



UNIVERSIDAD CENTRAL " MARTA ABREU " DE LAS VILLAS

VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILIS TOGA. 1948

Capacidad celulolítica de hongos existentes en la naturaleza para degradar residuos lignocelulósicos.

TESIS DE DIPLOMA

Autor: Mónica Herrera García

2011



TESIS DE DIPLOMA

Capacidad celulolítica de hongos existentes en la naturaleza para degradar residuos lignocelulósicos.

Autor: Mónica Herrera García

Tutora: Dra. Layanis Mesa Garriga. Centro de Análisis de Procesos. Fac. Qca-Farmacia. UCLV (leyanismg@uclv.edu.cu).

Facultad de Ciencias Agropecuarias.

Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.

2011



Pensamiento.

"Aquí hemos estado hablando de las distintas formas de energía, pero tenemos una valiosísima, de todos los años, el bagazo. Hay que establecer un intenso programa para la industria azucarera en materia de producción de energía con el bagazo".

Fidel Castro Ruz.

Dedicatoria.

A mami y papi, Will y Tamy, Ale y toda mi familia.

Agradecimientos.

A mi mamá por todo lo que me ha enseñado y enseña, por comprenderme, regañarme a veces y adorarme siempre.

A mi papá por enseñarme con rectitud que sin esfuerzo no se llega a ningún lugar.

A mi hermano por su amor infinito, por impulsarme y apoyarme en todo.

A mi hermana por ser como es y estar siempre.

A mi novio Ale por transmitirme tanta paz, enseñarme a ver más allá y a confiar en mí misma, por estar a mi lado.

Al microbio por su café obligatorio en las interminables madrugadas de cálculo, por los buenos momentos, por ser mi amiga.

A Leidy y Yaimara por ser mis amigas desde hace tanto.

A todos mis compañeros de aula y a todos los profesores.

A mi tutora Layanis por sus buenos consejos.

A Ino por malcriarme, a Nersi por su preocupación y a Delvis por los ratos de buen humor.

A los doctores Erenio y María teresa por su invaluable ayuda.

Esta investigación fue parcialmente financiada por la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID), a través del proyecto D/030185/10 "Obtención de bioetanol y coproductos a partir de fuentes alternativas de biomasa" ejecutado entre el Centro de Análisis de Procesos de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas y el departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Universidad de Jaén.

Resumen.

Resumen

El precio de las enzimas comerciales usadas para la sacarificación de materiales lignocelulósicos pretratados representa una parte significativa en el costo total del proceso de bioconversión de la biomasa a etanol. La reducción del costo de producción, desde el desarrollo de microorganismos secretores de celulasas más efectivos y el mejoramiento de las propiedades hidrolíticas de las mezclas de enzimas son de gran importancia. En este trabajo, se inició el estudio con dos hongos, *Trichoderma harzianum* y *Penicillium* sp. J-3, para evaluar sus capacidades celulolíticas utilizando como sustrato celulósico el papel de filtro Whatman 1 y el uso de varios azúcares como inductores. Los mejores resultados de actividad FPasa fueron obtenidos con el *Penicillium* sp. J-3 (0.28 U/mL) en las primeras 24 horas y usando la sacarosa como inductor. Por tal motivo se utilizó el *Penicillium* sp J-3 para la evaluación del bagazo de la caña de azúcar pretratado como sustrato. Se utilizó una estrategia experimental donde se estudiaron varios factores simultáneamente aplicando el diseño factorial saturado de Plackett-Burmann con 12 experimentos. Los valores de FPasa obtenidos el primer día fueron superiores a los obtenidos con papel de filtro. Los factores que resultaron significativos para el primer día de fermentación fueron el pH, el uso de miel final y las concentraciones de inóculo y bagazo. Se detectaron otras actividades enzimáticas como β -glucosidasa y β -Endoglucanasa al 5to día de fermentación. La importancia principal de este estudio radica en que con *Penicillium* sp. J-3 se logra la obtención de crudos con actividad enzimática celulolítica, lo que en el futuro propiciaría la disminución del costo total del proceso de obtención de etanol a partir de residuos lignocelulósicos.

Abstract.

Abstract.

The price of the commercial enzymes used for the saccharification of pretreated lignocelulosic materials represents a significant part in the total cost of the bioconversion process from the biomass to ethanol. The reduction of the cost of production, from the development of secretory microorganisms of more effective cellulases and the improvement of the hydrolytic properties of the mixtures of enzymes is of great importance. In this work, started the study with two funguses, *Trichoderma harzianum* and *Penicillium* sp. J-3, to evaluate their celullolitic capacities by using as cellulosic substrate the Whatman 1 filter paper and the use of several sugars as inductors. The better results of FPasa activity were obtained with *Penicillium* sp. J-3 (0.28 U/mL) in the firsts 24 hours and by using the saccharose as inductor. For such motive used the *Penicillium* sp J-3 for the evaluation of the waste pulp of the pretreated sugar cane as substrate. Used an experimental strategy in which studied to him several factors simultaneously by applying the saturated factorial design of Plackett - Burmann with 12 experiments. The FPasa values obtained the first day were superior to the obtained with filter paper. The factors that resulted significant for the first day of fermentation it went pH, the use of final honey, inoculate and sugar cane bagasse concentrations. Other enzymatic activities were detected as β -Glucosidasa and β -Endoglucanasa to the fifth day of fermentation. The main importance of this study resides in that with *Penicillium* sp J-3 it is possible to obtain a crude whith enzymatic celullolitic activity, what would propitiate the decrease of the total cost of the process of obtaining of ethanol starting from lignocelulosic residuals in the future.

Tabla de Contenido.

	Pág.
1. Introducción.	1
1.1. Revisión bibliográfica.	5
1.1.1. Biomasa lignocelulósica. Constituyentes.	5
1.1.1.1 Celulosa.	5
1.1.1.2 Hemicelulosa.	5
1.1.1.3 Lignina.	6
1.2 Bagazo de la caña de azúcar.	7
1.2.1. Características generales y composición química.	7
1.2.2 Usos del bagazo.	7
1.2.3 Pretratamientos.	8
1.3 Hidrólisis enzimática de la celulosa	9
1.4 Enzimas celulolíticas.	10
1.4.1 Clasificación del sistema enzimático según la estructura.	12
1.4.2 Aplicación de las celulasas en biotecnología.	13
1.5 Producción de celulasas fúngicas	16
1.5.1 Microorganismos con actividad celulósica.	16
1.5.1.1 Hongos con capacidad celulolítica.	16
1.5.1.1.1 <i>Trichoderma harzianum</i> .	17
1.5.1.1.2 <i>Penicillium</i> sp.	18
1.5.1.2 Bacterias celulolíticas.	20
1.6 Mejoras de la producción de celulasas para la producción de etanol.	20
1.7 Factores que influyen en la producción de enzimas por los microorganismos.	23
1.7.1 Surfactantes.	23
1.7.2 Sustrato	23
1.7.3 pH	23

1.7.4 Temperatura.	24
1.8 Consideraciones generales.	24
2. Materiales y Métodos.	25
2.1. Material celulósico. Bagazo de caña de azúcar.	25
2.1.1 Pretratamiento químico.	25
2.2. Microorganismos.	25
2.2.1 Preparación del inóculo.	26
2.2.1.1 Suspensión de esporas.	26
2.2.1.2 Biomasa.	26
2.3. Ensayo Cualitativo.	26
2.4. Prueba de inductores con papel de filtro.	27
2.4.1 Medio de cultivo.	27
2.4.2 Inoculación.	27
2.4.3 Cultivo y producción de celulasas.	27
2.5. Cultivo con Bagazo.	27
2.5.1 Medio de cultivo.	28
2.5.2 Inoculación.	28
2.5.3 Cultivo y producción de celulasas.	28
2.6 Evaluación de la influencia de varios parámetros en la actividad enzimática celulolítica del hongo <i>Penicillium</i> sp. J-3 sobre bagazo de la caña de azúcar pretratado.	28
2.7. Ensayo de actividad enzimática en papel de filtro.	30
2.7.1. Materiales e instrumental utilizados.	30
2.7.2. Reactivos de trabajo y su preparación.	30
2.7.3. Procedimiento de análisis	30
2.7.4. Cálculo de la actividad de papel de filtro.	31
2.8. Ensayo de actividad de β -Glucosidasa.	31

2.8.1 Materiales e instrumental utilizados.	31
2.8.2 Reactivos de trabajo y su preparación.	31
2.8.3 Procedimiento de análisis.	31
2.8.4. Cálculo de la actividad de β -Glucosidasa.	32
2.9. Ensayo de actividad β -Endoglucanasa.	32
2.9.1 Materiales e instrumental utilizados.	32
2.9.2. Reactivos de trabajo.	33
2.9.3. Procedimiento de análisis.	33
2.9.4. Cálculo de la actividad de β -Endoglucanasa.	33
2.10. Análisis estadístico.	34
2.10.1 Parámetros respuesta.	34
2.10.2 Significación de las variables.	34
3. Resultados y Discusión.	35
3.1 Capacidad celulolítica de dos especies de hongos en condiciones de laboratorio. Resultados del ensayo cualitativo.	35
3.2. Determinación de la actividad enzimática celulolítica de <i>Penicillium</i> sp. J-3 y <i>Trichoderma harzianum</i> con diferentes inductores sobre papel de filtro.	35
3.3. Determinación de actividad enzimática celulolítica del hongo <i>Penicillium</i> sp. J-3 sobre bagazo de caña de azúcar pretratado.	38
3.3.1 Cultivo de <i>Penicillium</i> sp. J-3 con bagazo de caña de azúcar pretratado.	38
3.4 Evaluación de la influencia de varios parámetros en la actividad enzimática celulolítica del hongo <i>Penicillium</i> sp. J-3 sobre bagazo de la caña de azúcar pretratado.	38
3.4.1 Actividades enzimáticas de <i>Penicillium</i> sp J-3.	38
3.4.2 Análisis estadístico de los resultados de actividad enzimática.	40
3.4.2 Proteínas de <i>Penicillium</i> sp J-3	44
3.4.2.1 Análisis estadístico de los resultados de proteínas.	45
Consideraciones generales.	47

Conclusiones	48
--------------	----

I ntroducción.

Introducción.

El alza en los precios del petróleo crudo en el mercado y el deterioro del medio ambiente provocado por el uso indiscriminado de sus reservas, ha determinado un aumento del interés por la búsqueda de fuentes de energía alternativa no basadas en el petróleo (Kumar *et al.*, 2008) en estas condiciones el etanol se ha convertido en una alternativa atractiva para sustituir a los combustibles de origen fósil, a esto se añade su baja contribución al efecto invernadero. Se puede afirmar que el etanol es hoy el aditivo a la gasolina más usado en el mundo.

El etanol puede ser obtenido a partir de materias primas con alto contenido de azúcares o compuestos factibles a ser convertidos en azúcares, tales como el almidón, la celulosa o la hemicelulosa por lo que el etanol disponible comercialmente se obtiene principalmente de sustratos ricos en azúcares o amiláceos.

La utilización de estas materias primas tiene como inconveniente que son más caras y que también pueden ser usadas en la producción de alimentos lo que ha llevado a la comunidad científica a buscar en otros materiales, como los residuos lignocelulósicos, vías más factibles para la producción de etanol, a esto va unido que la demanda de etanol a nivel mundial se está incrementando y los productos agrícolas no serán suficientes para ambos propósitos; la producción de alimentos y la industria del etanol, por tal condición la producción de etanol a partir de residuos lignocelulósicos se impone. (Wyman *et al.*, 2005.) (Saska y Gray., 2006)

El etanol a partir de biomasa lignocelulósica puede ser producido de varias formas y todos los procesos incluyen la misma etapa principal: hidrólisis de los polisacáridos a azúcares monoméricos, la fermentación de los azúcares a etanol y la concentración del etanol por destilación. La principal diferencia entre las alternativas de los procesos es en la etapa de hidrólisis, la cual puede ser realizada por el uso de ácido diluido, ácido concentrado o enzimas.

La utilización de la vía enzimática es ventajosa ya que se realiza a bajas temperaturas usando enzimas biodegradables en vez de ácidos tóxicos como catalizadores, además, debido a la especificidad de las reacciones enzimáticas se pueden lograr altas concentraciones de azúcares al contrario de la hidrólisis ácida, estos azúcares

monoméricos obtenidos no son degradados, no obstante, cuando las enzimas son añadidas a la biomasa nativa, la degradación de la celulosa y la hemicelulosa a azúcares es extremadamente lenta debido a la compleja estructura de la lignocelulosa (Galbe y Zacchi, 2002) por lo que es necesario realizar pretratamientos de la materia prima que hagan las fibras de celulosa más accesibles a las enzimas. Después del pretratamiento, los polisacáridos remanentes son hidrolizados a azúcares por celulasas y los azúcares entonces son convertidos a etanol por un microorganismo fermentador.

De acuerdo a evaluaciones técnico-económicas realizadas, el principal contribuyente al costo total de la producción de etanol a partir de biomasa lignocelulósica por vía enzimática son la materia prima (~40%) y el capital invertido (~45%) seguido por las enzimas (~10%), (Wingren *et al.*, 2004., Sassner *et al.*, 2008). Para reducir el costo de las enzimas requerido para el proceso de producción de etanol se hace necesario obtener las enzimas *in situ* utilizando sustratos que resulten económicos y recircular las enzimas utilizadas en la etapa de hidrólisis enzimática, también es importante el desarrollo de nuevos y más eficientes sistemas enzimáticos.

Los sistemas enzimáticos celulolíticos pueden ser producidos por varios microorganismos como bacterias y hongos aerobios y anaerobios. (Flachner y Réczey, 2004) Las especies de hongos celulolíticos más frecuentemente estudiados pertenecen al género *Trichoderma* sp. por ser los mejores productores de celulasas, sin embargo otros géneros y especies de hongos tales como: *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Neurospora crassa* también han mostrado producción de celulasas.

El estudio de organismos celulolíticos nos permite contar con una fuente fácilmente disponible de enzimas celulolíticas para ser utilizadas en la hidrólisis de residuos lignocelulósicos, lo que contribuirá grandemente a disminuir la contaminación ambiental que estos productos tratados como desechos provocan, es por ello que el uso de celulasas o la degradación de los mismos por hongos celulolíticos es una alternativa para convertir estos residuos en materias primas y obtener provecho de ellos. (Vilches, 2002) La habilidad de estos microorganismos para producir enzimas es un recurso no explotado a plenitud para procesos de producción de los azúcares fermentables sin la necesidad de adquirir las enzimas industriales que encarecen el proceso, esta problemática permite plantear el siguiente problema científico.

