

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA
ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA BIOLÓGICAS



“PRODUCCIÓN DE CELULASAS Y XILANASAS DE *Aspergillus niger* EN TRES SISTEMAS DE FERMENTACIÓN”

Presentada por:

NORMA NÉLIDA GAMARRA MENDOZA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTORIS PHILOSOPHIAE EN CIENCIAS E INGENIERÍA
BIOLÓGICAS**

Lima – Perú

2024

TESIS DE DOCTORADO 2024 N. Gamarra (1).pdf

INFORME DE ORIGINALIDAD

15%	15%	7%	%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	Gretty Villena Chávez, Ph.D Asesora	1%
2	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet		1%
3	ulspace.ul.ac.za Fuente de Internet		1%
4	link.springer.com Fuente de Internet		1%
5	dev.scielo.org.pe Fuente de Internet		1%
6	academic.oup.com Fuente de Internet		1%
7	Norma N. Gamarra, Gretty K. Villena, Marcel Gutiérrez-Correa. "Cellulase production by <i>Aspergillus niger</i> in biofilm, solid-state, and submerged fermentations", Applied Microbiology and Biotechnology, 2010 Publicación		<1%

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA AGRARIA

LA MOLINA

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA BIOLÓGICAS

**“PRODUCCIÓN DE CELULASAS Y XILANASAS DE *Aspergillus niger* EN
TRES SISTEMAS DE FERMENTACIÓN”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTORIS PHILOSOPHIAE**

Presentada por:

NORMA NÉLIDA GAMARRA MENDOZA

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

**Ftc0Fqt k' \ À° li c'F^a xlc
"RTGUK GP VG**

**Rj (F 0I t gw{ 'Xlngpc'Ej^a xg|
"CUGUQT C**

**Ft0Fcxk' Eco rquI wlgttg|
"O KGO DTQ**

**Ftc0Ecto gp'Xng| o qtq'Ucpej g|
"O KGO DTQ**

**Ftc0Ecto gp'Vco ct k' f pi ggu
"O KGO DTQ'GZVGTP Q**

DEDICATORIA

A mis padres Gavino[†] y Justina[†] por darme la vida y sobre todo a mi madre por su ejemplo de resiliencia, que me inspiró a enfrentar muchos retos y alcanzar el éxito, ejemplo de mujer valerosa.

A mis hermanos Andres, Florinda, Elsa y Raúl[†] y a todos mis sobrinos, por su compañía, alegría y comprensión

AGRADECIMIENTO

Al Ph. D. Marcel Gutiérrez Correa, por su valiosa enseñanza durante los estudios de doctorado y haberme guiado en el desarrollo de la tesis que ha permitido fortalecerme académica y científicamente.

A la Ph. D. Greta Katherine Villena Chávez, por su gran apoyo y colaboración en el desarrollo de la tesis, expreso mi reconocimiento por compartir sus conocimientos y paciencia en los momentos difíciles.

Al Programa para la Innovación y Competitividad del Agro Peruano (INCAGRO), por el financiamiento para los estudios y ejecución de la tesis.

A todos los profesores e investigadores del Programa de Doctorado en Ciencias e Ingeniería Biológicas por sus enseñanzas, sugerencias y aportes de conocimientos.

A todas las instituciones públicas y privadas que contribuyeron en la ejecución de la tesis

A todas las personas que de una y otra manera me apoyaron a culminar este objetivo

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 GENERO ASPERGILLUS	6
2.2 <i>Aspergillus niger</i> : CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	8
2.3 GERMINACIÓN DEL <i>Aspergillus niger</i>	8
2.4 <i>Aspergillus niger</i> : IMPORTANCIA EN LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS PRIMARIOS.....	9
2.5 CELULASAS.....	11
2.5.1 Estructura molecular de celulasas	11
2.5.2 Celulasas: mecanismo de acción catalítica.....	12
2.5.3 Regulación de la síntesis y producción de celulasas	13
2.5.4 Mejoramiento de la producción de celulasas	15
2.5.5 Importancia y aplicación de celulasas	16
2.5.5.1 Industria de procesamiento de alimentos.....	16
2.5.5.2 Industriaa de alimentos para animales.....	18
2.5.5.3 Industria textil.....	19
2.5.5.4 Industria de pulpa y papel.....	22
2.5.5.5 Biocombustibles.....	23
2.5.5.6 Lavandería y detergentes	24
2.5.5.7 Agricultura.....	25
2.5.6 Mercado mundial de celulasas	26
2.6 XILANASAS Y PROPIEDADES BIOQUÍMICAS.....	28
2.6.1 Regulación de la síntesis de xilanasas.....	29
2.6.2 Fuente de xilanasas.....	30
2.6.3 Producción de xilanasas y factores que afectan su rendimiento	31
2.6.4 Aplicación de xilanasas	32
2.6.5 Mecanismo de acción de xilanasas.....	33

2.7 β – GLUCOSIDASAS, PROPIEDADES BIOQUÍMICAS Y FUNCIÓN	35
2.7.1 Importancia y aplicación de las β – glucosidasa	36
2.8 FERMENTACIÓN.....	37
2.8.1 Tipos de fermentación según el medio de cultivo.....	39
2.8.1.1 Fermentación sumergida, aspectos generales.....	39
2.8.1.2 Fermentación en biopelículas, aspectos generales.....	40
2.8.1.3 Fermentación en estado sólido, aspectos generales.....	44
III. MATERIALES Y MÉTODOS	52
3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN	52
3.2 MATERIALES.....	52
3.2.1 Microorganismos.....	52
3.3 MÉTODOS.....	52
3.3.1 Preparación del inóculo y medio de cultivo	52
3.3.2 Soporte inerte para cultivo de <i>A. niger</i> en fermentación en estado sólido (FES), y en biopelículas (FB)	53
3.3.3 Cultivos en fermentación sumergida (FS) y fermentación en biopelículas (FB) ..	54
3.3.4 Cultivos en fermentación en estado sólido (FES)	54
3.3.5 Análisis con microscopía óptica y microscopía electrónica de crio-barrido.....	55
3.3.6 Análisis del producto fermentado	56
3.3.6.1 Análisis de la biomasa.....	56
3.3.6.2 Determinación de actividad de celulasas y xilanasas.....	56
3.3.6.3 Determinación de lactosa residual.....	57
3.3.6.4 Determinación de proteína soluble.....	57
3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL Y PROCESAMIENTO DE DATOS.....	57
3.5 MODELOS MATEMÁTICOS	58
3.6 ANÁLISIS DE ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.....	60
3.6.1 Gel de Poliacrilamida nativa azul (DN – PAGE).....	60

3.6.2 Gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS – PAGE)	60
3.6.3 Zimografía para la identificación de la actividad de Endoglucanasas (EG) en SDS - PAGE.....	61
3.6.4 Zimografía en PAGE para la identificación de la actividad de β – glucosidasa ...	62
3.6.5 Zimografía en SDS - PAGE para la identificación de la actividad de Xilanasas ...	62
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	63
4.1 ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ÓPTICA Y CRIO MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.....	63
4.2 PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE <i>A. niger</i> Y CONSUMO DE SUSTRATO EN TRES SISTEMAS DE FERMENTACIÓN	68
4.3 PRODUCCIÓN DE CELULASAS, ENDOGLUCANASAS Y XILANASAS DE <i>A. niger</i> ATCC 10864 EN TRES SISTEMAS DE FERMENTACIÓN	71
4.4 CONSUMO DE LACTOSA DE <i>A. niger</i> ATCC 10864 EN LA PRODUCCIÓN DE CELULASAS Y XILANASAS EN TRES SISTEMAS DE FERMENTACIÓN	77
4.5 ELECTROFOREGRAMAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA NO DESNATURANTE (DN – PAGE) DE EXTRACTOS PROTEICOS DE <i>Aspergillus niger</i> EN TRES SISTEMAS DE FERMENTACIÓN	79
4.6 ELECTROFOREGRAMAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON SULFATO DODECIL DE SODIO (SDS – PAGE) DE EXTRACTOS PROTEICOS DE <i>Aspergillus niger</i> EN TRES SISTEMAS DE FERMENTACIÓN	81
4.7 ZIMOGRFIA DE ENDOGLUCANASAS DE <i>Aspergillus niger</i> ATCC 10864 PRODUCIDO EN TRES SISTEMAS DE FERMENTACIÓN.....	85
4.8 ZIMOGRFIA DE β - GLUCOSIDASAS DE <i>Aspergillus niger</i> ATCC 10864 PRODUCIDO EN TRES SISTEMAS DE FERMENTACIÓN.....	92
4.9 ZIMOGRFIA DE XILANASAS DE <i>Aspergillus niger</i> ATCC 10864 PRODUCIDO EN TRES SISTEMAS DE FERMENTACIÓN.....	94
V. CONCLUSIONES.....	97
VI. RECOMENDACIONES.....	100

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	101
VIII. ANEXOS	134

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Clasificación del género <i>Aspergillus</i>	6
Cuadro 2: Comparación del crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 10864 en tres sistemas de fermentación.....	68
Cuadro 3: Comparación de los parámetros de productividad de celulasas (FPA) por <i>Aspergillus niger</i> en 72 horas de cultivo en diferentes sistemas fermentación	74
Cuadro 4: Comparación de los parámetros de productividad de endoglucanasas y xilanasas de <i>A. niger</i> en 72 h de cultivo en diferentes sistemas de fermentación	75
Cuadro 5: Peso molecular (kDa) de proteínas secretadas de <i>Aspergillus niger</i> en tres sistemas de fermentación	84
Cuadro 6: Identificación de endoglucanasas en relación a su peso molecular (kDa) producidas en tres sistemas de fermentación durante 120 horas	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diferentes tipos de <i>Aspergillus</i> que difieren en forma y color	7
Figura 2: Crecimiento de <i>A. niger</i> monitoreado por microscopia electrónica de escaneo	9
Figura 3: Características morfológicas del <i>Aspergillus niger</i>	10
Figura 4: Estructura de endo/exocelulasa E4 de <i>Thermomonospora fusca</i>	12
Figura 5: Mecanismo de celulólisis para la degradación de la celulosa mediante la acción de la celulasas	14
Figura 6: Demanda industrial de celulasas en el mercado Asia – Pacífico, 2016	27
Figura 7: Regulación de la síntesis de xilanasas	30
Figura 8: Sitios de hidrólisis por las enzimas xilanolíticas en la molécula de xilano	30
Figura 9: Principales eventos bioquímicos desarrollado por las levaduras en una fermentación sumergida para producir cerveza:	38
Figura 10: Diferentes fases de formación de biopelículas de <i>Aspergillus fumigatus</i>	43
Figura 11: Estructura interna del sustrato soporte nutricional.....	38
Figura 12: Proceso de germinación de esporas para la formación de colonias	47
Figura 13: Distribución de hongos filamentosos en el sustrato sólido.....	48
Figura 14: Perlita (Agrolita) volcánica.....	53
Figura 15: Cultivo de <i>A. niger</i> ATCC10864 en fermentación sumergida (FS), fermentación en biopelículas (FB) y fermentación en estado sólido (FES).....	55
Figura 16: Imagen al estereoscopio de <i>A. niger</i> en crecimiento adherido en perlitas	64
Figura 17: Micrografías electrónicas de crio – escaneado de adhesión y crecimiento de <i>A.</i> <i>niger</i> en perlitas	67
Figura 18: Cinética del proceso de cultivo de <i>Aspergillus niger</i>	69
Figura 19: Perfil electroforético en gel de poliacrilamida no desnaturalante (DN – PAGE) de extractos proteicos de <i>A. niger</i> en tres sistemas de fermentación	80
Figura 20: Perfil electroforético SDS – PAGE de polipéptidos del extracto fermentado de <i>A.</i> <i>niger</i> obtenido en 72 h en tres sistemas de fermentación.....	83
Figura 21: Unidades polipeptídicas secretadas por <i>A. niger</i> en tres sistemas de fermentación	85
Figura 22: Zimograma de endoglucanasas obtenidos en tres sistemas de fermentación.....	89

Figura 23: Zimograma de endoglucanasas de <i>A. niger</i> ATCC 1066, producidas en tres sistemas de fermentación en 72 horas de cultivo	91
Figura 24: Endoglucanasas en relación a su peso molecular (kDa) producidas en tres sistemas de fermentación en 72 horas.....	91
Figura 25: Zimograma de β – glucosidasa de <i>A. niger</i> producidas en tres sistemas de fermentación a las 72 horas	92
Figura 26: Zimograma de xilanasas de <i>A. niger</i> producidas en tres sistemas de fermentación en 72 horas de cultivo.....	94
Figura 27: Xilanasas y β – glucosidasas en relación a su peso molecular producidas por <i>Aspergillus niger</i> en tres sistemas de fermentación.....	96

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Cellulase production by <i>A. niger</i> in biofilm, solid-state, and submerged.....	134
Anexo 2: Fermentación sumergida (FS), Fermentación en biopelículas y Fermentación en estado sólido.....	135
Anexo 2.1: Parámetros de ajuste y matriz de correlación aproximada de producción de biomasa (Xt) de <i>A. niger</i> ATCC 10864 en fermentación sumergida.....	135
Anexo 2.2: Análisis de regresión de la predicción de biomasa (Xt) producida por <i>A. niger</i> ATCC 10864 en fermentación sumergido	135
Anexo 2.3: Predicción de producción de biomasa (Xt) de <i>A. niger</i> ATCC 10864 en fermentación sumergida	136
Anexo 2.4: Parámetros de ajuste y matriz de correlación aproximada de producción de celulasas (P) de <i>A. niger</i> ATCC 10864 en fermentación sumergida	136
Anexo 2.5: Análisis de regresión para la predicción de producción de celulasas (P) de <i>A. niger</i> ATCC 10864 en fermentación sumergida	136
Anexo 2.6: Predicción de la producción de celulasas (P) de <i>A. niger</i> ATCC 10864 en fermentación sumergida	136
Anexo 2.7: Parámetros de ajuste y matriz de correlación aproximada de producción de biomasa (Xt) de <i>A. niger</i> ATCC 10864 en fermentación en biopelículas.....	137
Anexo 2.8: Análisis de regresión de la predicción de producción de biomasa (Xt) de <i>A. niger</i> ATCC 10864 en fermentación en biopelículas.....	137
Anexo 2.9: Predicción de la producción de biomasa (Xt) de <i>A. niger</i> ATCC 10864 en fermentación en biopelículas.....	137
Anexo 2.10: Parámetros de ajuste y matriz de correlación aproximada de la producción de celulasas (P) de <i>A. niger</i> ATCC 10864 en fermentación en biopelículas..	137
Anexo 2.11: Análisis de varianza de la predicción de producción de celulasas (P) de <i>A. niger</i> ATCC 10864 en fermentación en biopelículas.....	138
Anexo 2.12: Predicción de producción de celulasas (P) de <i>A. niger</i> ATCC 10864 en fermentación en biopelículas.....	138

Anexo 2.13: Parámetros de ajuste y matriz de correlación aproximada de la producción de biomasa (Xt) de <i>A. niger</i> ATCC 10864 en fermentación en estado sólido.....	138
Anexo 2.14: Análisis de regresión de la predicción de producción de biomasa (P) de <i>A. niger</i> ATCC 10864 en fermentación en estado sólido.....	138
Anexo 2.15: Predicción de la producción de biomasa (Xt) de <i>A. niger</i> ATCC 10864 en fermentación en estado sólido.....	139
Anexo 2.16: Parámetros de ajuste y matriz de correlación aproximada de la producción de celulasas (P) de <i>A. niger</i> ATCC 10864 en fermentación en estado sólido.....	139
Anexo 2.17: Análisis de regresión de la predicción de producción de celulasas (P) de <i>A. niger</i> ATCC 10864 en fermentación en estado sólido.....	139
Anexo 2.18: Predicción de la producción de celulasas (P) de <i>A. niger</i> ATCC 10864 en fermentación en estado sólido.....	139
Anexo 3	140
Anexo 3.1: Determinación de la movilidad electroforética (Rf) de los estándares de peso molecular (PM) de proteínas.....	140
Anexo 3.2: Curva de calibración de los estándares de peso molecular de proteínas en relación a Rf.....	140
Anexo 3.3: Determinación del peso molecular de las unidades polipeptídicas (UP) del extracto fermentado en FS con <i>A. niger</i> ATCC 10864 en 72 h de cultivo.....	141
Anexo 3.4: Determinación del peso molecular de las unidades polipeptídicas del extracto fermentado en FB con <i>A. niger</i> ATCC 10864 en 72 h de cultivo.....	141
Anexo 3.5: Determinación del peso molecular de las unidades polipeptídicas del extracto fermentado en FES con <i>A. niger</i> ATCC 10864 en 72 h de cultivo.....	141
Anexo 3.6: Curva de calibración de los estándares de peso molecular de proteínas para determinar endoglucanasas, β - glucosidasas y xilanasas.....	142
Anexo 3.7: Determinación de la movilidad electroforética (Rf) y peso molecular de las endoglucanasas (EGs) de los extractos fermentados de FS en 72 h de cultivo	142
Anexo 3.8: Determinación de la movilidad electroforética (Rf) y peso molecular de las endoglucanasas (EGs) de los extractos fermentados de FB en 72 h de cultivo.....	143

Anexo 3.9: Determinación de la movilidad electroforética (Rf) y peso molecular de β - glucosidasas y xilanasas de los extractos fermentados de FS, FB y FES en 72 h de cultivo.....	143
---	-----

LISTA DE SÍMBOLOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AECM	Producción del material extracelular adhesivo
ATCC	Colección Americana de Tipos de Cultivo (American Type Culture Collection)
ATP	Adenosina trifosfato (Adenosine triphosphate)
BGL	β – glucosidasa
CAGR	Tasa compuesta de crecimiento anual (compound annual growth rate)
CBH	Celobiohidrolasas
CBD	Catalizador con dominio de unión
CMB	Módulos no catalíticos de unión
CMC	Carboxil metil celulosa
DN – PAGE	No denaturante en gel de poliacrilamida (Non - denaturant polyacrylamide gel)
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico (3,5-dinitrosalicylic acid)
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraácetico
EGs	Endoglucanasas
FAS	Fermentación por adhesión a superficie
FB	Fermentación en biopelículas
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and drug Administration)
FES	Fermentación en estado sólido
FPA	Actividad de papel de filtro (filter paper activity)
FS	Fermentación sumergida
GH	Glucósidos hidrolasas
GMP	Buenas prácticas de fabricación
GRAS	Reconocidad generalmente seguras (Generally recognized safe)
HHP	Hifas – hidrofobinas - perlitas
kDa	Kilodalton
mA	Miliamperios
NADPH	Nicotiamida Adenina Dinucleotido Fosfato
PAGE	Gel de poliacrilamida (Polyacrylamide gel) (polyacrylamide gel)

PGPR	Rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas
PM	Peso molecular
q_{EG}	Tasa específica de formación de endoglucanasas
q_{FPA}	Tasa específica de formación de celulasas
q_{Xyl}	Tasa específica de formación de xilanasas
Rf	Movilidad electroforética
rpm	Revoluciones por minute
SAS	Sistema de análisis estadístico) (Statistical Analysis System)
SEM	Microscopía electrónica de escáner (Scanning electron microscopy)
SDS – PAGE	Dodecil sulfato de sodio en gel de poliacrilamida (Sodium dodecyl sulfate in polyacrylamide gel)
Γ_{EG}	Productividad volumétrica de endoglucanasas
Γ_{FPA}	Producción volumétrica de celulasas
Γ_{Xyl}	Productividad volumétrica de xilanasas
UI	Unidades por litro
Ug	Unidades por gramo
UP	Unidades polipeptídicas
Xyl	Rendimiento de xilanasas (UI ⁻¹)
$Y_{E/X}$	Rendimiento de enzima en relación a la biomasa
$Y_{FPA/S}$	Rendimiento de celulasas por sustrato consumido
$Y_{FPA/x}$	Rendimiento de celulasas por biomasa formada
$Y_{FPA/Pr}$	Rendimiento de celulasas por proteína secretada
$Y_{EG/X}$	Rendimiento de endoglucanasas por biomasa formada
$Y_{EG/s}$	Rendimiento de endoglucanasas por sustrato consumido
$Y_{EG/Pr}$	Rendimiento de endoglucanasas por proteína secretada
$Y_{X/S}$	Rendimiento de biomasa en relación al sustrato
$Y_{Xyl/S}$	Rendimiento de xilanasas por sustrato consumido
$Y_{Xyl/x}$	Rendimiento de xilanasas por biomasa formada
$Y_{FPA/Pr}$	Rendimiento de xilanasas por proteína secretada

