



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

## FACULTAD DE CIENCIAS

**“Producción del sistema celulolítico completo: celulasas, pectinasas y xilanasas de *Aureobasidium sp. CH-Y-TE18* y su aplicación en la Sacarificación de Bagacillo de caña de azúcar.”**

### TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)**

**PRESENTA**

**MARÍA ENRIQUETA OCHOA GASCA**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS HUITRÓN VARGAS  
Y CO- DIRECTOR: DR. GUILLERMO AGUILAR OSORIO**

México D. F.

Abril, 2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

## FACULTAD DE CIENCIAS

**“Producción del sistema celulolítico completo:  
celulasas, pectinasas y xilanasas de  
*Aureobasidium sp. CH-Y-TE18* y su aplicación en la  
Sacarificación de Bagacillo de caña de azúcar.”**

## TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)**

**P R E S E N T A**

**MARÍA ENRIQUETA OCHOA GASCA**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS HUITRÓN VARGAS  
Y CO- DIRECTOR: DR. GUILLERMO AGUILAR OSORIO**

México D. F.

Abril, 2012



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/136/12

ASUNTO: Asignación de Jurado

**DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ**  
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E

At'n: DR. MANUEL ENRIQUE VÁZQUEZ VALDÉS

Comunico a usted que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas ha asignado al(a) **M. EN C. MARÍA ENRIQUETA OCHOA GASCA**, el jurado para presentar Examen de Grado de DOCTOR(A) EN CIENCIAS (BIOLOGÍA).

CARGO	GRADO	NOMBRE COMPLETO
PRESIDENTE	DRA.	LUISA ALVARINA ALBA LOIS
VOCAL	DR.	JOAQUÍN CIFUENTES BLANCO
SECRETARIO	DR.	GUILLERMO AGUILAR OSORIO
SUPLENTE	DR.	LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
SUPLENTE	DRA.	BLANCA SUSANA CRUZ ULLOA

El trabajo aprobado como tesis es:

**"Producción del sistema celulolítico completo: celulasas, pectinasas y xilanasas de *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18 y su aplicación en la Sacarificación de Bagacillo de caña de azúcar"**

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 13 de marzo de 2012  
COORDINADORA DEL PROGRAMA

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA

MCAA/ASR/mnm\*



## **Agradecimientos**

- Primeramente al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.
- Por la BECA otorgada para realizar la tesis de doctorado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas por la Escuela Nacional Preparatoria a través de la Dirección General de Asuntos del personal Académico por dos años y hace años.

*• Al Dr. Teófilo Herrera mi primer director y profesor a lo largo de mi desempeño profesional.*

*• al Dr. Carlos Huitrón Vargas quien en su tiempo me albergó en su laboratorio.*

*• Especialmente al Co-director Dr. Guillermo Aguilar Osorio, que gracias a su asesoría y con la humanidad que lo caracteriza y su tiempo, rescató este trabajo ampliándolo y haciendo posible que se concluyera esta tesis después de todos estos años.*

*• A los sinodales Luisa A. Alba Lois, Joaquín Cifuentes Blanco, Felipe Jiménez García, y Susana Cruz Ulloa por su apoyo y por su tiempo que me han dedicado.*

### Agradecimientos personales

A MI HIJO PACO, QUIEN SIEMPRE ME HA APOYADO Y POR QUIEN HE REALIZADO LOCURAS COMO ESTA.

A MIS ANGELITOS DE LA GUARDA BLANCA TREJO, NORMA GARCIA, ROSAURA RUIZ, QUIENES EN CADA ETAPA ME DIERON LA MANO AMIGA, SIN CUYA AYUDA SEGUIRÍA EN EL LIMBO.

A LOS COMPAÑEROS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUE GRACIAS A SU APOYO LOGRÉ CONCLUIR.

A MIS HERMANOS MELA, SUSY, JOJO Y ARTURO SACÁNDOME DEL APURO CONTINUAMENTE, MOSTRÁNDOME SU SOLIDARIDAD A CADA MOMENTO Y SU INMENSO CARIÑO.

A MIS ALUMNOS POR MUCHOS AÑOS DE QUIEN SIEMPRE APRENDO ALGO NUEVO.

A MIS AMIGAS ELSA, GABY, LIGIA, LOLITA, LUCHA, POR SU APOYO.

A TODOS LOS QUE LEAN ESTE ESCRITO MIL GRACIAS POR SU TIEMPO.

## Resumen

Actualmente un problema central para la Biotecnología lo constituye el desarrollo de procesos que hidrolicen eficientemente la gran cantidad de desechos agroindustriales que se producen anualmente en el mundo. A partir de estos desechos, constituidos por macromoléculas de difícil degradación a unidades químicas de fácil digestibilidad para ser empleados en procesos de producción de moléculas de alto valor agregado como las proteínas y en la producción de bioenergéticos como el bioetanol.

En la naturaleza se presentan organismos que degradan una gran variedad de compuestos como la celulosa y se han adaptado a crecer en condiciones muy diversas. De entre estos microorganismos se pueden encontrar cepas con capacidad para crecer en celulosa y producir enzimas que la degraden, tal es el caso de *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18, es un hongo celulolítico verdadero aislado de suelo rico en desechos celulósicos y que tiene potencial práctico.

El bagacillo de caña es un desecho muy abundante en México por lo que buscar alternativas de utilización de este material es una necesidad.

En este trabajo se ha estudiado el crecimiento y la producción de enzimas celulolíticas de *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18 sobre bagacillo de caña de azúcar y la utilización de las enzimas producidas en la sacarificación de bagacillo de caña. También se analizó si esta cepa podía producir otras enzimas con potencial para la degradación de otros polisacáridos presentes en el bagacillo de caña y que pudieran favorecer una mayor conversión de polisacáridos en azúcares solubles.

En la etapa de producción se analizaron el efecto del tamaño inóculo, tipo y concentración de fuente de carbono y la sustitución de reactivos de grado analítico con reactivo de grado industrial. Nuestros resultados muestran que *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18 puede crecer en celulosa microcristalina y bagacillo de caña y producir celulasas. Así mismo, la cepa produce xilanasas, pectinasas y beta glucosidasas.

En la segunda etapa, se procedió a la evaluación de la mezcla de enzimas producidas por *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18 en la sacarificación del bagacillo de caña de azúcar. Factores estudiados fueron la concentración de enzima, concentración de bagacillo, efecto de la esterilización, tamaño de partícula, pH, temperatura y agitación. Se logró obtener una concentración de azúcares reductores de alrededor de 20 a 22 g/L con una conversión del 50 al 55%.

## Abstract

Currently, a central problem for Biotechnology is the development of processes for efficient hydrolysis of the large amounts of agro-industrial wastes produced annually worldwide. From these waste macromolecules consisting of difficult degradation polymeric substances, it could be obtained chemical units easily digestible for use in production processes of high added value molecules like proteins and the production of bioenergy and bioethanol.

In nature, organisms are degrading a variety of compounds such as cellulose and have adapted to grow in very diverse conditions. Among these microorganisms can be found in strains capable to grow on cellulose and produce enzymes that degrade such polymer, as is the case of *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18. This is a true cellulolytic fungus isolated from soil rich in cellulosic wastes with an interesting practical potential.

The sugarcane bagasse is a waste product abundant in Mexico for what alternatives to use of this material is a necessity.

In this work we have studied the growth and production of cellulolytic enzymes from *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18 on sugar cane bagasse and the use of enzymes produced in the saccharification of sugarcane bagasse. We also examined whether this strain could produce other enzymes with potential for degradation of other polysaccharides present in the sugar cane bagasse and could contribute to increased conversion of polysaccharides into soluble sugars.

In the production stage it was analyzed the effect of inoculum size, type and concentration of carbon source and the replacement of analytical grade reagents with industrial ones. Our results show that *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18 can grow on microcrystalline cellulose and sugar cane bagasse and produce cellulases. Also, the strain produces xylanases, pectinases, and beta-glucosidase.

In the second step, we proceeded to the evaluation of the mixture of enzymes produced by *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18 in the saccharification of sugarcane bagasse. Factors studied were the concentration of enzyme, concentration of bagasse, the effect of sterilization, particle size, pH, temperature and agitation. It was possible to obtain a reducing sugar concentration of about 20 to 22 g/L with a conversion of 50 to 55%.

## Índice

### Contenido

Lista de figuras y cuadros .....	11
I-INTRODUCCIÓN GENERAL.....	13
I.1.-Estructura de la pared celular de plantas.....	15
I.2.Desechos celulósicos.-.....	19
I.3.- Producción de bagazo de caña de azúcar en México. ....	21
I.4.-Degradación de celulosa por celulasas.....	23
I.4.a.-Degradación de celulosa.- Pretratamientos físicos, químico, biológico y mixto.....	23
I.5.-Hidrólisis enzimática. ....	31
I.6.- Hidrólisis enzimática de la celulosa .....	36
I.7.-Mejoramiento de la producción de celulasas y selección: .....	39
1.- Diseño racional.....	39
2.- Evolución dirigida.....	42
I.8.- Hemicelulosa y xilanasas .....	42
I.9.-Pectina y pectinasas .....	46
1.10 Enzimas relevantes cuyas propiedades se han modificado empleando técnicas de evolución dirigida. ....	49
II.- OBJETIVOS y JUSTIFICACIÓN.....	52
III.- ANTECEDENTES .....	53
III.1.Organismos celulolíticos estudiados en procesos de hidrólisis y sacarificación del bagazo de caña de azúcar.-.....	53
III.2.-Microorganismos .....	56
III.3.-Antecedentes sobre el género <i>Aureobasidium</i> sp.....	58
III.4.a-Sobre la producción de xilanasas. ....	61
II.5.Sobre la producción de $\beta$ -glucosidasa .....	63
III.6.Microorganismos en el laboratorio .....	66
IV.-MATERIAL Y METODOS .....	67
IV.1.-Microorganismo.....	67
IV.1.2.Propagación del microorganismo.....	68
IV. I.3.-Producción de enzimas.- .....	68

IV.1.3.a.-Inóculo .....	68
IV.1.3.b.-Condiciones de crecimiento y producción .....	68
IV.1.4.Sacarificación. ....	70
IV.1.5.Determinación de las actividades enzimáticas. ....	71
IV.1.5.a.Actividad celulolítica en papel filtro. ....	71
IV.1.5.b.-Determinación de actividad celulolítica sobre carboximetilcelulosa, (CMC). ....	72
IV.1.5.c.Actividad exopectinolítica. ....	72
IV.1.5.d.-Actividad xilanolítica. ....	73
IV.1.5.e.-Determinación de la Actividad de $\beta$ -Glucosidasa. ....	73
IV.5.f.-Actividad endo-pectinolítica. ....	74
IV.6.-Técnicas analíticas generales.- ....	74
IV.6.a.-Determinación de azúcares reductores .....	74
IV.6.b.-Determinación de proteína .....	74
V.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	75
V.1.-Producción de enzimas.- .....	75
V.1.a.Efecto de la concentración del inóculo. ....	75
V.1.b.- Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de las enzimas .....	81
V.1.C.- Sustitución de ingredientes y escalamiento de la producción .....	89
V.1.d.- Comparación de sales grado analítico e industrial en la producción de Pectinasas. ....	91
V.1.E.- Evaluación de la producción en mayor escala. ....	92
V.2.- Sacarificación.- .....	96
V. 2. A.- Evaluación de la capacidad sacarificante del filtrado de Aureobasidium sp CH-Y-TE18 utilizando papel filtro (PF) y bagazo de caña de azúcar (Bg).....	97
V. 2. B.- Efecto de la concentración de enzima.....	98
V.2.C.- Concentración del Sustrato bagazo de caña. ....	99
V.2.D.- Efecto del tiempo de incubación. ....	101
V.2 .E .Efecto de la temperatura en la sacarificación del bagazo de caña en biorreactor. ....	103
V.2.F.-Efecto de Conservadores en diferente concentración .....	104
V. 2. G.-Efecto del tiempo de esterilización del bagacillo de caña.....	106
IV.2.H.- Efecto del Tween 80 .....	107
V.2.I.- Efecto del tamaño de partícula del bagazo de caña de azúcar.....	108
V.2.J.- Optimización de condiciones en la sacarificación de biorreactor. ....	109

VI.- DISCUSION GENERAL .....	113
VII.- CONCLUSIONES.....	126
VII.-REFERENCIAS .....	128
1.-Bibliográficas.-.....	128
2.-Referencias cibergrafía .....	154
Anexo . Panorama histórico sobre el estudio de enzimas celulolíticas y su utilización en la degradación de desechos celulósicos.- (Fig.49 y 50) .....	156

### Lista de figuras y cuadros

FIG. 1 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA ESTRUCTURA Y CONSTITUYENTES DE LA PARED CELULAR DE PLANTAS.....	15
FIG. 2 ESQUEMA DE CELULOSA EN LA PARED CELULAR .....	19
FIG. 3 TABLA 1 CONTENIDO DE CELULOSA Y COMPOSICIÓN G/100G DE PESO SECO .....	20
FIG. 4 TABLA 2 PRODUCCIÓN DE BAGAZO EN MÉXICO.....	22
FIG. 5 TABLA 3 TIPOS DE PRETRATAMIENTOS DE LA LIGNOCELULOSA .....	30
FIG. 6 BIOMASA POTENCIAL DE RESIDUOS CELULOLÍTICOS DE COSTO MENOR A \$50 DLLS POR TONELADA SECA. ....	32
FIG. 7 ESQUEMA GENERAL PARA CONVERTIR BIOMASA A ETANOL.....	33
FIG. 8 DIAGRAMA IDEAL PARA LA PRODUCCIÓN DE ETANOL Y GASOLINAS A PARTIR DE MATERIALES CELULÓSICOS. ....	34
FIG. 9 POTENCIAL DE AHORRO EN EL COSTO (\$/GALLON ETOH).....	35
FIG. 10 MODELO DEL MECANISMO DE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE CELULOSA PARA EL SISTEMA CELULOLÍTICO DE <i>TRICHODERMA</i> .	37
FIG. 11 MODELO PARA EL DESARROLLO DEL DISEÑO RACIONAL. ....	41
FIG.12 TABLA 4 ENZIMAS MODIFICADAS EMPLEANDO TÉCNICAS DE EVOLUCIÓN DIRIGIDA.....	43
FIG. 13 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS XILANOS. ....	45
FIG. 14 ESTRUCTURA DE LOS COMPONENTES DE LA PECTINA.....	47
FIG. 15 TABLA 5 ENZIMAS EMPLEADAS EN LA INDUSTRIA Y SUS APLICACIONES. ....	52
FIG. 16 ESQUEMA. PROGRAMA MUNDIAL DE DESARROLLO DE MUTANTES DE <i>TRICHODERMA REESEI</i> . ....	57
FIG. 17 ESQUEMA DE LA TAXONOMÍA Y CLASIFICACIÓN DE <i>AUREOBASIDIUM SP</i> . ....	58
FIG. 18 ESQUEMA 22 ESPECIES Y SUBESPECIES DEL GENERO <i>AUREOBASIDIUM SP</i> .....	59
FIG. 19 ESQUEMA DE SINONÍMIAS PARA LA ESPECIE <i>AUREOBASIDIUM PULLULANS</i> . ....	60
FIG. 20 ESQUEMA 10 ÁRBOL FILOGENÉTICO QUE MUESTRA LA RELACIÓN DE LOS DOMINIOS CATALÍTICOS ENTRE <i>AUREOBASIDIUM PULLULANS XYNII</i> Y OTRAS XILANASAS HOMÓLOGAS. ....	62
FIG. 21 TABLA DE BIOPRODUCTOS DE <i>AUREOBASIDIUM PULLULANS</i> Y SUS APLICACIONES POTENCIALES.....	65
FIG.22 BIORREACTOR DE 14 L. NEW BRUNSWIK SCI. USA, MOD. LABROFERM, UTILIZADO PARA LA CARACTERIZACIÓN COMPLETA DE LA CINÉTICA DE HIDRÓLISIS. ....	69
FIG.23 BIORREACTOR DE 1L, UTILIZADO PARA LA SACARIFICACIÓN DEL BG POR EL FILTRADO LIOFILIZADO CONCENTRADO DE <i>AUREOBASIDIUM SP</i> . CH-Y-TE18. ....	70
FIG.24 EFECTO DEL INÓCULO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CELULASAS DE <i>AUREOBASIDIUM SP</i> . CH-Y-TE18, CRECIENDO SOBRE AVICEL AL 0.75% COMO ÚNICA FUENTE DE CARBONO.....	76
FIG.25 EFECTO DEL INÓCULO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CELULASAS DE <i>AUREOBASIDIUM SP</i> . CH-Y-TE18, CRECIENDO SOBRE BAGACILLO 0.75% COMO ÚNICA FUENTE DE CARBONO .....	78
FIG.26 EFECTO DEL INÓCULO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PECTINASAS DE <i>AUREOBASIDIUM SP</i> . CH-Y-TE18, CRECIENDO SOBRE AVICEL AL 0.75% COMO ÚNICA FUENTE DE CARBONO.....	79

FIG.27 EFECTO DEL INÓCULO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PECTINASAS DE <i>AUREOBASIDIUM SP. CH-Y-TE18</i> , CRECIENDO SOBRE AVICEL AL 0.75% COMO ÚNICA FUENTE DE CARBONO.....	81
FIG.28 EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CELULASAS DE <i>AUREOBASIDIUM SP. CH-Y-TE18</i> . ....	82
FIG.29 EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PECTINASAS DE <i>AUREOBASIDIUM SP. CH-Y-TE18</i> . ....	83
FIG.30 EFECTO DE LA FUENTE DE CARBONO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ENDO-PECTINASAS DE <i>AUREOBASIDIUM SP. CH-Y-TE18</i> . 84	
FIG.31 EFECTO DEL BAGACILLO LAVADO Y DEL EXTRACTO DE LEVADURA COMO FUENTE DE CARBONO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CELULASAS DE <i>AUREOBASIDIUM SP. CH-Y-TE18</i> .....	85
FIG.32 EFECTO DEL BAGACILLO DE CAÑA LAVADO Y DE LA LEVADURA COMO FUENTE DE CARBONO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PECTINASAS DE <i>AUREOBASIDIUM SP. CH-Y-TE18</i> . ....	87
FIG.33 EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE BAGACILLO DE CAÑA DE AZÚCAR SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CELULASAS DE <i>AUREOBASIDIUM SP. CH-Y-TE18</i> , CON DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.....	88
FIG.34 COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LA SUSTITUCIÓN DE SALES GRADO ANALÍTICO (GA), POR GRADO INDUSTRIAL (GI), A PH 4.4-4.6, SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CELULASAS DE <i>AUREOBASIDIUM SP. CH-Y-TE18</i> . ....	90
FIG.35 COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LA SUSTITUCIÓN DE SALES GRADO ANALÍTICO (GA), POR GRADO INDUSTRIAL (GI), A PH 4.4-4.6, SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PECTINASAS DE <i>AUREOBASIDIUM SP. CH-Y-TE18</i> . ....	92
FIG.36 PROTEÍNA EXTRACELULAR PRODUCIDA POR <i>AUREOBASIDIUM SP. CH-Y-TE18</i> , CRECIDO EN BAGACILLO 2% COMO ÚNICA FUENTE DE CARBONO. ....	94
FIG.37 ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS PRODUCIDAS POR <i>AUREOBASIDIUM SP. CH-Y-TE18</i> , CRECIDO EN BAGACILLO 2% COMO ÚNICA FUENTE DE CARBONO:.....	96
FIG.38 CINÉTICA DE SACARIFICACIÓN DE PAPEL FILTRO AL 2.5 % (A) Y BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR AL 4% (B) POR EL CONCENTRADO ENZIMÁTICO DE <i>AUREOBASIDIUM SP. CH-Y-TE18</i> . ....	98
FIG.39 EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL [E] FILTRADO LIOFILIZADO CONCENTRADO DE <i>AUREOBASIDIUM SP. CH-Y-TE18</i> , EN LA SACARIFICACIÓN DEL BAGACILLO DE CAÑA DE AZÚCAR.....	99
FIG.40 EFECTO DE LA SACARIFICACIÓN DEL BAGACILLO DE CAÑA DE AZÚCAR EN DIFERENTES CONCENTRACIONES, POR EL FILTRADO LIOFILIZADO CONCENTRADO DE <i>AUREOBASIDIUM SP. CH-Y-TE18</i> .....	101
FIG.41 EFECTO EN LA SACARIFICACIÓN DEL [Bg] BAGACILLO DE CAÑA DE AZÚCAR ESTERILIZADO EN DIFERENTE %. ....	103
FIG.42 EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA SACARIFICACIÓN DEL Bg ESTERILIZADO 4% POR EL FILTRADO LIOFILIZADO CONCENTRADO DE <i>AUREOBASIDIUM SP. CH-Y-TE18</i> . ....	104
FIG.43 EFECTO DE CONSERVADORES EN LA SACARIFICACIÓN DEL BAGACILLO DE CAÑA AL 4%, SIN ESTERILIZAR POR EL FILTRADO DE <i>AUREOBASIDIUM SP. CH-Y-TE18</i> , DURANTE 14 HORAS .....	106
FIG.44 SACARIFICACIÓN DEL BAGACILLO DE CAÑA DE AZÚCAR 4% A DIFERENTES TIEMPOS DE ESTERILIZACIÓN:.....	107
FIG.45 EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TWEEN 80 EN LA SACARIFICACIÓN DEL Bg POR EL FILTRADO DE <i>AUREOBASIDIUM SP. CH-Y-TE18</i> . DURANTE 48 HORAS. ....	108
FIG.46 EFECTO DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA EN LA SACARIFICACIÓN DEL BAGACILLO DE CAÑA DE AZÚCAR POR EL FILTRADO DE <i>AUREOBASIDIUM SP CH-Y-TE18</i> .....	109
FIG.46 SACARIFICACIÓN DEL BAGACILLO DE CAÑA DE AZÚCAR 4%, POR LAS ENZIMAS DE <i>AUREOBASIDIUM SP.CH-Y-TE18</i> . ....	111
FIG.48 SACARIFICACIÓN DEL BAGACILLO DE CAÑA DE AZÚCAR ESTERILIZADO 4%, CON FILTRADOS DE <i>AUREOBASIDIUM SP.CH-Y-TE18</i> Y <i>ASPERGILLUS SP.</i> DURANTE 48 HORAS.....	113
FIG.49 CUADRO DE LA REVISIÓN DE ARTÍCULOS POR DÉCADAS DE 1960 A 2009. BUSCADOR GOOGLE SCHOLAR AVANZADO..	163
FIG.50 C ARTÍCULOS CITADOS COMO RESULTADO DE LA REVISIÓN EN EL BUSCADOR GOOGLE SCHOLAR ADVANCE.....	164

## I-INTRODUCCIÓN GENERAL

La biodegradación de la celulosa por celulasas, producidas por diversos microorganismos, representa el mayor flujo de carbono de la naturaleza. Las celulasas pueden ser de gran utilidad en el diseño de procesos para el aprovechamiento de desechos agroindustriales y tienen gran potencial para ser usadas en la obtención de bio-combustibles para reemplazar los cada vez más escasos recursos fósiles.

Algunos estudios han mostrado que el uso de bioenergía no produce tantas emisiones de dióxido de carbono, como el petróleo (Demain, 2005). Actualmente, cantidades enormes de celulosa proveniente de desechos urbanos, rurales e industriales son depositadas en el medio ambiente, lo cual contribuye a aumentar los problemas de contaminación.

El desarrollo de tecnologías menos costosas para la conversión de recursos forestales y agrícolas en azúcares fermentables sigue siendo un reto y una necesidad.

En este contexto, es importante señalar que la cantidad de energía solar recibida en la superficie terrestre es de  $2.5 \times 10^{21}$  Btu/año, la cual excede por mucho el porcentaje que los humanos usamos, estimado alrededor de  $2.0 \times 10^{17}$  Btu/año.

La cantidad de energía procedente del sol que es guardada como carbono, vía fotosíntesis es 10 veces más que la usada en todo el mundo. La celulosa es el producto primario de la fotosíntesis y el recurso renovable más abundante producido por la naturaleza y el sustrato ideal para la producción de energía alterna.

Se estima que anualmente se producen alrededor de 100 billones de toneladas en base seca (Demain, 2005).

La biodegradación de la celulosa por celulasas, producidas por diversos microorganismos, representa el mayor flujo de carbono de la naturaleza. Las celulasas pueden ser de gran utilidad en el diseño de procesos para el aprovechamiento de desechos agroindustriales y tienen gran potencial para ser usadas en la obtención de bio-combustibles para reemplazar los cada vez más escasos recursos fósiles.

Algunos estudios han mostrado que el uso de bioenergía no produce tantas emisiones de dióxido de carbono, como el petróleo (Demain, 2005). Actualmente, cantidades enormes de celulosa proveniente de desechos urbanos, rurales e industriales son depositadas en el medio ambiente, lo cual contribuye a aumentar los problemas de contaminación.

El desarrollo de tecnologías menos costosas para la conversión de recursos forestales y agrícolas en azúcares fermentables sigue siendo un reto y una necesidad.

La búsqueda de enzimas, microorganismos y procesos de degradación de celulosa y en general polisacáridos de la pared celular de las plantas sigue siendo una necesidad vigente.

En los últimos años la investigación en estos aspectos se ha intensificado, como resultado de la necesidad cada vez más urgente no solo de contar con combustibles alternativos, sino también para el reciclaje de materia orgánica en decaimiento ya sea producto de la actividad humana o bien por procesos biológicos naturales, así como para el aprovechamiento de desechos celulósicos.

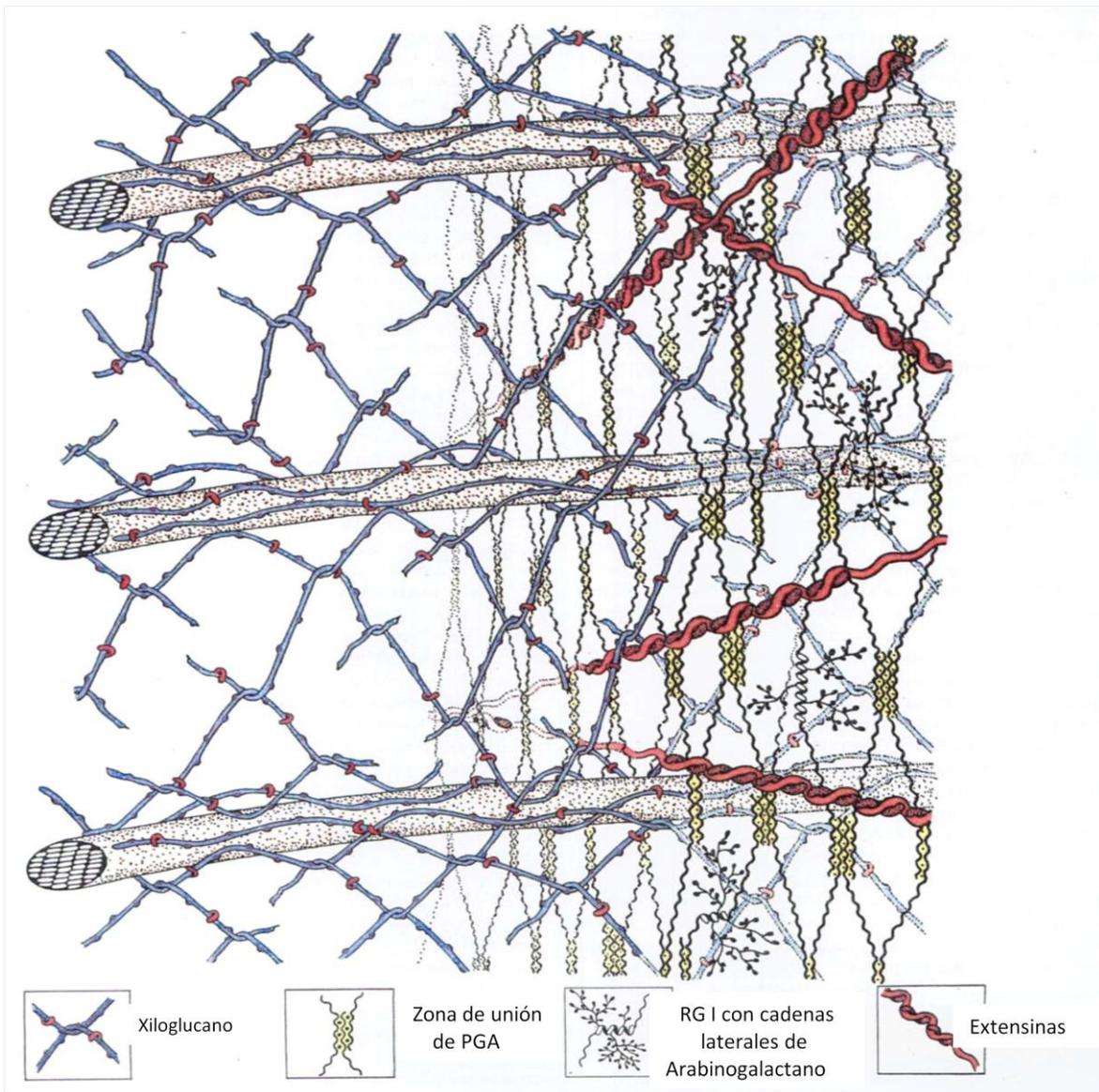


Fig. 1 Representación esquemática de la estructura y constituyentes de la pared celular de plantas  
Tomado de Carpita y col, 1993

### I.1.-Estructura de la pared celular de plantas

La pared celular de las plantas está constituida por polisacáridos que tienen múltiples interacciones de diversa naturaleza (Fig. 1). De acuerdo con Carpita y Mc Can (Carpita y Mc Can, 2000), se distinguen dos tipos de pared primaria en plantas superiores.

El tipo I que es característico de monocotiledóneas y dicotiledóneas, y el Tipo II que se puede encontrar solo en pastos (poales) y plantas relacionadas. La pared celular de Tipo I es una red de microfibrillas de celulosa (nanofibrillas) entrecruzadas con xiloglucanos (XGs). Los xiloglucanos son polisacáridos formados por unidades de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) O-glucosídicos, que están regularmente ramificadas en O6 con unidades de  $\alpha$ -D-xilosil en el extremo terminal.

El tipo II de pared celular está compuesta por microfibrillas de celulosa, pero en lugar de xiloglucano (XG), el principal polímero que interactúa con las microfibrillas es glucoarabinoxilano (GAXs). El glucoarabinoxilano (GAXs), es un polisacárido lineal formado por unidades de xilosil unidas entre sí por enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) , ramificado frecuentemente en posición O<sub>2</sub> con unidades de arabinosil y con menos frecuencia con unidades de ácido glucurónico.

De la misma forma que la pared primaria, la pared secundaria está compuesta principalmente de celulosa y lignina, pero otros polisacáridos, como xilanos y glucomananos (hemicelulosas) se depositan a lo largo de la celulosa (Fincher and Stone, 1983).

Aún cuando cotiledones y células del endospermo del desarrollo de semillas, no tienen una verdadera pared secundaria, las células acumulan espesas masas de polisacáridos entre el espacio periplásmico interior de la pared primaria. Dependiendo de la especie, diferentes polímeros no celulósicos están presentes, tales como, xiloglucanos, galactomananos, arabinogalactanos y (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)  $\beta$ -D-glucanos (Meier and Reid, 1982).

Parte de estos materiales son hidrolizados durante la germinación de la semilla, a través de diferentes rutas metabólicas proporcionando azúcares solubles para el desarrollo de la semilla.

La lignificación también ocurre durante la formación de la pared secundaria. La lignina es un polímero complejo, formado por alcoholes fenil propanóicos (cumaril, coniferil y sinápico) y sus correspondientes ácidos, conectados por numerosos tipos de enlaces, éster o éter e interacciones covalentes, están frecuentemente implicados entre los polisacáridos, proteínas y lignina.

Debido a que tales enlaces covalentes son difíciles de probar químicamente, el conocimiento de sus interacciones por lo tanto es limitado.

Otros polisacáridos como arabinanos, galactanos y arabinogalactanos en varias configuraciones y tamaños se pueden encontrar unidos a residuos de ramnosa.

La interacción de la pectina en la pared celular se puede presentar en diferentes formas, una puede ser, la hélice de ácido poligalacturónico (PGA), pueden adherirse con iones calcio y conformar grandes zonas de entrecruzamiento, traduciendo en la formación de geles.

El tamaño de la zona de entrecruzamiento y su frecuencia está en relación con la cantidad de sustituciones con ramnosa-ácido galacturónico (RGs) en el polímero, este fenómeno constituye un fino control en la porosidad, cambios en la estructura, modulación a pH y balance iónico en la pared celular.

La pectina puede jugar diversos papeles en la estructura de la pared, uno muy importante sería, el ser la molécula de reconocimiento para desarrollar la respuesta apropiada para organismos simbióticos, patógenos y herbívoros. (Carpita y col, 1993)

La estructura de la pared celular es más compleja de lo que parece, no solo funciona en la planta como un exoesqueleto y define la figura celular tanto al interior como al exterior de la misma, sino que desempeña un papel crucial en la interacción con microorganismos patógenos y barrera física contra daños ambientales. También es parte importante en la vida de los humanos, provee de dietas con mayor cantidad de fibra y proporcionan la materia prima para la fabricación de textiles, maderas, producción de papel y potenciales biocombustibles. Esquema de celulosa en la pared celular

En suma la pared celular consiste de varios polisacáridos (celulosa, hemicelulosa y pectina) los cuales junto con lignina forman un complejo estructural rígido. Estas moléculas presentan interacciones a través de la formación de puentes de hidrógeno y enlaces covalentes entre diferentes moléculas de hemicelulosa o hemicelulosa – lignina, celulosa – lignina y pectina – hemicelulosa, etc. (Fig. 1).

La celulosa es el más abundante polisacárido en la naturaleza y el principal constituyente de la pared celular, se trata de un polímero lineal de residuos de glucosa (alrededor de 8,000 a 12,000 unidades), unidos por enlaces  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4. Se presenta como estructuras ordenadas (fibras), cuya principal función es asegurar la rigidez de la pared celular de las plantas (Fig.2)

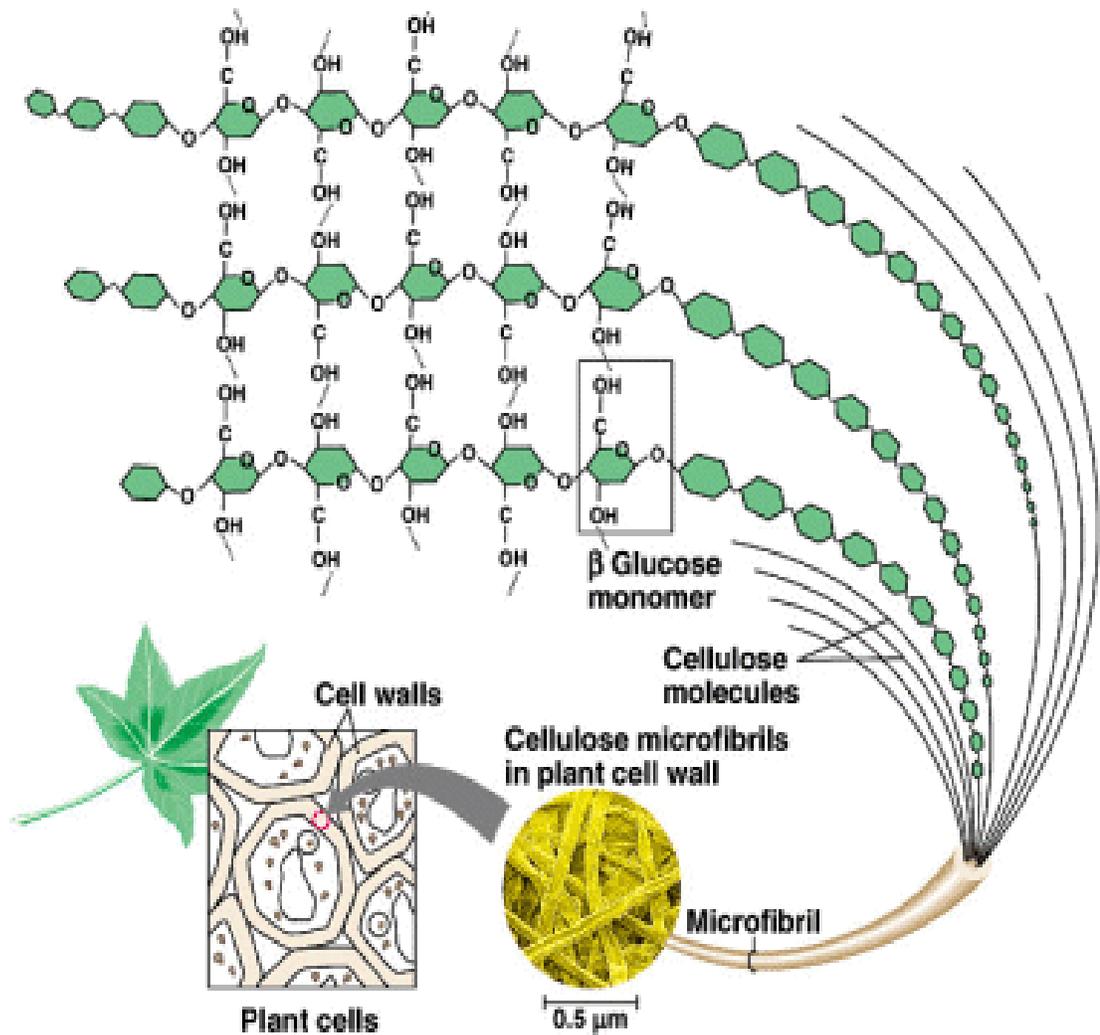


Fig. 2 Esquema de celulosa en la pared celular  
Tomado de de Vries, 1999, 2001

### I.2. Desechos celulósicos.-

El contenido de celulosa en los vegetales es muy alto, así como los desechos celulósicos muy abundantes, que pueden ser utilizados con fines industriales y de remediación.

Algunos ejemplos se muestran en la figura 3.

<b>DESECHOS CELULÓSICOS</b>	<b>CELULOSA</b>	<b>LIGNINA</b>	<b>HEMICELULOSA</b>	<b>REFERENCIA</b>
<b>Residuos agroindustriales</b>				
Paja de Cebada	44	7	27	Marsden, 1986
Paja de Avena	41	11	16	Ibid, Donefere y col, 1969
Paja de Arroz	33	7	26	
Paja de trigo	39	10	36	Marsden, 1986,
Paja de Sorgo	31	11	30	Virkola, 1975
Cáscara de algodón	59	13	15	Marsden, 1986
Bagacillo de Caña	40	13	29	Virkola, 1975
Azúcar	46	20	33	Marsden y Gray, 1986
Bagazo entero	56.6	19.15	26.11	Jackson 1977
Fibra de bagazo	55.4	22.30	29.30	Osman, 1975
Bagazo pulpa				Srinivasan y Han , 1969, Dale, 1987
<b>Frutos y vegetales</b>				
Manzana	2.9	Trazas	5.8	
Plátano	1.3	0.93	3.83	Southgate, 1976
Limón	--	35	--	
Naranja	--	14	---	
Piña	-	7.64	-	
Fresas	3.6	8.4	10	
Papa	1.2	Trazas	9.2	
Zanahoria	12.9	Trazas	19	
Coliflor	13.4	Trazas	13	
Col	8.9	4.3	26	
Tomate	9.1	5.3	11	
Guisante	14	2	36	
<b>Semillas</b>				
Cebada	5.3	---	---	
Maiz	2.4	---	---	Zaboshky, 1981
Trigo	2.1	---	---	
Avena	11.9	---	---	
Sorgo	2.7	---	2.5	
Cacahuete	2.8	---	2.5	

Fig. 3 Tabla 1 Contenido de celulosa y composición g/100g de peso seco  
Tomado de Das H. y S.K.Singh. 2004. "Useful Byproducts from Cellulosic Wastes of Agriculture and Food Industry-A C". Marsden y Gray, 1986, Dale y Osman, 1975. Compilado E. Ochoa en este trabajo.

### I.3.- Producción de bagazo de caña de azúcar en México.

En México se produce la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*, L), en las 5 variedades más conocidas en ingenios azucareros, localizados en 15 estados de la República mexicana, ocupa el 6° lugar en producción mundial de caña de azúcar y el 7° en su consumo (Figura 4).

El bagazo de caña de azúcar (BC), se produce abundantemente como desecho agroindustrial, producto de los ingenios azucareros. Es una biomasa heterogénea lignocelulósica, constituida de celulosa, hemicelulosa (incluidos arabanos, galactanos y xilanos), lignina y otros componentes como proteína, pectina, azúcares solubles, vitaminas y minerales. En la figura 3, tabla 1 se muestra un análisis comparativo de diversos recursos celulósicos incluido el bagazo de caña.

En las zonas rurales es utilizado como combustible, en hornos especiales muy contaminantes y también como forraje mezclado con melaza para el ganado. Algunos otros usos son diversos como la obtención de  $\alpha$ -celulosa, plásticos y como acondicionador de suelos.

Para su degradación el tamaño de partícula es importante, por lo que se le ha estudiado en sus tres formas: bagazo entero, partículas de 1 a 2 cm, como fibra de 0.9 a 0.4 cm y como médula o pulpa de menor tamaño. (Osman, 1975).

Se utiliza como fuente de carbono, sin embargo en la mayoría de los casos, es necesario los pretratamientos, para facilitar la reacción química para que la celulosa sea convertida a proteína unicelular. Sin embargo, se aumenta el costo y el tiempo de operación (Morales, 1985).

En la industria se le utiliza para la elaboración de papel, en pasta, corrugado, tabla prensada y aislante, en todos estos se utiliza solo la fibra. También, en la obtención de furfural por procedimiento ácido, es un producto de pentosanos que forman la celulosa.

Como otros residuos agroindustriales, el bagazo de caña de azúcar (BC). (*Saccharum officinarum, L*), es de gran interés biotecnológico, ya que presenta las siguientes ventajas: disponibilidad, biodegradabilidad, hasta ahora uso poco eficiente, no toxicidad y alto contenido de celulosa aprovechable, por todo esto, se puede utilizar en la producción de celulasas, pectinasas, xilanasas,  $\beta$ -glucosidasas, Carboxi Metil Celulasas entre otras y en su sacarificación con el filtrado de enzimas obtenidas a partir del mismo bagacillo.

PRODUCCION TONELADAS POR Año						
<b>Bagazo</b> %	2008/9	2007/ 8	2006/07	2005/06	2004/2005	
En CAÑA	29.580	29.089	28.788	2 9.061	28.90	
Humedad	51.056	51.055	5 1.080	51. 041	50.87	
Sacarosa	2.434	2.410	2.371	2.39	2.43	
Empacado Ton.	60419	78748	118097	235425	325344	
CAÑA MOLIDA BRUTA en Toneladas						
	42516838	48305474	49025604	4 7290412	50892642	
Fibra en caña %	13.447	13.259	13.120	13.258	13.212	
PRODUCCION DE AZUCAR EN TONELADAS						
Refinada	1,670,555	1,702,110	1,844,860	1 ,830,906	1,957,952	
Estándar	3,252,119	3,806,103	3,467,45	3 ,432,726	3,837,612	
Mascabado	39,821	12,474	1,762	18,456	875	
<b>TOTAL</b>	<b>4,962,495</b>	<b>5,520,687</b>	<b>5314,081</b>	<b>5 ,282,088</b>	<b>5,796,439</b>	

Fig. 4 Tabla 2 Producción de bagazo en México

Tomado del informe del Sindicato de cañeros, Unión Nacional de Cañeros, A.C.- CNPR. Estadísticas de la Agroindustria de la caña de Azúcar 2000-2009. [www.caneros.org.mx/principal.html](http://www.caneros.org.mx/principal.html)

#### I.4.-Degradación de celulosa por celulasas.

La conversión eficiente de la lignocelulosa recalcitrante en azúcares requiere cuando menos de tres pasos secuenciales:

- 1) reducción de tamaño,
- 2) pre-tratamiento e
- 3) hidrólisis enzimática.

#### I.4.a.-Degradación de celulosa.- Pretratamientos físicos, químico, biológico y mixto.

Los pretratamientos se utilizan previamente para facilitar el ataque enzimático en el sustrato celulósico. Existen muchos tipos de tratamiento, como nos muestra la figura 4 en la tabla 3, que se pueden clasificar en cuatro tipos: biológicos, físicos, químicos y mixtos.

Estos pretratamientos suaves o drásticos, permiten la mejor utilización de los residuos agroindustriales, desechos celulósicos, maderables y papel, entre otros.

Los pretratamientos han sido estudiados ampliamente por diferentes autores y se han analizado sus ventajas y desventajas.

En general, se aumenta el costo y en casos extremos con el uso de ácidos o bases, se puede dar como residuos la producción de compuestos tóxicos como el furfural, en cuyo caso el producto celulósico, no pueden ser utilizados para la alimentación.

