



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**PRODUCCIÓN DE ACTIVIDADES
FÚNGICAS QUE EFICIENTICEN LA
DEGRADACIÓN DE CELULOSA
CRISTALINA EN RESIDUOS
LIGNOCELULÓSICOS.**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO

PRESENTA:

MAGDIEL ANTONIO MERLIN VIEYRA



MÉXICO, D.F.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Irma Ofelia Bernal Lugo

Vocal: Luz del Carmen Castellanos Román

Secretario: Norma Angélica Camacho de la Rosa.

1º Suplente: Beatriz Ruiz Villafán

2º Suplente: Perla Deyanira Maldonado Jiménez.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

CONJUNTO E DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM .LABORATORIO 104.

ASESOR DEL TEMA:

Irma Ofelia Bernal Lugo

SUSTENTANTE:

Magdiel Antonio Merlin Vieyra

Contenido

RESUMEN.....	5
1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. ANTECEDENTES.....	11
2.1 Estructura de la pared celular.....	11
2.2 Composición química y estructura de los polímeros de la pared celular secundaria.....	13
2.3 Biodegradación de materiales lignocelulósicos.....	17
2.4 Pretratamientos para deslignificar residuos lignocelulósicos.....	20
2.4.1 Mecánico.....	20
2.4.2 Térmico.....	20
2.4.3 Explosión de vapor.....	21
2.4.4 Agua Caliente Líquida (LHW).....	21
2.4.5 Ácido.....	21
2.5 Degradación enzimática de celulosa.....	22
3. Justificación y Objetivos.....	25
3.1 Objetivo General:.....	27
3.2 Objetivos Particulares.....	27
4. Materiales y Métodos.....	30
4.1 Microorganismos y mantenimiento de las cepas.....	30
4.2 Medio Basal.....	30
4.3 Fermentación en fase sólida.....	30
4.4 Extracción de enzimas.....	31
4.5 Crecimiento del hongo.....	32
4.6 Cuantificación de la producción de celulasa en caja de Petri.....	32
4.7 Determinación de azúcares reductores.....	33
4.8 Ensayo de carboximetilcelulosa(CMCCase).....	33
4.9 Ensayo de la actividad de celulasas.....	33

4.10 Ensayo de β -glucosidasa	33
4.11 Actividad de avicelasa.....	34
4.12 Actividad de celobiohidrolasa	34
4.13 Determinación del efecto de glucosa en la producción de biomasa y actividad de celobiohidrolasa.	34
4.14 Obtención de esporas.....	36
5. Resultados	38
5.1 Evaluación de la actividad celulítica en placa de las distintas cepas fúngicas.....	38
5.2 Cuantificación de la producción de celulasas en fermentación sólida por diversas cepas fúngicas.	44
5.3 Elección de las cepas productoras de exoglucanasas	49
5.4 Efecto de la glucosa, del tiempo de fermentación, cantidad de sustrato y de inóculo en la producción de celobiohidrolasa por las cepas <i>A. niger</i> y <i>A. fumigatus</i>	50
5.5 Optimización de la producción de celobiohidrolasas de las especies <i>A.níger</i> y <i>A.fumigatus</i> utilizando el método de Box Wilson.	56
5.6 Degradación de celulosa microcristalina por los extractos optimizados de las especies <i>A.níger</i> y <i>A.fumigatus</i> y comparación con una enzima comercial.	65
6. DISCUSIÓN	68
7. CONCLUSIONES	73
8. REFERENCIAS	74

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue investigar la habilidad de diversas cepas fúngicas (*Asperigillus Spp.* y *Trichoderma viride*) para producir la enzima celobiohidrolasa, al ser cultivadas en presencia de residuos lignocelulósicos como el salvado de trigo. La producción de celobiohidrolasa secretada por las cepas, se evaluó a través de cuantificar la cantidad de P-nitrofenol liberado del sustrato 4-nitrofenil- β -D-celobiósido utilizando la técnica de fermentación en fase sólida. Las cepas de *A. niger* y *A. fumigatus* produjeron la mayor cantidad de celobiohidrolasa en las condiciones de crecimiento utilizadas para la selección, un pH de 5 y un porcentaje de humedad del 70%; con actividades exoglucanasas de 0.2 U/ml y 0.5 U/ml cuantificadas respectivamente, a los 15 días para *A. niger* y a los 10 días para *A. fumigatus*. Las condiciones de producción de la enzima para estas cepas fueron optimizadas. La cantidad de sustrato y la cantidad de inóculo, fue optimizado variando una de ellas a valor constante de la otra; para luego variar la otra manteniendo a valor constante el valor obtenido en la primera optimización, obteniéndose las siguientes condiciones para la cuáles se obtuvo la mayor producción: utilizando 5 g. de salvado de trigo y con un inóculo de 5×10^7 esporas para la especie *A. niger*, se utilizaron estas condiciones para la optimización posterior de la especie *A. fumigatus* con el método de Box Wilson. El pH, el porcentaje de humedad y el tiempo de producción se optimizaron utilizando el método de Box-Wilson. En estas nuevas condiciones la producción de celobiohidrolasa incrementó entre 1.5 y 3 veces para *A. fumigatus* y *A. niger* respectivamente, con valores de 0.3 U/ml y de 0.76 U/ml. La actividad avicelasa que se determinó utilizando celulosa cristalina con los extractos optimizados fue similar para ambas cepas de alrededor de 0.1 U/ml a 40 °C, aunque con menor valor que la detectadas

con el paranitrofenil-celobiósido. Cuando el ensayo con avicel se realizó a 50 °C la actividad producida por *A. fumigatus* disminuyó mientras que la de *A. niger* se incrementó con valores de 0.08 U/mL y de 0.14 U/mL respectivamente. Los extractos de *A.fumigatus* podrían utilizarse para la producción masiva de ésta ya que su producción exoglucanasa cuantificada fue mayor que la cuantificada con una preparación comercial con un valor 0.655 U/ml en paranitrofenilcelobiósido.

1. INTRODUCCIÓN.

Los residuos lignocelulósicos son generados como subproductos de la actividad agroindustrial y/o de la actividad forestal. Representando la mayor fuente de materia orgánica renovable ya que se produce durante la conversión de energía solar por la fotosíntesis de las plantas, y constituye el 60 % de la biomasa total de las plantas terrestres (Pérez y col., 2002). Sus componentes principales son los biopolímeros de la pared celular vegetal: celulosa, hemicelulosa, y lignina (Kim, 2012). En la Tabla 1 se muestran las composiciones típicas de los biopolímeros en algunos de estos residuos.

Tabla 1 Proporción de celulosa, hemicelulosa y lignina en algunos residuos lignocelulósicos

Material lignocelulósico	Celulosa(%w/v)	Hemicelulosa (%w/v)	Lignina(% w/v)
Tallos de madera dura	40-55	24-40	18-25
Tallos de madera suave	45-50	25-35	25-35
Cáscara de nuez	25-30	25-30	30-40
Mazorcas de maíz	45	35	15
Papel	85-99	0	0-15
Paja de trigo	30	50	15
Cascarilla de arroz	32.1	24	18
Basura clasificada	60	20	20
Hojas	15-20	80-85	0
Pelo de semillas de algodón	80-95	15	0
Periódico	40-55	25-40	18-30
Residuos de la pulpa de papel	60-70	15	7.5
Sólidos primarios de agua residual	12	NA	24-29
Bagazo fresco	33.4	30	18.9
Abono sólido de ganado	1.6-4.7	1.4-3.3	2.7-5.7
Césped americano	45	31.4	12

Como se observa en la Tabla 1, el compuesto estructural de la pared celular más abundante de la mayoría de los residuos lignocelulósicos es la celulosa y sólo en las hojas, la hemicelulosa es el polímero más abundante. Debido a que la hidrólisis enzimática de la celulosa produce glucosa y ésta a su vez es utilizada como sustrato fermentable para diversos procesos biotecnológicos

como la producción de: etanol, vitaminas, ácidos orgánicos, aminoácidos, enzimas de uso industrial, colorantes, saborizantes, fármacos, entre otros. A pesar de todas estas posibles aplicaciones, la producción de glucosa a partir de residuos lignocelulósicos aún no es económicamente competitiva por lo en las últimas tres décadas, numerosas investigaciones han sido realizadas con el fin de lograrlo. Sin embargo, se ha podido establecer que la viabilidad económica de la hidrólisis enzimática de la celulosa presente en los materiales lignocelulósicos requiere de abaratar los siguientes procesos: la remoción de la lignina y de la hemicelulosa que recubren a la celulosa, la disminución de la cristalinidad de esta última y el costo de las enzimas hidrolíticas.

En la actualidad, la mayoría de los métodos efectivos utilizados para remover la lignina y la hemicelulosa de los residuos lignocelulósicos también disminuyen la cristalinidad de la celulosa, lo que facilita su hidrólisis por celulasas comerciales de origen fúngico. Se mencionó con anterioridad que la glucosa liberada por estos procesos, no es económicamente rentable para su utilización como sustrato fermentable, por lo que surge la necesidad de desarrollar estrategias menos costosas que permitan la producción de glucosa a partir de residuos lignocelulósicos. Con finalidad de producir glucosa a partir de estos residuos, en el laboratorio 104 del departamento de Bioquímica, se han combinado métodos fisicoquímicos y enzimáticos, que permiten aislar

celulosa con un menor costo que el de los métodos tradicionales como el de hidrólisis ácida y básica que son descritos más adelante; pero la celulosa que queda después de estos tratamientos aún presenta un alto grado de cristalinidad, lo que limita su hidrólisis efectiva por celulasas comerciales.

Las exoglucanasas son las enzimas encargadas de hidrolizar a la celulosa cristalina. Desafortunadamente, la mayoría de las celulasas comerciales no contienen suficiente cantidad de estas enzimas; por lo que el objetivo de este trabajo fue el de seleccionar cepas de hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus* y *Trichoderma*, que produjeran exoglucanasa en una alta cantidad y en condiciones de producción óptimas.

2. ANTECEDENTES

La estructura y composición química de los componentes de la pared celular, constituyen el principal obstáculo para el aprovechamiento integral de los materiales lignocelulósicos.

2.1 Estructura de la pared celular

La pared celular de las plantas es una capa rígida localizada en el exterior de la membrana plasmática. Su función es la de proteger el contenido de la célula y le otorga soporte a los tejidos. La lamela media es el componente más externo en la pared de la célula vegetal y las está uniendo físicamente como se muestra en la figura 1 A, seguida de la pared primaria y las pared secundaria que se une finalmente a la membrana celular; la pared secundaria está ubicada en la parte más externa en comparación con la pared primaria como se observa en la figura 1 B.

La pared primaria, está presente en todas las células vegetales que se encuentran en etapa de reproducción. Su contenido de celulosa es del 9 al 25 % y no contienen lignina (Fig. 1C); y **la secundaria** que se forma en la parte interior de la pared celular primaria cuando las células han detenido su crecimiento (Fig. 1B). A diferencia de la pared celular primaria, contiene una gran proporción de celulosa, hemicelulosa y lignina (Fig. 1D). En la pared celular primaria las fibrillas están entrelazadas, dispuestas aparentemente al

azar (Fig. 1C); en la pared secundaria están dispuestas paralelamente (Fig. 1D).

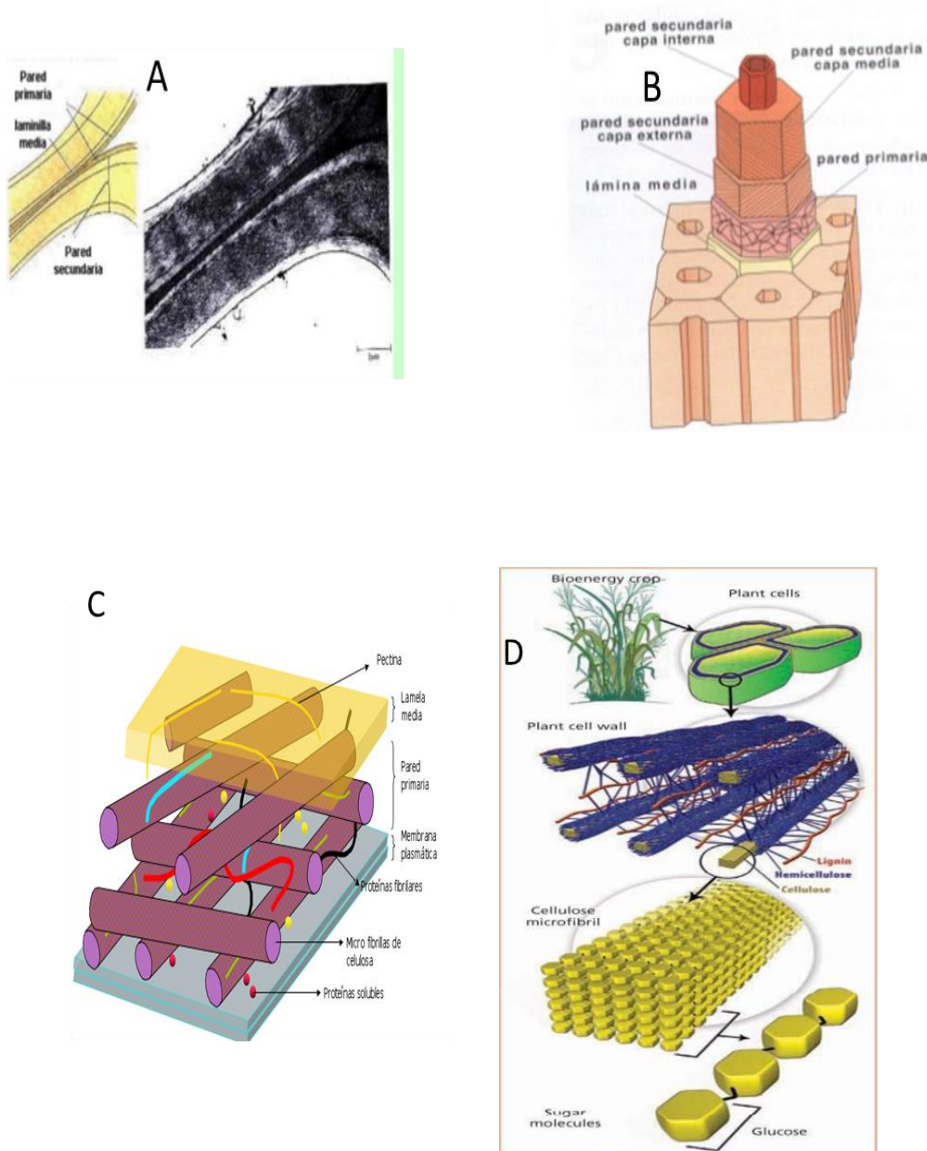


Figura.1 Esquema de la estructura de la pared celular vegetal donde se observan las interacciones entre sus componentes.