Problema Científico

La capacidad celulolítica sobre residuos lignocelulósicos de algunos hongos en estado natural, no se expresa en condiciones de laboratorio.

En la solución de este problema el resultado fundamental estará orientado hacia las vías que permitan utilizar la capacidad celulolítica de hongos existentes en la naturaleza en la producción industrial por lo que se plantea como objetivo general:

Objetivo general.

Desarrollar la actividad científica que permita aprovechar la capacidad celulolítica de hongos existentes en la naturaleza, para degradar residuos lignocelulósicos y posibilitar su transformación en productos útiles, tales como el etanol, en condiciones industriales.

Las acciones a realizar para su consecución están determinadas por objetivos específicos:

Objetivos específicos.

1. Evaluar la capacidad celulolítica de *Penicillium* sp. J-3 y *Trichoderma harzianum* en condiciones de laboratorio.
2. Determinar la actividad enzimática celulolítica de dos géneros de hongos: *Penicillium* sp. J-3 y *Trichoderma harzianum* con diferentes inductores sobre papel de filtro. Definir la cepa con la cual continuar el trabajo.
3. Determinar la actividad enzimática celulolítica del hongo *Penicillium* sp. J-3 sobre bagazo de la caña de azúcar pretratado.
4. Evaluar la influencia de varios parámetros en la actividad celulolítica del hongo *Penicillium* sp. J-3 sobre bagazo de la caña de azúcar.

La **novedad científica** de esta investigación reside en lograr a través de la actividad científica el aprovechamiento de la capacidad celulolítica de hongos existentes en la naturaleza para degradar residuos lignocelulósicos y posibilitar su transformación en productos útiles en condiciones industriales, tales como el etanol.

El **efecto social** se manifiesta fundamentalmente en que la industria contará con vías más económicas para la producción de etanol y no será necesaria la utilización de productos agrícolas que sirven de alimento al hombre.

Revisión Bibliográfica.

1. Revisión bibliográfica.

1.1. Biomasa lignocelulósica. Constituyentes.

Los materiales lignocelulósicos están constituidos por tres componentes fundamentales: los polisacáridos, la lignina y otras sustancias que no forman parte de la pared celular. El componente polisacárido comprende carbohidratos de alto peso molecular, celulosa y hemicelulosa, que representan entre el 60-80% del total de los materiales lignocelulósicos. La lignina representa del 20-35%, es un polímero tridimensional de unidades de fenilpropano, unidas por enlaces éter (C-O-C) y carbono-carbono (C-C), los primeros son mayoritarios (Sjöström, 1993.)

1.1.1 Celulosa.

La celulosa es el principal componente de los materiales lignocelulósicos, es el polisacárido renovable más abundante en la tierra. Su fórmula química es: $C_6H_{10}O_5$. Es un homopolímero lineal de moléculas enlazadas de β - 1,4-D-glucosa, con el dímero de celobiosa como unidad de repetición. Las largas cadenas de celulosa con un grado de polimerización por encima de 15 000 son unidas por enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, lo cual hace a la celulosa una macromolécula cristalina altamente insoluble (Delmer y Amor, 1995) además, pequeñas cantidades de cadenas sin organizar están presentes también formando celulosa amorfa, la cual es menos resistente al ataque químico y enzimático. La celulosa en la naturaleza se encuentra asociada con otros compuestos de las plantas, lo cual puede afectar su biodegradación. (Pérez *et al.*, 2002) esto no significa que no pueda ser hidrolizado, pues existen microorganismos celulíticos que poseen enzimas como las celobiohidrolasas y las endoglucanasas que se encargan de su degradación. (Ramirez y Urrego).

1.1.2 Hemicelulosa.

La hemicelulosa, el segundo mayor constituyente de la lignocelulosa, es el material de unión entre la celulosa y la lignina. Es un heteropolímero no lineal, ramificado, con menos resistencia, más estructura amorfa y menos grado de polimerización (<200) que la celulosa. (Saha, 2003). Está compuesta principalmente por varias hexosas tales como D-glucosa, D-galactosa y D-manosa, y de pentosas como la D-xilosa y L-arabinosa unidas por enlaces

glucosídicos β -1,4 y a veces por β -1,3. La estructura primaria de la hemicelulosa depende de su origen en gran medida.

1.1.3 Lignina.

La lignina es el tercer mayor constituyente de la lignocelulosa, es altamente complejo, ramificado, amorfo, de alto peso molecular, es un polímero aromático al cual está estrechamente unida la celulosa y la hemicelulosa y no está compuesto por unidades repetitivas. La lignina es muy resistente a los tratamientos químicos y microbiológicos y junto con la celulosa brinda la fortaleza a los vegetales.

Entre las otras sustancias que no forman parte de la pared celular que representan del 4-10% del peso seco de la madera, existe gran variedad de compuestos orgánicos, grasas, ceras, alcaloides, proteínas, fenoles simples y complejos, azúcares simples, pectinas, mucílagos, gomas, resinas, terpenos, etc. La formulación exacta depende del tipo de residuo, tanto en su composición química como en sus proporciones; incluso, dentro del mismo tipo se encuentran variaciones notables en función de la edad, estado de crecimiento u otros factores.

Actualmente existen materiales como la paja y el bagazo de la caña de azúcar que son considerados residuos agrícolas y desechados o subutilizados en la mayoría de los casos, esto es debido en gran medida a la estructura recalcitrante de la lignocelulosa que hace que el costo de una bioconversión eficiente a etanol sea más difícil que para sacarosa o almidón, sin embargo, ambos materiales son particularmente interesantes por las potencialidades que encierran como materias primas en la producción de etanol y por estar disponibles en los sitios donde estas plantas de producción están ubicadas (Gray, 2006)

1.2 Bagazo de la caña de azúcar.

1.2.1. Características generales y composición química.

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es una gramínea con una elevada eficiencia en la fotosíntesis que le permite obtener hasta 85 t de biomasa seca por hectárea de cultivo (Gálvez, 2000) por lo que constituye una fuente inagotable de alimentos, energía y materias primas para la industria y ha sido tradicionalmente la base de la economía de cubana y otros muchos países tropicales. Estudios realizados han demostrado la gran cantidad de derivados que esta planta brinda y que aún no se explotan, esta condición y las oscilaciones de los precios del azúcar en el mercado mundial imponen la necesidad

de diversificar la industria azucarera como un requerimiento urgente de los países exportadores de azúcar que dependen fundamentalmente de este producto.

El bagazo es el residuo separado después de la extracción del jugo de la caña de azúcar y es el principal subproducto de la industria azucarera. (Banerjee y Pandey, 2002) Por cada 100 t de caña procesada para la producción de azúcar se obtienen alrededor de 28 t de bagazo y 20 t de residuos agrícolas. (Gálvez, 2000)

El bagazo y los residuos de la cosecha de la caña de azúcar contienen alrededor de un 70% de carbohidratos. Los datos de la literatura indican que el bagazo contiene 41-52% de celulosa, 25-30% de pentosanas y 18-25% de lignina, por lo que su composición química es más cercana a la de las maderas duras que a la de las maderas blandas. (Gastón *et al.*, 2000)

1.2.2 Usos del bagazo.

La mayor parte del bagazo producido en la industria azucarera es utilizado para generar el vapor requerido para los procesos de la fabricación de azúcar, con este propósito es utilizado cerca del 92% del bagazo generado, el 8% restante es utilizado como materia prima para otros fines, dentro de los cuales su uso para la obtención de etanol se ha convertido en una necesidad (Baudel *et al.*, 2005)

El bagazo de caña de azúcar se encuentra disponible en las fábricas de azúcar sin un costo adicional, ya que los costos de cultivo, transportación y almacenamiento son cubiertos por la producción de azúcar (Teixeira *et al.*, 1999) por lo que representa una fuente barata y abundante de carbohidratos con un gran potencial de ser convertido en etanol. La gran experiencia en su manipulación, transportación y almacenamiento disminuye los riesgos inversionistas y lo hacen atractivo en comparación con otros materiales lignocelulósicos.

1.2.3 Pretratamientos.

Muchos métodos de pretratamiento físicos, químicos y microbianos para aumentar la bioconversión de materiales celulósicos han sido reportados. Según (Ojumu *et al.*, 2003) la exposición solar de bagazo, aserrín y mazorcas de maíz reduce su contenido de humedad y los hace más susceptibles a la trituration, lo que es necesario dada algunas características de dichos materiales, - como el grado de cristalización y lignificación y la estructura capilar de la celulosa, que limitan la asequibilidad y susceptibilidad de la celulosa a enzimas celulolíticas y otros agentes hidrolíticos impidiendo su bioconversión. (Varnaité *et al.*, 2008)

Los efectos del pretratamiento incluye: aumento del área de superficie accesible, descristalización de la celulosa, despolimerización parcial de la celulosa, solubilización de la hemicelulosa o lignina (o ambas a la vez) y la modificación de la estructura de la lignina, (Margeot *et al.*, 2009) En la figura 1 se muestran los efectos del pretratamiento en materiales lignocelulósicos.

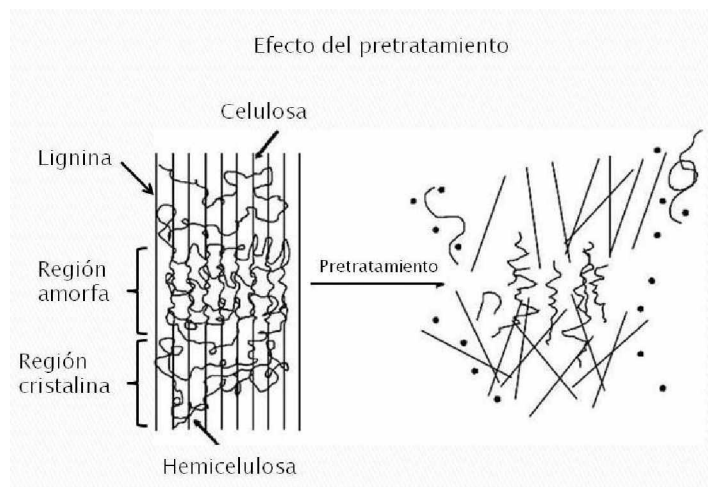


Figura 1 Representación esquemática de los efectos del pretratamiento en materiales lignocelulósicos.(Saratale *et al.*, 2008)

Efectos o consecuencias similares las señalan (Kuo yLee, 2009) en el bagazo específicamente. Varios métodos de pretratamiento han sido investigados en este material para la obtención de enzimas, pretratamientos alcalinos, ácidos, biológicos, y la combinación de los dos primeros.

Un pretratamiento eficaz debe ser de bajo costo y bajo consumo energético, fácil recuperación y reutilización, además de ser aplicable a diversos materiales con eficiencia y reproducibilidad. Así mismo, debe evitar la degradación o pérdida de carbohidratos o formación de subproductos inhibitorios para las enzimas y microorganismos en los procesos de hidrólisis y fermentación (Sun y Cheng, 2002)

1.3 Hidrólisis enzimática de la celulosa.

En el caso de la celulosa, la hidrólisis enzimática depende de la alta especificidad de las enzimas a los cambios en los rasgos estructurales de los materiales celulósicos. Entre estos rasgos estructurales se encuentran: el grado de acumulación de agua, el orden molecular, la estructura capilar de las fibras de celulosa, el área superficial, el contenido de materiales asociados como la lignina y la cristalinidad de la estructura. Las diferencias estructurales entre diversos sustratos celulósicos influyen en el desarrollo del proceso de degradación enzimática, además, el paso limitante en la velocidad de la

hidrólisis lo constituye la degradación de la lignina ya que es un material muy resistente a la biodegradación por tanto afecta la biodegradabilidad del material. Los principales productos de la hidrólisis de la celulosa son celobiosa y glucosa, mientras que la hemicelulosa produce pentosas, hexosas y ácidos urónicos.

Se ha identificado el área superficial y la cristalinidad de la molécula como las características estructurales más importantes que afectan la susceptibilidad de la celulosa a la hidrólisis enzimática. La velocidad inicial de la hidrólisis depende de estas características estructurales. (Ramos *et al.*, 1992.)

1.4 Enzimas celulolíticas.

Las celulasas constituyen un conjunto de enzimas formadas por diferentes componentes y obtenidas fundamentalmente a través de procesos fermentativos que de forma sinérgica degradan la celulosa y hemicelulosa a glucosa, primeramente fueron clasificadas en familias que incluían a la celulasa y a las xylasas, aunque esta clasificación se ha ampliado para incluir el grupo de enzimas que hidrolizan enlaces glicosídicos entre dos o más carbohidratos o entre un carbohidrato y un no carbohidrato. La nomenclatura utilizada para nombrarlas se basa en la especificidad por el sustrato y ocasionalmente en su mecanismo molecular. (Vargas, 2005)

El complejo celulolítico consta de tres tipos de enzimas que actúan de forma sinérgica en la hidrólisis de la celulosa. Las celulasas son hidrolasas que constituyen un complejo multienzimático, las cuales de forma sinérgica rompen las regiones amorfas y cristalinas de las fibras de celulosa. Basado en la región del sustrato y los productos de hidrólisis las celulasas pueden ser divididas en los siguientes tres grandes grupos.

- 1) endoglucanasa (EG), 2) Exoglucanasa que incluye glucohidrolasa y celobiohidrolasa (CBH) y 3) β -glucosidasa o celobiasa (Tabla I)

Tabla I. Componentes y modo de acción de las celulasas.

