rodríguez, J. A. Ragazzo-Sánchez, S. del Moral, M. Calderón-Santoyo, y M. G. Aguilar-Uscanga, “Production and characterization of an enzyme extract with cellulase activity produced by an indigenous strain of *Fusarium verticillioides* ITV03 using sweet sorghum bagasse”, *Biotechnol. Lett*., vol. 42, núm. 11, pp. 2271–2283, 2020.

[12] S. S. Saha, S. R. Saha, y A. K. Sen, "Colletotrichum gloeosporioides: An anthracnose causing pathogen of fruits and vegetables," *Biotech. Asia*, vol. 12, no. 2, pp. 316-323, 2019.

[13] H. Allaga et al., “Members of the Trichoderma harzianum species complex with mushroom pathogenic potential”, *Agronomy (Basel)*, vol. 11, núm. 12, p. 2434, 2021.

[14] G. Leon-Revelo, M. C. Cujilema-Quitio, L. Baryolo, E. Rosero Delgado, J. Córdova, y L. B. Ramos-Sánchez, “Determinación de la temperatura óptima para la producción de celulasas con *Aspergillus niger* en fermentación sólida”, *Centro Azúcar*, vol. 45, núm. 3, pp. 1–13, ene. 2018.

[15] M. Andlar, T. Rezić, N. Marđetko, D. Kracher, R. Ludwig, y B. Šantek, “Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation”, *Eng. Life Sci.,* vol. 18, núm. 11, pp. 768–778, 2018.

[16] A. A. Cubilla-Ríos, D. D. Ruíz-Díaz-Mendoza, M. C. Romero-Rodríguez, M. E. Flores-Giubi, y J. E. Barúa-Chamorro, “Antibiosis de proteínas y metabolitos en especies de *Trichoderma* contra aislamientos paraguayos de *Macrophomina phaseolina*”, *Agronomía Mesoamericana*, vol. 30, núm. 1, pp. 63–77, 2019.

[17] O. Paredez-López, F. Guevara-Lara, y L. A. Bello-Pérez, “La nixtamalización y el valor nutritivo del maíz”, *Ciencias*, vol. 92, pp. 60–70, 2009.

[18] B. N. Batista, R. R. Matias, R. L. e. Oliveira, y P. M. Albuquerque, “Hydrolytic enzyme production from açai palm (*Euterpe precatoria*) endophytic fungi and characterization of the amylolytic and cellulolytic extracts”, *World J. Microbiol. Biotechnol*., vol. 38, núm. 2, 2022.

[19] A. G. Patil et al., “Fungal amylases and their industrial applications”, en *Fungal Biology, Cham:* Springer International Publishing, 2021, pp. 407–434.

[20] S. B. Onofre, “Amylolytic enzymes produced by the fungus Colletotrichum gloeosporioides in rice semi-solid fermentation”, *J. Yeast Fungal Res*., vol. 2, núm. 3, 2011.

[21] R. Cabrera, S. Palafox-Félix, y I. Valenzuela Quintanar, “Estrategias para el control del hongo fitopatógeno Fusarium en el sector agrícola: del control químico al control biológico”, *Frontera Biotecnológica*, vol. 12, núm. 1, pp. 19–26, 2019.

[22] F. Zhang et al., “Regulation and production of lignocellulolytic enzymes from Trichoderma reesei for biofuels production”, en *Advances in Bioenergy*, Elsevier, 2019, pp. 79–119.

[23] K. K. Manathunga, N. W. Gunasekara, M. K. Meegahakumbura, P. B. Ratnaweera, T. K. Faraj, y D. N. Wanasinghe, “Exploring endophytic fungi as natural antagonists against fungal pathogens of food crops”, *J. Fungi (Basel)*, vol. 10, núm. 9, p. 606, 2024

[24] J. A. Ferreira Filho, M. A. C. Horta, L. L. Beloti, C. A. dos Santos, y A. P. de Souza, “Carbohydrate-active enzymes in *Trichoderma harzianum*: a bioinformatic analysis bioprospecting for key enzymes for the biofuels industry”, *BMC Genomics*, vol. 18, núm. 1, 2017.