- Tabla 3.-Tipos de pretratamientos de la lignocelulosa.-

TIPO de Pretratamientos	Desecho Celulósico	Efecto	Ventajas/desventajas	Referencias
<b>BIOLOGICOS</b>	Sustratos	Menor daño ecológico	La enzima se forma <i>in situ</i> con el crecimiento celular, pudiendo alterar las condiciones de cultivo para favorecer la actividad enzimática sobre el crecimiento celular, produciendo así proteasas, xilanasas, pectinasas o celulasas entre otras enzimas.	JeffriesT.W,1992
Enzimas Microbianas	Agroindustriales	Celulosa microcristalina libre		
	Pulpa			
Lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa	Fibras reciclada Secundarias, Postconsumibles	Remoción de lignina		Ghose, 1982
Hemicelulasas : xilanasas, glucomanasas y otras	Maderas		Producción de alimentos a gran escala.	Fan y col, 1982
Hemicelulasas	Tropicales duras	Rompimiento fibras lignocelulósicos.	Sin producción de tóxicos ni contaminantes químicos.	
Cultivos Celulares		microfibrillas	Reduce viscosidad	
Completos o		Flexibilidad de las fibras	Destruye la celulosa	
Combinación de ambas			Reduce la viscosidad de la pulpa.	
Ligninasas + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		Restauración enlaces		
Celulasas, hemicelulasas y estereasas.		Hidratación		
		Solubilizar	La actividad enzimática puede ser interferida por	

Xilanasas		lignocelulosa	muchas sustancias como contaminantes, metales pesados, la adsorción no específica o inactivación de xilanasas por celulosa	Jeffries T.W, 1992
Mezcla de Hemicelulasas: xilanasas, acetilmetilglucuronosidasas, arabinofuranosidasas y glucomanasas.	rábano	Reducción vesículas	puede reducir el efecto de la enzima en xilanos.	
Peroxidasa, catalasa, lacasa, oxígeno, radical superóxido y radical hidroxilo		Mas pulpa, biopulpa, bioblanqueado y biooxidación	Si se prolonga la reacción se puede perder lignina y celulosa.	Ghose, 1982
Blanqueado de la pulpa usando tres enzimas:	Pulpa	Remoción selectiva de xilanos	Algunas xilanasas tienen actividad contra la CMC,	
Agentes biomiméticos, enzimas oxidativas extracelulares y hemicelulasas.	Agroindustriales Industria del papel	xilanos de la pulpa soluble	Reduciendo la viscosidad de la celulosa porque atacan las zonas amorfas.	Fan y col, 1982
XILANASAS		Mayor calidad y blanqueado	Maderas duras usadas en la industria papelera, las Celulasas reducen los orificios de los vasos 85%, de 160/cm a 21/cm. Al mismo tiempo aumenta la uniformidad o blandura del 50 a 129s fuerza de tensión aumenta 4.45 y la flexibilidad. También rompen la estructura cristalina de la celulosa,	
		Menos vesículas		
		Agentes oxidativos Biomiméticos		
		Cataliza el blanqueado oxidativos. La glucosa oxidasa en presencia de glucosa aumenta la brillantez en dos puntos,		

CELULASAS	El ataque a maderas duras se atribuye a enlaces álcali lábiles como acetil esterres	probablemente por generación <i>in situ</i> de peróxido de hidrógeno.	dañan. Atacan la fibra dañando las propiedades de la pulpa – el grado de polimerización (DP) de la celulosa y reduce su viscosidad.	Jeffries T.W, 1992
XILANASAS ESPECÍFICAS	Remoción selectiva de xilanos, se requiere celulosa pura con alto grado de polimerización.	Blanqueado Remueve hemicelulosa y lignina, rompe enlaces entre lignina y carbohidratos y entre cadenas de hemicelulosa. El tamaño del sustrato y la superficie tienen mucha importancia para determinar la accesibilidad de la enzima, así como la reactividad es crítica.	Rayón es celulosa, pulpa De celulosa, si hay xilanos disminuye su fibra.	Ghose, 1982
		Los grupos acetilados y otros enlaces éster son rotos por álcali diluido, facilitando el ataque enzimático.	Xilanos acetilados son resistentes al ataque de la mayoría de las xilanasas. Hidróxido de sodio del 4% al 8%, las xilanasas pueden remover el 40% de xilanos.	Fan y col, 1982
FISICOS	Desechos urbanos y agroindustriales periódico, aserrín, residuos madera, pajas, rastros, excrementos.	Fracción celulósica. Al fragmentar a menor tamaño aumenta la superficie, restaura la cristalinidad, separa lignina, microfibrillas Muy utilizado.	No contaminan No tóxicos	Mandels y col, 1974 Pandey y col, 2000 Gutiérrez-Correa, 2003 Andren y col, 1976 Marsden y col, 1986 Andrea y col, 1976 Dale, 1987 Fan y col, 1982

LAVADOS SUCESIVOS		Extrae solubles	Implica gasto de agua. Se recobra el 90% como azúcares monoméricos	Moisier y col, 2005
<b>SECADO:</b> al sol, en estufa, horno, molienda	celulósicos	Tiempos largos	No contaminan No tóxicos	Ídem
<b>PULVERIZACIÓN:</b> Molino de bolas Molino de martillo Molino coloidal Molino vibro energía Molino Wiley Molino pot Molino roll	Celulósicos papel	Fragmentación. Partículas más pequeñas	A gran escala Fuerte inversión inicial, Equipo costoso Azcs red. De 14.9 hasta 26.3 g/l	Cen y col, 1999; Pandey y col, 2000; Andren y col, 1976; Nyri,1978; Blanco,1982; Gupa, 1973; Dwivedi y col, 1979; Mishra y col, 1984; Mandels y col, 1974; Fan y col, 1982
DISCOS	Celulósicos papel	Fragmentación. Partículas más pequeñas	A gran escala. Fuerte inversión inicial, Equipo muy costoso. Se obtienen Az. red. De 14.9 hasta 26.3 g/l	Ídem
Presión EXPLOSION DE VAPOR Irradiaciones de alta energía	Maderas baratas Celulósicos recalcitrantes	Remueve hemicelulosa Reduce el tamaño de partículas y aumenta el volumen del poro. 200–240°C, 30 s, 20 min. Bajar rápidamente	Facilita la acción enzimática sobre las fibras celulósicas. Tóxico, producción Furfural Menos sustancias solubles y lignina. Fuerte inversión, alta tecnología.	Cen & Xia, 1999; Moisier, y col, 2005
HIDROTERMOLISIS Cambios de Temperatura drástica Mayor a menor o menor a mayor	Maderas duras	200-230°C por 15 min. Disuelve del 40- 60% Biomasa total: 4- 22% de celulosa, 35- 60% de lignina y el 100% de hemicelulosa.	Azcs reductores liberados Se usan ácidos para hidrolizar los líquidos	Fan y col, 1982 Moisier, y col, 2005
SOLVÓLISIS				

<b>CERNIDO EN CRIBA:</b>	Hojarasca	Fragmentación	Altamente utilizado.	Gupa, 1973; Mandels 74; Blanco 1982; Andrea, 76; Dwivedi79; Choudhury 1980, Blanco, 82; Ghosh 82; Mishra, 84;Toit, 84; Tewari,88; Miyakawa,86; Pandey, 2000
Medidas más utilizadas de 20 a 60 mesh	Desechos agroindustriales	Partículas grandes a pequeñas, aumentan la superficie de contacto		
<b>QUIMICOS</b>		Condiciones drásticas	Tóxicos	Tewari y col, 1988
			Contaminan	Fan y col, 1982
	Hidrólisis celulosa		Hexosas furfural	
<b>ACIDOS</b>		Pentosas a etanol,	Hidroximetil furfural y sus precursores la mayoría tóxicos;	Pandey y col,2000
	Hemicelulosa	Azucares solubles		
		Remover la lignina		Toit y col, 1984
		Romper su estructura		
<b>HCL</b>		Cristalina, fragmentar microfibrillas,	Costosos	Tewari, 1988
		Aumentan la superficie		Yeoh y col, 1985
<b>HCl + Cl Zn</b>		Rompe xilosa		
<b>HCl</b>			Incineración de papel se liberan compuestos clorinados altamente tóxicos.	Mishra y col, 1984
	Pulpa		Tóxicos dioxinas y otros	Toit y col, 1984
<b>Cloro y Dióxido de cloro +</b>		Blanqueado	Se modifica la celulosa microcristalina	Tewari,1988

<b>extracción alcalina</b>		Remueve compuestos		
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Celulosa sin lavar, pH 6.5	Aromáticos clorinados de la lignina	Mayor temperatura los pentosanos se convierten en furfural que inhiben el crecimiento de microorganismos.	Cen & Xia, 1999 Pandey y col, 2000
Hidrólisis ácida 110-120°C y 0.3-1.1% conc. ácido.		Remoción de hemicelulosa		Oliveira y col, 2006
<b>Ac. Nítrico</b>		Mayor área de superficie y de volumen de los poros	Menos costoso	Jeffries, T.W, 1992 Moisier, N y col, 2005
<b>ALCALINOS:</b>		Productos tóxicos		
Son los más usados	Más usados	Azucares Reductores 53 g/l.	Altamente eficiente	Blanco, 1982; Pandey y col, 2000; Dunlap & Calligan, 1969; Mandels y col, 1974; Nyri, 1978; Dwivedi & Ghose, 1979;
<b>NaOH</b> , NaOH 0.5 , 2.5%, 1M, 80 a 100 C, 1 a 24 horas	Agroindustriales	Remover lignina de la biomasa.	A largo tiempo horas o días	Choudhury y col, 1980; Blanco, 1980; Ghosh y col, 1982; Mishra y col, 1984; Toit y col, 1984; Mannonmani, 1987; Tewari y col, 1988; Miyakawa, 1986;
<b>O CaO</b>	Cosecha	Reactivan polisacáridos.	Se producen sales irre recuperables o incluidas en la biomasa.	Pandey y col, 2000, Cen, 1999; Moisier, y col, 2005; Fan y col, 1982
Acuoso o gaseoso NH <sub>3</sub> .	Papel pulpa		Bajo costo y seguro	
Ca(OH) <sub>2</sub>	Maderas duras	Bagazo de caña, bajo condiciones ambiente facilita la acción enzimática de la Celulosa del 20% al 72%, después, por 192 horas. 120°C, 1h	Agregando aire/oxígeno se acelera la delignificación.	
Oxido de Calcio, sodio, potasio, calcio e hidróxido de amonio.			U liza mucho agua para lavados sucesivos	
Ozono, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>				

EXPLOSIÓN de: Ammonia o dióxido de carbono, igual a la explosión de vapor	Herbáceos Agroindustriales Maderables	Remoción de lignina	No reacciona la Celulosa. Condiciones drásticas Presión 15 atm, 50–80°C	Fan y col, 1982 Cen & Xia, 1999; Moisier y col, 2005
<b>Solventes:</b> <b>Dioxano</b> <b>Cadoxen</b> <b>Glicerol, Fenol</b> <b>Etilen glicol</b>	Todos celulósicos	Romper estructura cristalina, fragmentar sus microfibrillas, aumentar la superficie de contacto. Hidrólisis	Tóxicos No para alimentos	Ladish y col, 1978; Jeffries, 1992; Moisier y col, 2005
Óxidos: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Fe <sub>2</sub> Sulfato de cobre Cetil metil amonio Dióxido de Nitrógeno Dióxido de Azufre	Agroindustriales	Lavados sucesivos a neutralidad con agua, hidróxido de amonio, Buffer de citratos, pH 4.8		Mannonmani, 1987; Mishral, 1984; Tewari, 1988 Dwivedi, 1979 Pandey, 2000 Fan, 1982
<b>MIXTO</b> <b>Alcalino y Fermentación</b> pH 6.5 con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Alcalino y ácido	Papel agroindustriales estado sólido	Sin lavar celulosa	Estado sólido	Cen & Xia, 1999 Toit y col, 1984 Mishra, 1984
<b>FERMENTACION</b> <b>Sacarificación</b> <b>ESTADO SÓLIDO</b> <b>SUMERGIDA</b> <b>HIDROLISIS ENZIMATICA</b> <b>FERMENTACION Y SACARIFICACION</b> <b>SIMULTÁNEA SSF</b>	Agroindustriales Pulpa y otros lignocelulósicos	Conversión de residuos celulósicos en azúcares fermentables Bagazo de caña con <i>T. viridae</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Estructura cristalina y lignina.	Proceso enzimático en donde la porción de hemicelulosa y celulosa de los residuos son convertidos a pentosas y hexosas monoméricas, y ácidos de azúcares.	Ladisch, 1979; Pandey y col, 2000 Jeffries, 1992 Gosh y col, 1982 Blanco y col, 1982
<b>ENZIMAS MICROBIANAS</b> <b>CON EXTRACCION</b>	Pulpa y otros lignocelulósicos Periódico Agroindustriales	Celulosa, hemicelulosa y lignina		Jeffries, 1992

Fig. 5 Tabla 3 Tipos de pretratamientos de la lignocelulosa

(Compilado por E. Ochoa, 2009, en este trabajo)

## I.5.-Hidrólisis enzimática.

En la biodegradación de celulosa son cuatro clases de enzimas involucradas: Endoglucanasa (E.C. 3.2.1.4) hidroliza la celulosa en gluco-oligosacáridos, corta la cadena interna de celulosa principalmente de la región amorfa proporcionando a la celobiohidrolasa más cadenas sobre las cuales actuar; Celobiohidrolasa (E.C.3.2.1.91) libera celobiosa de la celulosa cristalina;  $\beta$ -Glucosidasa (E.C. 3.2.1.21) degrada los oligosacáridos a glucosa y exoglucanasa que genera glucosa a partir de celulosa y gluco oligosacáridos (De Vries & Visser, 2001).

La mayoría de celulasas comerciales (incluyendo  $\beta$ -glucosidasa) son producidas por especies de *Trichoderma* y *Aspergillus*. (Cherry & Fidansef, 2003). Las celulasas se usan en la industria textil para el suavizado de las fibras de algodón en la industria de detergentes para limpieza y el cuidado del color; en alimentos para la maceración de frutas y en las Industrias de la pulpa y el papel para el destintado y modificación de la fibra de celulosa.

Por un lado, los desechos agroindustriales cada año aumentan y su costo es relativamente barato, como lo muestra la figura 6.

Las celulasas son enzimas relativamente caras de modo que una reducción considerable en su costo es necesaria para hacer exitosa su aplicación comercial en bio-refinerías. Los factores que pueden hacer más económicos los procesos basados en el empleo de celulasas incluyen: aumentar la producción volumétrica de las enzimas en escala comercial; producir enzimas empleando sustratos más baratos; obtener celulasas con

mejor estabilidad para procesos específicos y celulasas con mayor actividad específica contra sustratos sólidos, como se muestra en el esquema 6 y 8.

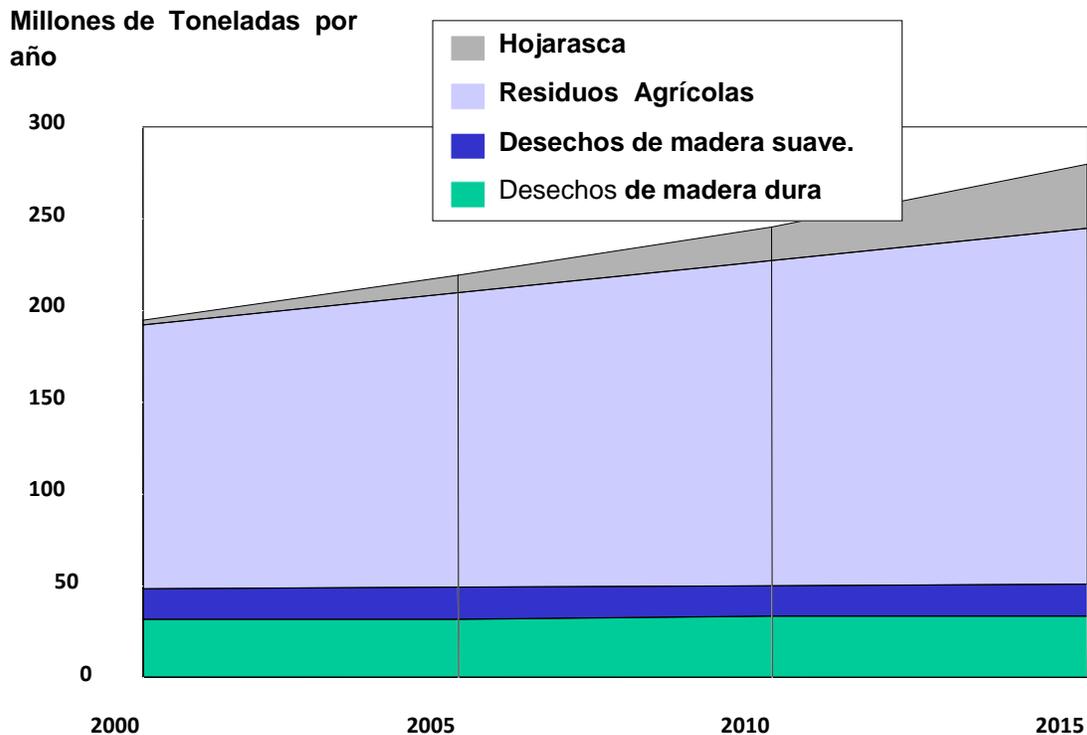


Fig. 6 Biomasa potencial de residuos celulolíticos de costo menor a \$50 dls por tonelada seca.

Tomado de "Improved Cellulases for Bioethanol Production", Biotechnology Center for Fuels and Chemicals. National Renewable Energy Laboratory. Himmel & Sheehan, 2000.

A pesar de la gran controversia que ocasiona el desarrollo de bio-combustibles, la demanda de celulasas ha crecido y se espera que aumente debido a su empleo en la hidrólisis y pre-tratamiento de materiales celulósicos, para la obtención de azúcares que pueden ser fermentados y transformados en bio-etanol. El mercado potencial para las celulasas fue estimado en alrededor de 400 millones de dólares por año, si son usadas para la hidrólisis de maíz en Estados Unidos. Si cada una de las cadenas de celulosa

podiera degradarse individualmente en cada uno de sus enlaces, el azúcar liberado se utilizaría para hacer etanol y gasolina. (Figuras 6, 7, 8 y 9).

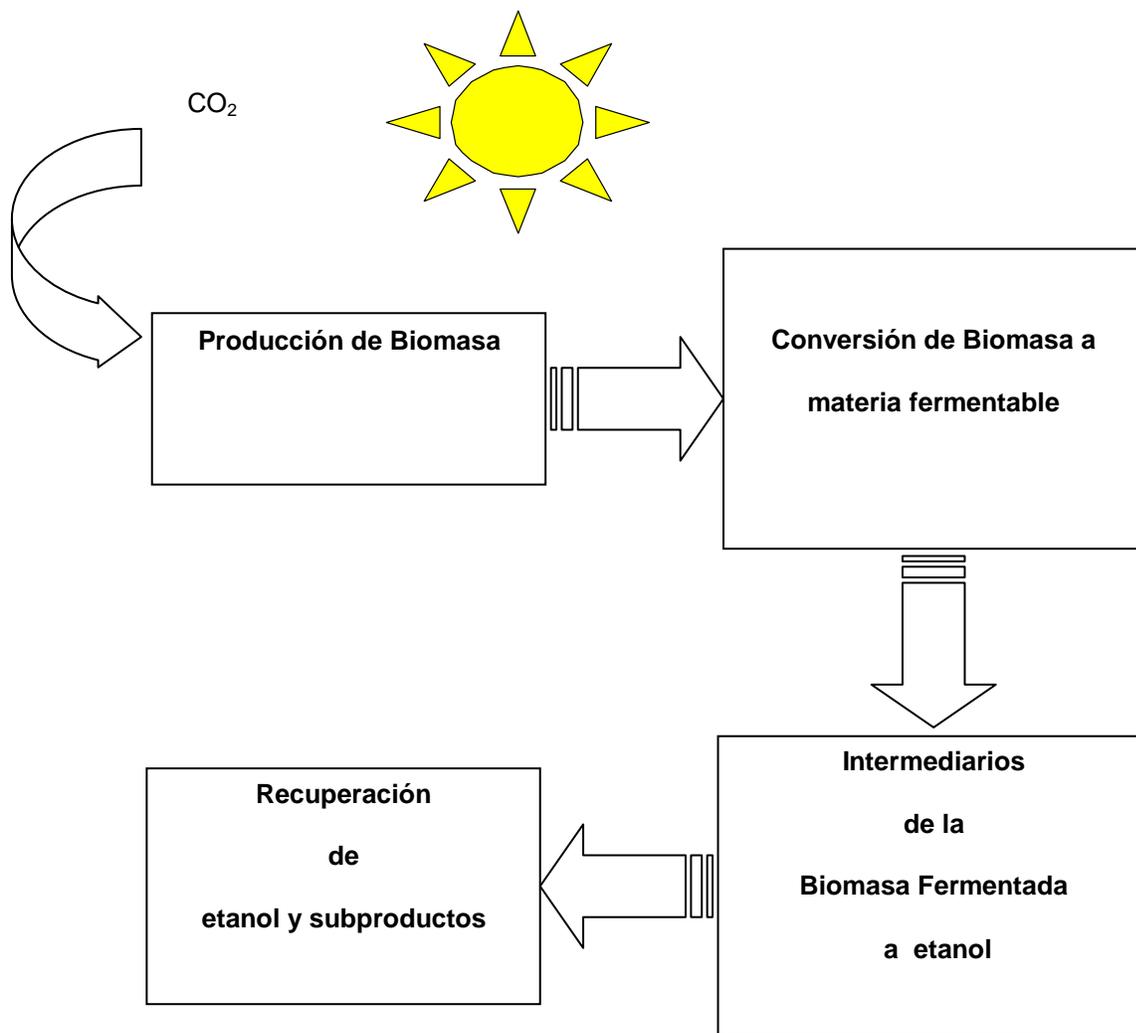


Fig. 7 Esquema general para convertir biomasa a etanol.

Tomado de Himmel & Sheehan, 2000. Mejoramiento de las Celulasas **Error! Marcador no definido.**, para la producción de Bioetanol, Biotechnology Center for Fuels and Chemicals, National Renewable Energy Laboratory.

El etanol puede ser purificado con la misma tecnología que se emplea para la producción de etanol basada en productos de maíz. Basados en el papel que puede jugar su uso potencial en la producción emergente de bioenergía, ha motivado el desarrollo de mejores preparaciones de celulasas para la hidrólisis completa de la pared celular de plantas (figura 8)

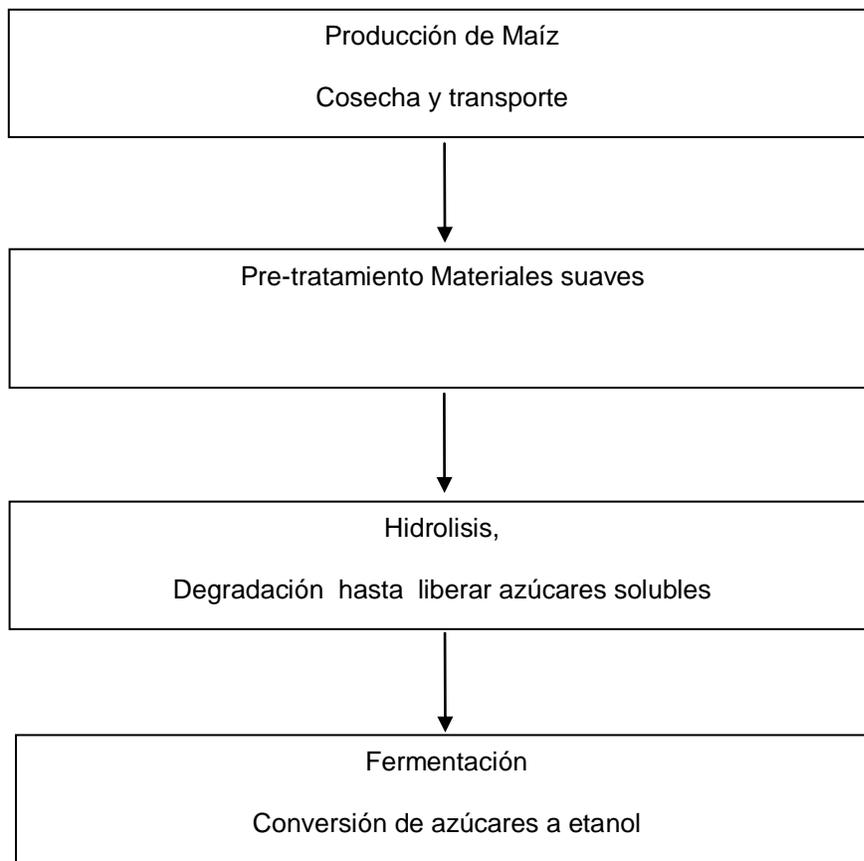


Fig. 8 Diagrama ideal para la producción de etanol y gasolinas a partir de materiales celulósicos.

Tomado de Lipinsky y col, 1978 y Saha y col, 1994

El mayor reto está en reducir los costos asociados a la producción, cosecha y transportación de los desechos celulósicos, figura 8.

Actualmente es necesaria la búsqueda de nuevas celulasas o la mejora de las ya empleadas en las nacientes biorefinerías, una alta eficiencia catalítica sobre sustratos celulolíticos insolubles, incremento en la estabilidad a temperatura y pH así como, mayor tolerancia a inhibición por producto final, son características necesarias para la conversión biológica eficiente de biomasa lignocelulósica en etanol.

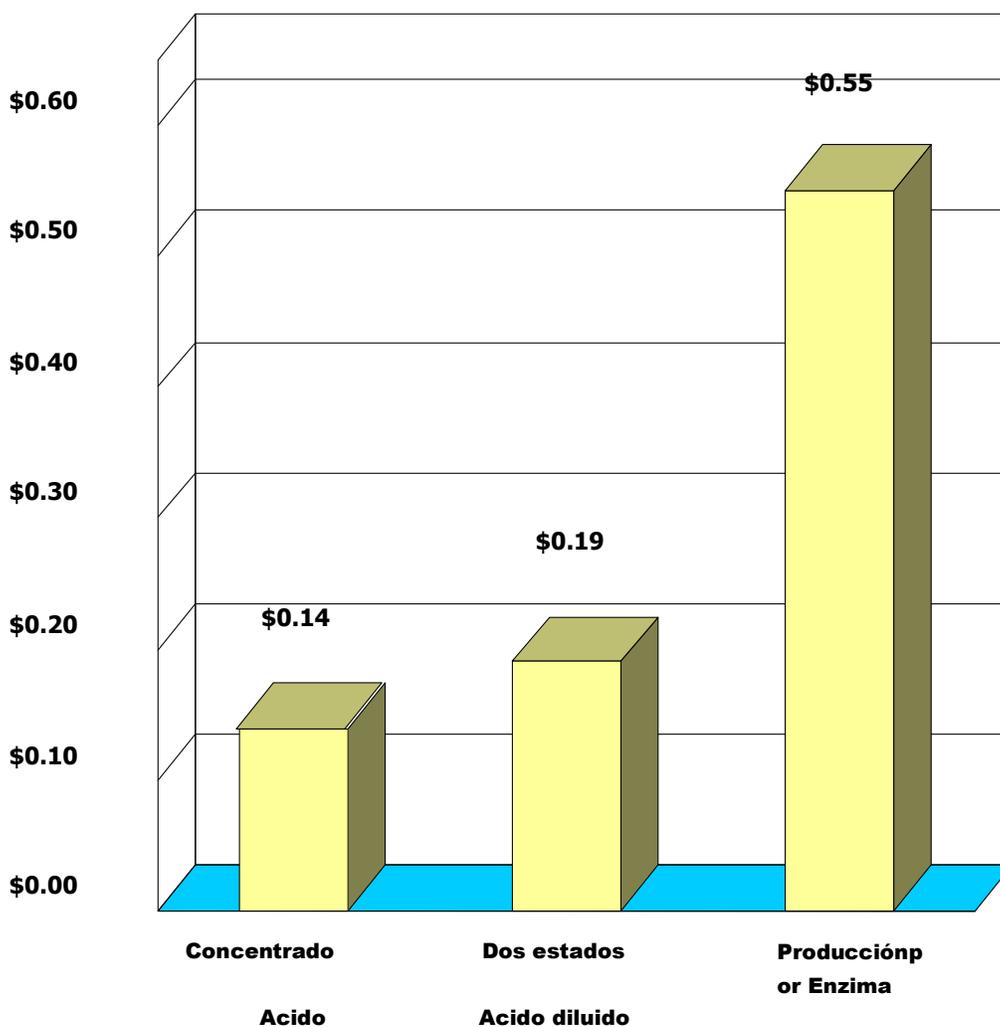


Fig. 9 Potencial de ahorro en el costo (\$/gallon EtOH). Tomado de Himmel & Sheehan, 2000.

## I.6.- Hidrólisis enzimática de la celulosa

La celulosa es un polímero lineal formado por unidades de D-anhidroglucopiranosido unido por enlaces glicosídicos  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4, con diferentes grados de polimerización (DP) de 100 a 20,000 (Krassing, 1993). La celulosa está compuesta por unidades repetidas de anhydrocelobiosa. La forma acoplada de las cadenas y hojas de celulosa adyacente por enlaces de hidrógeno y fuerzas de van der Waals, da como resultado un alineamiento paralelo y una estructura cristalina con fuertes y muy estables supra moléculas de fibra con alto grado de tensión y baja accesibilidad. (Demain, 2005). La molécula de la celulosa es muy estable. Se ha calculado que tiene una vida media de 5-8 millones de años por cada enlace  $\beta$ -glucosídico a 25° C, (Wolfenden, 2001) por lo tanto la degradación de celulosa catalizada por enzimas, es un proceso vital, para el retorno del carbono de los sedimentos a la atmósfera.

Los mecanismos aceptados para la hidrólisis enzimática de la celulosa involucran la acción sinérgica de endoglucanasa (EC 3.2.1.4), exoglucanasa o celobiohidrolasa (E.C 3.2.1.91) y  $\beta$ -glucosidasa (EC 3.2. 1.21). La endoglucanasa rompe los enlaces  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 glicosídicos de la cadena intramolecular de celulosa haciéndola accesible, a la vez que produce nuevas cadenas con extremos libres; las exoglucanasas procesan estos extremos de la cadena de celulosa para liberar celobiosa soluble o glucosa, la  $\beta$ -glucosidasa hidroliza celobiosa a glucosa a fin de eliminar la inhibición por celobiosa (Fig. 10).

Estos tres procesos ocurren simultáneamente como lo muestra la Figura 10, la hidrólisis primaria que ocurre en la superficie de sustratos sólidos liberando azúcares solubles con cierto grado de polimerización (DP) arriba de 6 en la fase líquida, seguida de la hidrólisis

por endoglucanasas y exoglucanasas. La despolimerización enzimática realizada por endoglucanasas y exoglucanasas es el paso limitante para el proceso completo de hidrólisis de la celulosa. La hidrólisis secundaria que ocurre en la fase líquida involucra, en primer lugar la hidrólisis de celobiosa a glucosa por  $\beta$ -glucosidasa, además de que en algunos casos la  $\beta$ -glucosidasa también hidroliza celodextrinas de cadena larga. (Zhang y col, 1993).

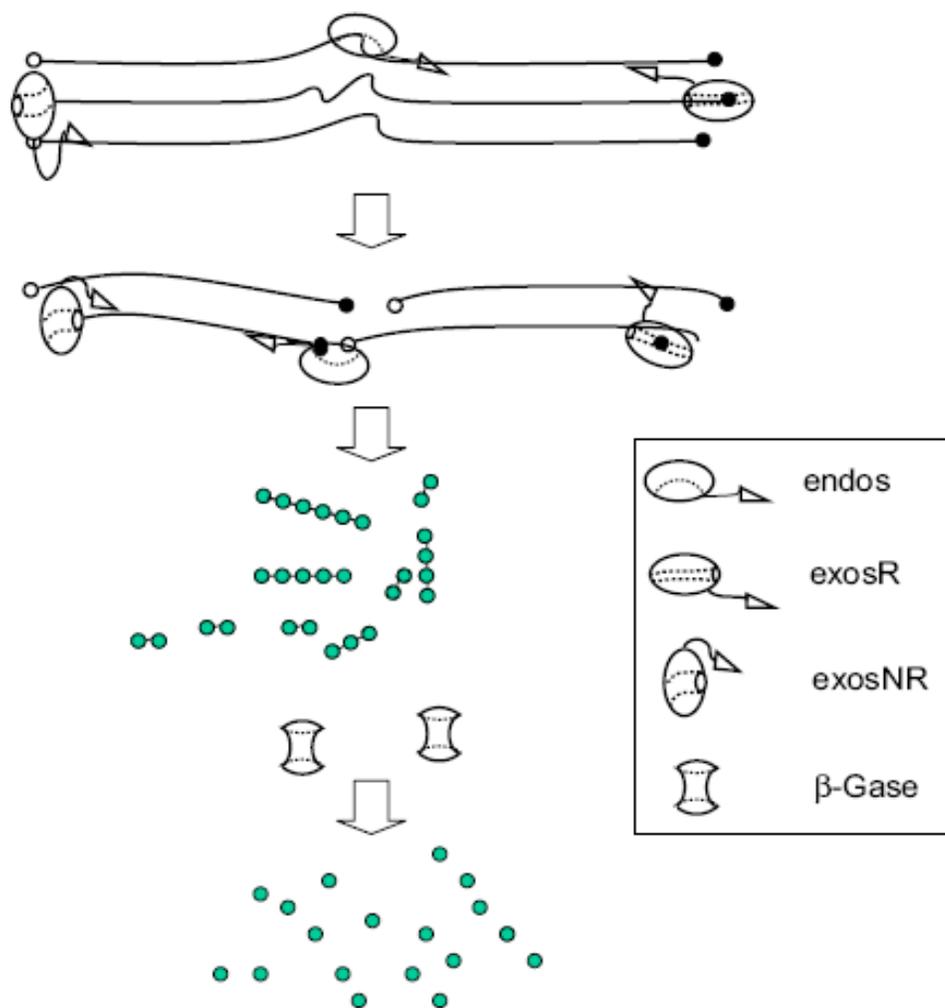


Fig. 10 Modelo del mecanismo de hidrólisis enzimática de celulosa para el sistema celulolítico de *Trichoderma*  
Tomado de Zhang y col, 2006

Durante la hidrólisis de la celulosa, cambian algunas de las características del sustrato sólido, estas modificaciones incluyen:

1) cambios en el número de extremos libres de las cadenas de celulosa generados por la acción de endoglucanasas y su consecuente consumo por exoglucanasas y

2) cambios en la accesibilidad a la celulosa, resultado de la degradación y la fragmentación de la misma. (Walker y col, 1990). La acción combinada de endoglucanasas y exoglucanasas modifica las características topológicas en la superficie de la celulosa y el resultado de estos cambios inciden en el tiempo de hidrólisis.

Las complicadas interacciones de la cantidad de endoglucanasas, exoglucanasas y las características cambiantes del sustrato durante la hidrólisis han sido simuladas en un nuevo modelo matemático propuesto por Zhang y Lynd, basado en el diseño de parámetros enzimáticos para endoglucanasas I, celobiohidrolasas I y II sobre una variedad muy amplia de sustratos, para el cual se consideran dos características importantes: el número de enlaces  $\beta$ -glucosídicos accesibles para las celulasas y el grado de polimerización (DP).

Con este modelo se espera obtener información más clara del proceso de hidrólisis enzimática de la celulosa. El modelo propone, por ejemplo, simular los rangos de la reacción basados en lo reportado en la literatura, incluyendo modificaciones de las características del sustrato, el efecto de la acción de exoglucanasa y endoglucanasa, un grado conocido de sinergismo entre exo- y endo glucanasas, eficiencia de hidrólisis; entre otros. El modelo también sugiere que es casi imposible predecir la hidrólisis de mezclas de celulasas procedentes de sustratos sólidos, ya que existe una gran variación en la cantidad de celulasas.

## I.7.-Mejoramiento de la producción de celulasas y selección:

La investigación en ingeniería de celulasas para el diseño de un sistema celulolítico está orientada en tres direcciones,

1. Diseño racional de cada enzima, basado en el conocimiento de su estructura y mecanismo catalítico (Schulein, 2000).

2. Evolución dirigida en el que las enzimas sean seleccionadas por mutagénesis aleatoria o recombinación molecular hasta encontrar aquellas que presenten nuevas y mejores propiedades, (Arnold 1998, 2001, Demain, 2001, 2003).

3. La reconstitución de mezclas de celulasas activas sobre sustratos insolubles que den lugar a mayores velocidades de hidrólisis o mayor digestibilidad de la celulosa (Baker y col, 1995, 2000, 2005). El mayor reto para la Ingeniería de celulasas es conseguir una correlación entre los ensayos enzimáticos o estrategias de selección con los cambios en las funciones de las enzimas para la aplicación deseada. El desarrollo de ensayos útiles y predecibles de celulasas para la selección es particularmente difícil debido a la naturaleza heterogénea de los sustratos sólidos.

### 1.- Diseño racional.

Está basado en el uso de Ingeniería de proteínas, estrategia empleada poco tiempo después de ser desarrollados los métodos de DNA recombinante y mutagénesis dirigida. El empleo de esta estrategia requiere de un detallado conocimiento en la estructura de la proteína, del conocimiento de los sitios de catálisis y afinidad a sustrato, así como del modelado molecular, basado en la relación estructura-función, y el diseño de la relación

ideal. En el figura 11, se muestra el proceso que involucra el diseño racional, para lo cual es necesario, tener los datos relacionados con la estructura de la enzima a modificar; la identificación de la región de la proteína que deberá ser modificada, requiere de un amplio conocimiento, no solo de la existencia de dicha función en la región, si no de la certeza de que al modificarla el cambio es el esperado o bien, una nueva función que será favorable. La modificación de un aminoácido en la secuencia, se puede realizar por medio de mutagénesis dirigida; un cambio sencillo o el cambio completo del dominio y/o la fusión de proteínas.

La variación en la estrategia para el diseño racional, está basada en el conocimiento que se tenga de la proteína, que sea suficiente para poder predecir el cambio sobre la estructura, y en sus mecanismos de catálisis. Sin embargo, no todas las estructuras terciarias y mecanismos de acción y catálisis están disponibles en muchas enzimas.

El diseño racional parece ser el método más lógico para examinar los aminoácidos cercanos o involucrados en el sitio activo, o sitio de unión a sustrato en estructura tridimensional, pero algunas propiedades enzimáticas, no pueden ser localizadas *a priori* entre un pequeño número de residuos catalíticos, existen muchos residuos distribuidos a lo largo de la proteína que frecuentemente le confieren propiedades importantes. Aun cuando gran cantidad de funciones pueden ser cambiadas con la sustitución de uno o algunos aminoácidos, es difícil predecir la respuesta a una mutación específica.

Schulein, 2000; Wilson, 2004; Wither, 2001, entre otros, han publicado el uso de mutagénesis dirigida para mejorar las propiedades y mecanismos de acción de las celulasas. Sin embargo, son pocos los autores que han reportado éxito en sus

investigaciones, un ejemplo es lo reportado por Baker y colaboradores, un incremento en el 20 % en la actividad sobre celulosa microcristalina es el obtenido con una endoglucanasa modificada, Cel5A de *Acidothermus cellulolyticus* (Baker y col, 2005).

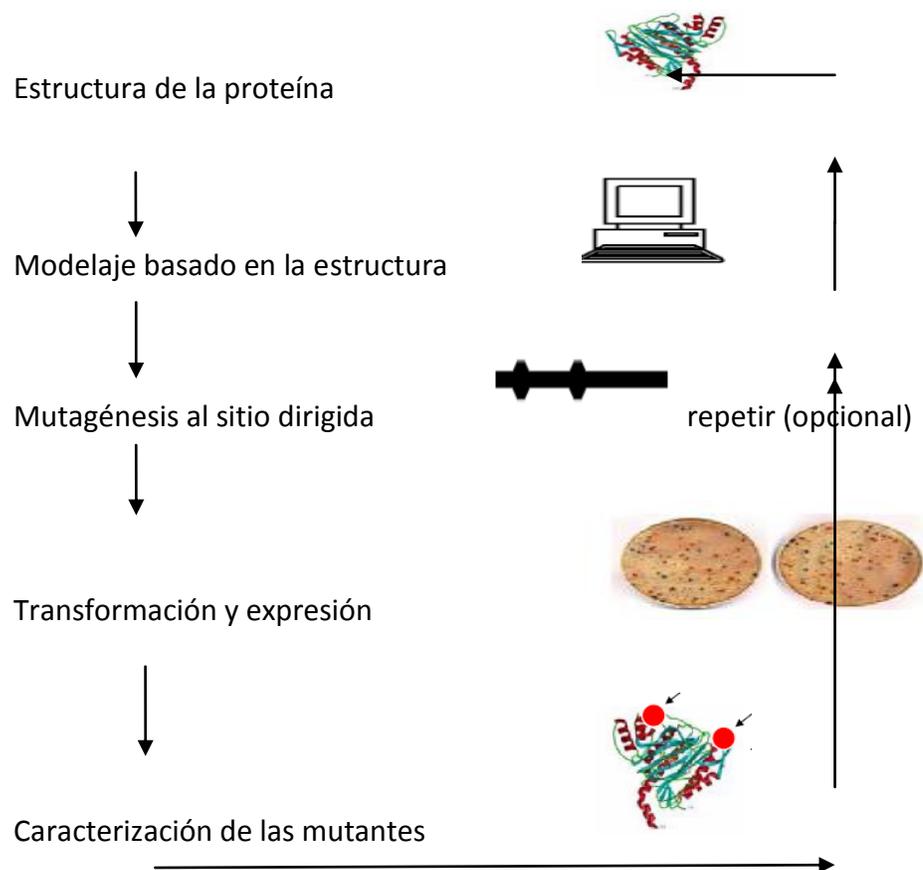


Fig. 11 Modelo para el desarrollo del diseño racional.  
Tomado de Zhang y col, 2006

La estructura por cristalografía de alta resolución estaba disponible y la proteína fue sujeta a una serie de mutaciones diseñadas para alterar la química de la salida del producto de la cavidad del sitio activo. Empleando información estructural y siguiendo la teoría de inhibición por producto final, se substituyó un residuo no aromático en el aminoácido 245, para obtener una mutante (Y245G), que muestra un incremento en la  $K_i$  para celobiosa de 15 veces.

Sin embargo, estos resultados no son una regla general en el empleo de mutagénesis dirigida. Se continúa con el diseño en la elaboración de nuevas mutantes y su evaluación.

## 2.- Evolución dirigida.

A la fecha el conocimiento en relación a las características de los sustratos celulósicos insolubles es limitado, las interacciones dinámicas entre celulasas y sustratos insolubles, entre el complejo sinérgico y /o su relación por la competencia al sustrato, la cantidad de celulasa para cada componente, limita el empleo del diseño racional para mejorar las propiedades de la celulasas.

La gran ventaja de la evolución dirigida radica en que es independiente al conocimiento de la estructura de la enzima y a las interacciones entre enzima y sustrato. El reto de esta estrategia, es el desarrollo de herramientas para evaluar correctamente la eficacia de las mutantes generadas por técnicas de DNA recombinante.

El éxito de la evolución dirigida depende directamente del método que se seleccione para encontrar la mejor enzima mutante; en los laboratorios de investigación es cada vez más común la frase “encontrarás lo que estas buscando”. En la figura 12, tabla 4 se muestra la estrategia empleada para la obtención de proteínas de evolución dirigida.

### 1.8.- Hemicelulosa y xilanasas

Interaccionando con la celulosa y sus nanofibrillas se encuentra la hemicelulosa, el polisacárido más heterogéneo encontrado en la pared celular de plantas.

El principal tipo de hemicelulosa en cereales y maderas duras es el xilano, (de Vries, 1999).

La estructura del xilano puede diferir dependiendo de la planta, pero siempre tendrá una cadena principal de residuos de D-xilosil unidos por enlaces  $\beta$  -1,4 (85-93% de la molécula), altamente ramificada, (Ebringerova, 2000).

<b>Enzimas relevantes cuyas propiedades se han modificado empleando técnicas de evolución dirigida.</b>				
<b>Enzima</b>	<b>Alteración</b>	<b>Técnica de DNA</b>	<b>Método de Selección</b>	<b>Referencia</b>
Endoglucanasa	Estabilidad Térmica	Shuffling family	Selección en placas de CMC agar con rojo congo	Murashima y col, 2002b
Endoglucanasa	Actividad	DNA shuffling	Selección en placas de CMC agar con rojo congo	Kim y col, 2000
Endoglucanasa	pH alcalino	epPCR	Selección en placas de CMC agar con rojo congo	Wang y col, 2005
Endoglucanasa	-----	Shuffling family	Selección en placas de CMC agar con rojo congo	Catcheside y col, 2003
$\beta$ -D-glucosidasa	Adaptación a frio	DNA shuffling	Selección usando sustrato cromogénico	Lebbink y col, 2000
$\beta$ -D-glucosidasa	Estabilidad térmica	epPCR	Selección usando sustrato cromogénico	Gonzalez-Blasco y col, 2000
$\beta$ -D-glucosidasa	Estabilidad térmica	epPCR +Shuffling family	Selección usando sustrato cromogénico	Arrizubieta & Polaina, 2000
$\beta$ -D-glucosidasa	Actividad	epPCR	Selección usando sustrato cromogénico acoplado	McCarthy y col, 2004
$\beta$ -glicosidasa	Actividad	Shuffling family	Selección usando sustrato cromogénico	Kaper y col, 2004
Mutante de $\beta$ -glicosidasa (glycosilsintetas a)	Actividad	epPCR	Selección usando sustratos fluorogénico	Kim y col, 2004
Mutante de endoglucanasa (glicosilsintetas a)	actividad	Mutagénesis en casett	Complementación química	Lin y col, 2004

Fig.12 Tabla 4 Enzimas modificadas empleando técnicas de evolución dirigida.

Tomado de Zhang y col, 2006.

La arabinosa se encuentra unida por enlaces  $\alpha$ -(1,2) y  $\alpha$ -(1,3) como residuo sencillo o como una pequeña cadena. Esta cadena lateralmente, a la que se encuentra una xilosa con un enlace  $\beta$  -(1,2) o una galactosa en posición  $\beta$  -(1,5) arabinosa; la arabinosa también puede estar unida a la xilosa mediante un enlace  $\beta$  -(1,4). Los grupos acetilos se encuentran unidos a la cadena de xilosa en el carbono 2 o 3 por uniones  $\alpha$ .