A. Pared celular primaria y secundaria B. Arreglo espacial de las paredes primaria y secundaria C. Estructura de la pared primaria D. Estructura de la pared secundaria.

http://www.biologia.edu.ar/plantas/cell_vegetal.htm.

Además, en la pared celular secundaria la celulosa se encuentra cubierta y entrelazada con la lignina y la hemicelulosa, a su vez estos dos componentes también interactúan entre ellos. Las paredes celulares abundantes en los residuos lignocelulósicos son de tipo secundario.

2.2 Composición Química y estructura de los polímeros de la pared celular secundaria.

La **lignina** está constituida por alcoholes aromáticos (Fig 2A) polimerizados de manera azarosa formando una malla amorfa (Fig 2B).

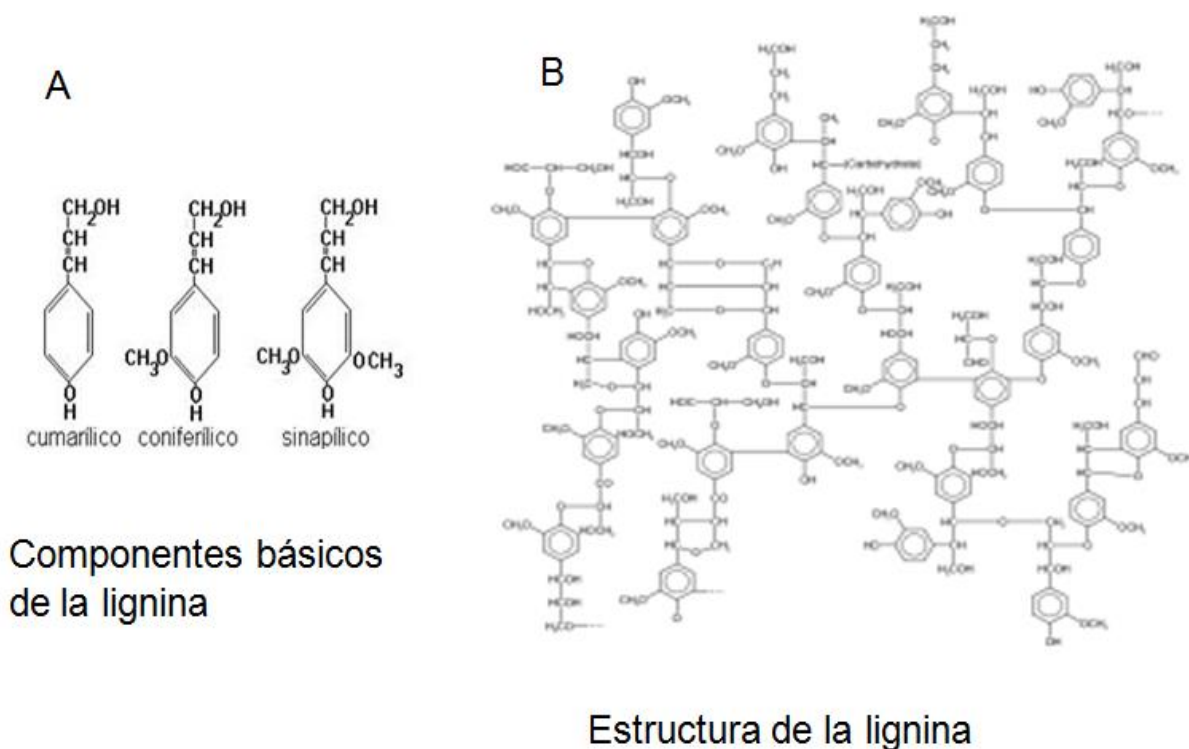


Figura 2. Estructura de la lignina y sus componentes básicos
<https://es.wikipedia.org/wiki/Lignina>.

Mientras que la hemicelulosa es un heteropolímero formado por una cadena principal y ramificaciones cortas de diversos azúcares como la D-xylosa, la D-manosa, la D-galactosa, la D-glucosa, y la L-arabinosa. En la figura 3 se muestra un esquema de xiloglucano, hemicelulosa presente en los residuos lignocelulósicos de origen agrícola.

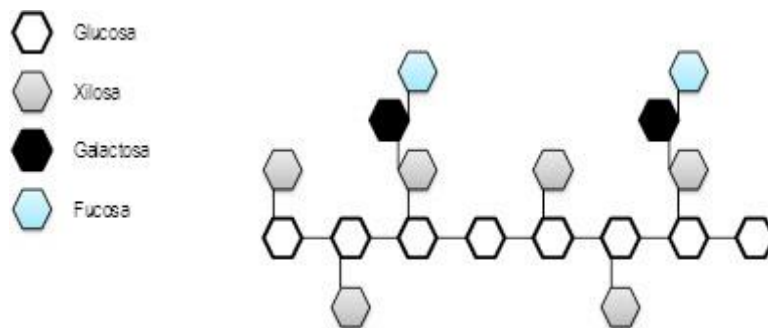


Figura 3 Representación esquemática de la estructura química de un xiloglucano

<http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%204/AQM4hemicelulosas.html>

Tanto, la lignina como la hemicelulosa forman la parte amorfa, la matriz no fibrosa, en la que se encuentra embebida la celulosa, que constituye la parte fibrosa de la pared celular.

Por su parte, la celulosa es un homopolímero lineal compuesto de unidades de β -D-glucosa (Fig. 4A) unidos exclusivamente a través de enlaces β -1,4-glucosídicos (Richmond, 1991). El grado de polimerización (DP) en las cadenas individuales de celulosa, también denominadas moléculas de celulosa varía desde 200 hasta más de 15000 residuos de glucosa (Sjostrom, 1993; Kuga y Brown, 1991). Cuando se asocian 20 de estas cadenas de celulosa, a través de puentes de hidrógeno (Fig. 4B), se forma una **microfibrilla** (Fig. 4C), observable con el microscopio electrónico, 10-25 nanómetros (Nishiyama et al., 2002; 2003). Las interacciones entre las moléculas de celulosa para formar las microfibrillas no se realiza a lo largo de toda la cadena de celulosa por lo que en las microfibrillas de celulosa se distinguen dos regiones: una amorfa y otra cristalina (Fig 4D).

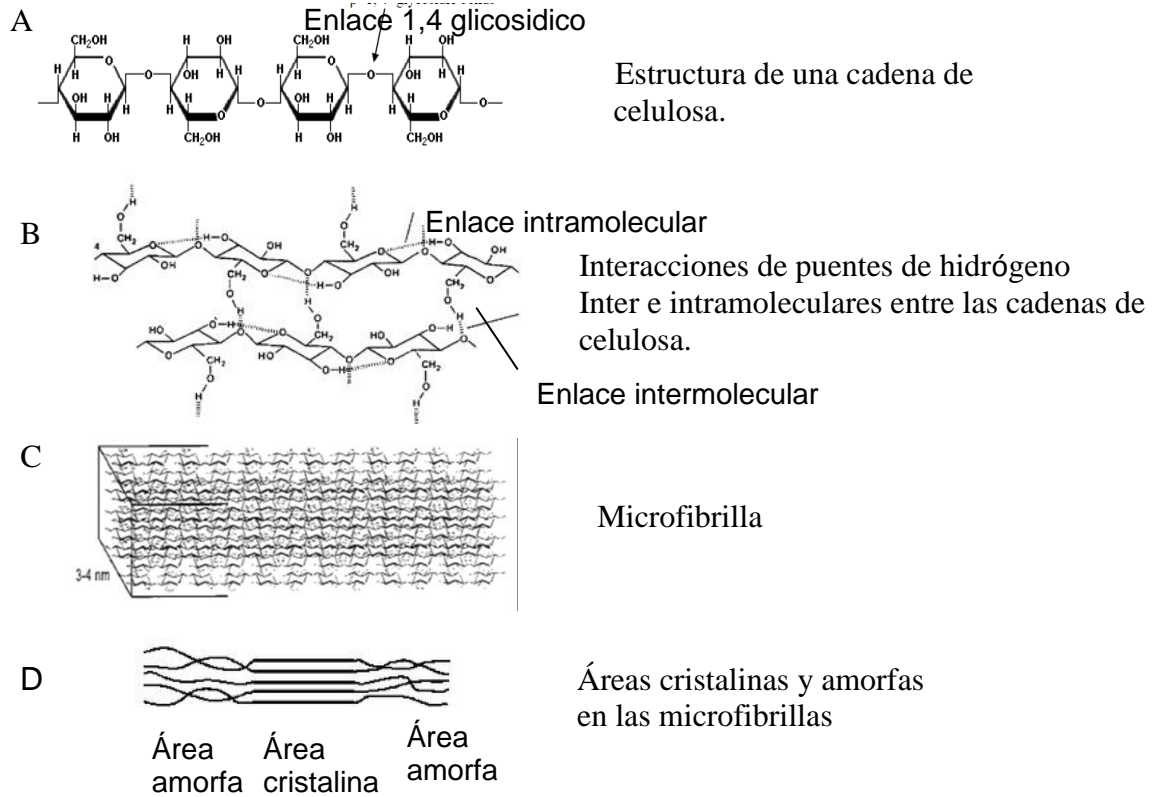


Figura 4 Organización de las cadenas de celulosa

<http://www.barnhardtcotton.net/technology/cotton-properties/>

La agregación de 250 microfibrillas, constituye una fibra de celulosa. Debido a que las unidades de glucosa están rotadas 180^0 alrededor del eje del esqueleto de celulosa la unidad repetitiva estructural básica de la celulosa es la celobiosa antes que la glucosa (Blackwell, 1982; Atalla, 1984) como se muestra en la figura 5.

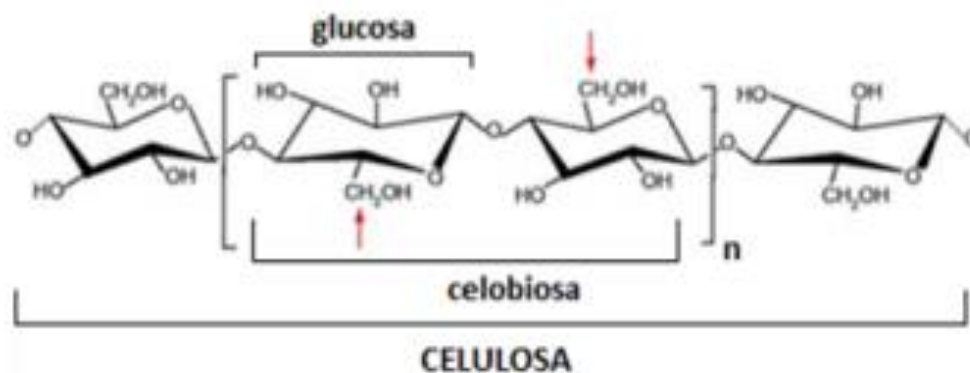


Figura 5. Celobiosa como una unidad de repetición en una cadena de celulosa.

http://biologiadelatortilla.blogspot.mx/2013/03/la-pared-celular-vegetal-composicion_1.html

La CBH I actúa en los extremos reductores y la CBH II actúa en los extremos no reductores de esta unidad estructural en la celulosa cristalina (Teeri, 1997).

2.3 Biodegradación de materiales lignocelulósicos.

En la naturaleza, los residuos lignocelulósicos son degradados por las enzimas producidas por hongos Basidiomicetos que pudren la madera (Ravinovich y col., 2004). Los basidiomicetos son uno de los grupos más diversos de hongos, formado por unas 20 000 especies entre las cuales se encuentran las setas, los bejine, falos, hongos de madera, las royas y los carbonos; entre todos forman el 30% de los hongos conocidos. Su característica principal es la formación de basidios, meiosporangios que

producen basidiosporas exógenas, uninucleadas y haploides. Su micelio está formado por hifas bien desarrolladas, septadas, que penetran el sustrato de dónde absorben su alimento; son microscópicas, pero en ocasiones es posible observar un micelio en zonas húmedas; normalmente es blanco, pero en ocasiones toma coloraciones azules, amarillas y anaranjadas. Este tipo de hongos se clasifican en tres grandes grupos: los de A) *podrición blanca*, B) *podrición café* y C) *podrición suave* (Haglund, 1999; Dhouib y col., 2005).

A) *Los hongos de podrición blanca* son los más estudiados (Mester and Field, 1998) en el área de la utilización biotecnológica de residuos lignocelulósicos. Cuando la madera es atacada por **hongos de podrición blanca selectiva**, como en los casos del *Ganoderma australe*, *Phlebia tremellosa*, o *Pleurotus spp.*, la madera pierde sus características de calidad y toma una apariencia blanquecina debido a la oxidación y pérdida selectiva de la lignina, la cual es ligeramente café. La oxidación de la lignina, la realizan el conjunto de enzimas lignolíticas secretadas por estos hongos, entre las que se encuentran la versátil peroxidasa, la manganeso peroxidasa, la lignina peroxidasa y la lacasa entre otras. En otros casos la **podrición blanca es simultánea**, debido a que se hidroliza, tanto la lignina como los polímeros de azúcares, aunque la hidrólisis de estos últimos es tardía. Este tipo de podrición la realizan los

hongos: *Phanarechoate chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, o *Trametes versicolor*.

B) Los hongos de *putrición café* degradan las hemicelulosas y la celulosa a través de un sistema celulítico que trabaja en conjunto, estos azúcares son utilizados por los hongos como fuente de carbono. Debido a que estos hongos sólo modifican parcialmente a la lignina, la madera luce un color café oscuro debido a la lignina residual. Ejemplo de estos hongos son: *Fomitopsis pinicola*, *Poria placenta*, *Tyromices palustres*.

C) *Putrición suaves*. Este tipo de pudrición es realizada por hongos filamentosos que hidrolizan la pared celular alrededor de las hifas, por lo que la pudrición es sólo superficial. La pudrición blanda la causan, generalmente, los hongos des-componedores de la familia de los ascomicetos, aunque algunos basidiomicetos pueden causar una pudrición similar a la pudrición blanda. Los hongos causantes de pudrición blanda usan un tipo de ataque similar al utilizado por los causantes de pudrición marrón; se degrada preferentemente la celulosa. Los hongos de pudrición blanda atacan la celulosa de las paredes celulares y forman a menudo cavidades microscópicas en la pared secundaria celular (Schwarze et al. 2000).