Enzimas	Modo de acción
Endoglucanasa (EG) (Endo-1,4- β -D-glucan glucanohidrolasa)	$\begin{array}{ccccccccccc} - & G & - & G & - & G & - & G & - & G & - & G & - \\ & & & \uparrow & & & & \uparrow & & & & & \\ & & & & & & & & & & & & \end{array}$ Rompe las uniones aleatoriamente
Celobiohidrolasa (CBH) (Exo-1,4- β -D-glucan celobiohidrolasa)	$\begin{array}{ccccccccccc} G & - & G & - & G & - & G & - & G & - & G & - & G \\ & & & \uparrow & & & & \uparrow & & & & & \end{array}$ Libera celobiosa de los terminales reducidos y no reducidos
Glucohidrolasa (Exo-1,4- β -D-glucan glucohidrolasa)	$\begin{array}{ccccccccccc} G & - & G & - & G & - & G & - & G & - & G & - & G \\ & & & \uparrow & & & & & & & & & \end{array}$ Libera glucosa de los terminales no reducidos
β -glucosidasa or celobiasa (β -D-glucosida glucohidrolasa)	$\begin{array}{ccccc} G-G & & G-G-G & & G-G-G-G \\ \uparrow & & \uparrow & & \uparrow & \uparrow \end{array}$ Libera glucosa de celobiosa y oligómeros de glucosa de cadena corta

La exoglucanasa actúa de una manera progresiva sobre las terminaciones de las cadenas de celulosa generando glucosa (glucohidrolasas) o celobiosa (celobiohidrolasas) como principales productos y tienen alta actividad sobre la celulosa cristalina (Teeri, 1997). EG ataca los enlaces β -1,4-glucosídicos ubicados en el centro de las largas cadenas de celulosa amorfa liberando oligómeros de glucosa de varios tamaños y creando consecuentemente nuevas terminales de cadena para las exoglucanasas. Al contrario de estas, las endoglucanasas pueden también hidrolizar celulosa sustituida tal como carboximetilcelulosa e hidroxietilcelulosa. B-glucosidasa completa la hidrólisis por conversión de los oligómeros solubles de glucosa (celobiosa) en glucosa. Las celulasas son distinguidas de otras hidrolasas glicosídicas por su

habilidad para hidrolizar los enlaces β -1,4 glicosídicos entre los residuos glicosilados.(Lynd *et al.*, 2002) Hablando estrictamente, la β -glucosidasa no es una celulasa, ya que no ataca la cadena de celulosa, sin embargo tiene un rol muy importante en su hidrólisis dado que evita la acumulación de celobiosa que tiene un efecto inhibitorio sobre los otros componentes de las celulasas.

La acción de las 1,4- β endo y exoglucanasas ocurre sobre la superficie de la celulosa sólida, mientras que la acción de la β -glucosidasa ocurre en la fase acuosa. En cada componente existe una multiplicidad enzimática que se puede encontrar en diferentes formas de isoenzimas. De modo general, estas enzimas son glucoproteínas.

1.4.1 Clasificación del sistema enzimático según la estructura.

En relación con la estructura de las celulasas se conocen dos sistemas enzimáticos:

- **Sistema agregativo o sistema de celulasas permanentemente asociadas**, conocido como **celulosoma**; donde las enzimas (provenientes de microorganismos celulósicos) se encuentran ubicadas en la superficie de los microorganismos. El celulosoma constituye un complejo multienzimático de alto peso molecular que posee por lo general una proteína de andamiaje o de reconocimiento que facilita que la célula reconozca a la celulosa, presenta además múltiples dominios funcionales, entre ellos un dominio de unión a la celulosa (cellulose binding dominio, CBD). Cuando las enzimas del celulosoma se disocian de la proteína de andamiaje son capaces de hidrolizar formas amorfas de celulosa pero no formas cristalinas del polisacárido. El celulosoma más estudiado pertenece a *Clostridium thermocellum* aunque en general sólo se tienen evidencias bioquímicas y genéticas de la presencia de celulosomas en dos géneros *Clostridium* y *Ruminococcus* (Beguin y Aubert, 1994)

- **Sistemas no agregativos** conocido también por **sistema de celulasas asociadas o transitoriamente asociadas**; estos sistemas están compuestos por los tres tipos de enzimas descritos anteriormente, las endo β -glucanasas, las exo β -glucanasas y las β -glucosidasas las cuales actúan de forma cooperativa en la degradación de celulosa. En este caso, cada enzima presenta un dominio de unión a la celulosa (**CBD**). Los sistemas más estudiados al respecto son las celulasas fúngicas de *Trichoderma reesei*.

1.4.2 Aplicación de las celulasas en biotecnología.

La demanda de celulasas está aumentando rápidamente debido a sus numerosas aplicaciones actuales y las potenciales que manifiesta. Hasta el presente, las celulasas son ampliamente usadas para la industria alimentaria, cerveza y vino, alimento animal,

en la industria textil, en la biotecnología de la industria de la pulpa y el papel, en la agricultura y en investigación y desarrollo (Bhat, 2000). Algunas de esas aplicaciones emplean uno o dos componentes enzimáticos purificados y otras necesitan mezclas enzimáticas multicomponentes (Tabla II). Los dos productores de enzimas más importantes hoy son las industrias Novozymes y Genencor.

Tabla II. Aplicación de las celulasas en biotecnología.

	Enzima	Función	Aplicación
Biotecnología en la industria alimentaria	Enzimas maceradas (mezcla de celulasas, hemicelulasas y pectinasas)	Hidrólisis de los componentes de la pared celular, disminución de la viscosidad de jugos	Extracción y clarificación de jugos de frutas y vegetales, producción de néctar de frutas y purés. Extracción de aceite de oliva
Biotecnología de cerveza y vinos	β -glucanasas	Hidrólisis de glucanos, disminución de la viscosidad durante la fermentación	Mejoramiento en la fermentación primaria, filtración y calidad de la cerveza.
	Enzimas en maceración	Hidrólisis de la pared celular de plantas	Mejoramiento en extracción de color, calidad, estabilidad y filtración de vinos
	β -glucosidasa	Modificación de los residuos aromáticos	Mejora en el aroma de los vinos
Biotecnología de alimento animal	Celulasas	Hidrólisis parcial de materiales lignocelulósicos	Mejoras en la calidad nutricional de alimento animal para rumiantes y monogástricos.
	β -glucanasa	Hidrólisis de polisacáridos no amiláceos	Mejoras en la digestibilidad de los alimentos para pollos y patos
Biotecnología de industria textil y de lavandería	Celulasas ricas en	Modificación de pulpas mecánicas, hidrólisis parcial de polisacáridos, liberación de tintas	Pulpeo biomecánico, modificación de las propiedades de pulpas, destintado de fibras recicladas

	endoglucanasas		
Agricultura	Celulasas y β - 1,3 y 1,6 glucanasas	Inhibición de la germinación de esporas y crecimiento fúngico	Biocontrol de patógenos y enfermedades de las plantas.
Investigación y desarrollo	Celulasas	Hidrólisis de materiales lignocelulósicos	Producción de bioetanol de biomasa lignocelulósica
	Mezcla de celulasas, hemicelulasas y pectinasas	Solubilización de paredes celulares de plantas u hongos	Producción de protoplastos, híbridos y cepas mutantes

1.5 Producción de celulosas fúngicas.

1.5.1 Microorganismos con actividad celulósica.

La celulosa al ser el polisacárido más abundante en nuestro planeta podría constituir una fuente inagotable de energía y carbono para muchos microorganismos. Sin embargo, no todos los microorganismos poseen la maquinaria metabólica que les permite utilizar a este polímero insoluble como sustrato. Los microorganismos capaces de llevar a cabo la reacción catalítica heterogénea de hidrólisis de dicho polisacárido, son conocidos como microorganismos celulolíticos. Estos microorganismos segregan el sistema enzimático celulasa que de forma sinérgica permite la degradación de la celulosa y en muchos casos la producción de otras sustancias de alto valor agregado (Vilches, 2002). Entre los microorganismos celulósicos se encuentran una gran variedad de hongos y bacterias.

1.5.1.1 Hongos con capacidad celulolítica.

Los hongos, por excelencia, participan en la descomposición de la materia orgánica y en particular en la descomposición de los sustratos celulósicos, debido a que presentan ventajas adaptativas con relación a otros microorganismos como son: una rápida colonización de los sustratos y una eficiente remoción de los productos de hidrólisis. Entre los hongos degradadores de los sustratos celulósicos y productores de enzimas celulíticas se encuentran los pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Trichoderma* (*Deuteromycetes*), *Bulgaria*, *Chaetomium*, *Helotium* (*Ascomycetes*); *Coriolus*, *Phanerochaete*, *Poria*, *Schizophyllum* and *Serpula* (*Basidiomycetes*); entre otros. (Aguiar, 2001)

El sistema de enzimas celulolíticas de *T. reesei* es inducible con celulosa y sus productos de degradación, tales como celobiosa y otros oligosacáridos, y también con otros carbohidratos fácilmente metabolizables, tales como lactosa, soforosa. El mecanismo de la inducción de celulosas por la lactosa (1,4-O- β -galactopiranosil-glucosa) no está completamente esclarecido, pero es claro que la galactoquinasa de *T. reesei* es una enzima clave en el proceso. (Seiboth *et al.*,

2004), sin embargo, los niveles de enzimas producidos sobre soforosa o lactosa fueron menores que los niveles obtenidos sobre celulosa o sobre sustratos ricos en celulosa, los cuales fueron encontrados mejores fuentes de carbono para la producción de altos niveles de celulasas por varios microorganismos. Esta observación trajo consigo la cuestión fundamental de cómo un sustrato insoluble y grande como la celulosa, el cual no puede entrar a la célula, puede inducir y regular la producción de celulasas. (Bhat y Hazlewood, 2001)

Es generalmente aceptado que la celulosa es primeramente hidrolizada en azúcares solubles más pequeños por las pequeñas cantidades de celulasas producidas constitutivamente por los microorganismos. Estos oligosacáridos solubles pueden entrar entonces a la célula, e inducir la transcripción de los genes de celulasa. También ha sido sugerido que en el caso de *Trichoderma* sp, la CBH enlazada al micelio hidroliza la celulosa y libera los oligosacáridos que inducen la síntesis de celulasas. El sistema de enzimas celulasas de cepas naturales de *Trichoderma* sp es reprimido por la glucosa. Esto significa, que no hay síntesis de celulasa en presencia de glucosa (Mach y Zeilinger, 2003)

1.5.1.1.1 *Trichoderma harzianum*

Características generales

Hongo filamentoso mesófilo perteneciente a un género de hongos saprófitos, de esporas verdes y habitantes comunes del suelo. Posee conidióforos erectos o arrastrados, altamente ramificados, más o menos cónicos, débil o fuertemente verticilados. Las fiálides pueden tener apariencia de racimos o ser separadas, desde las cuales son sostenidas las conidias no septadas, subglobosas y viscosas, a menudo reunidas a la entrada de estas. (Valenzuela, 2004)

Usos

El uso de *Trichoderma* spp. para el control de enfermedades fungosas, es hoy día una práctica generalizada en la agricultura cubana. Su empleo se justifica por las relaciones antagonistas que establece fundamentalmente, con los hongos fitopatógenos que viven en el suelo, además de la influencia que ejerce sobre el

crecimiento vegetativo de algunas plantas de importancia económica (Salgado et al., 1999)

Ubicación taxonómica.

Hongo superior

Sub-Division: Deuteromycotina

Clase: Hyphomycetes

Orden: Hyphales (Moniliales)

Género: *Trichoderma*

Especie: *harzianum*



Figura 2 Cultivo de *Trichoderma harzianum* T-22 (KRL-AG2) creciendo en agar papa dextrosa. (Nagham et al., 2006)

1.5.1.1.2 *Penicillium* sp

Características generales

Los penicilios son mohos comunes que se desarrollan sobre los más diversos substratos: granos, paja, cueros, frutas, o sobre los alimentos preparados ya sean de origen vegetal o animal, si hallan la actividad del agua y los nutrientes necesarios.(Carrillo, 2001) Poseen hifas más o menos erectas que acaban en estructuras con aspecto de minúsculas escobillas y cuyas cerdas constan de largas cadenas de pequeñas esporas redondeadas. Este género se caracteriza

por formar conidios en una estructura ramificada semejante a un pincel que termina en células conidiógenas llamadas fiálides. (Raimbault)

Características culturales

Las colonias de *Penicillium* son circulares si no hay impedimento alguno para su crecimiento, con un borde neto muchas veces sin fructificación y mostrando el color del micelio. Éste es generalmente blanco, pero en algunas especies es amarillo, anaranjado, púrpura o pardo claro. La superficie de la colonia madura puede ser: aterciopelada, ligeramente algodonosa o con pequeños haces (fascículos) de conidióforos. En unos pocos casos los haces miden varios milímetros (coremios) con el extremo constituido por las cadenas de esporas (Pitt, 1980).



Figura 3. Crecimiento de *Penicillium chrysogenum* en agar glucosado de Sabouraud durante 7 días a 24 °C. (2002)

Ubicación taxonómica

Reino Fungi

División Eumycota

Subdivisión Deuteromycotina

Clase: Hyphomycetes

Orden: Moniliales

Familia: Moniliaceae

Género: *Penicillium*

1.5.1.2 Bacterias celulolíticas

Numerosas bacterias anaerobias y aerobias son capaces de degradar a los materiales celulósicos; por ejemplo la bacteria anaerobia termófila *Clostridium thermocellum* y *C. cellulovorans* degradan la celulosa formando complejos multienzimáticos que se localizan en la superficies de las mismas. (Chen *et al.*, 2005)

Dentro de las bacterias, el sistema celulolítico de la bacteria termófila anaeróbica *Clostridium thermocellum* es el más investigado. Al contrario de la bacteria anaeróbica, los hongos y las bacterias aeróbicas producen sistemas enzimáticos no complejos. Los sistemas celulolíticos mejor caracterizados son los pertenecientes a los hongos aerobios que pertenecen al género de *Chaetomium*, *Phanerochaete*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Myrothecium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* y *Trichoderma*. (Bhat y Hazlewood, 2001)

En la actualidad se continúa la búsqueda de nuevas especies de microorganismos celulósicos altamente productores de celulasas ya que, aunque se han encontrado y aislado una gran variedad de bacterias y hongos capaces de utilizar la celulosa, estos no producen altos niveles de enzimas que permitan una degradación más eficiente de este polímero insoluble.

1.6. Mejoras de la producción de celulasas para la producción de etanol

El principal problema hoy para las aplicaciones biotecnológicas de forma económica, por ejemplo para el proceso de conversión de biomasa lignocelulósica en etanol, es el costo demasiado alto de las celulasas. Otra dificultad incluye las velocidades de crecimiento relativamente bajas de los hongos productores de celulasas, el largo período de inducción para la expresión de celulasas, la baja actividad específica de las celulasas y los niveles subóptimos de β -glucosidasa. (Bhat, 2000) Es entonces importante optimizar el proceso tecnológico, incrementando la productividad de los microorganismos celulolíticos y mejorar la efectividad de las celulasas. Los sustratos celulósicos purificados han sido ampliamente usados para los estudios de producción de celulasas, pero son muy costosos para el proceso a escala industrial. Una vía para reducir el costo de las enzimas necesarias para la hidrólisis enzimática de la biomasa puede ser el uso

de sustratos menos costosos, tales como la lignocelulosa natural, en vez de celulosa purificada para la producción de celulasas. Sin embargo, el uso de biomasa lignocelulósica posee varios retos.

Debido a su compleja estructura, la lignocelulosa natural tiene que ser pretratada para la producción óptima de enzimas. Después del pretratamiento, los compuestos inhibitorios como furfural, hidroximetilfurfural o fenólicos pueden afectar la eficiencia de los microorganismos productores de celulasas. En la figura 4 se muestra la propuesta tecnológica.