El ácido glucurónico y su éster, el 4-O-metilo están unidos mediante un enlace  $\alpha$ -(1,2), mientras que los residuos de los ácidos ferúlico y *p*-cumárico se encuentran unidos a la arabinosa en el carbono 5 mediante un enlace éster (de Vries & Visser, 2001).

La frecuencia y composición de las ramificaciones en el xilano dependen de su origen y de su localización citológica.

Los xilanos procedentes de cereales presentan unidades de L-arabinosa, denominados arabinoxilanos, están unidos a la xilosa por medio de enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) o  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3) formando cadenas cortas a las que consecuentemente se pueden unir otros residuos como L- arabinosa, D-galactosa acetil, feruloil *p*-coumaroil y residuos de ácido glucurónico. El segundo componente de las hemicelulosas presente en maderas duras y suaves, son el galacto glucomanano (de Vries and Visser, 2001) y los glucomananos, compuesto por una cadena principal de unidades de D-manosa y D-glucosa con enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). En monocotiledóneas y algunas dicotiledóneas como la cebolla, la estructura más comúnmente encontrada son los xiloglucanos éstos están compuestos por unidades de D-glucosa unidas entre sí por medio de enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) con sustituciones de D-xilosa, L-arabinosa y D-galactosa, figura 13.

Los xiloglucanos interactúan con las microfibrillas de celulosa formando puentes de hidrogeno contribuyendo a la formación final de la estructura final de la celulosa. (fig. 2 y 7)(Carpita, 1993)

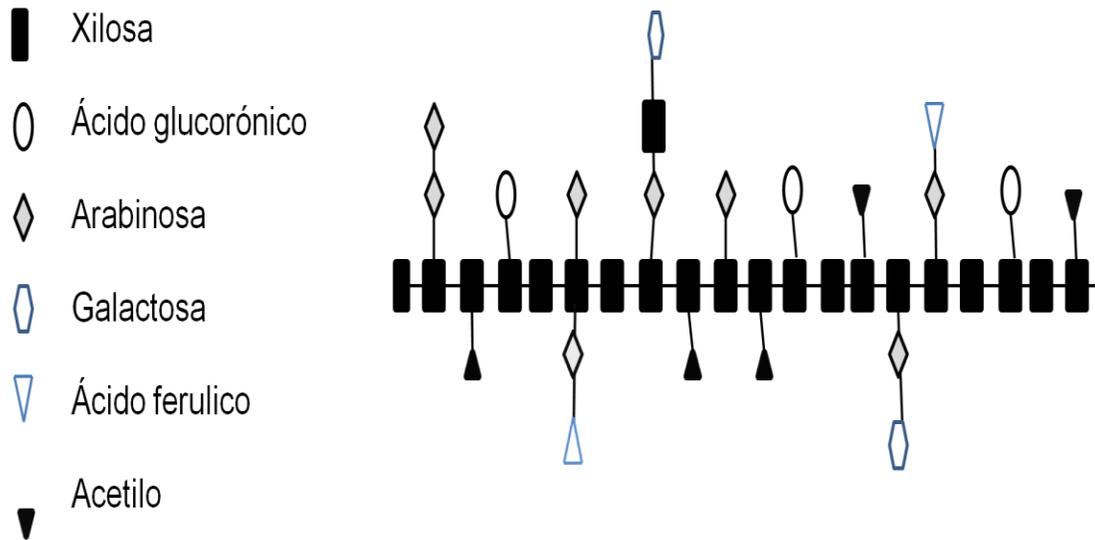


Fig. 13 Representación esquemática de los xilanos.  
Tomado de Carpita, 1993

El xilano aparece como el mayor constituyente de la interfase entre la lignina y otros carbohidratos en la pared celular secundaria en las plantas, en particular con las microfibrillas de celulosa y pectina vía interacción covalente y/o puentes de hidrógeno, lo cual, hace que los tejidos presenten una gran resistencia mecánica y biológica.

Debido a que la estructura de los xilanos es variada y compleja, además por su interacción con otros polímeros se hace aún más complicada, para lograr una hidrólisis más completa eficiente, es necesaria una diversidad de enzimas que actúen sobre ellos. Algunos mecanismos de acción enzimática no están aún totalmente entendidos.

La biodegradación de este polisacárido se realiza principalmente por medio de dos enzimas: Endoxilasas, (E.C.3.2.1.8) las cuales hidrolizan los enlaces  $\beta$ -(1→4), al interior

de la cadena de xilano, liberando los residuos de xilosa en pequeños oligosacáridos que pueden ser degradados por  $\beta$ -Xilosidasas (E.C. 3.2.1.37),  $\beta$ -endomananasas (EC 32178),  $\beta$ -manosidasas (EC 32125) (Civas, y col, 1984). Los mejores productores de estas enzimas son hongos de los géneros *Aspergillus* y *Trichoderma*.

#### I.9.-Pectina y pectinasas

El tercer componente encontrado en la pared celular de plantas es la pectina, durante muchos años fue considerada el polímero más sencillo de los componentes de la pared, figura 14. Sin embargo, ha demostrado ser uno de los más complejos.

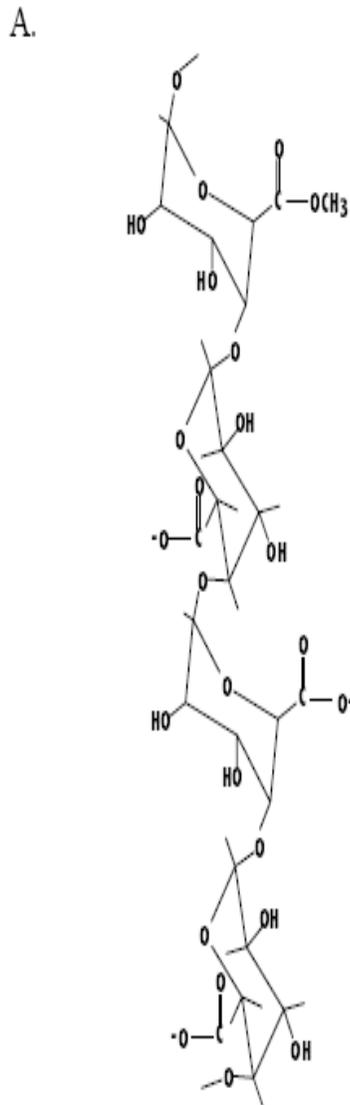
Este heteropolisacárido está constituido por tres dominios estructurales distribuidos en dos regiones (de Vries., y col. 1982 y Pérez., y col. 2000). La región lisa consiste en una cadena de compuesta por dos regiones principales denominadas homogalacturonano, en donde la cadena principal está formada por residuos de ácido  $\alpha$ -D-galacturónico unidos entre sí por enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), puede estar metilada en O6 y/o acetilada en posición O2 ó en O3, respectivamente.

La segunda región ramificada también llamada “región peluda”, es un heteropolímero en donde son identificadas dos regiones unidas por enlaces  $\alpha$ -1,4 denominado homogalacturonano (HG) y residuos de ramnosa unidos por enlaces  $\alpha$ -1,2 (ramnogalacturonano RGI y RGII) estos tres dominios se encuentran covalentemente unidos formando una especie de red.

La segunda región es un heteropolímero denominado Ramnogalacturonano I y II. El Ramnogalacturonano I (RGI) está formado por una cadena principal de unidades repetidas de ácido galacturónico y ramnosa unidos entre sí por enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) y  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), unidos a la ramnosa a por medio de enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 5) se encuentran residuos de arabinanos y

unidades de galactosa unidas a la ramnosa por enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) en los denominados arabinogalactanos.

A) Homogalacturonano



B) Ramnogalacturonano I y II

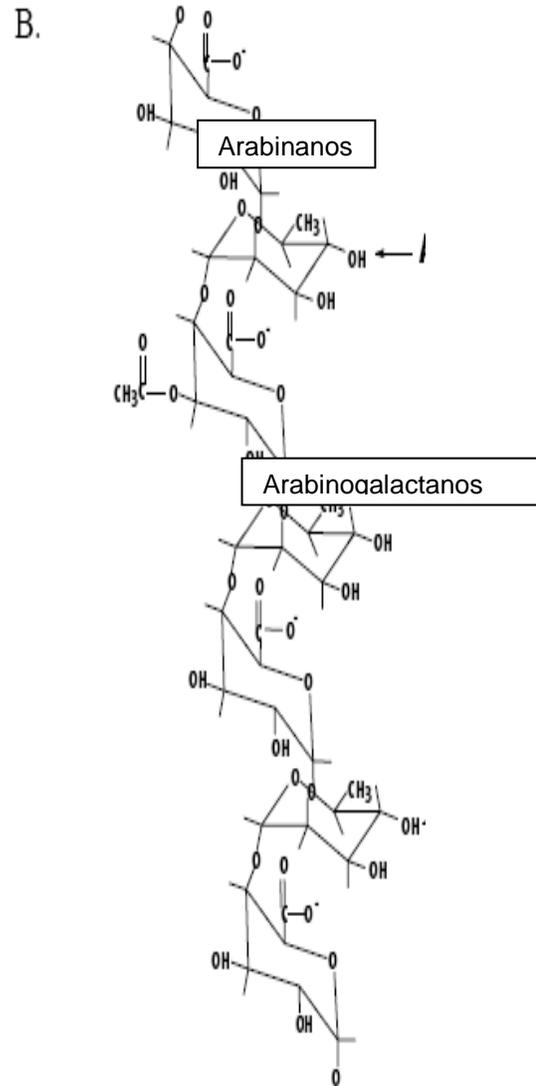


Fig. 14 Estructura de los componentes de la pectina.  
Tomado de Carpita y col, 1996 y de Parenicova, 2000.

En el ramnogalacturonano II (RGII) se encuentran azúcares poco comunes como D-xilopiranosido, D-glucopiranosido y L-fucopiranosido en el ramnogalacturonano II, D-ápioasa, O<sub>2</sub> metil D-xilosa y 2-O-metil L-fucosa están presentes.

En el ramnogalacturonano II (RGII) se encuentran azúcares poco comunes como D-xilopiranosido, D-glucopiranosido y L-fucopiranosido en el ramnogalacturonano II, D-ápioasa, O<sub>2</sub> metil D-xilosa y 2-O-metil L-fucosa están presentes.

Las concentraciones más altas de pectina en las plantas son observadas en la lámina media, con una disminución gradual cuando pasa a través de la pared primaria hacia la membrana plasmática.

La pectina contribuye a la adhesión de las células vegetales y también a la fuerza mecánica de la pared celular.

Las enzimas encargadas de degradar a la pectina se agrupan de igual manera que el sustrato, el homogalactano puede ser degradado por acción de pectin metil y acetil esterasas (E.C.3.1.1.1.1 y E.C.3.1.1.6), endopoligalacturonasas (E.C.3.2.1.1.5), exopoligalacturonasas (E.C.3.2.1.6.7), pectatoliasa (E.C.4.2.2.2) y pectinliasa (E.C.4.2.2.1.0) (Parenicova, 2000).

Para la degradación del ramnogalacturonano las enzimas reportadas son: una ramnogalacturonano hidrolasa producida por *Aspergillus aculeatus* y *A.niger*, ramnogalacturonano liasa, ramnogalacturonano ramnohidrolasa y una ramnogalacturonano galacturonhidrolasa todas producidas por *A. aculeatus*.

Además de las anteriores para la degradación de la pectina es necesaria la acción de las denominadas enzimas accesorias que incluyen:  $\alpha$ -arabinofuranosidasas, endorabinasas,  $\beta$ -

galactosidasa, endogalactanasa, feruloil y p coumaroil esterasas. (de Vries, 2001), al igual que muchos sistemas enzimáticos se ha demostrado que para la degradación completa de la molécula se necesita la acción sinérgica del complejo enzimático. (Parenicova, 2000 y de Vries, 2001).

1.10 Enzimas relevantes cuyas propiedades se han modificado empleando técnicas de evolución dirigida.

Hoy en día la industria de las enzimas es muy conocida gracias al rápido desarrollo de la biotecnología moderna en las pasadas cuatro décadas. Las enzimas han sido empleadas desde tiempos antiguos en la producción de productos alimenticios, como manufactura de quesos, pan, cerveza, vino y vinagre. Así como en productos para nuestra comodidad como curtido de pieles, elaboración de lino y el color índigo. (Linko, 1978, 1983; Lipinski, 1978; Mandels, 1982, 1985; Eveleigh, 1987; Chander & Singh, 1993, Subramaniyan y col, 2002, Pandey y col, 2000; Gutiérrez- Correa, 2003)

Muchos de estos procesos fueron realizados con enzimas producidas por microorganismos que crecieron espontáneamente y otras que se encontraban en preparaciones conocidas como la fruta de papaya o el rumen de bovinos. Las enzimas eran empleadas de forma empírica con los conocimientos generados tras años de uso.

El desarrollo de procesos de fermentación durante la pasada centuria específicamente en la producción de enzimas, ha sido enfocado especialmente en la selección y uso de cepas de microorganismos lo que ha hecho posible la manufactura a gran escala de

preparaciones enzimáticas bien caracterizadas. (Johnson, 1977; Lin y col, 1984, Subramaniyan y col, 2002, Vries, 2003, Camacho & Aguilar, 2003)

El desarrollo y empleo de tecnología de ADN recombinante a ayudado a mejorar aún más el proceso y hecho posible el uso comercial de enzimas que antes no era posible utilizar. Asimismo, la introducción de ingeniería de proteínas y mutagénesis dirigida, ha revolucionado el desarrollo de la industria enzimática.

Estos avances han hecho posible el empleo de enzimas hechas a la medida de las necesidades industriales, dando como resultado una gran diversificación industrial que continua creciendo y haciéndose cada día más compleja (Merivuori y col, 1985; Tan y col, 1987; Ayeen & Roche, 1989; Subramaniyan y col, 2002; de Vries, 2003).

Las enzimas con acción hidrolítica, útiles para la degradación de varias substancias naturales, han sido las más empleadas en la industria. Las proteasas son predominantemente el tipo de enzima más utilizada por su extendido empleo en la industria de los detergentes e industrias diarias.

Algunas carbohidrasas como amilasas y celulasas son usadas en la industria textil, almidón y panadería las que representan el segundo grupo (Godfrey 1996, Camacho & Aguilar, 2003). En figura 15, la tabla 5 se menciona las enzimas empleadas en la industria y sus aplicaciones.

El valor mundial estimado en el uso de enzimas industriales es de \$ 1 billón en 1995 y 1.5 en el año 2000. (Godfrey 1996)

## CELULASAS, HEMICELULASAS Y PECTINASAS EN BIOTECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Enzima	Función	Aplicación	REFERENCIA
Pectinasas, Celulasas Hemicelulasas.	Hidrólisis de pectina soluble y componentes de la pared celular, disminuyen la viscosidad y mantienen la textura del jugo de los frutos.	Mejoran en presión y extracción de jugos de frutos y aceite de olivos Liberan: sabor, enzimas, proteínas, polisacáridos, almidón y agar.	Galante y col., 1998b, Godfrey & West, 1996b, Uhlig, 1998
Poligalacturonasa y Pectintranseliminasa con poca Pectin estereasa y Hemicelulasa.	Hidrólisis parcial de protopectina e hidrólisis de pectina soluble a fragmentos de tamaño mediano; formación y precipitación de ácido; remoción de hidrocoloides de las fibras de celulosa.	Producción de jugo turbio de vegetales de baja viscosidad.	Grassin & Fauquembergue , 1996b Uhlig, 1998
Con mezcla igual de las 3 enzimas anteriores.	Hidrólisis completa de pectina. Polisacáridos secundarios y sustancias mucosas.	Clarificación de jugos de frutas.	Grassin , 1996b; Uhlig, 1998
Poligalacturonasa con alta Protopectinasa y poca Celulasa.	Hidrólisis completa de pectina Hidrólisis parcial de protopectina.	Clarificación de jugos de frutas. Pure de frutas de alta viscosidad.	Grassin y Fauquembergue , 1996b Uhlig, 1998
Pectinasa $\beta$ -glucosidasa Pectin estereasa.	Infusión de pectinasa y glucosidasa para facilitar el pelado y la firmeza de los frutos y vegetales. Procesamiento de fruta	Alteración en las propiedades sensorias de frutos y vegetales. Producción calidad de tomate Ketchup y pulpa de frutas.	Baker y col, 1989 Baker & Wicker, 1996 Crocco, 1976, Gunata y col, 1990, Javeri et al, 1991; Krammer y col, 1991; Marlatt y col, 1992; Pabst y col, 1991 Heldt-Hansen, 1997
Enzimas modificadas Arabinoxilanasas, (endoxilanasas, rompen enlaces	Modifican arabinoxilanos de Cereales y producción de arabinoxylooligosacáridos	Mejora en la textura, prolongan la vida y consistencia de productos de panadería.	Hamer, 1991; Kulp, 1993; Maat y col, 1992; Poutanen,

secundarios.			1997
Celulasas y Hemicelulasas	Hidrólisis parcial o completa de los polisacáridos y sustitutos Celulósicos de la pared celular	Mejoran la eficiencia del remojado aumentan absorción homogénea de agua en Cereales; mejoran calidad nutritiva de los alimentos Fermentados; aumentan la rehidratación de vegetales y sopas Secas; aumentan la producción de Oligosacáridos como ingredientes alimenticios y sustitutos bajos en calorías y conversión en Biomasa.	Beguin & Aubert, 1994 Bhat & Bhat, 1997, Mandels, 1985 Ryu & Mandels, 1980
Xilanasas y Endoglucanasas	Hidrólisis de arabinoxilanos y almidón.	Separación y aislamiento de almidón y gluten de la Harina de trigo.	Heldt-Hansen, 1997
Celulasas y Pectinasas	Liberan antioxidantes de frutos y vegetales pomáceos	Controlan enfermedades del corazón coronaria, arteriolas clorosis. Reducen el despojo alimenticio.	Meyer y col, 1998
Celulasas	Pulpa y industria del papel para manufacturar	Rayón, celofán, CMC, plásticos, lacas y otros	Casey, 1980 Chrisov & Prior, 1993

Fig. 15 Tabla 5 Enzimas empleadas en la industria y sus aplicaciones.  
Tomado de M.K. Bhat. *Biotech. Adv.* (2000) 18:358-359., Chrisov & Prior, 1993

## II.- OBJETIVOS y JUSTIFICACIÓN.

El presente estudio trata de profundizar el conocimiento de las celulasas, pectinasas y xilanasas, provenientes del hongo levaduriforme: *Aurobasidium* sp. CH-Y-TE18, aislado en este laboratorio y particularmente en su aplicación en la sacarificación de sustratos agroindustriales de desecho utilizando como fuente de carbono el bagacillo de caña de azúcar y la evaluación de los sistemas experimentales en biorreactores cuantificando los

azúcares reductores producidos en diferentes condiciones, de interés tanto para implementar su utilización práctica como para el conocimiento mismo.

### III.- ANTECEDENTES

III.1. Organismos celulolíticos estudiados en procesos de hidrólisis y sacarificación del bagazo de caña de azúcar.-

Las investigaciones sobre la hidrólisis y la sacarificación del bagacillo de caña de azúcar ha resultado de gran interés biotecnológico desde hace alrededor de 60 años, en respuesta a la crisis del petróleo, y la búsqueda de energías alternativas, desde entonces se ha venido desarrollando este campo con diferentes enfoques, que resumiremos en este capítulo.

Los estudios se han realizado en general, por medio de filtrados de organismos celulolíticos "In Vitro" (Mishra y col, 1984) y también efectuando procesos simultáneos de sacarificación y fermentación alcohólica (Niyri, 1973; Choudhury, 1980; Blanco, 1982; Ghosh y col, 1982; Miyakawa, y col, 1986; Tewari, 1988; Pandey y col, 2000)

El estudio de las celulasas utilizadas en la sacarificación de sustratos celulósicos, se inicia con el aislamiento, la caracterización de los organismos preferentemente bacterias y hongos celulolíticos, así como de sus filtrados, el organismo mas estudiado ha sido *Trichoderma reesei*, antes *Trichoderma viridae*, identificada como de *T.longibrachiatum* cepa Qm6a, que fue aislada en la segunda guerra mundial, proveniente del sudeste de Asia, por el equipo de Mary Mandels de Natick, USA.

Desde entonces mucho se ha avanzado en su estudio, en la producción de cepas hiperproductoras y el estudio del mecanismo sinérgico, tal es el trabajo de Bland S. Montenecourt, en 1983.

Se ha obtenido por manipulación genética todo un linaje de cepas hiperproductoras utilizadas en biotecnología a nivel industrial, las cuales son : QM9414 (Gupa y col,1973; Mandels y col, 1974; Andren y col, 1976; Mandels & Andreotti, 1978; Dwivedi & Ghose, 1979 y Mandels, 1982; Tewari, 1988); QM9123 (Mandels y col, 1974 y Mandels & Andreotti, 1978 y Tewari y col, 1988), ITCC1433 y no se especifica (Nyiri, 1973; Ladisch, 1979; Blanco y col, 1982; Mannonmani & Skreekantiah, 1987; Pandey y col, 2000; Gutiérrez- Correa, 2003).

Se ha realizado la sacarificación con los filtrados de la cepa QM9414 (Andren y col, 1976; Mandels & Andreotti, 1978); esta cepa agregando  $\beta$ -Glucosidasa comercial (Ghosh y col, 1982); también comparando ambas por separado (Tewari y col,1988); o bien, mezclando con otros filtrados provenientes de *Pestalotiopsis westerdijkii* QM381 (Mandels y col, 1974); *T. reesei* QM9414 con *Aspergillus wentii* (Dwivedi & Ghose, 1979); o *I. viridae* con *A. ustus* (Mannonmani & Skreekantiah, 1987).

Otras celulasas provienen de *Penicillium funiculosum* (Mishra y col, 1984); o de *Cellulomonas* (Dunlap & Calligan, 1969); en la producción de proteína microbiana con las cepas CSI-1 y CSI-17 de esta bacteria (Choudhury y col, 1980); también la cepa CSI-17 en pruebas de resistencia a productos de inhibición como glucosa, celobiosa, xilosa y etanol en la fermentación alcohólica (Choudhury y col, 1980).

Además de la actividad celulolítica se estudian otras enzimas como son las xilanasas y las pectinasas, encontrándose un campo de aplicación biotecnológico que hemos venido detallando.

Asimismo, se realizó la sacarificación o hidrólisis y la fermentación alcohólica simultánea (SSF), esta última combinando filtrados celulolíticos, pectinolíticos y xilanolíticos con *Saccharomyces cerevisiae* (Nyiri, 1973; Ghosh y col, 1982) y en un estudio con *Candida* sp. (Nyiri, 1973).

En cuanto al desarrollo tecnológico se proponen diferentes fermentadores en estados líquidos, semisólidos, sólidos- sumergida entre otros. (Gutiérrez- Correa, 2003)

Por ser tan extensos el estudio actual de la biotecnología de enzimas sobre este campo, seleccionamos solo los estudios en los que se utiliza el bagacillo de caña de azúcar clasificado como buen sustrato para la sacarificación o hidrólisis, ya sea entero, como médula o como fibra.

También, se compara con otros desechos celulósicos como el periódico molido (NEP), cáscara de arroz, cáscara de nuez, aserrín, entre otros, hasta 200 diferentes sustratos en donde se les clasifica como excelentes, buenos, regulares y malos (Mandels y col, 1974; Andren et. al 1976)

El porcentaje en que se utiliza el bagacillo de caña de azúcar varía del 0.5, 1, 3, 4, 4.5, 5, 7.5 y 10 %, siendo el más frecuente el 5 %. En todos los estudios previos se realizan pretratamientos del bagacillo de caña de azúcar tanto físicos, químicos o combinados. (Pandey y col, 2000)

Respecto a los resultados reportados tenemos los siguientes: la concentración de azúcares reductores obtenidos, varía en cada caso, pretratamiento, condiciones entre otras variables. Encontramos desde 14.9 hasta 26.3 g/l en molido en molino de bolas y con pretratamiento alcalino hasta 53 g/l. (Pandey y col, 2000). En cuanto al tipo de azúcares

reductores presentes se especifica en algunos casos la concentración de glucosa, celobiosa, xilosa e incluso en los casos de SSF, de etanol.

Por ejemplo sobre la sacarificación se reporta el 5.2 % sin pretratamiento, el 47.3 % en molido en molino de bolas a 48 horas; con pretratamiento alcalino del 50.4 al 55 % en 48 horas y solo químicamente, con ácido sulfúrico hasta el 94.7% en 15 minutos. (Pandey y col, 2000).

### III.2.-Microorganismos

Muchos microorganismos que incluyen bacterias, actinomicetos y otros hongos pueden producir y secretar celulasas. Las principales cepas productoras de celulasas son: *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, de las cuales la más popular es *Trichoderma reesei*, desde su descubrimiento por Reese en Ainsworth y colaboradores en 1973, quienes clasifican a este género.

El estudio de celulasas se vuelve un reto y para 1985, Douglas E. Eveleigh, escribe un capítulo de *Trichoderma* sobre la biología de los microorganismos industriales y Mary Mandels, amplía las perspectivas sobre la aplicación de celulasas.

Desde los años 60 esta cepa ha sido sometida a muchos programas de mejoramiento a partir de la cepa silvestre *T. reesei* QM6a, de los cuales se han obtenido mutantes con mayor productividad (Montenecourt, 1983), (figura 16, esquema 6).

De todas ellas las más estudiadas han sido la QM 9414, Rut C30 y MCG 77. Estas cepas pueden producir grandes cantidades de endo- y exoglucanasa, pero son deficientes productoras de  $\beta$ -glucosidasa (Stockto y col, 1991 y Duff y col, 1987).

Por otro lado, las celulasas producidas por *Aspergillus* cepas tales como *A. niger* and *A.phoenicis* son pobres en la hidrólisis de materiales celulósicos pero son muy buenos productores de  $\beta$ -glucosidasa (Duff y col, 1987 y Deschamps y col, 1984).

De modo que cepas de *Trichoderma* y *Aspergillus* podrían ser empleadas conjuntamente por ejemplo a través de la utilización de la fermentación en estado sólida para el aprovechamiento de desechos celulósicos para la producción de celulasas. (Cen & Xia, 1999).

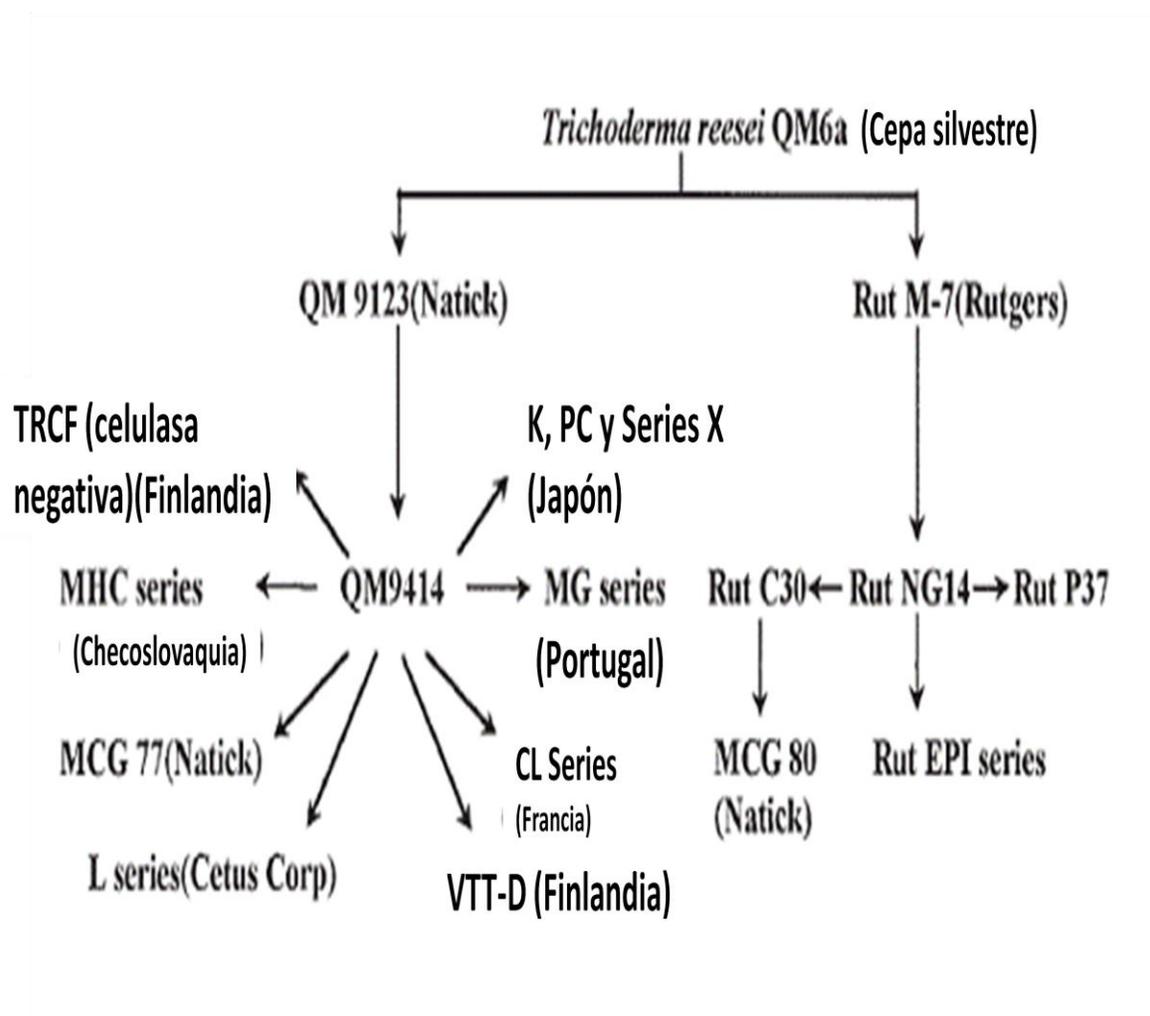


Fig. 16 Esquema. Programa mundial de desarrollo de mutantes de *Trichoderma reesei*. Tomado de Cen. & Xia, 1999, Montenecourt, 1983.

### III.3.-Antecedentes sobre el género *Aureobasidium* sp.

Desde los años 60's, del siglo pasado, se han venido estudiando un gran número de microorganismos extraídos de su hábitat natural que han sido seleccionados naturalmente por sus atributos biológicos, tal es el caso de algunas especies y cepas del género *Aureobasidium* sp. (Descrito por Viala y Bayer, 1891. Berkhout, 1923), hongo levaduriforme que produce enzimas extracelulares las cuales pueden ser colectadas en el medio donde se desarrolla.

En esta parte de nuestro estudio, realizamos una revisión acerca de los autores que han investigado este género y que ahora les presentamos con las controversias y acuerdos del caso. (Google 724 a 338 000 citas, identificadores: Biodiversity Heritage Library

[NamebankID:](#) [3915888](#), [GloballyUniquelIdentifier:](#) [urn:lsid:indexfungorum.org:names:101771](#), [Zipcode Zoo Species Identifier:](#) **3289461**).

La descripción taxonómica del género *Aureobasidium* se muestra en la figuras 17.

<b>Taxonomía y Clasificación de <i>Aureobasidium</i> sp.</b>	
<b>Dominio</b>	<i>Eukaryota</i> Whittaker & Margulis, 1978
<b>Reino</b>	<i>Fungi</i> T.I. Jahn & F.f. Jahn, 1949 Ex R.t. Moore, 1980
<b>Subreino</b>	<i>Dikarya</i> D.s. Hibbett Y col., in D.s. Hibbett Y col., 2007
<b>Phylum</b>	<i>Ascomycota</i> H.c. Bold, 1957 Ex T. Cavalier-Smith, 1998
<b>Subphylum</b>	<i>Pezizomycotina</i> O.e. Eriksson & K. Winka, 1997
<b>Class</b>	<i>Dothideomycetes</i> O.e. Eriksson & K. Winka, 1997
<b>Subclass</b>	<i>Dothideomycetidae</i> P.m. Kirk Y col., 2001 Ex C.I. Schoch Y col., 2006
<b>Order</b>	<i>Dothideales</i> Lindau, in Engler & Prantl, Eds., 1897
<b>Family</b>	<i>Dothioraceae</i> Theiss. & H. Syd., 1917
<b>Genus</b>	<i>Aureobasidium</i> , sp Viala y Boyer, 1891. Berkhout, 1923
<b>Especie</b>	<i>no identificada</i>

Fig. 17 Esquema de la Taxonomía y Clasificación de *Aureobasidium* sp.

Tomado de Enciclopedia Wikipedia, 2010, ZipcodeZoo 2011 y modificado por E. Ochoa en este trabajo.

Son varias las especies estudiadas, sin embargo, *A. pullulans* es la más conocida en cuanto a hábitat, condiciones de producción y manipulada e incluso hasta su diversidad intraespecífica por rangos amplificados polimórficos de DNA (RAPD). (Urz'ı y col, 1999)☒

Como otros hongos su papel en la naturaleza dentro de la red trófica o pirámide alimenticia es la de descomponedores y transformadores de organismos, se han venido estudiado ampliamente desde fines del siglo XIX, en la figura 18 se señalan las 22 especies y subespecies o variedades.

22 Especies y subespecies del Genero <b><i>Aureobasidium</i></b>		
1.- <i>A. aleuritıs</i>	2.- <i>A. apocryptum</i>	3.- <i>A. dalgeri</i>
4.- <i>A. foliicola</i>	5.- <i>A. harposporum</i>	6.- <i>A. indicum</i>
7.- <i>A. liliı</i>	8.- <i>A. microstictum</i>	9.- <i>A. prunicola</i>
10.- <i>A. pullulans</i> <i>var.melanigenum</i>	11.- <i>A. pullulans var.</i> <i>melanogenum</i>	12.- <i>A. pullulans var.</i> <i>aubasidani</i>
13.- <i>A. pullulans var.</i> <i>pullulans</i>	14.- <i>A. pullulans</i> <i>var.pullulans</i>	15.- <i>A. ribis</i>
16.- <i>A. sanguinariae</i>	17.- <i>A. umbellulariae</i>	18.- <i>A. vaccinii</i>
19.- <i>A. vitis</i>	20.- <i>A. vitis album</i>	21.- <i>A. vitis var.</i> <i>tuberculatum</i>
22.- <i>A. vitis var. vitis</i>		

Fig. 18 Esquema 22 especies y subespecies del genero *Aureobasidium* sp.  
Tomado de ZipcodeZoo 2011 y modificado por E. Ochoa para este trabajo.

Ya que este género *Aureobasidium* sp es un hongo levaduriforme, con un ciclo de vida en cuyos estadios presenta diferente morfología, color y condiciones de desarrollo, se ha caído en sinonimias como se muestra en la figura 19.

<b><u>Sinónimos de <i>A. pullulans</i></u></b>		
<i>Aureobasidium oleae</i> (Castagne) Subram. 1971	<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) G. Arnaud 1918	<i>Azymocandida malicola</i> (D. S. Clark & R. H. Wallace) E. K. Novak & Zsolt 1961
<i>Candida malicola</i> Viala & G. Boyer 1891	<i>Cladosporium pullulans</i> (De Bary) Sacc. & Trotter 1913	
<i>Exobasidium vitis</i> (Viala & G. Boyer) Prill. & Delacr.	<i>Hormonema oleae</i>	
<i>Pullularia fermentans</i> var. <i>fermentans</i> E. S. Wynne & Gott 1956	<i>Hormiscium oleae</i> (Castagne) Sacc. <i>Hormonema pullulans</i> /i> (De Bary & Lawenthal) Lagerb. & Melin Ex Robak 1932	
<i>Torula oleae</i> Castagne 1845	<i>Pullularia fermentans schoenii</i> E. S. Wynne & Gott 1956	
	<i>Torula schoenii</i> Roukhelman	<i>Dematium pullulans</i> de Bary & Lawenthal
		<i>Hormonema pullulans</i>
		<i>Pullularia pullulans</i> (De Bary & Lawenthal) Berkhout 1923

Fig. 19 Esquema de Sinonímias para la especie *Aureobasidium pullulans*.

Tomado de Enciclopedia Wikipedia.-2010, ZipcodeZoo 2011 y modificado por E. Ochoa para este trabajo.

Algunos autores identifica a este género como productor de pectinasas y principalmente de xilanasas pero no de celulasas (Leathers, 1986).

Otros autores, han estudiado su potencial celulolítico, probando el efecto del complejo extracelular enzimático celulolítico crudo de *Trichoderma reesei*, QM 9414 y sus mutantes M 6 y MHC 22, a una concentración de 1.5 mg/ml sobre la morfología de varias levaduras entre ellas *Aureobasidium pullulans* en la estabilización del medio osmótico en donde reportan lisis espontánea y lisis después de diluir en agua, en tiempos cortos de 4 y 20

horas, demostrando así las semejanzas y diferencias con los componentes de *T. reesei* degradadores de la pared celular. (Kolarova & Farkas, 1981)

Este género ha sido estudiado dentro de un gran grupo de microorganismos con potencial para ser manipulados en la producción de enzimas industrialmente, Phaff, 1982, Zhenming y col, 2009, como podemos observar en la figura 21, las enzimas que producen algunas especies y cepas de *Aureobasidium sp.*, con su aplicación a nivel industrial.

También se ha estudiado la fuente de nitrógeno, el efecto de la concentración del ión amonio en la producción de *Aureobasidium pullulans* en cultivos en lote. (Seviour & Kristiansen, 1983)

#### III.4.a-Sobre la producción de xilanasas.

De los estudios encontrados para este género, los más abundantes son para la producción de xilanasas. Debido a que este género presenta diferentes coloraciones que van de crema al naranja aunque incluso se ha reportado gamas de colores entre púrpura y violeta, ya sea brillante u opaco. Así es que, se trató de relacionar la coloración más fuerte, con la producción de una proteína de 20 a 21 kilodantones asociada a la sobreproducción de xilanasas, postulando que a mayor coloración habría mayor contenido de xilanasas, sin embargo, no se ha podido comprobar dicha relación. Se ha observado que la mayoría de los cultivos de *A. pullulans* no muestran actividad celulolítica y se reporta a esta cepa como no productora de celulasas. (Dennis and Buhagiar 1973; Deshpande y col.1992; Leathers 1986; Buzzini and Martini 2002)

También, se han utilizado xilanasas producidas por *A. pullulans* para disolver xilanos de pulpas tratadas en donde la mayor concentración de azúcares reductores, 0.045 mg/ml,

con 1.81% de pentosas fue utilizando 1500 U xilanas por 24 horas, en donde la presencia de glucosa inhibe la actividad. (Christov & Prior, 1993)

Como se puede observar en la figura 20, se ha llegado a estudiar la sobreproducción inducida por cambios genéticos, la purificación y propiedades de la familia 10 xilanas de *Aureobasidium pullulans* ATCC20524 y la caracterización de los genes involucrados en esta actividad. (Tanaka y col, 2005)

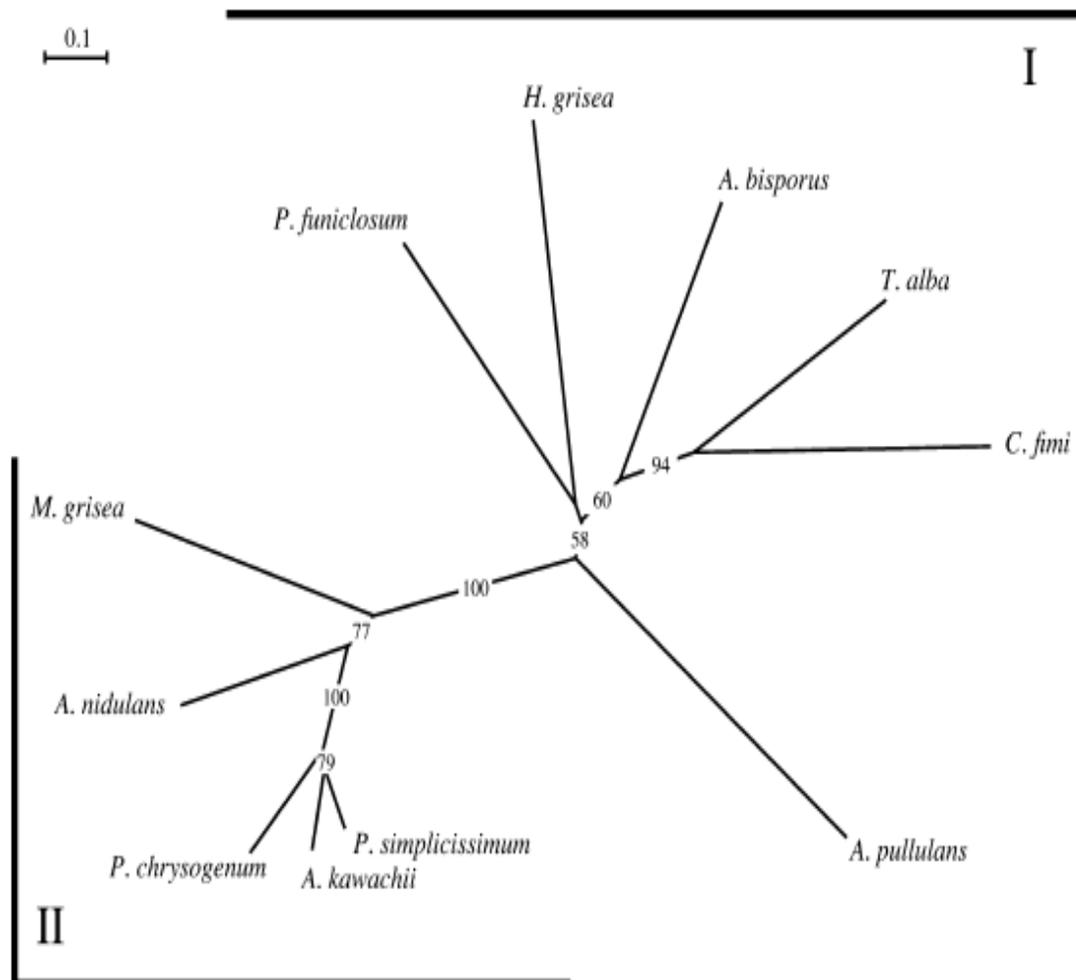


Fig. 20 Esquema 10 Árbol filogenético que muestra la relación de los dominios catalíticos entre *Aureobasidium pullulans* XynII y otras xilanasas homólogas. Tomado de Tanaka y col, 2005

## II.5. Sobre la producción de $\beta$ -glucosidasa

Se han llevado al cabo estudios sobre la producción, purificación y propiedades de la  $\beta$ -glucosidasa termostable de una cepa de color *Aureobasidium pullulans*, se probaron en la producción, diferentes fuentes de carbono, como celobiosa, xilosa, arabinosa lactosa, sacarosa, maltosa, glucosa, xilitol, xilanos, celulosa, almidón y pullulano, produciendo la actividad de  $\beta$ -glucosidasa, la cual fue purificada del caldo del cultivo libre de células, crecido en maíz.