RESUMEN

Existen muchos estudios sobre la producción de celulasas y xilanasas de hongos en fermentación sumergida (FS) y escasos estudios en sistemas de fermentación en biopelículas (FB) y en estado sólido (FES) con *Aspergillus niger* ATCC 10864. En la investigación, se comparó los tres sistemas de fermentación. La FS se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 70 mL de medio de cultivo y 3% de inóculo, el tiempo de fermentación fue de 120 h a una velocidad de agitación de 125 rpm y 28°C. En FB y FES se utilizó perlitas como soporte inerte impregnado con nutrientes, en ambos casos se utilizó matraces de 250 mL y para cada caso se preparó el medio de cultivo requerido, el inóculo utilizado fue de 3%. Mediante microscopía electrónica de crio-barrido se observó la adhesión del *A. niger* en FB y FES. La FB presentó mayor título de celulasas (1768 UL^{-1}) que en FS (1165 UL^{-1}) y FES (1174 UL^{-1}). La biomasa producida en FB era menor que FS y FES, contrariamente el $Y_{\text{FPA/S}}$ (Ug^{-1}) era significativamente mayor en FB que en FS y FES (368, 212, y 217), respectivamente, al igual que la Γ_{FPA} ($\text{UL}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (25, 16 y 16, respectivamente). Asimismo, la actividad endoglucanasa y xilanasas era mayor en FB. Se realizó el análisis electroforético (en DN- PAGE y SDS-PAGE) y zimográfico de celulasas, β – glucosidasas y xilanasas secretado por *A. niger*. Los electroforegramas y zimogramas exhibieron diferencias en la expresión proteómica activa en respuesta a la adhesión al soporte sólido. En los zimogramas de SDS-PAGE con CMC las EGs presentaron alta actividad catalítica a las 72 h de cultivo, en FS se expresó cinco bandas de EGs de 21 a 54 kDa, en FB y FES ocho bandas desde 20 a 80 kDa y de 23 a 54 kDa, respectivamente. Respecto a las β – glucosidasas se identificó dos enzimas, uno de 200 kDa y otro de 30.15 kDa. En cuanto a las xilanasas se encontró uno de 30.5 kDa. El *A. niger* cultivado en condiciones adheridas favorece la expresión de un complejo enzimático requerido para procesos biotecnológicos industriales.

Palabras clave: *Aspergillus niger*, celulasas, fermentación – por adhesión a superficie, xilanasas, electroforegramas, zimogramas.

ABSTRAC

There are many studies on the production of cellulases and xylanases from fungi in submerged fermentation (FS) and few studies in fermentation systems in biofilms (FB) and in solid state (FES) with *Aspergillus niger* ATCC 10864. In the research, the three fermentation systems. The FS was carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks with 70 mL of culture medium and 3% inoculum, the fermentation time was 120 h at a shaking speed of 125 rpm and 28°C. In FB and FES, perlite was used as an inert support impregnated with nutrients. In both cases, 250 mL flasks were used and for each case the required culture medium was prepared, the inoculum used was 3%. Using cryo-scanning electron microscopy, the adhesion of *A. niger* to FB and FES was observed. The FB presented a higher cellulase titer (1768 UL⁻¹) than in FS (1165 UL⁻¹) and FES (1174 UL⁻¹). The biomass produced in FB was lower than in FS and FES, on the contrary the $Y_{FPA/S}$ (Ug⁻¹) was significantly higher in FB than in FS and FES (368, 212, and 217), respectively, as was the Γ_{FPA} (UL⁻¹h⁻¹) (25, 16 and 16, respectively). Likewise, endoglucanase and xylanase activity was higher in FB. Electrophoretic analysis (in DN-PAGE and SDS-PAGE) and zymographic analysis of cellulases, β -glucosidases and xylanases secreted by *A. niger* were performed. Electrophoregrams and zymograms exhibited differences in active proteomic expression in response to adhesion to the solid support. In the SDS-PAGE zymograms with CMC, the EGs presented high catalytic activity after 72 h of culture, in FS five bands of EGs from 21 to 54 kDa were expressed, in FB and FES eight bands from 20 to 80 kDa and from 23 at 54 kDa, respectively. Regarding β -glucosidases, two enzymes were identified, one of 200 kDa and another of 30.15 kDa. Regarding the xylanases, one of 30.5 kDa was found. *A. niger* grown under adhered conditions favors the expression of an enzyme complex required for industrial biotechnological processes.

Keywords: *Aspergillus niger*, cellulases, fermentation - by adhesion to surface, xylanases, electrophoregrams, zymograms.

I. INTRODUCCIÓN

Los hongos filamentosos tienen mucha aplicación por su capacidad de producir enzimas celulolíticas y xilanolíticas (Ali y Saad EL-Dein 2008, da Silva *et al.* 2005), una característica importante de estos microorganismos es que pueden biosintetizar simultáneamente estas enzimas y a la vez estos biocatalizadores pueden actuar sinérgicamente durante la hidrólisis de la lignocelulosa (Kumar y Wyman 2009, Robison 1984, Sánchez 2009, Krisana *et al.* 2005). La biomasa vegetal está compuesta principalmente de 35 – 50% de celulosa y cerca de 30% de xilano (Bonnin *et al.* 2001), los cuales se encuentran presentes en residuos agrícolas (paja, hojas, tallos y raíces), bosques caducifolios y coníferas, residuos de supermercados (frutas, verduras, tubérculos, etc.), residuos biodegradables municipales, residuos de la industria de pulpa y el papel y de la agroindustria (salvado de trigo, maíz, arroz, bagazo de caña de azúcar y café, etc.) y cultivos energéticos herbáceos (Todorov y Yordanova 2012, Murugan *et al.* 2011). En recientes años, los residuos lignocelulósicos vienen cobrando considerable atención para la reducción, reutilización y valoración en procesos de fermentación secundaria (Cristini y Knob 2014) y bioconversión mediante celulasas y xilanasas en productos químicos, biocombustibles, digestión de alimentos para animales, industria alimentaria y textiles, y como agentes blanqueadores en el tratamiento de pulpa y papel (Knob *et al.* 2010, Moure *et al.* 2006, Polizeli *et al.* 2005).

Por todo lo señalado, existe un creciente interés en la producción de celulasas y xilanasas debido a su enorme potencial de aplicación biotecnológica. Sin embargo, se requiere mayor investigación para mejorar la producción de estas enzimas, desde varios enfoques, incluyendo nuevos diseños de procesos para la producción de estos biocatalizadores. A la fecha se ha realizado muchos estudios para la producción de enzimas celulolíticas y xilanolíticas, a través de fermentación sumergida (FS) y/o fermentación en estado sólido (FES) con distintas fuentes de carbono (Krishna 2005). Además, se han utilizado otros sistemas de cultivo, como la inmovilización celular y las biopelículas han sido probados para producir enzimas (Papagianni *et al.* 2002, Villena y Gutiérrez-Correa 2006). La FES implica el crecimiento de microorganismos adheridos en soporte sólido natural o inerte en ausencia de agua libre (Hölker *et al.* 2004, Ooijkaas *et al.* 2000) comparado a la FS donde los microorganismos crecen en forma libre, el cultivo adherido produce mayores actividades enzimáticas (Viniestra-González *et al.* 2003). Resultados similares se encontraron en cultivos con hongos inmovilizados en superficies con distintos soportes (Skowronek y Fiedurek 2006). En la

naturaleza, los microorganismos crecen principalmente unidos a superficies que forman biopelículas debido a su tendencia innata se adhieren a las estructuras sólidas. Además, los microorganismos adheridos dentro de las biopelículas se organizan en comunidades complejas y tienen una mejor actividad fisiológica y resistencia a los antimicrobianos. La adhesión celular a superficies, induce a una expresión genética diferencial (Mowat *et al.* 2008, O'Toole *et al.* 2000, Villena *et al.* 2009a). Además, es conocido que la morfología de los microorganismos está estrechamente relacionada con la productividad en la mayoría de los procesos de fermentación, y algunos parámetros han sido identificados para influir en esta relación (Papagianni y Matthey 2004, Wang *et al.* 2003). Sin embargo, la mayoría de las investigaciones realizadas están relacionadas con la FS y FES (Grimm *et al.* 2005, Papagianni 2004).

Los hongos filamentosos, inherentemente crecen en superficies sólidas, en estas condiciones muestran un comportamiento fisiológico diferente; los hongos que crecen adheridos pueden ser considerados como organismos formadores de biopelículas (Harding *et al.* 2009, Villena y Gutiérrez-Correa 2006). En este sentido, tanto la FES y FB pertenece a una nueva categoría de fermentación denominada fermentación con adhesión celular (FAS) propuesta por Gutiérrez-Correa y Villena 2003). En estudios anteriores, se demostró que el *Aspergillus niger* adheridas sobre tela de poliéster forman biopelículas y producen un 70% más de actividad celulasa que los cultivos miceliales suspendidos libremente cuando se cultiva en matraces agitados o microbiorreactores de burbujas (Villena y Gutiérrez-Correa 2006 2007). Sin embargo, se requieren mayores investigaciones en FB y FES, probando nuevos parámetros de procesos y soportes sólidos compatibles con los microorganismos y comparar la producción de enzimas con FS.

Muchos microorganismos, principalmente bacterias, desarrollan complejos multiproteicos, llamados celulosoma (Lamed and Beyer, 1988) o xilosoma (Lind and Thomsom, 1991) que biosintetizan celulasas, xilanasas y factores de unión a la celulosa, con lo cual degradan de manera efectiva la compleja pared celular de vegetales para nutrirse y sobrevivir.

Aspergillus niger al igual que otros hongos del mismo género tienen la capacidad de producir una gama de enzimas, dependiendo de las condiciones físicas y químicas del medio de cultivo y la dotación genética que posee. Entre las principales enzimas que secretan se incluyen a las celulasas y xilanasas. El complejo celulasas está constituido de endoclucanasas(EG), celobiohidrolasas(CBH) y β – glucosidasa (BGL), estas tres enzimas actúan sinérgicamente para

convertir la celulosa cristalina en glucosa (Sukumaran *et al.* 2005, Balat *et al.* 2008), presentan dos sitios activos uno en forma de surco que exhibe glucólisis endo y otro en forma tubular con actividad celulolítica exo para degradar la celulosa en oligosacáridos cortos (Gray *et al.* 2006, Prasad *et al.* 2007, Balat *et al.* 2008, Sukharnikov *et al.* 2011). Esta característica catalítica permite una potencial aplicación en diferentes sectores agroindustriales y la bioconversión de desechos agrícolas lignocelulósicos en azúcar y bioetanol (Anuradha *et al.* 2014).

Las xilanasas al igual que las celulasas tienen gran demanda para diferentes aplicaciones industriales (de pulpa y papel, textil y de alimentos), y en este caso la principal materia prima es la hemicelulosa constituida de xilano, que es hidrolizado internamente rompiendo enlaces β -1,4 - D-xilosídicos produciendo cadenas cortas de xilooligosacáridos (Coughlan and Hazlewood 1993). La mayoría de las xilanasas pertenecen a la familia 10 y 11 glicosidos hidrolasa (GH) de acuerdo a la similitud de la secuencia de aminoácidos, mientras otros se agrupan en familias GH de 4; 8 y 43 (Henrissat and Bairoch 1993).

Una característica intrínseca de los hongos es su capacidad de producir en forma simultánea enzimas degradadoras de celulosa y xilanasas. Las celulasas y xilanasas producidas por ciertas especies de hongos pueden actuar sinérgicamente para hidrolizar la biomasa de lignocelulosa (Kumar and Wyman 2009, Sánchez 2009, Selig *et al.* 2008). Hongos filamentosos como *Aspergillus* y *Penicillium* son importantes productores de celulasas y xilanasas y secretan en el medio altos niveles de estas enzimas comparado a otros microorganismos (Chávez *et al.* 2006, de Vries and Visser 2001). Gorbacheva and Rodionova (1977) sostienen que *Aspergillus niger* es un excelente productor de xilanasas. Se realizaron muchas purificaciones y análisis electroforéticos de extractos enzimáticos y encontraron xilanasas que difieren en peso molecular y punto isoeléctrico (Fournier *et al.* 1985, Frederick *et al.* 1981, Frederick *et al.* 1985, Shei *et al.* 1985).

Para la caracterización de enzimas, las técnicas electroforéticas son muy utilizadas en la medida que permiten diferenciar proteínas y enzimas en relación a su peso molecular y punto isoeléctrico. La electroforesis se fundamenta en la movilización de proteínas iónicas en un campo eléctrico; las proteínas se desplazan hacia el cátodo (-) o ánodo (+) en relación a su carga, peso y forma molecular (García 2000). El análisis proteómico por electroforesis, está considerado como un método valioso para la identificación de proteínas extracelulares expresadas por organismos o sistemas celulares que crecen y se desarrollan en diversas condiciones ambientales (Chu *et al.*

2000). La combinación de electroforesis enzimática y la técnica de zimografía, tienen ventajas, porque permiten la determinación de la estructura de subunidades de las moléculas enzimáticas rápidamente y comparativamente fácil, incluso usando preparaciones enzimáticas no purificadas (Shaw 1964). Esto se debe a una relación bien definida entre bandas de patrones electroforéticos, cuya actividad enzimática se ven reveladas en zimogramas y la estructura de subunidades de moléculas enzimáticas nativas. La identificación de enzimas en relación a su actividad catalítica después de SDS-PAGE está bien adaptado para determinar la fuente de actividad enzimática de una mezcla de proteínas heterogéneas o una proteína heterooligomérica (Paudel y Carlson 1988, Richardson *et al.* 1986, Harris y Hopkinson 1976, Buth 1990), o determinar si múltiples actividades catalíticas residen en un solo polipéptido (Matzukawa *et al.* 1994). Esta técnica se denomina zimografía, siendo una poderosa herramienta para analizar enzimas hidrolíticas basadas en la degradación del sustrato. Durante la zimografía, las enzimas hidrolíticas (ejemplo proteinasas) se separan por electroforesis en condiciones desnaturalizantes y no reductoras. La separación se produce en gel de poliacrilamida que contiene un sustrato específico copolimerizado de acrilamida (Leber y Balkuill 1997). La ventaja de la detección de la actividad enzimática a través de los zimogramas está relacionada a su efectividad, ya que permite identificar la actividad de todas las isoformas de enzimas presentes en PAGE, independientemente de su punto isoeléctrico, una vez que todas las proteínas han migrado en relación a su masa molecular, otra ventaja adicional de la zimografía es que tanto las proenzimas como las formas activas de enzimas pueden distinguirse en función de su peso molecular (Woessner 1995). El análisis de las actividades enzimáticas después de SDS-PAGE ha permitido detectar más de cientos de enzimas diferentes que afectan aspectos de la función celular que va desde el metabolismo de los carbohidratos y los lípidos hasta la transducción de señales y expresión de genes a degradación de biomoléculas (Bischoff *et al.* 1988).

A través del presente trabajo de investigación se busca promover los procesos de fermentación por adhesión a superficies (FAS) para la producción de celulasas y xilanasas de *Aspergillus niger*, como métodos alternativos a la fermentación sumergida (FS), ya que estas enzimas tienen un gran potencial biotecnológico en el sector industrial. Los objetivos propuestos en esta investigación son:

Objetivo general

- Comparar la producción de celulasas y xilanasas de *A. niger* ATCC 10864 en fermentación sumergida, en biopelículas y en estado sólido (FS, FB y FES).

Objetivos específicos

- Identificar la adhesión del *A. niger* ATCC 10864 mediante microscopia electrónica, cultivados en fermentación por adhesión a superficies
- Comparar la productividad y rendimiento de biomasa, celulasas, endoglucanasas y xilanasas de *A. niger* ATCC 10864 en fermentación en biopelículas, en estado sólido y sumergida.
- Comparar el perfil enzimático en relación al peso molecular de proteínas extracelulares y enzimas secretadas por *A. niger* 10864 en fermentación en biopelículas, en estado sólido y sumergida.
- Comparar los zimogramas de las enzimas endoglucanasas (EGs), xilanas y β – glucosidasas (BGLs) secretados por *A. niger* en los tres sistemas de fermentación.

Hipótesis de investigación

- Mediante la fermentación en biopelículas se logra una mayor producción de celulasas, endoglucanasas y xilanasas y mayor capacidad hidrolítica, debido a que la adhesión celular a superficie sólida, permite mayor expresión genética diferencial y por consiguiente un aumento en la actividad fisiológica del *A. niger* ATCC 10864.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 GENERO *ASPERGILLUS*

Los *Aspergillus* son hongos filamentosos, que pertenecen al filo Ascomycota, formados por hifas hialinas septadas y su reproducción puede ser sexual o asexual. Son de morfología anamorfa, comprenden entre 260 (Geiser *et al.* 2007, Samson y Varga 2009) y 837 especies (Hawksworth 2011). Estas especies se clasifican en aproximadamente diez géneros teleomorfos diferentes (Geiser 2009). Estos hongos fueron clasificados por la Agencia Internacional para la Investigación de Cancer (IARC) en tres grupos, según la secreción de sustancias toxicológicas (Cuadro 1).

Cuadro 1: Clasificación del género *Aspergillus*

Género <i>Aspergillus</i>	Clasificación IARC	Sustancia toxicológica
<i>A. Flavus</i>	Grupo 1	Aflatoxinas B1, B2, G1, G2
<i>A. parasiticus</i>		
<i>A. Flavus</i>	Grupo 2B	Aflatoxina M1
<i>A. parasiticus</i>		
<i>A. ochraceus</i>	Grupo 2B	Ochratoxina A
<i>A. niger</i>		
<i>A. versicolor</i>		Esterigmatocistina
<i>A. nidulans</i>		
<i>A. clavatus</i>	Grupo 3	Patulina
<i>A. oryzae</i>		Citrinina
<i>A. terreus</i>		
<i>A. niveus</i>		

Fuente: INSHT (2012).

Por otro lado, Meijer *et al.* (2011), señalan que el género *Aspergillus* consta de un gran número de especies, siendo:

- Patógenos oportunistas (por ejemplo, *A. fumigatus*, *A. terreus*)
- Productores de toxinas (por ejemplo, *A. flavus*, *A. parasiticus*) y
- Especies industriales (*A. niger*, *A. aculeatus*, *A. oryzae*).

Así mismo sostienen que, el género se divide en varias secciones, como el amarillo y el negro aspergilli. Los aspergillios negros (*Aspergillus* sección *nigri*) son cosmopolitas y comprenden las especies industriales más utilizadas, siendo el *A. niger*. Las especies de *Aspergillus* se diferencian

en tamaño, tasa de crecimiento, textura y color de la colonia (Figura 1); son productores de micotoxinas, y secretan como mecanismo de defensa frente a otros microorganismos.