La degradación de la lignina y la celulosa que los hongos de pudrición blanca llevan a cabo sobre la madera, también la realizan sobre todo tipo de

materiales lignocelulósicos; siendo ésta la razón por lo que en la actualidad, la producción comercial de enzimas lignolíticas y celulíticas es en su mayoría a partir de hongos Basidiomicetos de pudrición blanca.

En la actualidad, la deslignificación enzimática de materiales lignocelulósicos no es efectiva, por lo que se han desarrollado métodos fisicoquímicos que permiten la deslignificación de estos materiales, como pretratamientos ácidos y básicos, explosión de vapor, térmicos, entre otros. A continuación se describen los métodos más utilizados para este propósito.

2.4 Pretratamientos para deslignificar residuos lignocelulósicos.

2.4.1 Mecánico

Este procedimiento consiste en la molienda que es el corte de residuos lignocelulósicos en pequeños pedazos. Es un pre tratamiento mecánico de la materia lignocelulósica.

2.4.2 Térmico

En este tratamiento la biomasa lignocelulósica es calentada. Si la temperatura se incrementa entre 150-180 °C, primero la hemicelulosa y luego la lignina se comienzan a solubilizar (Bobleter, 1994; Garrote y col., 1999).

Dentro de las desventajas de este pretratamiento con calor en el cual se forman hemicelulosa y lignina soluble, se tiene el riesgo de formación de compuestos fenólicos y heterocíclicos como la vainillina, el alcohol

vainillílico, el furfural y el 5-hidroximetil furfural (Ramos, 2003), los cuales inhiben el crecimiento de diversos microorganismos. También el pretratamiento térmico puede generar un aumento en el índice de cristalinidad de la celulosa (Weimmer y col.1995) este aumento en la cristalinidad complica su hidrólisis, ya que este tipo de celulosa es de difícil degradación.

2.4.3 Explosión de vapor.

En este caso la biomasa se coloca dentro de un reactor que se calienta con vapor de agua a temperaturas mayores de 240 °C, por algunos minutos. Después de un cierto tiempo, el vapor es liberado y la biomasa se enfría rápidamente. El objetivo del pretratamiento con vapor es solubilizar a la hemicelulosa para hacer la celulosa más accesible a la hidrólisis enzimática y evitar la formación de inhibidores, como el furfural.

2.4.4 Agua Caliente Líquida (LHW)

En este pretratamiento se usa agua caliente en lugar de vapor, con el objetivo de remover la hemicelulosa para hacer la celulosa más accesible y evitar la formación de inhibidores. Para evitar la formación de estos inhibidores, el pH se mantiene entre valores 4 a 7.

2.4.5 Ácido

El pre tratamiento de lignocelulósicos con ácidos a temperatura ambiente se utiliza para aumentar la eficiencia de degradación enzimática. La reacción que

ocurre durante el tratamiento ácido es la hidrólisis de hemicelulosas, estos oligómeros, pueden ser hidrolizados produciendo furfural, monómeros, HMF y otros productos inhibitorios para el crecimiento de los hongos (Fengel y Wegener, 1984).

Independientemente de cuál de los pretratamientos anteriores sea utilizado para deslignificar, el paso siguiente en la degradación de materiales lignocelulósicos es la hidrólisis enzimática de la celulosa, lo que permite la obtención de glucosa y dextrinas solubles.

2.5 Degradación enzimática de celulosa.

Las enzimas llamadas celulasas son las responsables de la degradación de celulosa a glucosa. Las celulasas se ubican dentro de las enzimas del tipo Glucosil hidrolasas y éstas a su vez forman parte de las carbohydrate active enzymes, las cuáles son responsables de la ruptura, modificación y síntesis de los enlaces glicosídicos (Cantarel y col., 2009).

Las celulasas de origen fúngico son un conjunto de 3 tipos de actividades enzimáticas diferentes (Goyal y col, 1991; Rabinovich y col., 2002): endoglucanasas (endo-1,4- β -d-glucanasa), celobiohidrolasas (exo-1,4- β -d-glucanasa) y β -glucosidasas (1,4- β -glucosidasa) (Hong y col., 2001; Li y col., 2006).

Las endoglucanasas, son frecuentemente llamadas carboximetilcelulasas, debido a que su actividad se determina utilizando como sustrato carboximetilcelulosa, que es un compuesto orgánico, derivado de la celulosa, compuesto por grupos carboximetil, enlazados a algunos grupos hidroxilo, presente en polímeros de la glucopiranososa no cristalinos. Las endoglucanasas inician su ataque en múltiples sitios internos de las regiones amorfas de las fibras de celulosa, lo que ocasiona la apertura de sitios para que las enzimas celobiohidrolasas actúen posteriormente (Lynd y col., 1991). Las celobiohidrolasas frecuentemente llamadas exoglucanasas son el mayor componente del sistema celulítico fúngico acumulando del 40 al 70% del total de proteína celulítica, estas actividades pueden hidrolizar celulosa altamente cristalina (Esterbauer y col., 1991). Las celobiohidrolasas remueven monómeros y dímeros de la parte terminal de la cadena de glucanos. Generalmente, las endoglucanasas y las celobiohidrolasas trabajan sinérgicamente en la hidrólisis de celulosa (figura 7), pero los detalles de los mecanismos involucrados en el proceso son todavía desconocidos (Rabinovich y col., 2002).

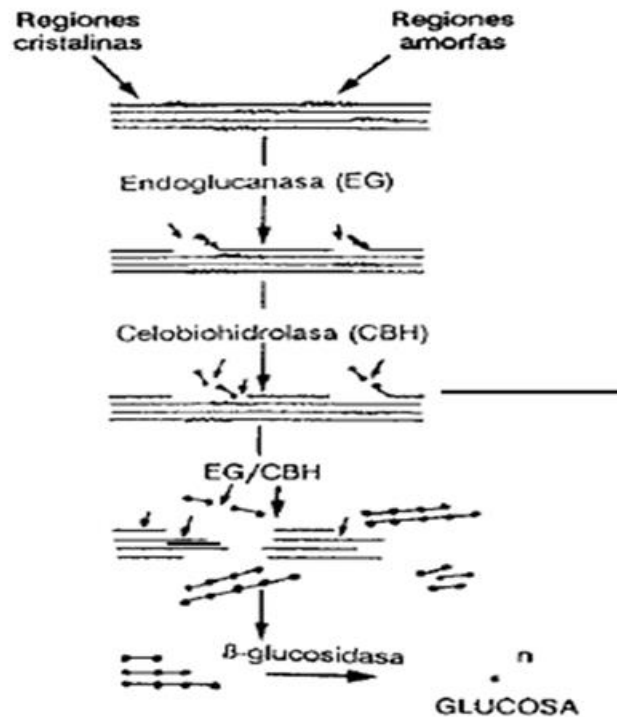


Figura 6. Hidrólisis enzimática de celulosa, mostrando el sinergismo entre endoglucanasa y exoglucanasa.

<http://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/1754-6834-3-4>

Las celulasas son producidas por muchos organismos incluyendo hongos y bacterias. En general, las celulasas bacterianas son producidas constitutivamente, en cambio las celulasas fúngicas son inducibles por la presencia de celulosa (Suto y Tomita, 2001). Los hongos filamentosos; particularmente los géneros de *Aspergillus* y *Trichoderma* son conocidos por ser los mejores productores de celulasas (Peig y col., 1998).

3. Justificación y Objetivos

En las últimas tres décadas, la conversión de biomasa lignocelulósica, ha mostrado un gran interés en el uso potencial de los carbohidratos y de la lignina debido a que son fuentes sustentables para producir bioetanol, a si mismo de productos precursores para ser utilizados en las biorefinerías (Kann y Kamm, 2004) y en aplicaciones biotecnológicas que incluyen productos químicos y/o farmacéuticos, cómo: detergentes, combustibles, alimentos, alimentos para animales, cosméticos, entre otros (Sánchez, 2009). Sin embargo, aún no se ha demostrado su viabilidad económica debido a los altos costos que representan el pretratamiento del material lignocelulósico, para la remoción de lignina y hemicelulosas; así como el de las enzimas utilizadas en la hidrólisis de la celulosa. Es por ello que el desarrollo de nuevas tecnologías, es un requisito para el aprovechamiento de biomasa recalcitrante, que permita el acceso a la celulosa y hacer que el paso de hidrólisis sea un proceso barato y competitivo (Talebna y col., 2010).

En el laboratorio 104 del departamento de bioquímica, se ha implementado un pretratamiento combinado, que utiliza una menor temperatura que los métodos tradicionales y disuelve tanto a la hemicelulosa como a la lignina; sin embargo, la celulosa no es hidrolizada eficientemente por celulasas

comerciales debido a que presenta un alto grado de cristalinidad. Por lo anterior, este trabajo se orientó hacia la producción de actividades de exoglucanasas que degraden a la celulosa cristalina, utilizando hongos del género *Aspergillus* y *Trichoderma viride* para producir estas enzimas.

3.1 Objetivo General:

Optimizar las condiciones de producción de las cepas fúngicas con mayor capacidad para producir celobiohidrolasas.

3.2 Objetivos Particulares

- Selección de las cepas fúngicas que produzcan una mayor actividad enzimática de celobiohidrolasa, a partir de una fermentación en fase sólida, usando como fuentes de carbono: salvado de trigo y una mezcla 50:50 de salvado de trigo y avicel.
- Optimización de producción de la actividad celobiohidrolasa, cuantificando dicha actividad en paranitrofenil celobiósido; para lograr esto se modificó una variable de interés, mientras las demás variables se mantuvieron constantes, estas variables fueron: cantidad de sustrato, cantidad de glucosa en el medio basal y el tipo y cantidad de inóculo.
- Optimización de la producción de la actividad celobiohidrolasa. cuantificando dicha actividad con el sustrato paranitrofenil celobiósido. Para ello se utilizó el método de box Wilson para optimizar: el pH, el porcentaje de humedad y el tiempo de fermentación.

- Cuantificación de la actividad avicelasa de los extractos producidos en condiciones optimizadas, utilizando el avicel como sustrato para esta determinación.

4. Materiales y Métodos

4.1 Microorganismos y mantenimiento de las cepas

Las cepas fúngicas utilizadas fueron cuatro pertenecientes al género *Aspergillus* (*A. niger*, *A. oryzae*, *A. fumigatus* y *A. terreus*) y una del género *Trichoderma* (*T. viride*). Todas las cepas fueron facilitadas por el cepario de la Facultad de Química. Inicialmente estas cepas fueron aisladas del jardín de la Facultad de Química y se conservaron en el cepario. Para el trabajo aquí desarrollado, las cepas fueron conservadas en el laboratorio en tubos con agar papa dextrosa (PDA) en refrigeración a 4 °C resemebrándose cada dos meses.

4.2 Medio Basal

Como medio basal se utilizó una solución de 1 % glucosa, 0.1 % tiamina, 0.1 % elementos traza y 1 % de sales de nitrato (Kaminsky, 2001).

4.3 Fermentación en fase sólida

En matraces Erlenmeyer de 500 ml se colocaron 10 g de salvado de trigo o 5 g de salvado de trigo con 5 g de avicel adicionando, 20 ml del medio basal antes descrito. Estos matraces se esterilizaron a 121 °C, 15 psi por 15 minutos; una vez fríos, en condiciones estériles se inocularon con 1 cm² o más de agar recortado de cajas Petri con 5 días de crecimiento de la mezcla del hongo con el agar, se usó esta medida para hacer constante el inóculo considerando que

no hay mucha variación de esporas inoculadas de 1 cm² a otro. Los matraces se incubaron a 30 °C en una incubadora sin agitación de Craft. Cuatla Morelos, durante 5, 10 y 15 días. A cada tiempo se retiró un matraz de la incubadora para obtener el extracto enzimático y determinar actividades celulíticas.

En otra serie de experimentos se utilizaron 5, 6, o 7 g. de salvado de trigo y se les adicionaron 10 ml de medio de cultivo basal. Estos matraces se esterilizaron a 121 °C, 15 psi, por 15 minutos. Una vez fríos se inocularon con la misma cantidad de esporas, para escoger la cantidad de sustrato más conveniente. Posteriormente, se inocularon matraces que contenían, 5g de salvado de trigo con diferentes cantidades de inculo: 10⁶, 5*10⁶, 10⁷, 5*10⁷ y 10⁸ esporas para determinar la cantidad de esporas que produce, una mayor actividad enzimática.

4.4 Obtención del extracto enzimático.

Al término de la fermentación, al matraz se le adicionaron 30 ml de amortiguador de acetatos 50 mM, pH 5. El contenido se agitó con una espátula metálica para resuspender el sólido en el líquido y los matraces se agitaron a 150 rpm, en un agitador orbital, a 4 °C durante toda la noche; el contenido de esta extracción se conservó en refrigeración a 4 °C en un tubo falcon de 50 ml. La segunda extracción se realizó con la adición de otros 30

ml de amortiguador de acetatos. Esta segunda extracción se realizó por 5 h en las condiciones antes mencionadas. Los extractos se reunieron y se guardaron a 4°C hasta su uso para la cuantificación de actividades enzimáticas.

4.5 Determinación del crecimiento fúngico.

Se cuantificó la proteína total del hongo, en la mezcla residual de micelio con sustrato después de extraer los extractos enzimáticos por el método propuesto por Parry (1981).

4.6 Cuantificación de la producción de celulasas en caja de Petri.

Se preparó el medio de producción enzimática que contenía por litro: 3 g de nitrato de sodio, 1 g de fosfato dibásico de potasio, 0.5 g de sulfato de magnesio, 0.5 g de cloruro de potasio, 0.01 g de sulfato ferroso, 20 g de agar y 5 g de avicel o de carboximetil celulosa, el pH se ajustó a 5.0 y se esterilizó a 121°C, 15 psi, por 15 min (Farinas, 2012). El medio se dejó enfriar hasta 60 °C y se vertieron 25 ml, a cada una de las cajas Petri en condiciones estériles. Una vez que las cajas solidificaron, en cada una se colocó un cuadro de agar con micelio fúngico de 1 cm² que fue previamente incubado durante 5 días a 30 °C en medio de crecimiento de agar papa dextrosa. Las cajas inoculadas con los cuadros, se dejaron durante 5 días a 30 °C; después de este tiempo, se tiñeron con rojo Congo al 2.5% y se lavaron después de 15 minutos con una solución 1 M de NaCl. Las áreas no teñidas con rojo congo, indicaron dónde

la CMC o el avicel fueron hidrolizados a glucanos que contienen siete o menos residuos de glucosa.