Se purificó en cromatografía columnar de biogel y Sefacril, se encontró que es una glicoproteína con un peso molecular de 340,000, D compuesta por dos subunidades con un pm de 165,000 D. La enzima tiene una actividad óptima a 75° C de temperatura y un pH de 4.5, tiene una actividad específica de 315 U/mol. Esta enzima mostró actividad contra celotriosa, celotetrosa, celopentosa, celohexosa y celoheptosa e inhibida con glucosa mientras que fructuosa, arabinosa, galactosa, manosa, xilosa, sacarosa y lactosa no demostraron actuar como inhibidoras. No requiere de metales para su actividad y no fue afectada por p-cloromercuribenzoato o ditiotreitól. (Saha y col, 1994)

Se ha demostrado la interacción sinérgica con celulasa para aumentar la eficiencia de la producción de glucosa de celulosa proveniente de la celobiosa. Esta  $\beta$ -glucosidasa, pueden ser utilizadas en la hidrólisis enzimática de celulosa de fibra de maíz u otra biomasa celulósica para la subsecuente producción de etanol. La alta actividad de la  $\beta$ -glucosidasa de *A. pullulans*, para convertir una variedad de celo oligosacáridos en celobiosa, la alta tolerancia al substrato, la no dependencia a compuestos con iones metálicos o tiol compuestos, y su alta termoactividad hacen a esta enzima como probable candidata a la aplicación en la hidrólisis enzimática de celulosa a glucosa. (Saha y col, 1994)

Asimismo, se ha realizado el intento de relacionar la coloración de las colonias con la producción de  $\beta$ - glucosidasa

Esta especie se ha estudiado ampliamente como productora de diferentes enzimas amilasas, pectinolíticas, xilanolíticas, mannosíticas y  $\beta$ -glucosídicas. Un hecho importante es que crecido en jugo de naranja y en la industria vitivinícola para probar actividad xilanolítica y de  $\beta$ - glucosidasa, soporta bien los medios ácidos. En el caso de pruebas con enzimas crudas, se encontró que soporta bien las altas temperaturas, lo cual tiene un gran significado para la producción industrial, bajando costos. (Iembo y col, 2002)

También se ha realizado un estudio para distinguir las especies en *Aureobasidium* y los géneros relacionados por ribotificación por PCR, en donde se muestra el árbol genealógico y su parentesco con otros géneros, como se muestra en el esquema 8. (Yurlova y col, 1996)

<b>BIOPRODUCTOS</b>	<b>APLICACIONES</b>	<b>REFERENCIAS</b>
<b>Sideróforo</b>	Medicina, recobro de metales y remediación de basureros.	Wang y col, 2008
<b>Biocontrol</b>	Inhibición de organismos no deseados en frutas, granos y vegetales.	Mounir y col, 2007
<b>Pullulano</b> <b>Polisacárido polimérico formado por unidades de maltotriosa, producido a partir de almidón.</b>	Membranas y fibras oxigenadas delgadas o extendidas o adhesivas o encapsuladas, alimentos bajos en calorías: películas comestibles para refrescar el aliento, productos de higiene bucal como Listerine Cool Mint PocketPaks. Aditivo, número E E1204. En farmacia: anticoagulantes, antitrombóticos y actividad antiviral, materiales para la industria química.	Duan y col, 2008, Wikipedia
<b>Amilasas</b>	Licuefacción del almidón y sacarificación. Diseño textil, aditivos para detergentes, producción de etanol, químicos para análisis	Chi y col, 2001, Gupta y col,

	médicos y clínicos, producción de jarabe de alta fructuosa. Producción de células de levaduriformes y otros microorganismos.	2003
<b>Celulasas</b>	Mejoramiento de fibras celulósicas, sustitución de piedra pómez en pretratamientos “lavado de piedras”, aditivos de detergentes, producción de proteína unicelular y bioenergéticos, tratamientos de basura.	Zhang & Chi, 2007
<b>Lipasas</b>	Catálisis de un gran rango de reacciones, incluida hidrólisis, inter-esterificación, alcoholisis, acidólisis, esterificación y aminólisis. Producción de biodiesel.	Hasan y col, 2006
<b>Proteasas alcalinas</b>	Detergentes aditivos en industria peletera, recobro de plata, propósitos médicos, procesos de alimentos, industria química, tratamientos de basura, digestión de proteína.	Ni y col, 2008 a,b
<b>Xilanasas</b>	Papel, fermentación e industria alimenticia y en el tratamiento de desechos.	Li y col, 1993
<b><math>\beta</math>-Fructofuranosidasa y Maltosiltransferasa</b>	Alivio del estreñimiento, mejoramiento de la composición de lípidos de la sangre en hiperlipidemias, mejora en la absorción de calcio y magnesio, supresión de la producción intestinal de sustancias putrefactoras en humanos y animales, factor del crecimiento por bifidobacterias. Sabor dulce y de fácil producción comercial.	Yoshikawa y col, 2007, Yun y col, 1997
<b>Mananasas</b>	Blanqueado de la pulpa en la industria del papel, bioconversión de desechos en biomasa a azúcares fermentables, mejora en alimento animal y reducción de la viscosidad de extractos de café, producción de mananoligosacáridos.	Lin & Chen, 2004
<b>Proteína unicelular</b>	Alimento animal y humano, fuente de proteína para la producción de péptidos bioactivos.	Gao y col, 2007, Chi y col, 2008

Fig. 21 Tabla de Bioproductos de *Aureobasidium pullulans* y sus aplicaciones potenciales Tomado de Zhenming y col, 2009. Enciclopedia Wikipedia

### III.6. Microorganismos en el laboratorio

En nuestro laboratorio una línea de investigación se ha enfocado a la búsqueda de sistemas biológicos celulolíticos seleccionados de manera natural a través del tiempo en los lugares donde se producen los desechos agroindustriales, tal es el caso del hongo levaduriforme *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18, aislado por nuestro grupo en el estado de Morelos (Gilbon y col, 1981; Huitrón y col, 1984).

Este microorganismo ha resultado ser una cepa celulolítica verdadera que tiene potencial práctico ya que sintetiza el sistema multienzimático capaz de degradar a la celulosa microcristalina en las condiciones establecidas por Mandels (Mandels & Reese, 1964; Linko, 1983; Eveleigh, 1985 y Mandels, 1985).

Es importante destacar que en pruebas de patogeneidad resulto no ser patógeno en ratones de laboratorio.

Se seleccionó *Aureobasidium* sp CH-Y-TE18, en base a la velocidad de disgregación del papel filtro y a la actividad celulolítica extracelular producida cuando crece en celulosa microcristalina como única fuente de carbono. Para su selección, también se comparó bajo las mismas condiciones con la cepa silvestre de *Trichoderma viridae*, encontrándose que ambos microorganismos producen actividades similares. Sin embargo, *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18 produce mayor cantidad de enzima en tiempos más cortos (Acuña, 1983y 1991; Larios y col, 1981; 1982; Gilbon y col, 1979, 1981; García, 1983; Huitron, 1984, 1986).

La cepa CH-Y-TE18, se ha observado en microscopia electrónica y presenta las siguientes características: es un microorganismo levaduriforme, no presenta micelio aéreo y en

cultivo sumergido con celulosa microcristalina no forma esférulas de micelio en el sustrato.

Las colonias son de consistencia cremosa, inicialmente de color rosa tenue y gradualmente el tono va aumentando hasta llegar a ser anaranjado. Este microorganismo fue identificado como un hongo levaduriforme perteneciente al género *Aureobasidium* sp CH-Y-TE18 (Gilbon y col, 1986).

Además de que es capaz de utilizar el bagacillo de caña de azúcar esterilizado como única fuente de carbono, también es capaz de crecer en otras fuentes de carbono tanto soluble como insoluble. Asimismo, crece y produce celulasas y xilanasas en medios simplificados a base de sales minerales de grado industrial y agrícola y agua de la llave (Acuña, 1983).

Se encontró que la urea y el Tween 80 son los compuestos más determinantes en la producción de celulasas por este hongo. La presencia de Tween 80 en el medio de cultivo incrementa la producción de enzimas. Una elevada concentración de urea tiene un efecto negativo sobre la producción de la actividad celulolítica y no sobre el microorganismo (Larios, 1979).

## IV.-MATERIAL Y METODOS

### IV.1.-Microorganismo

El microorganismo utilizado en este trabajo fue el hongo levaduriforme *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18, aislado y seleccionado de suelo de cañaveral en el estado de Morelos. Es un microorganismo celulolítico verdadero capaz de crecer en celulosa microcristalina y bagacillo de caña como únicas fuentes de carbono (Gilbón y col, 1981).

#### IV.1.2.Propagación del microorganismo

El microorganismo fue propagado y conservado en tubos que contienen agar de papa dextrosa (PDA) suplementado con 0.25 % de agar bacteriológico y esterilizado a 121 °C por 20 min. La cepa se incubó a 29 °C durante 72 h.

#### IV. I.3.-Producción de enzimas.-

Para la producción de enzimas se utilizó el medio A que contiene en g/L:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.0%; urea, 0.9 %;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.3%;  $\text{CaCl}_2$ , 0.3%. A cada 100 ml de este medio se le agregaron 0.4 ml de una solución de elementos traza que contenía en (mg/L):  $\text{CoCl}_2$ , 2.0%;  $\text{MnSO}_4$ , 1.6%;  $\text{FeSO}_4$ , 5.0%;  $\text{ZnCl}_2$ , 1.7%. Como fuentes de carbono se utilizaron la celulosa microcristalina y bagacillo de caña de azúcar, la concentración de cada una de esta se da en las respectivas figuras. El pH del medio se ajustó a 4.6 y se esterilizó a 121 °C por 20 min.

#### IV.I.3.a.-Inóculo

La preparación del inóculo para los experimentos en matraces, se realizó creciendo la cepa en medio PDA durante tres días a 29 °C. Al cabo de ese tiempo las esporas se cosechan con solución salina isotónica hasta que la suspensión obtenida tenga una densidad óptica de 5.0. A menos que se indique lo contrario, se adicionaron 1.0 ml de esta suspensión por cada 100 ml de medio.

#### IV.I.3.b.-Condiciones de crecimiento y producción

Los experimentos a nivel de matraz se realizaron en matraces Erlenmeyer de 500 ml o en matraces Fernbach, conteniendo 200 ml y 1 L de medio, respectivamente. Los matraces fueron incubados a 29 °C en una agitadora orbital a 180 rpm. Para los experimentos de

producción en fermentador se utilizó un fermentador Labroferm (Newbrunswick Sci. USA) de 14 Litros de capacidad nominal y 10 L de volumen de trabajo.



Fig.22 Biorreactor de 14 L. New Brunswik Sci. USA, Mod. Labroferm, utilizado para la caracterización completa de la cinética de hidrólisis.

El fermentador se preparó con 9 Litros de medio A con bagacillo de caña como fuente de carbono. Se operó a una agitación a 200 rpm, 1 vvm de volumen de aire suministrado y temperatura de 29 °C. En este caso, el inóculo se desarrolló en un matraz Fernbach conteniendo 1 L del mismo medio inoculado con 10 ml de suspensión microbiana. Este matraz se incubó a 29 °C con agitación de 180 rpm durante 24 h, al cabo de las cuales el contenido del matraz fue transferido en condiciones asépticas al fermentador.

En todos los casos, se tomaron muestras a lo largo de la fermentación las cuales fueron centrifugadas a 3500 rpm, por tiempo y temperatura el sobrenadante se utilizó para la determinación de las actividades enzimáticas correspondientes.

#### IV.1.4.Sacarificación.

Una vez obtenidas las enzimas, por diferentes procedimientos, se procedió a realizar los experimentos de sacarificación. Estos fueron llevados a cabo en tubos de ensayo para la evaluación de tiempos cortos de reacción y en matraces de 200ml y en un bioreactor de 1 litro de capacidad, marca Applikon Biotechnology, Mex. Modelo ADI-1030



Fig.23 Biorreactor de 1L, utilizado para la sacarificación del Bg por el filtrado liofilizado concentrado de *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18.

El sistema de reacción consta de bagacillo de caña suspendido en solución amortiguadora y adicionado de filtrado enzimático obtenido. La concentración del bagacillo, así como el tipo de buffer, su concentración y la relación enzimas sustrato se dan en las figuras

correspondientes.

Se utilizó bagacillo de caña de azúcar nativo como fuente de carbono, el pretratamiento físico fue la esterilización por 20 minutos, a una presión de 121 psi en las pruebas a tiempos largos en matraz en la mayoría de los casos, o bien lavado. En otras pruebas se utilizó sin pretratamiento alguno, ni físico ni químico.

Se evaluaron otras variables como temperatura, uso de agentes tensoactivos y conservadores, pretratamientos y tamaño de partículas. Los detalles de cada una de estas variables se especifican en las figuras correspondientes. El seguimiento de la hidrólisis enzimática se realizó midiendo la concentración de los azúcares reductores a lo largo de cada experimento.

#### IV.1.5.Determinación de las actividades enzimáticas.

##### IV.1.5.a.Actividad celulolítica en papel filtro.

Se determinó utilizando papel filtro como sustrato. Para el ensayo una tira de 50 mg de papel filtro Wathman N° 1 se depositó al fondo de un tubo de ensayo al que se le adicionaron 1.5 ml de solución amortiguadora de citratos 0.1 M, pH 4.8 y 0.5 ml de muestra. La mezcla de reacción se incubó en un baño termostático a 50°C, después de este tiempo a esta mezcla se le adicionaron 3.0 ml del reactivo de DNS (Miller, 1959) y los tubos se sometieron a ebullición durante 5 min y se diluyeron con agua para alcanzar un volumen final de 20 ml. Los tubos fueron leídos en un espectrofotómetro (Hitachi Mod. 100-40, Japan) a una longitud de onda de 550 nm. Como blanco de reacción se utilizaron muestras inactivadas por ebullición durante 5 min en lugar de muestras activas. Una

unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar una  $\mu\text{mol}$  de glucosa a partir de papel filtro, en las condiciones de ensayo.

#### IV.1.5.b.-Determinación de actividad celulolítica sobre carboximetilcelulosa, (CMC).

Se utilizó la metodología previamente reportada (Miller, 1960; García, 1983). La mezcla de reacción contenía 1.5 ml de carboximetilcelulosa 0.75% en buffer citratos 75mM, pH 4.8 y 0.5 ml del filtrado enzimático correspondiente. La mezcla se incubó durante 1 hora a 50 °C. Los azúcares reductores producidos fueron cuantificados por el método de DNS como se ha descrito para los otros métodos. Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima necesaria para liberar una  $\mu\text{mol}$  de glucosa a partir de CMC, en las condiciones de ensayo.

#### IV.1.5.c.Actividad exopectinolítica.

Se determinó por la cuantificación de azúcares reductores liberados de pectina por el método de DNS utilizando una curva estándar de ácido galacturónico. El sistema de reacción consistió de 0.7ml de pectina al 0.9% (p/v), 1.0 ml de buffer de acetatos 0.17 M a pH 5.0 y 0.3 ml de filtrado enzimático libre de células. La mezcla se incubó a 45 °C durante 1 hora. Al término del tiempo se adicionaron 3 ml de DNS y se calentó la mezcla a ebullición por 5 min, se le añadieron 15 ml de H<sub>2</sub>O destilada y se leyó a una longitud de onda de 550 nm en un espectrofotómetro (Hitachi Mod. 100-40, Japan). Una unidad (U) de actividad exopectinolítica se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de 1 $\mu\text{mol}$  de ácido galacturónico en 60 min bajo las condiciones de ensayo.

#### IV.1.5.d.-Actividad xilanolítica.

La actividad xilanolítica se determinó por la cuantificación de los azúcares reductores liberados del xilano por el método de DNS usando una curva de xilosa como patrón, obtenidos después de la incubación de: 1.5 ml de xilano de lardo abedul (Sigma Chemical Co.) al 0.75% (w/v) en buffer citratos 75 mM a pH 4.8 y 0.5 ml del filtrado enzimático libre de células a 50 °C durante 15 min. Al término del tiempo se le adicionó 3.0 ml de DNS y se calentó la mezcla a ebullición por 5 min., se le añadieron 15ml de H<sub>2</sub>O destilada y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm en un espectrofotómetro (Hitachi Mod. 100-40, Japan). Se interpolaron los valores obtenidos en una curva estándar de xilosa. Una unidad (U) de actividad xilanolítica se define como la cantidad de enzima necesaria para catalizar la producción de 1 μmol de xilosa en 15 min bajo las condiciones de ensayo.

#### IV.1.5.e.-Determinación de la Actividad de β-Glucosidasa.

Esta actividad fue determinada por el método previamente reportado (García, 1983). El sistema de reacción se componía de 0.25 ml de solución de P-nitrofenol-β-D-glucósido (PNFG) 6.0 μM en buffer de citrato 0.1 M a un pH de 4.8, 0.5 ml de buffer citrato 100 mM pH 4.8 y 0.25 ml de filtrado enzimático. Esta mezcla se incubó a 50 °C durante 10 min. Al cabo de ese tiempo una alícuota de 0.2 ml fue retirada de cada tubo y adicionada a tubos que contienen 4.8 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.1M y se lee la absorbancia en un espectrofotómetro a 420 nm. La concentración de p-nitrofenol liberado se utilizó una curva estándar de p-nitrofenol (PNF). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que libera una μmol de PNF bajo las condiciones de ensayo.

#### IV.5.f.-Actividad endo-pectinolítica.

La actividad de la enzima se determinó por el cambio de viscosidad que se produce en una solución de pectina al 1% (p/v) y una solución amortiguadora de acetatos 100 mM a pH 4.2 con NaCl (0.03 % p/v), se utilizó un viscosímetro de Oswald. La reacción se inició al adicionar 0.5 ml de fracción extracelular a 10 ml de la solución de pectina y se incubó a 30°C, se midió el tiempo de reacción así como el tiempo que tardó en fluir la solución. La actividad se expresó en unidades enzimáticas (U), se define como la cantidad de enzima que redujo en un 50 % la viscosidad relativa de la solución de pectina en las condiciones de ensayo.

#### IV.6.-Técnicas analíticas generales.-

##### IV.6.a.-Determinación de azúcares reductores

Los azúcares reductores fueron determinados por el método de DNS (Miller, 1959). La mezcla de reacción constó de 0.1 ml de muestra, 0.9 ml de H<sub>2</sub>O destilada, 3 ml del reactivo del ácido dinitrosalicílico (DNS); la mezcla fue puesta en ebullición por 5 min, se le añadieron 15 ml de H<sub>2</sub>O destilada y se leyó a una longitud de onda de 550 nm en un espectrofotómetro (Hitachi 100-40, Japan). La concentración de azúcares reductores fue calculada utilizando una curva estándar de glucosa.

##### IV.6.b.-Determinación de proteína

La cuantificación de la concentración de proteína en la muestra se determinó por el método de Lowry (Lowry y col, 1951).

## V.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### V.1.-Producción de enzimas.-

El género *Aureobasidium* ha sido objeto de estudio por otros autores también para la producción de celulasas y otros metabolitos (Seviur & kristiansen, 1983; Leathers, 1986; Christov & Prior, 1993; Yurlova y col, 1996; Gupta y col, 1973 2003; Zhang y col, 2006 2007?; Moisiej y col, 2007; Wang y col, 2008; Zalar y col, 2008; Chi y col, 2009).

La cepa de *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18 fue aislada y seleccionada por su capacidad para crecer sobre sustratos celulósicos y producir celulasas y xilanasas (Larios y col, 1982; Gilbon y col, 1986).

#### V.1.a.Efecto de la concentración del inóculo.

*Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18 crece bien en diversos sustratos celulósicos y nos interesaba evaluar la producción de celulasas, xilanas y pectinasas, creciendo a esta cepa sobre celulosa microcristalina (avicel), así como en bagacillo de caña de azúcar (BC). Para tal efecto, se evaluó en primer término, el efecto del inóculo sobre la producción de las diferentes enzimas. El nivel de inóculo se estandarizó ajustando la densidad óptica (DO) como se indica en la sección de Material y Métodos.

En la fig. 24 se muestra la producción de celulasas. Como se puede ver, utilizando avicel como única fuente de carbono, la actividad obtenida es prácticamente la misma cuando el nivel de inóculo fue de 0.05 y 0.1 UDO (Fig.24). Cuando el inóculo fue menor (0.01 UDO), la producción de celulasas fue muy pobre, cerca de 5 veces menos en esta condición que en las dos anteriores donde la producción fue de 4-5 U/ml.

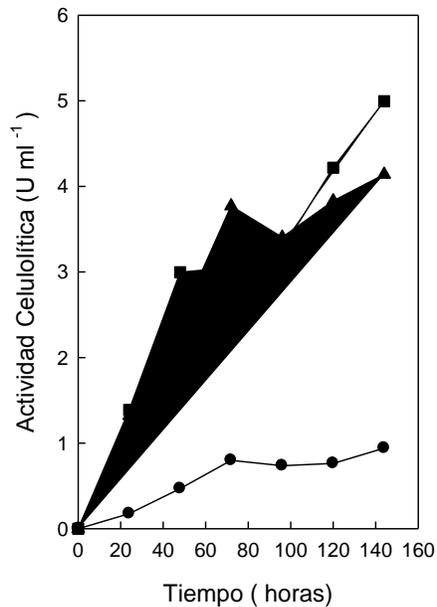


Fig.24 Efecto del inóculo sobre la producción de celulasas de *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18, creciendo sobre avicel al 0.75% como única fuente de carbono. Inóculo 0.01 UDO (●), 0.05 UDO (■) y 0.10 (▲).

Cuando la fuente de carbono fue bagacillo de caña de azúcar (0.75%), la mayor actividad también se obtiene para los niveles más altos de inóculo, aunque es ligeramente superior cuando se utiliza 0.05 UDO de inóculo (Fig. 24).

Sin embargo, para el nivel más bajo (0.01 UDO) y a diferencia de lo que pasa en avicel (Fig.24) la actividad se produce desde tiempos cortos lo que parece indicar que el microorganismo crece mejor con este sustrato que con avicel.

En este sentido y dado que el bagacillo contiene también otros polisacáridos (hemicelulosa, principalmente) el microorganismo podría crecer más rápido ya que cuenta

con fuentes alternas de carbono más fácilmente asimilables, lo que no ocurre en el caso del avicel.

También es importante hacer notar que la producción cuando se utiliza bagacillo de caña es ligeramente menor que con avicel.

La máxima actividad obtenida en bagacillo es un 37% menor que la máxima obtenida en avicel, diferencia que se acentúa a tiempos más cortos, por ejemplo, a las 72 horas la actividad en bagacillo es menos de la mitad de la que se obtiene en avicel (Fig. 24 y 25).

Esto podría deberse a la presencia de sustratos alternos (hemicelulosa) que retardan la producción de celulasas.

Es interesante que en este caso el microorganismo fue capaz de crecer y producir las enzimas en un medio muy pobre y utilizando material sin pretratamiento.

La mayoría de los autores cuando hablan de la degradación de materiales celulósicos, como Linko y Nybergh (1978), aplican pretratamientos de diversos tipos. Asimismo, Choudhury y colaboradores (1980), cultivan *Cellulomonas* para producir celulasas, con bagazo de caña tratado en condiciones alcalinas. Fan y colaboradores (1982) realizan un estudio exhaustivo para su tiempo sobre el tema y haciendo el análisis económico correspondiente. Dado el que los pretratamientos son por lo general costosos Moisiere y colaboradores (2005), continúan con la búsqueda del pretratamiento idóneo con miras a disminuir costos.

Por lo que, hay ventajas en nuestro estudio al utilizar el bagacillo de caña de azúcar sin pretratamiento alguno, lo que hace que sea menos costoso, se lleve a cabo la producción e hidrólisis en menor tiempo y sobre todo no contamine con productos tóxicos.

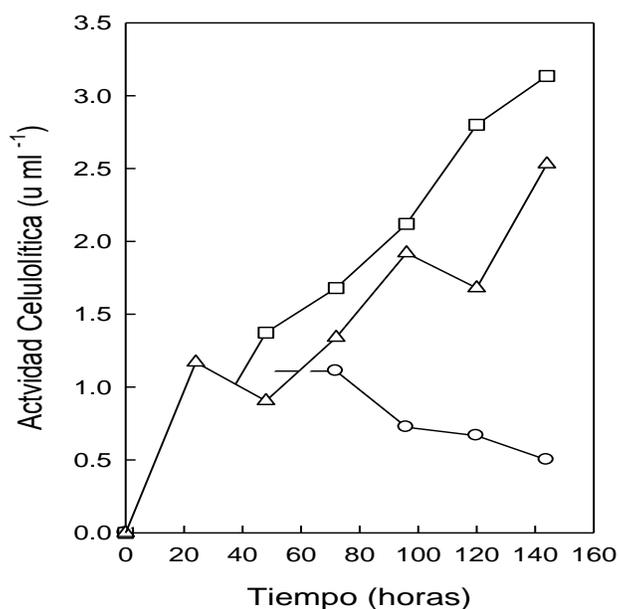


Fig.25 Efecto del inóculo sobre la producción de celulasas de *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18, creciendo sobre bagacillo 0.75% como única fuente de carbono Inóculo 0.01 UDO (○), 0.05 UDO (□) y 0.10 (△).

Por otro lado y en virtud de que esta cepa es capaz de producir diversas enzimas degradadoras de polisacáridos, se determinó la actividad pectinolítica producida sobre avicel y bagacillo de caña. Con avicel como única fuente de carbono se encontró actividad exo pectinolítica (Fig. 26).

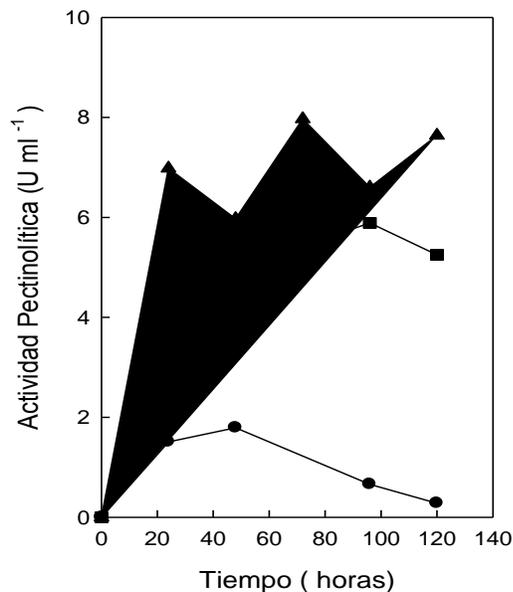


Fig.26 Efecto del inóculo sobre la producción de pectinasas de *Aureobasidium sp.* CH-Y-TE18, creciendo sobre avicel al 0.75% como única fuente de carbono. Inóculo 0.01 UDO (●), 0.05 UDO (■) y 0.10 (▲).

La actividad fue mayor con el inóculo de 0.1 UDO seguido por 0.05 UDO, y al igual que en el caso de la producción de celulasas con el inóculo más bajo se obtuvieron también las actividades más bajas. Llama la atención el hecho de que se hayan producido enzimas pectinolíticas en avicel (celulosa microcristalina) que no contiene pectina, en sentido estricto no se esperaba la producción de pectinasas ya que, en general, la producción de pectinasas es inducida por pectina. Sin embargo, en algunos microorganismos se producen niveles basales en forma constitutiva como se ha descrito en varios trabajos (Aguilar y col 1986, 1987, 1990, 1993), y este podría ser el caso en *Aureobasidium sp* CH-Y-TE18.

Otra posibilidad es que la producción de pectinasas esté cooregulada con la de celulasas en esta cepa.

La producción de pectinasas utilizando bagacillo de caña se muestra en la Fig. 27, como se puede apreciar en este caso las diferencias en la producción por efecto de los diferentes niveles de inóculo se hace menor y los resultados para las tres concentraciones son más uniformes. A diferencia de lo que se encontró con la actividad celulolítica, la actividad pectinolítica se produce en mayores concentraciones cuando se utilizó bagacillo de caña. De hecho los niveles de producción alcanzados con avicel fueron en promedio 60% más bajos en relación a los obtenidos con bagacillo de caña. Esta diferencia, que favorece al bagacillo de caña, se puede atribuir a la presencia de pectina en el bagacillo lo que no se presenta en avicel.

Como ya se había mencionado, esta cepa aparentemente produce niveles constitutivos de pectinasas, que se incrementan por la presencia de la pectina. A pesar de que la concentración de pectina es muy baja en el bagacillo, es aparentemente suficiente para estimular la producción de las enzimas.

Resultados de la producción de pectinasas sobre bagazo de caña se han reportado en fermentación en fase sólida por otros autores ( Acuña y col, 1995; Soccol, 1995; Solis-Pereyra y col, 1988, 1993, 1996).

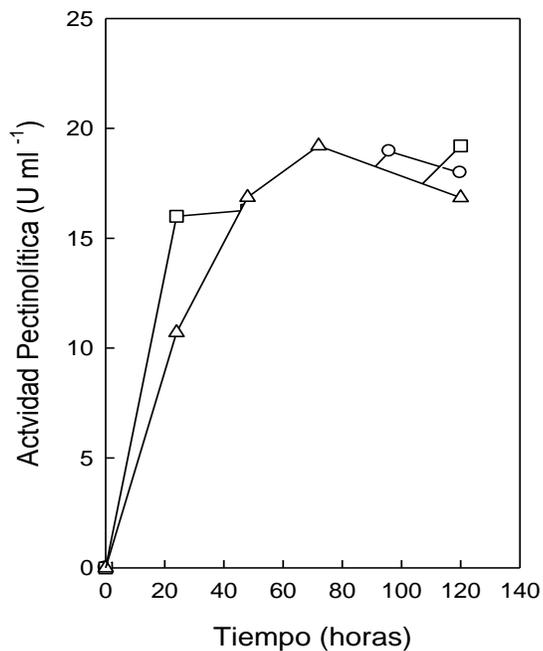


Fig.27 Efecto del inóculo sobre la producción de pectinasas de *Aureobasidium sp.* CH-Y-TE18, creciendo sobre avicel al 0.75% como única fuente de carbono.

Inoculo 0.01 UDO (○), 0.05 UDO (□) y 0.10 (△).

De los resultados anteriores se puede ver que para los niveles de 0.05 y 0.1 UDO de inóculo son muy similares tanto para la producción de celulasas como de pectinasas por lo que en los experimentos siguientes se fijo el nivel de inoculación en 0.05 UDO.

#### V.1.b.- Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de las enzimas

A fin de evaluar el potencial de la cepa para crecer sobre otras fuentes de carbono y producir celulasas y particularmente pectinasas, se evaluó el crecimiento y la producción de enzimas en cáscara de limón y pectina, además del avicel y el bagacillo de caña. Es de hacer notar que todos los sustratos fueron utilizados sin pretratamiento, ya que como se

ha dicho de los muchos estudios realizados una variable costosa es la utilización de algún tipo de tratamiento (Dale, 1987; 2009). La producción de celulasas se presenta en la Fig. 5, como puede verse la producción se ve favorecida cuando la *Aureobasidium* crece en avicel. La segunda mejor condición se encontró cuando se utilizó cáscara de limón seguida por el bagacillo de caña (Fig. 28).

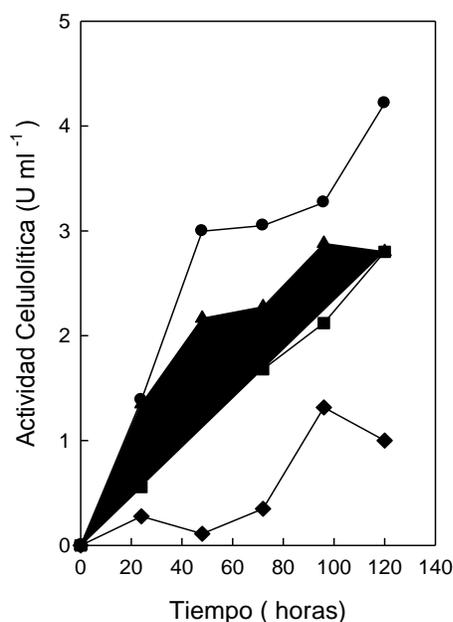


Fig.28 Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de celulasas de *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18.

Creciendo sobre Avicel (●), bagacillo (■), cáscara de limón (▲) y pectina (◆).

En cuanto a la actividad de pectinasas, como era de esperarse, la pectina y la cáscara de limón favorecen claramente la producción de estas enzimas. Estas enzimas se producen rápidamente, a las 24 horas de fermentación se alcanzan niveles cercanos a 30 U/ml tanto en pectina como en cáscara de limón, aunque en este último se alcanzan los niveles más

altos, contrariamente a lo que ocurrió en el caso de las celulasas, la menor actividad pectinolítica, se obtuvo en avicel (Fig.29).

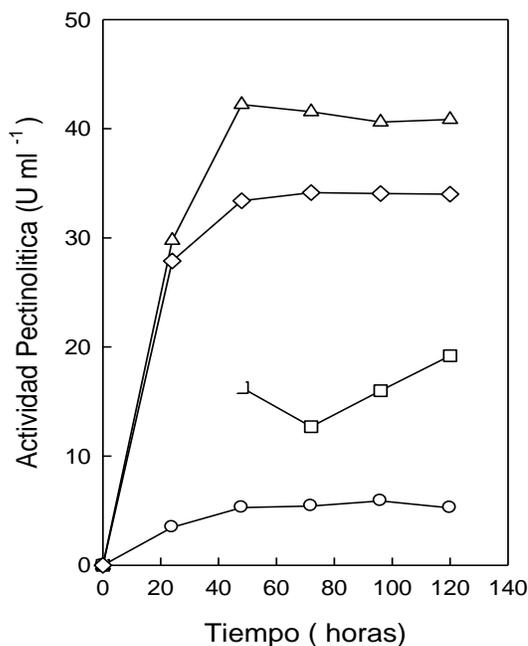


Fig.29 Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de pectinasas de *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18.

Creciendo sobre Avicel (○), bagacillo (□), cáscara de limón (△) y pectina (◇).

En estos experimentos también se determinó la actividad la endo-pectinolítica (Fig. 30).

Esta actividad se produce en cáscara de limón, pectina y bagacillo de caña en orden descendente y prácticamente no hay actividad cuando *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18 creció en avicel.

Otros autores, han demostrado también que algunos desechos como la cáscara de limón inducen la producción de pectinasas (Aguilar y col, 1986, 87, 90, 93, Álvarez y col 2004) y

dada la composición de este desecho que también contiene celulosa y hemicelulosa, es posible inducir también la síntesis de estas enzimas.

Es interesante observar que en el caso de la producción de pectinasas en los desechos, se obtienen rendimientos superiores a los que se obtienen con el sustrato puro.

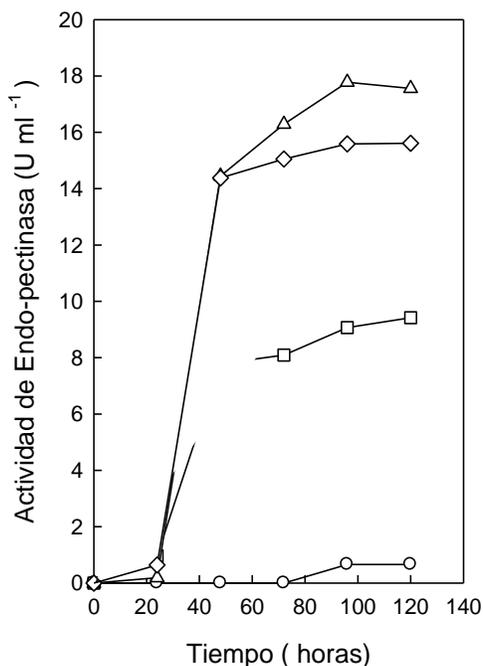


Fig.30 Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de endo-pectinasas de *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18.

Creciendo sobre Avicel (◇), bagacillo (□), cáscara de limón (△) y pectina(○).

Como se ve en los experimentos anteriores *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18 es capaz de producir celulasas y pectinasas creciendo sobre avicel, pectina, cáscara de limón y bagacillo de caña.

La producción de estas enzimas es variable dependiendo del sustrato específico, las pectinasas se producen en mayores niveles pectina y cáscara de limón, al igual que la exo

pectinasa, mientras que el mayor rendimiento de celulasas se obtiene en celulosa microcristalina. El rendimiento en bagacillo fue bajo, incluso menor al obtenido en cáscara de limón, lo que sugiere que la celulosa y los otros sustratos en este material están menos disponibles dado las interacciones entre ellos y el alto grado de cristalinidad de la celulosa, lo que puede ocasionar un crecimiento limitado. Por lo cual, y tratando de promover el crecimiento, se probó la adición de extracto de levadura a los cultivos con bagacillo, utilizando bagacillo lavado y no-lavado. Los resultados se muestran en la Fig.31.

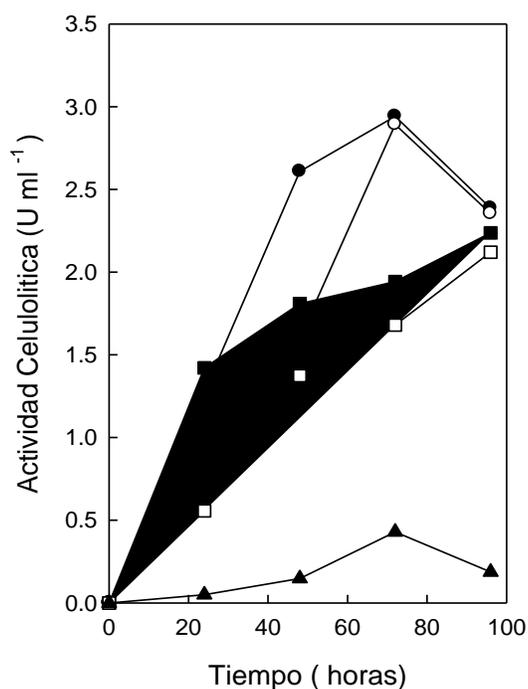


Fig.31 Efecto del bagacillo lavado y del extracto de levadura como fuente de carbono sobre la producción de celulasas de *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18. Creciendo en bagacillo lavado con extracto de levadura (●), bagacillo lavado(O), bagacillo no lavado con extracto de levadura (■), bagacillo no lavado, (□) y extracto de levadura (▲).

La adición de extracto de levadura mejora ligeramente la producción de celulasas, particularmente a tiempos cortos, tanto cuando se utiliza el bagazo lavado como el no-lavado y de estos la producción más alta se obtuvo con el bagacillo lavado (Fig. 31).

El extracto de levadura estimula el crecimiento independientemente de la fuente de carbono utilizada, esto ha sido reportado por otros autores para diferentes microorganismos (Saldaña, 2009), lo que puede explicar que la producción haya aumentado en tiempos cortos, tendiendo a igualarse al final de la fermentación (Fig. 31).

Por otro lado, cuando el bagacillo es lavado, se eliminan los azúcares solubles presentes, dejando solo los componentes insolubles (celulosa, hemicelulosa). Si bien los azúcares solubles pueden favorecer el crecimiento también ejercen represión catabólica sobre la síntesis de celulasas, xilanasas, etc. haciendo que la productividad descienda. Cuando estos son eliminados, el efecto de represión catabólica es menor y la producción se incrementa como ocurre con esta cepa (Fig.31).

La producción observada en extracto de levadura solo es muy baja y podría corresponder a un nivel basal de celulasas que se producen en forma constitutiva, como ya se dijo anteriormente.

En cuanto a la producción de la actividad pectinolítica, a diferencia de lo que ocurrió con la producción de celulasas, la adición de extracto de levadura ocasionó una disminución de la producción cercana al 50% para bagazo lavado y no lavado (Fig.32).

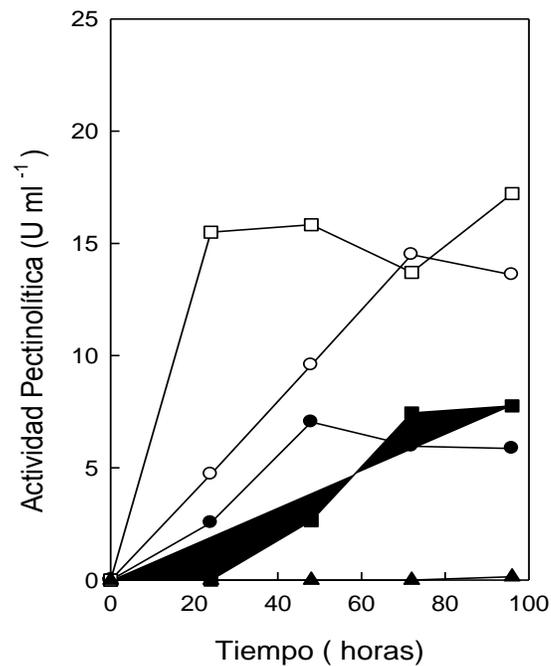


Fig.32 Efecto del bagacillo de caña lavado y de la levadura como fuente de carbono sobre la producción de pectinasas de *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18. Creciendo en bagacillo lavado con levadura (●), bagacillo lavado(O), bagacillo no lavado con levadura (■), bagacillo no lavado (□) y levadura.

La actividad en bagacillo no lavado fue mayor a la obtenida en el lavado, de hecho a las 24 horas en esta última condición se produce prácticamente el 90% de la actividad, mientras que en las otras condiciones la velocidad de producción es más baja (Fig.32).

Con el fin de aumentar la disponibilidad de sustrato para *Aureobasidium* sp. CH-M-1018 y evaluar la relación entre la concentración de bagacillo de caña con la producción de celulasas, se probaron diferentes concentraciones de bagacillo en la fermentación. La concentración usada hasta esta etapa fue de 0.75 % y se utilizaron 2% y 4% en los siguientes experimentos (Fig.33).

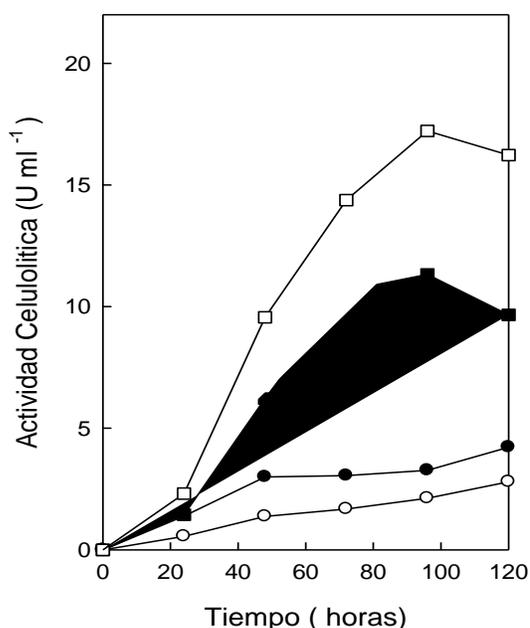


Fig.33 Efecto de la concentración de bagacillo de caña de azúcar sobre la producción de celulasas de *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18, con diferentes fuentes de carbono. Avicel 0.75%(●), bagacillo 0.75% (○), bagacillo al 2%(■), bagacillo al 4% (□).

Como control se utilizó un cultivo conteniendo avicel al 0.75%. La producción de celulasas es mayor en avicel que en bagacillo de caña cuando están a la misma concentración.

Sin embargo, al aumentar la concentración, la actividad máxima producida es de 3 a 4 veces mayor que en avicel y del orden de 4 a 6 veces mayor que en bagacillo al 0.75%, cuando se utilizan concentraciones de 2 y 4%, respectivamente (Fig. 33). Este resultado

apoya que la baja producción de celulasas en bagacillo de caña en los experimentos previos es la consecuencia de la baja disponibilidad de sustrato. También indica que la cepa es muy buena productora de celulasas. Esto último es muy importante ya que el género *Aureobasidium* ha sido muy estudiado por diferentes autores como productor de xilanasas y pectinasas pero no de celulasas. (Dennis and Buhagiar 1973; Deshpande y col. 1992; Leathers 1986; Buzzini and Martini 2002)

#### V.1.C.- Sustitución de ingredientes y escalamiento de la producción

Un aspecto muy importante en la producción de enzimas y que tiene mucho que ver con los costos del producto final es el relativo a la calidad y tipo de ingredientes del medio de cultivo.

En nuestro caso se está utilizando como fuente de carbono el bagacillo de caña que es un subproducto de la industria azucarera pero también utilizamos un medio mineral. En este sentido, es necesario sustituir las sales de grado analítico, que se han usado en los experimentos previos a nivel de laboratorio, por sales de grado industrial.

Para tal efecto se realizaron algunos experimentos sustituyendo todos los componentes del medio mineral con sales grado industrial. La evaluación de esta sustitución se realizó utilizando avicel y bagacillo de caña como fuentes de carbono con los dos tipos de sales (Fig. 33 y 34).

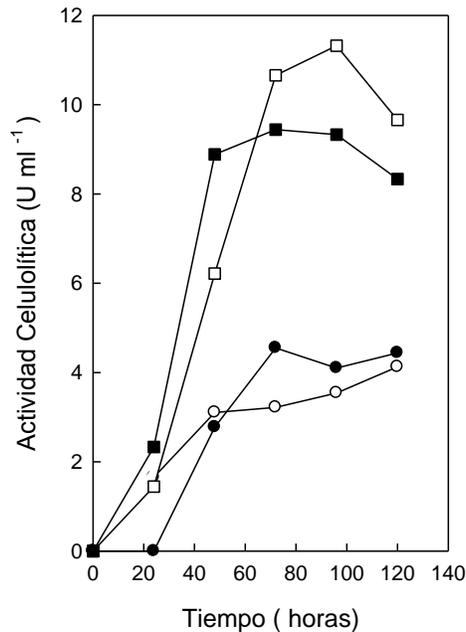


Fig.34 Comparación del efecto de la sustitución de sales grado analítico (GA), por grado industrial (GI), a pH 4.4-4.6, sobre la producción de celulasas de *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18.

Utilizando como fuente de carbono Avicel 0.75% en sales GA (O), Avicel en sales GI (●), bagacillo 2%, en sales GA (□) y Bagacillo en sales GI (■).

En la Fig. 34 se muestran los resultados de la producción de la actividad celulolítica.

Como puede apreciarse con avicel como fuente de carbono, es ligeramente superior cuando se utilizan sales grado industrial. Aunque al principio de la fermentación (las primeras 24 horas), hay un retraso en la producción en sales de GI que se recupera y supera ligeramente a lo obtenido con sales de grado analítico.

Cuando se utilizó bagacillo de caña los resultados favorecen la producción con sales de grado analítico que superan en alrededor de 15% la producción obtenida con sales GI.

Encontramos diferencia entre los niveles de producción que favorecen a las sales GA: Sin embargo, un factor importante es el costo de los reactivos utilizados: en el caso de las

sales GA, 1 litro de medio tiene un costo aproximado de \$48.94, mientras que para la producción con sales GI el costo también de 1 litro de medio es de \$ 1.62. Así es que, aunque la producción es ligeramente mayor con las sales GA, su costo de medio es 30 veces mayor que el medio con sales GI y dado que la diferencia en nivel de producción no es muy grande (15% menor con sales industriales) consideramos que la sustitución no resulta desfavorable, se disminuye ligeramente la productividad pero se ahorra considerablemente en costos.

V.1.d.- Comparación de sales grado analítico e industrial en la producción de Pectinasas.

La producción de pectinasas, tienen esencialmente el mismo perfil que la producción de celulasas. Los mayor producción se obtuvo con bagacillo de caña y sales grado analítico, sin embargo, con sales industriales la actividad máxima producida es menor del 10% que con sales analíticas (Fig. 35).

Con avicel la diferencia entre las sales analíticas e industriales, favorece a estas últimas, obteniéndose producciones superiores hasta en un 40% de lo obtenido con sales grado analítico.

Estos resultados son muy promisorios ya que si bien la producción tanto de celulasas como de pectinasas es menor cuando se utilizan sales industriales, se compensa de sobra cuando se analizan los costos de estas materia primas.

El costo de los reactivos grado analítico utilizados en el laboratorio, por tener un alto grado de pureza son costosos, lo que hace que no puedan ser utilizados a escala industrial

ya que haría inviable cualquier proceso, porque impacta el costo del producto final y por supuesto, su precio en el mercado.

Por lo anterior, se puede considerar que la sustitución a sales de grado industrial es muy favorable.