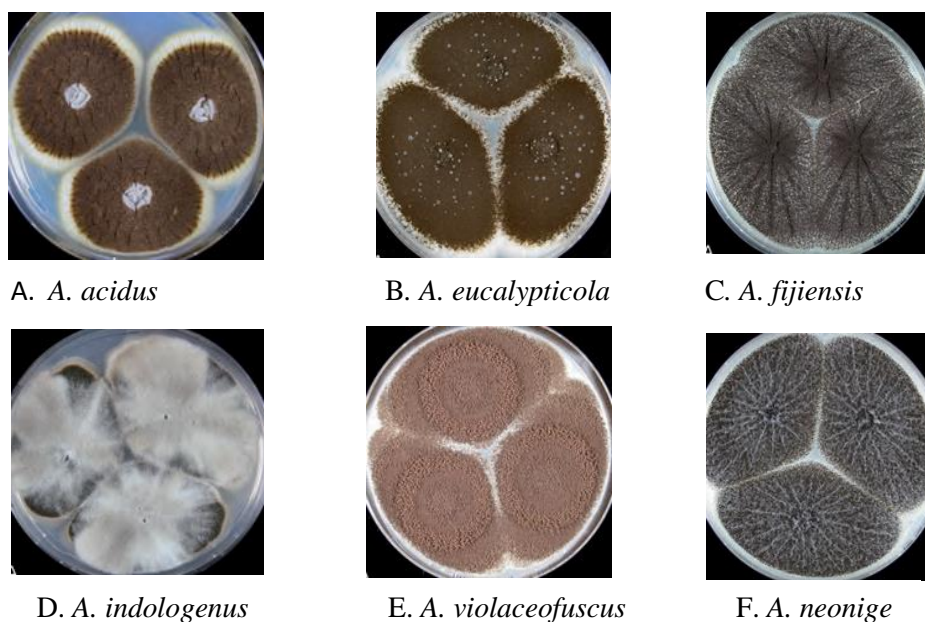


Figura1: Tipos de *Aspergillus niger* que difieren en forma y color

Fuente: Frisvad *et al.* (2007) (A, C, D y F), Gasperini (1887) (E), Kozak (1989) (B).

Las especies de *Aspergillus*, son los hongos más abundantes, sus condiciones abióticas de crecimiento no son muy selectivos, por ejemplo, pueden crecer en un amplio rango de temperatura (6–55 °C) y baja humedad (krijgsheld *et al.* 2012). Estos hongos se alimentan de una gran variedad de sustratos (pueden incluir heces de animales y tejido de humanos), principalmente se alimentan de polímeros complejos de plantas (Bennett, 2010) y están considerados como hongos que deterioran los alimentos; ejemplo, pueden encontrarse en el heno mohoso (*A. flavus*), paja (*A. versicolor*), cebada (*A. clavatus*) o cacahuets (*A. niger*) enmohecido (Los *Aspergillus* tienen una capacidad efectiva de dispersión. Las esporas de este género se encuentran entre las estructuras fúngicas más dominantes en el aire, dispersándose en distancias tanto cortas como largas (Bennett 2010).

Los *Aspergillus spp* secretan una gran variedad de endoenzimas que degradan polímeros desde el interior del sustrato en moléculas más sencillas que son utilizados

como nutrientes por estos hongos. Por ejemplo, las amilasas, xilanasas y pectinasas son secretados para degradar el almidón, xilano y pectinasas, respectivamente (Krijgsheld *et al.* 2012). Los *Aspergillus* no pueden absorber moléculas poliméricas al interior de su célula, por lo que tienen que segregar enzimas hidrolíticas para producir fuentes de carbono monomérico y pequeños compuestos oligoméricos (de Vries y Visser 2001, de Vries, 2003). Estos hongos también tienen la capacidad de segregar grandes cantidades de proteínas (y otros metabolitos, como ácidos orgánicos) a través de la tecnología de fermentación junto a la biología molecular, así el *A. niger*, *A. oryzae*, *A. awamori*, *A. sojae* y *A. terreus*, están considerados como biofactorias celulares atractivas para la producción de proteínas homólogas y heterólogas (Meyer *et al.* 2011).

2.2 *Aspergillus niger*: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

Los *A. niger* pertenecen al grupo de los *Aspergillus* negros y familia moniliaceae (Kwon-Chung y Bennett 1992). Sus características del *A. niger* son: cabezas conidiales de tonos negro a negro grisáceo, negro - café, negro - púrpura o negro - carbón, globosas que forman columnas de cadenas de conidios irregulares o definidas (Figura 2). Los conidióforos son de color hialino a café, lisos o ligeramente granulares en algunas especies, tienen vesículas globosas (Moslem *et al.* 2010). Los conidios son globosos o subglobosos, de color negro rugoso (Raper y Fennell 1965, Carrillo 2003).

2.3 GERMINACIÓN DEL *Aspergillus niger*

Durante la germinación de conidias, se distinguen tres etapas: primera fase, ocurre la germinación, la latencia se rompe por señales ambientales en presencia de agua y aire, ya sea o no en combinación con sales inorgánicas, aminoácidos y azúcares (Osharov y May 2001). En la segunda fase, ocurre la hinchazón de las esporas y crecen isotrópicamente entre 2 y 6 h después de la inoculación del *A. niger* a 25 °C (Leeuwen *et al.* 2013a, b), en esta etapa, el diámetro de la espora aumenta dos veces o más debido al consumo de agua y es acompañado de una disminución de la microviscosidad del citoplasma (Dijksterhuis *et al.* 2006), a la vez las moléculas se desplazan a la corteza celular para permitir la adición de nuevo plasma en la membrana y pared celular (Momany 2002). En la tercera fase de germinación, se forma un tubo germinal por crecimiento polarizado. Finalmente, la maquinaria morfogenética se redirige al sitio de polarización (d'Enfert 1997, Momany 2002, Harris y Momany 2004) y en 6 h se observa un crecimiento polarizado de *A. niger*.

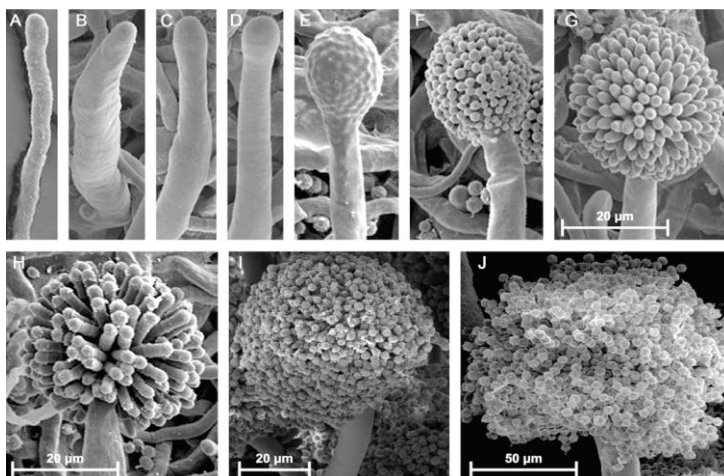


Figura 2: Desarrollo de *A. niger* monitoreado por microscopía electrónica de escaneo: Formación de hifas aéreas (hifas vegetativas) (A). Hifas gruesas (B). Hinchamiento de la punta de hifas para formar la vesícula (C, D). Formación de brotes sobre la vesícula (E). Brotes se convierten en metulas (F, G). Fialidos se forman sobre las metulas (H). Formación de conidios (I, J). La barra en G también es válida para A – F.

Fuente: Adams *et al.* (1998), Krijgsheld *et al.* (2013).

2.4 *Aspergillus niger*: IMPORTANCIA EN LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS PRIMARIOS

La biosíntesis de productos o metabolitos primarios del *Aspergillus niger*, está estrechamente relacionada a su morfología. El micelio y la forma de pellet tienen sus aplicaciones en varios procesos de cultivo industrial y se puede controlar de forma efectiva mediante ajuste del valor de pH y el potencial volumétrico interno (Figura 3) (Lin *et al.* 2008, Hagemann *et al.* 2007, Metz y Kossen 1977). La aglomeración de conidios en la fase temprana de cultivo se ve dominada por el valor de pH, mientras que la morfología de los gránulos de hongos está influenciada principalmente por el poder volumétrico (Grimm *et al.* 2005). Comparando la entrada de potencia volumétrica causada por la agitación y la aireación, la aireación tiene más impacto para contrarrestar el proceso de aglomeración, y conduce a una mayor concentración de pellets (Lin *et al.* 2008, Stintzing *et al.*

2008). Debido a mayor esfuerzo mecánico se producen gránulos más pequeños y más densos en comparación con una menor entrada de energía.

El *Aspergillus niger* abunda en la naturaleza y tiene importancia industrial, segrega grandes cantidades de proteínas y metabolitos como el ácido cítrico (Finkelstein *et al.* 1989, Conesa *et al.* 2001, Papagianni 2007, Andersen *et al.* 2011). El crecimiento sumergido de *A. niger* en medio líquido forma micelio disperso, en grupos o en microcolonias conocidas como gránulos; el micelio tiene gran impacto en la producción de enzimas y metabolitos primarios. Por ejemplo, para la producción de ácido cítrico de *A. niger* se necesitan micro-colonias (Gómez *et al.* 1988) o una alta acumulación de micelio, asociado a la fuente de carbono (glucosa) y de oxígeno disuelto (Papagianni 2007, Wolschek *et al.* 1999). También han demostrado que la formación de gránulos grandes coincide con un aumento de actividad extracelular de glucoamilasa y proteasa extracelular (Papagianni *et al.* 2002). Finkelstein *et al.* (1989), han demostrado la producción de más de 30 gL⁻¹ de glucoamilasa.

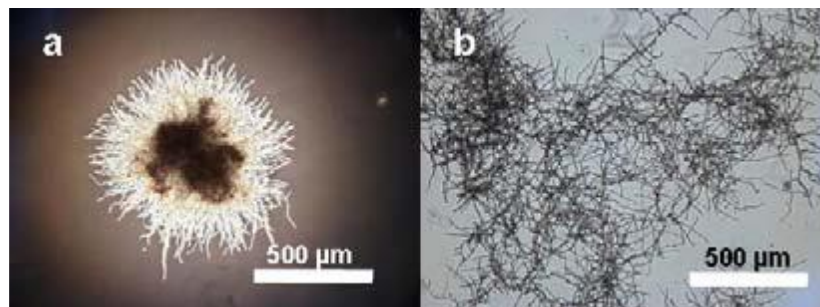


Figura 3: Características morfológicas del *Aspergillus niger*, a) biopellet, b) micelio disperso libre.

Fuente: Hagemann *et al.* (2007).

El *Aspergillus niger* es utilizado ampliamente por su eficiente secreción para producir productos biotecnológicos a granel, como ácido cítrico, glucoamilasas (Pey-Jin y Krull 2009), celulasas, así como para la producción de productos de alto valor agregado (glucosiltransferasas, antibióticos, etc.). El diseño del proceso a menudo se ve dificultado por un complejo patrón de crecimiento de estos organismos. Existe, sin embargo, una relación estrecha entre el desarrollo de la morfología de los hongos filamentosos, fenómenos de transporte y productividad relacionada. Dependiendo

del metabolito a producir, las características morfológicas de *A. niger* varían tanto como micelios libremente dispersos o como distintos aglomerados densamente empaquetados, generalmente en forma de esfera, llamados pellets. Para la adaptación de una morfología con cultivos biológicos filamentosos es necesario probar o establecer la influencia de parámetros sensibles del proceso ambiental de cultivo (Pey-Jin y Krull 2009).

2.5 CELULASAS

2.5.1 Estructura molecular de celulasas

Las celulasas son sistemas multicomponentes, constituido de tres enzimas: endo-1,4 β -glucanasa (endo-1,4- β -glucano - 4 - glucanohidrolasa), celobiohidrolasa, (exo - 1,4- β -D-glucano celobiohidrolasa) y celobiosa (β -glucosidasa) (Sukumaran *et al.* 2005). Las celulasas pertenecen a la familia de glucósidos hidrolasas (GH), escinden enlaces β -1,4-glucosídicos de lignocelulosas, están clasificados en 115 familias basadas en similitudes de secuencia de aminoácidos y estructuras cristalinas. Las celulasas muestran una variedad de topologías proteicas desde β – hoja plegada (características de las endocelulasas) a una combinación de β/α a α -helice (Figura 4) común a todas las proteínas (Jayasekara y Ratnayake 2019). En la estructura de la celulasa, existen módulos catalíticos y no catalíticos. Los módulos catalíticos de celulasas han sido clasificadas en numerosas familias basadas en sus secuencias de aminoácidos y estructuras cristalinas, los módulos no catalíticos de unión (CMB) a carbohidratos (ayuda a la unión celulasa-celulosa y posible inicio de rotura de enlaces glucosídicos) y/u otros módulos funcionalmente conocidos o desconocidos pueden estar ubicados en el extremo N (amino terminal) o C (carboxilo terminal) de un módulo catalizador (Xiao-Zhou y Hi – Hen 2013). Las familias de CBMs tienen afinidad por la celulosa, se debe a su superficie planar, constituida por aminoácidos aromáticos que le proporcionan características hidrofóbicas (Hilden y Johansson, 2004). Sin embargo, mediante un mecanismo no catalítico el CBM de la endoglucanasa III de *T. reesei* puede alterar la estructura de la celulosa cristalina (Xiao *et al.* 2001). Por tanto, otra función del CBM es modificar la estructura de la celulosa,

Por lo general, las celulasas fúngicas y bacterianas tienen dos o más estructuras y dominios funcionales. Son producidos por microorganismos celulolíticos aerobios y anaerobios, que da lugar a sistemas de celulasas no complejas y complejas, las no complejas son producidas por

microorganismos aerobios y son mezclas de enzimas cooperativas extracelulares, donde la disposición común es la unión de un dominio catalizador con un dominio de unión a celulosa (CBD). Mientras que un sistema complejo de celulasas es producido por microorganismos anaerobios y se llama "celulosoma". La celulosoma se ensambla por unión a un dominio catalítico con un dominio dockerin (dominio de proproteína) (Ciolacu *et al.* 2011). En la estructura de las celulasas existen adicionalmente otros dominios catalíticos, sin embargo, los dominios, catalizadores y dominios de unión a celulosa son los más importantes y los que participan en mecanismos hidrolíticos enzimáticos (Jayasekara y Ratnayake 2019).

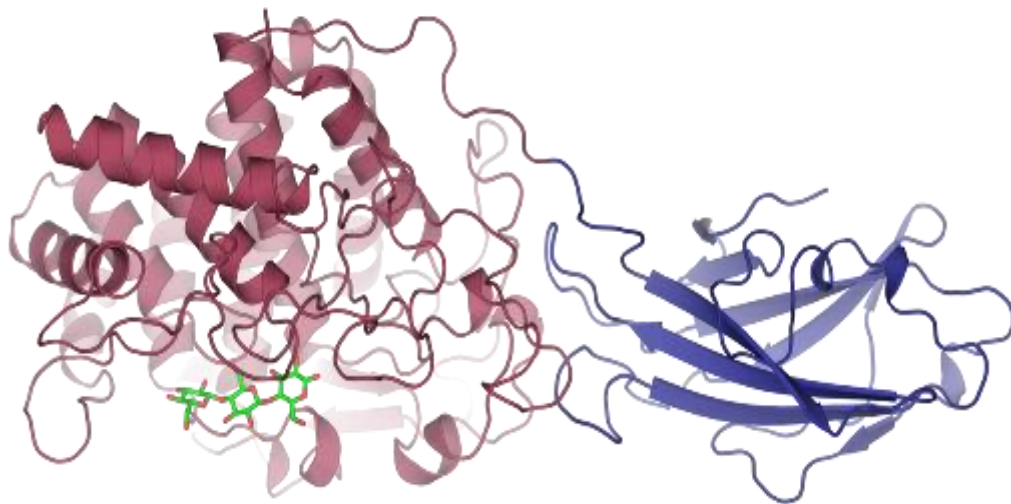


Figura 4: Estructura de endo/exocelulasa E4 de *Thermomonospora fusca*

Fuente: Sakon *et al.* (1997).

2.5.2 Celulasas: mecanismo de acción catalítica

Las celulasas catalizan la descomposición de la celulosa rompiendo enlaces β -1,4-glicosídicos, en la cual están involucrados tres enzimas: endoglucanasa, exoglucanasa y β -glucosidasa. La hidrólisis completa de la celulosa depende de la combinación de estos tres tipos principales de enzimas. Las endoglucanasas (con sitios activos abiertos o hendiduras) suele actuar aleatoriamente y en enlaces internos sobre las áreas amorfas de la celulosa, generando cadenas cortas de celulosa. Las exoglucanasas (con sitios activos tubulares) hidrolizan el extremo no reductor de las cadenas cortas de celulosa, generando celobiosa u oligosacáridos (Gray *et al.* 2006, Balat *et al.* 2008, Sukharnikov *et al.* 2011). Finalmente, la β -glucosidasa hidroliza la celobiosa desde el extremo no

reductor, formando unidades de glucosa libre (Figura 5). Las exocelulasas son enzimas procesivas, se mantienen unidas a la cadena de celulosa hasta una hidrólisis completa. Las endocelulasas pueden ser procesivas o no. La tasa de degradación de la celulosa depende de la eficiencia hidrolítica de las enzimas (Sukharnikov *et al.* 2011). Las endocelulasas y exocelulasas trabajan cooperativamente y a veces sinérgicamente para hidrolizar el sustrato celulósico cristalino (Balat *et al.* 2008), dando como resultado oligómeros solubles, celobiosa y glucosa.

Las celulasas presentan dos mecanismos catalíticos uno de retención y otro de inversión en la cual se da la escisión del enlace glucosídico en medio ácido – base, donde participan dos residuos catalíticos uno ácido (donador de protones) y una base nucleófilo (aceptor de protones). El mecanismo de retención, implica que las celulasas catalizan manteniendo el carbono anomérico de la glucosa en posición β (Withers 2001), mientras que en la “Inversión” las celulasas invierten la configuración anomérica C en un solo desplazamiento hidrolítico nucleofílico (Vocadlo y Davies 2008).

La multiplicidad de las formas de celulasas, es el resultado de múltiples genes, la macro heterogeneidad se debe a la complejidad de las celulasas unidas a proteínas, glicoproteínas y polisacáridos, síntesis de variantes de un solo producto génico por la infidelidad de la traducción, proteólisis y glicosilación variable o interacción con componentes del caldo fermentado (Everleigh 1987). El complejo celulasa de *Trichoderma reesei*, por ejemplo, presenta un componente C1 (57 kDa) que separa las cadenas de celulosa cristalina, una endoglucanasa (\approx 52 kDa), una exoglucanasa (\approx 61 kDa) y una beta-glucosidasa (\approx 76 kDa) (WBC, 2014).

2.5.3 Regulación de la síntesis y producción de celulasas

Las celulasas son producidas por hongos, bacterias, actinomicetos, protozoos, plantas y animales, información existente de acuerdo a la base de datos de enzimas activas sobre carbohidratos activos, que forman parte de las familias de glucósido hidrolasas (Jayasekara y Ratnayake 2019). La producción de celulasas es inducible y la regulación de síntesis está finamente controlada por mecanismos de activación y represión. La expresión de celulasas y hemicelulasas está regulado por fuentes de carbono. En presencia de D-glucosa la transcripción se reprime, mientras que con celulosa la transcripción es fuertemente inducida. Las celulasas pueden co-inducirse con mono y

disacáridos (Suto y Tomita 2001). En *T. reesei*, la producción de celulasas se induce con celulosa, y se reprime con mono y disacáridos fácilmente asimilables.