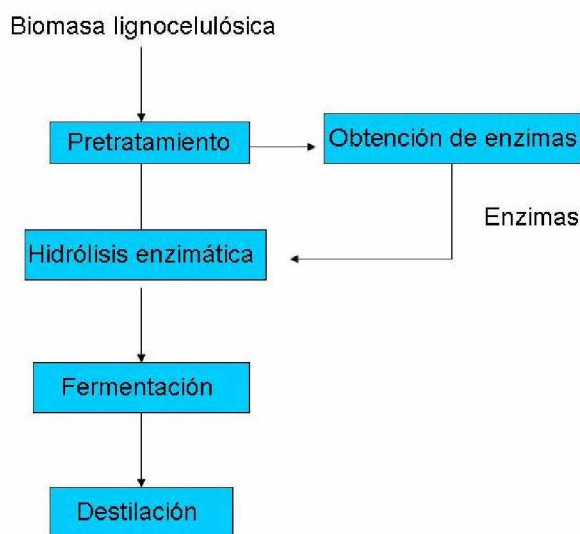


Figura 4 Propuesta tecnológica del proceso de obtención de etanol.

Ha sido reportado que el cultivo de los hongos sobre el sustrato lignocelulósico en cuestión pudiera resultar en perfiles enzimáticos especialmente adecuados para la hidrólisis del sustrato particular. (Jorgensen y Olsson, 2006) Para aplicaciones como la producción de etanol, la producción de enzimas en el mismo sitio, sobre una parte del sustrato lignocelulósico pretratado presente en el proceso de obtención de etanol puede ser favorable. El crudo enzimático producido en la planta de etanol puede ser directamente aplicado para convertir la biomasa en etanol.

Otro factor importante para reducir el costo de producción de las enzimas es el mejoramiento profundo de la producción y efectividad de la producción de celulasas. La selección de un productor ideal de celulasas es de gran importancia, y varios candidatos deben ser investigados. A pesar de su

relativamente baja actividad β -glucosidasa, los mutantes hipercelulolíticos de *T. reesei* son los más usados como productores de celulasas hoy. Para incrementar la conversión eficiente en la hidrólisis enzimática de celulosa, las enzimas de *T. reesei* tienen que ser suplementadas con β -glucosidasa de otro origen (Berlin *et al.*, 2007). La β -glucosidasa es la enzima clave en la hidrólisis completa de la celulosa a moléculas de glucosa. La falta de esta enzima resulta en una acumulación de celobiosa, la cual inhibe la acción de CBHs y EGs, por lo que disminuye la velocidad de hidrólisis (Gusakov y Sinitsyn, 1992)

Varios métodos para incrementar el potencial hidrolítico de las mezclas de enzimas de *T. reesei* sin la suplementación exógena de β -glucosidasa ha sido investigado. El uso de cepas genéticamente manipuladas de *T. reesei* con producción incrementada de β -glucosidase extracelular es uno de los métodos que ha sido usado para obtener enzimas degradadoras de celulosa eficientes (Murray *et al.*, 2004). El uso del caldo de cultivo completo de *T. reesei* (Xia y Shen, 2004) y la aplicación del micelio inmovilizado ha sido también propuesto, en vez del sobrenadante de la fermentación, como la mayor parte de la enzima β -glucosidasa está fuertemente enlazada a la pared celular del hongo durante el cultivo. (Messner y Kubicek, 1990)

Otra vía para mejorar el potencial hidrolítico del sistema enzimático de *T. reesei* es el cocultivo con un hongo buen productor de β -glucosidasa, como por ejemplo *Aspergillus phoenicis* (Wen *et al.*, 2005). El cultivo mixto de los hongos produce una mezcla enzimática con mejor relación que entre los componentes enzimáticos individuales con cultivos únicos. *T. harzianum* (Saddler *et al.*, 1985) y varias especies de *Penicillium* (Jorgensen y Olsson, 2006) también han mostrado que secretan mezclas de enzimas con alta relación de actividad β -glucosidasa a FPA, resultando en similar o mejor potencial hidrolítico que *T. reesei*.

1.7 Factores que influyen en la producción de enzimas por los microorganismos.

Diferentes factores han sido analizados en la obtención de enzimas tales como tipo de sustrato, concentración y temperatura. La integridad de la estructura tridimensional del centro activo es esencial para el mantenimiento de la actividad por lo que cualquier factor que altere la integridad de esta estructura afectaría la actividad enzimática.(Aguiar, 2001).

1.7.1 Surfactantes.

Existen estudios que utilizan tensoactivos para la producción de enzimas lo cual provoca un incremento de la actividad enzimática. Los resultados muestran que los surfactantes como el Tween 80 provocan efectos estimulantes en la producción y liberación de enzimas y aunque el mecanismo exacto no se conoce el punto común radica en que mejoran la permeabilidad de la membrana celular. (Zeng *et al.*, 2006) Ha sido reportado que el Tween 80 estabiliza la actividad enzimática contra la fuerzas de cizallamiento durante la agitación y estabiliza la actividad ligninasa en cultivos sumergidos con agitación. (Tien y Kirk, 1988)

1.7.2 Sustrato

La selección del sustrato debe realizarse de acuerdo al tipo de microorganismo y tipo de enzima que se requiera, por ejemplo, para producir celulasas y xilanasas se pueden seleccionar sustratos que contengan porcentajes elevados de celulosa y hemicelulosa; mientras que para producir oxidasas pueden seleccionarse sustratos con alto contenido de lignina (Couto y Sanromán, 2005)

1.7.3 pH

Dependiendo del microorganismo utilizado y del tipo de enzima que se produzca, el pH puede afectar de manera variable los niveles de producción de enzimas lignocelulolíticas, de manera que en la mayoría de los estudios de optimización, el pH se ha tomado en cuenta como una de las variables más relevantes del proceso. Con lo que se ha observado que la producción de enzimas lignocelulolíticas se ve afectada drásticamente cuando el pH del cultivo sólido está por debajo de 5 o por encima de 7. (Jing *et al.*, 2007).

1.7.4 Temperatura

La temperatura es un factor que influye en el crecimiento de los microorganismos y en la formación del producto. Conforme la temperatura aumenta, las velocidades de las reacciones químicas y enzimáticas, que ocurren en el interior de las células de los microorganismos, se vuelven cada vez más rápidas, al igual que la velocidad de crecimiento. Sin embargo, hay un límite de temperatura dentro del cual las funciones metabólicas pueden ocurrir y, cuando este se sobrepasa, las funciones celulares empiezan a decaer drásticamente (Hernández, 2008)

1.8 Consideraciones generales

El desarrollo que ha tenido la humanidad a través de los años ha demostrado que se necesitan fuentes de energía que no provoquen daños al medio ambiente y por consiguiente a la vida en el planeta. La concientización de este principio ha dado lugar a que día a día sean muchos los esfuerzos que se realicen en este sentido.

La celulosa puede constituir la fuente de energía renovable que permitiría obtener productos de gran utilidad para la humanidad en general. Sin embargo, se ha visto en el desarrollo del capítulo, que es necesario incrementar el conocimiento acerca de los microorganismos capaces de degradar este abundante polímero natural, con altos rendimientos y eficiencia de los complejos enzimáticos involucrados, para lograr así procesos económicamente factibles y de impacto positivo sobre el medio ambiente.

Materiales y Métodos.

2. Materiales y Métodos.

2.1 . Material celulósico. Bagazo de caña de azúcar.

Se utilizó para este estudio bagazo de caña de azúcar procedente del CAI Heriberto Duquesne de la provincia de Villa Clara.

La composición del bagazo se muestra en la Tabla III.

Tabla III. Composición química del bagazo de caña de azúcar natural y pretratado.

Bagazo	% sobre base seca natural	% sobre base seca pretratado
Celulosa	40.85	58.18 (34.8)
Hemicelulosa	23.5	7.00 (4.2)
Lignina	18.93	27.9(16.7)

2.1.1 Pretratamiento químico.

Primera etapa de pretratamiento.

Se realizó un pretratamiento secuencial ácido- alcalino mezclando el bagazo con ácido sulfúrico al 1% (v/v), relación sólido – líquido de 1-10 (g-mL) y a una temperatura de 120 °C durante 40 minutos. Una vez enfriado fue filtrado a vacío, lavado con agua destilada y secado en estufa a 35°C durante 48 horas.

Segunda etapa de pretratamiento.

Al bagazo pretratado seco obtenido de la etapa anterior se le añadió NaOH al 7 % (m/v), relación sólido-líquido de 1-7 (g-mL) se usó una temperatura de 140 °C durante 60 minutos, luego fue secado nuevamente bajo las condiciones antes referidas.

Para determinar la composición del bagazo seco resultante se aplicó el método (Puls *et al.*, 1993). De la misma forma se determinó la composición inicial del bagazo.

2.2 Microorganismos.

Fueron utilizadas cepas naturales de: *Trichoderma harzianum* procedente del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP) de Villa Clara, aislada del suelo y *Penicillium* sp J-3 procedente de la colección de la Facultad de Ingeniería Química del Instituto Superior Politécnico “José Antonio Echeverría” (ISPJAE), aislado de bagazo de caña de azúcar. Ambos microorganismos fueron almacenados a 4°C en cuñas de agar extracto de malta.

2.2.1 Preparación del inóculo.

2.2.1.1 Suspensión de esporas.

Para obtener la suspensión de esporas los microorganismos fueron cultivados en frascos Erlenmeyer con agar papa dextrosa e incubados a una temperatura de 28°C por un período de 5 días. La suspensión de esporas se obtuvo a partir de los mismos adicionando 15 mL de solución mineral de Mandels y Weber (Mandels y Weber, 1969) y se almacenó a 4°C. La concentración de esporas se estandarizó con la ayuda de la cámara de Neubauer.

2.2.1.2 Biomasa.

Se llevaron a cabo dos estrategias para la obtención de inóculo por biomasa como se muestra en la Figura 6.

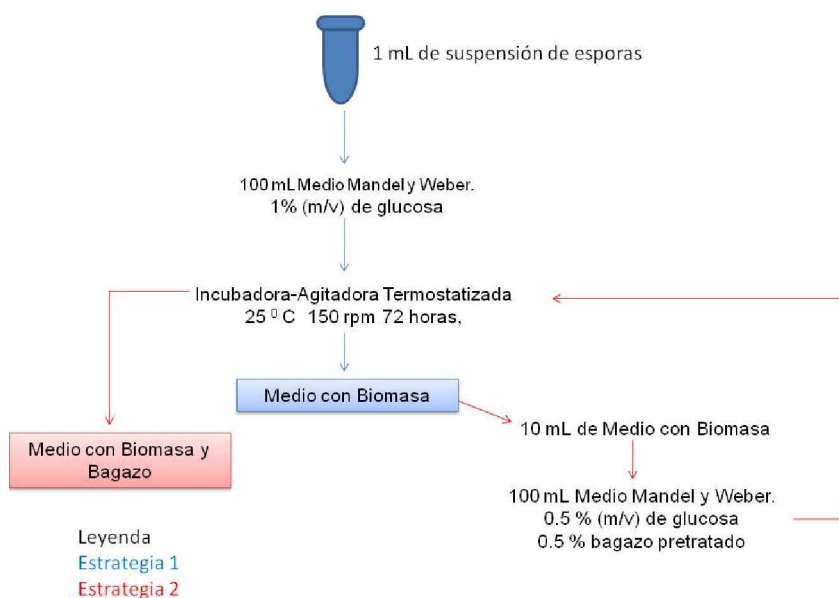


Figura 6. Estrategias de obtención de inóculo por biomasa.

2.3 Ensayo Cualitativo.

Se realizó un ensayo cualitativo para detectar actividad enzimática celulasa de ambos microorganismos adicionando al medio de cultivo Mandels y Weber (sin otra fuente de carbono) 1.7 % de agar y 0.1 % de carboximetil celulosa (CMC), se esterilizó a 121°C por 15 minutos, se dejó enfriar y una vez sólido se inoculó e incubó a 30 °C por siete días.

Pasado este tiempo se reveló la presencia del polisacárido con una solución del colorante azoico Rojo Congo al 0.1 % durante 10 minutos lavando luego el exceso de colorante con solución de NaCl 1 N. Se observó el halo de crecimiento.

2.4 Prueba de inductores con papel de filtro.

Se realizó la prueba de los inductores: glucosa, sacarosa y lactosa para seleccionar el más adecuado para la expresión de las actividades enzimáticas con los hongos *Trichoderma harzianum* y *Penicillium* sp J-3.

2.4.1 Medio de cultivo.

El medio de cultivo utilizado contenía 100 mL de medio Mandels y Weber, 5g/L de sustrato modelo (papel de filtro Whatman # 1) en cuadros de 1x1 cm y 2 g/L de glucosa, sacarosa y lactosa añadidos luego de la esterilización en autoclave por 15 minutos a 121 °C.

2.4.2 Inoculación

La inoculación se llevó a cabo adicionando 1 mL de suspensión de esporas de los microorganismos obtenida como se refiere en 2.2.1.1.

2.4.3 Cultivo y producción de celulasas.

Los cultivos se realizaron en Erlenmeyer de 200 mL los cuales una vez inoculados se introdujeron en una Incubadora-Agitadora Termostatzada (Sartorius) a 28°C y velocidad de agitación de 150 rpm por 7 días. Los experimentos fueron llevados a cabo por duplicado y se realizaron ensayos controles para cada microorganismo. Fueron tomadas muestras cada 24 horas en Eppendorf de 1,5 mL y se centrifugaron (Eppendorf. 5417R) a 25 °C y 14000 rpm por espacio de 15 minutos.

El sobrenadante se utilizó en la determinación de actividad enzimática sobre papel de filtro y contenido de proteínas por el método de Biuret. (Gornall *et al.*, 1949)

2.5 Cultivo con Bagazo

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el hongo *Penicillium* sp. J-3 se realizó la evaluación de la influencia de dos estrategias de inoculación del mismo en la producción de celulasas en cultivos con bagazo pretratado como única fuente de carbono.

2.5.1 Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado contenía 200 ml del medio antes referido y 2 g de bagazo pretratado.

2.5.2 Inoculación

La inoculación se realizó añadiendo al medio de cultivo 10 ml de inóculo por biomasa obtenido con anterioridad siguiendo las estrategias descritas en el epígrafe 2.2.1.2.

2.5.3 Cultivo y producción de celulasas.

Los cultivos se realizaron en Erlenmeyers de 1000 mL siguiendo el procedimiento antes descrito por un espacio de 5 días.