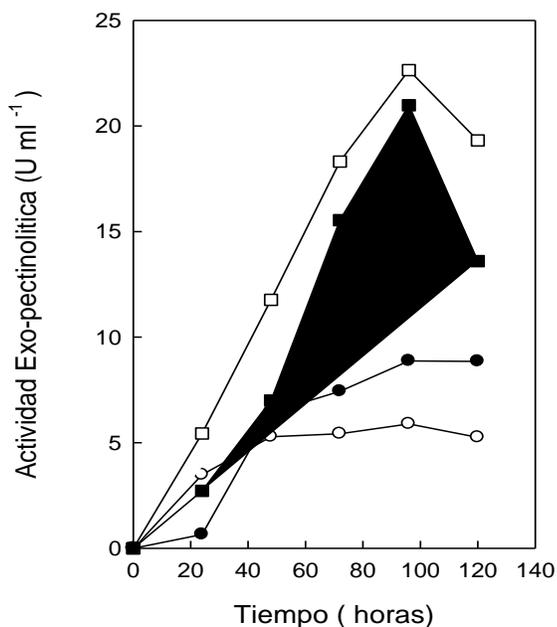


Fig.35 Comparación del efecto de la sustitución de sales grado analítico (GA), por grado industrial (GI), a pH 4.4-4.6, sobre la producción de pectinasas de *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18.

Utilizando como fuente de carbono Avicel 0.75% en GA (O), Avicel en GI (●), bagacillo 2% en GA (□) y Bagacillo en GI (■).

#### V.1.E.- Evaluación de la producción en mayor escala.

Una vez que se obtuvieron las condiciones mínimas de producción se procedió a escalar la producción de las enzimas, hasta ahora evaluadas solo a nivel matraz con 100 ml de medio en matraces de 500 ml, para llevarla a un nivel de 1 y 14 L en un matraz de

Fernbach y en un fermentador instrumentado respectivamente. En este caso se utilizó una concentración de bagacillo del 2%, que aunque encontramos que al 4% la actividad producida es más alta, esta última concentración provoca problema de transferencia de masa así como taponamiento de las líneas de muestreo y heterogeneidad en el mezclado.

De acuerdo a los resultados anteriores en esta etapa se utilizaron las condiciones que dieron mejores resultados.

En ambos niveles se llevo a cabo la determinación de la proteína extracelular producida a lo largo del cultivo a fin de tener una idea más clara del comportamiento del microorganismo en las dos escalas.

Los resultados se muestran en la Fig. 36. Se puede observar un aumento en la cantidad de proteína muy similar tanto en el matraz Fernbach, como en el fermentador de 14 L, durante las primeras 72h de cultivo después de la cuales, la proteína producida aumenta solo en el fermentador de 14L.

Este comportamiento podría deberse a que una limitación de oxígeno en el matraz ya que en el fermentador se suministra aire continuamente durante toda la fermentación mientras que en el matraz la oxigenación depende solo de la aireación superficial y de la velocidad de agitación y frecuentemente el oxígeno llega a condiciones limitantes que restringen el crecimiento y por lo tanto la producción de proteína extracelular.

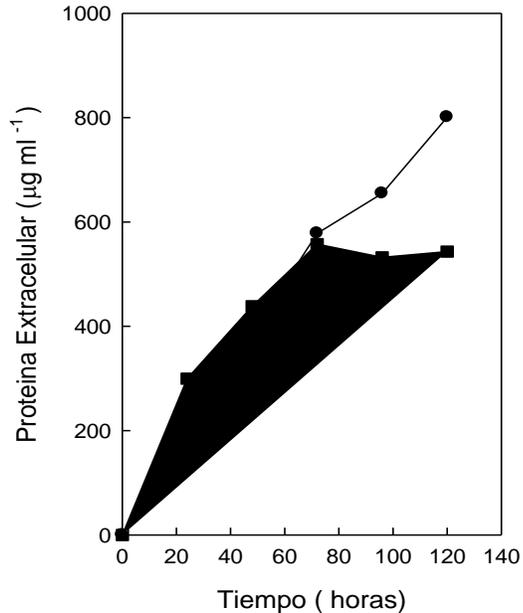


Fig.36 Proteína extracelular producida por *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18, crecido en bagacillo 2% como única fuente de carbono. En matraz fernbach (●), y fermentador de 14 litros (■).

En la Fig. 37 se muestran las actividades producidas en el fermentador. En este caso además de celulasas y pectinasas también se determinó la actividad de xilanasas y  $\beta$ -glucanasa. Los niveles de celulasas alcanzados en esta etapa fueron prácticamente los mismos que los obtenidos en los experimentos en matraces agitados. Sin embargo, la producción de pectinasa si se vio incrementada en poco más del 20% el fermentador (Fig. 37). La actividad de xilanasas fue muy alta alcanzando niveles cercanos a las 50 U/ml, que se considera en términos generales como una muy buena actividad, comparándola con la obtenida, por ejemplo con cepas de *Aspergillus*. Camacho y Aguilar, (2003) reportan la producción de xilanasas de *Aspergillus flavipes* a nivel de fermentador en niveles semejantes a los producidos por *Aureobasidium* sp CH-Y-TE18.

Es interesante que esta cepa produzca tan buenos niveles de xilanasa ya que esto amplía el horizonte de la aplicación de esta cepa silvestre. Otros autores (Christov & Prior, 1993) han utilizado xilanasas producidas por *A. pullulans* para disolver xilanos de pulpas de madera tratadas.

En cuanto a la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa, que se muestra en la figura 37, se puede observar que se presenta un aumento continuo llegando a 14 U/ ml, a las 120h de incubación presentando una excelente actividad, recordemos que actúa sobre la celobiosa liberando glucosa. Aunque la presencia de glucosa y celobiosa pueden reprimir la producción de esta enzima de acuerdo a Hagget y col, 1979, Rumyantseva y col, 1982, en nuestro caso no se observó el efecto.

Estas  $\beta$ -glucosidasas, pueden ser utilizadas en la hidrólisis enzimática de celulosa de fibra de maíz y otra biomasa celulósica para la subsecuente producción de etanol. La alta actividad de la  $\beta$ -glucosidasa de *A. pullulans*, para convertir una variedad de celooligosacáridos en celobiosa, la alta tolerancia al substrato, la no dependencia a compuestos con iones metálicos o tiol compuestos, y su alta termoactividad hacen a esta enzima como probable candidata a la aplicación en la hidrólisis enzimática de celulosa a glucosa.

La determinación de estas actividades se realizó también con el propósito de caracterizar las diversas actividades que se produjeron en estas condiciones ya que este filtrado se utilizará para llevar a cabo la sacarificación del bagacillo de caña en la siguiente etapa y como se puede apreciar en la figura 14, *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18, creciendo en bagacillo de caña, produce de xilanasas, pectinasas, celulasas y  $\beta$ - glucosidasas.

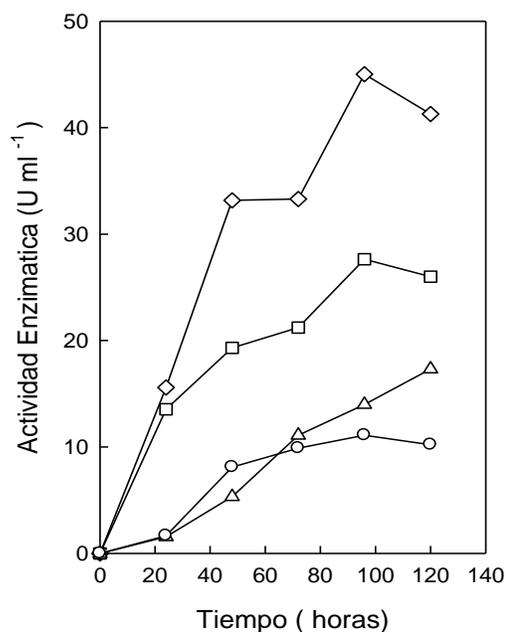


Fig.37 Actividades Enzimáticas producidas por *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18, crecido en bagacillo 2% como única fuente de carbono: Xilanasas (◇), pectinasas (□), β-glucosidasa (△) y celulasas(○).

## V.2.- Sacarificación.-

Con el fin de evaluar la capacidad de las enzimas obtenidas de *Aureobasidium* para la obtención de azúcares fermentables a partir de bagacillo de caña de azúcar se llevó a cabo una serie de experimentos tendientes a diseñar un sistema de sacarificación lo más simple y económico posible.

Para tal efecto y ya obtenidas las condiciones favorables de producción, se procedió a producir y caracterizar un lote de mayor volumen (14L), y así contar con una cantidad suficiente de filtrado enzimático para llevar a cabo los experimentos de sacarificación.

Se realizó una fermentación utilizando Bagacillo de caña de azúcar como única fuente de carbono en un fermentador de 12 litros de volumen de trabajo. La fermentación se hizo en las condiciones descritas en la sección anterior y una vez terminada, se procedió a separar el filtrado y a evaluar las actividades producidas para posteriormente concentrarlo y utilizarlo en la evaluación de su capacidad sacarificante en experimentos *in vitro* con bagacillo de caña.

V. 2. A.- Evaluación de la capacidad sacarificante del filtrado de *Aureobasidium* sp CH-Y-TE18 utilizando papel filtro (PF) y bagazo de caña de azúcar (Bg).

Las principales actividades del concentrado enzimático obtenido fueron celulasas, pectinasas endo y exo, xilanasas y  $\beta$ -glucosidasa. Así se probó la acción de las enzimas obtenidas en dos sustratos, papel filtro (Pf) y bagacillo de caña de azúcar (Bg). El sistema de reacción consistió de una suspensión de cada uno de los dos sustratos a una concentración final de 25 mg/ml. Como diluyente se utilizaron amortiguador de acetatos, citratos 0.1M, pH 4.8 y un control con agua destilada. En todos los casos los sistemas de reacción se incubaron a 50°C. Los resultados se muestran en la Figura 38, como puede apreciarse con papel filtro como sustrato y el amortiguador de acetatos produce la mayor concentración de azúcares reductores. Con el buffer de citratos y agua los resultados en términos de azúcares reductores producidos son muy semejantes aunque favorecen ligeramente a la condición de buffer de citratos (Fig. 38a). Cuando se utilizó bagacillo de caña (Fig. 38 b) los rendimientos son muy parecidos, independientemente del amortiguador utilizado para mantener el pH. Comparando la sacarificación de los dos

sustratos encontramos que los azúcares reductores liberados a partir de Bg, es en promedio de cuatro veces mayor de Pf. Esto tiene gran importancia ya que lo que se desea sacarificar son desechos celulósicos como es el bagacillo de caña.

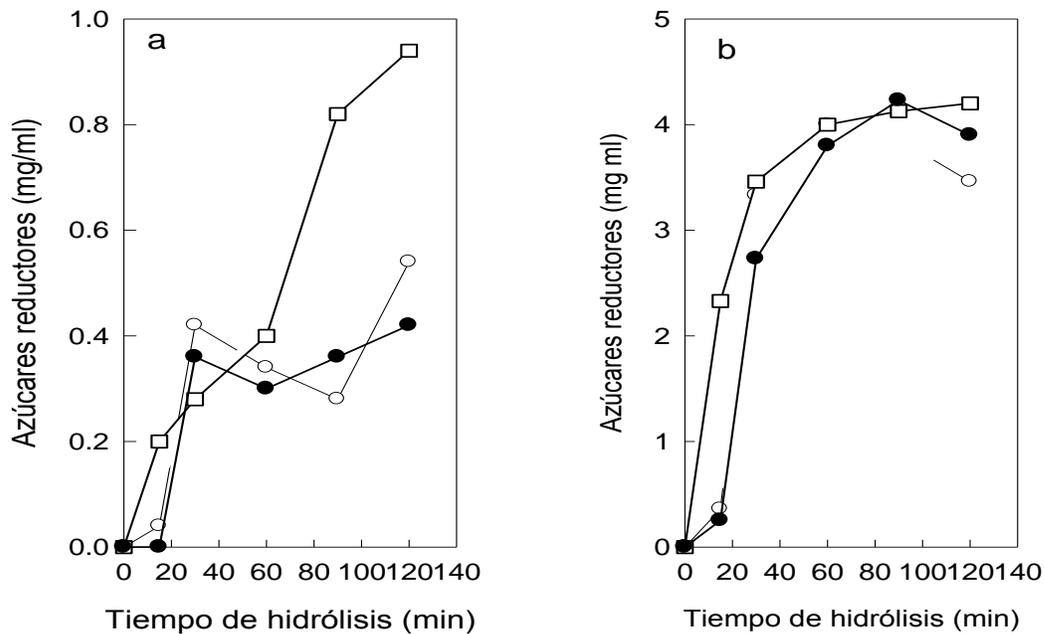


Fig.38 Cinética de sacarificación de papel filtro al 2.5 % (a) y bagazo de caña de azúcar al 4% (b) por el concentrado enzimático de *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18. Utilizando buffer de citratos (○), acetatos (□) y agua destilada (●).

#### V. 2. B.- Efecto de la concentración de enzima.

Un factor importante a considerar en nuestro estudio fue justamente el efecto de la concentración de enzima sobre la sacarificación. Encontramos que al aumentar la concentración de enzima se presenta una mayor producción de azúcares reductores (Fig. 39). Sin embargo, a pesar del aumento en azucares reductores obtenido, casi dos veces si se compara la concentración más baja y la más alta de enzima, el incremento en la concentración de enzima fue de 4 veces más, por lo que no parece muy conveniente

aumentar tanto la concentración de enzima. figura 39, esto se pudo deber a que la concentración del Bg, es el mismo 4% y por lo tanto, aunque se aumente la concentración de enzima el Bg es el mismo y ocurre una saturación por el sustrato disponible.

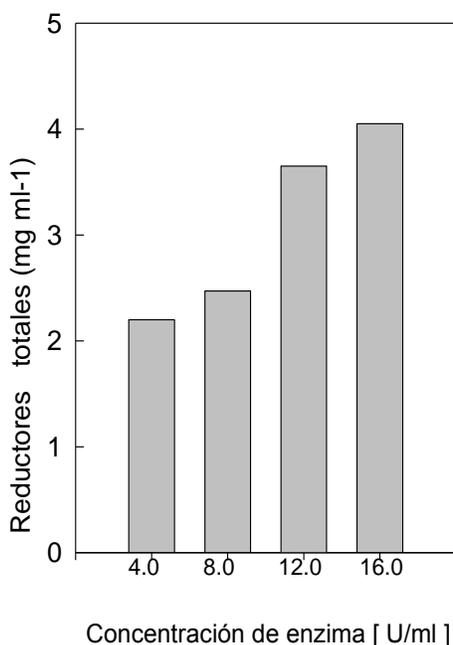


Fig.39 Efecto de diferentes concentraciones del [E] filtrado liofilizado concentrado de *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18, en la sacarificación del bagacillo de caña de azúcar.

#### V.2.C.- Concentración del Sustrato bagazo de caña.

Uno de los parámetros importantes a estudiar es la proporción del sustrato idóneo para ser hidrolizado, en este caso el bagazo de caña de azúcar, catalogado como buen sustrato (Mandels y col, 1981).

La figura 17, nos muestra la sacarificación empleando diferentes concentraciones de bagazo de caña de azúcar y la misma concentración de enzima, se observa que la

concentración de reductores aumenta a medida que aumenta la concentración de bagazo, este incremento no es directamente proporcional.

Es decir a un aumento en el doble de bagazo no corresponde el doble de azúcares producidos. Dada la heterogeneidad del sistema, a medida que hay mas bagazo la enzima tiene un mayor número de sitios para fijarse y su aprovechamiento depende de la utilización de una mayor cantidad de sustrato, de modo que al haber más sitios de unión las enzimas son retenidas por tiempos más largos y su eficiencia tiende a disminuir. También las interacciones entre los diferentes componentes del sistema celulolítico disminuyen y no se favorece el sinergismo con el resultado final de reducción de eficiencia catalítica global.

a) al ser heterogéneo en cuanto al tamaño de partícula y porosidad, la reacción de hidrólisis se ve favorecida en partículas pequeñas de fácil acceso enzimático y se dificulta al aumentar el tamaño de las partículas.

B) el acceso de las enzimas al aumentar la cantidad de bagazo y ocupar mayor volumen, o sea cuando el sistema es heterogéneo se dificulta el acceso de la enzima específica al sustrato y favorece la saturación del complejo E/S en algunos lugares del sistema y obstaculiza en otros.

Sin embargo, a mayor cantidad de sustrato la sacarificación fue mayor, aunado a los resultados anteriores y a que en la literatura es muy usada del 4 al 5 % de BS, nosotros adoptamos el 4% de BS para experimentos posteriores.

En nuestra investigación se utiliza poca enzima en el mismo tiempo, con diferentes rendimientos en azúcares reductores, pero sin pretratamiento del BS, tomando en cuenta que cuando hay pretratamientos drásticos como son los alcalinos, se puede producir furfural y dioxanos, lo cual es tóxico si se usa para la industria alimentaria.

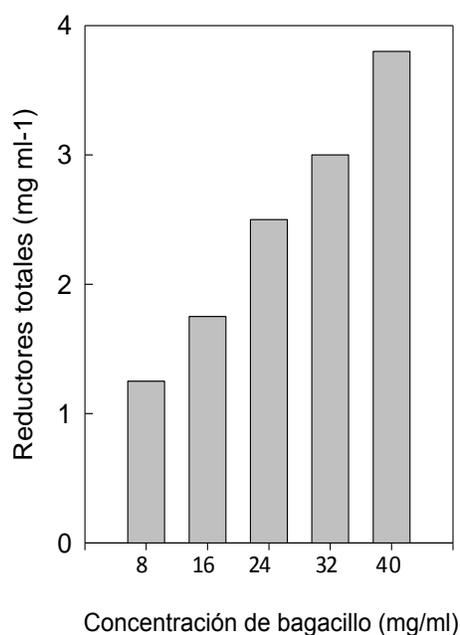


Fig.40 Efecto de la Sacarificación del bagacillo de caña de azúcar en diferentes concentraciones, por el filtrado liofilizado concentrado de *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18.

V.2.D.- Efecto del tiempo de incubación.

Los resultados anteriores fueron obtenidos utilizando tiempos de reacción cortos (120 min) y a continuación se probaron tiempos más largos y también quisimos evaluar el efecto de la concentración utilizando mayores volúmenes para lo cual se usaron concentraciones de 3, 3.5 y 4% (Fig. 41).

En este caso se uso bagazo tratado por esterilización durante 20 min. La mayor generación de reductores se obtiene, al igual que en los experimento anteriores, utilizando la concentración de 4% y la esterilización favorece para que el rendimiento sea mayor.

En nuestro sistema adoptamos el 4 %, que es una concentración en un intervalo muy comúnmente utilizado por varios autores. Blanco y col en 1982, quienes utilizan el Bg con pretratamiento con NAOH, en concentraciones de entre 1 y 10%, y encuentran que del 4 al 5% se obtienen los mejores rendimientos.

Nosotros, también probamos concentraciones de 6 y 8% pero los problemas de mezclado para mantener una distribución homogénea de enzima y bagazo hace que sea muy poco reproducible y práctico.

También, Pandey y col. 2000, reportan el porcentaje en que se utiliza el bagacillo de caña de azúcar varía del 0.5 y 10 %, siendo el más frecuente el 5 %.

En todos los estudios previos se realizan pretratamientos del bagacillo de caña de azúcar tanto físicos, químicos o combinados.

En nuestro experimento, como lo muestra la figura 18, encontramos que se utiliza el 4% como más efectivo y de fácil manejo, a las 26 Horas en matraz, se produjeron 30 mg/ml azúcares reductores.

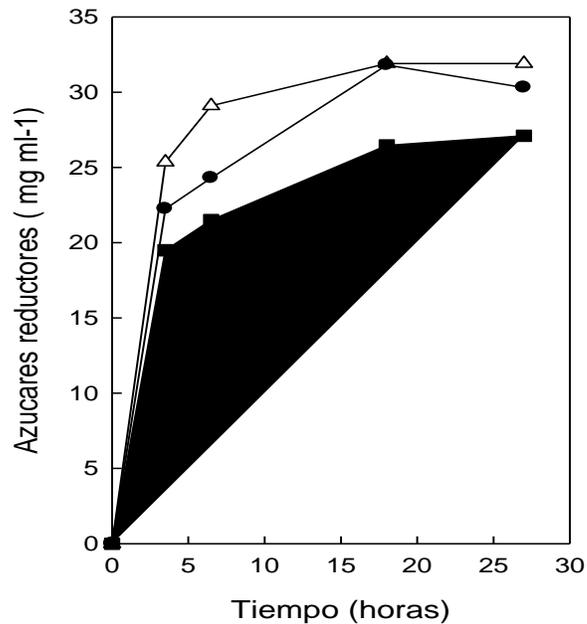


Fig.41 Efecto en la Sacarificación del [Bg] Bagacillo de caña de azúcar Esterilizado en diferente %. (■) 3%, (●) 3.5% y (△)4%, por el Filtrado proveniente de *Aureobasidium sp CH-Y- TM 18*.

#### V.2 .E .Efecto de la temperatura en la sacarificación del bagazo de caña en biorreactor.

Como se probó en experimentos anteriores, la figura 42, nos muestra en el bioreactor de un litro, diferentes temperaturas: como se precia en la Fig.42 a medida que se incrementa la temperatura de tratamiento la producción de reductores aumenta hasta alcanzar un máximo a 50°C, a 60°C de temperatura disminuye la concentración de reductores. A 22°C y a 40 °C, la actividad enzimática no es despreciable por lo que se deberá de tomar en cuenta para aplicaciones futuras. En este sistema enzimático están presentes tanto las celulasas, pectinasas, xilanasas y presentan un rango de actividad entre 40 a 50°C por lo

que en principio la temperatura óptima de sacarificación esta dentro de los intervalos de temperatura de las diferentes enzimas presentes en el complejo enzimático producido por *Aureobasidium* sp.

Aunque pudiera ser deseable utilizar temperaturas más altas las enzimas de nuestra cepa podrían desnaturalizarse y bajar el rendimiento de productos.

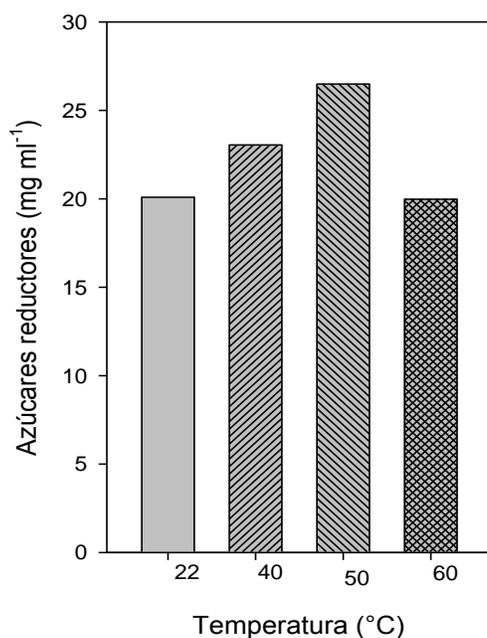


Fig.42 Efecto de la temperatura en la Sacarificación del Bg esterilizado 4% por el filtrado liofilizado concentrado de *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18.

#### V.2.F.-Efecto de Conservadores en diferente concentración

Los procesos de sacarificación en general no se llevan a cabo en condiciones estériles por lo frecuentemente se reporta contaminación ya que la flora microbiana del ambiente utiliza los azúcares formados por la hidrólisis de los materiales celulósicos.

Con el fin de controlar el desarrollo de flora microbiana, se probaron tres conservadores de los más utilizados en estos estudios: ázida de sodio, benzoato de sodio y metabisulfito de sodio.

De acuerdo a la literatura, se reporta cierto efecto inhibitorio en la sacarificación y un ligero efecto negativo en la actividad enzimática por lo que estudiamos diferentes concentraciones de cada uno tratando de encontrar una concentración que evitara el crecimiento microbiano pero que no comprometiera la actividad enzimática.

Realizamos una prueba con tres conservadores a dos concentraciones (0.005% y 0.01%) cada uno, como lo muestra la Fig. 43.

Si se compara al lote control con los lotes experimentales, encontramos que los conservadores sin importar su concentración, presentaron un efecto inhibitorio en la sacarificación.

La ázida de sodio produjo una inhibición muy semejante en las dos concentraciones.

El efecto de inhibición mayor se observó con meta bisulfito de sodio en ambas concentraciones.

De los tres conservadores utilizados, el benzoato de sodio fue con el que se observó menor inhibición en la sacarificación, lográndose obtener mayor hidrólisis.

Este compuesto, además de que es comúnmente utilizado en alimentos resulta menos tóxico a las concentraciones utilizadas.

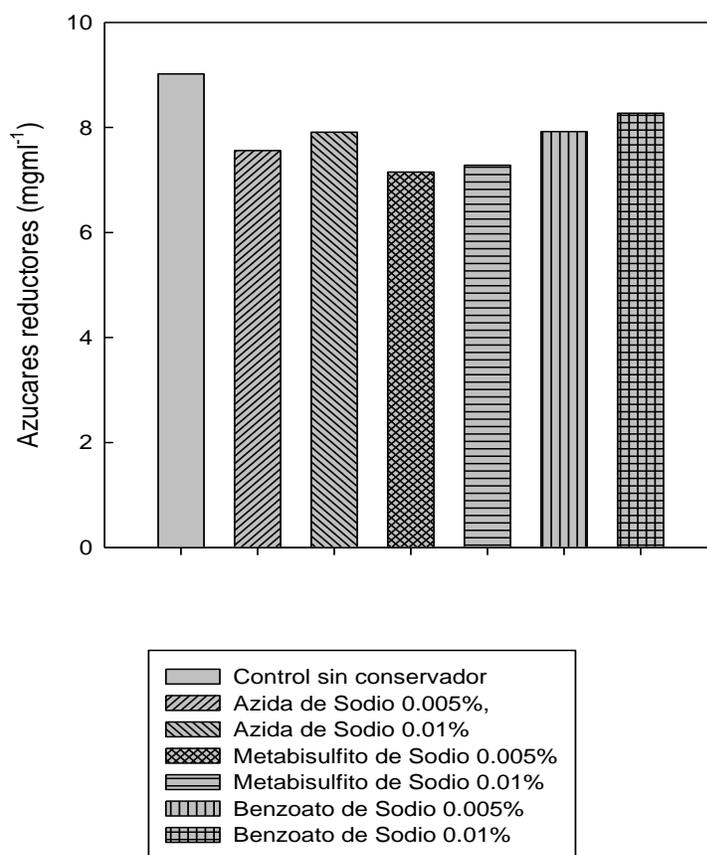


Fig.43 Efecto de conservadores en la sacarificación del bagacillo de caña al 4%, sin esterilizar por el filtrado de *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18, durante 14 horas

#### V. 2. G.-Efecto del tiempo de esterilización del bagacillo de caña

Ya que es importante reducir la carga microbiana del sustrato utilizado para evitar la contaminación y consumo de azúcares obtenidos durante la sacarificación por flora presente en el sustrato, se realizaron pruebas de esterilización a diferentes tiempos del bagacillo de caña de azúcar. La esterilización, puede también facilitar la sacarificación por lo se evaluó su efecto. Se utilizó bagacillo de caña al 4% y se probaron 20, 40 y 60 min de tiempo de esterilización. Se observa (Fig. 44) que con cualquier tiempo de esterilización se favorece la sacarificación respecto del control sin esterilizar y se obtienen rendimientos de 50% más en promedio con cualquier tiempo de esterilización. No hay diferencias significativas entre 20, 40 y 60 minutos, aunque en este último tiempo se obtuvo mayor concentración de azúcares comparado con el control, sin esterilizar.

Con la esterilización se reblandecen las fibras de la celulosa, se abren poros, se aumenta la superficie de contacto con las enzimas por lo que se facilita el ataque enzimático. Sin embargo, aún con todas estas bondades de la esterilización las posibilidades de utilizarlo a gran escala se deben valorar ya que aumentan los costos del proceso.

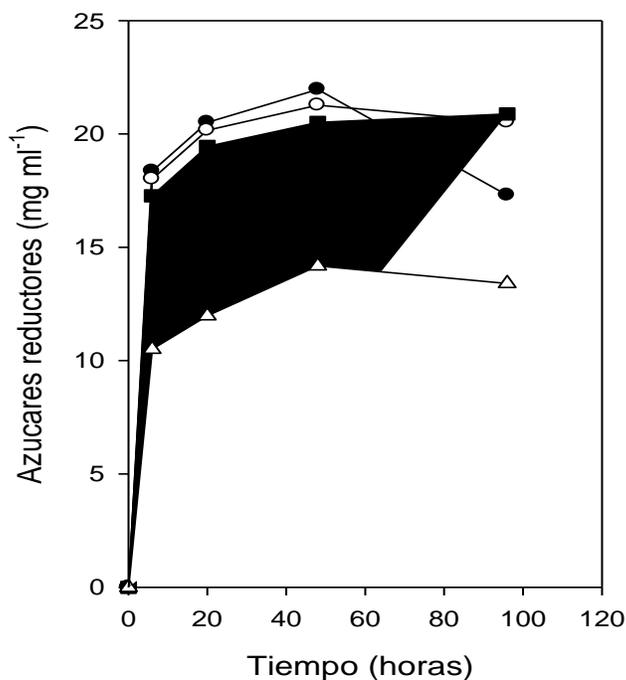


Fig.44 Sacarificación del bagacillo de caña de azúcar 4% a diferentes tiempos de esterilización:  
 (●) 20', (○) 40', (■) 60' y (△) control, sin esterilizar, por el filtrado de *Aureobasidium sp.* CH-Y-TE18.

#### IV.2.H.- Efecto del Tween 80

En la figura 45, podemos observar el efecto de la utilización Tween 80, que es un surfactante, a diferentes concentraciones. En este experimento se presentaron incrementos en el % de conversión de azúcares a medida que se aumento la

concentración del Tween 80, hasta un máximo a un intervalo concentración de 0.1-0.2%. A 0.3% la conversión disminuye respecto del máximo al igual que para concentraciones menores a 0.1%. Como se puede observar, la adición de Tween 80 favorece la producción de azúcares, lo que puede deberse a que se facilita la reacción al permitir el acceso de la enzima con el sustrato, lo que coincide con lo encontrado por otros autores (Otter y Munro, 1989).

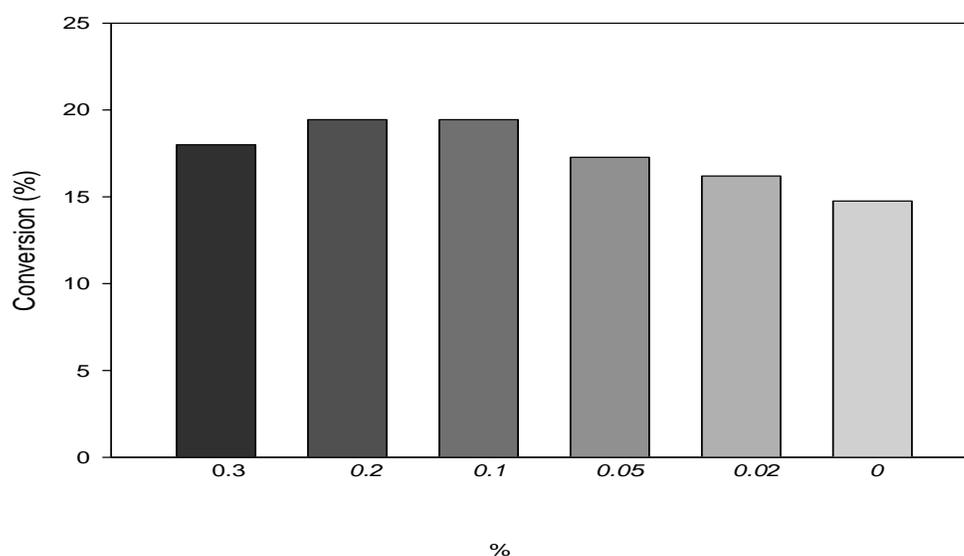


Fig.45 Efecto de diferentes concentraciones de tween 80 en la Sacarificación del Bg por el filtrado de *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18. Durante 48 horas.

#### V.2.1.- Efecto del tamaño de partícula del bagazo de caña de azúcar.

El tamaño de partícula de partícula del sustrato, determina las facilidades del ataque enzimático así como el tiempo de degradación, es por esto que realizamos una comparación de tres lotes referidos en tres tamaños de partícula. Para tal efecto el

bagacillo se tamizó y se recuperaron dos fracciones: lo que fue retenido en la maya de 2mm pero pasó por 4mm y lo que pasó por la maya de 2mm y fue retenido en la de 1mm serán referidos como mayor de 2mm y mayor de 1mm, respectivamente. Estas fracciones fueron comparadas con el bagacillo tal como se recolecta y este se denominó entero. Los resultados están en la figura 46, en donde podemos observar que se presenta una relación inversa a menor tamaño mayor es la producción de azúcares reductores especialmente a tiempos cortos.

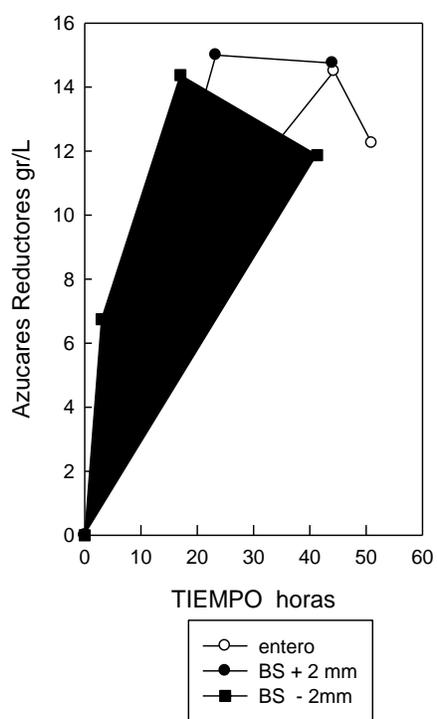


Fig.46 Efecto del tamaño de partícula en la sacarificación del bagacillo de caña de azúcar por el filtrado de *Aureobasidium* sp CH-Y-TE18  
 Bagacillo entero (○), mayor de 2mm (●) y mayor de 1 mm (■).

#### V.2.J.- Optimización de condiciones en la sacarificación de biorreactor.

En la figura 47 se observan los resultados de la sacarificación en el bioreactor con 1L de volumen de trabajo, en estas condiciones se probaron algunas de las condiciones que funcionaron a nivel de matraz incluida la utilización de conservador. Como ya se vio en los

experimentos anteriores con el bagazo esterilizado se facilita la sacarificación porque se presenta la celulosa pretratada que facilita la reacción. Por otro lado, la utilización del bioreactor da la posibilidad de controlar el pH a lo largo del proceso y en este caso se mantuvo a 4.8, que de acuerdo a nuestros resultados, fue el idóneo para que este grupo de enzimas funcione de manera sinérgica. En la fig. 47 se ve que con agua y control de pH se obtienen mejores resultados con la utilización de amortiguador lo que es interesante ya que confirma los resultados anteriores y da la posibilidad de omitir el uso de amortiguadores lo que reduce costos de proceso.

A pesar tanto de la esterilización como de la adición de conservador a tiempos mayores a 40 horas, en ambas condiciones se presenta una disminución en la concentración de reductores debido a consumo por microorganismos contaminantes presentes en el ambiente. Es importante resaltar la necesidad de llevar a cabo un estudio de costo-beneficio que considere las condiciones obtenidas y los rendimientos con el fin de determinar las más adecuadas no solo en función de los aspectos técnicos sino también de los costos.

También, la figura 47 nos muestra la sacarificación del Bg, por el filtrado [E] de *Aureobasium* sp. CH-M-1018 en un medio con agua sin ajustar el pH, lo que simplifica el sistema de reacción, ya que se obtuvo una buena cantidad de azúcares reductores en el sistema minimizado.

También, se probó con agitación y pH 4.8, en donde se encontró que estos dos factores favorecen la sacarificación mostrando una concentración de azúcares reductores mayor

que el lote sin agitación y sin ajustar el pH. Por los resultados obtenidos, se recomienda la agitación y ajustar el pH a 4.8 y así facilitar la acción enzimática.

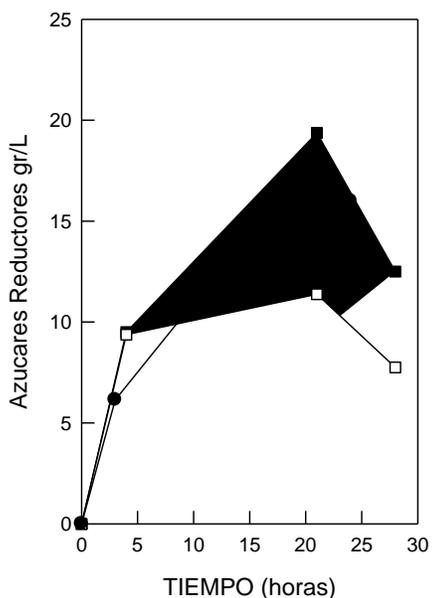


Fig.47 Sacarificación del Bagacillo de caña de azúcar 4%, por las enzimas de *Aureobasidium* sp.CH-Y-TE18.

Sistema de sacarificación con agua potable, pH, 7.6 sin ajustar y sin agitación (□), con agitación 425 rpm, agua potable y control de pH a 4.8 (■) y con agitación 425 rpm, esterilizado, con buffer de acetatos 0.1M, pH 4.8 (●).

Se han utilizado múltiples combinaciones para producir bioenergía y alimentos, como R.W. Detroy, G. St. Julian y S.N Freer, estudian la conversión biológica de los residuos agrícolas, en 1980, en donde estudian a *Aspergillus niger* comparado con varias especies de *Trichoderma*, como buenos productores de celulasas utilizando bagazo de caña de azúcar (Mandels y col 1974, N. Toyama y Kogawa, 1972).

En su mismo artículo nombran al género *Aureobasidium* como levaduras que degradan xilanos y después ser utilizados en la producción de alcohol con la adición de otras levaduras.

En ese estudio todos los sustratos celulósicos fueron pretratados con diferentes métodos. A.V. Bolova y A.A. Klesov en 1990, publican un artículo sobre la comparación de la hidrólisis de celulosa microcristalina utilizando filtrados de celulasas provenientes de la bacteria *Clostridium thermocellum* a 65° C y una mezcla de los hongos de *Trichoderma viridae*, *T. longibrachiatum*, *T. koningii*, a 50° C en columnas, obteniendo 4 a 15% conversión en la primera y 18 a 19% de conversión en *Trichoderma*.

En nuestro caso, probamos a nivel bioreactor la mezcla de dos filtrados, el de *Aureobasidium sp.* CH-Y-TE18, descrito como celulolítico y xilanolítico, con *Aspergillus sp.*, estudiado ampliamente por Aguilar y col. (1986, 1987, 1990, 1993) como pectinolítico.

Los resultados nos muestran una mayor actividad enzimática cuando se mezclan ambos filtrados, llegando hasta 49 g/L que fue la mayor proporción de *Aspergillus sp.* 33% y menor de *Aureobasidium* 67%, que cuando la sacarificación se realiza separadamente en ambos filtrados, como se muestra en la figura 48.

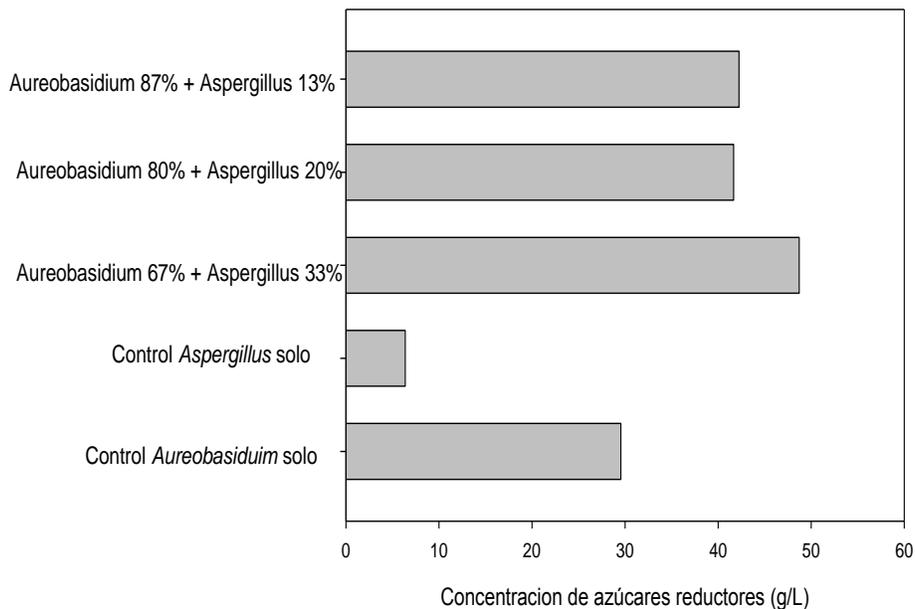


Fig.48 Sacarificación del Bagacillo de caña de azúcar esterilizado 4%, con filtrados de *Aureobasidium* sp.CH-Y-TE18 y *Aspergillus* sp. Durante 48 horas

## VI.- DISCUSION GENERAL

El presente estudio se basó en la producción de enzimas celulolíticas por el hongo levaduriforme *Aureobasidium* sp. CH-Y- M18, ya que es capaz de producir complejos enzimáticos extracelulares como son las celulasas, pectinasas y xilanasas entre otras, capaces de degradar moléculas complejas como lo es la celulosa, hemicelulosa y pectina. Estas enzimas actúan sinérgicamente obteniéndose azúcares reductores como la glucosa, que podría ser utilizada en diversas aplicaciones.

Este estudio se centra en la búsqueda de alternativas para la degradación de materiales celulósicos que consideren el posible impacto ecológico de los procesos y reduzcan las grandes cantidades de estos materiales en el planeta.

Es por esto, que nos dimos a la tarea de producir el sistema enzimático de *Aureobasidium* sp. CH-Y- M18 para desarrollar un sistema de sacarificación y evaluar su potencial para ser probado a escala industrial.

En nuestro caso se utiliza bagazo de caña de azúcar de los cañaverales, que es un desecho agroindustrial subutilizado. Sin pretratamiento y con un tratamiento de esterilización. Los materiales celulósicos históricamente hablando desde los años 60 del siglo pasado, se han centrado en solucionar algunas de los problemas como: su colecta, transporte y su empleo eficiente con el fin de reducir los precios. Debido a la resistencia de los compuestos celulósicos a la hidrólisis enzimática, son sometidos a una gran variedad de pretratamientos que mejoran su degradabilidad pero llevan tiempo, mayores recursos y algunos son contaminantes.

Se encontró que *Aureobasidium* sp CH-Y-TE18, produce una gama de enzimas como son: celulasas,  $\beta$ -glucosidasa, CMCasa, exo- y endo pectinasas y también xilanasas, de manera natural existe un balance de enzimas que pueden hidrolizar el bagacillo de caña.

En este estudio se probó que el efecto de *Aureobasidium* sp CH-Y-TE18, es capaz de producir celulasas con un inóculo de 0.05 UDO, utilizando avicel como única fuente de carbono, la actividad obtenida es prácticamente la misma cuando el nivel de inóculo fue de 0.05 y 0.1 UDO (Fig. 24). Cuando el inóculo fue menor (0.01 UDO), la producción de celulasas fue muy pobre, cerca de 5 veces menor en esta condición que en las dos anteriores donde la producción fue de 4-5 U/ml. Es de hacerse notar que también se obtiene actividad exopectinolítica, (fig26). Sin embargo, en algunos microorganismos se

producen niveles basales en forma constitutiva como se ha descrito en varios trabajos (Aguilar, y col 1986, 1987, 1990, 1993), y este podría ser el caso en *Aureobasidium* sp CH-Y-TE18. Otra posibilidad es que la producción de pectinasas este cooregulada con la de celulasas en esta cepa.

En todas las fuentes de carbono probadas, en cuanto a la actividad celulolítica, los niveles más altos se obtienen con avicel como fuente de carbono, (fig. 28 y 29) seguida por la producción sobre cáscara de limón, (fig.28) y bagacillo de caña, (fig.25, 27 y 28). A diferencia de lo que se encontró con la actividad celulolítica, la actividad pectinolítica se produce en mayores concentraciones cuando se utilizó bagacillo de caña. De hecho los niveles de producción alcanzados con avicel fueron en promedio 60% más bajos en relación a los obtenidos con bagacillo de caña. (fig. 26, 29 y 30). Esta diferencia, que favorece al bagacillo de caña se puede atribuir a la presencia de pectina en el bagacillo lo que no se da en avicel. Como ya se había mencionado, esta cepa aparentemente produce niveles constitutivos de pectinasas, que se incrementan por la presencia de la pectina. A pesar de que la concentración de pectina es muy baja en el bagacillo, es aparentemente suficiente para estimular la producción de las enzimas. Resultados de la producción de pectinasas sobre bagazo de caña se han reportado en fermentación en fase sólida por otros autores (Soccol, 1986; Acuña, 1983; Solis-Pereyra y col, 1988, 1993, 1996).