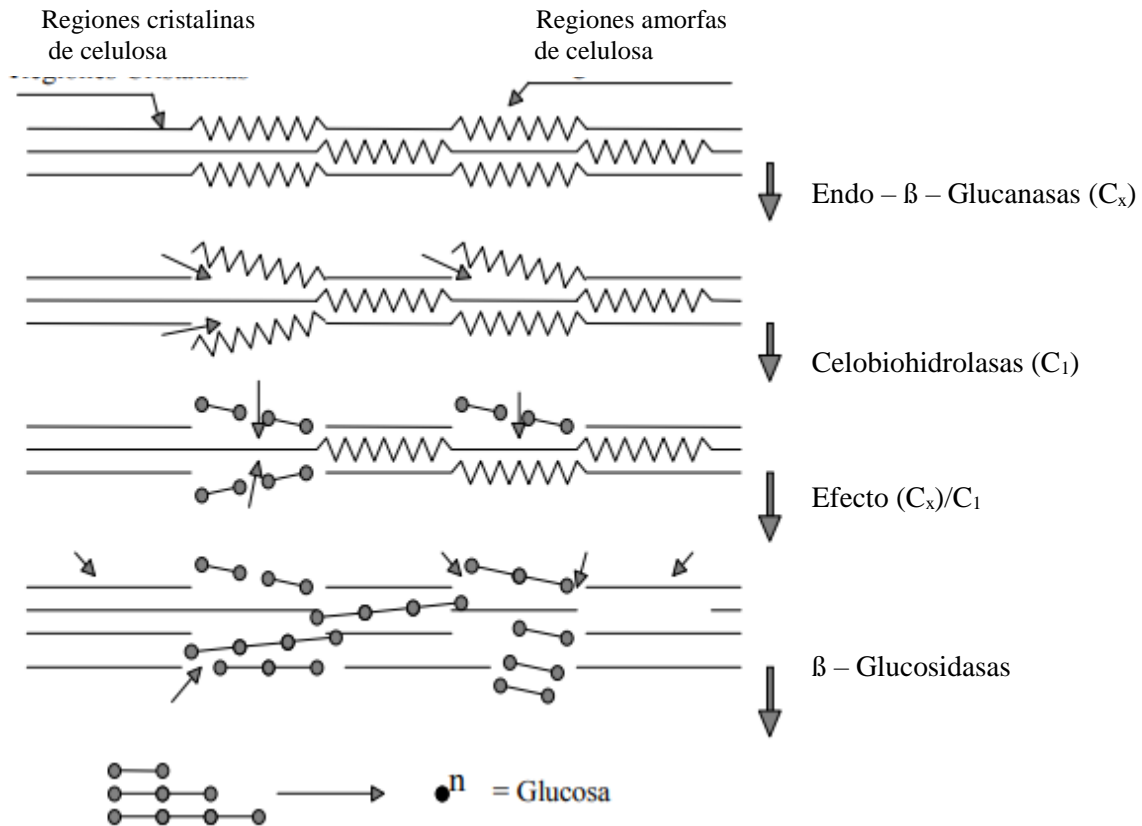


Figura 5: Mecanismo de hidrólisis de la celulosa

Fuente: Nidtzky y Steiner, (1993).

La sorfosa (disacárido) induce la síntesis de enzimas celulolíticas mediante acción de trans-glicosilación de la β-glucosidasa expresada basalmente. La celobiosa, lactona δ-celobiosa-1, 5 y otros productos oxidados de la hidrólisis de la celulosa también pueden actuar como inductores de celulasas (Bhat y Bhat, 1997, Sukumaran *et al.* 2005). Por otro lado, la glucosa actúa como represor de la expresión de celulasas en *Trichoderma* y *Aspergillus* (Hou *et al.* 2007).

Los hongos filamentosos son las principales fuentes de celulasas y hemicelulasas. Cepas mutantes y tipos salvajes de *Trichoderma sp.* (*T. viridae*, *T. reesei*, *T. longibranhiatum*) fueron considerados como los productores potenciales de celulasas (Balat *et al.* 2008). En general la producción de celulasas se realiza por fermentación sumergida. Sin embargo, en la naturaleza, el crecimiento de

estos hongos, ocurre adheridos en superficies de celulosa, que se asemejan a fermentaciones de estado sólido. Sin embargo, una mejor supervisión y manejo de producción de celulasas aún está asociado con la fermentación sumergida (Sukumaran *et al.* 2005). Los sistemas de celulasa no complejados de hongos o bacterias tienen componentes del sistema de celulasa libres y en su mayoría son secretados. Los ejemplos típicos incluyen el sistema de celulasa de *T. reesei*, que produce dos exoglucanasas y aproximadamente ocho endoglucanasas y siete β -glucosidasas. Los sistemas complejos (celulosomas) corresponden a bacterias nativas anaeróbicas. Las celulosomas son protuberancias de la pared celular del organismo el cual alberga enzimas complejas. En Clostridia, el celulosoma consiste de una proteína no catalítica (cipA) el cual difiere de los módulos catalíticos responsables de actividades exo y endoglucanasa. La composición individual de las celulosomas varía con respecto al organismo (Sukumaran *et al.* 2005; Mathew *et al.* 2008).

2.5.4 Mejoramiento de la producción de celulasas

La viabilidad de uso industrial de celulasas, sugiere inevitablemente la mejora de producción de celulasas, para el cual se requiere la aplicación de la ingeniería de las celulasas para mejorar el rendimiento de producción y sus propiedades catalíticas para usos industriales robustos (Singh *et al.* 2017). Los hongos filamentosos secretan de forma nativa varias celulasas cuando crecen en desechos de lignocelulosas. Sin embargo, se puede mejorar la expresión de estas enzimas o reducir cuando sea necesario por varios métodos, siendo uno de ellos, mediante mutagénesis aleatoria, considerado como un enfoque clásico, un ejemplo es el *T. reesei* RUT - C30 es resultado de 30 ciclos de mutación (Peterson y Nevaleinen, 2012). La mayoría de las cepas fúngicas empleadas para la producción comercial de celulasas son cepas mutantes robustas, y muy pocas están modificadas genéticamente. La mutagénesis en sitios dirigidos o de combinación, también se han utilizado para obtener enzimas específicas para aplicaciones industriales (Dalby, 2007). Durante los últimos 20 años, se ha utilizado *Penicillium oxalicummutant* (JU-A10-T) para producir celulasas a escala industrial en China (Liu *et al.* 2013a).

La ingeniería genética una de las herramientas más populares, ha permitido combinar múltiples rasgos deseables en un solo organismo. Puede utilizarse para diseñar microbios para la producción de metabolitos de mucha importancia, que pueden variar desde proteínas simples hasta proteínas terapéuticas altamente específicas. Sin embargo, puede que no sea tan simple como parece debido

a la complejidad inherente de los propios organismos o los metabolitos necesarios para ser expresados. La información más importante que se requiere es la composición genética de los organismos. El conocimiento de la secuencia y funciones de todo el genoma facilita la decisión de los sitios objetivo para las alteraciones genéticas (Singh *et al.* 2017). Los hongos filamentosos tienen un enorme potencial para ser empleados como hospedadores de ADN recombinante. Pero existen desafíos sobre la recombinación no homóloga en hongos. Este problema se resolvió mediante la inactivación de los componentes de la ruta de la unión del extremo no homóloga (NHEJ) de la reparación del ADN (Guangtao *et al.* 2009; Steiger *et al.* 2011). El género *Aspergillus* y la cepa *T. reesei* se han utilizado como hospedadores para expresar varios genes de origen fúngico y no fúngico. La secuenciación del genoma de *T. reesei* (Martínez *et al.* 2008) reveló que, a pesar de ser el productor de celulasas más conocido; el genoma del hongo contiene menos genes de celulasas y hemicelulasas que cualquier otro hongo secuenciado. Por lo tanto, el mecanismo y la razón para el alto nivel de secreción aún no se han revelado. Se ha observado que los genes de celulasa y hemicelulasa de hongos filamentosos, como del *T. reesei* están bajo represión de catabolitos de carbono mediada por el gen regulador cre1.

2.5.5 Importancia y aplicación de celulasas

Durante muchas décadas, las celulasas han desempeñado un papel crucial como biocatalizadores, tienen aplicación potencial en diferentes industrias:

2.5.5.1 Industria de procesamiento de alimentos

Las celulasas tiene mucha aplicación en distintos sectores de la industria de procesamiento de alimentos (Prabhu y Jayadeep, 2015), en combinación con otras enzimas (xilanasas y pectinasas) son conocidas como enzimas macerantes, utilizadas para mejorar el rendimiento en la extracción y clarificación de jugos de frutas y verduras (Jutururu *et al.* 2014). Además, tiene otras aplicaciones potenciales, así como, en la reducción de la viscosidad de néctares, concentración de purés, alteración de las propiedades sensoriales de la fruta, extracción de carotenoides, extracción de aceite de oliva, mejora de la calidad de los productos de panadería, de vino y cerveza para mejorar su sabor, textura, digestibilidad y valor nutricional (Kumar *et al.* 2012a; Mendez y Salas, 2001). Las celulasas son utilizadas a nivel mundial y mayormente están presentes en los jugos de frutas y

verduras, debido a que están constituidos de polisacáridos suspendidos, tales como celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina, almidón y taninos. La presencia de estos materiales en el zumo lo hace de baja calidad y atrae menos demanda de los consumidores. “Rapidase pomaliq” es una preparación enzimática, disponible comercialmente compuesta de celulasas, hemicelulasas, y pectinasas obtenidas de *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger*. La aplicación de este producto en la clarificación del jugo de fruta fue beneficiosa para obtener un producto final con características de calidad. También se tiene celulasas producidas por *Bacillus* y *Paenibacillus* con pectinasas y hemicelulasas utilizadas en la clarificación de zumos de frutas y hortalizas (Keerti *et al.* 2014), que también son utilizados en el tratamiento de néctares y purés eficientemente. Parámetros reológicos como la viscosidad de estos productos son tratados hasta un nivel comercialmente aceptable. La modificación de los parámetros sensoriales de los alimentos con la aplicación de las celulasas es altamente recomendada, especialmente en propiedades aromáticas, como sabor, y textura de las frutas son propiedades sensoriales que juegan un papel crucial en la biotecnología de alimentos (Zhang *et al.* 2010).

Las celulasas también son utilizadas en la degradación de las cáscaras de uvas para liberar azúcares para la industria de vinos. Otra aplicación es en la extracción de compuestos fenólicos de orujo de uva; extracción del aceite de oliva procedente de la pasta de olivo para mejorar el rendimiento. El uso de celulasas solas o con pectinasas mejoran la extracción, así como la calidad del aceite de oliva, provoca mejoras significativas en el contenido fenólico y actividad antioxidante del aceite, etc. Las celulasas con otras enzimas como amilasas, proteasas y xilanasas dan como resultado un aumento del volumen del pan, mejora la calidad de este producto, producción de miga más suave. Un cóctel de enzimas con celulasas, hemicelulasas, amilasas, lipasas y fosfolipasas dan un mejor acondicionamiento de la masa y mejora el sabor, vida útil prolongada y aumento de volumen después del horneado (Illingworth 1998). Otra aplicación importante de las celulasas es la extracción de pigmentos y compuestos naturales de vegetales, así como los carotenoides que tienen gran demanda de los consumidores en la elaboración de alimentos coloreados naturalmente, de menor toxicidad, y disponibilidad de una amplia gama de colores en la corteza de frutas como naranjas, papas nativas, tomates, zanahorias, etc. ricas en carotenoides, siendo colorantes alimentarios naturales. Las enzimas utilizadas en el procesamiento de alimentos se comercializan como enzimas preparados, que contienen no sólo la enzima deseada, sino también los metabolitos

producidos y varias sustancias añadidas como estabilizantes. Todos estos materiales deben ser seguro bajo la guía de buenas prácticas de fabricación (GMP), en el caso de microorganismos recombinantes deben ser reconocidos generalmente como seguros (GRAS) en el contexto de las regulaciones de la FDA, sobre un número relativamente pequeño de especies de bacterias y hongos, principalmente *A. oryzae*, *A. niger*, *B. subtilis* y *B. licheniformis* (Kumar *et al.* 2014). Por otro lado, la hidrólisis con celulasas, se aplica para mejorar la eficiencia de remojo y absorción homogénea de agua por cereales y facilitar la rehidratación de vegetales y sopas secas, mejorar la calidad nutritiva de alimentos fermentados, producción de oligosacáridos como ingredientes funcionales de alimentos y sustituyentes de alimentos bajos en calorías (Mandels 1985, Béguin y Aubert 1994, Bhat y Bhat 1997).

2.5.5.2 Industria de alimentos para animales

Las celulasas se usan en la producción de alimentos para animales para mejorar la digestibilidad de los alimentos elaborados a base de cereales y para aumentar el valor nutritivo y mejorar la calidad de los forrajes. Existen estudios sobre el uso eficiente de celulasas de *Trichoderma* como aditivos para piensos y lograron mejoras significativas en la relación de conversión del alimento, así como la digestibilidad del alimento a base de cereales (Backer y Wicker 1996). La composición de los alimentos forrajeros de rumiantes es bastante compleja, esta constituido de celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina, el uso de celulasas puede mejorar la digestibilidad de estos compuestos forrajeros (Boutte *et al.* 2009, Vasco - Correa 2016). Por lo general, las celulasas de *Bacillus subtilis* se utiliza en esta industria de alimentos. Los alimentos preparados que contienen celulasas y hemicelulasas se utilizan para mejorar la producción de leche, aumento de peso, y alimentación. Otras aplicaciones en el tratamiento de alimentos para animales es para eliminar los factores antinutricionales presentes en los granos y otras sustancias celulósicas. Además, las celulasas juegan un papel importante en el aumento de la tasa y grado de digestión de la fibra. Esto puede ser usado como un efecto positivo en el aparato digestivo natural de los rumiantes, que finalmente se logra mayor disponibilidad de nutrientes absorbibles mediante la mejora de la digestibilidad del forraje (Hebeish e Ibrahim 2007). La hidrólisis parcial de moléculas lignocelulosicas, también conduce a una mejor emulsificación de los alimentos en el tracto digestivo de los animales, que resultan en la mejoría final de la disponibilidad de nutrientes, así

mismo las celulasas ayudan al descascarillado de granos de cereales, disminución de la viscosidad interna y flexibilidad de materiales para la producción de alimentos (Bhat 2000).

2.5.5.3 Industria textil

La industria textil es una de las industrias más grandes del mundo. La demanda del cliente por la moda está aumentando, especialmente por la singularidad en los estilos, colores y ropa que usan. Durante los últimos años, hubo un crecimiento significativo en esta industria, como consecuencia de la creciente demanda de los clientes; al mismo tiempo se incluyó el uso de celulasas para los procesos texttileros, convirtiéndose ahora en el tercer grupo más grande de enzimas utilizadas en este sector (Xia y Cen 1999), que ha creado una plataforma de mercado muy competitivo para los fabricantes que buscan los enfoques ecológicos para obtener productos con un aspecto único. La celulasa es utilizada en el procesamiento textil en húmedo, biostonado de tejido, biopulido de fibras textiles, suavizado de prendas y eliminación del exceso de tinte de los tejidos. Las celulasas fúngicas de *Trichoderma reesei* son las enzimas más aplicadas en la industria textil. Así también como de actinomicetos de los géneros *Streptomyces* y *Thermobifida* y otros géneros de bacterias, como *Pseudomonas* y *Sphingomonas*, son algunas de las fuentes de enzimas que se utilizarán para la decoloración y degradación de los tintes textiles (McMullan *et al.* 2001). El lavado de la tela de algodón con celulasas (biostoning), es una alternativa biotecnológica, frente al método convencional, que primeramente es tratado con amilasas para liberar el almidon y luego una abrasión con piedra pómez para flexibilizar la tela y seguido con hipoclorito de sodio o permanganato de potasio. Estos tratamientos generan muchas desventajas, el uso de grandes cantidades de piedras pómez afecta la productividad de las máquinas y mucho esfuerzo mecánico, además las sustancias químicas contaminan el medio ambiente y salud de trabajadores.

La aplicación de celulasas microbianas resultó ser una alternativa eficiente para lavado de la mezclilla o tela de algodón, fue puesto en operación por primera vez en la década de 1980. El tejido de algodón cuando es tratado con celulasas, se hidroliza (rompiendo enlaces β -1,4 glucosídico de la celulosa) y rompe pequeñas fibras de la tela, se afloja y se libera el exceso de tinte, resultando un aspecto descolorido. Se ha encontrado que la endoglucanasa II ácida de *Trichoderma reesei* es una enzima muy eficiente en la biostonación (Heikinheimo *et al.* 2000). Las celulasas neutras extraídas de *Humicola insolens* es aplicado comúnmente en este proceso (Maryan *et al.* 2013). Las

ventajas de las celulasas en el bistonado, incluyen alta productividad; menos trabajo, ofrece un ambiente más seguro; tratamiento corto y menos desgaste de las máquinas. Actualmente, la tela de algodón desgastado (denim) tiene una gran demanda en el mercado textil. Una deventaja es el reteñido de la tela (backstaining), pero esto fue superado por las empresas biotecnológicas, han logrado la inmovilización de las celulasas en la piedra pómez, resultando más rentable y también han observado que las endoglucanasas ácidas provocan una mejor abrasión y menos backstaining (teñido de partes o no teñidas por el tinte que sale en el lavado, ejemplo los bolsillos) en comparación con endoglucanasas neutra. Por ejemplo, la celulasa producida por *Trichoderma reesei* es más eficiente en la prevención de backstaining en comparación con endoglucanasas neutras de *H. insolens*.

La última tendencia del lavado de biostonos es utilizar una mezcla de enzimas compuesta de amilasa, celulasa y lacasa (Cortez *et al.* 2001). Las amilasas hidrolizan el almidón de la tela y causa descolado, las celulasas hidrolizan las pequeñas fibras de celulosa, y las lacasas (EC 1.10.3.2) suele causar decoloración de la tela, esta última enzima tiene un mecanismo, dona o cede electrones en la catalisis y de esta manera puede descomponer el índigo en la solución, creando efecto decolorante en prendas de tela de algodón (denim). El tinte índigo se convierte, en isatina y ácido antranílico, lo que evita el teñido en partes sobre la superficie de la tela. Eventualmente, esto le dará una apariencia descolorida completa al tejido (denim). El propósito de usar una mezcla de enzimas es mejorar la eficiencia de procesos de lavado de biostonos, al permitir que las tres enzimas trabajen juntas y no de forma secuencial. Estudios recientes, han informado que las celulasas alcalinas estables en combinación con xilanasas de *Thermomonospora sp* ofrece una tendencia reducida de backstaining (Anish *et al.* 2007). Sin embargo, los efluentes generados durante el lavado de biostono deben ser pretratados al eliminar el material de tinte y los compuestos químicos intermedios presentes después de la reacción. De lo contrario, estos tintes podrían contaminar los cursos de agua naturales y el suelo. La mayoría de estos residuos de tinte son tóxicos y cancerígenos que podrían causar efectos adversos para la salud en humanos y animales.

El biopulido y bioacabado (biopolishing y biofinishing) de las telas se realiza antes, durante o después del teñido, lo que aumenta la superioridad de la tela al reducir el vello y la formación de partículas de celulosa, ya que materiales fibrosos celulósicos como algodón y lino, siempre pierden

su apariencia debido a la formación de pelusas en la superficie de la tela (Anish *et al.* 2007). Las pelusas ocurren por las fibras cortas de celulosa que sobresalen de la superficie de la tela y a veces se adhieren ligeramente a la tela formando bolas (pilling) de pelusas que le da un aspecto poco atractivo a la tela. Esto se llama pilling. El proceso de biopolishing apunta básicamente a eliminar microfibrillas de algodón, realza la apariencia de la tela, le da sensación de suavidad a la mano y aspecto brillante. Además, mejora la hidrofiliidad y la absorbancia de la humedad por el tejido (Anish *et al.* 2007). Las celulasas ácidas producidas por *T. reesei* y *Aspergillus niger* es enormemente eficaz en el proceso biopolishing, es ecológico, porque las enzimas utilizadas son fácilmente biodegradables y no tóxico. También el lavado repetido de las prendas de algodón lo hacen esponjoso y sin brillo, debido a las microfibrillas en la superficie de la tela, mediante tratamientos con celulasas (biofino) es posible eliminar estas fibrillas y devolver la superficie lisa y el color original a la tela. Además, permite eliminar manchas de suciedad atrapadas en la red de fibra de algodón (Sreenath *et al.* 1996, Hebeish e Ibrahim 2007).