4.7 Determinación de azúcares reductores

El método del ácido dinitrosalicílico (Miller, 1959) se utilizó para determinar la cantidad de azúcares reductores.

4.8 Ensayo de Carboximetilcelulasa (CMCasa)

La actividad CMCasa fue determinada usando el método descrito por Wood and Bhat (1988) cuantificando la cantidad de azúcares reductores liberados.

4.9 Ensayo de la actividad de Celulasas.

Esta actividad enzimática, se midió de acuerdo a los métodos de Wood y Bhat (1988). La actividad en unidades sacarificante de papel filtro, se midió de acuerdo a la cantidad de glucosa liberada. Una unidad se definió como un μmol de glucosa equivalente a azúcares reductores liberada por minuto.

4.10 Ensayo de β -glucosidasa

La actividad β -glucosidasa se midió por el método propuesto por Wood y Bhat (1988), se utilizó como sustrato p-nitrofenil- β -D-glucósido y se cuantificó la cantidad del p-nitrofenol liberado. La actividad de β -glucosidasa se expresó en unidades, definidas como 1 μmol de paranitrofenol liberado por la enzima en un minuto.

4.11 Actividad de avicelasa

Se pesaron 15 mg de avicel en un microtubo al que se le agregó posteriormente 1 ml del extracto enzimático, 75 μL de amortiguador de citratos y 425 μL de agua, el microtubo se colocó en un agitador de movimiento circular en una incubadora a 50 $^{\circ}\text{C}$ y se incubó durante 30 min. Posteriormente se cuantificaron los azúcares reductores con el reactivo de DNS (Miller, 1959).

4.12 Actividad de celobiohidrolasa

Se colocaron 10 μL del extracto y 10 μL de amortiguador de citratos 0.05 M, pH 5 en un pozo de una placa Nunc de polipropileno la mezcla se preincubó durante 5 min a 50 $^{\circ}\text{C}$. Pasado el tiempo se le agregaron 10 μL del sustrato PNCB de una concentración 1mM. La caja se incubó otros 15 min a 50 $^{\circ}\text{C}$. Al terminar la reacción se agregaron 200 μL de Na_2CO_3 1M. La intensidad del color se leyó a 420 nm en un espectrofotómetro para placas.

4.13 Determinación del efecto de la glucosa en la producción de la biomasa y la actividad de celobiohidrolasa.

De los tubos que fueron proporcionados por el cepario de la Facultad que se encontraban en refrigeración, se tomó en la campana de flujo laminar un pedazo de agar con micelio con la ayuda de una espátula, que se sembró en cajas Petri con medio PDA, las cajas se incubaron a 30 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 días,

después de este período se transfirió 1 cm² de las especies *A.níger* y *A.fumigatus* en matraces que contenían 10 g de salvado de trigo y 20 mL de medio basal con o sin glucosa a un pH de 5.0. Los matraces se incubaron a 30 °C por 5 y 8 días. A cada tiempo, el contenido de los matraces se agitó con una espátula y se les adicionó 30 ml de buffer de citratos 50 mM, y se agitaron durante toda la noche en movimiento circular a 4 °C, después se filtró el extracto y al sólido restante se le agregaron otros 30 ml de amortiguador de citratos 50 mM para agitarlo nuevamente a 4 °C durante 2 horas. Se volvió a filtrar el contenido del matraz para quitar los residuos sólidos, y este extracto se juntó con el primer extracto en un tubo Falcón de 50 ml; éste extracto se utilizó para los ensayos de actividad de la exoglucanasa.

Los residuos sólidos se almacenaron en cajas metálicas, para luego secarlos en una estufa a vacío durante tres días para la determinación de proteína total.

El contenido proteico se determinó calentando muestras de 100 mg con 100 ml al 0.1% de Docecil Sulfato de Sodio (SDS), por 3 minutos a 100 °C, se centrifugó y determinó la proteína por la técnica de Bradford tomando del sobrenadante 800 µL y se adicionó 200 µL del reactivo de Bradford, de la siguiente manera: se agitó el contenido de la celda y se incubó por cinco minutos. Posteriormente, las celdas se leyeron a 595 nm en un espectrofotómetro.

4.14 Obtención de esporas.

De los tubos que fueron proporcionados por el cepario de la Facultad que se encontraban en refrigeración, se tomó en la campana una muestra de agar con micelio, con la ayuda de una espátula, que se sembró en cajas Petri con medio PDA, las cajas se incubaron a 30 °C durante 5 días. A este tiempo, en condiciones de esterilidad, se adicionaron 5 ml de una solución salina isotónica con tween 80 al 0.1% a cada caja. El sobrenadante de dos cajas de Petri se reunió en un tubo Falcón estéril. El tubo se centrifugó a 5000 rpm en una centrífuga. En condiciones de esterilidad se separó el sobrenadante que se colocó en tubo de precipitados para desecharlo posteriormente. A la pastilla se le adicionaron 10 ml de solución salina isotónica con tween 80 y se mezcló con ayuda de un vortex, esta operación, se realizó por 3 veces consecutivas para obtener las esporas de cada cepa. Al final se realizó un conteo de esporas con la ayuda de un microscopio óptico y de una cámara de Neubauer, se hicieron las diluciones correspondientes para poder observar las esporas en los cuadrillos de la cámara, colocando 10 µL de esta dilución en la cámara y realizando el conteo correspondiente.

Se utilizó la siguiente fórmula para realizar el conteo.

$$\text{conidias}/\mu\text{L} = \frac{(\text{Conidias}) * (10) * (\text{Fd})}{4}$$

Fd= factor de dilución

Este conteo se realizó con la intención de hacer el ajuste del inóculo para inocular una cantidad específica de esporas. Se calculó el volumen del inóculo conteniendo la cantidad de esporas necesarias para un específico.

5. Resultados

5.1 Evaluación de la actividad celulítica en placa de las distintas cepas fúngicas.

Al comparar con el control cada una de las cajas donde crecieron las diferentes cepas fúngicas, se observan zonas de decoloración y otras más oscuras (Figura 7).

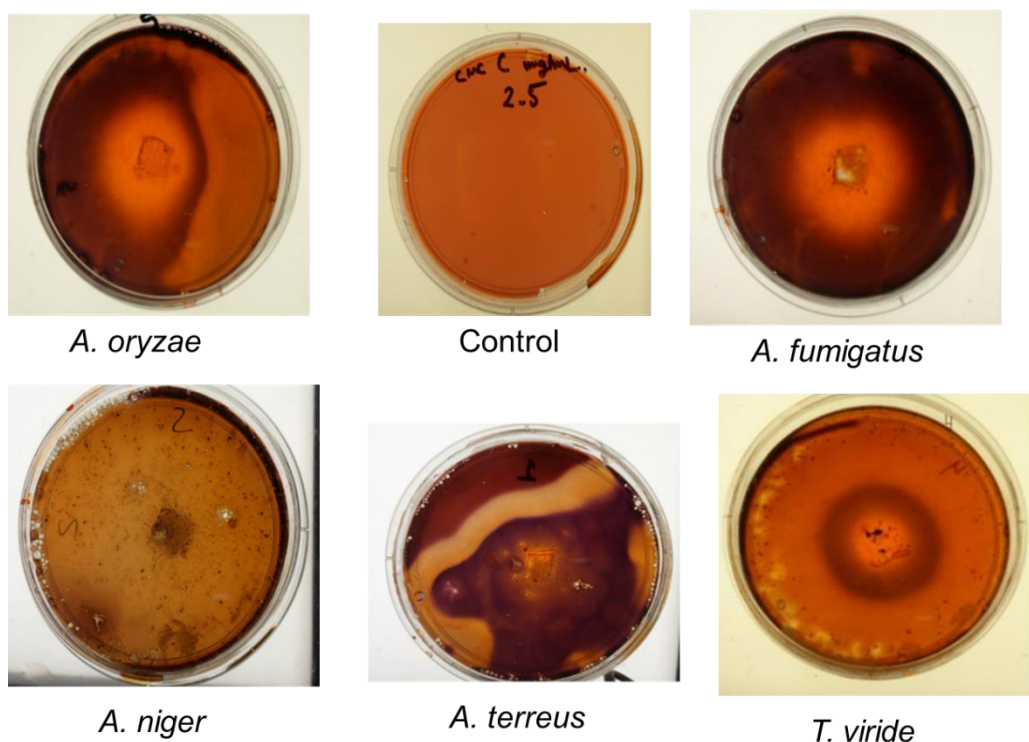


Figura 7 Evaluación cualitativa de la producción de celulasas por diversos hongos en placas de CMC-agar, reveladas con rojo congo al 2.5 %

Las zonas de decoloración indican que la CMC fue degradada por las enzimas celulíticas (Piontek y col.,1998; Ten y col., 2004) mientras que la zona oscura se interpretó como micelio creciendo densamente al cual se encuentra

asociada la β -glucosidasa (Pointing, 1999). De acuerdo a este experimento *A. niger*, *A. terreus* y *A. oryzae* son las cepas que produjeron mayor cantidad de celulasas secretadas ya que en el primer caso, toda la caja disminuyó su color y en *A. terreus* se detecta una amplia franja sin color. Para las otras tres cepas es difícil establecer cuál de ellas secretó mayor actividad, pues en todos los casos se detectó un círculo central con escasa decoloración. Tomando en cuenta que la zona oscura representa el micelio creciendo densamente al cual está asociada la β -glucanasa, *A. fumigatus* fue la cepa con mayor crecimiento y producción de β -glucanasas, pues la mayor parte de la caja presentó zonas oscuras, seguido de *A. terreus* y *A. oryzae*. Mientras que la de *A. niger* y la de *T. viride* constituyen las cepas con menor capacidad de crecimiento en este sustrato ya que las zonas oscuras que presenta son pequeñas. Los resultados anteriores se indican como los hongos aquí estudiados, sintetizaron celulasas especialmente del tipo de las endo β -glucanasas. Los resultados anteriores, están de acuerdo con resultados previos que demuestran que el género *Aspergillus* spp. es un buen productor de enzimas celulíticas (Hoshino y col.,1997). El género *Trichoderma* ha sido más utilizado para la producción de enzimas celulíticas, las cepas de este género pueden producir altas actividades endo y exoglucanasas, pero no son buenas productoras de β -

glucosidasas; pero sin embargo, en las condiciones aquí utilizadas el crecimiento de esta cepa fue limitado y por tanto su producción enzimática.

Teniendo en cuenta que la CMC es una molécula modelo de celulosa amorfa, los resultados anteriores sugieren que las cepas usadas poseen el potencial celulítico para degradar celulosa amorfa, por lo que el siguiente paso fue observar si estos hongos también pueden degradar celulosa cristalina, produciendo exoglucanasas. Para esto se utilizó el sistema de evaluación de celulasas en placa, utilizando avicel como sustrato cristalino. Previo a su utilización se cuantificó la cristalinidad del avicel (Fig. 8) que fue de 67.7 %.

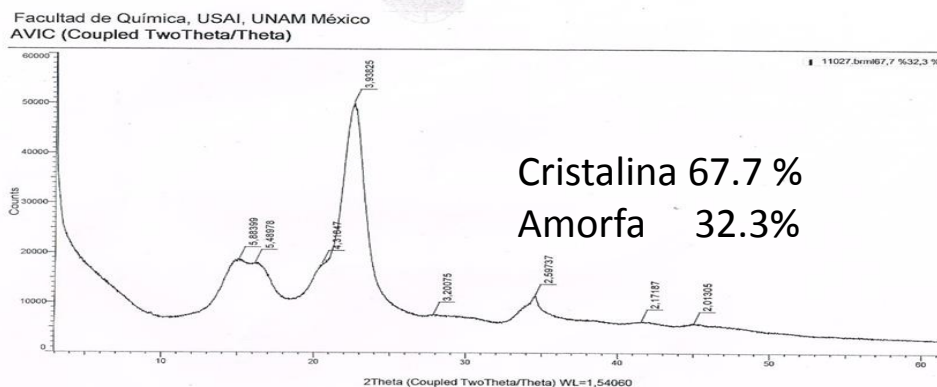


Figura 8. Espectro de difracción de rayos X de avicel.

A continuación, se muestran los resultados del crecimiento de los hongos en celulosa cristalina (Fig. 9). Debido a que en el ensayo en placa, para detectar la actividad celulítica, el crecimiento fúngico se observa como zonas oscuras (Pointing, 1999), el crecimiento de las cepas de *Aspergillus* en avicel fue

menor que el observado en CMC. Probablemente, como consecuencia de una menor disponibilidad de sustrato, ya que la hidrólisis de la celulosa microcristalina, el avicel, es más lenta que la de la celulosa amorfa, la CMC (Lynd, 2004). En esta misma figura, también se observa que la apariencia de la caja control luce diferente en las diversas tomas fotográficas, por lo que la evaluación cualitativa de la actividad celulítica, se realizó comparando las cajas dónde se crecieron los hongos. En las placas donde crecieron las cepas de *A. niger* (Fig. 9A) y de *A. terreus* (Fig. 9B) se observan pequeños listones oscuros y la superficie de la primera es menos opaca que la de la segunda. Los pequeños listones se interpretaron como crecimiento fúngico y la mayor luminosidad como una mayor degradación del avicel. En el caso de *A. niger* también se observan dos pequeños círculos oscuros, similares a los observados en las placas de CMC y que corresponden a crecimiento fúngico.