Con pectina se obtienen niveles muy bajos de azúcares reductores, durante las primeras 72 horas de fermentación, que se incrementan ligeramente después de este tiempo. Es interesante hacer notar que aunque la actividad es baja cuando se utiliza pectina, hay niveles basales de celulasas, que podrían indicar que hay un nivel constitutivo de esta

enzima en *Aureobasidium* sp CH-Y-TE18 (fig. 26, 29 y 30). Sin embargo, se presenta una variabilidad intrínseca de la cepa ya, que resulta lo contrario con algunos autores que bajo estas condiciones no detectan actividad pectinolítica (Pérez, R., 1996)

En nuestros experimentos cuando probamos diferentes fuentes de carbono como avicel, bagazo de caña, cáscara de limón y también pectina, obtuvimos casi el doble de actividad tanto pectinolítica como celulolítica y además, en menor tiempo, lo que hace a esta cepa muy competitiva (Fig. 28 y 29). A las 24 horas de fermentación se alcanzan niveles cercanos a 30 U/ml tanto en pectina como en cáscara de limón, aunque en este último se alcanzan los niveles más altos, contrariamente a lo que ocurrió en el caso de las celulasas, la menor actividad pectinolítica, se obtuvo en avicel, contrario a lo que, algunos autores como Pérez Villalva R.1996, reportan que la actividad pectinolítica no se presenta cuando la fuente de carbono es avicel en *Aureobasidium* sp CH-M-1018.

También se determinó la actividad endo-pectinolítica (Fig. 30). Esta actividad se produce en cáscara de limón, pectina y bagacillo de caña en orden descendente y prácticamente no hay actividad cuando *Aureobasidium* sp. CH-Y-TE18 creció en avicel.

Otros autores, han demostrado también que algunos desechos en la cáscara de limón inducen la producción de pectinasas (Aguilar, 1986, 1987, 1990, 1993) y dada la composición de este desecho que también contiene celulosa y hemicelulosa, es posible inducir también la síntesis de celulasas, pectinasas y xilanasas estas enzimas.(figs. 28, 29 y 30)

Es interesante observar que en el caso de la producción de pectinasas en los desechos agroindustriales, se obtienen rendimientos superiores a los que se obtienen con el sustrato puro. Lo cual podría interpretarse como ya se mencionó, a una selección natural por el sustrato de donde fue aislado este hongo levaduriforme.

Cuando probamos el bagacillo de caña lavado adicionado con extracto de levadura para estimular el crecimiento (figs. 8, 9), varios autores como Kolarova y Farkas, en 1981, muestran el efecto del extracto en la producción de celulasas encontrándose también como es nuestro caso, las enzimas que son constitutivas.

Una gran vertiente en la investigación sobre celulasas no solo es para la producción o síntesis sino también para su utilización en otros procesos como la sacarificación basados en la biodegradación de residuos celulósicos en donde se utilizan pretratamientos de diferentes tipos, ya sean biológicos, físicos, químicos o mixtos (Figura 5, Tabla 3), buscando tiempos y costos redituables. En nuestro caso se utiliza el bagacillo de caña esterilizado, lavado o sin pretratamiento lo cual implica diferentes tiempos, utilizamos la esterilización por 20 minutos, cuando el tiempo de la producción fue mayor a 48 horas, ya que los productos de hidrólisis son un medio altamente favorable para el crecimiento de microorganismos o sea se contamina, también probamos lavar el bagacillo con el objeto de hidratarlo por

24 horas y de quitar algunos azúcares solubles libres que podrían tener, lo cual, también fue favorable y por último utilizamos el bagacillo sin ningún pretratamiento (Fig. 31, 35). A este respecto, Haggett y col 1979, utilizan 3 mutantes de *Cellulomonas* para degradar celulosa microcristalina de algodón sin pretratamiento en cultivos estacionarios y con

agitación orbital, esta última condición, le resultó la más favorable para la producción de celulasas, CMCasa (Choi y col, 1978) y  $\beta$ -glucosidasa (Hagget y col., 1978).

Coincidimos con otros autores en cuanto a la necesidad de agitación y por lo tanto se favorece la aireación, por ejemplo: Sukekuni Mukataka, Nobuyuki Kobayashi, Seigo Sato y Joji Takahashi de Japón, en 1988 realizaron pruebas en *Trichoderma reesei QM9414* de los componentes de celulasas variando la intensidad de la agitación rotatoria de 100, 200, 300, 400 y 500 rpm, relacionado con el oxígeno, reportando que a 300 rpm se presentó mayor producción, seguido por 200 rpm. La producción de CMCasa fue mayor a 200rpm 27 IU/ml a las 72 horas, mientras que la producción de  $\beta$ - glucosidasa fue de 0.1 IU/ml. En cuanto a la producción de proteína extracelular a las 72 horas 200, 300 y 400 rpm de agitación es de 0.82. En el mismo sentido Hendy y col en 1984 y Watson y col, 1984, documentan el uso de agitación para la producción de estas enzimas.

En cuanto a la producción es mayor con las sales de grado analítico, pero su costo es mayor y dado que la diferencia en nivel de producción no es muy grande (15% menor con sales industriales) consideramos que la sustitución no resulta desfavorable, se disminuye ligeramente la productividad pero se ahorra considerablemente en costos. De ese modo (fig. 34 y 35) y como obtuvimos buena actividad, con sales grado industrial, produjimos la enzima en jarra de 14 L.

Las actividades enzimáticas celulolíticas,  $\beta$ -glucosidasa, CMCasa, exo- y endo-pectinolíticas y también xilanolíticas, se presentan en el filtrado en cantidad suficiente para ser utilizado en la sacarificación del bagacillo de caña, bajo las condiciones estudiadas (fig. 36 y 37).

Saha y colaboradores en 1994, en su artículo sobre producción, purificación y propiedades de una  $\beta$ -Glucosidasa termostable de una cepa de color de *Aureobasidium pullulan*, demuestran la interacción sinérgica con celulasa para aumentar la eficiencia de la producción de glucosa de la celobiosa proveniente de la celulosa, el sustrato induce a la enzima.

D.V. Garcia-Martinez, A. Shinmyo, A. Madia y A. L. Demain, en 1980 estudian la producción de celulasas por *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 y AS-39, produce endo- $\beta$ -glucanasa y exo- $\beta$ -glucanasa cuando crece en celobiosa o celulosa, 95 % extracelular, los xilanos fueron degradados por enzimas extracelulares producidos durante el cultivo en celobiosa pero no crece en xilanos. Posteriormente A. Donnison, C.M. Brockelsby, H.W. Morgan y R. M. Daniel de Nueva Zelanda, en 1988, aíslan cinco cepas de bacterias en las termas a 65°C, tres de ellas se comportan como *C. thermocellum*, se probó su capacidad de degradación de materiales celulósicos semejante al artículo anterior, así como la posibilidad de crecer en xilanos como fuente de carbono. Un sin fin de artículos apoyan nuestro estudio en los diferentes aspectos estudiados.

Observamos también, que *Aureobasidium sp* CHY-1018 tiene ciertas variaciones en el color de las colonias pero no pudimos asociar estos cambios con niveles de producción de celulasas ni de las otras enzimas. En este sentido Leathers, 1986 estudió la relación entre la variación de colores en *A. pullulans* con la sobreproducción de xilanasa, sin poder concluir claramente la relación entre la coloración y la producción de xilanasas.

La utilización de enzimas comerciales y sus mezclas para lograr una mejor hidrólisis de diferentes sustratos, así como la Sacarificación y Fermentación Simultánea conocida

como SSF nos lo muestra Hidekatsu Maeda y col, en 1982, utilizan una mezcla de enzimas comerciales como son: celulasas provenientes de *Trichoderma pseudokoningii* y de *T. reesei*, con pectinasas de *Aspergillus niger*, y de *A. genus* y glucoamilasas provenientes de *Rhizopus delemar* y de *A. niger*, que se agregaron a xilanasas inmovilizadas en un gel con una solución de cobre y bisulfito de sodio como conservadores y como sustrato cortes en cubos de *Cassava tuber*, a 55 °C, ellos reportan que se requieren 213 unidades de enzima para hidrolizar 10 ml de la solución del sustrato en 4 horas. Reportan haber obtenido el 94.4 %, de glucosa. Se podría implementar un sistema con levadura inmovilizada para una fermentación alcohólica para obtener etanol lo que daría un avance tecnológico.

Ghosh y col, en 1982 estudian la sacarificación y fermentación simultánea de la celulosa, el efecto de la actividad de  $\beta$ -glucosidasa y la inhibición de celulasas por etanol, utilizaron *Trichoderma reesei* QM9419 y *Saccharomyces cerevisiae* UNSW706800, encontraron que con bagazo pretratado con NaOH en la sacarificación se obtienen 21.80 de glucosa, 2.10 celobiosa, 11.70 xilosa, dando un total de 35.60 % de azúcares reductores y en la SSF 0.24 de glucosa, 0.2 de celobiosa, 12.1 de xilosa y 15.1 de etanol y un total de azúcares reductores de 42.08 %, el etanol inhibió la actividad celulolítica, sin embargo, la inhibición de SSF decreció al remover glucosa y celobiosa, utilizando una doble columna.

El equipo de Ashok Pandey, Poonam Nigam y Manfred Vogel, de Alemania occidental en 1988, efectúan la sacarificación simultánea y enriquecimiento de la proteína de la pulpa de betabel, obtenida en 48 horas por medio de enzimas comerciales de *Aspergillus niger*, pectinasas y hemicelulasas y celulasas de *T. reesei*.

Kolarova y Farkas (1981), estudian la sensibilidad de algunas levaduras a los complejos crudos de enzimas celulolíticas, de *Trichoderma*, *Aureobasidium* y otros 25 mas, los autores indican que la glucosa puede inhibir su desempeño, así como otros factores como la edad del filtrado deben ser probados. En nuestro caso la formación de la glucosa no inhibe la sacarificación.

Mary Mandels en 1982, en Natick, nos dice que la celulasa requerida para la hidrólisis de celulosa es cerca de 100 veces más que la amilasa para la hidrólisis del almidón. Esto se debe a la naturaleza de la celulosa insoluble y recalcitrante y resistente a la hidrólisis. La acción sinérgica de varias enzimas se considera un factor muy importante para mejorar la hidrólisis de celulosa.

Otro reto es llevar al cabo la producción de etanol de celulosa, se proponen procesos de fermentación y sacarificación simultánea, conocidos como SSF, por la hidrólisis enzimática de celulosa a glucosa y la fermentación de la glucosa, por levaduras hasta etanol, al remover la glucosa formada por la hidrólisis se evitan los efectos inhibitorios del sistema celulasa.

Shin-ichiro Abe y Motoyoshi Takagi, en Japón, 1990, utilizan celulasas comerciales de *Trichoderma reesei* QM 9414 y *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3534, utilizando como fuente de carbono el avicel y el periódico pretratado con disco y molino de vibroenergía, obteniendo avicel 0.4, sacarificación 37 y SSF 56 G/L azúcares reductores.

Garg y Neelakantian en 1982, comparan la producción de celulasas en *Aspergillus terreus* utilizando bagazo tratado y no tratado, relacionando la degradación del bagazo con la

biomasa recobrada para el bagazo no tratado fue de 1,020 y tratado 820 mg/g de proteína cruda y la actividad enzimática producida fue de 14.30 y 20, expresada como actividad específica.

Una alternativa en la sacarificación es la reutilización de enzimas pudiendo de esta manera bajar los costos, además de que se ha demostrado que las enzimas celulósicas tienen una alta afinidad con la lignina restante y que del total, solo el 50% se encuentran libres después de la hidrólisis de los polisacáridos lo que es factible recuperarlas en un 90%. Sobre este tema Desphande y Eiksson de Estocolmo, Suecia en 1984, estudian la sacarificación de fibras de trigo pretratado con explosión de vapor, con enzimas reutilizadas y con avicel, obteniendo 0.8, 0.4 y 0.08 respectivamente de azúcares reductores en mg/min. Comparativamente, fig. 15 a y b, obtuvimos una proporción de azúcares reductores más elevada aunque en mayor tiempo y a muy bajo costo.

También, en las aplicaciones actuales lo es la sacarificación y la producción simultánea de alcohol, SSF como los estudios de Blanco y colaboradores, en 1982, nos muestran un estudio de la sacarificación enzimática del bagazo de caña de azúcar al 5% pretratado con NAOH, en columna más eficiente que en matraces con la producción de etanol por vía fermentativa conocido como SSF, con decantamiento de levadura y reciclado del fermento a la columna de bagazo, se realiza a 24 o 48 horas con un rendimiento mayor al 10 % de cultivos agitados, se utiliza otra columna para remover la glucosa formada por hidrólisis, que es inhibidor de la sacarificación.

Sobre el efecto de la SSF. Gosh y colaboradores, en 1983, aumentan el rendimiento entre el 13 y 30 %, a 35°C, con requerimiento de  $\beta$ -D- glucosidasa. Otro estudio, se realiza en la prefectura de Yamaguchi, Japón desde 1983, Miyakawa y colaboradores, han utilizado bagazo de caña de azúcar para producir etanol en la planta- piloto, señalan dificultades para que se lleve a cabo este debido a la resistencia natural de la celulosa a la hidrólisis enzimática , las enzimas celulolíticas son costosas y difíciles de reusar, el rango de hidrólisis por enzimas celulolíticas es muy limitado, las pentosas no pueden ser fermentadas eficientemente y los procesos de destilación convencional y deshidratación requieren de mucha energía.

Para facilitar la hidrólisis combinan molienda mecánica con tratamiento alcalino. Se lleva al cabo la sacarificación por 24 horas a 50°C, pH 5, usan una actividad de celulasa de 50 IU/ml. La fermentación es continua utilizando 3 columnas de levaduras inmovilizadas en alginato de calcio, melasas de caña por 300 horas. En estos estudios se utiliza para producir celulasas a *Trichoderma reesei* y *Sacharomyces cerevisiae* para la fermentación alcohólica.

Con respecto a la concentración del sustrato, Pandey y col. 2000, reportan el porcentaje en que se utiliza el bagacillo de caña de azúcar varía del 0.5 y 10 %, siendo el más frecuente el 5 %. En todos los estudios previos se realizan pretratamientos del bagacillo de caña de azúcar tanto físicos, químicos o combinados.

S. Blanco y col, en 1982 realizan procesos de SSF, la sacarificación y fermentación simultánea para obtener etanol con celulasas de Miles Laboratories, USA, con celulasas

de *T. viridae* utilizando bagazo de caña de azúcar pretratado con NaOH 1%, a 80° por 3 h, lavado y secado, obtienen 0.8 azs red. Y en el no tratado 0.1, en los cultivos en columna y 0.72 y 0.08 gm/L respectivamente, 10% menos eficiente que en matraces agitados, también estudian la adición de levadura decantada y reciclada, obteniendo etanol.

Con respecto a los estudios que requieren de sistemas sofisticados y de alto costo como D.E. Otter y P.A. Munro, de la Universidad de Auckland en Nueva Zelanda, en 1989, utilizan celulasas de *Trichoderma reesei*, avicel y desorbentes como Tween 80 y asimismo relacionan el pH, la temperatura, el tamaño de partícula del sustrato y el tiempo de hidrólisis. Al utilizar glicerol en diferentes concentraciones combinado con Tween 80 a una concentración de 0.005%, y Triton X-100, como detergentes se encontró un 68 % de desorción de la enzima del avicel en tween a pH 5.

Mary Mandels en Natick, 1982 sobre la sacarificación dice que el cuello de botella para convertir sustratos celulósicos por procesos enzimáticos a azúcares fermentables y energía líquida son: la disponibilidad del sustrato adecuado, el pretratamiento y la cantidad suficiente de enzima requerida. El sustrato debe estar disponible en grandes cantidades durante todo el año, fácil de colectar, tener alto contenido en celulosa y requerir poco o ningún pretratamiento. Se requiere bajo costo.

Lars Vallander y Karl-Erick Eriksson en Estocolmo, Suecia en 1987, estudian la recirculación de enzimas en la sacarificación de materiales lignocelulósicos, utilizando pretratamiento de explosión de vapor del algodón aspen y paja de trigo, removieron los productos de hidrólisis y así obtuvieron 67 y 56 % azúcares producidas en 48 horas.

Claudia Martinez Anaya, Edgar Balcazar López y Edgar Dantàn Gonzalez y Jorge L. Folck Maltel del Instituto de investigaciones Biotecnológicas de la UAEM en Cuernavaca, Morelos, en 2008, estudian las celulasas fúngicas, sobresaltando la característica recalcitrante del sustrato y la importancia de su uso para la bioconversión de energéticos de segunda generación.

Por los resultados obtenidos en nuestro estudio *Aureobasidium sp* es un buen candidato para la producción industrial de estas enzimas estudiadas, bajo las condiciones experimentales y lograr la sacarificación incluso simultánea hasta biogás y etanol.

En nuestro caso se utiliza bagazo de caña de azúcar de los cañaverales, que es un desecho agroindustrial, subutilizado, esterilizado o sin pretratamiento alguno.

La utilización de materiales celulósicos históricamente hablando desde los 60's, se han centrado en solucionar algunas de los problemas como bajar costos de los materiales de desechos en: su colecta, transporte y en la utilización eficiente.

Debido a la resistencia de los compuestos celulósicos a la hidrólisis enzimática, son utilizados una gran variedad de pretratamientos que mejoran su reactividad pero llevan tiempo, mayores recursos y algunos son contaminantes.

Se comprobó que *Aureobasidium sp* CH-Y-TE18, que fue aislado de cañaveral donde por selección natural ha perfeccionado su complejo enzimático.

Se encontró que *Aureobasidium sp* CH-Y-TE18, al contar con actividades enzimáticas celulolíticas,  $\beta$ -glucosidasa, CMCasa, exo- y endo-pectinolíticas y también xilanolíticas, de manera natural existe un balance en la preparación de enzimas óptima para hidrolizar el sustrato Bg.

## VII.- CONCLUSIONES.

Un gran reto desde los 70's que sigue vigente en nuestros días se refiere al desarrollo de procesos comerciales para convertir la celulosa y hemicelulosa en etanol, metanol u alcoholes, para sustituir la gasolina.

En este estudio se sientan las bases para que se pueda continuar con pruebas para realizar la sacarificación y la producción simultánea de alcohol, con miras a obtener un sistema eficiente a nivel industrial.

Por los resultados obtenidos, el presente estudio es un claro ejemplo del estudio de nuevas técnicas de preparaciones de materiales de desecho, conversión biológica y productos con aplicación comercial de alta calidad, en diferentes campos tanto alimentarios, farmacéuticos, energéticos, entre otros.

También, es importante señalar que este proceso contribuye a la conservación del ambiente y no contaminantes.

Además, de que son desarrollados localmente con biomasa como el bagazo de caña que es un producto de desecho, disponible todo el año y es degradado en este estudio por

*Aureobasidium sp*, capaz de producir el sistema celulolítico completo para ser utilizado en la sacarificación, provenientes tanto el sustrato como el sistema enzimático completo del mismo nicho ecológico.

Hacemos hincapié en que probamos algunas de las recomendaciones expresadas para poder aprovechar nuestros recursos, que se refieren a estudios que permitan desarrollar las capacidades y necesidades de energía, ensayos sobre las fuentes de biomasa, los requerimientos hacerlos competitivos, definir las necesidades del mercado y evaluar las tecnologías necesarias para convertir los recursos locales en energéticos para llenar las necesidades locales. Identificamos y se podrá evaluar el posible impacto económico, ambiental y social, basada en estrategias de la implementación de biomasa a energía

El organismo estudiado, presenta una gran variabilidad, tanto en su morfología como en su comportamiento como hemos venido señalando a lo largo de este trabajo, como la coloración de blanca cremosa a naranja e incluso violácea, la morfología de las colonias de brillante a opaca, su forma estrellada a ovoide, han permitido relacionar la variabilidad intrínseca, intentando separarlas en las diferentes cepas y relacionarlas con la producción de diferentes sistemas enzimáticos como las xilanasas, aunque no se ha logrado.

Ya que el organismo estudiado presenta un buen perfil para ser explotado, se podrían seguir las técnicas de evolución racional (fig. 11 de la introducción) y evolución dirigida (figura 12, tabla 4) para aumentar el potencial deseado, como ha sucedido desde los 80's, Mary Mandels y col 1985, M. P. Coughan, 1985, trabajan sobre la manipulación de genes de hongos y B.S. Montenecourt y D.E. en 1985, J.N. Saddler en 1986, Eveleigh en 1987,

entre otros, han buscado modelos de acción, naturaleza del complejo enzimático, métodos analíticos y acercamientos para mejorar la producción.

Por último, falta definir y caracterizar su morfología, ciclo de vida, la especie biológica, mapeo genético, para aplicaciones como clonación de los genes de interés industrial como celulasas, xilanasas y pectinasas, identificar las micotoxinas que produce así como otros metabolitos secundarios.

Nosotros encontramos que al contar *Aureobasidium sp.* Con sistemas enzimáticos no solo celulolíticos,  $\beta$ -glucosidasa, CMCasa, sino también pectinolíticos y xilanolíticos y alta concentración de proteína, que dado los resultados actúan sinérgicamente, nos invitan a proponerles la factibilidad de su producción a mayor escala.

## VII.-REFERENCIAS

### 1.-Bibliográficas.-

- Abdel-Mohsen S. Ismail, Abdel-Hamid A. Hamdy, Nadia Naim, Abdel-Monem H. El-Refai. 1985. "[Enzymatic saccharification of Egyptian sugar-cane bagasse](#)". Agricultural Wastes, XII(2): 99-109
- Acuña A.M.E. 1983."Producción de Celulasas y Xilanasas por Fermentación sumergida a partir de bagacillo de caña de azúcar" Tesis de Lic. en Ingeniería Industrial. Inst. Tecnol. de Sonora. 103 pp
- Acuña A.M.E. 1991."Evaluación de los parámetros físico-químicos que afectan la producción de celulasas y xilanasas por *Aureobasidium sp*" Tesis de maestría en investigación biomédica básica. IIB. UNAM. 83 pp
- Acuña-Arguelles M.E., M.Gutierrez-Rojas, G. Viniegra-Gonzalez. & E. Favela-Torres. 1995. "Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* by sub-Merged and solid state fermentation". Appl. Microbiol. & Biotech. 43, 808-814.
- Ait N, N. Creuzet & P. Forget. 1979. "Partial purification from *Clostridium thermocellum*" J. of Gral. Microbiol, 113:399-402
- Aguilar G. & C. Huitrón. 1986. "Application of fed-batch cultures in the production of extracellular pectinasas by *Aspergillus sp.* Enz. Microb. Technol. IX, Sep: 541-545
- Aguilar G. & C. Huitrón. 1987. "Stimulation of the production of extracellular pectinolytic activities of *Aspergillus sp.* By galacturonic acid and glucose addition". Enzyme & Microbial Tech. 9:690-696

- Aguilar G. & C. Huitrón. 1990. "Constitutive exo-pectinase produce by *Aspergillus sp.* CH-Y-1043 on different carbon source. *Biotech.Lett.*12:655-660
- Aguilar G. & C. Huitrón. 1993. "Conidial and micelial- bound exo-pectinase of *Aspergillus sp.* *FEMS Microbiol. Lett.* 108: 127-132
- Álvarez A. M. E., B. Trejo-Aguilar & G. Aguilar-Osorio. 2004. "Identificación de las enzimas producidas por cepas de *Aspergillus sp.* en residuos de tamarindo". *Mem. Ier Enc. Nal. Biotec., UPIBI, IPN*,1:1-4.
- Allen A. P. & P. Sternberg. 1980. " $\beta$ -glucosidase production by *Aspergillus phoenicis* in stirred-tank fermentors" *Biotech.Bioeng. Symp.* 10:189-197
- Allen S.L. & C.D. Roche. 1989. "Effects of strain and fermentation conditions on production of cellulase by *Trichoderma reesei*" *Rev.Biotech. & Bioeng.* XXXIII:650-656
- Allermann K. & J. Olsen. 1983. "Production of mycelial biomass on waste water in a rotating disc fermenter" *Applied Science Pub*:93-95
- Andren R.K, M. Mandels & J.E Modeiros J.E. 1976."Production of sugars from waste cellulose by Enzymatic hydrolysis: Primary evaluation of substrates" *Process Biochem*, Oct.: 2-11
- Andreotti R.E. 1980. "Laboratory Experiment for high yield cellulose fermentation" II Int. Course Cum Symp. Bioconv. and Biochem. Enging.New Delhi, India. Feb. 17pp.
- Annunziato M. E. & R. R. Mahoney. 1987. "Partial purification and characterization of  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus oryzae*." *J. Food Biochem.* 11:263-277.
- Arnold F.H. 1998. "Design by directed evolution". *Acc Chem. Res* 31:125-131 y en *Nature Biotechnol.* 16: 617-618
- Arnold F. H. 2001. "Combinatorial and computational challenges for biocatalyst design". *Nature* : 409:253-257.
- Arnold F.H, Wintrode PL, Miyazaki K, & A. Gershenson. 2001. "How enzymes adapt: lessons from directed evolution". *Trends Biochem Sci.* 26:100-106.
- Arnold L. 2007. "Earthshine observation of vegetation and implication for life detection on other planets". A Review of 2001-2006 works. *Space Science Rewies* 26, jun. 13pp
- Arrizubieta M.& J. Polaina. 2000."Increased termal resistance and modification of the catalytic properties of a beta glucosidase by random mutagénesis and in Vitro recombination". *J. Biol. Chem.* 275 (37): 28843-28848
- Bailey M, T. Enari & M. Linko Eds. 1975. "Symposium on Enzymatic hydrolysis of cellulose" the Finnish National Fund for research and development (SITRA), Aulanko, Finland. 1857pp
- Bailey J.E. & D. Ollis. 1977. "Biochemical engineering fundamentals." Int. Student Edit. Mc Graw Hills. 418pp
- Baker C. J, C.H. Whalen & D. F. Bateman.1977. "Xylanase from *Trichoderma pseudokoningii*: Purification, characterization and effects on isolated plant cell walls". *Phitopath.* 67:1250- 1258.
- Baker J. O, W.S. Adney, S.R. Thomas, R.A. Nieves,Y.C. Chou, T.B. Vinzant, M.P. Tucker, R.A. Laymon & M.E. Himmel 1995. "Synergism between Purified Bacterial and Fungal Cellulases. In *Enzymatic degradation of insoluble polysaccharides*"; Sandler, J. N., Penner, M. H., Eds.; Amer. Chem. Soc. Washington, D.C., 618, pp 113- 141.

- Baker J.O, M.R.King, W.S. Adney, S.R. Decker, T.B. Vizant, S.E. Lantz , R.A. Nieves , Thomas S. R, L. C. Li , D.J. Cosgrove & M.E. Himmel 2000. "Investigation of the cell-wall loosening protein expansin as a possible additive in the enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass". *App. biochem. & Biotech.* 84-86: 217-223
- Baker A. & I.A. Sparks. 2005. "Peroxisome protein import: some answers, more questions". *Current opinion in Plant Biology* 8: 640.
- Baker J.O, J.R. McCarley, R. Lovett, C.H.Yu, W.S. Adney, T.R. Rignall. 2005. "Catalytically enhanced endocellulase Cel5A from *Acidothermus cellulolyticus*". *Appl Biochem Biotechnol*: 121–124: 129–148.
- Bakir U, S. Yavascaoglu, F. Guvenc & A. Ersayin 2001. "An endo- $\beta$ -1,4-xylanase from *Rhizopus oryzae*: production, partial purification and biochemical characterization". *Enz. Microb. Technol.* 29: 328–334.
- Baldwin R. D. 1986. "Technology transfer at the university of Washington." *SRA Journal.* 13-26
- Barend J.M, M. de Wet, K.A Matthew, K.H. Storbeck, W.H van Zyl & B.A. Prior. 2008. "Characterization of a family 54 $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Aureobasidium pullulans*." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77: 975-983
- Beckhorn E.J, M.D. Labbee & L. A Underkofler. 1965. "Production and use of microbial enzymes for food processing." *J. Adr. Food Chem.* XIII (1), Jan-Feb:30-34
- Beguín P & H.Eisen. 1978. "Purification and partial characterization of three extracellular cellulases from *Cellulomonas* sp." *Eur.J.Biochem* 87:525-531
- Beguín P, O. Grepinet, J. Millet & J.P. Aubert.1988. "Recent aspects in the biochemistry and genetics of cellulose degradation" 8<sup>th</sup> Int. Biotech. Symp. Paris:1015-1029
- Begum A, H. Rahid & N. Choudhury. 1988. "Saccharification of gamma-ray and alkali pretreated lignocellulosics".*Jour of Ferment tech.* LXVI (6): 681-684
- Beldman G, T.M Rombouts, A.G.J. Voragen & W. Pilnik. 1984. "[Application of cellulase and pectinase from fungal origin for the liquefaction and saccharification of biomass](#)". *Enzyme and Microbial.Technol.* V.VI (11) Nov: 503-507
- Beltrame P. L, P. Carniti, B. Focher, A. Marzetti, & V.Sarto. 1984. "Enzymatic hydrolysis of cellulosic materials: a kinetic study" *Biotech and Bioeng.* XXVI: 1233-1238
- Benech-Arnold R.L. 2001. "Bases of pre-harvest sprouting resistance in barley: physiology, molecular biology and environmental control of dormancy in the barley grain." *Barley Science. Recent advances from molecular biology to agronomy of yield and quality.* Ed. G. A. Slafer, J.L. Molina- Cano, J.L. Araus. R- Savin & I. Romagosa. Food Product press. New York, USA, pp 481-502
- Benedetta F. M, M.R. Dessi, R. Mauri, A. Rinaldi & G. Satta. 1984. "Hyghly efficient solubilization of natural lignocellulosic materials by a commercial cellulose immobilized on various solid supports". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19:306-311
- Berghem L. E.R. & L. G. Pettersson. 1973. "The Mechanism of Enzymatic Cellulose Degradation. Purification of a Cellulolytic Enzyme from *Trichoderma viride* Active on Highly Ordered Cellulose". *Eur. J. Biochem.* 37:21-30
- Berezin I. V & A. A Kleslov. 1980. "Enzyme Engineering", Wingard L.B, ed. Plenum press NY. USA. P83-165

- Berezin I. V & A.A. Klyosov. 1981. "Enzymes Attack Cellulose". Science in the USSR. (3): 6-15
- Berezin I. V & A.A Kleslov. et. al 1987. "Enzyme Engineering", . VYSHAYA SHKOLA, Moscow. 143 pp.
- Bhat M .K. 2000. "Cellulases and related enzymes in biotechnology". Biotech. Adv. 18:355–383
- Bisaria V. S & T. K. Ghose. 1981. "[Biodegradation of cellulosic materials: Substrates, microorganisms, enzymes and products](#)" Enz.& Microb. Tech. VIII(2), April: 90-104
- Biely P, Z. Krátky, M. Vr1anská & D. Urmanieová. 1980 "Induction and inducers of endo-1,4-b-xylanase in the yeast *Cryptococcus albidus*". Eur J Biochem 108:323–329
- Biely P & E. Slavikova. 1994. "New search for pectolytic yeasts". Folia Microbiol., 39: 485-488.
- Biely P, K. Heinrichová & M. Kruzřiková. 1996. "Induction and inducers of the pectolytic system in *Aureobasidium pullulans*". Curr. Microbiol., 33: 6-10.
- Blancas A, L. Alpizar, G. Larios, S.Saval & C. Huitròn. 1982. "Conversion of *Henequen* pulp to microbiol biomass by submerged fermentation". Biotechnol & Bioengin. Symp (12): 171-175
- Blanco S, A. Gamarra, C. Cuevas & G. Ellnrieder. 1982 "Etanol production by coupled saccharification and fermentation of sugar cane bagasse" Biotech letters Vol. IV (10):661-666
- Blanco P, C. Sieiro & T.G. Villa. 1999. "Production of pectic enzymes in yeasts". FEMS Microbiol. Lett., 175: 1-9.
- Blotkamp P. J., M.Takagi, M.S. Peberton & G.H. Emert. 1978. "Enzymatic hydrolysis of cellulose and simultaneous fermentation to alcohol. AIChE Symp Series 74:85-90
- Bolobova A. V & A. A. Klysov. 1990. "Comparison of efficiency of microcrystalline cellulose hydrolysis using bacterial and fungal cellulases". A. N. Bakh Inst.of Biochem, Acad. of Sciences of the URSS, Moscow. 26, May-June 3: 321-327
- Borchert A. & K. Buchholz. 1987. "Enzymatic hydrolysis of cellulosic materials" Process Biochem, Dec 2: 173-180
- Boyer F., F. Rodney. 1993. "Modern Experimental Biochemistry" 2<sup>a</sup> ed. The Benjamín/Cumming Pub. Co. Inc. 555 pp
- Brill, J. W. 1981."Agricultural microbiology".Scientific American Vol. CCXLV(3): 146-157, 199-215 ISSN: 0036-8733 En: /  VER [Scientific american](#) V. 245 N. 3 1981
- Brownell H. H & J.N. Saddler. 1987. "Steam pretreatment of lignocellulosic material for enhanced enzymatic hydrolysis". Biotechnol. Bioengin. XXIX:228-235
- Buckeridge M.S, C. E. Vergara & N. C. Carpita. 1999. "The Mechanism of Synthesis of a Mixed-Linkage (133), (134)b-D-Glucan in Maize. Evidence for Multiple Sites of Glucosyl Transfer in the Synthase Complex1". Plant Physiology, August,CXX:1105–1116, www.plantphysiol.org 1999 American Society of Plant Physiologists
- Buckeridge M. S, C. Rayon, B. Urbanowicz, M.A.S Tiné & N. C. Carpita. 2004. "Mixed lincage (1-> 3), (1- >4)-β-D-Glucans of grasses". Cereal Chem. LXXXI (1): 115-127
- Buzzini P & A. Martini. 2002. "Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments" J. of App. Microbiol.(93): 1020-1025
- Cabello-velasco A, J.S. Ruiz & M.L. Orihuela-Alcocer. 1982. "Producción de pectinasas

- bacterianas utilizando pulpa de café como substrato". Rev. Lat-amer.Microbiol. XXI:172-179
- Camacho N & Aguilar G. 2003. "Xylanase Produced by *Aspergillus sp. FP-470 159*" Human Press. CIV(3), March, ISSN: 0273-2289
- Camacho N & Aguilar G. 2003 "Production, Purification and characterization of a low-molecular-mass-Xylanase from *Aspergillus sp.* And its application in baking" Applied Biochemistry and Biotechnology.CIV(3), 159-172
- Carpita N. C & D.M. Gibeaut. 1993. "Structural Models of primary cell walls in flowering plant: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. Plant J. 3, p1-30
- Carpita N.C. 1996. "Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol. 47, p 445-476
- Carpita N.C. & M.C. Mc Canm. 2000. "Chapter 2:"The cell wall" in Biochem and Mol. Biol. of plants. Amer Soc. Plant Physiol.
- Carpita N. C, M. Tierney & M. Campbell. 2001. "Molecular biology of the plant cell wall: searching for the genes that define structure, architecture and dynamics". Plant Mol. Biol. 47:1-5
- Castillo P. A. 1987. "Producción de enzimas celulolíticas para la Obtención de protoplastos de células vegetales" Tesis de licenciatura en Biología. UNAM. Fac. de Ciencias.63 pp.
- Catcheside D.E.A, J. P. Rasmussen, P. J. Yeadon, F. J. Bowring, E. B. Cambareri , E. Kato, J. Gabe & W. D. Stuart. 2003."Diversification of exogenous genes in vivo in *Neurospora*". Appl Microb. Biotech. 62:544-549
- Cen P. & L. Xia. 1999. "Production of Cellulase by Solid-State Fermentation". Adv. in Biochem. Engine. Biotech, LXV: 70-91
- Chander K, R & A. Singh. 1993. "Lignocellulose Biotechnology: Current and Future Prospects" Critical Reviews in Biotech, XIII (2):151-172
- Changeux, J.P. 1965. "The control of Biochemical Reactions". Scientific American. April. XII(4): 36-45
- Chaturvedi V. 2002 "Mycology/Mycology Proficiency Testing Program". Critique. New York State Department of HealthWadsworth Center, January 37pp. [mycology@wadsworth.org](mailto:mycology@wadsworth.org)
- Chemoglozov V.M, D. Ermolova, Y.V. Vozny & A.A. Klyosov.1989. "A method for detection of cellulases in polyacrylamide gels using 5-Bromoindoxyl- $\beta$ -D-cellobioside: high sensitivity and resolution". Anal. Biochem 182:250-252
- Cheng-Shung G, M.R. Ladish & G.T. Tsao. 1977. "Cellobiose from *Trichoderma viridae*: purifications, properties, kinetics and mechanism" Biotech. & Bioeng. XIX: 959-981
- Cheng-Shung G, C.M. Maun & G.T. Tsao. 1981. "Direct fermentation of cellulose to ethanol by a cellulolytic filamentous fungus, *Monilia ap.*" Biotech. Letters III,2:77-82
- Cherry JR, Fidantsef AL. 2003. "Directed evolution of industrial enzymes: an update. Curr Opin". Biotechnol. 14:438-43.
- Chi Z, Wang F, Chi Z, Yue L, Liu G & T. Zhang. 2009. "Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast". Appl. Microbiol. & Biotech. Pubh. Springer berlin/ Heidelberg. LXXXII (5) abril: 793-804
- Choi W.Y, Haggett K.D. & N.W. Dunn. 1978. "Isolation of a cotton wool degrading strain of

- Cellulomonas*: mutans with altered ability to degrade cotton wool". Aust. J. Biol.Sci 31: 553-564
- Choudhury N, P.P.Gray & N.W. Dunn. 1980. "Reducing Sugar Accumulation from alkali Pretreated Sugar Cane Bagasse using *Cellulomonas*" Europ. J. Appl. Microb. Biotechnol 11; 50-54
- Choudhury N, P.P.Gray & N.W. Dunn. 1980. "Saccharification of sugar cane bagasse by an enzyme preparation from *Cellulomonas*: resistance to product inhibition" Biotech letters. II,10:427-428
- Christov, L.P. & B.A. Prior. 1993. "Xylan removal from dissolving pulp using enzymes of *Aureobasidium pullulans*". Biotech. Letters. XV,12: 1269-1274
- Christov L.P., Akhtar, M & B.A. Prior. 1996. "Biobleaching in dissolving pulp production". In Biotechnology in the pulp and paper industry: recent advances in applied and fundamental research: proceedings of the VIth Int. Conf. on Biotech. in the pulp and paper industry. Ed. by Ewald Srebotnik, Kurt Messner. Vienna, Austria. Facultas-Univ-Verf., p625-628
- Civas A, R. Eberhard, P. le Dizet & F. Petek. 1984. " Glycosidases induced in *Aspergillus tamaris*. Secreted  $\alpha$ -D-galactosidase and  $\beta$ -D-mannanase." Biochem. Jour.19: 857 –863.
- Cocking E. C. 1960. "A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles". Nature, Lond. 187:962-963
- Coughlan M.P. 1985. "The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application". Biotechnol. Genetic Eng. Rev. 3:39-109
- Covarrubias R.A & G.I.Cassab. 2003. "CapXVIII. Matriz extracelular de plantas" en Biología Celular y Molecular, Jimenez L. P., H. Merchant. Ed. Pearson Ed., México: 547-591
- Cysuwsku, G.R & Ch. R. Wilke. 1976. "Utilization of cellulosic materials through enzymatic hydrolysis I. Fermentation of hydrolyzate to ethanol and single- cell protein". Biotech. & Bioeng. 18:1296-1313
- Dale E.B. 1987. "Lignocellulose conversion and the future of fermentation biotechnology" TIBETCH V,Oct: 287-291
- Dalton, J.P. A. 1973 "Chemicals from biological resources" Intermediate tech. development group. London. 24pp
- Das H. & S.K. Singh. 2004. "Useful Byproducts from Cellulosic Wastes of Agriculture and Food Industry-A Critical Apraisal". Critical Reviews in Food Science and nutrition; Pro Quest Medical library LXIV,2:77-89
- Da Silva, J.G., Serra, G.E., Moreira, J.R., Concalves, J.C., and Goldemberg, J. 1978. Energy balance for ethyl alcohol production from crops. Science 201:903-906.
- Davies G.J, A.M. Brzozowski , M Dauter, A. Varrot & M. Schülein . 2000. "Structure and function of *Humicola insolens* family 6 cellulases: structure of the endoglucanase, Cel6B, at 1.6 Å resolution. The Biochem Jour. 348pt10:201- 207.
- Dekker R.F & A.F.A. Wallis. 1983. "Enzymatic saccharification of supercane bagasse pretreated by autohydrolysis steam explosion". Niotech bioeng. 25:12:3027-3048
- Delmer D.P.1987. "Cellulose Biosynthesis". Ann.Rev.Plant.Physiol. 38: 259-290
- Demain A.L. 1998. "Induction of microbial secondary metabolism". Int Microbiol 1:259–264

- Demain A.L. 1999. "Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms". *Appl Microbiol Biotechnol* 52:455–463
- Demain A.L & R.P Elander. 1999. "The b-lactam antibiotics: past, present, and future". *Ant v Leeuwenhoek* 75:5–19
- Demain A.L. 2000 "Small bugs, big business: the economic power of the microbe". *Biotechnol Adv* 18:499–514
- Demain A. L. 2000. "Microbial biotechnology". *Trends Biotechnol.* 18:26–31
- Demain A L. 2001. "Molecular genetics and industrial microbiology— 30 years of marriage". *J Ind Microbiol Biotechnol.* 27:352–356
- Demain A.L & P. Vaishnav.2002. "Regulation of b-lactam antibiotic biosynthesis by carbon sources". *Chim Oggi/Chem Today XX*, 11–12:46–51
- Demain A. L & P. Vaishnav. 2003. "Nitrogen regulation of biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolic products". *Pharma Chem II*, 10:92–96
- Demain A.L. 2004. "The biopharmaceutical revolution". *Chim. Oggi/Chem Today XX*,11–12:41-44
- Demain A. L & P. Vaishnav. 2004. "Secondary metabolism in microbes and its control by phosphate and metals. *SIM News* 54:104–113
- Demain A.L., M. Newcomb & J. H. David Wu. 2005. "Cellulase, *Clostridia*, and Ethanol". *Microbiol. & Mol. Biol. Reviews*, Mar. LXIX (1): p. 124–154
- Demain A.L. 2006. "From natural products discovery to commercialization: a success story". *J. Ind. Microbiol Biotechnol.* 33: 486–495
- Demain A.L. & J.L. Adrio. 2008. "Contributions of Microorganisms to Industrial Biology". *Mol. Biotechnol* 38:41–55
- Dennis C & R.W.M Buhagiar 1973. "Comparative study of *Aureobasidium pullulans* A. *prunorum* sp. Nov., and *Trichosporon pullulans*". *Trans Brit Mycol Soc.* 60:567–575
- Deschamps F & M.C. Huet. 1984. "β-Glucosidase production by *Aspergillus phoenicis* in solid state fermentation" *Biotechnol. Lett Springer Netherlands VI(1):55-60*
- Deschamps F & M.C. Huet. 1984. "β-Glucosidase production in agited solid fermentation, study of its properties" *Biotechnol Lett VI(7):451-456*
- Deshpande M. V, & K.E. Eriksson. 1984. "[Reutilization of enzymes for saccharification of lignocellulosic materials](#)". *Enzyme and Microbial Technol.* Vol. VI( 8), August:338-340
- Deshpande M. S, V.B. Rale & J. M. Lynch. 1992. "*Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: a status report". *Enzyme Microb. Technol.* 14:514-527
- Detroy R. W, G.St. Julian & S.N.Freer. 1980. "Chemical and biological conversion of agricultural residues for energy and feedstuffs". *Symp. On Chem. And energy production, combined Meeting of American Chemical Society. New Orleans, Louisiana.*
- de Bekker C, A. Wiebenga, G. Aguilar, H.A.B Wösten. 2009. "An enzyme cocktail for efficient protoplast formation in *Aspergillus niger*". *Jour. Microbiol. Meth*, LXXVI, 3:305-306 online, 14 nov.
- de Vries O.M.H & J.G.H.Wessels. 1973a. "Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by combined action of purified β- 1,3-glucanase and chitinase derived from *Trichoderma viridae*". *J. Gen. Microbiol* 76: 319-330

- de Vries O.M.H & J.G.H.Wessels. 1973b. "Effectiveness of a lytic enzyme preparation from *Trichoderma viridae* in releasing protoplasts from fungi, particularly basidiomycetes". *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol Serol* 39:397-400
- de Vries J.A, F.M Rombouts, A.G.J. Voragen & W. Pilnik. 1982. "Enzymic degradation of apple pectins. *Carbohydr. Polym.* 2:25-33
- de Vries R.P. & J. Visser. 2001. "*Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides". *Microbio. & Mol. Biol. Reviews. Amer. Soc. For Microbiol.* Dec. LXV(4): 497-522.
- de Vries R.P, J. Jansena, G. Aguilar, L. Parenicova, V. Joosten, F. Wülfert, J. A.E. Benen & J. Visser. 2002. "Expression profiling of pectinolytic genes from *Aspergillus niger*" *FEBS26577, Letter* 530: 41-47
- de Vries R.P. 2003. "Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide- degrading enzymes". *Microbiol. Biotechnol.* 61: 10- 20
- Dewey D, Y. Ryua & M. Mandels. 1980. "Cellulases: Biosynthesis and applications". *Enzyme and microbial technol.* II, abril :91-102
- de Bary G. A. 1918 "Mushroom observer *Aureobasidium pullulans.*" *Annals d'École National d'Agric. de Montpellier, N.S.* 16: 39
- Donnison A. M, C.M. Brockelsby, H.W. Morgan & R.M. Daniel. 1989. "The degradation of lignocellulosic by extremely thermophilic microorganism". *Biotech. & Bioeng.* Vol XXXII: 1495-1499
- Driouch A, C. F. Zhang & A. Staehelin. 1993. "Effect of Brefeldin A on the structure of the Golgi Apparatus and on the synthesis and secretion of proteins and polysaccharides in Sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) suspension-cultured cells". *Plant physiol.* 101:1363-1373
- Duff S. J. B, D.G. Duff, D. G. Cooper & O. M. Fuller. 1986. "[Evaluation of the hydrolytic potential of a crude cellulase from mixed cultivation of \*Trichoderma reesei\* and \*Aspergillus phoenicis\*](#)" *Enzyme and Microbial Technol.* Vol.VIII (5), May:305-308
- Duff S.J.B, D.G. Cooper & O.M. Fuller. 1987. "Effect of media composition and growth conditions on production of cellulase and  $\beta$ - glucosidase by a mixed fungal fermentation" *Enzyme Microbiol. Technol.* IX January: 47-52
- Dunlap C.E. & C.D. Callihan. 1969. "Microbial protein production from sugar cane bagasse" *Sugar Journal* XXXII (2). July: 13-16
- Durand A, P. Arnoux, O Theilard de Chardin, D. Chereau, C.Y. Boquien & Larios A.G. 1983. "Protein enrichment of sugar beet pulp by solid state fermentation" *Applied Science Pub*:120-123
- Dwight L. Miller. 1975. "Annual crops- a renewable source for cellulose". *Applied polymer symp.* 28:21-28
- Dwivedi C.P. & T.K. Ghose. 1979. "A model on hydrolysis of bagasse cellulose by enzyme from *Trichoderma reesei* QM9414" *J. Ferment. Technol.* LVII:15-24
- Ed. Arora D.K, Elander R.P. & K.G. Mukerji. 1992. "Handbook of Applied Mycology". Vol.IV. "Fungal Biotechnology". Ed Marcel Dekker, Inc. NY. pp. 1114
- Ed. Bergmeyer H. U. 1974. "Methods of enzymatic analysis. Vol. I". 2nd English ed. Acad. Press. Inc. 62pp
- Ed. Ferranti M.P & A. Fiechter. 1985. "Production and feeding of single cell protein"