El tratamiento de bioscouring que consiste en eliminar el material no celulósico de la superficie del algodón. Este bioproceso se hace con celulasas únicas o combinado con pectinasas, estas digieren la pectina presente entre las fibras de celulosa, de esta manera se elimina la interacción intacta entre la cutícula y el cuerpo principal de la fibra de celulosa. Esto ayuda a degradar la celulosa primaria de la pared de la fibra, dando como resultado final la destrucción de la cutícula (Ibrahim *et al.* 2011). Esta reacción mejora la suavidad de la tela. La biocarbonización y lavado de lana es otro tratamiento biológico para limpiar la tela de la celulosa o impurezas vegetativas con ayuda de enzimas. Cuando se usa algodón puro o mezcla de algodón para la fabricación de telas, algunos restos de material celulósico no deseado aún pueden permanecer en la fabricación, generando un acabado imperfecto y una menor calidad de la tela. Los primeros métodos de carbonización implicaban el uso de ácido sulfúrico. Era caro, y corrosivo, inseguro y peligroso. Por lo que la carbonización enzimática es una alternativa ecológica prometedor. Este método es adecuado para la eliminación de impurezas celulósicas de las telas, que causa menos efecto en el color y suavidad de la tela. La eliminación de impurezas vegetativas de las superficies de lana cruda utilizando celulasas se denominan raspado de lana (Mojsov 2011).

2.5.5.4 Industria de pulpa y papel

Es uno de los sectores industriales más grandes a nivel mundial. Según la WWF (2018), la industria de la celulosa y papel, que incluye productos como papel de oficina y catálogos, papel satinado, papel tisú y papel de envases, utiliza más del 40% de toda la madera industrial comercializada en el mundo (Shah 2013). Las últimas estadísticas revelan que China, Estados Unidos, y Japón son los mayores productores de papel, producen la mitad de la fabricación total de papel del mundo. Sin embargo, Alemania y los Estados Unidos son los principales productores de papel periódico y a la vez son importadores y exportadores (WWF 2018). La pulpa y los papeles son recursos renovables, pueden ser reciclados y reutilizados, para este propósito es posible utilizar celulasas microbianas para el destintado, pulpeado, biorremediación de la industria, reutilización de desechos, blanqueamiento y mejora de la fibra. Durante las últimas décadas el interés de aplicación de celulasas en la industria de pulpa y papel ha aumentado considerablemente (Mai *et al.* 2004). El despulpado mecánico en la fabricación de pasta de madera, tuvo muchos inconvenientes en la refinación y esmerilado, que resultaba pulpas con alta cantidades de finos y muy rígido. Además, el proceso consumía mucha energía y no era una opción rentable para la industria. Sin embargo, el biopulpeo (biopulping) utilizando celulasas, resultó una forma ecológica y de ahorro de energía (Statista 2018) en torno al 20% - 40% (Singh *et al.* 2017, Akhtar 1994, Bath 2000). En el proceso de refinación, se genera pequeñas partículas de pulpas, los cuales reducen la tasa de drenaje en la fabricación del papel. Estas partículas pueden degradarse fácilmente con las celulasas y aumenta la capacidad de drenaje de la pulpa.

Mezclas de celulasas (endoglucanasas I y II) y hemicelulasas, también se han utilizado para la biomodificación de la pulpa gruesa y mejorar las propiedades de la fibra. La fabricación de pasta biológica tiene el potencial de mejorar la calidad de la pulpa y propiedades del papel al tiempo que reduce los costos de energía y el impacto ambiental (Sharma *et al.* 2016). El destintado tradicional de papel, requiere el uso de grandes cantidades de productos químicos, métodos caros y perjudiciales para el medio ambiente por la liberación de contaminantes (Zhang *et al.* 2013). En consecuencia, el bio-destintado que consiste en los usos de celulasas únicas, o en combinación con xilanasas evita el uso de álcalis durante el proceso y el amarilleo del papel, también son beneficiosos para el destintado de diferentes tipos de residuos de papel. El hidrolizado parcial de moléculas de carbohidratos permite la liberación de tinta de la superficie de la fibra, esto se hace

con celulasas solas o mezcladas con hemicelulasas. Las ventajas del destintado enzimático permiten un acabado con un aspecto limpio del papel, brillo mejorado y se reduce la contaminación ambiental. La biomodificación y biocaracterización de fibras de papel en esta industria, resulta satisfactorio con la aplicación de mezclas de celulasas y hemicelulasas. Mejora la operación de batido, la capacidad de manejo y drenaje de la pulpa de papel durante el proceso de fabricación. Las modificaciones de las propiedades de la fibra también se logran con el uso de celulasas (Statista 2018). Además, el hidrolizado enzimático de la fibra facilita la caracterización, mediante diversas técnicas, como por microscopía electrónica de escaner (SEM) y HPLC (Breen y Singleton 1999).

2.5.5.5 Biocombustibles

Los combustibles fósiles son las principales fuentes de energía, presentan la mayor demanda de consumo, no son recursos renovables, el agotamiento de sus depósitos naturales es inevitable y nos encontramos en la era de la energía limitada y costosa, junto a sus efectos adversos sobre el medio ambiente, como el calentamiento global causado por las emisiones de dióxido de carbono y los problemas posteriores del cambio climático (Jayasekara y Ratnayake 2019). Una alternativa a los combustibles fósiles son los biocombustibles, que vienen ganando interés actualmente, y esta focalizado en la producción de bioetanol utilizando microorganismos celulolíticos y levaduras fermentativas utilizando celulosa como sustrato. El bioetanol es una forma de energía renovable, puede ser producido como bioetanol de segunda generación a partir de biomasa lignocelulósica (rastros agrícolas o residuos agroindustriales). El rendimiento de la lignocelulosa puede alcanzar aproximadamente 200 mil millones de toneladas métricas en todo el mundo por año (Sindhu *et al.* 2016). La biomasa lignocelulósica no crea ninguna inseguridad alimentaria, porque no es utilizado como un alimento para humanos después de la cosecha. Antes de la fermentación alcohólica, la biomasa agrícola es sometido a un tratamiento térmico, seguido por un catalizador lignocelulolítico para liberar los azúcares fermentables del sustrato celulósico, el cual contiene aproximadamente 40 a 50% de celulosa (polímero de glucosa); 25–35% de hemicelulosa, un heteropolímero de azúcar; 15-20% de lignina, etc. (Jayasekara y Ratnayake 2019).

2.5.5.6 Lavandería y detergentes

La aplicación de enzimas en la fabricación de agentes de lavado enzimáticos o los detergentes biológicos se remontan a la década de 1960. Hoy en día el uso de enzimas en fórmulas de detergentes es una práctica común. Según informes del mercado, en el año 2014, la industria de detergentes era el mercado único más grande para enzimas con alrededor del 25-30% del total de ventas (Zhang *et al.* 2013). En el año 2017, se reportó que el mercado global de detergentes para ropas estaba valorado en 133.300 millones de dólares en 2016. Las últimas tendencias de la industria de detergentes es utilizar enzimas alcalinas en grandes cantidades. Por ejemplo, proteasas, celulasas, α -amilasas, lipasas y mananastas, los cuales son usados ampliamente en la lavandería pesada y detergentes para lavavajillas automáticos. Las enzimas tienen una gran capacidad para eliminar las manchas, siendo el objetivo principal de producirlas y usarlas en la fabricación de detergentes. Las celulasas están disponibles en el mercado en diferentes marcas. Por ejemplo, Celluzyme® y Carezyme® son dos marcas principales aplicadas en mezclas de detergentes, que son aplicados principalmente en el lavado de tejidos de algodón y mezclas con algodón. Estos detergentes a la vez hacen modificaciones de la fibra en la tela, mejoran el brillo del color, la suavidad y la eliminación de partículas de tierra. Las celulasas son producidas por muchas especies de hongos *Trichoderma sp.* y *Bacillus sp.* que han sido ampliamente estudiados actualmente (Jayasekara y Ratnayake 2019).

Las celulasas alcalinas son los aditivos más adecuados para los detergentes convencionales. Se debe a su capacidad de eliminar partículas de tierra y suciedad de los espacios interfibrilares de la tela. También eliminan las fibras de celulosa o agregados de celulosa unidos al tejido, permitiendo un mejor acabado en brillo y suavidad de la tela (Breen y Singleton 1999). Innovaciones recientes utilizan combinaciones de enzimas en detergentes. Las celulasas pueden estar mezcladas con otras enzimas como proteasas y lipasas, con lo cual se aumenta la eficiencia en la limpieza de manchas y cuidado de las telas. Por ejemplo, SaniZyme® es un detergente líquido de cuatro enzimas que contiene lipasa, celulasa, amilasa y proteasa. Este es un detergente enzimático bacteriostático para la eliminación de sangre, proteínas, mucosas, grasas, lípidos y carbohidratos de todo tipo de equipos endoscópicos e instrumentos quirúrgicos. Otro ejemplo es Getinge Clean MIS Detergent®, que también es una formulación que incluye proteasa, lipasa, amilasa y celulasa, tensioactivos, agentes secuestrantes e inhibidores de corrosión (pH = 8 en dilución), está diseñado

específicamente para limpiar instrumentación compleja, mínimamente invasiva (Jayasekara y Ratnayake 2019).

2.5.5.7 Agricultura

La aplicación de celulasas en la agricultura generalmente tiene mejoras en el crecimiento del cultivo y actúa como un agente de control de enfermedades de las plantas. Para estos propósitos, se aplican ampliamente, combinaciones de celulasas, hemicelulasas y pectinasas. Algunas celulasas de hongos tienen la capacidad de degradar la pared celular de los patógenos de plantas. También existen informes detallados sobre la aplicación de bacterias, como las rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas (PGPR) y mejoran su rendimiento (Jayasekara y Ratnayake 2019). Las bacterias juegan un papel importante en la reducción de uso de fertilizantes químicos, incrementan el desarrollo de las plantas y el control de posibles ataques de patógenos y protección de enfermedades. También, muchos hongos como *Trichoderma sp.*, *Geocladium sp.*, *Chaetomium sp.* y *Penicillium sp.* pueden mejorar la germinación de semillas, ayudan a un rápido crecimiento de la planta, aceleran la floración, mejoran el sistema de raíces y aumentan el rendimiento del cultivo. Sin embargo, los mecanismos exactos detrás de estas reacciones aún no se entienden claramente esta área necesita más investigación, sobre la caracterización y mejoras en las aplicaciones de celulasas microbianas en este campo (Jayasekara y Ratnayake 2019). En prácticas agrícolas tradicionales, en países como Sri Lanka, los agricultores solían agregar paja y hojas de Gliricidia como materiales celulósicos en sus campos y observaron que la incorporación de este tipo de material vegetal mejoró y aumentó la calidad del suelo, posiblemente se debe a que los microorganismos celulolíticos tienen la capacidad de producir celulasa y enzimas relacionadas y tienen participación directa en reacciones hidrolíticas del material lignocelulósico. Algunos informes, sostienen posibles sinergias entre la producción de celulasas y antibiótico bacteriano contra hongos patógenos de plantas. Reportes evidencian que los microorganismos celulolíticos participan en muchos procesos, como en la descomposición del suelo rizosférico y aumentan la disponibilidad de nutrientes para las plantas, controlan la presencia de patógenos de la planta, facilitan la colonización de raíces y penetración de cultivos de cereales mejorando los rendimientos y contenido de nutrientes (Jayasekara y Ratnayake 2019).

2.5.6 Mercado mundial de celulasas

De acuerdo a estudios de proyección estadística, se espera que el mercado de enzimas industriales crezca a una tasa compuesta anual de 6.83% durante el período de pronóstico del 2019-2024 (Bussines waire 2019). Los factores que promueven el mercado son las crecientes aplicaciones de enzimas para la obtención de productos especializados y las estrictas normas ambientales que limitan el uso de productos químicos. Las enzimas industriales de las carbohidrasas dominaron el mercado en 2017 y se espera que crezcan durante el período de pronóstico, debido a su uso creciente en alimentos y bebidas. América del norte ha liderado el mercado global de celulasas más alto en el 2017, la mayor aplicación es en la producción de biocombustibles, en EE.UU se incremento en la producción de butano de 1.891 trillones a 2.332 trillones de US\$ desde el 2013 al 2017 con un incremento de la tasa compuesta de crecimiento anual (CAGR) de 5.4% (Coherent Market Insigth) (CMI) (2018); y de acuerdo a los registros estadísticos del (IBEF= Indian Brand Equity Fundation) el mercado textil de la India se incremento de US\$ 99 billones al 2014 a US\$ 137 billones al 2016 con CAGR 17,6% (CMI, 2018). El procesamiento de alimentos domina el mercado de enzimas industriales con una participación total de ~ 37%. Este es el segmento de aplicaciones de más rápido crecimiento, respaldado principalmente por la creciente población mundial y su creciente poder adquisitivo. La concientización de los consumidores sobre la salud, también es otro factor para la creciente demanda de la gente por la calidad alimentaria, procesamiento y producción segura y valor nutricional mejorada (Bussines waire 2019).

La creciente demanda de alimentos de calidad y sabor natural, según las tendencias actuales, impulsaron a la utilización de enzimas industriales (amilasas, celulasas, xilanasas, pectinasas, proteasas, lipasas, glucosiltransferasas, arabinanasas, poligalacturonasas, quimosina y las beta-glucanasass, entre otras), se han convertido en los ingredientes esenciales de la industria alimentaria (Bussines waire 2019). Las aplicaciones de enzimas industriales para la modificación de grasas, proteínas, almidones y edulcorantes, han contribuido a las innovaciones tecnológicas de la industria alimentaria e impulsando el mercado de enzimas. El mercado de norte América, alcanzó la mayor participación con el 36% del mercado mundial en el 2017 (Bussines waire 2019, CMI 2018). La mayor aplicación de enzimas en las industrias de los Estados Unidos, correlaciona con la generación de tecnologías ecológicas, compatibles con el medio ambiente, mayor productividad

y calidad del producto, lo que conduce a un mayor crecimiento de la investigación científica y desarrollo tecnológico utilizando enzimas (CMI 2018).

Uno de los principales factores que impulsan el crecimiento de las enzimas industriales en el mercado de los Estados Unidos es el uso creciente de enzimas en la industria de alimentos y bebidas. Según la mayoría de los informes de investigación de mercado de enzimas publicados en 2018, alimentos y bebidas, industria textil, alimentos para animales y biocombustibles, fue informado como las principales áreas de aplicaciones de las celulasas. Otro reporte de investigación sobre el mercado global de celulasas (CAS 9012-54-8) publicado en el 2018, Asia-Pacífico es el mayor consumidor de celulasas, con un ingreso de cuota de mercado de cerca del 32.84% en el 2016. En la Figura 6, se muestra los rubros de mayor demandada de celulasas. Este mismo informe pronostica que las aplicaciones de celulasas alcanzarán los 2300 millones de dólares a finales de 2025, creciendo a una tasa anual compuesta (CAGR) del 5,5% durante el período 2018-2025. Estos datos sugieren que la aplicación de celulasas en las industrias está aumentando drásticamente cada año (CMI 2018). Novozymes y DuPont de Dinamarca son las empresas productoras clave de enzimas celulasas, son las que mayormente suministran estas enzimas al mercado global para aplicaciones industriales (Busines - Waire 2019).

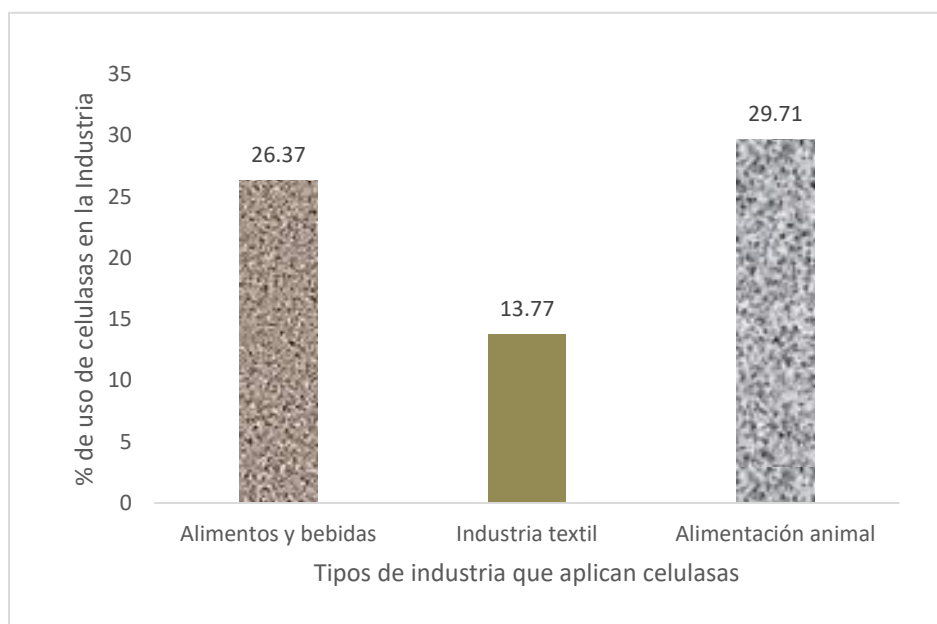


Figura 6: Demanda industrial de celulasas en el mercado Asia – Pacífico 2016

Fuente: Bussines - Waire (2019).

Las celulasas son actualmente la tercera enzima industrial más grande por volumen de dólares. La demanda de celulasas está aumentando debido a sus diversas aplicaciones en la industria (Wilson 2009). Varias empresas están involucradas en la producción de celulasa para las industrias de textiles, detergentes, pulpa y papel, una de ellas es Novozymes, también tiene una amplia gama de preparaciones de celulasas comerciales con aplicaciones específicas, como Cellulosoft AP y Cellulosoft CR para bioblasting en fábricas textiles, Carezyme y Celluclean para lavandería en detergentes y Denimax para la industria del lavado a la piedra (Singhania *et al.* 2010). Aunque la mayoría de las empresas productoras de enzimas en todo el mundo están involucradas en la producción y comercialización de celulasas para diversas aplicaciones, muy pocas de ellas desarrollan celulasa para la conversión de biomasa vegetal (Singhania *et al.* 2010, Sarrouh *et al.* 2012).

2.6 XILANASAS Y PROPIEDADES BIOQUIMICAS

Las xilanasas son sistemas complejos de enzimas xilanolíticas que incluyen endoxilanasas, β -xilosidasa, α - glucuronidasa, α - arabinofuranosidasa y acetilxilan estearasa (Juturu y Wu 2012). Son un grupo de enzimas hidrolasas glucosidos, que degradan los polizacaridos de xilano lineal en xilosa catalizando la hidrólisis de los enlaces xilosídicos β - 1, 4. Las xilanasas han sido clasificados en al menos en tres formas, basado en su masa molecular y punto isoeléctrico (Wong *et al.* 1988), estructura cristalina (Jeffries 1996) y las propiedades cinéticas o la especificidad del sustrato y perfil del producto (Motta *et al.* 2013).