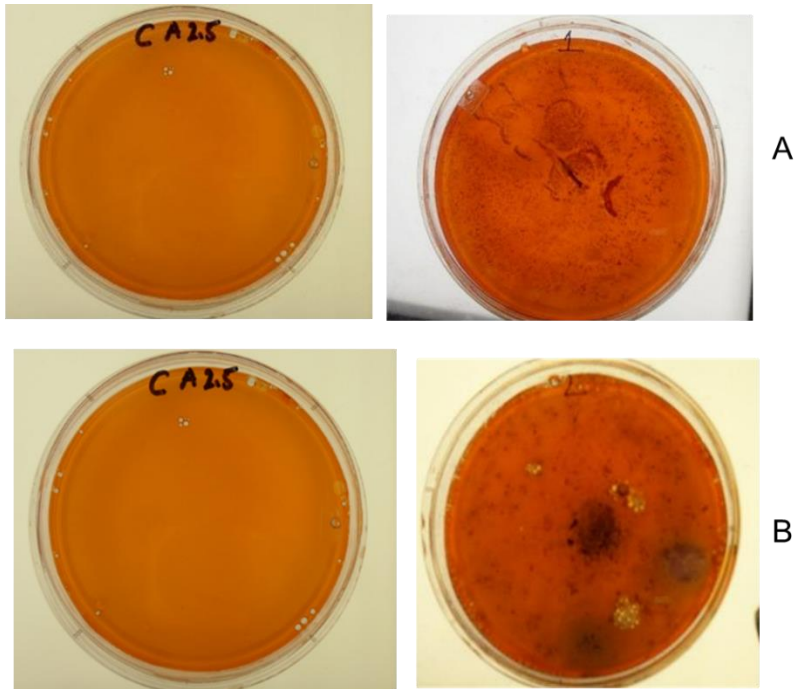


Figura. 9. Crecimiento de las cepas *A. niger* (A) y *A. terreus* (B) en placas de avicel, reveladas con rojo al 2.5% y 5 días de incubación a 30 °C, al lado izquierdo de cada figura están los controles, que no contienen micelio fúngico pero si el colorante de rojo congo al 2.5%.

En el caso de *A. oryzae* (Fig. 10A) en el centro de la placa se observa un círculo central oscuro, y a su alrededor una zona más clara y luminosa. El primero corresponde al inóculo utilizado al inicio del experimento y la segunda indica degradación del avicel por las enzimas secretadas por el hongo. Aparentemente, los productos de la hidrólisis del avicel por *A. oryzae* no son adecuados para sostener el crecimiento. Se observó que la apariencia de la caja inoculada con *A. fumigatus* (Fig. 9B) luce diferente a la de las otras cepas. El color es café y la periferia de la caja luce más oscura y opaca que el resto de la caja. Lo que es muy claro en esta caja son las pequeñas áreas de

total decoloración, las cuales también están presentes en *A. niger*, indicando la hidrólisis total del avicel. El método de la determinación de actividad celulítica en placa, es utilizado frecuentemente para seleccionar rápidamente cepas productoras de celulasas. Sin embargo, los resultados de estas determinaciones no fueron concluyentes para escoger las cepas con mayor producción de exoglucanasa, por lo que se decidió realizar experimentos de fermentación sólida para cuantificar las diversas actividades enzimáticas del complejo celulítico.

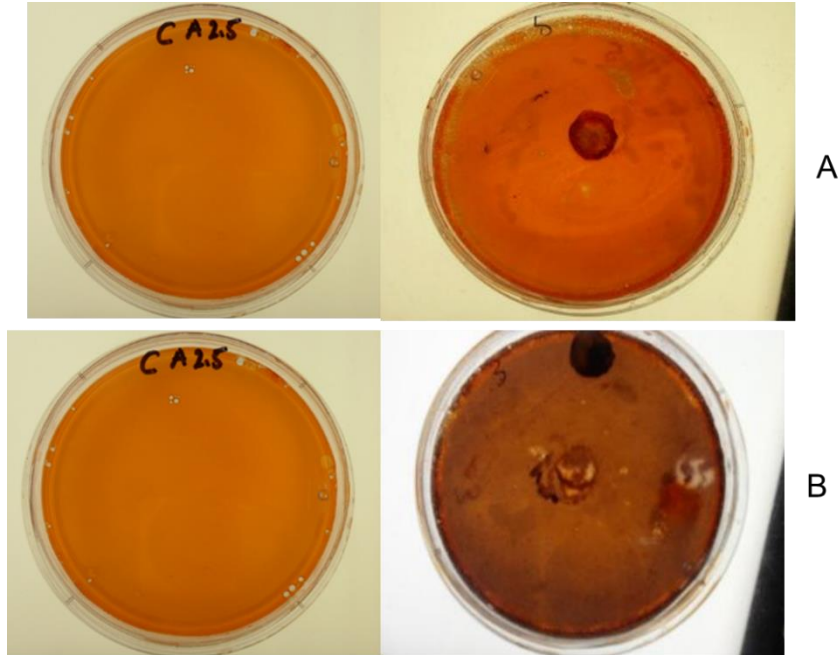


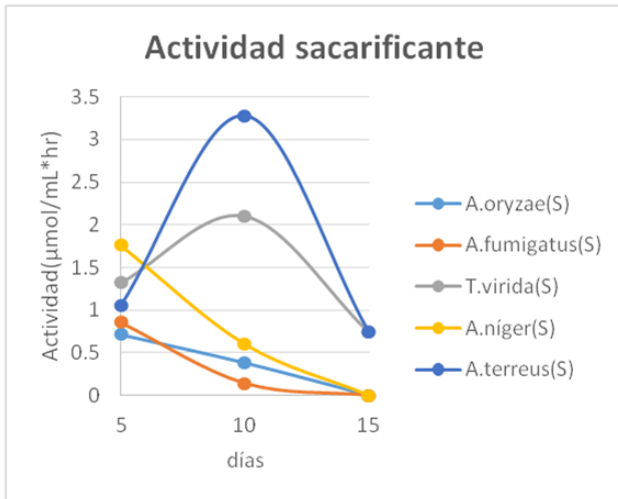
Figura. 10. Crecimiento de las cepas *A. oryzae* (A) y *A. fumigatus* (B) en placas de avicel, reveladas con rojo congo al 2.5% y 5 días de incubación a 30 °C, al lado izquierdo están los controles, que no contienen micelio fúngico pero si el colorante de rojo congo al 2.5 %.

5.2 Cuantificación de la producción de celulasas en fermentación sólida por diversas cepas fúngicas.

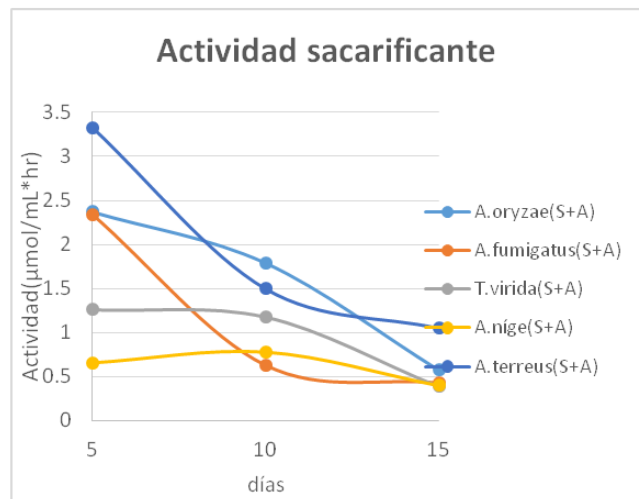
El crecimiento fúngico se realizó al 66 % de humedad y pH 5. Utilizando como sustrato de crecimiento salvado de trigo o bien una mezcla (1:1) de salvado de trigo y avicel. El inóculo en todos los casos fue 1cm² de agar conteniendo micelio fresco.

La actividad de celulasas se realizó como actividad sacarificante, o bien cuantificando la actividad de cada una de las enzimas que constituyen la actividad celulítica. En la primera se utilizó papel filtro y en el segundo con sustratos específicos para cada actividad.

En la figura 11 se muestran los resultados de la actividad sacarificante de cada una de las cepas en los diferentes sustratos utilizados para la producción de celulasas. A los cinco días de fermentación en salvado de trigo o en mezcla de salvado de trigo y avicel todas las cepas produjeron celulasas y con excepción de *T. virida* y *A. terreus*, la producción de celulasas disminuyó a medida que se incrementó el tiempo de fermentación. Este comportamiento fue independiente del tipo de sustrato de crecimiento. En algunas cepas, la presencia de avicel incrementó la producción de celulasas con respecto a la producción observada en salvado de trigo, estas cepas fueron: *A. niger*, *A. fumigatus* y *A. oryzae*. También resalta el comportamiento de la producción de celulasas en las cepas *A. terreus* y *T. viride* crecidas en salvado de trigo ya que el máximo de esta actividad se detecta hasta los 10 días de fermentación.



A

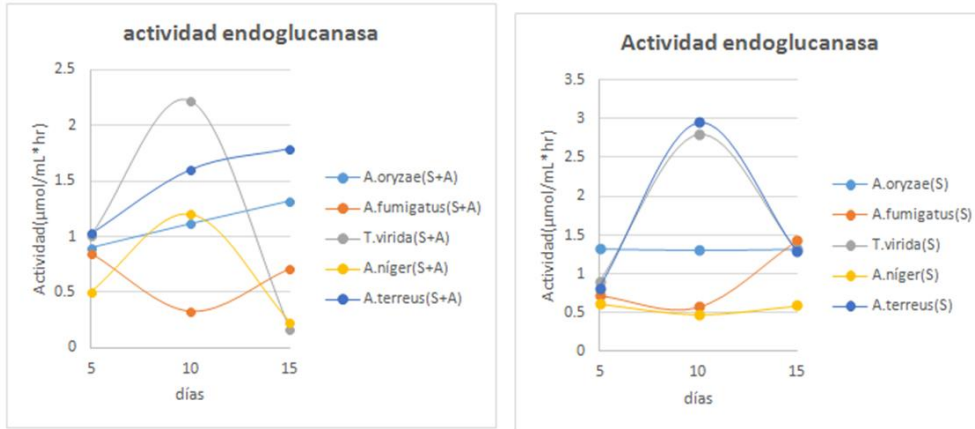


B

Figura. 11. Actividad sacarificante cuantificada en papel filtro en función del tiempo de fermentación, producida por diversas cepas fúngicas, usando como sustratos: A) salvado de trigo B) mezcla 50:50 salvado de trigo y avicel, a 30 °C.

El hecho de que el extracto enzimático sea capaz de hidrolizar papel filtro indica la presencia de las tres actividades que constituyen el complejo celulítico efectivo: endoglucanasa, α -glucosidasa y celobiohidrolasa (Wood y Bhat, 1998), por lo que estas actividades fueron cuantificadas.

La máxima actividad de endoglucanasa (Fig. 12) fue producida por *T. viride* y *A. terreus* 10 días después de iniciada la fermentación; y para *T.viride* la presencia de avicel incrementó la producción de esta actividad endoglucanasa respecto a la producida en solo salvado de trigo. En las otras cepas la producción de endoglucanasa permaneció casi constante a lo largo del período estudiado, con excepción de *A. níger* que a los 15 días presentó un incremento de más de dos veces, cuando se utilizó la mezcla de salvado de trigo y avicel.

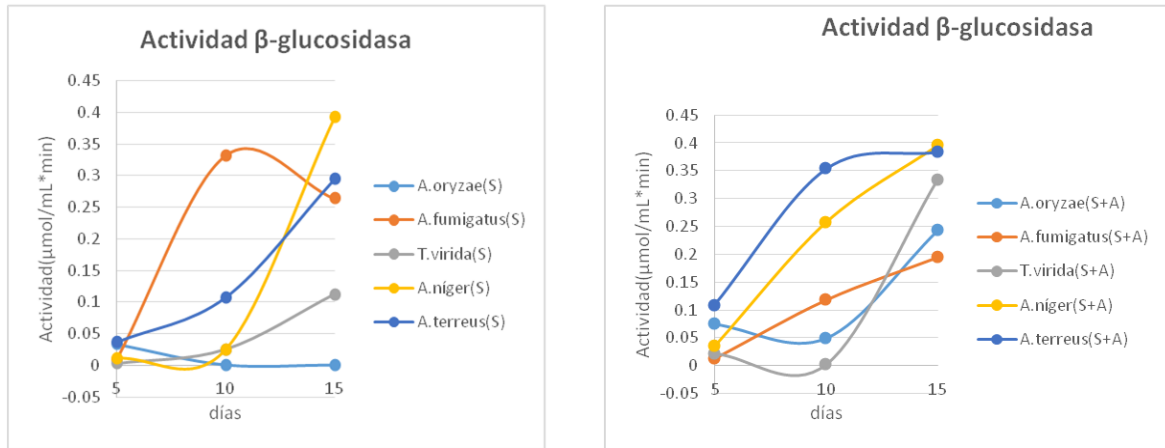


A

B

Figura 12. Actividad endoglucanasa cuantificada en carboximetil celulosa en función del tiempo de fermentación, producida por diversas cepas fúngicas en función del tiempo de fermentación, usando como sustratos: A) mezcla 50:50 salvado de trigo y avicel y B) salvado de trigo a 30 °C.

En la Fig.13 se observan las actividades β -glucosidasa, las cuales fueron menores que las producidas para la endoglucanasa y su mayor producción se detectaron hasta los 15 días de fermentación. Los mejores productores de esta actividad fueron *A. niger* y *A. terreus*. El efecto del avicel no fue significativo para la mayoría de las especies, excepto para las especies *A. fumigatus* y *A. terreus*, en las que se observó una disminución a la tercera parte de la actividad inicial para *A. fumigatus* y un aumento al triple para *A. terreus*.



A **B**
 Figura 13. Actividad β-glucosidasa, cuantificada en p-nitrofenil-β-D-glucósido, producida por diversas cepas fúngicas en función del tiempo de fermentación, usando como sustratos: A) salvado de trigo B) mezcla 50:50 salvado de trigo y avicel, a 30 °C.

Las mejores cepas productoras de celobiohidrolasa (Fig.14) fueron *A. fumigatus* y *A. terreus*. Ambas presentaron la mayor producción a los 10 días de incubación, pero para la primera el mejor medio de producción fue el salvado de trigo, mientras que para la segunda fue la mezcla de salvado de trigo con avicel. En esta figura llama la atención que la detección de esta actividad se produjo a posteriori de la endoglucanasa y la α-glucosidasa.