- Proceedings of the cost workshop. Zurich Switzerland. Applied Science Pub. Elsevier Science pub. Co: 205pp
- Ed. -Godfrey T & West S. 1996. "Industrial Enzimology." (2ª ed.). MacMillan Press Ltd., London. 360 pp
- Ed. Morón C, I. Zacarías & S. de Pablo. 1997. "Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición" ONU- FAO para América latina y del Caribe. Univ. de Chile Inst. De Nutrición y Tecnología de Alimentos. Santiago de Chile. 368pp. <http://WWW.fao.org/docrep/010/ah833s/ah833s0>
- Ed. Wilke C.R. 1975. "Cellulose as a chemicals and energy resource". Biotechnol & Bioeng 5<sup>th</sup> Symp Calif. Pub. John Wiley & Sons 358pp
- Edwards M, C. Iain. C. M. Dea O, Paul V. Bulpin Q, & J. S. Grant Reid. 1986. "Purification and Properties of a Novel Xyloglucan-specific *Endo*-(1 +4)- $\alpha$ -glucanase from Germinated Nasturtium Seeds (*Tropaeolum majus* L.)". by The Amer. Soc. of Biol. Chemi., Inc. CCLXI, No . 20, Issue of July 15, pp. 9489-9494
- Esteaubauer H, G. Jungschaffer & J. Schurz. 1981. "Enzymatic hydrolysis of cellulose" *Holzforschung* 35,3: 129-135
- Eveleigh D.E. 1985 "*Trichoderma*" in *Biology of Industrial Microorganisms*. Ed. By Demain A.L. 6 N. A. Solomon. The Benjamin/Cummings Pubh. Co, Inc. USA. Cap. XVI:487-509
- Eveleigh D.E. 1987. "Cellulase: a perspective". *Phil Trans. R. Soc. Lond.* A321:435-447
- Fan L.T, Y-H. Lee & D.H. Beardmore. 1979. "Major chemical and physical features of cellulosic materials as substrates for enzymatic hydrolysis". *Adv. Biochem Enz* 14:101-117
- Fan L.T; Y-H. Lee & D.H. Beardmore. 1980. "Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: effects of mayor structural features on cellulose on enzymatic hydrolysis " *Biotechnol. Bioeng.* XXII: 177-199
- Fan L.T; M. M. Gharpuray & Y-H. Lee 1981. "Evaluation of pretreatments for enzymatic conversión of agricultural residues". *Biotech. Bioeng. Symp.* 11:29-45
- Fan L.T, Y-H. Lee & M. M. Gharpuray. 1982. "The nature of Lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis". *Adv. Biochem Enz* 23:157-183
- Fan L.T; M. M. Gharpuray & Y-H. Lee 1987. "Cellulose Hydrolysis" *Biotechnol monogr.* 198 pp
- Farid M.A., H.M. Shaker & A.I. Diwany. 1983. "Effect of peracetic acid, sodium hydroxide and phosphoric acid on cellulosic materials as a pretreatment for enzymatic hydrolysis". *Enzyme Microbiol. Technol.* Vol V (6):421-424
- Federici F. 1982. "Extracellular Enzymatic Activities in *Aureobasidium pullulans*". *Mycologia. Soc. of America.* LXXIV (5) Sep. - Oct.:738-743 <http://www.istor.org/stable/3792859>
- Ferrero G.L, M.P. Ferranti, H. Noveau. 1984. "Ongoing activities in europe in the field of enzymatic hydrolysis". *Anaerobic digestion and carbohydrate hydrolysis of waste.* Pag.100-111
- Fincher, G. B. & B.A Stone. 1983. "Arabinogalactan- proteins: structure, biosynthesis and function" *Ann, Rev. Plant Physiol* 34: 47-70
- Fincher G. B. & B.A. Stone. 1986. "Cell walls and their components in cereal grain technology". *Adv. Cereal. Sci. Tech.* 8: 207-295

- Flinder D.D.S, C.E. Wyman & K. Grohrmann. 1989. "Evaluation of thermotolerant yeasts in controlled Simultaneous Saccharification and Fermentations of cellulose to ethanol" *Biotech. & Bioeng.* XXXIV(2), June 20:189-195
- Flinn J. E & E. S. Lipinsky. "Production of chemicals via advanced biotechnological processes". 523-538
- Folan M. A & M. P. Coughlan. 1979. "[The saccharifying ability of the cellulase complex of \*Talaromyces emersonii\* and comparison with that of other fungal species](#)". *Int. Jour. of Biochem.* Vol X(6):505-510
- Fraude E, C. Fenge & W. Kuhlmann. 1988. "Development of large scale perfusion cell culture bioreactors". *Bio. symp. Adv. biotech.* Tokyo, Oct 19-23.: 116-121
- Galas E, R. Pye, K. Pye & K. Siminska 1981. "Universal method for expressing activity of cellulolytic enzymes". *European J. appl. Microbiol. Biotechnol* 11:229-233
- Galiotou-Panayotou, M; O.Kalantzi & G. Aggelis. 1998. "Modelling of simultaneous production of polygalacturonase and exopolysaccharide by *Aureobasidium pullulans* ATHUM 2915". Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 155-162
- Garcia K. O. 1983. "Producción Microbiana de celulasas y su Utilización en la Sacarificación de Materiales Celulósicos" Tesis de Químico farmacéutico biólogo. UNAM 190 pp.
- Garcia-Kirchner, O. & C.V.Huitrón. 1996. "Saccharification of native sugar cane bagasse pith by the cross-synergetic action of cellulases from *Penicillium*\_spCH-M-001 and *A. terreus*\_CH-M-103". *Applied. biochem. & Biotech.* XVII Symp. Of Biotech for fuels and chemicals. Ed. Wyman E.C. & B.H. Davison. LVII/LVIII, 253- 265
- Garcia-Kirchner O, M. Muñoz-Aguilar; R. Perez-Villalva & C.V.Huitrón-Vargas. 2002. "Mixed submerged fermentation with two filamentous fungi for cellulolytic and xylanolytic enzyme production". *Applied. biochem. & Biotech.* IIC/C (1-9), marzo:1105-1114
- Garg S.K. & S. Neelakantan 1981. "Proceedings of recycling residues of Agriculture and industries". M. S. Kalra, Ed. (P.A.U. Ludhiana, India. P. 125
- Garg S.K. & S. Neelakantan 1982. "Bioconversion of sugar cane bagasse for cellulose enzyme and microbial protein production". *Int. Jour of food science and tech.* XXVII, 2 April:271-279
- Garg S.K. & S. Neelakantan 1981. "Effect of cultural factors on cellulose activity and protein production by *Aspergillus terreus*". *Biotech. & Bioeng.* XXIII, 7, July: 1653-1659
- Garg S.K., & S. Neelakantan 1982. "Production of SCP and cellulase by *Aspergillus terreus* from baggase substrate". *Biotech. & Bioeng.* XXIV :2407-2417
- Garg N, D.F. Tandom & S.K. Kabra. 2000. "Protein enrichment of mango peel through solid state fermentation using *Aspergillus niger* for utilization as feed. *Indian Food Packer*,LIV (3):62-64
- Gerbi S.A. 1987. "From genes to proteins". Carolina Biology Readers, J.J. Head ed. (158): 16
- Ghose T.K. 1969. "Continous Enzymatic Saccharification of cellulose with Culture Filtrates of *Trichoderma viridae* QM6a". *Biotech. & Bioeng.* XI: 239-261
- Ghose T.K. & V.S. Bisaria 1979. "Studies on the mechanism of Enzymatic hydrolysis of cellulosic substances" *Biotechnol. & Bioeng.* XXI: 131- 146
- Ghose T.K. & K. Das. 1971. "A simplified kinetic approach to cellulose-cellulase system"

Cap. III. 55-76 en *Advances in Biochemistry Engineering/Biotechnology*. Ed Springer Berlin/Heidelberg. Iso 0724-6145 print 1616-854 online Vol I

-Ghose T.K. & P.Ghosh.1979."Cellulase Production and cellulose Hydrolysis".*Process Biochem*.Nov. 14: 20-24

-Ghose T. K. & V. Sahai. 1979. "Production of cellulases by *Trichoderma reesei* QM 9414 in fed-batch and continuous-flow culture with cell recycle".*Biotechnol. Bioeng.* (21):283–296.

-Ghosh P, N. B. Pamment & W.R.B. Martin. 1982. "[Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose: effect of  \$\beta\$ -D-glucosidase activity and ethanol inhibition of cellulases](#)"

*Enzyme and Microbial Technol.* Vol.IV(6),Nov: 425-430

-Ghosh M. & G. Nanda. 1994. "Purification and some properties of a xylanase from *Aspergillus sydowii* MG49." *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4620–4623.

-Gibeaut D.M. & N. Carpita. 1983. "Synthesis of (1-3, 1- 4)-,  $\beta$ -D-glucan in the Golgi apparatus of maize coleoptiles". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* LX, may: 3850-3854 (1993)

-Gilbert I. G. & Tsao, G. T.1983. "Interaction between solid substrate and cellulase enzymes in cellulose hydrolysis". *Ann. Rept. Ferm. Proc.* 6 : 323-358.

-Gilbert I. G. & G. Tsao GT. 1985. "Surface adsorption and reaction kinetics of enzymatic cellulose hydrolysis in a column reactor. ". *Ann. Rep. Ferment. Process* 8:211-297

-Gilbón A. 1980. "Aislamiento y caracterización de un hongo levaduriforme que produce celulasas extracelulares activas en la degradación de celulosa cristalina" Tesis para el grado de maestro en investí. Biomedica básica. CCH. UNAM. Mex.

-Gilbon A; G. Larios & C. Huitrón. 1981."Aislamiento y selección de hongos productores de celulasas que degradan celulosa microcristalina" *Rev. Tecnol. Alim. Méx.* Vol. XVI (3):24-31

-Gilbon A; Huitrón C; González F. & M. Ulloa. 1986."Scanning electron microscopy of a true cellulolytic strain of *Aureobasidium* grown on crystalline cellulose" *Rev. Mycol.* CXXVIII (5) p.804-809

-Godbole S, S. R. Decker, R. A. Nieves, W. S. Adney, T. B. Vinzant, J. O. Baker, S. R. Thomas, & M. E. Himmel. 1999. "Cloning and Expression of *Trichoderma reesei* Cellobiohydrolase I in *Pichia pastoris*". *Biotechnol. Prog.* 15: 828-833

-Godfrey T. 1996."Textiles". In: Godfrey T, West S, editors.*Industrial enzymology*, 2nd ed. London Mac Millan Press. p. 360–71.

-Godfrey T & S. West. 1996A."Introduction to industrial enzymology". In: Godfrey T, West S, Editors. *Industrial enzymology*, 2nd ed. London: Macmillan Press, pp. 1–8.

-Gokhale D.V, S.G. Patil. & K.B. Bastawade. 1992. " Protection of *Aspergillus niger* cellulases by urea during growth on glucose or glycerol supplemented media". *Applied Biochemistry and Biotechnology* 37: 11-17.

-Gómez Sánchez C. E, B. Trejo-Aguilar y G. Aguilar Osorio. 2004. "Efecto de la temperatura y ph sobre la producción de pectinasas en *A. flavus*". *Mem. Ier Enc. Nal. Biotec. UPIBI, IPN*, 1:5-8.

-Gonzalez- Blasco G., J.Sainz- Aparicio, B. Gonzalez, J.A. Hermoso & J. Polaina. 2000. "Directed evolution of B- glucosidase A from *Paenibacillus polymorpha* to thermal resistance ". *J. Biol. Chem.* 275 p. 13708-13712

- Grassin C. & P. Fauquembergue. 1996. "Applications of pectinases in beverages", In J. Visser and A. G. J. Voragen (ed.), Pectin and pectinases, vol. 14. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands. p. 453-462.
- Greenshielda R.N. & E.L. Smith. 1971. "Tower-fermentation systems and their applications." The chemical engineer. 182-190
- Griffin H. L, J.H. Sloneker & G.E. Inglett. 1974. "Cellulase production by *Trichoderma viridae* on fedlot waste" Applied Microb. June :1061-1066
- Gulati S.L & A.C. Gaur. 1988. "Enzymatic hydrolysis of cellulose from agricultural and industrial wastes". Microbiol. Indian Agric. Res. Inst. New delhi 110-012, India Biol. Wastes. XXV(4):309-313
- Gupta J.K, Y.P. Gupta & N.B. Das. 1973. "Degradation of cellulosic materials by *Trichoderma viridae* cellulase" Agr. Biol. Chem. XXXVII (11); 2657-2662
- Gutierrez-Correa M & G.K. Villem. 2003. "Surface adhesión fermetation: a new fermentation "category"" Rev. Perú Biol. X(2): 113-124
- Hagget K.D., W. Y. Choi & N.W. Dunn. 1978."Mutants of *Cellulomonas* which produce increased levels of  $\beta$ - glucosidase" European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. (6):189-191
- Hagget K.D, P. P.Gray & N.W. Dunn. 1979."Crystalline cellulose Degradation by a Strain of *Cellulomonas* and its mutant Derivates" Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. (8):183-190
- Hamlyn P F, R.E. Bradshaw, F. M. Mellon, C. M. Santiago, J. M. Wilson & J. F. Peberdy. 1981. "Efficient protoplast isolation from fungi using commercial enzymes".Enzyme and Microbial Technol. VIII (4)3:321-325
- Han Y.W & C.D. Callihan. 1974. "Cellulose fermentation: effect of substrate pretreatment on microbiol growth". Appl. Microbiol. 27:159-165
- Han Y.W, Pence J.W. & A.W. Anderson. 1975. "Dioxane treatment to improve Microbial Digestibility of Cellulose Fibers " Applied Microbio, May:708-709
- Han Y.W, Cheeke P.R. Anderson A.W. & C. Lekprayoon. 1976. "Growth of *Aureobasidium pullulans* on straw hydrolysate" Applied & Environ. Microb. Dec. U32 (6) :799-802
- Handford M. 2006. "Biosynthesis of plant cell walls". Cien. Inv. Agr. XXIII(3):179-196 [www.rcia.puc.cl](http://www.rcia.puc.cl) [www.RCIA33\(3\).indd](http://www.RCIA33(3).indd)
- Hart T. D, F.A.A.M. DeLeij, G. Kinsey, J. Kelley & J. M. Lynch. 2002. "Strategies for the isolation of cellulolytic fungi for composting of wheat straw" World J. of Microbiol. & Biotech. 18: 471-480
- Hayashi S, M. Tohno, M. Ito & H. Yokoi. 2001. "Purification and Properties of the cell-associated  $\beta$ -Xilosidase from *Aureobasidium*". Jour. of Industrial Microbiol. & Biotech. 26:276-279
- Hayn M, W. Steiner & H.Esterbaurt. 1987. "Studies on structural and adsorptive properties of the cellulose produced by *Trichoderma reesei* MCG 77". FEMS Symp. Biochemistry and Genetics of cellulose degraedation, sep. 7-9 Inst. Pasteur Paris France. Fed. Eur. Microbiol. Soc. And Soc Francaise de Microbiologie 9pp
- Hendy, N.A., C.R. Wilke, & H.W. Blanch. 1984. " Enhanced cellulose production in fed-bach culture of *Trichoderma reesei* C30". Enzyme microbial Technol. 6: 73-75.
- Hérrnandez-Santoyo A., E. Garcia-Hernández y A. Rodriguez R. 1999. "Celulosomas: sistema multienzimatico". Jour. of Mex. Chem. Soc. LXIII:3-4:137-142

- Hesseltine, C.W. 1987. "Solid state fermentation". An overview. *Infernafiona/ Biodeterioration* 23: 78-89.
- Hidenori Tanaka, Michio Mugurama, Kazuyoshi Ohta. 2005. "Purification and properties of a family-10 xylanase from *Aureobasidium pullulans* ATCC20524 and characterization of the encoding gene.". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70: 202-211
- Himmel M. E. & J.J. Sheehan. 2000. "Improved Cellulases for bioethanol production". *Biotechnol. Center for Fuels and Chemicals. Nat. Renewable Ener. Lab. Golden, Co 80401:* 3
- Hochhauser J. S. 1983 "Bringing Biotechnology to market". *High Tech.* Feb. 55-60
- Huang Y, G. Krauss, S. Cotlaz, H. Driguez & G. Lipps.2005. "A highly acid- stable and thermostable Endo $\beta$ -glucanase from the thermoacidophilic archae on *Sulfolobus solfataricus*." *Biochem J*, 385: 581-588
- Huitrón C; S. Saval & M.E.Acuña. 1984. "Production of Microbial Enzymes from agroindustrial by-products". *Annals of the New York Acad. Of Sciences.* DCXXXIV: 110-114
- Hulme M.A. & D.W. Stranks. 1971. "Regulationnnn of cellulase Production by *Myrothecium verrucaria* grown on non-cellulosic substrates" *J. of Gral. Microb.* 69:145-155
- Humphrey. A.E, A. Moreira, W. Armiger. & D. Zabriskie. 1977."Production of single cell protein from cellulosic wastes". *Biotech. Bioeng. Symp.* 7: 45 - 64.
- Iembo T, R. da Silva, F.C Pagnocca & E. Gomes. 2002. "Production, Characterization, and Properties of  $\beta$ -Glucosidase and  $\beta$ -xylosidase from a Strain of *Aureobasidium sp*". *Applied Biochem. and Microbiol.* 38, 6: 549-552 from *Prikladnaya Biochimiya, Mikrobiologiya, XXXVIII(6): 639-643 (2002)*
- Jackson M.G.1977. "The alkali treatment of straws" *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2, 105
- Jeffries W. T. 1992. "Enzymatic Treatments of Pulps". In *Emerging Tech. for Mat. and Chem. from Biomass.* Eds. Rowell R. M, T. P. Schultz & Narayan R. *Am. Chemi. Soc. Series* ·44/6 Cap VIII, p313-329
- Karni M, R.L. Deopurkar & V.B. Rale. 1993. " $\beta$ -Xylanase production by *Aureobasidium pullulans* grown on sugars and agricultural residues". *World Jour. of Microbiol and Biotech.* 9: 476-478
- Kaper K, J.H.G. Lebbink, J. Pouwels J, Kopp, G.E Schulz, van der Oost J & WM de Vos. 2000. "Comparative structural analysis and substrate specificity engineering of the hyperthermostable  $\beta$ -glucosidase from *Pyrococcus furiosus*." *Biochemistry* 39, 4963-4970
- Khan A.W, D. Tremblay & A. LeDuy. 1986. " Assat if xykanase and xylosidase activities in bacterial and fungal cultures". *Enzyme and microbial Tech.* V VIII(6). June: 373-377
- Kim M.H, S.B. Lee & D. Dewey, Y. Ryu & E.T. Reese. 1982. "Surface deactivation of cellulase and its prevention" *Enzyme Microb. Technol.* 4 March: 99-103
- Klesov A.A. 1986. "Problems of plant raw material bioconversion" ( in russian). *Nuka, Moskow.* 93-136
- Klysov A. A & A.P. Siniteyn. 1981. "Enzymatic hydrolysis of cellulose. IV. Effect of major physico-chemical and structural features of the substrate." *Bioorg. Khim* VII(12):1801-1812
- Klysov A. A. 1986. "Enzimatic conversion of cellulosic materials to sugars and alcohol". *Applied Biochem and Biotech.* XII: 249-300
- Knowles J. Lehtovaara P. & T. Teeri. 1987. "Cellulase families and their genes" *TIBETCH,*

Sep. V: 255-261

- Kolarova N & V. Farkas. 1981. "Sensitivity of various yeasts to crude cellulolytic enzyme complexes from *Trichoderma reesei*". Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. XIII: 184-187
- Korish M. 2003. "Production, Purification, Properties and Application of the Cellulases from a Wild type Strain of a Yeast isolate." Tesis doctoral. Faculty of Biology of the Johannes Gutenberg-University Mainz, Germany. Supervisor Prof. Dr. Helmut König. 140pp
- Koshland, D.E., Jr. 1973. "Protein shape and Biological Control". Scien. Amer. October, CCXXIX(4): 52-64
- Krässig HA. 1993. "Cellulose: structure, accessibility, and reactivity". Yverdon, Switzerland: Gordon and Breach Sci. Publishers. 147 pp
- Kremnický L & Biely Peter. 1997. "β Mannanolytic system of *Aureobasidium pullulans*." Arch. Microbiol. 167:350-355
- Kubicek C.P. 1981. "Release of carbocymethyl-cellulase and β-glucosidase from cell walls of *Trichoderma reesei*" Eur. J. Appl. Microb. Biotechnol. 13:226-231
- Kudanga T & E.Mwenje. 2005 "Extracelullar Cellulase production by tropical isolates from *Aureobasidium pullulans*." Canadian Journal of Applied Microbiol. 51-Sep.:773-776
- Ladish M.R. 1978. "Cellulose to sugar: new path genes Quantitative yield" Science 201:743-745
- Ladish M.R. 1979. "Fermentable sugars from cellulosic residues" Process Biochem., Jan: 21-25
- Ladish M.R, K.W. Lin, M. Voloch & G.T. Tsao. 1983. "Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass". Enz. microbial. Technol. Vol. V(2):82-102
- Ladish M.R & G.T. Tsao. 1986. "Engineering and economics of cellulose saccharification systems". Enzyme midrobiol. Technol. VIII(2):66-69
- Lamed R, Setter E, E. Bayer. 1983. "Characterization of cellulose binding cellulase-containing complex in *Clostridium thermocellum*" J. of Bact. CLVI(2), Nov:828-836
- Larios G. & C. Huitron. 1981. "Celulasas extracelulares que produce un hongo levaduriforme. Rev. Tecnol. Alim. V XIV(5):24-29
- Larios G. 1981. "Aislamiento y caracterización de celulasas producidas por *Aureobasidium sp*". Tesis para el grado de maestro en investí. Biomed. Básica. CCH, UNAM. Mex.
- Larios G., Gilbón, A, Lara, Y. & C. Huitron. 1982. "Extracellular cellulases produced by a yeast-like fungus. Enzyme Engineering 6:353-354
- Larios G. & C. Huitron. 1989. "Endopolygalacturonase production from untrated lemon peel by *Aspergillus sp.*". Biotechnol. letters. 11:729-734
- Lao N. T, D. Long, S. Kiang, G. Coupland, D. A. Shoue, N. C. Carpita & T. A. Kavanagh. 2003. "Mutation of a family 8 glycosyltransferase gene alters cell wall carbohydrate composition and causes a humidity-sensitive semi-sterile dwarf phenotype in *Arabidopsis*" Kluwer Academic Publishers, Printed in the Netherlands. Plant Molecular Biology 53: 647–661
- Lastick S.M, Spindler D.S., Terrell S. & K. Grohman. 1984. "Simultaneous saccharification & fermentation of cellulose" Biotech. 84 USA: Onlme Publ. Oinner. UK:277-289
- Lathes T.P & S.C. Gupta. 1996. "Soft corn fibre using enzymes from *Aureobasidium sp* strain NRRLY-2311-1". Appl. Biochem 6 Biotech. LIX (3):337-342
- Leathers, T.D. 1986. "Color variants of *Aureobasidium pullulans* overproduce Xylanase

- with extremely high specific activity". Applied and Environmental Microbiol. LII(5):1026-1030. Nov.
- Lebbink JHG, Kaper T, Bron P, van der Oost J, de Vos WM. 2000. "Improving low-temperature catalysis in the hyperthermostable *Pyrococcus furiosus*  $\beta$ -glucosidase CelB by directed evolution". Biochem. 39: 3656-3665.
- Lee, Y.Y, Lin, C.M., Johnson, T., Chambers, R.P., 1978. "Selective hydrolysis of hardwood hemicellulose by acids". Biotech. and Bioengin. Symp. 8, 75–88.
- Lee S. B, I.H Kim, D.D. Ryu & M. Mandels. 1982. "Competitive adsorption of cellulase components and its significance in a synergistic mechanism". Biotechnol. Bioeng. 24:2137-2153
- Lee S.B, H.S. Shin, D.D.Y Ryu & M. Mandels. 1982. " Adsorption of cellulase on cellulose: effect of physicochemical properties of cellulose on adsorption and rate of hydrolysis". Biotechnol Bioeng. 24:2137–2153
- Lee Y.H & L.T.Fan. 1983. "Kinetic studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: (II) analysis of extended hydrolysis times". Biotechnol Bioeng 25:939–966
- Lee S.B, I. H. Kim, D.D. Y Ryu & H. Taguchi. 1983. "Structural properties of cellulose and cellulase reaction mechanism". Biotechnol Bioeng 25:33–51
- Lee J.M. & J.H. Wolf. 1988. "Continuos attrition bioreactor with enzyme recycling for the bioconversion of cellulose". Appl. Biochem. Biotechnol. XVIII(1):203-216
- Lee, D, A.H.C. Yu, K.K.Y Wong & J.R. Saddler, J.R., 1994. "Evaluation of the enzymatic susceptibility of cellulosic substrates using specific hydrolysis rates and enzyme adsorption". Applied Biochem. and Biotech XLV(45): 407–415.
- Lee D. & A.H.C. Yu. 1995. "Evaluation of cellulase recycling strategies for the hydrolysis of lignocellulosic substrates". Biotech. and Bioengin XL:328–336.
- Lee, Y.Y, P. Iyer & R.W. Torget. 1999. "Dilute-acid hydrolysis of lignocellulosic biomass". Advances in Biochem. Engin. and Biotechnology 65, 93.
- Lee J.W, W.G. Yeomans, A. L. Allen, F. Deng, R. A. Gross & D. L. Kaplan. 1999. Biosynthesis of Novel Exopolymers by *Aureobasidium pullulans*. Applied & Env. Microbiol. LXV, 12: 5265–5271
- Leisola M.S, A. Thanei-Wyss & A. Fiechter. 1985."Strategies for production of high ligninase activities by *Phanerochaete chrysosporium*" J.of Biotechnol. 3:97-107
- Lenhinger A. Bioquimica. 1984. "Las bases moleculares de la estructura y función celular" Ed. Omega, S.A. Barcelona España pp 1095
- Lim G, E. Khew & H.H. Yeoh 1985. "Extracellular enzymes of some black aspergilli in Singapore" Mircen Jour. 1:55-61
- Lin E. & Wilson D.B. 1987. "Regulation of  $\beta$ -1,4-Endoglucanase Synthesis in *Thermomonospora fusca*" Applied and Environmental Microb. LIII(6) June:1352-1357
- Lingappa Y, A. S Sussman & I.A. Bernstein. 1963. "Effect of light and media upon growth and melanin formation in *Aureobasidium pullulans* ( de By. ) Arn . (=pullularia pullulans)." Mycopathologia et Mycologia Applicata XX.1-2:109-128.  
<<http://hdl.handle.net/2027.42/43277>
- Linko M. & P. Nybergh. 1978. "Degradation of cellulosic materials". Proc. Symp. Bioconversion in food Tech, Helsinki, 8-10 Feb. 64-67
- Linko M. 1983. "Progress and problems in the utilization of cellulosic materials" Applied

Science Pub: 26-29

- Lipinsky E.S. 1978. "Fuels from biomass: integration with food and materials systems". Sci 10 feb, CIC( 4329): 644-651
- Lipinsky E.S. 1979. "Perspectives on Preparation of cellulose for hydrolysis" Hydrolysis of cellulose: mechanism of enzymatic and acid catalysis. Ed. R.D. Brown & Jurasek Adv. Chem. Series 181: 1-23
- Loewy A.G. 1969. "Biological Motility: The conversion of chemical energy into Work". From Cell Biology: Cell structure and function, 2a ed. Adapted for BIO. P.74-87
- Loncaric I, Oberlerchner JT, Heissenberger B, & R. Moosbeckhofer. 2009. " Phenotypic and genotypic diversity among strains of *Aureobasidium pullulans* in comparison with related species". Antonie Van Leeuwenhoek. 95(2):165-78. PubMed PMID: 19123008
- Lowry O. H, N.J. Rosebrough, H:L: Farr & R.J. Randall. 1951. "Protein measurement with the folin phenol reagent " *J. Biol. Chem.* 193:265-275. 177, 751.
- Luong J.H.T, A.L. Nguyen & K.B.Male. 1987. "Recent developments in downstream processing based on affinity interactions". Elsevier publications, Cambridge. TIBETCH V, Oct. 281-286
- Lynd L. R, P. J. Weimer; W. H. van Zyl, & I. S. Pretorius. 2002. "Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology". Microb. & Molec. Biol. Reviews, LXVI(3),Sept: 506-577.
- Lyse M.W.M. & A.W. Khan. 1984. "Relation Between filter paper activity and Saccharifying ability of a *Trichoderma* cellulase system" Biotech. letters. VI(6) 375-378
- Madson M, C. Dunand, X. Li, R. Verma, G. F. Vanzin, J. Caplan, D. A. Shoue, N. C. Carpita, & Wolf-Dieter Reiter. 2003. "The *MUR3*Gene of *Arabidopsis* Encodes a xyloglucan Galactosyltransferase That Is Evolutionarily Related to Animal Exostosins". The Plant Cell, July.Vol.XV: 1662-1670. www.plantcell.org © 2003 American Society of Plant Biologists
- Maldonado M, A. Stresser & D. Callieri. 1989. "Regulatory aspects of the synthesis of polygalacturonase and pectinesterase by *Aspergillus niger* ." Sciences des Afiments (9), 101-110.
- Mandels M & E. T. Reese. 1960. "Induction of cellulose in fungi by cellobiose". J. Bacteriol. June, LXXIX(6): 816-826
- Mandels M & E. T. Reese. 1964."A new  $\alpha$ -glucanase: mycodextranase". Can. J. microbial. Apr (10):103-114
- Mandels M, J. Weber & R. Parizek. 1971. "Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma viridae*" Applied. Microb, Jan:152-154
- Mandels M, J. Kostick & R. Parizek. 1971. "The use of adsorbed cellulase in the continuous conversion of cellulose to glucose" J. Polymer Sci. part C #36: 445-459
- Mandels M, L. Hontz & J. Nistrom. 1974. "Enzymatic Hydrolysis of waste cellulose". Biotech. & Bioeng. XVI: 1471-1493
- Mandels M. 1975. "Growth and cellulase production by *Trichoderma*". In M. Bailey, T. M. Enari, and M. Linko (ed.), Symposium on the enzymatic hydrolysis of cellulose. The Finnish National Fund for Research and Development (SITRA), Helsinki, Finland. p. 81-109.
- Mandels M. 1975. "Microbiol source of cellulase" Fifth Biotech & Bioeng. Symp. John Wiley and sons, N.Y. 5:81- 105
- Mandels M, R. Andreotti & C. Roche. 1976. "Measurement of saccharifying cellulose".

Biotech. Bioeng. Symp. 6:21-33

-Mandels M. & R. E. Andreotti. 1978. "Problems and challenge in the cellulose to cellulase fermentation" Process Biochem. May: 6-13

-Mandels M, J. Madeiros, R. Andreotti & F. Bisset. 1981. "Enzymatic hydrolysis of cellulose: evaluation of cellulose culture filtrates under use conditions" Biotechnol. Bioeng. 23:2009-2026

-Mandels M. 1982. "Cap. II Cellulases" Annual Reports on Ferment. Process. Vol. 5 Ed. Tsao G.T. Academic Press: 35-78

-Mandels M. 1985. "Applications of cellulases" 611th meeting, Galway. Biochem Soc. Transactions. Vol XIII: 414-417

-Manoliu A. L, Z. Olteanu, L. Oprica, M. M. Zamfirache & D. Creanga. 2002. "Petroleum Ferrofluid Influence on Cellulase Specific Activity in *Chaetomium globosum*". Roum. Biotechnol. Lett. VII 7,(3):737-744

-Manonmani H. K. & K. R. Skreekantiah. 1987. "Saccharification of sugar cane bagasse with enzymes from *Aspergillus ustus* and *Trichoderma viridae*" Enz. Microb. Technol. IX August: 484-488

-Marsden W.L. & P.P. Gray. 1986. "Enzymatic hydrolysis of cellulose in lignocellulosic materials" Critical Reviews in Biotech. III:235-276

- Marsden W.L., N.W. Dunn, P.P. Gray. 1986. "[Action of \*Trichoderma reesei\* QM9414 and C30 cellulase on substrates with varying crystallinity](#)". Enz. & Microbial Technol. V.(5), Sep:345-351

-Martinez-Anaya C, E. Balcazar-López, E. Dantán-González & J. L. Folck- Maltel. 2008. "Celulasas Fúngicas Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética." Rev. Lat. Amer. de Microbiol. ALAM. L 3-4:119-131

-Martinez-Trujillo, M. A., Trejo-Aguilar B, C. Gómez Sánchez & G. Aguilar –Osorio. 2004. "Efecto de la fuente de carbono en la producción de pectinasas por *Aspergillus* sp. FP 500" Memorias del 1er Encuentro nal. De Biotec., UPIBI, IPN, 1:233-236

-Martinez-Trujillo A, J. S. Aranda & G. Aguilar Osorio 2008. "Kinetic study on inducibility of polygalacturonases from *Aspergillus flavipes* FP-500. Electronic Journal of Biotechnology. XI( 4).

-Masahito T, I. Yashiro, K. Ohmiya, T. Kobayashi & S. Shimizu. 1979. "Anaerobic digestion of cellulose and utilization of digestion products in a consecutive cultivation system" J. of Ferment. Tech., Vo V5 #3:178-185

-Mattos I. L, E. A. G. Zagatto & A. O. Jacintho. 1988. "[Spectrophotometric flow-injection determination of sucrose and total reducing sugar in sugar-cane juice and molasses](#)" Analytica Chimica Acta, V CCXIV(214): 247-257

-McCarthy M. J, J. H. Walton, J. S. de Ropp, S. D. Collins, M. V. Shutov, & A. G. Goloshevsky. 2004. "Development of microscale NMR sensors for control of food processing." Food Sci. Biotechnol. XIII(6):848-851.

-Medicuti L. P. C, B. Trejo-Aguilar, G. O. Aguilar. 1997. "Thermostable xylanases produced at 37°C and 45°C by thermotolerant *Aspergillus*" FEMS Microbiology Letter 146:97-102

-Meir H & J. S.G. Reid. 1982. "Reserve polysaccharides other than starch". p. 418-471. In. F.A. Loewus, and W. Tanner (eds.). Encyclopaedia of Plant Physiology, NS, 13A. Springer, Berlin, Germany.

- Menezes H. C, T. Menezes & V.H. Boas. 1973. *Biotech & Bioeng* 15:1123-1129
- Menezes T, T. Arakaki & P.R. De Lamo. 1976. "Producao do complexo celulolitico C1 -Cx por microorganismos" *Coletanea do Inst. de Tec. de Alimentos* VII: 91-96
- Menezes T, P.R. De Lamo & T. Arakaki. 1976. "Isolamento e selecao de microorganismos productores de celulase" *Colentaen do Inst. de Tecnol. de Aliment.* VII:83-90
- Merivuori H, K.M. Siegler, Sands J.A. & B.S. Montecourt 1985. "Regulation of cellulase biosynthesis and secretion in fungi" 611th meeting, Galway Biochem Soc. Transactions .XIII:411-414
- Mertz T. E. 1978. "Bioquímica". Pub- cultural, S.A. México, 4a impression 343pp
- Miller G. L. 1959. "Use of dinitrosalicylic reagent for the determination of reducing sugars." *Anal. Chem.* 31: 426-428
- Miller G.L, R. Blum, W.M. Glennon & A.L Burton. 1960. "Measurement of carboxymethylcellulase activity. Anahydrolytical". *Biochem.* 2, 127-132.
- Mishra C; M. Rao; R. Seeta; M.C. Srinivasan & V. Desphande. 1984. "Hydrolysis of Lignocelluloses by *Penicillium funiculosum*\_cellulase". *Biotech & Bioeng.* XXVI: 370-373
- Mitchell R, B. Halm-Hagerdal, Ferchak & E.K. Pyse. 1982. "Characterization of  $\beta$ -1-4-glucosidase activity in *Thermoanaerobacter ethanolicus*" *Biotech. & Bioeng. Symp.* #12:461-467
- Mitra N. & C.R. Wilke. 1975. "Continuos cellulase Production" *Biotech. & Bieng.* XVII: 1-13
- Miyakawa H, S. Moriyama, H. Ishibashi, Y. Shrisaka, N. Mizutani, H. Michiki & T. Saida. 1986. "Fuel ethanol production from cellulosic biomass". 8th. Symp.on Biotechnol. for fuels and chemicals. Gatlinburg Tenn. USA May 13-16:23pp
- Moisier N, C. Wyman , B. Dale , R. Elander, Y.Y. Lee , M. Holtzapple & M. Ladisch. 2005. "Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass". Elsevier. *Biosource tech.* 96: 673-686 [WWW.sciencedirect.com](http://WWW.sciencedirect.com)
- Moloney A.P, T. J. Hackett, P.J.Considine & M.P.Coughan. 1983. "Isolation of mutants of *Talaromyces emersonii* CBS 8114.70 with enhanced cellulase activity" *Enzyme Microb.Technol.* V,July: 260-264
- Montenecourt B.S & D.E. Eveleigh. 1977. "Semiquantitative Plate Assay for Determination of Cellulase Production by *Trichoderma viridel*". *Applied & Environmental microbiology.* Amer. Soc. for Microb.XXXIII (1) Jan:178-183
- Montenecourt B.S. 1983. "Strain improvement for the production of microbial enzymes for biomass conversion" *Appl. Science Pub:* 30-34
- Montenecourt B.S. 1983. "*Trichoderma reesei* cellulases" *Trends in Biotech.I* #5: 156-160
- Moore W, E Effland & M.A. Millet. 1972. "Hydrolysis of wood and cellulose with cellulytic enzymes" *J. Ag. Food Chem.* XX #6:1173-1175
- Moo-Young M, G. van Dedem & A. Binder. 1976. "Process critica for cellulase fermentation systems" *ABst. 5th Int. Ferment.Symp.* Berlin:434
- Moo-Young M, S. Hasnain & J. Lamptey. 1986. "Production and use of cellulases in the conversion of cellulose to fuels and chemicals". *Biotechnol & renewable energy.* 70-75
- Morales P, B. Trejo, A. Salazar y G. O. Aguilar. 2001. "Efectos de las xilanasas de *Aspergillus* sp. FP-470 sobre las propiedades reológicas de masas". *Jour. Boliv. De ciencias* VIII (5):55-60

- Mueller O., R. Kahmann, G. Aguilar, B. Trejo-Aguilar, A. Wu, R P. de Vries. 2008. "The secretome of the maize pathogen *Ustilago maydis*. Fungal Genetics and Biology",45:S63-S70
- Mullings R. 1985. "Measurement of saccharification by cellulases". Enzyme Microbiol. Technol. V VII( 12), Dec:586-591.
- Nakadi, T. & S. Nasuno. 1988. "Culture conditions of *Aspergillus oryzae* for production of enzyme preparation." Jour. of Ferment. Technol. 66, 525-533.
- Nesse N, Wallick J. & J.M. Harper. 1977. "Pretreatment of cellulosic wastes to increase enzyme reactivity" Biotechnol. & Bieng.XIX: 323-336
- Nigam P. & K.A. Prabhu. 1990. "Some factors affecting bioconversion of whole bagasse into fungal biomass". J. Base Microbiol. XXX(10):747-751
- Nishio N & S.Nagai. 1979. "Production of macerating enzymes of mandarin orange peel by fungal cultures" Europ.J.Appl.Microbio.Biotechnol.6:371-378
- Nyri L.K. 1975. "A system approach to utilize cellulose to obtain food and energy" New Brunswick Scientif. Co. 23 pp
- Oh T.K, S.H. Kim & K.H. Park. 1986. "Determination of cellobiohydrolase from culture filtrate of *T. viridae* by the ethod of single immunodiffusion and enzyme linked immunoabsorbent assay" Biot. letters VIII(6):403-406
- Oliveira L. A., A. L. F. Porto, E.B. Tambourgi. 2006 "Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from diffrent agricultural wastes" Bioresource Thechnology 97: 862-867
- Ooshima H, K. Aso, T. Harano & T. Yamamoto. 1984. "Microwave treatment of cellulosic materials for their enzymatic hydrolysis". Biotechnol. Lett.6, 5: 289-294
- Oriol E., B. Schettino, G. Viniegra. & M. Raimbault. 1988 b "Solid state culture of *Aspergillus niger* in support." Jour. of Fementation Technol. 66: 57-62.
- Otter D.E, P.A. Munro, G.K. Scott & R. Geddes. 1989. "Description of *Trichoderma reesei* cellulase by a range of desorbents" Biotech & Bioeng. XXX(3) July:291-298
- Pandey A, C.R. Soccol, P. Nigam & V.T. Soccol. 2000. "Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse" Bioresource Technol. LXXIV:69-80
- Pandey A, C. R. Soccol, P. Nigam, V.T. Soccol, L.P.S. Vandenberghe & R. Mohan 2000. "Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse". Bioresource Technol. VCXXIV(1): 81-87
- Paquot M & L.Hermann. 1983. "Cellulose hydrolysis of papermill sludge" Appl. Science Pub:118-119
- Parenicova, L. 2000. "Pectinases of *Aspergillus niger*: a molecular and biochemical characterization". Ph.D. thesis. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. 200 pp
- Parenicova L, J. A. E. Benen, H. C. M. Kester, & J. Visser. 2000. "*pgaA* and *pgaB* encode two constitutively expressed endopolygalacturonases of *Aspergillus niger*". Biochem. J. (345):637-644.
- Pathak, A.N. & T.K. Ghose. 1973. " Cellulase 2: Applications" Process Biotech, May: 20
- Pathak A. N. & T.K. Ghose. 1973. "Cellulases -1: Sources, Technology" Process Biochem. Apr:35-38
- Patnaik G, D. Wilson & E.C. Cocking. 1981. " Importance of enzyme purification for

- increased plating efficiency and plant regeneration from single protoplasts of *Petunia parodii*". Z.Pflanzenphysiol. 102:199-205
- Patnaik G. & E.C. Cocking. 1982. "A new enzyme mixture for the isolation of leaf protoplasts". Z. Pflanzenphysiol. Bd 107.S:41-45
- Peiris P.S. & I. Silva. 1987. "Hydrolysis of rice straw to fermentable sugars by *Trichoderma* enzymes". MIRCEN. Journal. 3: 57-65
- Peitersen N. 1975. "Production of cellulase and Protein from Barley straw by *Trichoderma viridae*". Biotech. & Bioeng. XVII: 361-374
- Peña J. M, M. Ryden, M. Madson, A. C. Smith & N. C. Carpita. 2004. "The Galactose Residues of Xyloglucan Are Essential to Maintain Mechanical Strength of the Primary Cell Walls in *Arabidopsis* during Growth<sup>1</sup>". *Plant Physiology*, Jan., CXXXIV: 443–451, www.plantphysiol.org © 2004 American Society of Plant Biologists
- Peña M. & N. C. Carpita. 2004. "Loss of Highly Branched Arabinans and Debranching of Rhamnogalacturonan I Accompany Loss of Firm Texture and Cell Separation during Prolonged Storage of Apple<sup>1</sup>". *Plant Physiology*, July Vol.CIIIV:1305–1313, www.plantphysiol.org\_ 2004 American Society of Plant Biologists.
- Peraza L, M.A Ortiz, J.F. Peberdy & G. Aguilar. 2003. "Growth and Pectinase Production by *Aspergillus* Mexican Strain Protoplast Regenerated Under Acidic Stress" *Applied Biochem. & Biotech.* CXI(1), 15-28 Oct ISSN:0273-2289
- Perez S, K. Mazeau, & C. Herve du Penhoat. 2000. "The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides." *Plant Physiol. Biochem.* 38:37–55.
- Perez V. R. 1996. "Biosíntesis de pectinasas por el hongo levaduriforme celulolítico *Aureobasidium* sp, *Ch-M-1018*". Tesis QFB. UNAM. 51pp
- Person I, F.Tjerneld & Hahm Hagerdal B.1984. "Semicontinuos cellulase production in a aqueous two-phase system with *Trichoderma reesei* Rutgers C30 " *Enzyme Microb. Technol.* VI, Sept:415-418
- Peters L.E., L.P. Walker, D.B. Wilson & D.C. Irwin.1991. "[The impact of initial particle size on the fragmentation of cellulose by the cellulase of \*thermomonospora fusca\*](#)". *Bioresource Technol.* XXXV(3):313-319
- Phaff H.J. 1982. "Microorganismos industriales". *Scientific American* #62.23-36
- Poulsen O.M. & L.W. Petersen. 1989. "Electrophoretic and enzymatic studies on the crude extracellular enzyme system of the cellulolytic bacterium *Cellulomonas* sp. ATCC 21399" *Biotech. & Bioeng.* XXXIV(1),June 5:59-64
- Poulsen O.M. & L.W. Petersen.1989. "Purification of two inmunologically distinct endoglucanases without affinity for microcrystalline cellulose from *Cellulomonas* sp. ATCC 21399" XXXIV(1),June5: 65-71
- Pouwels J, Moracci M, Cobucci-Ponzano B, Perugino G, van der Oost J, Kaper T, Lebbink JHG, de Vos WM, Ciaramella M, Rossi M. 2000."Activity and stability of hyperthermophilic enzymes: a comparative study on two archaeal b-glycosidases. *Extremophiles*". 4, 157-64.
- Puri V. P. & H. Manners. 1983. "Explosive pretreatment of lignocellulosic residues with high-pressure carbon dioxane for the production of fermentation substrates". *Biotechnol. Bioeng.* 25,12: 3149-3161
- Raimbault, M. & Alazard, D. 1980. "Culture method to study fungal growth in solid fermentation." *European Jmnal of Applied Microbiology and Biotechnology* 9: 199-209.