2.6 Evaluación de la influencia de varios parámetros en la actividad enzimática celulolítica del hongo *Penicillium* sp. J-3 sobre bagazo de la caña de azúcar pretratado.

Se llevó a cabo el estudio de la influencia de los valores mínimo y máximo de nueve variables en la producción de celulasas por el hongo *Penicillium* sp J-3. Para el seguimiento de este estudio se utilizó el diseño parcial fraccional saturado de Plackett-Bürmann (Plackett y Bürman, 1946.) (PB) con 12 experimentos. Las variables y niveles son listadas en la Tabla IV.

Tabla IV. Variables analizadas en el estudio y sus niveles.

x	Variables	Valor mínimo (–)	Valor máximo (+)
1	Concentración de glucosa.	0%	1%
2	Temperatura.	25°C	30°C
3	pH	4	6
4	Velocidad de agitación.	150 rpm	200 rpm
5	Concentración de miel	0%	1%
6	Surfactante Tween 80.	0%	0.1%
7	Concentración de proteasa peptona.	0%	0.2%
8	Tamaño del inóculo	5%	10%
9	Concentración de bagazo.	1%	1.5%

Se realizaron 12 estudios en Erlenmeyers de 500 mL los cuales tuvieron como base 100 mL de medio Mandels y Weber y cuyas condiciones individuales se describen a continuación en la tabla 3. La inoculación se realizó siguiendo la Estrategia 1 (2.1.2.).

Tabla V. Condiciones de concentración de glucosa (Gluc), temperatura (Temp), pH, velocidad de agitación (V.A), concentración de miel final (miel), concentración de surfactante Twen 80 (T.80), concentración de proteasa peptona (P.P), concentración de inóculo (Inóc) y concentración de bagazo de los experimentos llevados a cabo.

Experimento	Gluc.	Temp.	pH	V.A	Miel	T.80	P. P.	Inóc.	Bagazo
A	1%	30°C	6	150 rpm	0%	0%	0.2%	5%	1.5%
B	1%	30°C	4	150 rpm	0%	0.1%	0%	10%	1%

C	0%	30°C	6	150 rpm	1%	0.1%	0.2%	5%	1%
D	1%	30°C	4	200 rpm	1%	0.1%	0%	5%	1.5%
E	0%	30°C	6	200 rpm	0%	0%	0%	10%	1.5%
F	0%	30°C	4	200 rpm	1%	0%	0.2%	10%	1%
G	1%	25°C	6	200 rpm	1%	0%	0%	5%	1%
H	0%	25°C	4	200 rpm	0%	0.1%	0.2%	5%	1.5%
I	1%	25°C	6	200 rpm	0%	0.1%	0.2%	10%	1%
J	1%	25°C	4	150 rpm	1%	0%	0.2%	10%	1.5%
K	0%	25°C	6	150 rpm	1%	0.1%	0%	10%	1.5%
L	0%	25°C	4	150 rpm	0%	0%	0%	5%	1%

2.7 Ensayo de actividad enzimática en papel de filtro.

Se determinó la actividad enzimática en papel de filtro de las muestras tomadas anteriormente según el método de (Correa *et al.*, 1999) utilizando una dilución 1 en 2 en el caso del estudio de inductores excepto los controles donde se utilizó la muestra sin diluir así como los experimentos con bagazo como fuente de carbono.

2.7.1 Materiales e instrumental utilizados.

- ü Espectrofotómetro para lecturas a 540 nm.
- ü Micropipetas y pipetas
- ü Baño termostático
- ü Baño María
- ü Papel de filtro Whatman # 1

2.7.2 Reactivos de trabajo y su preparación.

- ü Tampón acetato 50mM, pH 4.8
- ü Reactivo DNS (Ácido dinitrosalicílico)

2.7.3 Procedimiento de análisis.

El procedimiento de análisis se describe a continuación en la tabla VI.

Tabla VI. Procedimiento de análisis del ensayo de actividad enzimática en papel de filtro.

Reactivos	BR	BPF	BM	M
Tampón acetato 50mM, pH 4.8 (mL)	1.5	0.5	1.0	---
Dilución de enzima (mL)	---	---	0.5	0.5
Se introdujeron los tubos en baño a 50 ⁰ C				
Tira de papel de filtro 50 mg (1x6 cm)	NO	SI	NO	SI
Se incubaron los tubos por 30 minutos en baño a 50 ⁰ C				
Reactivo DNS (mL)	3.0	3.0	3.0	3.0
Se colocaron los tubos en baño de agua hirviendo durante 5 minutos e inmediatamente fueron enfriados en baño de agua corriente.				
Agua destilada (mL)	5.0	5.0	5.0	5.0

Se agitaron bien los tubos y luego fueron leídos en el espectrofotómetro a 540 nm contra el blanco de reactivo. El cálculo de la concentración de glucosa en los tubos BPF, BM y M se realizó utilizando la curva estándar o la ecuación de regresión encontradas previamente. La concentración de glucosa estuvo dada de la siguiente manera:

$$[\text{Glucosa}] = [\text{M}] - ([\text{BM}] + [\text{BPF}])$$

Una unidad de enzima se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de glucosa por minuto.

2.7.4 Cálculo de la actividad de papel de filtro.

La actividad de papel de filtro se calculó mediante la siguiente expresión:

Celulasa (U/mL) = [Glucosa] $\times$ 0.1852 $\times$ dilución; donde 0.1852 es un factor para obtener el número de μmoles de glucosa formados en un minuto.

2.8 Ensayo de actividad de β -Glucosidasa.

Se determinó la actividad enzimática de β -Glucosidasa de las muestras tomadas anteriormente según el método op. cit. utilizando una dilución 1 en 2 en el caso del estudio de inductores excepto los controles donde se utilizó la muestra sin diluir así como los experimentos con bagazo como fuente de carbono.

2.8.1 Materiales e instrumental utilizados.

- ü Espectrofotómetro para lecturas a 540 nm.
- ü Micropipetas y pipetas
- ü Baño termostático
- ü Baño María

2.8.2 Reactivos de trabajo y su preparación.

- ü Tampón acetato 50mM, pH 4.8
- ü Reactivo DNS
- ü Salicina.

2.8.3 Procedimiento de análisis.

El procedimiento de análisis se describe a continuación en la Tabla VII

Tabla VII. Procedimiento de análisis del ensayo de actividad β -Glucosidasa.

Reactivos	BR	BSAL	BM	M
Tampón acetato 50mM, pH 4.8 (mL)	1.5	0.5	1.0	---
Dilución de enzima (mL)	---	---	0.5	0.5

Se introdujeron los tubos en baño a 50 ° C				
Salicina 10 mM (mL)	---	1.0	---	1.0
Se incubaron los tubos por 30 minutos en baño a 50 ° C				
Reactivo DNS (mL)	3.0	3.0	3.0	3.0
Se colocaron los tubos en baño de agua hirviendo durante 5 minutos e inmediatamente fueron enfriados en baño de agua corriente.				
Agua destilada (mL)	5.0	5.0	5.0	5.0

Se agitaron bien los tubos y luego fueron leídos en el espectrofotómetro a 540 nm contra el blanco de reactivo. El cálculo de la concentración de glucosa en los tubos BSAL, BM y M se realizó utilizando la curva estándar o la ecuación de regresión encontradas previamente. La concentración de glucosa estuvo dada de la siguiente manera:

$$[\text{Glucosa}] = [M] - ([BM] + [BSAL])$$

Una unidad de enzima se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de glucosa por minuto.

2.8.4 Cálculo de la actividad de β -Glucosidasa.

La actividad de β -Glucosidasa se calculó mediante la siguiente expresión:

β -Glucosidasa (U/mL) = [Glucosa] x 0.37 x dilución; donde 0.37 es el factor para obtener el número de μmoles de glucosa formados en un minuto.

2.9 Ensayo de actividad β -Endoglucanasa.

Se determinó la actividad enzimática de β -Endoglucanasa de las muestras tomadas anteriormente según el método op. cit. utilizando una dilución 1 en 2 en el caso del estudio de inductores excepto los controles donde se utilizó la muestra sin diluir así como los experimentos con bagazo como fuente de carbono.

2.9.1 Materiales e instrumental utilizados.

ü Espectrofotómetro para lecturas a 540 nm.

ü Micropipetas y pipetas.

ü Baño termostático.

ü Baño María.

2.9.2 Reactivos de trabajo.

ü Tampón acetato 50mM, pH 4.8

ü Reactivo DNS.

ü Carboximetilcelulosa 1%

2.9.3 Procedimiento de análisis.

El procedimiento de análisis se describe a continuación en la Tabla VIII.

Tabla VIII. Procedimiento de análisis del ensayo de actividad β -Endoglucanasa.

Reactivos	BR	BCMC	BM	M
Tampón acetato 50mM, pH 4.8 (mL)	1.5	0.5	1.0	---
Dilución de enzima (mL)	---	---	0.5	0.5
Se introdujeron los tubos en baño a 50 ° C				
Carboximetilcelulosa 1% (mL)	---	1.0	---	1.0
Se incubaron los tubos por 30 minutos en baño a 50 ° C				
Reactivo DNS (mL)	3.0	3.0	3.0	3.0
Se colocaron los tubos en baño de agua hirviendo durante 5 minutos e inmediatamente fueron enfriados en baño de agua corriente.				
Agua destilada (mL)	5.0	5.0	5.0	5.0

Se agitaron bien los tubos y luego fueron leídos en el espectrofotómetro a 540 nm contra el blanco de reactivo. El cálculo de la concentración de glucosa en los tubos BCMC, BM y M se realizó utilizando la curva estándar o la ecuación de regresión encontradas previamente. La concentración de glucosa estuvo dada de la siguiente manera:

$$[\text{Glucosa}] = [\text{M}] - ([\text{BM}] + [\text{BCMC}])$$

Una unidad de enzima se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de glucosa por minuto.

2.9.4 Cálculo de la actividad de β -Endoglucanasa.

La actividad de β -Endoglucanasa se calculó mediante la siguiente expresión:

β - Endoglucanasa (U/mL) = [Glucosa] x 0.37 x dilución; donde 0.37 es un factor para obtener el número de μmoles de glucosa formados en un minuto.

2.10 Análisis estadístico.

Cuando se comienza un estudio donde existen varios factores por estudiar, una buena estrategia experimental es necesaria. Los diseños factoriales saturados son diseños de screening de variables, donde sólo se analizan los efectos de las variables lineales.

Para el seguimiento de este estudio se utilizó el diseño parcial fraccional saturado de Plackett-Bürmann antes referido.

Este diseño ha sido usado efectivamente en aplicaciones de desarrollo de procesos complejos, desarrollo de productos (Ghanem *et al.*, 2000, Isaccson, 1970) y en determinar la influencia de nutrientes en medios de cultivos (Forchiassin y Papinutti, 2007) entre otras aplicaciones.

Un acercamiento lineal es considerado suficiente para la selección de las variables.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i \quad (i = 1, \dots, k) \quad [2.1]$$

Donde Y es la respuesta predicha y β_i son los efectos de las variables consideradas. En este trabajo se consideraron 2 falsas variables. Sus efectos son calculados de la misma manera que para las variables reales. Los resultados fueron procesados en DesignExpert v.4.0.

2.10.1 Parámetros respuesta.

Los parámetros respuestas analizados fueron Y_1 (Actividad sobre el papel de filtro, FPasa, U/mL), Y_2 (β -Glucosidasa, U/mL), Y_3 (β -Endoglucanasa, U/mL) y Y_4 (Proteínas, mg/mL) luego de la fermentación durante 5 días consecutivos.

2.10.2 Significación de las variables

La significación de las variables se calculó utilizando las falsas variables mediante la ecuación:

$1.061 * SE = Ef$ [2.2] donde 1.061 es el valor de t de student para un 80 % de significación, SE es la desviación estándar calculada por la ecuación:

$SE = \sqrt{\sum (f1^2 + f2^2) / \text{número de falsas variables}}$ [2.3] donde f1 y f2 son las falsas variables.

Resultados y Discusión.

3. Resultados y Discusión.

3.1 Capacidad celulolítica de dos especies de hongos en condiciones de laboratorio. Resultados del ensayo cualitativo.

Los resultados del ensayo cualitativo con *Trichoderma harzianum* y *Penicillium* sp J-3 se pueden apreciar en la figura 6 a y b respectivamente; el halo de crecimiento es visible.

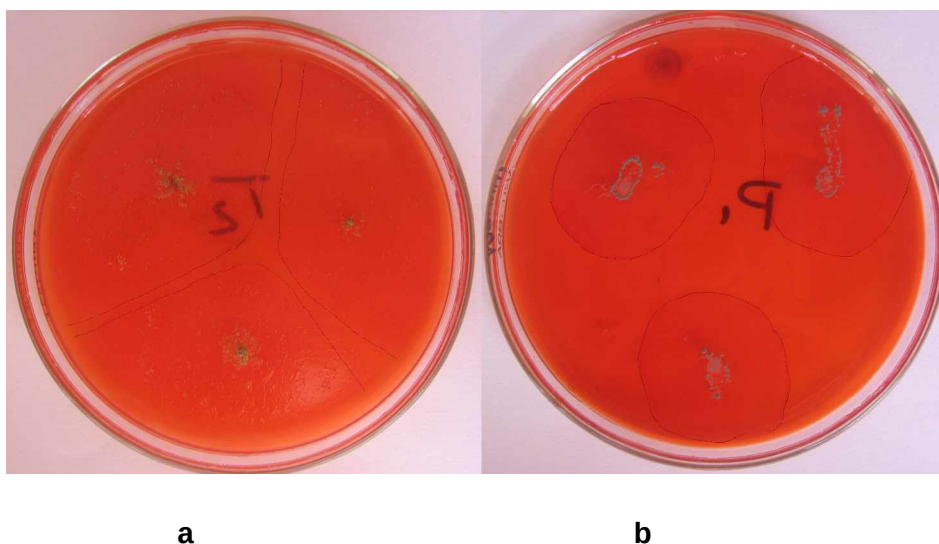


Figura 6. Ensayo cualitativo con *Trichoderma harzianum* (a) y *Penicillium* sp J-3 (b)

Como se observa en la figura 6 a y b, ambos hongos crecen sobre el medio que contiene como única fuente de carbono la carboximetilcelulosa, lo cual es indicativo de la capacidad celulolítica de estos hongos.

3.2 Determinación de la actividad enzimática celulolítica de *Penicillium* sp. J-3 y *Trichoderma harzianum* con diferentes inductores sobre papel de filtro.

Luego de la detección de la capacidad celulolítica cualitativa, se realizaron experimentos para la determinación de la actividad sobre el papel de filtro (FPasa) usando los inductores previstos (azúcares simples: glucosa, sacarosa y lactosa).