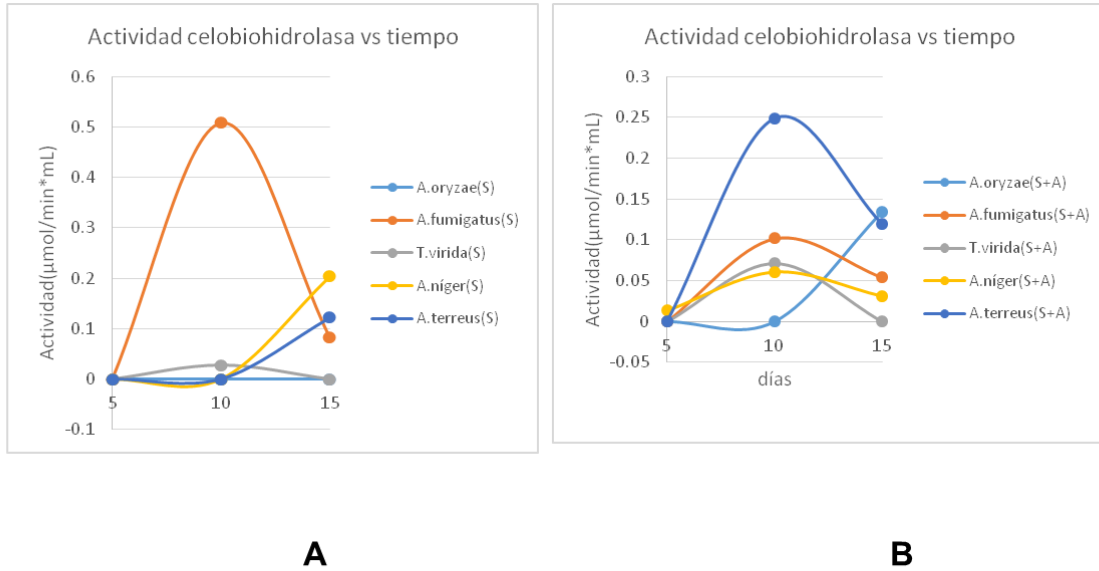


Figura 14. Actividad celobiohidrolasa, cuantificada en p-nitrofenil- β -D-celobiósido y producida por diversas cepas fúngicas en función del tiempo de fermentación, usando como sustratos: A) salvado de trigo B) mezcla 50:50 salvado de trigo y avicel, a 30 °C.

5.3 Elección de las cepas productoras de exoglucanasas.

Como se puede observar en la figura 14 la fuente de carbono cristalina avicel es capaz de inducir la enzima β -celobiohidrolasa que es la que libera el p-nitrofenol del paranitrofenil- β -D celobiósido (Gilkes y col., 1992). Con excepción de *A. oryzae*, a los 10 días de crecimiento se puede observar la inducción de celobiohidrolasas por avicel, siendo mayor para *A. terreus*. Sin embargo, la máxima actividad detectada para *A. terreus* en este sustrato fue dos veces menor que la cuantificada para *A. fumigatus* en salvado de trigo. Mientras que para *A. niger* en salvado de trigo a los 15 días de crecimiento produjo casi la misma actividad que *A. terreus* en salvado de trigo más avicel,

por lo anterior se escogieron las cepas de *A.níger* y *A.fumigatus* con salvado de trigo como sustrato.

5.4 Efecto de la glucosa, del tiempo de fermentación, cantidad de sustrato y de inóculo en la producción de celobiohidrolasa por las cepas *A. níger* y *A. fumigatus*.

La glucosa desempeña un papel dual y antagónico en los medios de cultivo en que se crecen hongos productores de celulasas; puede actuar como represor de la síntesis de estas hidrolasas (Beguin, 1990; Fowler, 1993) pero también es requerida para la producción de biomasa. En base a lo anterior, se realizaron experimentos para estudiar el efecto de la glucosa en los medios de fermentación en la producción de celobiohidrolasa. Para lo cual se cuantificó la producción de celobiohidrolasa en presencia y ausencia de glucosa en el medio de fermentación en fase sólida. En la tabla 2 se puede observar que en ausencia de glucosa los hongos, independientemente de la especie, no crecen ni producen celobiohidrolasa. También se observa que la glucosa es necesaria para el crecimiento de los hongos y para la producción de la celobiohidrolasa. La velocidad de crecimiento para *A. fumigatus* es mayor a los 5 días, pero a los ocho días este mismo parámetro es mayor para *A. níger* (1.5 veces) que para *A. fumigatus*. Así mismo, la producción de celobiohidrolasa a los ocho días de fermentación es mayor para *A. níger* (2 veces) que para *A. fumigatus*.

Estos resultados indican que en estas especies de hongos, la glucosa no sólo acelera el crecimiento si no también incrementa la actividad celobiohidrolítica. Tomando en cuenta los resultados anteriores se utilizará glucosa en los medios de fermentación.

Tabla 2. Efecto de la glucosa en actividad celobiohidrolítica y el crecimiento fúngico.

Días de fermentación	Cepa	medio	inóculo	Proteína total (mg)	U/mL)
5	<i>A.fumigatus</i>	glucosa	1cm ²	104.515	0
5	<i>A.fumigatus</i>	no glucosa	1cm ²	0	0
5	<i>A.níger</i>	glucosa	1cm ²	0	0
5	<i>A.níger</i>	no glucosa	1cm ²	0	0
8	<i>A.fumigatus</i>	glucosa	1cm ²	207.271	0.0511
8	<i>A.fumigatus</i>	no glucosa	1cm ²	0	0
8	<i>A.níger</i>	glucosa	1cm ²	311.785	0.105
8	<i>A.níger</i>	no glucosa	1cm ²	0	0

La cantidad de sustrato como fuente de carbono y el tiempo de producción, fueron optimizados ya que estos dos parámetros también influyen en la producción de las enzimas (Ramos y col., 1993).

Para determinar el tiempo de fermentación requerido para la mayor producción de celobiohidrolasa, se realizó una cinética de producción de celobiohidrolasa para ambas especies. Los resultados se muestran en la figura 15. Aparentemente la producción de celobiohidrolasa es cíclica. Para *A. níger* hay un pico de máxima actividad a los ocho días, mientras que para *A.*

fumigatus la máxima actividad se alcanzó a los 10 días. En ambos casos, después de la máxima producción hay una abrupta caída de actividad, para después incrementarse. En el caso de *A. niger* esta recuperación de actividad fue el doble de la observada a los ocho días. En cambio para *A. fumigatus* la actividad recuperada fue de tan solo el 50 % de la actividad observada a los 10 días de fermentación.

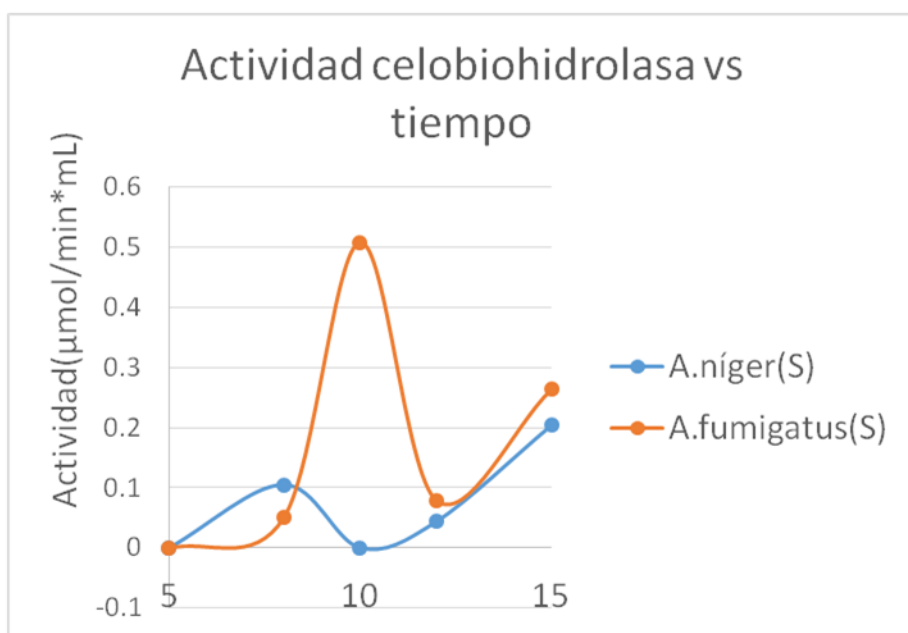


Figura 15. Cinética de producción de celobiohidrolasa de las especies *A.Niger* y *A.fumigatus* crecidas en salvado de trigo a 30 °C.

Los resultados de otros autores muestran que una alta concentración de sustrato, ocasiona un bajo rendimiento enzimático por efecto de inhibición por producto (Ramos y col., 1993; Sherief, 2010). Por lo que se realizaron experimentos para definir la cantidad del sustrato a utilizar. Se usaron 10^7 esporas por experimento y con diferentes cantidades de sustrato en la fermentación: 5, 6, 7, 8 g., en cada caso el porcentaje de humedad fue de 66 % y pH 5. Las enzimas se extrajeron como ya se describió, pero en este caso se adicionó al amortiguador de extracción PMSF 1mM para impedir la acción de proteasas de serina. En la figura 16 se observa que la actividad de celobiohidrolasa es mayor cuando se utilizan 5 g de salvado, que cuando se utiliza mayor cantidad, aún cuando el crecimiento fúngico sea mayor al

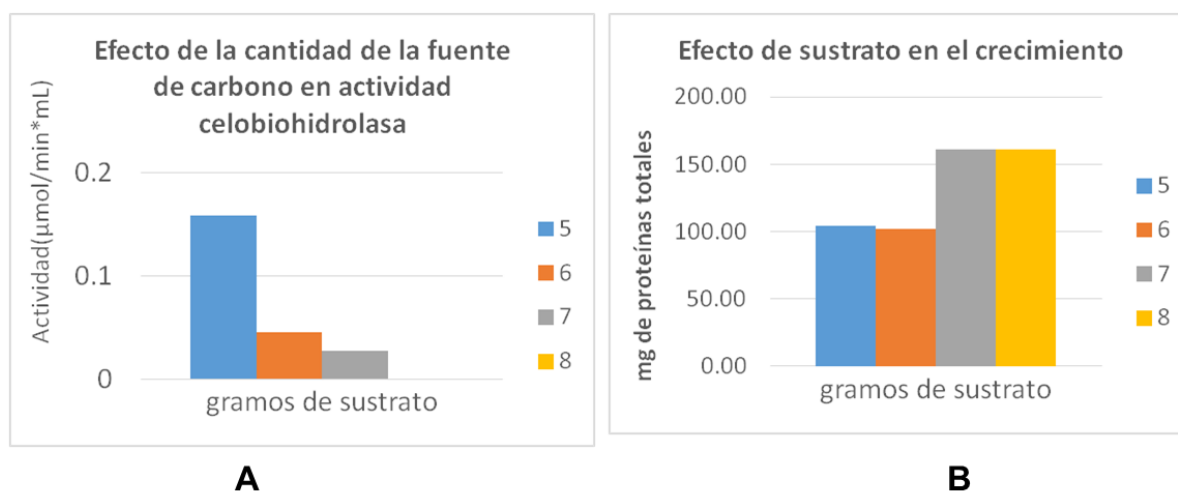
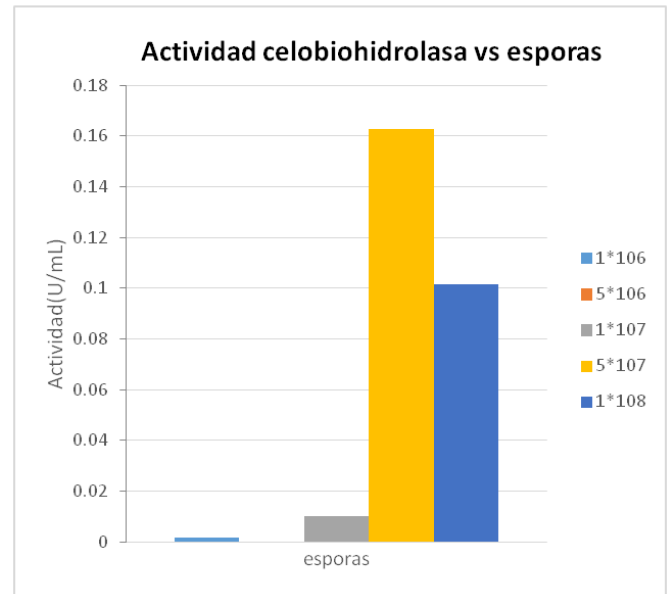
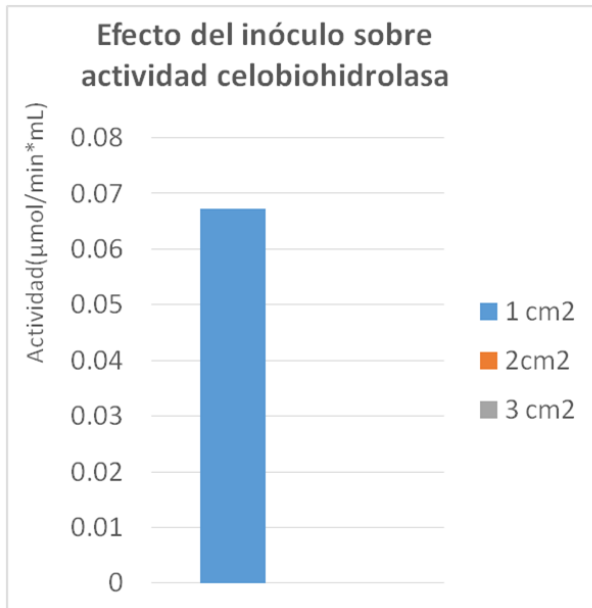


Figura 16. Efecto de A) la cantidad de sustrato en la producción de celobiohidrolasa y en B) el crecimiento de la cepa *A. niger*, se utilizaron 10^7 esporas para el inóculo y se fermentó a 30 °C.

utilizar 7 y 8 g de sustrato.

De acuerdo a las figuras anteriores se observa que la máxima producción enzimática se obtuvo utilizando 5 g. de sustrato para la especie *A.níger*.

Otro parámetro que debe optimizarse es la cantidad de inóculo. Con la finalidad de lograr un balance entre la proliferación fúngica y la producción de enzima, la cantidad de inóculo también debe optimizarse (Ghanem y col., 2000; Ramachandran y col., 2004). Para optimizar la cantidad de inóculo se realizaron experimentos con 5 g. de sustrato, 66 % de humedad relativa y pH 5 con diversas cantidades de esporas o con diversas cantidades de agar tomado de cajas Petri con cinco días de crecimiento del hongo. En ambos casos la fermentación se realizó por siete días.



A

B

Figura 17. Efecto del inóculo en la actividad celobiohidrolasa producida usando A) inóculo de área definida o B) inóculo con esporas por la especie *A. niger* a los 7 días de producción a 30 °C.