- Reese, E.T. 1975. "Summary statement on the enzyme system". Fifth Biotechnol. & Bioeng. Symp. John Wiley & Sons, N.Y.:77
- Reese E.T.1976. "History of the cellulase program at the US army Natick, Massachusetts 01760" Army Natick Development Center. John Wiley & Sons, Inc. Biotechnol. & Bioeng. Symp.(6): 9-20
- Reese E.T, Mandels M. 1984. "Rolling with the time: production and applications of *Trichoderma reesei* cellulose". Annual Report of Fermentation Processes.7:1–20.
- Rios M.N; C. M. Crespo; L.S. Terrazas y col. 2007. "Aislamiento de cepas anaeróbicas termófilas productoras de celulasas y hemicelulasas implicadas en la producción de bioetanol mediante técnicas de cultivo y aislamiento tradicionales y no tradicionales".Biofarbo online, dic. .XV(1):.43-50.  
<[http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1813-53632007000100007&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1813-53632007000100007&lng=pt&nrm=iso)>. ISSN 1813-5363.
- Rockwell P.J. 1976. "Single cell proteins from cellulose and hydrocarbons." Noyes data corporation, New jersey., USA. 336pp
- Rockwell P.I. 1976. "Sources and characteristics of cellulose in single cell proteins from cellulose and hydrocarbons" Noyes Data Corp, London
- Roels J.A. 1982. "Mathematical models and the design of biochemical reactors." J. Chem. Tech. Biotechnol. 32:59-72
- Roussos S, A. Olmos, M. Raimbault, G. Saucedo-Castaiieda. & B.K. Lonsane. 1991. "Strategies for large scale inoculum for SSF system: conidiospores of *Trichodema harzianu*." BiotechnologyTechnique 5, 415-420.
- Rumyantseva G.N & N.A. Rodionova. 1982. "Properties of  $\beta$ - glucosidase from cellulolytic fungus *Geotrichum candidum* sp" Moscow, XLVII(1):108-114
- Ryu D.D.Y & M. Mandels. 1980. "Cellulases: biosynthesis and applications". Enzyme Microb. Technol. 2:91-102
- Ryu D.D.Y, S.B. Lee, T. Tassimari & C. Macy. 1982. "Effect of compression milling on cellulose structure and on enzymatic hydrolysis kinetics". Biotech. Bioeng. 24: 1047-1067
- Ryu D.D.Y, C. Kim & M. Mandels. 1984. "Competitive adsorption of cellulase components and its significance in a synergistic mechanism". Biotech. & Bioeng. 26: 488-496
- Saddler J.N, M.K. Chan & G. Louise-Seize. 1981."A one step process for the conversion of cellulose to ethanol using anaerobic microorganisms in mono- and co-culture" Biotech. Letters III(6):321-326
- Saha B. C; S. N. Freer & R. J. Bothast. 1994. "Production, Purification, and Properties of a Thermostable 13-Glucosidase from a Color Variant Strain of *Aureobasidium pullulans*". Applied & Environ. Microbiol. LC(10), Oct:3774-3780
- Sakata M, H. Oshima & Y. harano. 1985. " Effects of agitation on enzymatic saccharification of cellulose". Biotechnol letters. VII( 9):689-694
- Saldaña. 2009. "Actividad pectinolítica en esporas" tesis licenciatura QFB.Fac. de Química UNAM. 75pp
- Sattler W, H. Esterbauer, O. Glatter & W. Steiner. 1989. "The effect of enzyme concentration on the rate of hydrolysis of cellulose" Biotech. & Bioeng. XXXIII(10) ap.20:1221-1234

- Saucedo-Castaneda G, B.K. Lonsane, J.M. Navarro, S. Roussos & M. Raimbault. 1992. "Importance of medium pH in solid state fermentation for growth of *Schwanniomyces castelli*". Letters in App.Microb.15: 164-167. -
- Saval S, B. 1985. "Producción de pectinasas de *Aspergillus sp.* por fermentación sumergida de la pulpa de henequén. Mex. DF. P 26
- Schülein. 2000. "Review Protein engineering of cellulases". Biochimica et Biophysica Acta 1543: 239-252.
- Scriban R. 1985. "Biotecnología. Ed. El Manual Moderno, Méx. p 588-599
- Sedha R.K, D. Bertrand, J. Delort-Laval. 1983. "Utilization de la bagasse traitee par la soude pour la production de proteines d'organismes unicellulaires" Appl. Science Pub:112-114
- Seviour J; B Kristiansen. 1983. "Effect of ammonium ion concentration on Polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans*\_in batch culture". Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17:178-181
- Simon L., Caye-Vaugien, C. & Bouchonneau, M., 1993. "Relation between pullulan production, morphological state and growth conditions in *Aureobasidium pullulans*: new observations". *Journal of General Microbiology* 139:979-985.
- Sindhu A; T. Langewisch; A. Olek, D.S. Multani; M. C. Mc Cann; W. Vermerris, N.C. Carpita & G. Johal. 2007. "Maize Brittle stalk2 encodes a COBRA-like protein expressed in early organ development but required for tissue flexibility at maturity". Plant Physiology Prew. 11Oct: 107 pp
- Singh R. J; S. Saxena & R. Gupta. 2005. "Microbial pectinolytic enzymes: A review".Process Biochemistry 40: 2931–2944 www elsevier.com
- Slepecky A.R & W.T. Starmer.2009. "Phenotypic plasticity in fungi: a review with observations on *Aureobasidium pullulans*".by [The Mycological Society of America Mycologia](#), 101(6): 823-832.
- Smith I. 1969. "Chromatographic and electrophoretic techniques, 3rd ed. Vol I. Heinemann, London, 310 pp
- Soccol C. R. 1995. "Aplicaciones agroindustriales de los procesos de fermentaciones en medios sólidos". Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería. Soc. Mex. De Biotec. E Bioing. I: 349-358
- Solis-Pereyra S, E. Oriol, M. Raimbault, S. Roussos & G. Viniestra, G. 1988a. " Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*". App. Microbiol.& Biotechnol. 27:498-503.
- Solis-Pereyra S, E. Favela-Torres, G. Viniestra-Gonzalez & M. Gutierrez-Rojas 1993. "Effect of different carbon sources on the synthesis of pectinases by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentations". Appl. Microbiol. & Biotech. 39: 36-41
- Solis-Pereyra S, E. Favela-Torres, M. Gutierrez-Rojas, S. Roussos, G. Saucedo-Castañeda, P. Gunasekaran & G. Viniestra-Gonzalez. 1996. "Production of pectinases by *Aspergillus niger* in solid state fermentation at high initial glucose concentrations". World Jour. of Microbiol. & Biotechnol. 12: 257-260
- Souza J.D.& D. Volfova. 1982. "The effect of pH on the production of cellulases in *Aspergillus terreus*". Eur.J. Appl. Microbiol. 16:123-125
- Spyropoulos C. G. & J. S.G.Reid. 1985. "Regulation of  $\alpha$  galactosidase activity and the

- hydrolysis of galactomannan in the endosperm of the fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L)" en Pub. Planta. Ed. Springer Berlin/Heidelber. Vol. CXLVI. #2 Oct.:271-275
- Srinivasan V.R & Y.W. Han. 1969 . "Utilization of bagasse. In cellulase and their application. Adv. In Chem.ser 95:447-460. Ed B y R. Gould. Amer Chem. Soc., Wahington, D.C. USA
- DOI: 10.3852/08-197
- Sternberg D. 1976. "A method for increasing cellulase production by *Trichoderma viridae*" Technol. & Bioeng. Vol XVIII: 1751- 1760
- Sternberg D, Vyayakumar P. & T. Reese. 1976. " $\beta$ -glucosidase: microbial production and effect on enzymatic hydrolysis of cellulose" Can. J. Microbiol. Vol.XXIII:139-147
- Sternberg D. 1976. " $\beta$ -glucosidase of *Trichoderma* : Its Bioynthesis and role in saccharification of cellulose" Appl. Environment. Mic. V.XXXI:648-654
- Stockton B. C; D. J. Mitchell; K. Grohmann & M. E. Himmel. 1991. "Optimun  $\beta$ -D-glucosidase supplementation of cellulose for efficient conversion of cellulose to glucose". Biotech. Letters XIII(1): 57-62
- Stryer L. 1979. "Bioquimica". Ed. revertéS.A., Barcelona, españa, p 279-281
- Subramaniyan & P. Prema. 2002. "Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology and Application" Critical Reviews in Biotech. 22(1):33-64
- Takagi M, S. Abe, S. Susuki G.H. Emert & N. Yata. 1977. Sym. Bioconv. of cellulosic substances into energy chemicals and microbial protein III, New Delhi, India. Ed. T.K. Ghose: 551- 571
- Takagi M. 1984. "Inhibition of cellulose by fermentation products." Biotechnol & Bioeng. 26:1506-1507
- Takebe,I., Y. Otsuki & S. Aoki. 1968. "Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state. Plant and Cell Physiol. 9: 115-124
- Tan T.K, H.H. Yeoh, & K.E. Tian. 1985. "Cellulolytic fungi isolated from wood shavings" Mycopathologia 90, 97-99
- Tan T.K, H.H. Yeoh, M.L. Tan & K.Paul. 1986. "Cellulolytic activities of *Trichoderma hamatum* grown on diffrent carbon substrates" Mircen Jour.2: 467-472
- Tan T.K, H.H. Yeoh, M.L. Tan & S.K.Koh. 1987. "Cellulolytic Activies of some filamentous Fungi" Jou. of the Singapore Nat. Acad. Of Science Vol XVI: 11-16
- Tanaka, H., M Mugurama & Ohta Kazuyoshi. 2005. "Purification and properties of a family-10 xylanase from *Aureobasidium pullulans* ATCC20524 and characterization of the encoding gene." Appl. Microbiol. Biotechnol. 70: 202-211
- Tewari H. K, L Singh, S. S. Marwaha & J.F.Kennedy . 1987. "Role of pretreatment on enzymatic hydrolysis of agricultural residues for producing sugar production". H. Chem. Technol. Biotechnol. 38, 3: 153-166
- Tewari H.K, S.S. Marwaha, J.F. Kennedy & L. Singh. 1988. "Evaluation of acids and cellulase Enzyme for the effective hydrolysis of Agricultural Lignocellulosic Residues" J. Chem. Tech. Biotechnol. 41:261-275
- Thomas K. N.G. & J. G. Zeikus . 1981. "Comparison of Extracellular Cellulase Activities of *Clostridium thermocellum* LQRI and *Trichoderma reesei* QM9414". Applied & Environ Microbiol. CXII, 2 Aug:231-240
- Tien M. 1987. "Properties of ligninase from *Phanerochaete chrysosporium* and their

- possible applications" *Critical Reviews in Microbiol.* 15, #2:141-168
- Timell T. E. 1967. "Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses." *Wood Sci. Technol.* 1:45–70.
  - Toit P. J, S.P. Olivier & P.L. Blljon. 1984. "Sugar cane bagasse as a possible source of fermentable carbohydrates. I.- Characterization of bagasse with regard to monossaccharide, hemicelulose and amino acid composition ". *Biotechnol. & Bieng.* XXVI: 1071-1078
  - Torre de M Compilador. 1985. "La utilización de los recursos celulósicos en la alimentación animal" IPN-CINVESTAV 278pp
  - Toyama N, K. Ogawa & H. Yoyama. 1979. "Production of Sugar from Cellulose with *Trichoderma* Cellulase." *Applied Microbiology Laboratory, Dep. of Agric. Chem., Fac. of Agric., Miyazaki University, Miyasaki 880, Japan. Symp VI on biosynthesis and biodegradation of cell wall components, ACS/CSJ Chemical Congress, Honolulu, HI*
  - Trevin S, K Boffy, H. Goulding & P. Stanbery. 1987. "Biotechnology: The Biological Principles" Ed. Open Univ. Press Milton Keynes. Biology, Inst of London, Eng. 256 pp
  - Trivedi S. M. & J. D. Desai. 1984."Cellulase and  $\beta$ glucosidase production by mix shake cultivation of *Scytififium lignicola* and *T. longabra chiatum*". *J. ferment. Technol.* 62, 2:211-215
  - Tucker J.B. 1985. "Proteins to order". *High Technology*, Dec.: 25-36
  - UrbanowiczB. R., C. Rayon & N. C. Carpita. 2004. "Topology of the Maize Mixed Linkage (133), (134)-\_DGlucan Synthase at the Golgi Membrane1". *Plant Physiology*, February, CIIIV, pp. 758–768, [www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org) © 2004 American Society of Plant Biologists.
  - Urzi C  , F. De Leo, C. Lo Passo & Criseo. 1999. "Intra-specific diversity of *Aureobasidium pullulans* strains isolated from rocks and other habitats assessed by physiological methods and by random amplified polymorphic DNA (RAPD)". [Journal of Microbiological Methods](#) XXXVI (1-2), May: 95-105
  - urzicl@sciocco.unime.it-Van der Walls y coll compiladores. 1979. Bioconversion of Organic Residues for Rural Communities.[Table of contents](#) (178 p.)© The United Nations University 1979.Papers Presented at the Conference on the State of the Art of Bioconversion of Organic Residues for Rural Communities, Held at the Institute of Nutrition of Central America and Panama, Guatemala City, Guatemala, 13 - 15 November 1978:178pp
  - van Wyk J.P.H. 1998. "[Paper hydrolysis by cellulase from \*Penicillium funiculosum\* and \*Trichoderma viride\*](#)" *Bioresource Technol.* VLXII(3), March:275-277
  - Vikola N.E. 1975. "In Symposium in enzymatic hydrolysis of cellulose" .Bailey M., Enari, T.M. & M. Linko. Eds. SITRA. Aulanko, Finlandia p.23
  - Walker L. P, D. B. Wilson, & D. C. Irwin. 1990. "Measuring fragmentation of cellulose by *Thermomonospora fusca* cellulose". *Enzyme Microb. Technol.* V XII:378–386.
  - Wang D. I. C, C.Z Cooney, A.L. Demain, P. Dunnel & A.E. 1979. "Cap 7.- Continuous Culture". En *Fermentation and Enzyme Technology*. John Wiley & Sons NY, USA. P98-137
  - Wang L, Z Chi, X Wang, Z Liu & J Li. 2007. "Diversity of lipase-producing yeasts from marine environments and oil hydrolysis by their crude enzymes". *Annalsof Microbiology* 57: 34–40.

- Wang San-Lang , Yue-Horng Yen., Ing-Lung Shih., A. C. Chang, Wen-Teish Chang, Wen-Chieh Wu & Yue-Der Chai. 2008. "Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151". Enzyme and Microbial Technology 33: 917–925
- Ward O. P, & M. Moo-Young. 1989. "Enzymatic degradation of cell wall and related plant polysaccharides" Critical reviews in Biotech. Vol.8,4:237-274
- Watson T. G, I. Nelligan & L. Lessing. 1984. "Cellulase production by *Trichoderma reesei* (RUT-C-30) in fed-batch culture. Biotechnol. Lett. 6: 667-672
- Wilke C. R. Edit. 1975. "Cellulose as Chemical and Energy resource" Biotechnol. & Bioeng. 5th Symp. Calif. June, 1974. Pub. John Wiley & Sons 358 pp
- Wilke C. R, B. Macorella, A. Sciamanna, K. Tangnu, D. Wiley & H. Wong. 1983. "Enzymatic hydrolysis of cellulose theory and applications". Noyes Data Corp., Park Ridge. Ny. USA, 164 pp
- Wilson D. & D.W. Thayer. 1981. "Growth of *Candida utilis* and *Pseudomonas* JM127 in mixed culture of treated and untreated mesquite" Industrial Microbiol. Cap XXX:337-349
- Wilson D. B & L.P. Walker 1991. "Engineering cellulases". Bioresour. Technol. 36:97–99.
- Wilson C. A & T. M. Wood. 1992. "The anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*: isolation and properties of a cellulosome-type enzyme fraction with the capacity to solubilize hydrogen-bond-ordered cellulose". Appl. Microbiol. Biotechnol. 37:125–129.
- Wilson D. B. 1992. "Biochemistry and genetics of actinomycete cellulases". Crit. Rev. Biotechnol. 12:45–63
- Wilson J. R. 1993. "Organization of forage plant tissues", p. 1–32. In H. G. Jung, D. R. Buxton, R. D. Hatfield, and J. Ralph (ed.), Forage cell wall structure and digestibility. Amer. Soc. of Agr.—Crop Sci. Soc. of America—Soil Sci. Soc. of America, Madison, Wisc.
- Wilson J. R & D. R. Mertens. 1995. "Cell wall accessibility and cell structure limitations to microbial digestion of forage". Crop Sci. 35:251–259.
- Wilson J. R & R. D. Hatfield. 1997. "Structural and chemical changes of cell wall types during stem development: consequences for fibre degradation by rumen microflora". Aust. J. Agric. Res. 48:165–180.
- Wilson D.B & D.C. Irwin.1999. "Genetics and properties of cellulases". Adv. Biochem. Eng. Biotech. 65:1–21.
- Wilson D. B. 2004. "Studies of *Thermobifida fusca* plant cell wall degrading enzymes". Chem Rec 4:72–82.
- Willick G. E, R. S. Morosoli, V. L. Yaguchi & M. Desrochers. 1984."Extracelular proteins secreted by the basidiomycete *Schizophyllum commune* in relation to carbon source". J. Bact. 159:291-299
- Withers S. G. 2001. "Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolyses". Carbohydr. Polym. 44:325–337
- Wolfenden R & M. J. Snider. 2001. "The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts". Acc. Chem. Res. 34, 938-945
- Wood T. M. 1969. "The relationship between cellulolytic and pseudo-cellulolytic microorganisms". Biochem. Biophys. Acta 192:531-534
- Wood T. M. & S.I. Mc Crae. 1972. "The purification and properties of the C<sup>1</sup> component of *T.koningii* celullase" Biochem J. 128:1183-1192
- Wood T. M. & S. I. Mc Crae. 1979. "Synergism between enzymes involved in the

- solubilization of native cellulose. In Hydrolysis of cellulose: mechanisms of Enzymatic and Chemical Catalysis". Brown, R.D. & Jurasek, L., Ed.. Amer. Chem. Soc. Washington, D.C. #181:181-209.
- Wood T. M. 1985. "Properties of cellulolytic enzyme systems" 611th meeting Galway Vol13: 407-410
- Wood T. M & S. I. McCrae. 1996. "Arabinoxylan-degrading enzyme system of the fungus *Aspergillus awamori*: purification and properties of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase." Appl. Microbiol. Biotech. 45:538–545.
- Yamazaki Y. H. Maeda & H. Suzuki. 1976. "Application of Polylysine Bound Succinyl-Na to a membrane reactor" Biotech. & Bioeng. Vol.XVIII:1761-1775
- Ye Sun & Jiayang Cheng. 2002. "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review". Bioresource Technology 83: 1-11
- Yeoh H. H, T. K. Tan & K. E. Tian. 1984. "Cellulolytic enzymes of fungi isolated from wood materials" Mycopathologia 87:51-55
- Yeoh H. H, E. Khew & G. Lim. 1985. "A simple method for screening cellulolytic fungi" Mycologia 77(1): 161-162
- Yong W, B. Link, R. O'Malley, J. Tewari, C. T. Hunter, Chung-An L.Xuemei Li, A. B. Bleecker, K. E. Koch, M. C. McCann, D. R. McCarty, S. E. Patterson, Wolf-Dieter Reiter, C. Staiger, S. R. Thomas, W. Vermerris & N. C. Carpita. 2005. "Genomics of plant cell wall biogenesis" Planta # 221: 747–751
- Yong-Hyun L. & L.T. Fan. 1980. "Kinetics of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: Experimental observations on initial rates" Vith Int. Ferm. Symp, London, Ontario, Canada, Jul 20- 25:6pp
- Young R. A & R.M. Rowell. 1986. "Cellulose Structure, Modification and hydrolysis". John Wiley & Sons Inc. USA. 371pp
- Yurlova N. A, Mokrousov I. V & G.S. de Hoog. 1995. "Intraspecific variability and exopolysaccharide production in *Aureobasidium pullulan*". *Antonie van Leeuwenhoek* **68**:57 –63.[\[CrossRef\]](#)[\[Medline\]](#)
- Yurlova N. A, J. M. J Uijthof & G.S. de Hoog. 1996. "Distinction of species in *Aureobasidium* and related genera by PCR-ribotyping". *Antonie van Leeuwenhoek* **69**:323 –329.[\[CrossRef\]](#)[\[Medline\]](#)
- Yurlova NA, Hoog GS de (1997). A new variety of *Aureobasidium pullulans* characterized by exopolysaccharide structure, nutritional physiology and molecular features. *Antonie van Leeuwenhoek* **72**:141 –147.[\[CrossRef\]](#)[\[Medline\]](#)
- Yurlova N. A, G.S. de Hoog & Gerrits van den Ende AHG. 1999. "Taxonomy of *Aureobasidium* and allied genera". *Studies in Mycology* **43**:63 –69.
- Zaborosky O.R.1981. "CRC Handbook of biosolar resource". Vol II. CRC Boca Raton Florida, USA
- Zalar P, C. Gostinčar, G.S. de Hoog, V. Uršič, M. Sudhadham & N. Gunde-Cimerman. 2008. "Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties". *Studies in Mycology* **61**: 21–38. 2008
- Zhang G .F, A. Driouich & L.A. Staehelin. 1993. "Effect of monensin on plant Golgi:re-examination of the monensin induced changes in cisternal architecture and functional activities of the Golgi apparatus of sycamore suspension-cultured cells". Printed in GB. The

Co. of Biologists Limited. Jour. Of Cell Science 104, 819-831

-Zhang, Y. H. P, M. E. Himmel & J. R. Mielenz. 2006. "Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies". Biotech. Adv. 24:452 -481

[www.elsevier.com/locate/biotechadv](http://www.elsevier.com/locate/biotechadv)

-Zhenming C, F. Wang, C. Zhe, Y. Lixi, G. Liu & T. Zhang. 2009. "Bioproducts from Aureobasidium pullulans, a biotechnologically important yeast". App. Microbiol. & Biotech. LXXXII. 5: 793-804

## 2.-Referencias cibergrafía

<http://www.caneros.org.mx/principal.html>

[Scientific american](#) V. 245 N. 3 1981

<http://cc.msnsccache.com/cache.aspxpq=6005269052737&lang=es-MX&FORM=CVRE>

[http://sisbib.unmsm.edu.pe/BV\\_Revistas/biologiaNEW.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/BV_Revistas/biologiaNEW.htm)

[http://www.fao.org/index\\_es.htm](http://www.fao.org/index_es.htm) FAO-BiotechNews-Esp@fao.org

El sitio de biotecnología de la FAO: <http://www.fao.org/biotech/index.asp?lang=es>

([http://www.fao.org/biotech/news\\_list.asp?thexpand=1&cat=131](http://www.fao.org/biotech/news_list.asp?thexpand=1&cat=131))

NOVEDADES \*\*\*

([http://www.fao.org/biotech/news\\_list.asp?thexpand=1&cat=131](http://www.fao.org/biotech/news_list.asp?thexpand=1&cat=131))

En el informe de síntesis se integran las conclusiones principales de las evaluaciones globales y subglobales, centradas en ocho temas: bioenergía; biotecnología; cambio climático; salud humana; gestión de los recursos naturales; innovación basada en los conocimientos y las comunidades tradicionales; el comercio y los mercados; y la mujer en la agricultura. Para obtener mayor información, véase el sitio web

<http://www.agassessment.org/> o bien, póngase en contacto con

[bmcintyre@worldbank.org](mailto:bmcintyre@worldbank.org).

**Documentos sobre bioenergía y biotecnología**

<http://www.fao.org/biotech/seminaroct2007.htm> o bien, póngase en contacto con [biotech-website@fao.org](mailto:biotech-website@fao.org).

**3) Instrumentos de la FAO sobre la bioseguridad**

<http://www.fao.org/docrep/010/a1140s/a1140s00.htm> (en español, francés e inglés) o bien, póngase en contacto con [biosecurity@fao.org](mailto:biosecurity@fao.org).

**4) Biotecnología y recursos genéticos** <http://www.fao.org/biotech/seminarsbstta.htm> o bien, póngase en contacto con [biotech-website@fao.org](mailto:biotech-website@fao.org).

**5) Comité del Codex sobre Métodos de Análisis y Toma de Muestras - Informe de la Reunión 29** <http://www.codexalimentarius.net/web/archives.jsp> o bien, póngase en contacto con [codex@fao.org](mailto:codex@fao.org).

**7) Reseña sobre patentes en las Biociencias**

[http://www.wipo.int/meetings/en/2008/lifesciences/patent\\_landscaping/program.html](http://www.wipo.int/meetings/en/2008/lifesciences/patent_landscaping/program.html)

(el programa y algunas de las ponencias) o bien, póngase en contacto con [publicinf@wipo.int](mailto:publicinf@wipo.int).

#### **10) Documentos del Protocolo de Cartagena (COP-MOP 4)**

La Cuarta reunión de las Partes en el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología (COP-MOP 4) tuvo lugar del 12 al 16 de mayo de 2008 en Bonn, Alemania, inmediatamente antes de la Novena reunión de la Conferencia de las Partes en el Convenio sobre la Diversidad Biológica (19-30 de mayo). La reunión abordó algunas cuestiones permanentes del programa del COP-MOP (es decir, cumplimiento; funcionamiento y actividades del Centro de Intercambio de Información sobre Seguridad de la Biotecnología; creación de capacidad; mecanismo y recursos financieros; cooperación con otras organizaciones, convenios e iniciativas; y administración y asuntos presupuestarios). También trató asuntos de fondo dimanantes del programa de trabajo a mediano plazo y de decisiones previas de la Conferencia de las Partes que actúa como Reunión de las Partes en el Protocolo de Cartagena (manipulación, transporte, envasado e identificación de organismos vivos modificados; evaluación del riesgo y gestión del riesgo; responsabilidad y compensación; órganos subsidiarios; vigilancia y presentación de informes; evaluación y revisión; consideraciones socioeconómicas; concienciación y participación del público; y requisitos de notificación). Para obtener mayor información, véase el sitio web <http://www.cbd.int/mop4/> para referencias y acceso a documentos oficiales (en árabe, chino, español, francés, inglés y ruso) y a documentos informativos (en inglés) o bien, póngase en contacto con [secretariat@cbd.int](mailto:secretariat@cbd.int).

#### **11) Biotecnología y propiedad intelectual - Enseñanza a distancia**

La Academia Mundial de la Organización Mundial de Propiedad Intelectual (OMPI) está impartiendo un curso especializado a distancia sobre propiedad intelectual (P.I.) y biotecnología. Uno de los objetivos del curso es que los participantes puedan aprender definiciones y conceptos que se utilizan comúnmente en la esfera de la P.I., especialmente por parte de profesionales que trabajan en ese ámbito. El curso cubre temas tales como: la naturaleza de los sistemas de protección del derecho de los obtentores de nuevas variedades vegetales y la P.I. como factor de peso en las actividades de investigación y desarrollo. Para este curso especializado se necesitan aproximadamente 100 horas de estudio repartidas en un período de 10 semanas. Se imparte dos veces por año, por ahora en español, francés e inglés. Para obtener mayor información, véase el sitio web [http://www.wipo.int/academy/en/courses/distance\\_learning/catalog/dl204bio.htm](http://www.wipo.int/academy/en/courses/distance_learning/catalog/dl204bio.htm) o bien, póngase en contacto con [DL204e.academy@wipo.int](mailto:DL204e.academy@wipo.int).

**12) Reglamento regional de los OMG** En su colección de documentos de estudios, el Instituto Internacional de Investigaciones sobre Políticas Alimentarias (IFPRI) acaba de publicar "Regional biotechnology regulations: Design options and implications for good governance" (Reglamentaciones regionales sobre biotecnología: opciones y consecuencias para una buena gobernanza) de R. Birner y N. Linacre. En este documento los autores elaboran un marco conceptual en el que se identifican los factores fundamentales que han de examinarse al concebir un sistema regional para la reglamentación de organismos modificados genéticamente. El caso de África Occidental se utiliza para ilustrar el marco, y se hace referencia a la Unión Europea con fines de comparación. Para obtener mayor información, véase el sitio web <http://www.ifpri.org/pubs/dp/ifpridp00753.asp> o bien, póngase en contacto con [ifpri@cgiar.org](mailto:ifpri@cgiar.org).

\*\*\* EVENTOS \*\*\* ([http://www.fao.org/biotech/events\\_list.asp?Cat=133](http://www.fao.org/biotech/events_list.asp?Cat=133))

1. [ELSEVIER.ES - REVISTAS](#)

2. ScienceDirect®

<http://redalyc.uaemex.mx>

[www3.interscience.wiley.com](http://www3.interscience.wiley.com)

Biodiversity Heritage Library [NamebankID: 3915888](#), GloballyUniqueIdentifier:

<urn:lsid:indexfungorum.org:names:101771>, [Zipcode Zoo Species Identifier: 3289461](#)

<http://zipcodezoo.com/Fungi/A/Aureobasidium%5Fribis/>

zipcodezoo.com fungi 24-25jul 2011 920-12.45, 17 abril 2012 5.12-521

Anexo . Panorama histórico sobre el estudio de enzimas celulolíticas y su utilización en la degradación de desechos celulósicos.- (Fig.49 y 50)

Para presentarles un panorama histórico sobre los artículos que se reportan por décadas de los 60's del siglo pasado a la fecha sobre el estudio de la producción de: celulasas, pectinasas y xilanasas, por medio de microorganismos tanto bacterias como hongos.

La utilización de los desechos celulósicos agroindustriales como fuente de carbono, así como su hidrólisis y sacarificación y su aplicación para obtener biocombustibles como el etanol y otros, por procesos fermentativos.

Decidimos realizar un sondeo en Internet, particularmente con el buscador Google scholar advanced, cuyos resultados se muestran en la figura 49 y 50.

Al principio se inicia el estudio de las celulasas, pectinasas y xilanasas, como una alternativa de energía no convencional debido a la posible escasez de petróleo y otros energéticos convencionales en corto tiempo.(figura 50)

Así que el estudio del sistema celulolítico, pectinolítico y xilanolítico para ser utilizado sobre los sustratos celulósicos y así obtener energéticos para formar biocombustibles

como el biogás y el bioetanol por vía fermentativa aún continúa con la SSF sacarificación simultánea y fermentación.

Encontramos que los estudios son muy diversos: sobre la enzima y los organismo que la producen, que van desde la caracterización de cada una de las diferentes actividades enzimáticas, el sinergismo, el aislamiento, la purificación, las técnicas de ARN recombinante a partir de los 70's, la formación de clones y de hiperproductores, empleando técnicas de manipulación genética hasta formar los transgénicos y actualmente se muestra un interés particular en estudiar rutas metabólicas y a lo largo de esta revisión, así como la patentes y su comercialización. Estos estudios mostraron ser de una amplia variedad como los estudios del rumen, de bacterias y de hongos, tomando generalmente como patrón a *Trichoderma* y su descendencia como se muestra en el cuadro 33 y 34.

Sobre el sustrato a hidrolizar es de gran diversidad, ya sea desecho agroindustrial de todo tipo o humano, o bien, provenientes de industrias como el papel. También se utiliza todo tipo de pretratamiento con el fin de obtener fibras celulósicas fácilmente digeribles desde los más simples como el cernido en partículas pequeñas hasta los más sofisticados y caros, como la explosión de vapor. (Cuadro 33)

La aplicación a nivel comercial que se lleva a cabo en diferentes industrias alimentarias tanto humano como de animales, medicina, agronomía, textiles, el ensilaje, tanto productoras de estas enzimas como su utilización. (Cuadro 33)

En la naturaleza para determinar su actividad edáfica, ciclos biogeoquímicos, relación con plantas como las micorrizas, remediación y composta.

Asimismo se estudia el efecto que estas enzimas pueden ocasionar y que se presenta en enfermedades ocupacionales como la de panaderos, que se traduce en alergias como la rinitis e incluso asma.

Otra línea de investigación es la relación huésped- hospedero como es el caso de los parásitos de plantas, que hidrolizan la pared celular con celulasas producidas por bacterias, hongos e insectos principalmente. (figura 50)

Un tema actual es sobre el posible daño que puede causarse a la alimentación en general si se utilizara la producción agrícola para formar biocombustibles como prioridad dejando de lado la producción de alimentos, que tradicionalmente se ha ponderado. (figura 49 y 50)

Encontramos en este acercamiento que los resultados se deben tomar con cautela ya que, por las siguientes razones los datos obtenidos no son exactos, pues muchos artículos se repiten en Internet o bien tratan diferentes tópicos de nuestro análisis.

Elegimos el buscador scholar Google advanced, porque es el que nos dio mayor cantidad de artículos.

De estos el número de artículos total que se presenta en cada década no se encontró al 100%, porque no aparece o bien porque se repiten a lo largo de la búsqueda, ya que puede citarse un artículo de los 60's en adelante y aparecerá tantas veces como sea citado. En los primeros años no se utilizaba el Internet o bien ya no aparecen muchos de los artículos publicados en revistas científicas. (Figura 49 y 50)

En Wiley Inter Science, [www3.interscience.wiley.com](http://www3.interscience.wiley.com) la búsqueda arroja 22563, artículos solo para celulasas, bagazo y *Aspergillus terreus*.

DECADAS DE 1960 A 2009	TEMA CENTRAL Y # ARTICULOS	NUMERO TOTAL DE ARTICULOS
1960 a 1969	Alimento forrajes caprinos, pollos, porcinos 8 Almacenamiento de semillas Silage, 5 Comerciales 6 Detergentes biológicos 8 Enfermedades de las plantas 4 Etanol bacterias, levaduras, hongos 23 Hidrólisis 4 Inhibidores 3 Mandels y Reese 6 Optimización 4 Producción 5 Purificación y Caracterización, 15 Rumen 13 Utilización de celulasas y pectinasas: separar 3	<b>370 a 3190</b> <b>¿9130</b>
1970 a 1979	<b>Biotecnología Moderna RNA recombinante</b> Actividad en el suelo, 5 Aislamiento organismos C, P, X , 33 Alimento forrajes 18 Almacenamiento de semillas Silage, 3 Biocombustibles, 5 Biocidas, Pesticidas, 6 Daños por insectos, 4. bibliotecas 3 Detergentes biológicos, 8 Determinación de actividades: $\beta$ -Glucosidasa, CMC, exo, endo. 26 Enfermedades de las plantas, 9 Fermentación Etanol y biodiesel: bact., levaduras, hongos 42 Geles de acrilamida, 5 Genotipo levadura varias especies <i>Saccaromyces</i> ,3 Hidrólisis 8 Industrias productoras, 5 Inhibidores del crecimiento, 9 Ingeniería genética, 4 Mandels y Reese 12 Materiales celulósicos, 34 Medicina digestivas, fibras de dietas, 15	<b>658 a 2490</b>

	<p>Papel, 44  Producción 92  Purificación, Caracterización y cinética 99  Regulación 37 y expresión 211 génica  Rumen, 55  SSF 22  Sustratos celulósicos, 95 BS, 35  <i>Trichoderma</i> y mutantes 95  Utilización de celulasas, pectinasas y xilanasas:  Inhibición de organismos no deseados como hongos e insectos en frutas, granos.  Aromatizante, 4, Floración, 5  Medicina 5, aditivos 17, digestivas 28, laxantes 34  Textiles, 44.  Micorrizas, 8  Patentes 34</p>	
<b>2000 a 2009</b>	<p>Actividad en el suelo, 49  Aislamiento org. C, P, X: Bacterias, 286.  Hongos 241  Aislamiento, caracterización, 328, secuenciación de genes , 341  Alimentos humanos: ablandadores, 43, aditivos, 25, Conservas, 8 jugos- viscosidad,52 vinos 19  Alimento forrajes 86  Almacenamiento de semillas ensilaje, 261  Biocombustibles, 221 bioetanol, 392, biodiesel 140  Biocidas, 32,Pesticidas, 5 Control biológico, 59  Bioseguridad 9  Composta 76  Clonación, 22  Detergentes biológicos, 273  Determinación de actividades: <math>\beta</math>-Glucosidasa, CMC, exo, endo. 328  Enfermedades de las plantas, 65. Hombre: Asma y alergias causadas por CPX 87  Hidrólisis, 82  <i>Hiperproductores</i>, 224  Industrias productoras, 86  Inhibidores del crecimiento, 7</p>	<b>5870 a 6840 encontrados587</b>

	<p>Mutantes 12  Optimización, 8  Patogeneicidad 3  Papel Reciclado, 4  Producción 12  Purificación y Caracterización 12  Regulación 5 y expresión 6 génica  Rumen, 18  Utilización de celulasas, pectinasas y xilanasas:  Inhibición de organismos no deseados en frutas, granos. Vegetales, jugos, pieles, textiles. 32</p>	
<b>1980 a 1989</b>	<p>Actividad en el suelo, 5  Aislamiento organismos C, P, X , 83  Alimento forrajes 28  Almacenamiento de semillas ensilaje, 9  Biocombustibles, 25  Biocidas, Pesticidas, 6  Clonación , 5  Daños por insectos, 4. bibliotecas 1  Detergentes biológicos, 5  Determinación de actividades: <math>\beta</math>-Glucosidasa, CMC, exo, endo. 36  Enfermedades de las plantas,7  Fermentación Etanol y biodiesel: bact., levaduras, hongos 22  Geles de agarosa y acrilamida, 3  Genotipos,53  Hidrólisis, 38  Industrias productoras, 55  Inhibidores del crecimiento, 4  Ingeniería genética, 44  Mandels y col 42, Cel. cap. II(cita 258 de 79-80)  Medicina digestivas, fibras de dietas, 26  Mutantes 32  Optimización, 48  Patogeneicidad 3  Papel Reciclado, 4  Producción 42  Purificación, Caracterización y cinética 29  Regulación 9 y expresión 11 génica  Rumen, 38</p>	<b>983 a 2710</b>

	<p>SSF 12  Sustratos celulósicos, 334  <i>Trichoderma</i> y mutantes 45  Utilización de celulasas, pectinasas y xilanasas:  Inhibición de organismos no deseados como hongos e insectos en frutas, granos. Vegetales, conservas, jugos- viscosidad, papel, papel reciclado, pieles, textiles. 154</p>	
1990 a 1999	<p><b>INGENIERIA GENETICA</b>  <b>HIPERPRODUCTORES, CLONACION.</b>  <b>FAO</b>  Actividad en el suelo, 15  Aislamiento org. C, P, X: Bacterias, 33.  Hongos 58  Aislamiento, caracterización, 76,  secuenciación de genes , 41  Alimentos humanos: ablandadores, 15,  aditivos, 5, Conservas, 5 jugos-  viscosidad,12 vinos 9  Alimento forrajes 42  Almacenamiento de semillas ensilaje, 17  Biocombustibles, 45 bioetanol, 47,  biodiesel 12  Biocidas, 8,Pesticidas, 6 Control  biológico,7  Bioseguridad 7  Composta 27, vermicomposta 9  Clonación, 15  Detergentes biológicos, 15  Determinación de actividades: β-  Glucosidasa, CMC, exo, endo. 88  Enfermedades de las plantas, 7. Hombre:  Asma y alergias causadas por CPX 29  Hidrólisis, 58  <i>Hiperproductores</i>, 31  Industrias productoras, 6  Inhibidores del crecimiento, 3  Ingeniería genética, marcadores ADN 32  Medicina digestivas, fibras de dietas, 26  Mutantes 32  Optimización, 88  Patogeneicidad 8 relación huésped-  hospedero 5</p>	1340 a 3410 ¿24000

	Ingeniería genética, marcadores ADN 158 Medicina 45, aditivos 37, digestivas 46, fibras de dietas y laxantes 47 Mutantes 469 Optimización, 145 Patogeneicidad 8 relación huésped- hospedero 28 Papel, 176 Producción 289 Purificación, Caracterización y cinética 199 Regulación 97 y expresión 283 génica Rumen, 72 Rutas metabólicas 12 SSF 179 Sustratos celulósicos, 221 BS, 57 Transgénicos 23 Tratamiento de residuos humanos, 12 <i>Trichoderma</i> y mutantes 195 Utilización de celulasas, pectinasas y xilanasas: Inhibición de organismos no deseados como hongos e insectos en embutidos, frutas, granos, 126. Aromatizantes, 9, Floración, 15 Textiles, 72 tratamientos de mezclillas 9. Micorrizas, 22 Patentes 134	
<b>Total</b>		<b>9221- 18540</b> <b>¿14000</b>

Fig.49 Cuadro de la Revisión de artículos por décadas de 1960 a 2009. Buscador Google scholar avanzado.

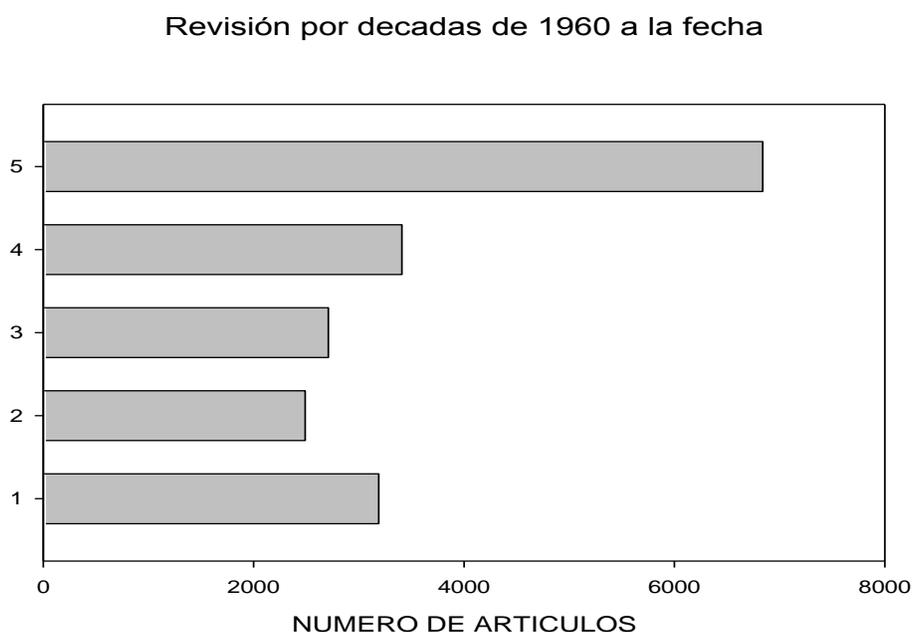
Compilado en este trabajo, M.E. Ochoa, 2009

Otra representación gráfica de acuerdo al número de artículos encontrados en nuestra búsqueda por décadas, de 1960 a 2010. (Fig. 50) Es de hacerse notar el adelanto tecnológico-científico y social que nuestro tema de estudio ha despertado según la década en donde se muestran altas y bajas hasta la actualidad en donde las xilanasas, pectinasas y

celulasas, así como  $\beta$ -glucosidasa y CMCasa entre otras, son producidas industrialmente con múltiples aplicaciones como lo pudimos observar en el siguiente cuadro (Fig. 49 y 50). Solo sobre el género *Aureobasidium*, se encontraron 724 citas con este buscador Google Chrome en julio del 2011)

Por otro lado, los materiales celulósicos de desecho o productos agroindustriales, son abundantes como lo es la celulosa en la naturaleza, lo que lleva a ser sujeto de estudio con todas las variantes de pretratamientos y condiciones de hidrólisis.

En la figura 34 se muestran el total de artículos encontrados por décadas de 1960 a 2009.



**5. Años 2000 a 2009 = 5870 - 6840**

**4.- 1990 a 1999 = 1340 - 3410**

**3.- 1980 a 1989 = 983- 2710**

**2.- 1970 a 1979= 658 a 2490**

**1.- 1960 a 1969= 370 – 3190**

**Total 50 años artículos encontrados 9221 referidos por duplicidad 18 540**

Fig.50 C Artículos citados como resultado de la revisión en el buscador Google Scholar Advance

Compilado en este trabajo M.E. Ochoa.