Los valores obtenidos de FPasa con ambos hongos se muestran en las figuras 7 y 8.

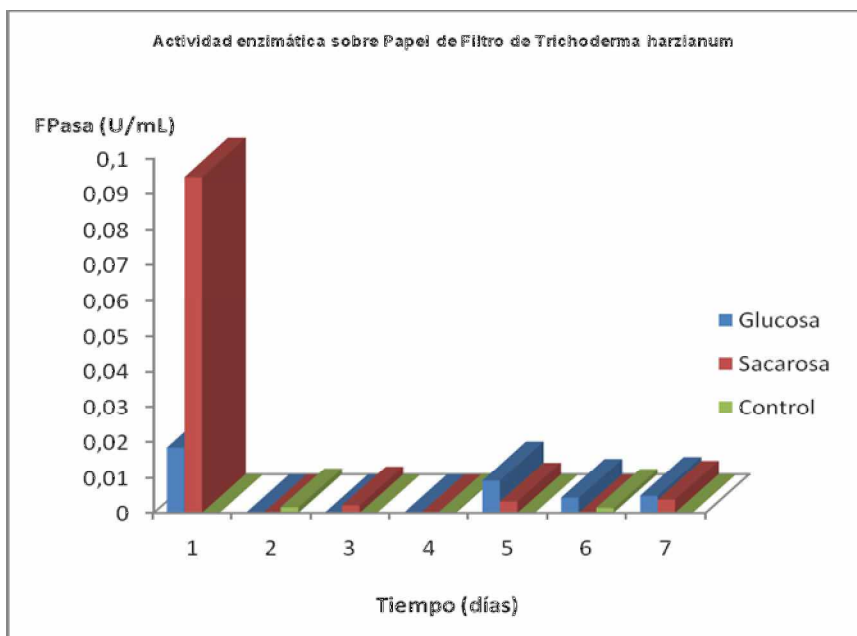


Figura 7: Actividad enzimática en papel de filtro de *Trichoderma harzianum* J-3 con sacarosa y glucosa como inductores.

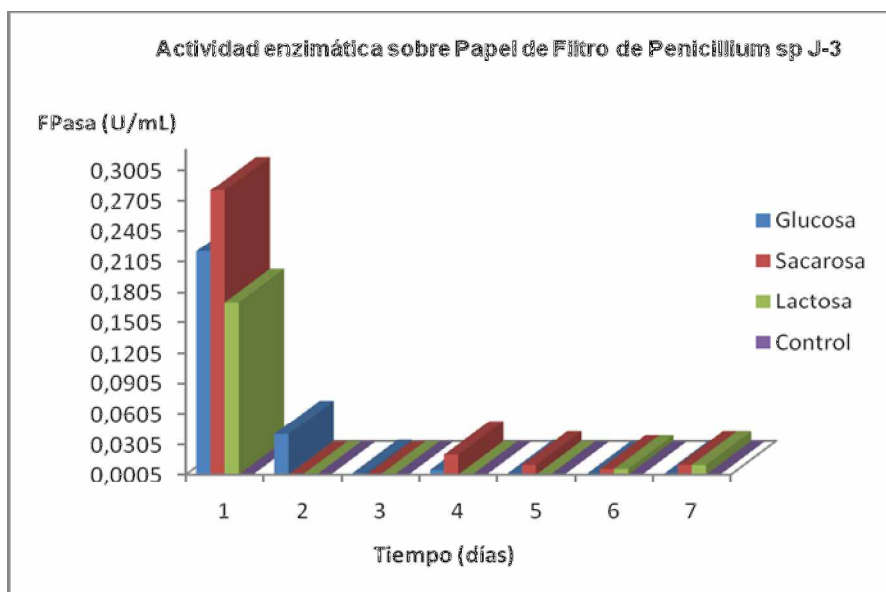


Figura 8: Actividad enzimática en papel de filtro de *Penicillium* sp J-3 con sacarosa, glucosa y lactosa como inductores.

En el caso de los resultados obtenidos con el hongo *Trichoderma harzianum* no se detectó actividad FPasa con la lactosa como inductor; sin embargo, con *Penicillium* sp J-3 se detectó una actividad enzimática FPasa de 0.17 UI/mL al primer día; la lactosa fue el inductor que más bajos

resultados mostró en este estudio. Contrariamente a estos resultados (Ceroni and Gutiérrez-Correa, 1988) reportan una actividad enzimática FPasa de 0.462 UI/mL y 0.625 UI/mL con *Penicillium implicatum* y *P. spinolosum* respectivamente, en sus condiciones de trabajo y usando la lactosa como inductor (1%). La diferencia de estos resultados puede estar dada por la presencia en el medio de vitaminas y un surfactante en el referido estudio.

Las mayores actividades para ambos microorganismos se obtuvieron con el uso de sacarosa como inductor, con diferencias significativas entre ambos, *Penicillium* sp J-3 resultó el de mayor actividad FPasa con 0.28 U/mL a las 24 horas y *Trichoderma harzianum* produjo 0.09 U/mL en igual tiempo. Los resultados obtenidos en este trabajo son superiores a los reportados por (Vilches, 2002), que utilizando papel de filtro como sustrato, con una cepa de *Penicillium* sp obtuvo una actividad enzimática FPasa de 0.051 U/mL. De igual manera (Steiner *et al.*, 1994) con una cepa de *Penicillium purpurogenum* en medio Mandels y Weber obtuvieron 0.22 U/mL.

El uso de glucosa como inductor también resultó en un aumento de la actividad enzimática FPasa para *Penicillium* sp J-3 con 0.22 U/mL y *Trichoderma harzianum* con 0.018 U/mL lo cual concuerda con lo reportado por (Aslam *et al.*, 2010) usando dicho microorganismo, aunque siempre fueron menores que los obtenidos con sacarosa. En los experimentos control (sin inductor) con *Penicillium* sp J-3 se detectó actividad enzimática del 1ero al 4to día y para *T. harzianum* J-3 el 2do, 4to y 6to día. Los mayores valores detectados fueron 0.0005 U/mL para *Penicillium* sp J-3 el primer día y 0.001U/mL para *Trichoderma harzianum* el segundo día, estos resultados fueron bajos comparados con los obtenidos por los medios que contienen inductor, lo cual demuestra los beneficios del uso de azúcares simples para el incremento de las actividades enzimáticas.

La diferencia entre los días a los cuales se detectó actividad enzimática de los dos microorganismos puede estar dada por el sustrato de procedencia de estos. *Penicillium* sp. J-3 fue aislado del bagazo de la caña de azúcar, material lignocelulósico, por lo que pudiera este aspecto contribuir a la rápida expresión de la FPasa (desde el primer día) en el medio de fermentación.

Los resultados logrados hasta el momento en el estudio con ambos hongos, apuntan hacia un mejor desempeño de *Penicillium* sp. J-3 y dada la complejidad del trabajo se estimó conveniente no continuar el estudio con *Trichoderma harzianum*.

3.3 Determinación de actividad enzimática celulolítica del hongo *Penicillium* sp. J-3 sobre bagazo de caña de azúcar pretratado.

3.3.1 Cultivo de *Penicillium* sp. J-3 con bagazo de caña de azúcar pretratado.

Después de la realización de los estudios en los que se determinó la actividad enzimática FPasa de los hongos sobre el papel de filtro, se procedió a utilizar otro material celulósico como fuente de carbono, como es el caso del bagazo de caña pretratado.

Los resultados obtenidos con el empleo de las dos estrategias de trabajo no mostraron actividad enzimática, lo cual es indicativo de que la composición del bagazo pretratado (ver sección 2.1 de Materiales y Métodos) influye de manera directa sobre la expresión de la actividad enzimática.

Todo parece indicar que el pretratamiento que se le da al bagazo puede tener alguna incidencia en el comportamiento celulolítico de hongo, aunque por la extensión de este trabajo no ha sido posible considerar este factor.

Así mismo varios autores, en diferentes condiciones de cultivo utilizan aditivos como vitaminas, otras fuentes de nitrógeno y surfactantes que podrían inducir resultados más favorables. A esto se debe adicionar la posibilidad de variar otros factores que hasta el momento no se han considerado como concentración de sustrato, temperatura y pH (Nagham *et al.*, 2006)

3.4 Evaluación de la influencia de varios parámetros en la actividad enzimática celulolítica del hongo *Penicillium* sp. J-3 sobre bagazo de la caña de azúcar pretratado.

Con el estudio de la influencia de nueve variables en la producción de celulasas por el hongo *Penicillium* sp J-3 siguiendo el diseño parcial fraccional saturado de Plackett-Bürmann se obtuvieron los siguientes resultados.

3.4.1 Actividades enzimáticas de *Penicillium* sp J-3

Los valores de actividad enzimática sobre papel de filtro (FPasa), β -Glucosidasa (β -G) y β -Endoglucanasa (β -EG) de *Penicillium* sp J-3 durante cinco días se exponen en la tabla IX.

Tabla IX. Actividades enzimáticas FPasa, β -G y β -EG de *Penicillium* sp J-3 durante los cinco días del estudio.

	Día 1			Día 2			Día 3			Día 4			Día 5		
Expto	FPasa	β -G.	β -EG.	FPasa	β -G.	β -EG.	FPasa	β -G.	β -EG.	FPasa	β -G.	β -EG.	FPasa	β -G.	β -EG.
A	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,02	0	0
C	0,4	0	0	0	0	0	0	0,03	0	0	0,09	0	0	0,03	0
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,05	0	0	0,06	0
G	0,6	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,01
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,01	0
I	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	0	0	0	0	0	0	0,01	0,24	0	0	0,27	0	0	0,3	0,001
L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

El valor máximo de actividad enzimática FPasa se obtuvo el primer día lo cual coincide con el estudio donde se utilizó el papel de filtro como sustrato, este fue de 0.6 U/mL destacando que todas las actividades enzimáticas fueron mayores que las obtenidas en el estudio referido. Es significativo que la actividad enzimática FPasa obtenida es similar a la reportada por (Kovács, 2009) (0.4-0.6 U/mL) utilizando un mutante de *Trichoderma atroviride*.

Como se puede apreciar en la tabla IX, en algunos experimentos no se detectó actividad enzimática. Las mayores actividades enzimáticas β -glucosidasa se detectaron al tercer, cuarto y quinto día con 0.24 U/mL, 0.27 U/mL y 0.3 U/mL respectivamente.

La actividad β -Endoglucanasa solo se detectó el quinto día siendo de 0.014 U/mL la mayor.

3.4.2 Análisis estadístico de los resultados de actividad enzimática.

Se realizó el análisis estadístico de los resultados siguiendo el diseño parcial fraccional saturado de Plackett-Bürmann. Se utilizó el 80% de confianza, de utilidad cuando se está realizando el tamizado de variables. Se procesó por separado cada día del estudio.

A continuación se muestran las ecuaciones de significación según el modelo utilizado, donde las variables significativas para cada día y su signo correspondiente se encuentran resaltadas en negrita.

Día 1

$$FPasa = 0.2 + 0.06X_1 - 0.04X_2 + \mathbf{0.16X_3} + 0.008X_4 + \mathbf{0.14X_5} - 0.04X_6 - 0.02X_7 - \mathbf{0.14X_8} - \mathbf{0.14X_9}$$

[3.1]

$$Ef = 0.1$$

Dentro de las variables independientes que resultaron significativas se encuentra el pH del medio, en este caso el nivel superior (pH=6). Este resultado coincide con lo reportado por (Gupta *et al.*, 1990), en el estudio para la producción de celulasa por *Coprinus attramentarius* utilizando celulosa como sustrato. Otra de las variables que resultó significativa fue el uso de la menor concentración de bagazo (1%) lo que coincide con lo reportado por (Lee *et al.*, 2011) los cuales detectaron un decrecimiento del 50% de la actividad FPasa al usar mayores concentraciones de bagazo (0.75 kg y 1.0 kg) con respecto a lo obtenido usando 0.5 kg con *Aspergillus niger* USM AI 1. Esto puede deberse a la dificultad de las enzimas para penetrar en la compleja estructura del bagazo pretratado, aspecto que debe ser mejorado aplicando otros pretratamientos. Resultó significativo también el uso de la menor concentración de inóculo (5%), lo que resulta atractivo por los beneficios económicos que reporta.

La presencia de miel final en el medio fue la variable de mayor significación estadística, constituyendo un resultado novedoso, puesto que en la literatura consultada no se encontraron referencias del uso de la miel como inductor en la producción de enzimas celulolíticas. Debe significarse que la miel final es un subproducto en la producción azucarera, y es rica en sustancias originalmente presentes en el jugo, tales como probióticos, proteínas, minerales etc, por lo que resulta un elemento rico en nutrientes para la fermentación. Por otra parte, al ser un subproducto tiene un menor costo lo cual favorece el proceso desde el punto de vista económico.

Día 2

$$FPasa=0.04+0.04X_1-0.04X_2+0.04X_3+0.04X_4+0.04X_5-0.04X_6-0.04X_7-0.04X_8-0.04X_9$$

[3.2]

$$Ef = 0.04$$

El comportamiento es similar al primer día pero pasan a ser significativas todas las variables en estudio aunque con diferentes niveles de significación. El análisis conjunto de estas variables indica que está ocurriendo un cambio en la correlación de la importancia de las diferentes variables, en el cual la miel final es menos significativa porque se va consumiendo, a la vez que comienza a ser significativa la utilización del bagazo por lo que el coeficiente de esta variable, aunque aún negativo su valor modular es menor que el primer día.

Día 3

$$FPasa=0.0016-0.0016X_1-0.0016X_2+0.0016X_3-0.0016X_4+0.0016X_5+0.0016X_6-0.0016X_7+0.0016X_8+0.0016X_9$$

[3.3]

$$Ef = 0.001$$

$$\beta\text{-Glucosidasa}=0.04-0.04X_1-0.04X_2+0.04X_3-0.04X_4+0.04X_5+0.04X_6-0.04X_7+0.04X_8+0.04X_9$$

[3.4]

$$Ef = 0.04$$

Al tercer día de fermentación aparece como aspecto significativo el uso de la mayor concentración de bagazo lo que se evidencia por el signo positivo del coeficiente. Es decir, que ya en este momento el microorganismo consumió los azúcares procedentes de la miel final y ha comenzado a utilizar el bagazo como fuente de carbono. Por tal motivo resulta meritorio destacar, el hecho de que se detecta actividad β -Glucosidasa y, para este parámetro respuesta resultan significativas todas las variables independientes del experimento con el mismo comportamiento de la actividad FPasa.