Generalmente, los hongos filamentosos producen una multiplicidad de β -xilosidasas. La multiplicidad de xilanasas es explicado por la naturaleza heterogénea del polímero de xilano. Estas enzimas exhiben una diversidad de propiedades fisicoquímicas, estructuras, actividades específicas y rendimientos (Wong *et al.* 1988, Wu y Lee 1997, Yang *et al.* 2006, Sánchez 2009). Las xilanasas microbianas son proteínas de una sola subunidad con masas moleculares desde 8-145 kDa. La actividad óptima de la endoxilanasas es de 40 a 60°C (Kulkarni *et al.* 1999, Knob *et al.* 2010). Las xilanasas fúngicas son menos termoestables que las xilanasas bacterianas. El hongo mesófilo *Ceratocystis paradoxa*, produce xilanasas termoestables, capaces de soportar 80°C durante 1 hora. Las xilanasas de diferentes organismos suelen ser estables en un amplio rango de pH (3-10) con un

rango óptimo de 4-7. Los puntos isoeléctricos de las endoxilanasas de diversas fuentes oscilan entre 3 y 10 (Kulkarni *et al.* 1999). La mayoría de las xilanasas fúngicas exhiben puntos isoeléctricos en el rango de 4-5; las xilanasas de *Talaromyces emersonni* tiene un pI inusual de 8.9 (Knob *et al.* 2010). En general, las bacterias producen dos xilanasas; uno ácido de alta masa molecular y otro básico de baja masa molecular. La composición de aminoácidos de las xilanasas de diversas fuentes, indican predominantemente ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, serina y treonina (Kulkarni *et al.* 1999). La aparición de enzimas glicosiladas es común entre muchas xilanasas eucariotas. Los grupos de carbohidratos están unidos covalentemente a proteínas. La glicosilación está implicada en promover la estabilidad de las xilanasas contra ambientes extremos (Kulkarni *et al.* 1999, Knob *et al.* 2010). El contenido de carbohidratos de la mayoría de xilanasas se estima en un 10-30%. El mayor contenido se ha verificado en *Aspergillus versicolor* (47%), *Paecilomyces thermophila* (61.5%) y *Aspergillus phoenicis* (43.5%) (Kulkarni *et al.* 1999).

2.6.1 Regulación de la síntesis de xilanasas

Se ha demostrado que la producción de xilanasas por diversas bacterias y hongos es inducible (Kulkarni *et al.* 1999). Se han informado casos raros de xilanasas constitutivas. La regulación de la síntesis de xilanasas es un fenómeno complejo y depende del inductor individual. Los componentes del sustrato a menudo pueden influir en la inducción de xilanasas; también pueden actuar como inhibidores del producto final, posiblemente en concentraciones mucho más altas (Kulkarni *et al.* 1999, Knob *et al.* 2010). En la Figura 7, se muestra un modelo hipotético de biosíntesis de xilanasas, se deduce previamente que las xilanasas constitutivas hidrolizan el xilano a xilooligosacáridos y xilobiosa y son absorbidos por la célula e inducen otros genes de xilanasas. Las L-xilosidasas, pueden producirse de manera constitutiva y/o inducible, convierten la xilobiosa en xilosa y posteriormente pueden transglicosilarlo a XylB1-2Xyl y GlcB1-2Xyl. Estos productos son absorbidos por la célula y actúan como inductores de genes para la codificación de enzimas xilanolíticas (Thomson 1993). Los oligosacáridos son transportados a la célula con la ayuda de β -xilosidasas permeasas, donde desencadenan síntesis de endoxilanasas (Shallom y Shoham 2003, Polizeli *et al.* 2005). La actividad de permeasas en células inducidas, se ve disminuida en presencia de glucosa (Polizeli *et al.* 2005). Esta represión de catabolitos está mediada por el represor CreA (entidades catabólicas reprimibles A). La regulación está mediada por el activador transcripcional XlnR. XlnR regula el número de genes implicados en la degradación de xilano, como los que

codifican para β -xilosidasa, α -glucoronidasa, xilanasa, arabinoxilano arabinofuranohidrolasa y D-xilosa reductasa (Knob *et al.* 2010). La detección y análisis funcional de los genes de xilanasa de *A. niger* y *A. tubigensis* condujeron al descubrimiento de una secuencia triplicada que parece controlar la inducción enzimática.

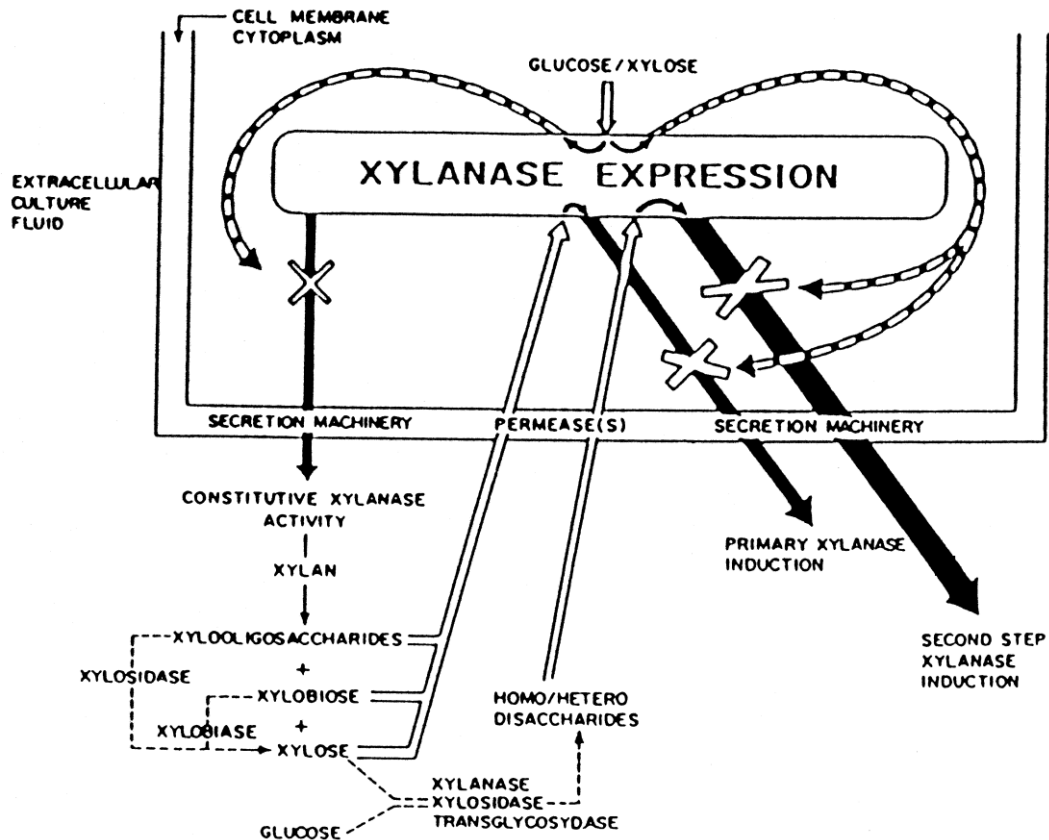


Figura 7: Regulación de la síntesis de xilanasa (Modelo hipotético)

Fuente: Thomson (1993).

2.6.2 Fuente de xilanasas

Las xilanasas se producen principalmente por microorganismos. Las hemicelulasas se han producido a partir de una serie de microorganismos que incluyen bacterias, levaduras y hongos filamentosos, tales como *Trichoderma*, *Bacillus*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Aureobasidium*, *Fusarium*, *Chaetomium*, *Phanerochaete*, *Rhizomucor*, *Humicola*, *Talaromyces* y muchos otros. Estos hongos producen enzimas extracelulares con una amplia gama de actividades. Varios sustratos como el rastrojo de maíz (Kumar *et al.* 2009), salvado de trigo, mazorcas de maíz,

salvado de lentejas y cáscaras de maní (Kang *et al.* 2004) se han utilizado en procesos de fermentación sumergida y en estado sólido para la producción de xilanasas. Naturalmente, las xilanasas degradan las paredes celulares de las plantas junto con otras enzimas. En la germinación de algunas semillas (ejemplo, el malteado de cebada) digieren el xilano. Las xilanasas también se pueden encontrar en algas marinas, protozoos, crustáceos, insectos, caracoles y semillas de plantas terrestres (Kang *et al.* 2004). Los hongos filamentosos son las fuentes más importantes de xilanasas, comparado a las levaduras y bacterias. Las xilanasas producidas por bacterias tienen niveles bajos de actividad hidrolítica, (Knob *et al.* 2010).

2.6.3 Producción de xilanasas y factores que afectan el rendimiento de xilanasas

Los factores básicos para la producción eficiente de xilanasas dependen del sustrato inductor apropiado y la composición óptima de nutrientes. Bandikari *et al.* (2014) utilizaron agro - residuos no tratado y pretratado para la producción de xilanasas los sustratos pretratados combinados con las cáscaras de frutas, mejoraron la producción de xilanasas por FES, el uso de sustratos con una composición adecuada de fuentes de carbono, para reducir los costos de producción de xilanasas son alternativas alentadoras. La producción de sistemas de xilanasas libres de celulosa es de gran importancia en la industria de la pulpa y de papel. Las xilanasas libres de celulosa implica la eliminación selectiva de xilano de las pastas disueltas que aseguran un daño mínimo a las fibras de pulpa, generan pulpa de disolución o calidad superior y minimizan el uso de sustancias químicas, disminuyendo así la cantidad de desechos liberados durante los procesos de blanqueo (Coman y Bahrim 2011). Los hongos filamentosos son capaces de secretar grandes cantidades de xilanasas extracelulares. Sin embargo, las xilanasas fúngicas generalmente se asocian con celulosa (Kulkarni *et al.* 1999). La producción selectiva de xilanasas es posible en el caso de las especies de *Trichoderma* y *Aspergillus* que usan solo xilano como fuente de carbono. Algunas cepas fúngicas, cuando utilizan celulosa como fuente de carbono, producen celulosa como xilanasas, que pueden deberse a trazas de hemicelulosa presentes en los sustratos celulósicos (Biely 1993). Los mecanismos que gobiernan la formación de enzimas extracelulares en relación a las fuentes de carbono presentes en el medio están influenciados por la disponibilidad de precursores para la síntesis de proteínas (Biely 1993). Medios de cultivo con sustratos celulósicos esenciales, permitieron máxima producción de xilanasas por *Clostridium stercorarium* (Berenger *et al.* 1985),

Thermomonospora curvata (Stutzenberger y Bodine 1992) y *Neurospora crassa* (Deshpande *et al.* 1986, Kulkarni *et al.* 1999, Gírio *et al.* 2010).

El rendimiento de producción de xilanasas por fermentación depende de algunos factores. La composición química del sustrato y los parámetros físicos son importantes durante la fermentación en FES (Gomes *et al.* 2016). La utilización de sustratos heterogéneos complejos, promueve un efecto combinado sobre el nivel de expresión de xilanasas. Los efectos se manifiestan a través de la accesibilidad del sustrato, la velocidad y la cantidad de liberación de los xilo-oligosacáridos, que actúa como fuente de carbono e inhibidores de la síntesis de xilanasas en muchos casos (Gomes *et al.* 2016).

2.6.4 Aplicación de xilanasas

Las xilanasas de diversos grupos de microorganismos han incrementado el interés en las últimas décadas, por su enorme potencial biotecnológico en una amplia variedad de procesos industriales (Linares-Pasten *et al.* 2018). Las xilanasas han sido aplicadas en la sacarificación (preparación de azúcar fermentecible) de material lignocelulósico (Basit *et al.* 2018a), alimentos para animales (como aditivos) (Ndou *et al.* 2015), blanqueado de pulpa de madera libre de cloro (Thomas *et al.* 2015), y sacarificación de granos para cervecería (Amor *et al.* 2015). Adicionalmente, la producción de xilooligosacáridos (XOSs) como prebióticos usando xilanasas a cobrado interés (Morgan *et al.* 2017, Linares-Pasten *et al.* 2018, Nordberg - Karlsson *et al.* 2018). Los XOSs con un grado de polimerización entre 2 y 10 unidades de xilosa, demostraron gran efecto prebiótico y considerados como ingredientes potenciales para el preparado de alimentos y fármacos (Aachary and Prapulla, 2011, Nieto-Domínguez *et al.* 2017).

Las xilanasas son utilizadas en la industria panificadora en combinación con otras enzimas (α -amilasas, proteasa, glucosa oxidasas). Las xilanasas hidrolizan las hemicelulosas de la harina de trigo, mejoran la redistribución de agua, generan una masa suave, de fácil amasado y moldeado. En la cocción del pan las xilanasas retrasan la formación de migas, favorecen el crecimiento de la masa, aumentan el volumen, mejoran la textura del pan y extienden la vida útil (Comacho y Aguilar 2003, Polizeli *et al.* 2005). En la fabricación de galletas, se recomienda el uso de xilanasas, para

que las galletas cremosas sean más livianas y mejoren la textura, palatabilidad y uniformidad de las obleas (Beg *et al.* 2001, Polizeli *et al.* 2005).

En la producción de jugos de frutas y vegetales el uso de xilanasas, junto con celulasas, amilasas y pectinasas mejoran el rendimiento de producción de jugos, estabilizan la pulpa de fruta, favorecen la conservación de aromas, aceites esenciales y colorantes naturales, ayudan a reducir la viscosidad de pulpas, hidrolizan sustancias que pueden causar turbidez en el concentrado (Wong *et al.* 1988, Polizeli *et al.* 2005). Las xilanasas, también son utilizadas en la preparación de dextranos utilizados como espesantes de alimentos. Además, la xilanasas en combinación con la endoglucanasa participa en la hidrólisis de arabinoxilano y almidón, que ayudan a separar el gluten de la harina de trigo (Polizeli *et al.* 2005). Las combinaciones de celulasas y xilanasas se usan en la hidrólisis parcial de alimentos para animales para mejorar la calidad del ensilado y la alimentación verde (Muthezhilan *et al.* 2007). Las xilanasas también se pueden usar para preparar materiales para la investigación científica. Las xilanasas bien caracterizadas pueden ser útiles para la caracterización de polisacáridos y paredes de células vegetales (Paës *et al.* 2012). Las xilanasas seleccionadas pueden ser utilizadas para hidrolizar xilololosacáridos ramificados y no ramificados, cortos y largos o marcados, que son compuestos modelo utilizados para estudiar los mecanismos de acción de la xilanasas. Algunas xilanasas pueden usarse para mejorar la maceración de la pared celular para la producción de protoplastos de plantas (Wong *et al.* 1988, Paës *et al.* 2012).

2.6.5 Mecanismo de acción de xilanasas

El mecanismo catalítico de xilanasas es similar a las celulasas, procede en condiciones ácido – base, que involucra dos residuos de aminoácidos. El primer residuo se comporta como un catalizador general y protona el oxígeno del enlace osídico (Mishra *et al.* 1984). El segundo residuo, actúa como un nucleófilo que, al retener enzimas, interactúa con el oxocarbonio intermedio y genera la formación de un ion OH^- de la molécula de agua, para promover la inversión de la enzima. La reacción con mantenimiento de la configuración implica un comportamiento de paso doble, que produce la transferencia de protones y de un átomo de oxígeno en una posición ecuatorial en el centro anomérico (Sinnot 1990). Este mecanismo de reacción es similar al de la lisozima (Kelly *et al.* 1979). Las xilanasas exhiben principalmente un proceso de doble

desplazamiento que involucra una enzima glicosídica intermedia que se forma e hidroliza a través del ion oxocarbonio como estado de transición.

La hidrólisis completa del xilano requiere la acción sinérgica de un sistema xilanólico (Biely 1985), conformado por la Endo- β -1,4-xilanasas (E.C.3.2.1.8) y β -D-xilosidasas (E.C.3.2.1.37), siendo las responsables de la degradación polimérica. Las xilanasas hidrolizan enlaces interno de $\beta(1 \rightarrow 4)$ de la cadena carbonada del xilano y liberan diferentes longitudes de xilooligosacáridos sustituidos; mientras que las β -xilosidasas son exoglicosidasas que liberan xilooligosacáridos y xilosas más pequeños de los extremos no reductores de los xilooligosacáridos. β -xilosidasas, realizan mayor actividad hidrolítica sobre los enlaces glicosídicos y también evitan la inhibición por producto de xilanasas, por lo que su participación hidrolítica es muy importante (Jordan y Wagschal 2010). Reilly (1981) clasificó tres P-xilosidasas aparentes como "exoxilanasas" porque presentaron actividad detectable en xilano, dos de estas enzimas aparentemente carecen de actividad transferasa y una de ellas provoca inversión de configuración, características que se han utilizado para distinguir entre β -glucosidasas y exoglucanasas (Eriksson y Wood 1985, Wood 1985). Además, una exoglucanasa de *T. viride* (Onozuka-celulasa) ha demostrado que hidroliza xilano por el extremo de la cadena para producir inicialmente xilobiosa (Shikata y Nisizawa 1975).

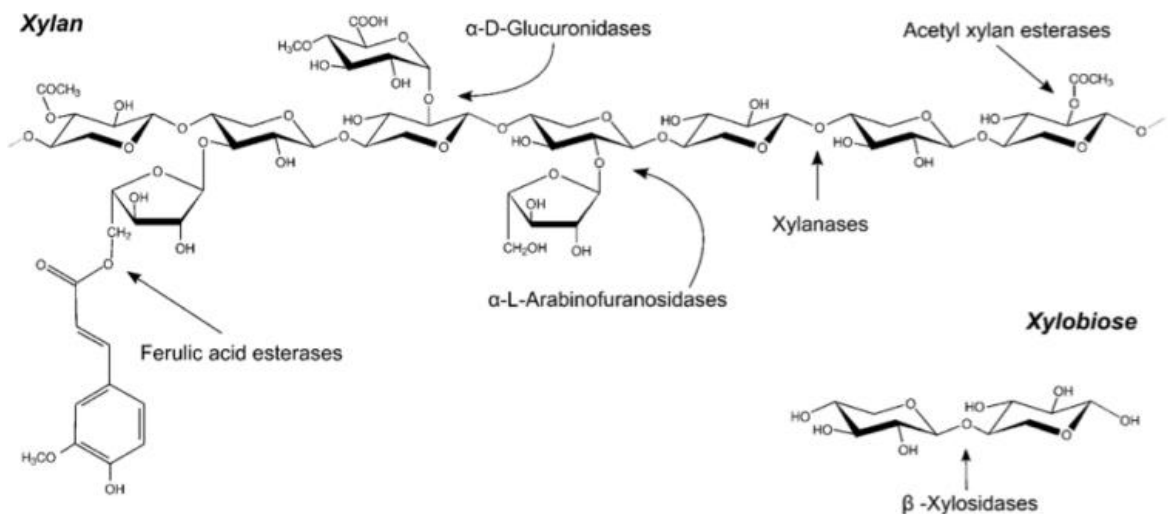


Figura 8: Sitios de hidrólisis por las enzimas xilanasas en la molécula de xilano.

Fuente: Pastor *et al.* (2007).