Se encontró que la máxima producción se obtenía inoculando con $5 \cdot 10^7$ esporas, por lo que se escogió esta cantidad de esporas para inocular 5 gramos de sustrato, así mismo se decidió utilizar glucosa al 1 % en los medios de fermentación y un tiempo de fermentación de 8 y 10 días para *A.niger* y *A.fumigatus* respectivamente, la cantidad de sustrato e inóculo óptimas para *A.niger* también se utilizaron para *A.fumigatus*. Posteriormente, se procedió a optimizar algunas otras variables como son humedad relativa, pH y tiempo de fermentación utilizando el método de Box Wilson (Davies, 1956).

5.5 Optimización de la producción de celobiohidrolasas de las especies

***A.níger* y *A.fumigatus* utilizando el método de Box Wilson.**

El método de Box Wilson es una modificación del diseño factorial 2^n , se utiliza cuando se desea optimizar un medio de cultivo, o las condiciones para producir un metabolito. En este método se estudian X número de variables a dos niveles, un nivel inferior y un nivel superior. Los resultados del diseño factorial, se utilizan para encontrar los componentes o condiciones que más afectan los resultados y así proponer una nueva serie de experimentos en donde, algunos componentes se incrementan y otros se disminuyen hasta llegar al nivel óptimo de cada componente. En este caso se utilizaron como variables el pH, el tiempo de producción y la humedad relativa. En la tabla 3 se muestra el diseño de las matrices para realizar la optimización de estas variables para cada especie estudiada.

Tabla 3. Diseños de la matriz para la cepas *A.níger* y *A.fumigatus*

Cepa	Variables	Nivel basal	Nivel mínimo	Nivel máximo	% variación	U. de variación
<i>A. níger</i>	A (pH)	5	4	6	16	1
	B (% humedad)	70	55	85	21	15
	C (t en h)	192	168	216	20	24
<i>A. fumigatus</i>	A (pH)	5	4	6	16	1
	B (% hum)	70	55	85	21	15
	C (t en h)	240	216	264	20	24

Como nivel basal para el pH se escogió 5, como % de humedad 70 % y como tiempo de producción, expresado en horas, 192 horas (8 días) para *A. níger* y 240 horas (10 días) para *A. fumigatus*. En base a estos valores se elaboró una matriz de los experimentos a realizar (Tabla 4).

Tabla 4. Matriz de los experimentos a realizar.

ACTIVIDAD	($\mu\text{mol}/\text{min}*\text{mL}$)	($\mu\text{mol}/\text{min}*\text{mL}$)	($\mu\text{mol}/\text{min}*\text{mL}$)
Tratamientos	A	B	C
1	–	–	–
2	†	–	†
3	–	–	†
4	–	†	†
5	–	†	–
6	†	†	–
7	–	†	†
8	†	†	†
9	†	–	–

En la tabla 4 las casillas con el signo negativo representan el nivel inferior, las casillas con el signo positivo representan el nivel superior al nivel basal.

Se sembraron $5 \cdot 10^7$ esporas en matraces que contenían 5 g. de salvado de trigo, que fueron las mejores condiciones obtenidas en los experimentos de optimización de estos parámetros y los matraces se incubaron a una temperatura de 30°C en SSF.

Tabla 5A. Resultados de matriz para la especie *A.níger*

Tratamientos	Actividad($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mL}$)	Actividad0($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mL}$)	Actividad($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mL}$)
1	0.32	0.10	0.15
2	0	0.02	0.16
3	0.06	0.2	0.09
4	0.05	0.02	0.12
5	0.06	0	0.11
6	0	0.17	0.25
7	0	0.14	0.02
8	0	0.02	0.15
9	0.08	0.07	0.30

Tabla 5B Resultados de matriz para la especie *A.fumigatus*.

Tratamientos	Actividad($\mu\text{mol}/\text{min}*\text{mL}$)	Actividad($\mu\text{mol}/\text{min}*\text{mL}$)	Actividad($\mu\text{mol}/\text{min}*\text{mL}$)
1	0.11	0.11	0.11
2	0.10	0.03	0.06
3	0.20	0.04	0.06
4	0.07	0.20	0.34
5	0	0.49	0.42
6	0	0.30	0.36
7	0.02	0.20	0.03
8	0.09	0.20	0.06
9	0.10	0.06	0.23

En las Tablas 5A y 5B se observa que no hubo reproducibilidad entre la actividad cuantificada en los triplicados, lo que sugiere que, la forma de extraer la enzima o la preparación de las unidades experimentales no fue reproducible. Sin embargo estos datos se utilizaron para plantear las ecuaciones que muestran la dependencia de la producción de celobiohidrolasa respecto de las tres variables estudiadas.

$$\text{a) } Y=0.1055-0.004974 \mathbf{A} + 0.202\mathbf{B} + 0.078\mathbf{C}$$

$$\text{b) } Y=0.187 +0.0369\mathbf{A} -1.589\mathbf{B}+ 1.079\mathbf{C}$$

Las ecuaciones anteriores muestran la dependencia de la actividad celobiohidrolasa en función de las variables estudiadas para cada cepa: a) *A.níger* y b) *A.fumigatus*. La variable independiente con el coeficiente de variación mayor en términos absolutos, indica que esa es la variable que afecta más la variable independiente que en este caso es la actividad enzimática. Dado que el coeficiente de variación mayor para ambas cepas fue el de la variable B, este se utilizó para calcular las unidades de variación y se plantearon nuevos experimentos (Tabla 6).

Tabla 6. Condiciones experimentales finales propuestos para a) *A. níger* y

b) *A. fumigatus*.

a)

	A	B	C
Basal	5	70	192
unidades de variación	-0.02	1	0.39
1	4.98	71	192.39
2	4.95	72	192.77
3	4.93	73	193.16
4	4.90	74	193.54

b)

	A	B	C
Basal	5	70	240
unidades de variación	0.02	-1	0.68
1	5.02	69	240.68
2	5.04	68	241.36
3	5.07	67	242.04
4	5.1	66	242.70

En las tablas anteriores se pueden observar los experimentos planteados una vez hecho los cálculos de optimización. En base a lo anterior, de los 4 experimentos planteados sólo se realizaron los basales y el tratamiento 4 para ambas cepas. En esta ocasión se hizo por duplicado. Los resultados se muestran en la tabla 7. Se observa que la variación del % de humedad para la cepa *A. niger* no tiene un efecto considerable en la actividad celobiohidrolasa por lo que su producción se podría realizar a una humedad relativa del 70-74%.

Tabla 7. Resultados finales de actividad obtenidos con la optimización de box Wilson. AN (*A.níger*) y AF (*A.fumigatus*).

Cepa	% humedad	Actividad($\mu\text{mol}/\text{min}*\text{mL}$)
AN	70	0.29
AN	74	0.3
AF	70	0.76
AF	66	0.66

El efecto de la variación en el porcentaje de humedad del 70 al 66% para *A. fumigatus* si tuvo un efecto significativo, ya que la actividad disminuyó en 0.1 U. Estos valores son mayores que los obtenidos cuando se realizó la primera exploración de actividad (Fig.15). En el primer caso se obtuvo un incremento de 3 veces, mientras que en el ultimo el incremento fue de 1.5 veces. Así pues los valores máximos alcanzados de actividad celobiohidrolasa finalmente fueron de **0.3U/mL** para la especie *A.níger* y de **0.76 U/mL** para la especie *A.fumigatus*. Estos valores fueron del mismo orden de la actividad de celobiohidrolasa detectada para la enzima comercial acelerasa 1500 que fue de **0.655 U/ml** actividad menor que la registrada por *A.fumigatus* , pero mayor que la de *A.níger*.

5.6 Degradación de celulosa microcristalina por los extractos obtenidos en las condiciones optimizadas de las especies *A.níger* y *A.fumigatus* y comparación con una enzima comercial.

El avicel es celulosa con un porcentaje de cristalinidad que varía dependiendo de la marca comercial. La cristalinidad del avicel aquí utilizado mostró un porcentaje de cristalinidad del 69 % cuando se determinó por rayos DXRS (fig 8). Utilizando este avicel como sustrato para explorar la capacidad de hidrólisis de celulosa cristalina, se encontró que la actividad de avicelasa fue dos veces mayor para el extracto obtenido de *A. níger* que para *A. fumigatus*.

Tabla 8. Actividad de celulasas en extractos enzimáticos producidos en condiciones optimizadas.

Especie	Actividad enzimática (UI/ml)			
	Avicelasa ¹	Sacarificante ²	Endocelulasa ³	β -glucosidasa ⁴
<i>A. fumigatus</i>	0.071377778	0.03776667	0.053777778	0.382774879
<i>A. niger</i>	0.142755556	0.05194444	0.046444444	0.269113043

Lo mismo pudo observarse cuando se utilizó papel filtro como sustrato, el cual también contiene un porcentaje de celulosa cristalina. Sin embargo, la actividad de endocelulasa, y de β -glucosidasa fue mayor en *A. fumigatus* que en *A. níger*.

Los resultados anteriores podrían deberse a que la estabilidad de las enzimas a 50 °C, temperatura al que se realiza la actividad de las enzimas es diferente, o a que la procesividad de las exoglucanasas de *A.níger* es mayor que las exoglucanasas de *A.fumigatus*. Para explorar la primera posibilidad, se determinó la estabilidad de la celobiohidrolasa para ambas especies en los 30 min que dura el bioensayo.

Los resultados se muestran en la figura 18. La actividad de avicelasa para *A. fumigatus* se mantiene constante entre 30 y 40 °C pero, disminuyó significativamente al alcanzar los 50 °C. En cambio para *A. níger* la actividad de avicelasa se incrementó a medida que se incrementó la temperatura. Estos resultados indican que la diferencia en la actividad de avicelasa observada entre *A. níger* y *A. fumigatus*, se deben a que la estabilidad del complejo celulítico de *A. níger* a 50 °C es mayor, que la del complejo celulítico de *A. fumigatus*.

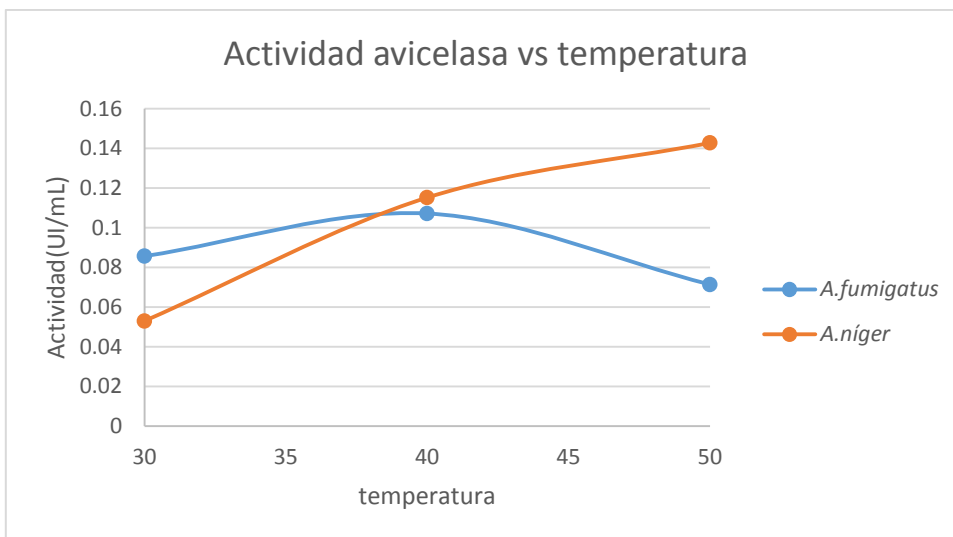


Figura 18. Efecto de la temperatura en el ensayo de actividad avicelasa de los extractos de *A.niger* y *A.fumigatus*.

Se utilizó la enzima comercial acelerasa 1500, para cuantificar la actividad avicelasa, utilizando el mismo volumen (10 μ L) que el del extracto enzimático para determinar actividad en p-nitrofenil-celobiósido.

6. DISCUSIÓN

En la actualidad hay gran interés en utilizar la glucosa producida por hidrólisis enzimática de la celulosa presente en materiales lignocelulósicos, convirtiendo así materiales de bajo costo en productos de mayor valor. Para acceder a la celulosa de los residuos lignocelulósicos, es necesario utilizar métodos que involucran altas temperaturas entre 180-200°C. En este caso se obtiene celulosa amorfa que es hidrolizada por las preparaciones de celulasas comerciales. Sin embargo, la celulosa aislada de materiales lignocelulósicos utilizando un pre-tratamiento catalizado y de baja rigidez mantiene su cristalinidad limitando su hidrólisis con enzimas comerciales, debido a la baja actividad de la exoglucanasa \square -1,4-glucancelobiohidrolasa, enzima responsable de hidrolizar a la celulosa cristalina. Con la finalidad de contar con una preparación celulítica rica en exoglucanasa, en este trabajo se seleccionaron las cepas de hongos del género *Aspergillus*, que en fermentación sólida y utilizando salvado de trigo como sustrato, produjeran la mayor actividad de exoglucanasa.

Debido a que en la hidrólisis de celulosa intervienen cuando menos tres enzimas celulíticas (endo-glucanasa, exo-glucanasa y \square -glucosidasa) y además se ha reportado que generalmente se producen en bloque, aunque en distinta proporción (Ilmén ,1997) primero se caracterizaron las cepas fúngicas

estudiadas respecto a su capacidad para producir y secretar endoglucanasa utilizando el ensayo de “actividad de endoglucanasa en placa”. Los resultados de estos experimentos no fueron útiles para la selección deseada, ya que el área color amarillo- opaco indicando la degradación de la CMC o del avicel no pudo ser detectado (Pointing, 1999), aunque se pudieron observar zonas más claras, que sugieren hidrólisis del sustrato. Lo anterior probablemente se debió a que los hongos aquí estudiados, producen hifas altamente coloreadas y el crecimiento fúngico se extendió por toda la caja. Esto último pudo deberse a que el inóculo contenía PDA y la caja de Petri con CMC o avicel contenía sales de nitrógeno, glucosa y otras sales, lo cual proporcionó suficientes nutrientes a las cepas para crecer, y por tanto producir poca hidrolasa ya que es bien sabido que la glucosa inhibe la producción de celulasas (Beguin, 1990; Fowler, 1993).