Día 4

$$\beta\text{-Glucosidasa}=0.06-0.06X_1-0.018X_2+0.04X_3-0.04X_4+0.06X_5+0.04X_6-0.018X_7+0.04X_8+0.018X_9 \quad [3.5]$$

$$E_f = 0.04$$

$$\beta\text{-Endoglucanasa}=0.018+0.0004X_1-0.002X_2+0.002X_3+0.0004X_4+0.002X_5-0.0004X_6-0.002X_7-0.0004X_8-0.0004X_9 \quad [3.6]$$

$$E_f = 0.0007$$

Al cuarto día se detectan las actividades β -Endoglucanasa y β -glucosidasa. Las variables independientes que resultaron significativas para la β -glucosidasa fueron glucosa, pH, velocidad de agitación, uso de la miel final, el uso del surfactante y el mayor tamaño de inóculo. El uso de glucosa en el medio puede disminuir esta actividad, ya que dicha enzima es inhibida por este, su producto de hidrólisis. (Muthuvelayudham y Viruthagiri, 2006), (Szijarto *et al.*, 2004)

Día 5

$$FPasa=0.002+0.002X_1+0.002X_2-0.002X_3-0.002X_4-0.002X_5+0.002X_6-0.002X_7+0.002X_8-0.002X_9 \quad [3.7]$$

$$E_f = 0.002$$

$$\beta\text{-Glucosidasa}=0.06-0.06X_1-0.02X_2+0.04X_3-0.04X_4+0.06X_5+0.04X_6-0.02X_7+0.04X_8+0.02X_9 \quad [3.8]$$

$$E_f = 0.04$$

$$\beta\text{-Endoglucanasa}=0.002+0.002X_1-0.002X_2+0.002X_3+0.002X_4+0.002X_5-0.002X_6-0.002X_7-0.002X_8-0.002X_9 \quad [3.9]$$

$$E_f = 0.002$$

El quinto día de fermentación se detectan las 3 actividades enzimáticas del complejo celulolítico. La β -glucosidasa es la mayor actividad enzimática detectada (0.3 UI/mL), resultado lógico ya que es la enzima que último se expresa en el mecanismo de acción de las celulasas, liberando las moléculas de glucosa a partir de la celobiosa y otros oligómeros resultado de la actuación de las otras enzimas.

Para la β -glucosidasa resultaron significativas las mismas variables independientes que para el 4to día de fermentación, excepto el uso de un mayor nivel de otra fuente de nitrógeno como la proteasa peptona y destacando el uso del surfactante Twen 80 por el efecto de aumento de esta actividad enzimática que provoca los días 3, 4 y 5, con su pico de efecto

(0.3 U/mL) este último, lo cual se puede apreciar en la figura 9. Esto puede estar determinado por los mecanismos de acción de los surfactantes como los cambios en la ultraestructura del sustrato, haciendo la celulosa más accesible al ataque enzimático (Helle *et al.*, 1993) el aumento de la estabilidad enzimática, por reducir la desnaturalización térmica o la desnaturalización por fuerzas de cizallamiento (Park *et al.*, 2004) y la prevención de la inactivación de las enzimas adsorbidas por el sustrato. (Castanon y Wilke, 1981)

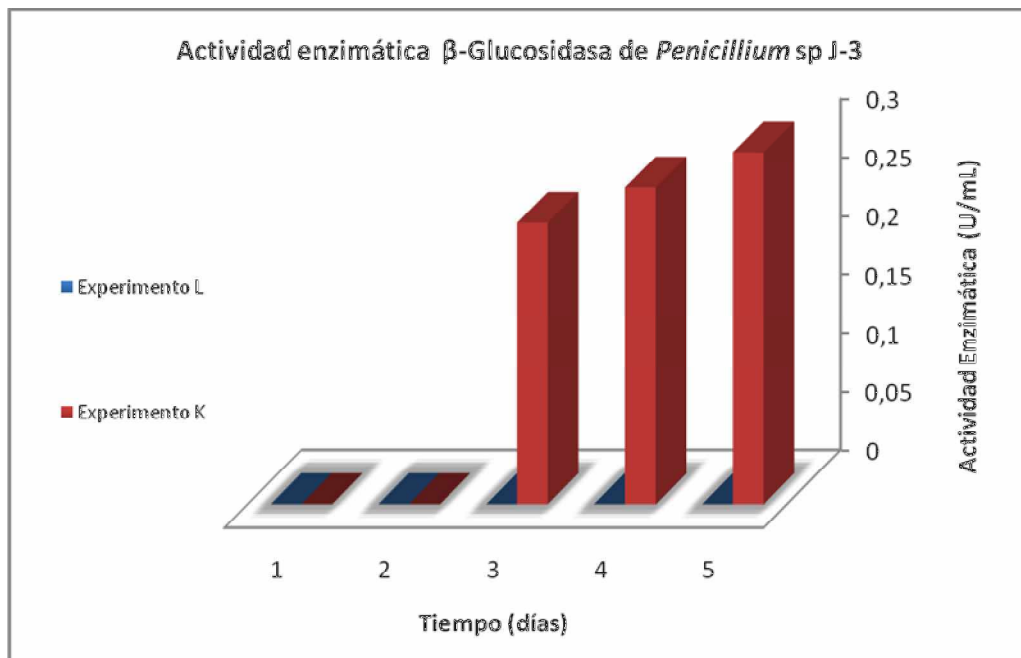


Figura 9 Efecto del uso de Tween 80 en la actividad enzimática β -Glucosidasa de *Penicillium* sp J-3 en los experimentos K y L.

3.4.2 Proteínas de *Penicillium* sp J-3

Tabla X Contenido de proteínas de los cultivos de *Penicillium* sp J-3.

Experimento	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
	Proteína (mg/mL)	Proteína (mg/mL)	Proteína (mg/mL)	Proteína (mg/mL)	Proteína (mg/mL)
A	1,16	0,77	0,88	0,71	0,49
B	0,72	0,66	1,23	1,29	0,64
C	0,82	0,71	1,1	1,07	0,97
D	1,17	2,79	3,14	2,93	2,86
E	0,24	0,18	0,25	0,35	0,22
F	1,63	0,74	0,78	0,9	0,81
G	1,58	1,87	2,79	2,46	2

H	0,55	0,48	0,78	0,6	0,54
I	0,43	0,84	2,24	2	0,79
J	1,23	0,46	1,04	1,4	1,61
K	2,89	1,25	0,31	0,5	0,78
L	0,16	0,17	0,48	0,38	0,24

En la tabla X se presentan los contenidos de proteínas del líquido de fermentación en los diferentes experimentos durante los cinco días del estudio. Se destacan los valores de los experimentos D, G y K, y aunque podría presumirse que esta proteína corresponde a enzima formada, ello no concuerda con la situación del experimento D, en el cual no se detectó actividad enzimática y sí un fuerte crecimiento celular. En los casos G y K si hay una correspondencia entre el contenido de proteínas y los valores de actividad enzimática.

3.4.2.1 Análisis estadístico de los resultados de proteínas.

Se realizó el análisis estadístico de los resultados siguiendo el diseño antes mencionado.

A continuación se muestran las ecuaciones de significación según el modelo utilizado, donde las variables significativas para cada día y su signo correspondiente se encuentran resaltadas en negrita.

Día 1

$$\text{Proteínas} = 0.2 - 0.16X_1 - 0.18X_2 + 0.26X_3 - 0.2X_4 + \mathbf{1X_5} + 0.08X_6 - 0.14X_7 + 0.28X_8 - \mathbf{0.6X_9}$$

[3.10]

$$Ef = 0.42$$

Día 2

$$\text{Proteínas} = 1.82 + \mathbf{0.64X_1} + 0.12X_2 + 0.04X_3 + \mathbf{0.48X_4} + \mathbf{0.78X_5} + \mathbf{0.42X_6} - \mathbf{0.48X_7} - \mathbf{0.44X_8} + 0.14X_9$$

[3.11]

$$Ef = 0.27$$

Día 3

$$\text{Proteínas} = 4.24 + \mathbf{1.28X_1} - 0.04X_2 + 0.02X_3 + \mathbf{0.82X_4} + \mathbf{1.08X_5} + \mathbf{0.42X_6} - 0.2X_7 - \mathbf{1X_8} - \mathbf{0.8X_9} \quad Ef =$$

$$0.21$$

[3.12]

Día 4

$$\text{Proteínas} = 2.42 + 1.16X_1 - 0.014X_2 - 0.06X_3 + 0.64X_4 + 0.64X_5 + 0.36X_6 - 0.2X_7 - 0.2X_8 - 0.2X_9$$

[3.13]

$$E_f = 0.14$$

Día 5

$$\text{Proteínas} = 3.4 + 0.8X_1 + 0.004X_2 - 0.24X_3 + 0.78X_4 + 1X_5 + 0.2X_6 + 0.68X_7 - 0.36X_8 - 0.16X_9$$

[3.14]

$$E_f = 0.12$$

En el análisis para el parámetro respuesta concentración de proteínas, también resultó significativo el uso de la miel final durante todos los días de fermentación lo cual se puede apreciar en la figura 10 donde los experimentos C y K a los cuales se añadió este inductor expresaron mayor concentración de proteínas lo cual puede deberse al alto contenido de nutrientes que posee. Es importante destacar que la miel se utiliza como sustrato para la obtención de biomasa proteica para alimento animal, lo cual es indicativo de sus numerosas aplicaciones industriales.

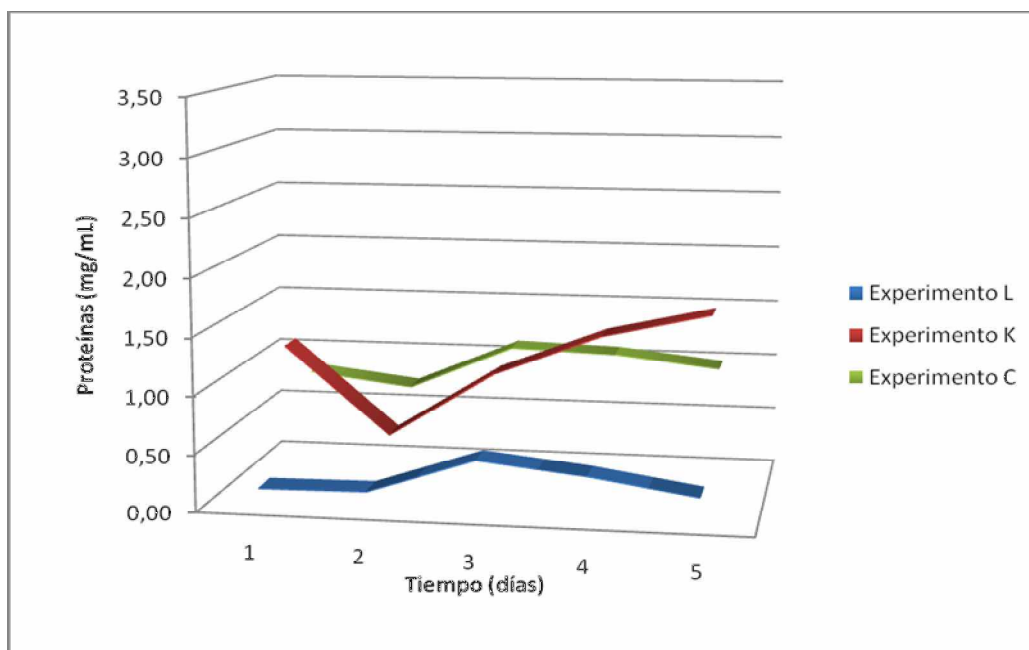


Figura 10. Efecto del uso de miel final como inductor en el contenido de proteínas de los cultivos de *Penicillium* sp J-3 en los experimentos K y C (con miel final) y L (sin miel final).

Consideraciones generales

En los resultados obtenidos se presenta como novedad del trabajo el empleo de la miel final como inductor para la obtención de enzimas celulolíticas a partir del bagazo

pretratado, además, los valores obtenidos de FPasa con *Penicillium* sp. J-3 en determinadas condiciones de cultivo son superiores a lo reportado en la literatura. Aunque los valores de las concentraciones enzimáticas obtenidas no son suficientes para la realización de una hidrólisis enzimática eficiente, no cabe duda de que la estrategia seguida debe ser continuada pues muestra un camino a seguir en las investigaciones futuras.

Conclusiones.

Conclusiones.

1. Los resultados obtenidos con ambos hongos utilizados, *Trichoderma harzianum* y *Penicillium* sp. J-3, muestran su capacidad celulolítica con la aplicación de ensayos cualitativos.
2. En los experimentos que contenían sacarosa como inductor se detectaron niveles mayores de FPasa que los que no lo contenían, lo que hace factible su uso como inductor sobre el proceso de obtención de crudos con actividad enzimática celulolítica.
3. Se definió la cepa de mayor actividad enzimática celulolítica con la cual se continuó el trabajo: *Penicillium* sp. J-3.
4. Los resultados obtenidos en la determinación de actividad enzimática celulolítica de *Penicillium* sp. J-3 sobre bagazo de caña de azúcar pretratado apuntan hacia la influencia de otros factores en el proceso de producción de crudos con actividad enzimática celulolítica.
5. Con el diseño factorial saturado Plackett-Burmann aplicado al estudio de la influencia de varios factores sobre el proceso de producción de crudos con actividad enzimática celulolítica de *Penicillium* sp. J-3, se demuestra que tienen una influencia notable el uso de la miel final, el Tween 80, el pH y el tamaño de inóculo.
6. Con el análisis del diseño factorial saturado de Plackett-Burmann durante la realización de la fermentación se demuestra que el tiempo influye en la significación y en el comportamiento de las variables.
7. El uso exitoso de la miel como inductor abre perspectivas a la utilización de este subproducto en la producción de crudos con actividad enzimática celulolítica, de gran importancia en el futuro de la transformación de residuos lignocelulósicos para la obtención de glucosa y otros productos, a la vez materia prima de la industria fermentativa derivada del azúcar.

Recomendaciones.

Recomendaciones

En base a los resultados obtenidos en este trabajo proponemos las siguientes ideas:

1. Propiciar el trabajo conjunto e interdisciplinario de las facultades de Ciencias Agropecuarias y Química Farmacia en el desarrollo de una línea de biotecnología que permita diversificar la industria azucarera y obtener valiosos derivados a partir de lograr:
 - 1.1 Ensayar diferentes condiciones de pretratamientos del bagazo de la caña de azúcar como sustrato para la producción de enzimas celulolíticas.
 - 1.2 Continuar con la optimización de las condiciones de cultivo y producción de crudos enzimáticos de *Penicillium* sp. J-3
 - 1.3 Evaluar la realización de cultivos mixtos con el microorganismo estudiado *Penicillium* sp. J-3 para el incremento de las actividades enzimáticas, tal y como está reportado en la literatura.
 - 1.4 Evaluar el efecto de realizar mutaciones químicas o físicas al *Penicillium* sp. J-3 para el incremento de las actividades enzimáticas.
 - 1.5 Estudiar otras cepas naturales con actividad celulolítica para ampliar el espectro de cepas propias con esta capacidad.