Debido a la heterogeneidad y complejidad del xilano, para la degradación requiere de la acción de una gran variedad de enzimas hidrolíticas, que pueden ser clasificadas en dos principales grupos: las que actúan sobre el esqueleto de xilosa, y los que remueven las cadenas laterales. La degradación de la estructura de xilosa depende de la acción de las xilanasas, que hidrolizan en la parte interna del polímero, y las β -xilosidasas, son las que liberan residuos de xilosa a partir de la xilobiosa y los xilooligómeros formados (Pastor *et al.* 2007). La ruptura de la molécula del xilano, es catalizado por α -L - arabinofuranosidasas, α -D-glucuronidasas, acetil xilan esterases, ácido ferúlico esterases y ácido p-cumárico esterases (Figura 8). Las xilanasas pertenecen a la familia de hidrolasas glicosidos (GH) y entre estos se tiene dos grupos. La familia GH10 esta compuesto de endo – 1,4- β -xilanasas y 1,3- β -xilanasas (EC 3.2.1.32) (Motta *et al.* 2013), miembros de esta familia son capaces de hidrolizar aril β - glicosidos de xilobiosa y en enlaces aglicónicos de xilotriosa. Estas enzimas son altamente activas en xilooligosacaridos cortos o sustratos pequeños con sitios de unión. Las familias GH11 estan compuestos únicamente de xilanasas (EC 3.2.1.8) considerados como “xilanasas verdaderas”, son exclusivamente activos en sustratos que tienen d-xilosa. De todas las xilanasas, las endoxilanasas son las más importantes, debido a su directa ruptura de los enlaces glucosídicos y liberación de pequeños xilooligosacaridos (Collins *et al.* 2005), los hongos filamentosos secretan altas cantidades de xilanasas extracelulares a menudo acompañados con enzimas celulolíticas, ejemplo en *Trichoderma*, *Penicillium* y *Aspergillus* (Kohli *et al.* 2001, Polizeli *et al.* 2005, Wong y Saddler 1992)

2.7 β – GLUCOSIDASAS, PROPIEDADES BIOQUÍMICAS Y FUNCIÓN

Las β -glucosidasas (EC 3.2.1.21), pertenecen a un grupo heterogéneo de enzimas hidrolíticas, que degradan los enlaces alquil – aril β -glucósido o enlaces glucosídico β (1-4) de disacáridos y oligosacáridos (Lecleric *et al.* 1987) originando monómeros de glucosa. Las β - glucosidasas, son responsables del catabolismo de muchos hidratos de carbono; pueden actuar como endo o exoglucanasas, se diferencian por donde inician la hidrólisis del carbohidrato (Sue *et al.* 2006). Las β -glucosidasas también poseen actividad transglucosidasas y pueden generar polisacaridos de mayor tamaño. Por su capacidad hidrolítica de compuestos glicosilados, tiene aplicación en las industrias de zumos de frutas y derivados, así mismo en la industria de vinos y ayuda a mejorar el aroma (Palmeri *et al.* 2007). Otra aplicación es la industria alcoholera utilizando residuos agrícolas (Sue *et al.* 2006).

Las β -glucosidasa al igual que las α - glucosidasas se encuentran distribuidas en el mundo viviente (microorganismos, animales, plantas y seres humanos) y cumplen funciones biológicas fundamentales y muy diversas, así como en el catabolismo glucósido, glucolípido en el tejido humano, en pigmentos de la pared celular, metabolismo del cianoglucósido y defensa contra patógenos en plantas. También se encuentran en el sistema digestivo de insectos (Riseh *et al.* 2012) que se alimentan de vegetales. Los roles fisiológicos asociados con la β -glucosidasa, son diversos y dependen de la ubicación de la enzima en el sistema biológico y tipo en el que se producen. En los microorganismos celulolíticos, las β -glucosidasas está implicada en la inducción de las celulastas y la hidrólisis de la celulosa (Bisaria y Mishra 1989, Tomme *et al.* 1995). En las plantas, la enzima participa en la síntesis de β -glucano durante el desarrollo de la pared celular, en el metabolismo del pigmento, la maduración de la fruta y los mecanismos de defensa (Esen 1993; Brozobohaty *et al.* 1993), mientras que, en humanos y otros mamíferos, BGL está involucrado en hidrólisis de glucosil ceramidas

2.7.1 Importancia y aplicación de las β – glucosidasa

Estas enzimas se usan ampliamente en diversos procesos biotecnológicos (Xin *et al.* 1993, Bhotast *et al.* 1997). Por sus diversas aplicaciones, su producción y caracterización están cobrando mucha importancia en los últimos años. Las β -glucosidasas han ganado importancia en la utilización de sustratos a base de celulosa y oligosacáridos para hongos y bacterias en la producción de bioetanol como combustible (Esen 1993, Krisch *et al.* 2010). En la industria del sabor, facilitan la liberación de aromas que generan compuestos aromáticos de precursores glucosídicos presente en frutas y productos de fermentación (Roitner *et al.* 1984, Martino *et al.* 2000). La suplementación de β -glucosidasa exógena en los bioprocesos no solo aumenta el rendimiento de glucosa, sino también de etanol en cierto nivel (Xin *et al.* 1993). En la elaboración de vino, las β -glucosidasas incrementan la liberación de aromas de la uva, se usan preparados enzimáticos comerciales de origen fúngico, principalmente procedentes de *Aspergillus spp*, estos preparados son utilizados en bodegas y poseen actividades exo β -glucanásica, endo- β -1,3-glucanásica, exo- β -1,6-glucanásica y actividad β -glucosidásica (Van Rensburg y Pretorius 2000). Estas enzimas pueden liberar los terpenos en los vinos. Su eficacia se basa en que no son selectivas y toleran relativamente bien, altas concentraciones de etanol, aunque su pH óptimo oscila entre 5 y 6.

2.8 FERMENTACIÓN

La fermentación comprende un sistema complejo de reacciones bioquímicas provocadas por catalizadores de microorganismos que pueden estar presentes simultáneamente (Collado – Fernandez 2003). En un proceso de fermentación, los microorganismos mantienen sus ciclos de vida a través de una gran cantidad de vías metabólicas interrelacionadas/complejas que cubren las funciones biosintéticas y de producción de energía (Tamine y Robinson's 2007). Cada ruta metabólica individual consta de muchas reacciones que, a su vez, están reguladas por diferentes sistemas enzimáticos y, por lo tanto, es el nivel de síntesis y actividad enzimática que mantiene y controla las funciones de la célula microbiana (Stanier *et al.* 1987). Un mecanismo regulador (o retroalimentación) se deriva de compuestos de bajo peso molecular que resultan de la descomposición de nutrientes (carbohidratos, proteínas, lípidos y otros constituyentes menores) presentes en el medio de crecimiento. La composición de este medio es, por lo tanto, importante en relación con la acumulación y división de las células microbianas (Figura 9).

Algunos procesos de fermentación son anaeróbicos, que producen energía, donde los sustratos se transforman secuencialmente mediante procesos de reducción-oxidación. No hay un aceptor de electrones externo involucrado; es decir, los niveles redox del sustrato y los metabolitos siguen siendo los mismos. Las fermentaciones representan una dismutación de las moléculas del sustrato. En las fermentaciones se conserva una cantidad relativamente baja de energía: la fermentación de un mol de glucosa produce 2–4 moles de ATP dependiendo del tipo de fermentación. En algunas fermentaciones de succinato/propionato, la etapa en la que el fumarato se reduce a succinato se acopla a la fosforilación oxidativa, en lugar de la fosforilación a nivel de sustrato. En algunos casos, la excreción de productos de fermentación da como resultado una fuerza motriz de protones, que se explota en la síntesis de ATP facilitada por la membrana. Algunos tipos de fermentaciones en las que utilizan CO₂ o H₂O derivados externamente como aceptores de electrones no representan un equilibrio redox completo. Algunos fermentados, también pueden "volcar" equivalentes reductores a compuestos externos como nitrato o Fe oxidado como alternativa a la excreción de H₂ (Fenchel *et al.* 2012).

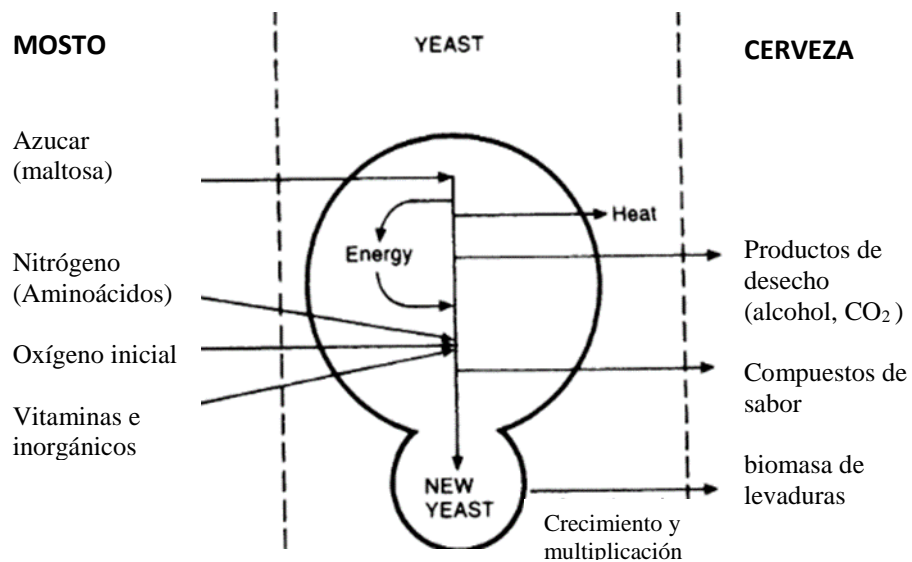


Figura 9: Principales eventos bioquímicos desarrollados por levaduras en una fermentación sumergida para producir cerveza.

Fuente: Lewis *et al.* (2001).

Existen diferentes tipos de fermentación resultantes de la acción de la levadura y otros microorganismos, como las bacterias del ácido láctico. Durante la fermentación, los nutrientes del sustrato se asimilan directamente en nuevos componentes celulares o se usan para generar intermedios para este proceso. La generación y la utilización de energía están íntimamente vinculadas. Además, conducen a la síntesis y secreción en el mosto de una gran cantidad de productos metabólicos menores, muchos de los cuales generan sabores y aromas característicos (Lewis *et al.* 2001). Por lo general, los procesos de fermentación en lote o discontinuos, obedecen a un crecimiento y desarrollo metabólico en cuatro fases principales: fase lag o de adaptación del microorganismo, fase logarítmica o exponencial de crecimiento constante, fase estacionaria donde se mantiene constante la cantidad de biomasa y fase de muerte; conforme crece el microorganismo, paralelamente ocurre la disminución del sustrato y formación del producto. Charalampopoulos *et al.* (2009) señalan que el modelamiento de los procesos de fermentación, así como del ácido láctico es necesario para predecir el comportamiento del crecimiento y/o la producción de metabolitos.

2.8.1 Tipos de fermentación según el medio de cultivo

2.8.1.1 Fermentación sumergida, aspectos generales

Consiste en el crecimiento y desarrollo del microorganismo en suspensión en un medio de cultivo líquido, con varios nutrientes disueltos o suspendidos (Aryal 2019). Dependiendo de la composición del medio de cultivo y del microorganismo, producen metabolitos intra y extracelulares que son liberados al medio líquido fermentado. Las ventajas de este método de fermentación son:

- Corto período de proceso, bajo costo y alto rendimiento.
- Fácil recogida del producto o metabolito
- Control del proceso de fermentación no es complejo, en procesos de alta capacidad de producción ofrecen control en línea sobre varios parámetros tales como pH, temperatura, OD (oxígeno disuelto) y formación de espuma.
- Puede aplicarse para la producción de muchos metabolitos primarios y secundarios.
- Facilita la optimización del proceso de fermentación y escalamiento.
- Tiene aplicación industrial en biorreactores de tanque agitado para la producción de enzimas y otros metabolitos
- Han sido ampliamente investigados y están bien desarrollados
- No presenta dificultades en la transferencia de masa y eliminación de calor.
- El medio de cultivo líquido favorece la distribución homogénea de los nutrientes, temperatura, pH y un adecuado contacto con los microorganismos.
- Es versátil presenta cuatro formas principales de cultivo: cultivo discontinuo, cultivo discontinuo alimentado, cultivo discontinuo de perfusión y cultivo continuo (Kumar *et al.* 2017).

La fermentación sumergida a la vez presenta limitaciones, como:

- Baja productividad volumétrica
- Relativamente menor concentración del metabolito de interés.
- Genera grandes volúmenes de efluentes.
- Requiere de biorreactores debidamente diseñados con dispositivos de agitación mecánica, distribuidores de oxígeno, etc. en ocasiones son de configuración compleja (Aryal 2019).

a. Aplicaciones de la fermentación sumergida (FS)

- Es ampliamente utilizado en la producción de diversas enzimas de fuentes bacterianas, debido a la exigencia de un mayor potencial de agua (Chahal 1983).
- También es utilizado en la producción de enzimas de hongos, como el de *A. niger* (Holker *et al.* 2004).
- Son utilizados en procesos de fermentación con organismos modificados genéticamente.
- Los sustratos más comunes que son utilizados en este sistema, son azúcares solubles, melazas, medios líquidos, jugos de frutas y vegetales, y aguas residuales.
- Son utilizados para la producción de: antibióticos (Maragkoudakis *et al.* 2009), pigmentos, enzimas (Aguilar *et al.* 2008, Kokila y Mrudula 2010), agentes hipercolesterolémicos (Xie y Tang 2007, Pansuriya y Singhal 2010), antioxidantes (Tafulo *et al.* 2010), agentes antihipertensivos (Nakahara *et al.* 2010), agentes antitumorales (Ruiz-Sanchez *et al.* 2010), biotensioactivos y péptidos bioactivos (Pritchard *et al.* 2010).

2.8.1.2 Fermentación en biopelículas, aspectos generales

Las biopelículas son un conjunto de microorganismos, unidos a una superficie sólida y cubierto por compuestos poliméricos extracelulares (EPS), y actúan como un consorcio cooperativo (McDougald *et al.* 2012). Las colonias microbianas se forman desde monocapas de células individuales dispersas a agrupaciones de características mucilaginosas gruesas de dimensiones macroscópicas (Wimpenny *et al.* 2000). El periodo de formación de las biopelículas microbianas comprende las siguientes etapas:

- Adhesión de células individuales a una superficie sólida
- Maduración y formación de microcolonias complejas y
- Distribución celular de alta movilidad.

El modo de vida en biofilm, es una característica común a la mayoría de los microorganismos en hábitats naturales (McDougald *et al.* 2012). Las biopelículas son ubicuas en casi todas las interfaces acuosas, como sólido, líquido o interfaces aire- líquido (Jenkins y Lapin 2001). El crecimiento filamentoso es una característica fundamental y es una característica morfológica importante de *A.*

fumigatus, requerido durante el desarrollo de un aspergilloma (Beauvais *et al.* 2007; Ramage *et al.* 2009, Loussert *et al.* 2010). El inicio de esta infección crónica involucra la germinación de conidia y posterior invasión hifal del tejido pulmonar (Filler y Sheppard, 2006). Las esporas de hongos se adhieren a superficies compatibles por varios mecanismos, que incluyen interacciones complejas de procesos físicos y biológicos. Además, las propiedades físicas del soporte (hidrofobicidad, carga electrostática y rugosidad de la superficie) influyen en la adhesión de los microorganismos (Cunliffe *et al.* 1999, Webb *et al.* 1999, Dufrene 2000, Bigerelle *et al.* 2002, Beauvais *et al.* 2007). Una clase pequeña de proteínas anfipáticas denominadas hidrofobinas intervienen en la adhesión de hongos filamentosos, y recientemente se ha demostrado que juegan un papel en el desarrollo de biopelículas de hongos (Kershaw y Talbot 1998, Linder *et al.* 2005, Armenante *et al.* 2010, Bruns *et al.* 2010, Pérez *et al.* 2011). Las hidrofobinas mantienen la adhesión de esporas a superficies hidrofóbicas naturales y artificiales, posiblemente generando señales morfogenéticas (Scholtmeijer *et al.* 2001, Wosten 2001, Linder *et al.* 2005a). Las hidrofobinas, tienen un patrón característico de ocho residuos de cisteína, se han reportado en *A. fumigatus* como responsable de las fuerzas de adhesión, tienen una fuerza de 2858 ± 1010 pN durante la adhesión de esporas a las superficies (Dague *et al.* 2008, Dupres *et al.* 2010). La morfología rugosa de las esporas de algunos hongos como de *A. niger* es importante para una primera adhesión física a la superficie del soporte y a la vez es ayudado por la producción de sustancias adhesivas, que forman parte del proceso de adsorción (Villena y Gutiérrez-Correa 2007b, Gamarra *et al.* 2010, Lord y Read 2011).

a. Mecanismo de formación de biopelículas

La formación de biopelículas, también se ven influenciadas por factores genéticos, así como los *medA* (desarrollo de genes modificadores) (Clutterbuck 1969), que revelan una funcionalidad importante y recientemente han sido caracterizados en actividades de conidiación, interacciones y virulencia de célula huésped (Gravelat *et al.* 2010). Las biopelículas fúngicas y bacterianas, tienen definido las fases de su desarrollo, incluyen un sustrato apropiado, adhesión, colonización, *producción* de polisacáridos, maduración y dispersión de biopelículas (Chandra *et al.* 2001, Donlan 2002, Blankenship y Mitchell 2006). La etapa inicial de la siembra conidial, tiene un periodo de retraso por la adhesión conidial, la relación de contacto conidio - superficie se requiere para desencadenar la germinación (Shaw *et al.* 2006). La germinación es de 6 – 8 h, la formación de filamentos y de monocapas 12 h, seguidos de una mayor complejidad estructural, de producción y

maduración de exopolisacáridos (EPS) (24 h). Durante estos tiempos, la profundidad de la biopelícula aumenta de 10 a 200 μm (Figura 10) (Mowat *et al.* 2007).

La formación de biopelículas de *A. niger*, también se puede dividir en distintas fases: (i) adhesión, se incrementa fuertemente por la hidrofobia de las esporas de *A. niger*, (ii) fase inicial de crecimiento y desarrollo desde la germinación de esporas hasta colonización de superficie y (iii) fase de maduración, en la cual la densidad de biomasa aumenta mucho con el desarrollo de una organización de canales internos (Gutiérrez-Correa y Villena 2003). A través de estos canales parecen permitir el paso de fluidos, favoreciendo una mejor transferencia de masa (Villena y Gutiérrez - Correa 2006, Villena y Gutiérrez-Correa 2007b, Villena *et al.* 2010). También hay una coordinación de crecimiento espacial diferente, cuando el hongo se adhiere a la superficie. Esta coordinación responde a interacciones estéricas entre hifas y puntas en contacto con superficies.

Existen muy pocos reportes sobre biología molecular y genómica funcional de biopelículas de *Aspergillus*, sin embargo, recientes estudios sobre cambios específicos transcripcionales y proteómica de biopelículas de *A. fumigatus* (Bruns *et al.* 2010), determinaron que las regulaciones de los biofilms dependen del tiempo, de muchas proteínas y de genes asociados con el metabolismo primario, lo que indica que su desarrollo depende de la energía en biopelículas jóvenes. La maduración de las biopelículas muestra una reducción de la actividad metabólica y una regulación positiva de hidrofobinas y proteínas involucradas en la biosíntesis.

b. Aplicaciones y ventajas

En la mayoría de los casos donde las biopelículas son una molestia, el término ensuciamiento microbiano o biofouling es ampliamente utilizado (Kumar y Anand 1998). Por ejemplo, la bioincrustación puede ser un problema en la industria alimentaria, contribuye a las infecciones humanas (Gotz 2002) y puede conducir a la biocorrosión de materiales (Beech y Sunner 2004). Sin embargo, las biopelículas no solo revelan efectos negativos. A partir de la fermentación en biopelículas se puede producir levaduras, bacterias de ácido láctico y bacterias de ácido acético de vinagre (Okazaki *et al.* 2010). Vinagre de arroz tradicional producido en Japón (Okazaki *et al.* 2010 y Haruta *et al.* 2006). Entre los microorganismos relacionados con la elaboración de cerveza, encontraron una cepa LAB única, que podría formar una espesa biopelícula de especies mixtas en

cultivo combinado con levaduras en formación (Furukawa *et al.* 2010). El mecanismo de la formación de biopelículas de especies mixtas, como células inmovilizadas, su papel e importancia fueron investigados (Furukawa *et al.* 2012, Furukawa *et al.* 2014). La aplicación de biopelículas como células inmovilizadas también es un enfoque importante y desafiante en la industria alimentaria. La inmovilización artificial de las células por lo general necesita altos costos para la fabricación; por otro lado, las biopelículas se forman automáticamente mediante el cultivo de microorganismos y sus células inmovilizadas se renuevan automáticamente bajo condiciones de cultivo apropiadas.