El método que resultó eficaz para la selección de las mejores cepas productoras de celobiohidrolasas, fue la cuantificación de dicha enzima producida por cada una de las cepas crecidas en medio sólido. Se escogió la técnica de fermentación en sustrato sólido (SSF) debido a que presenta varias ventajas sobre la producción de celulasas por la técnica de fermentación sumergida (SmF) (Shingania, 2010). El proceso de SSF se realiza en la ausencia de agua libre (actividad acuosa < 1) por lo que el crecimiento de

bacterias y levaduras se minimiza. La cantidad de energía utilizada en el proceso, es menor en SSF que en SmF, ya que en este último se requiere de agitación y en el primero no. El costo de la materia prima es mucho menor en SSF, ya que se utilizan residuos lignocelulósicos y en SmF medios líquidos de composición definida (Pandey y col., 2000). Además el costo de las celulasas producidas por SmF es de 20 US dls/kg, mientras que por SSF es de 0.20 US dls/kg. (Tengerdy, 1996), manteniéndose esta tendencia para el año 2003 (Tangerdy, 2003).

Entre los factores que son importantes para el crecimiento microbiano y producción de enzimas utilizando un substrato particular son: el tamaño de la partícula (espacio entre partículas, y área de superficie), el pretratamiento del sustrato, la temperatura de crecimiento, el tamaño y tipo de inóculo, el tiempo de crecimiento, el pH, y el contenido de agua en el sustrato (Kumar y Satyanarayama, 2004; Domínguez, 2000). Dado que no se exploró la posibilidad de que las cepas fueran termotolerantes, para su crecimiento se escogió, de acuerdo a la literatura, la temperatura promedio en que todas ellas podían crecer (Pirt, 1975). Así mismo, el tamaño de la partícula fue la del salvado de trigo no tostado comercial. En cuanto al tipo y cantidad de inóculo los resultados indicaron que era mejor utilizar esporas, que micelio en fase sólida y que la cantidad de esporas por gramo de sustrato era de 1×10^7 . Este

resultado está de acuerdo con lo reportado en la literatura, dónde se establece que existe un balance entre la producción de biomasa y la producción de enzima. Es decir altas concentraciones de inoculo aumentan la proliferación de la biomasa fúngica, pero la producción de enzimas decrece debido a una menor cantidad de nutrientes por célula (Ramachandran y col., 2004). También se demostró que la máxima cantidad de sustrato por unidad experimental debía ser de 5 g. Los parámetros de pH, tiempo de crecimiento y el % de humedad se optimizaron utilizando un método estadístico. Si bien no hubo reproducibilidad en los experimentos de optimización para la producción de celobiohidrolasa, si se lograron definir condiciones en las cuales se incrementó la actividad de dicha enzima respecto a la actividad inicial, tanto para *A. niger* como para *A. fumigatus*. La actividad de celobiohidrolasa fue mayor que las reportadas en la literatura y similar a la determinada en una celulasa comercial y aunque no se determinó la actividad específica, se puede inferir que la relación de exoglucanasas es mayor en el extracto, ya que la enzima comercial tenía una actividad de 4000U/ ml totales(sacarificantes) y se detectó una cantidad similar a la del extracto enzimático cuando se empleó el mismo volumen.

La actividad de exoglucanasa para ambas cepas es menor cuando se cuantifica con avicel como sustrato, que cuando se utilizó el celobiósido. Sin embargo,

esta disminución fue menor en *A. niger* (-51 %) que en *A. fumigatus* (-91 %). Una probable explicación para este tipo de resultado es proponer que la primera cepa produce mayor cantidad de celobiohidrolasa II que la segunda; ya que la celobiohidrolasa II presenta mayor velocidad de hidrólisis ante la celulosa cristalina, que la celobiohidrolasa I cuando la actividad se cuantifica sobre avicel (Medve, 1994), aunque no se ha reportado la estabilidad térmica de cada una de estas hidrolasas.

7. CONCLUSIONES

1. De las cepas estudiadas las mejores productoras de celobiohidrolasa fueron *A. niger* y *A. fumigatus*.
2. Las condiciones óptimas para la producción de celobiohidrolasa por la especie de *A. niger* fueron: pH del medio 5.0, un tiempo de fermentación de 192 h., y de un 70 al 74 % de contenido de agua en el medio sólido. Mientras que para *A. fumigatus* estos mismos parámetros fueron pH 5.0, 240 h, y 70 % respectivamente a 30 °C.
3. La actividad de celobiohidrolasa fue **0.3U/mL** para la especie *A. niger* y de **0.76 U/mL** para la especie *A. fumigatus* en condiciones de producción optimizadas.
4. *A. fumigatus* presentó una actividad de exoglucanasa mayor que la enzima comercial acelerasa 1500 de **0.76 U/mL** y **0.655 U/mL** respectivamente.
5. La actividad de exoglucanasa cuantificada en avicel microcristalino del extracto optimizado de *A. niger*, fue mayor que la de *A. fumigatus* de **0.147 U/ml** y **0.071U/ml** respectivamente.

8. REFERENCIAS

Atalla RH. 1983. The structure of cellulose: Recent developments. New York: Academic Press.

Beguin P.1990. Molecular biology of cellulose degradation. Annual Review of Microbiology. 44, 219–248.

Blackwell J. 1982. The macromolecular organization of cellulose and chitin. New York: Plenum.

Bobleter O.1994. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. Prog. Polym. Sci. 19, 797–841.

Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, and Henrissat, B. 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for Glycogenomics. Nucleic acids research. 37, 233–238.

Davies OL. 1956. The design and analysis of industrial experiments. New York: Hafner Publishing.

Dhouib A., Hamza M., Zouari H., Mechichi T., Hmidi R., Labat M., Martinez MJ and Sayadi . 2005. Screening for lignolytic enzyme production by diverse fungi from Tunisia. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 21, 1415-1423.

Ding M., Wang J., Xu GJ and Zhao F.2006. A novel thermoacidophilic endoglucanase, Ba-EGA, from a new cellulose degrading bacterium, Bacillus sp. AC-1. Applied. Microbiology Biotechnology. 70, 430-436.

Dominguez FC , Queiroz JA. , Cabrad JM and Fonseca, LP. 2000. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* rut C-30. Enzyme Microbiology Tecnology. 26, 394-401.

Esterbauer H., Steiner W., Labudova I., Hermann A., and Hayn M. 1991. Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. Bioresource Technology. 36, 51–65.

Fengel D. y Wegener G . 1984. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin:Walter de Gruyter.

Florencio C., Couri S., Farinas CS. 2012. Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *Trichoderma* strains. *Enzyme Resources*.

Fowler, T. 1993. Deletion of the *Trichoderma reesei* β -glucosidase gene, *bgII*. In: Esen, A. (Ed.). β -Glucosidase, Biochemistry, and Molecular Biology. pp. 56–65. Washington, DC, USA: American Chemical Society.

Ghaen NB, Yusef HH and Mahrouse HK. 2000. Production of *A.terreus* xylanase in solid state cultures: Application of the Plackertt-Burman experimental design to evaluate the nutritional requirements. *Bioresources. Tecnology*. 73, 113-121.

Gilkes NR, Jervis E., Henrissat B., Tekant B., Miller RC., Warren RAJ , and Kilburn DG. 1992. The adsorption of a bacterial cellulose and its two isolated domains to crystalline cellulose. *Journal Biology Chemistry*. 267, 6743–6749.

Goyal, TK, Ghosh B.,Eveleigh D. 1991.Characteristics of fungal cellulases. *Bioresources.Technology*. 36, 37-50.

Haglund C. 1999. Biodegradation of xenobiotic compounds by the white rot fungus *Trametes trogii*. Master's degree project. Uppsala University School of Engineering.

Hong J., Tamaki H., Akiba S., Yamamoto K., Kumagai H. 2001. Cloning of a gene encoding a highly stable endo- β -1, 4-glucanase from *Aspergillus niger* and its expression in yeast. *Bioscience and Bioengineering*. 92, 434-441.

Hoshino E., Shiroishi M., Amano Y., Nomura M. and Kanda T. 1997. Synergistic actions of exo-type cellulases in the hydrolysis of cellulose with different crystallinities. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 84, 300-306.

Ilmén M., Saloheimo A., Onnela ML, and Penttila ME. 1997. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Applied. Environment. Microbiology*. 63, 1298–1306.

Kamm B., Kamm M.2004. *Applied Microbiology Biotechnology*. 64, 137-145.

- Kaminskyj SGW. 2001. Fundamentals of growth, storage, genetics and microscopy of *Aspergillus nidulans*. *Fungi Genetics News*. 48, 25–31.
- Kim S., Kim CH. 2012. Production of cellulase enzymes during the solid-state fermentation of empty palm fruit bunch fiber. *Bioprocess Biosystems Engineering*. 35. 61–67
- Kuga S. and Brown RM.1991. Physical structure of cellulose microfibrils: Implications for biogenesis. In *Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose*. C.H. Haigler and P.J. Weimer. 5,125-142.
- Kumar P., and Satyanarayana T. 2004. Biotechnological Aspects of Thermophilic Fungal glucoamylases. In: *Emerging trends in mycology, plant pathology and Bagyanarayana, G., B. Bhadraiah and I.K. Kunwar (Eds.)*. pp. 539-563. Hyderabad: B.S. Publications.
- Lynd LR., Ahn HJ , Anderson, G. , Hill PW, Kersey DS, Kersey T. 1991. Thermophilic ethanol production: investigation of ethanol yield and tolerance in continuous culture. *Applied. Biochemistry. Biotechnol.* 28, 549–570.
- Lynd LR, Zang HP. 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non complexed cellulose system. *Biotechnology and Bioengineering*. 88, 797-824.
- Medve, J., Stahlberg, J., Tjerneld, F. 1994. Adsorption and synergism of cellobiohydrolase I and II of *Trichoderma reesei* during hydrolysis of microcrystalline cellulose. *Biotechnol Bioeng*. 44, 1064 – 1073.
- Mester, T. and Field, JM. 1998. Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese. *The Journal of Biological Chemistry*. 273, 15412-15417.
- Miller, GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical. Chemistry*. 31, 426–428.
- Nishiyama Y., Sugiyama, Chanzy JH, and Langan P. 2003. Crystal structure and hydrogen bonding system in cellulose I from Synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *Journal of American Chemistry Society* . 125, 14300-14306.

- Pérez J., Muñoz-Dorado J., de la Rubia T., Martínez, J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose, and lignin: an overview. *International Microbiology*. 5, 53-63.
- Pandey A., Soccol CR, Mitchell D. 2000. New developments in solid state fermentation I Processes and products. *Process Biochemistry*. 35, 1153–1169.
- Parry B., Sterwants JC. 1981. Factors influencing the production of cellulose by *A.fumigatus*. *Journal of General Microbiology*. 125, 33-39.
- Peig N., Gielkens MMC, Veries RP, Visser J., Graaff LH. 1998. The transcriptional activator XlnR Regulates both xylanolytic and endoglucanase gene expression in *Aspergillus niger*. *Applied Environmental Microbiology*. 64, 3615–3619.
- Piontek M., Hagedorn J., Hollenberg CP., Gellissen G., Strasser AW.1998. Two novel gene expression systems based on the yeasts *Schwanniomyces occidentalis* and *Pichia stipitis*. *Applied Microbiol Biotechnol*. 5;331–8.
- Pirt, SJ. 1975. *Principles of Cell Cultivation*. London: Blackwell Scientific.
- Pointing SB. 1999. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Fungal Diversity*. 2, 17-33.
- Rabinovich ML, Melink MS and Bolobova AV. 2002. Microbial cellulases. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 38, 305-321.
- Ramachandran SAK, Patel KM, Nampoothiri F. , Francis V., Nagy G., Szacks and Pandey A.. 2004. Coconut oil cake-a potential raw material for the production of α -amylase. *Bioresources. Technology*. 93, 169-174.
- Ramos, LP, Breuiand JN, Saddler. 1993. The use of enzyme recycling and the influence of sugar accumulation on cellulose hydrolysis by *Trichoderma* cellulases. *Enzyme Microbiology.Tecnology*. 15, 91-125.
- Ramos, LP. 2003. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. *Quimica Nova*. 26, 863–871.
- Richmond, PA. 1991. Occurrence and Functions of Native Cellulose. In *Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose*. pp. 5-23. (Haigler, C.H and Weimer, P.J., eds). New York: Marcel Dekker, Inc.

- Sánchez, C. 2009. Lignocellulosic residues Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*. 27, 185–194.
- Sherief AA, El-Naggar NE, Hamza SS. 2010. Bioprocessing of lignocellulosic biomass for production of renewable bioethanol using thermotolerant *Aspergillus fumigates* under solid state fermentation conditions. *Biotechnology*. 9, 513-522.
- Schwarze, F.W.M.R., J. Engels, and C. Mattheck. 2000. *Fungal Strategies of Wood Decay in Trees*. Springer, New York, NY.
- Singhania RR, Sukumaran RK, Patel AK, Larroche C., Pandey A., 2010. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme Microbiology. Technology*. 46, 54–59.
- Sjostrom, E. 1993. *Wood Chemistry Fundamentals and Applications*. San Diego, USA: Academic Press.
- Sterwart JC. , Parry B. 1981. Factor Influencing the production of cellulose by *Aspergillus fumigatus*. *Journal of General microbiology*. 125, 33-39.
- Suto M., Tomita F. 2001. Induction and Catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi. *Bioscience and Bioengineering*. 92, 305-311.
- Talebnia F., Karakashev D., Agelidaki I. 2010. Production of Bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresources Tecnology*. 101, 4744-4753.
- Ten LN, Im WT, Kim MK, Kang MS, Lee ST. 2004. Development of a plate technique for screening of polysaccharide-degrading microorganisms by using a mixture of insoluble chromogenic substrates. *Microbiology Methods*. 56, 375–82.
- Tengerdy RP. 1996. Cellulase production by solid substrate fermentation. *Journal of Science Index Resources*. 55, 313–316.
- Weimer, P.J., Hackney, JM, French, AD, 1995. Effects of chemical treatments and heating on the crystallinity of celluloses and their implications for evaluating the effect of crystallinity on cellulose biodegradation. *Biotechnol. Bioengineering*. 48, 169–178.

Wood TM and Bhat KM. 1988. Methods for measuring cellulose activities. *Methods in Enzymology*; 87-112.

Zhang Y-HP, Lynd LR. 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnol Bioengineering*. 88(7), 797–824.