Bibliografía.

Bibliografía.

1. 2002. *Penicillium chrysogenum* Thom. *Rev Iberoam Micol*
2. AGUIAR, C. L. 2001. BIODEGRADACIÓN DE CELULOSA DE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR POR HONGOS CELULOLÍTICOS. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 3.
3. ASLAM, N., SHIEKH, M. A., ASHRAF, M. y A.JAMIL 2010. EXPRESSION PATTERN OF TRICHODERMA CELLULASES UNDER DIFFERENT CARBON SOURCES *Pak. J. Bot.* , 42, 2895-2902.
4. BANERJEE, R. y PANDEY, A. 2002. Bio-industrial applications of sugarcane bagasse: A technological perspective. *Int. Sugar J*, 104, 64-68.
5. BAUDEL, H. M., ZAROR, C. y ABREU, C. D. 2005. Improving the value of sugarcane bagasse wastes via integrated chemical production systems: an environmentally friendly approach. *Ind Crops Prod*, 21.
6. BEGUIN, P. y AUBERT, J. P. 1994. The biological degradation of cellulose. *Microbiol Rev*, 13, 25-58.
7. BERLIN, A., MAXIMENKO, V., GILKES, N. y SADDLER, J. 2007. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. . *Biotechnol Bioeng.*, 97, 287-296.
8. BHAT, M. K. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. . *Biotechnol Adv.*, 18, 355-383.
9. BHAT, M. K. y HAZLEWOOD, G. P. (eds.) 2001. *Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases.*: CABI Publishing.
10. CARRILLO, L. 2001. LOS HONGOS DE LOS ALIMENTOS Y FORRAJES [Online]. Available: www.unsa.edu.ar [Accessed 2 junio 2011].
11. CASTANON, M. y WILKE, C. 1981. Effects of the surfactant Tween 80 on enzymatic hydrolysis of newspaper. *Biotechnol Bioeng.*, XXIII.
12. CERONI, A. & GUTIÉRREZ-CORREA, M. 1988. "Producción de celulasas por hongos: estudios cinéticos en hongos silvestres". *Boletín de Lima*.
13. CORREA, M. G., PORTAL, L., MORENO, P. y TENDERDY, R. 1999. Mixed cultures solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. *Bioresources Technology*, 68, 173-178.
14. COUTO, S. R.-. y SANROMÁN, A. 2005. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal* 22, 211-219.
15. CHEN, W.-M., TSENG, Z.-J., LEE, K.-S. y CHANG, J.-S. 2005. Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic sewage sludge. . *Int J Hydrogen Energy*, 30, 1063-1070.
16. DELMER, D. P. y AMOR, Y. 1995. Cellulose Biosynthesis. *Plant Cell*.
17. FLACHNER, B. y RÉCZEY, K. 2004. b-Glucosidase Production and Characterization of Some *Aspergillus* Strains. *Chem. Biochem. Eng*, 18, 303-307
18. FORCHIASSIN, F. y PAPINUTTI, V. L. 2007. Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation. *J. Food Eng*, 81, 54-59.

20. GALBE, M. y ZACCHI, G. 2002. A review of the production of ethanol from softwood. *Appl Microbiol Biotechnol* 59, 618-628.
21. GÁLVEZ, L. O. 2000. La producción diversificada de la agroindustria de la caña de azúcar. . In: GÁLVEZ, L. O. (ed.) *Manual de los derivados de la caña de azúcar* . Tercera Edición ed. La Habana, Cuba.
22. GASTÓN, C., BAMBANASTE, R., CORREA, J., ALFONSO, G. y M.HERRYMAN 2000. Bagazo. In: GÁLVEZ, E. L. O. (ed.) *En Manual de los derivados de la caña de azúcar*. Tercera Edición ed. La Habana, Cuba.
23. GHANEM, N. B., YUSEF, H. H. y MAHROUSE, H. K. 2000. Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid state cultures: application of the Plackett–Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. *Biores Technol*, 73.
24. GRAY, K. A., ZHAO, L. S. y EMPTAGE, M. 2006. Bioethanol. . *Curr Opin Chem Biol*, 10.
25. GUPTA, V. K., SINGH, A. y KALRA, M. S. 1990. Microbial proteins and cellulase production from cellulosic materials by *Coprinus attramentarius*. *J. Res. Punjab. Agri. Univ.*, 27, 623-631.
26. GUSAKOV, A. V. y SINITSYN, A. P. 1992. A theoretical analysis of cellulase product inhibition - Effect of cellulase binding constant, enzyme substrate ratio, and beta-glucosidase activity on the inhibition pattern. *Biotechnol Bioeng.* , 40, 663-671.
27. HELLE, S. S., DUFF, S. J. B. y COOPER, D. G. 1993. Effect of surfactants on cellulose hydrolysis. *Biotechnol Bioeng.*, 42.
28. HERNÁNDEZ, A. O. 2008. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS POR *Trametes sp. EUM1* EN CULTIVO SÓLIDO MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
29. ISACCCSON, W. B. 1970. Statistical Analyses for Multivariable Systems. *Chemical Engineering* 29, 69-75.
30. JING, D., LI, P., STAGNITTI, F. y XIONG, X. 2007. Optimization of laccase production from *Trametes versicolor* by solid fermentation. *Canadian Journal of Microbiology*, 53, 245-251.
31. JORGENSEN, H. y OLSSON, L. 2006. Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888 - Effect of substrate on hydrolytic performance. . *Enzyme Microb Technol*, 38.
32. KOVÁCS, K. 2009. PRODUCTION OF CELLULOLYTIC ENZYMES WITH *TRICHODERMA ATROVIRIDE* MUTANTS FOR THE BIOMASS-TO-BIOETHANOL PROCESS Thesis Doctoral
33. KUO, C.-H. y LEE, C.-K. 2009. Enhanced enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse by N-methylmorpholine-N-oxide pretreatment. *Bioresource Technology*, 100, 866-871.
34. LYND, L. R., WEIMER, P. J., ZYL, W. H. V. y PRETORIUS, I. S. 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. . *Microbiol Molecul Biol Rev*, 66.
35. MACH, R. L. y ZEILINGER, S. 2003. Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. . *Appl Microbiol Biotechnol*, 60, 515-522.
36. MARGEOT, A., HAHN-HAGERDAL, B., EDLUND, M., SLADE, R. y MONOT, F. 2009. New improvements for lignocellulosic ethanol. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 1-9.
37. MESSNER, R. y KUBICEK, C. P. 1990. Evidence for a single, specific beta-glucosidase in cell walls from *Trichoderma reesei* QM9414. *Enzyme Microb Technol.*, 12.

38. MURRAY, P., ARO, N., COLLINS, C., GRASSICK, A., PENTTILA, M., SALOHEIMO, M. y M.TUOHY 2004. Expression in *Trichoderma reesei* and characterisation of a thermostable family 3 beta-glucosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*. *Protein Expr Purif.* , 38, 248-257.
39. MUTHUVELAYUDHAM, R. y VIRUTHAGIRI, T. 2006. Fermentative production and kinetics of cellulase protein on *Trichoderma reesei* using sugarcane bagasse and wheat straw. *Afr. J. Biotechnol.*, 5, 1873-1888.
40. NAGHAM, A., SABAH, Y., HAJALI, A. y AZMEH, M. F. 2006. Optimization of cellulase production by submerged fermentation of agriculture wastes by *Trichoderma* spp. .
41. OJUMU, T., SOLOMON, B., BETIKU, E., LAYOKUN, S. y AMIGUN, B. 2003. Cellulase Production by *Aspergillus flavus* Linn Isolate NSPR 101 fermented in sawdust, bagasse and corncob. *African Journal of Biotechnology*, 2 (6), 150-152.
42. PARK, J., TAKAHATA, Y., KAJIUCHI, T. y AKEHATA, T. 2004. Effects of nonionic surfactant on enzymatic hydrolysis of used newspaper. . *Biotechnol and Bioeng.*, 39, 117-120.
43. PEREZ, L., MUNOZ-DORADO, J., RUBIA, T. D. L. y MARTINEZ, J. 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: An overview. *Int Microbiol.*, 5, 52-63.
44. PITT, J. I. 1980. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. *Academic Press*. London.
45. PLACKETT, R. L. y BÜRMAN, J. L. 1946. The design of multifactorial experiment. *Biometrika.*, 33.
46. PULS, J., STORK, J. y SCHUSEIL, J. 1993. Reactions of isolated cellulases, hemicellulases and ligninases with fibrous materials and isolated components of wood. *Papier*, 47, 719-728.
47. RAIMBAULT, M. GENERAL AND MICROBIOLOGICAL ASPECTS OF
48. SOLID SUBSTRATE FERMENTATION. *In: LABORATOIRE DE BIOTECHNOLOGIE MICROBIENNE TROPICALE, C. O.-L. (ed.). Montpellier (France).*
49. RAMIREZ, O. y URREGO, F. Producción de celulasas a partir del hongo *Trichoderma sp* y aprovechamiento de la fibra prensada de palma como medio de cultivo.
50. RAMOS, L. P., BREUIL, C., KUSHNER, D. J. y SADDLER, J. N. 1992. Steam pretreatment conditions for effective enzymatic hydrolysis and recovery yields of *Eucalytus viminalis* wood chips. . *Holzforschung*, 46.
51. SADDLER, J. N., HOGAN, C. M. y LOUISSEIZE, G. 1985. A comparison between the cellulase systems of *Trichoderma harzianum* E58 and *Trichoderma reesei* C30. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 22.
52. SAHA, B. C. 2003. Hemicellulose bioconversion. *J Ind Microbiol Biotechnol.* , 30.
53. SALGADO, C. H., LARRAMENDI, L. R., ARJONA, C., PUERTAS, A. y FONSECA, M. A. 1999. EFECTO DE LA APLICACION DE *Trichoderma harzianum* R. SOBRE LA COMPOSICION CUANTITATIVA DE BACTERIAS, HONGOS Y ACTINOMICETOS DE LA RIZOSFERA DE SOLANACEAS Y SU INFLUENCIA EN EL CRECIMIENTO VEGETATIVO. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.* , 14
54. SARATALE, G. D., CHEN, S., LO, Y., SARATALE, R. G. y J.CHANG 2008. Outlook of biohydrogen production from lignocellulosic feedstock usin dark fermentation - a review. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 67, 962-979.

55. SASKA, M. y GRAY, M. 2006. Pre-treatment of sugarcane leaves and bagasse pith with lime-impregnation and steam explosion for enzymatic conversion to fermentable sugars. . *28th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals* Nashville, TN . .
56. SASSNER, P., GALBE, M. y ZACCHI, G. 2008. Techno- economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy* 32, 422-430.
57. SEIBOTH, B., HARTL, L., PAIL, M., FEKETE, E., KARAFFA, L. y KUBICEK, C. P. 2004. The galactokinase of *Hypocrea jecorina* is essential for cellulase induction by lactose but dispensable for growth on D-galactose. *Mol Microbiol*, 51, 1015-1025.
58. SJÖSTRÖM, E. 1993. Wood chemistry. Fundamentals and applications. *Academic Press*. San Diego.
59. STEINER, J., SOCHA, C. y EYZAGUIRRE, J. 1994. Culture conditions for enhanced cellulose production by a native strain of *Penicillium purpurogenum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 10, 280-284.
60. SUN, Y. y CHENG, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic material from ethanol production: A review. *Biores. Technol.*, 83, 1-11.
61. SZIJARTO, N., SZENGYEL, Z., LIDEN, G. y RECZEY, K. 2004. Dynamics of cellulase production by glucose grown cultures of *Trichoderma reesei* Rut-C30 as a response to addition of cellulose. . *Appl. Biochem. Biotechnol*, 115, 113-116.
62. TEERI, T. T. 1997. Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends Biotechnol.*, 15.
63. TEIXEIRA, L. C., LINDEN, J. C. y SCHROEDER, H. A. 1999. Optimizing peracetic acid pretreatment conditions for improved simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of sugar cane bagasse to ethanol fuel. *Renewable Energy*, 16, 1070-1073.
64. TIEN, M. y KIRK, T. K. 1988. Lignin peroxidases of *P. chrysosporium*. . *Methods Enzymol*, 161.
65. VALENZUELA, C. A. H. 2004. *Evaluación de la capacidad biocontroladora de dos cepas nativas de Trichoderma spp. sobre aislados de hongos Basidiomycetes asociados a muerte de brazos en kiwi.*, Universidad de Talca.
66. VARGAS, G. 2005. *Avanços em biotecnologia de hemicelulose para produção de etanol por Pichia stipitis.* . Tesis presentada en opción al grado de máster en Ciencias, Universidad Federal de Río de Janeiro.
67. VARNAITÉ, R., PAŠKEVIČIUS, A. y RAUDONIENĖ, V. 2008. Cellulose degradation in rye straw by micromycetes and their complexes. *EKOLOGIJA*, 54 (1), 29-31.
68. VILCHES, L. 2002. *Determinación de la actividad de exonucleasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz.* . Tesis de Biólogo con mención en Microbiología y Parasitología. , Universidad Nacional Mayor de San Marcos. .
69. WEN, Z., LIAO, W. y CHEN, S. 2005. Production of cellulase/beta-glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure. . *Process Biochemistry*, 40.
70. WINGREN, A., GALBE, M. y ZACCHI, G. 2004. Techno-Economic Evaluation of Producing Ethanol from Softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of Bottlenecks. *Biotechnol Prog*, 19, 1109-1117.
71. WYMAN, C. E., DALE, B. E., ELANDER, R. T., HOLTZAPPLE, M., LADISCH, M. R. y LEE, Y. Y. 2005. Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover. . *Biores Technol*, 96, 2026-2032.

72. XIA, L. M. y SHEN, X. L. 2004. High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. *Bioresour Technol*, 91, 259-262.
73. ZENG, G. M., SHI, J. G., YUAN, X. Z., LIU, J., ZHANG, Z. B., HUANG, G. H., LI, J. B., XI, B. D. y LIU, H. L. 2006. Effects of Tween 80 and rhamnolipid on the extracellular enzymes of *Penicillium simplicissimum* isolated from compost. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 1451-1456.