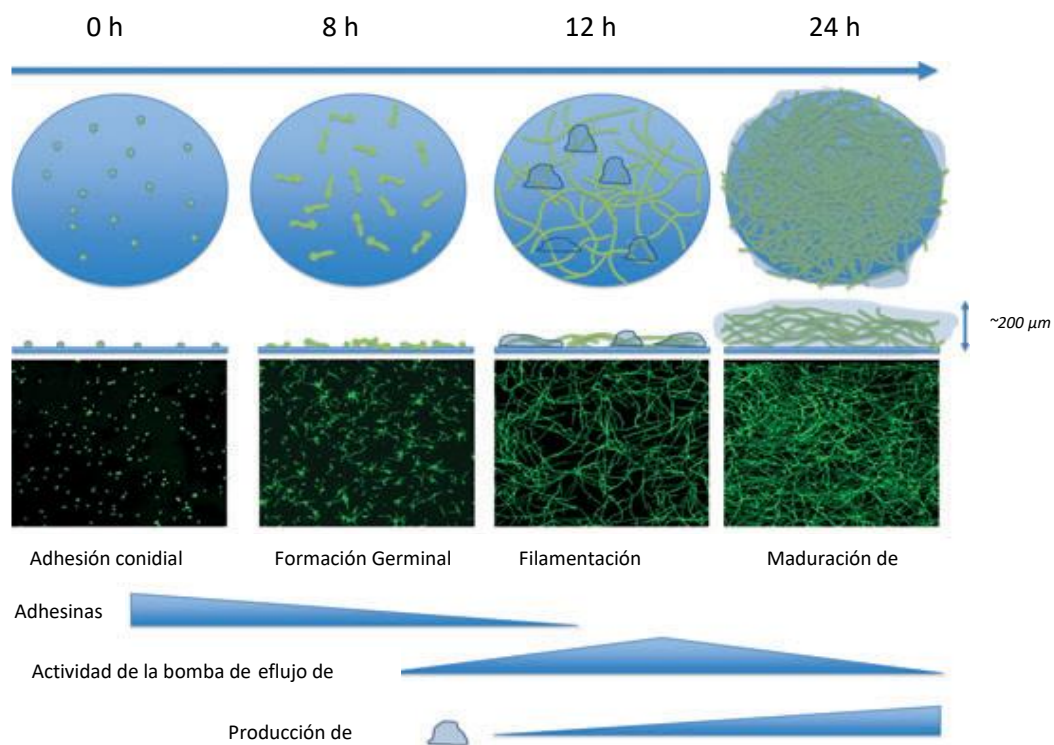


Figura 10: Diferentes fases de formación de biopelículas de *Aspergillus fumigatus*

Fuente: Ramage *et al.* (2011).

Las aplicaciones de biopelículas también se pueden encontrar en muchos sistemas anaeróbicos, especialmente en la eliminación de material orgánico (ejemplo, en el tratamiento de aguas residuales o producción de biogás), en el tratamiento de aguas residuales, generan la base de diversos ejercicios aeróbicos y reactores anaerobios (Fernández *et al.* 2008). Las biopelículas tienen mejor eficiencia de descomposición de los sustratos orgánicos y mayor producción de

metano. Estos efectos positivos de las biopelículas se deben a la digestión anaerobia, los microorganismos se adhieren a las superficies y forman agregados complejos, que forman mayores densidades celulares dentro de las biopelículas (Qureshi *et al.* 2005).

2.8.1.3 Fermentación en estado sólido (FES), aspectos generales

Este tipo de fermentación consiste en la utilización de un soporte o matriz sólida con contenido de humedad controlada o casi ausencia de agua libre y nutrientes disueltos. El sustrato debe contener la humedad requerida para el crecimiento y desarrollo metabólico del microorganismo (Pandey 2003, Pérez-Guerra *et al.* 2003). Es necesario distinguir dos tipos de sustrato (Pandey *et al.* 2007) basado en su digestibilidad: el primero, un sustrato sólido nutricional, que actúa como fuente de carbono/energía y de algunos factores de crecimiento para los microorganismos (Singhania *et al.* 2010), estos sustratos pueden ser residuos agroindustriales (salvado de trigo, de maíz, harina o torta de soja, etc.) o desechos agrícolas y forestales (paja, bagazo, aserrín, etc.), cuya composición química y estructura física favorece el crecimiento de los microorganismos. Los cultivos alimenticios nutricionales y los desechos agrícolas y forestales son los sustratos más comunes usados en FES. El segundo es el sustrato portador nutricional o sustrato portador químicamente inerte, poroso y dificultoso para su descomposición por los microorganismos, tales como espuma de poliuretano, resina macroporosa, perlita, y vermiculita. Estos sustratos solo sirven de soporte para la adhesión del microorganismo y distribución del nutriente en la brecha mediática porosa (Wu 2006).

a. Características fisicoquímicas y biológicas de la fermentación en estado sólido

La FES es un sistema trifásico de gas – sólido – líquido (Liu *et al.* 2006, Zambra *et al.* 2011) (Figura 11), donde el sustrato de fermentación es sólido, con presencia de gas en fase continua, y casi no hay agua libre en el sustrato. En comparación con otros sustratos porosos (ejemplo, tierra, roca, etc.) el crecimiento de micelios en el sustrato portador nutricional tiene un impacto significativo en la estructura del sustrato y las propiedades de transferencia. La estructura del sustrato tiende a cambiar durante todo el proceso de fermentación, así como la porosidad y las propiedades de transferencia de masa y calor en el sustrato. El sustrato portador nutricional, junto

con el calor metabólico generado en el proceso de crecimiento celular, humedad, oxígeno y dióxido de carbono afectan la fermentación en estado sólido

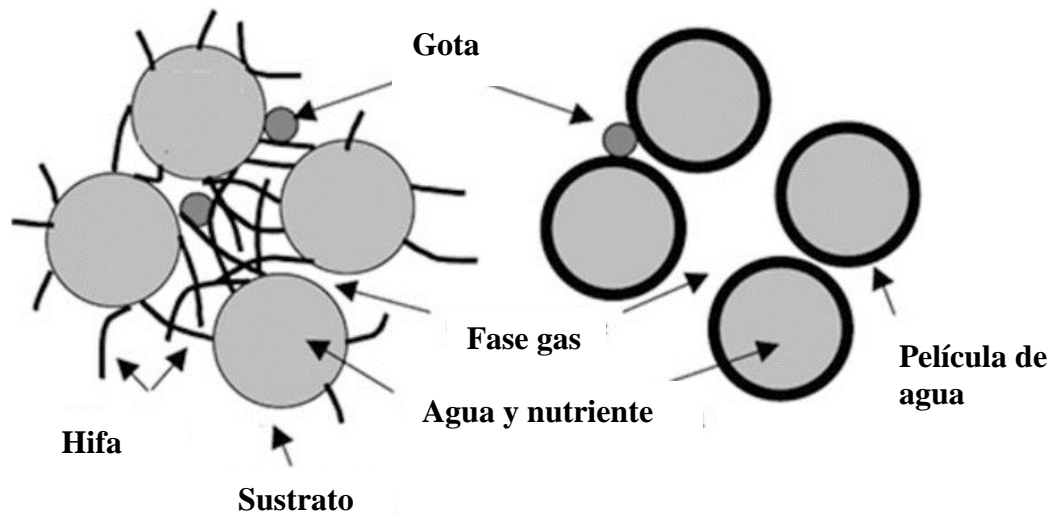


Figura 11: Estructura interna del sustrato soporte nutricional

Fuente: Liu *et al.* 2006, Zambra *et al.* (2011).

La FES presenta una interface importante en los procesos de reacción biológica, que es diferente a la fermentación sumergida. La interfaz generalmente expresa diferentes propiedades fisicoquímicas de la fase principal. Después de que los microorganismos se asienten en la interfaz y se convierten en biofilms, la estructura de biofilm de microorganismos y la actividad fisiológica forma el microambiente, lo que resulta en diferentes condiciones ambientales dentro y fuera de la membrana. Por ejemplo, en la dirección perpendicular a la interfaz, se observa un gradiente de concentración de oxígeno, gradientes de pH y otras sustancias (Donlan 2002), que indican impactos significativos en las actividades fisiológicas microbianas, como la expresión génica. En la comunidad microbiana formada en las biopelículas se realizan algunas actividades, que parece ser imposibles llevarse a cabo en fermentaciones de células libres.

La interface es la zona de transición entre dos fases en contacto cercano. La delgada zona de transición se genera por la fuerza desigual en la capa de interfaz, que muestra diferentes propiedades físicas y químicas de la fase principal. Por ejemplo, la tensión superficial, la adsorción interfacial y las moléculas polares en la interfaz muestran reglas de distribución completamente

diferentes en comparación con la fase principal (Zhu y Zhao 1996). Cuando el área de la interfaz es pequeña, el papel de los fenómenos interfaciales a menudo es insignificante; sin embargo, estos efectos deben tenerse en cuenta para un sistema de fermentación en estado sólido que tiene una matriz porosa con una interfaz estable. La tensión interfacial, que es causada por la cohesión entre las moléculas líquidas, es atracción mutua en la capa superficial cuando las dos fases están en contacto y la fuerza específica mantiene la tendencia a contraerse de la fase principal (Zhu y Zhao 1996). Como las moléculas en la capa superficial son más escasas que de la capa interna, sufren de cohesión interna en esta misma dirección, lo que resulta en la contracción de la capa superficial líquida; las gotas siempre tienden a formarse esféricamente bajo el efecto de tensión superficial.

En la FES, el crecimiento micelial a menudo cambia las características de la matriz sólida. Durante el crecimiento de los hongos filamentosos, el micelio sirve para absorber nutrientes y excretar desechos metabólicos, además actúa como un propágulo para completar el ciclo de vida (Xin y Li 1999). El crecimiento de hongos filamentosos a menudo se propaga en la matriz o sustrato. Por ejemplo, los mucorales a menudo forman hifas extendidas, y cuando se extienden una cierta distancia, generan raíces rizoides miceliales en la superficie del sustrato y luego avanzan para formar nuevas hifas que se esparcen (Figura 16). Hifas y rizoides entran en contacto con los sustratos como órganos de absorción de nutrientes. El tamaño de las colonias varía significativamente y después de cierto tiempo de incubación, las colonias pueden extenderse en toda la placa o crecer limitadamente, solo 1–2 cm en diámetro. La mayoría de las hifas fúngicas son transparentes; algunos producen pigmentos y el micelio toma un color marrón oscuro - negro o un color brillante (Xin y Li 1999).

Los micelios microbianos, generalmente crecen en la superficie de partículas de materiales (microorganismos aeróbicos); su crecimiento está influenciado por la inoculación, la germinación de esporas, micelio extendido y ramificado, y formación de capa micelial (Xin y Li 1999). Para los hongos filamentosos, la capa micelial se puede dividir en tres partes: biopelícula, micelio aéreo y micelios en sustrato (Figura 12). La capa de hifas, que cubre la superficie de las partículas (o una superficie poco profunda dentro de las partículas) y tiene un alto contenido de humedad, y es considerado una capa de biopelículas. La capa de biopelícula está formada por células microbianas y agua. La mayoría de los micelios microbianos se enriquecen en esta capa para formar una capa de hifas; el oxígeno externo ingresa a esta área, y los nutrientes del interior de las partículas del material también penetran esta región. Por lo tanto, la región es a menudo rica en nutrientes y oxígeno; siendo el lugar principal para la transferencia y el intercambio en masa (Chen 2013).

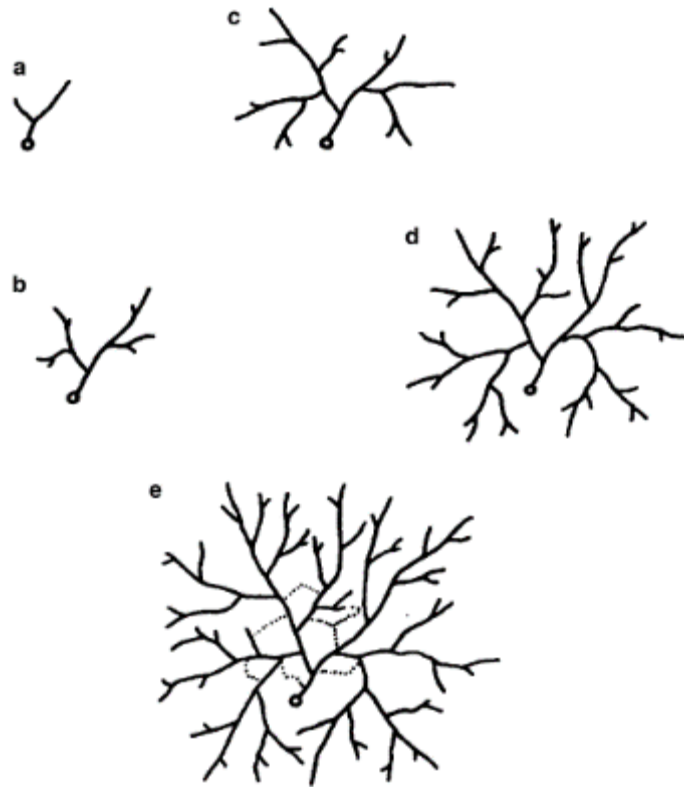


Figura 12: Proceso de germinación de esporas para la formación de colonias.

Fuente: Xin y Li (1999).

Pocas hifas penetran en el interior del sustrato, pero el crecimiento aeróbico de los microorganismos son difíciles debido a la hipoxia dentro de las partículas; en general,

el oxígeno no se puede medir a una profundidad de 100 μm . Parte del micelio aéreo será insertado en la fase gaseosa de las partículas. Incluso si los micelios se llenan en los espacios (Figura 13), no ocupan completamente el espacio porque los micelios están sueltos; ocupan hasta aproximadamente el 34% (Chen 2013).

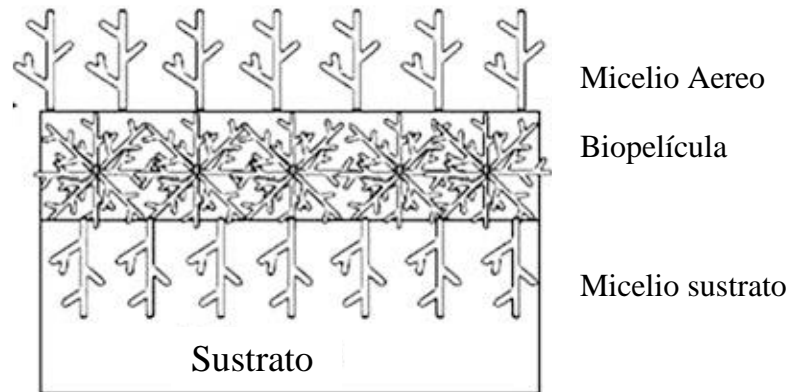


Figura 13: Distribución de hongos filamentosos en el sustrato de fermentación en estado sólido

Fuente: Chen (2013).

La distribución de la temperatura del sustrato generalmente se ve afectado por dos factores: el biocalentamiento, hace que la temperatura aumente, y varios factores de disipación del calor en la matriz. El biocalentamiento producido en la fermentación es la principal razón de incremento de la temperatura en el sustrato y el gradiente de temperatura. Mientras que la evaporación del agua es el principal medio de disipación de calor en la fermentación, y los efectos de la convección natural generalmente no son grandes (Chen 2013). En condiciones de ventilación forzada, el modo de operación tiene efectos importantes en el enfriamiento de la matriz. Para la FES estático, la radiación térmica y el enfriamiento por convección natural son las principales formas de operación. La fermentación con ventilación, convección forzada y conducción de calor juegan un papel importante. Mientras que la velocidad del flujo de aire, la dirección y el modo tienen implicaciones importantes para la intensidad de enfriamiento por convección (Chen 2013).

El agua del sustrato es un requisito básico para el crecimiento de microorganismos.

Los microorganismos no pueden absorber nutrientes sin la presencia de agua como solvente. Cambios en el contenido de humedad también afecta las condiciones de aireación y temperatura del sustrato; el agua será enriquecido y consumido alrededor de la célula y luego evaporado por el aire sobre el micelio para llevar a cabo el intercambio de calor y masa. Las células bacterianas contiene agua intracelular; y extracelular, incluida el agua de la película de agua y materiales (Chen 2013).

El aire en la matriz es un factor importante para el crecimiento de microorganismos; la composición del gas y el contenido afectan directamente la generación de micelios microbianos, esporas, y metabolitos secundarios. La permeabilidad al aire de la matriz (permeabilidad absoluta) y su correspondiente coeficiente de difusión de oxígeno son indicadores importantes. Cabe señalar que la permeabilidad absoluta y la capacidad de transferencia de humedad de la matriz están directamente relacionados de acuerdo con la teoría de transferencia en medios porosos (Membrillo *et al.* 2011), de modo que el parámetro pueda reflejar simultáneamente la eficiente transferencia del aire y la humedad a la matriz.

b. Ventajas y desventajas de la FES

- El contenido de humedad del sustrato sólido es aproximadamente del 60%.
- Los microorganismos absorben nutrientes del sustrato sólido.
- La cantidad de la inoculación es más del 10% .
- El oxígeno requerido es de la fase gaseosa
- Los microorganismos se adsorben en el sustrato sólido
- La producción de los metabolitos son altos
- La eliminación del calor metabólico es difícil
- Dificultades para el control del proceso de fermentación
- El soporte sólido simula al hábitat natural de los hongos filamentosos.
- Utiliza recursos renovables (residuos agrícolas e agroindustriales) (Chen 2013)
- Diseño del biorreactor es simple
- Bajo costo de materia prima (Chen y Xu 2004).

c. Aplicación de la fermentación en estado sólido

c.1 En la industria alimentaria: se produce una gama de productos a través de la FES, así como salsa de soja, proteína unicelular, enzimas microbianas y otros metabolitos microbianos. La producción de pan es otro producto obtenido por FES mediante levaduras para atender necesidades de consumo diario (Chen 2013). Los quesos madurados se elaboran por fermentación mixta con *Lactococcus lactis* y *Streptococcus*. La salsa de soja y el miso es fermentado por *A. oryzae*. El "arroz rojo" es producido con *Monascus purpureus*, produce un pigmento de color rojo oscuro, es utilizado como agente pigmentante en la preparación culinaria de alimentos (Chen 2013).

c.2 En la Industria farmacéutica y química: con la innovación de la tecnología de FES, se logró la producción de ácidos orgánicos como ácido láctico, cítrico, fumárico, oxálico y linolénico. Wu, (2006) comparó la producción de ácido láctico por FES y FS con *Rhizopus oryzae*, las tasas de producción en FES fueron superiores a FS. La FES, también es utilizado en la producción de metabolitos secundarios (aminoácidos, vitaminas y sustancias bioactivas) de microorganismos, que tienen aplicación médica e industrial. Estudios recientes mostraron con éxito la producción de antibióticos, toxinas bacterianas, auxina, medicamentos inmunes y alcaloides por FES. La *Ceratocystis fimbriata* también podría crecer en sustratos sólidos en residuos de yuca, orujo de manzana, soja y residuos de café y pueden producir una variedad de compuestos saborizantes. La FES también tiene aplicación en la producción de biosurfactantes, ácido glutámico, aminos, vitaminas, carotenoides, goma xantano y otros (Chen 2013).

c.3 En la producción de energía y protección del medio ambiente: La FES juega un rol importante, como una alternativa para reducir la contaminación ambiental y los problemas energéticos (Chen y Qiu 2010, Chen y He 2012). Los residuos agrícolas contienen abundantes nutrientes, que proveen un hábitat adecuado para el crecimiento de microorganismos, capaces de producir por FES productos de alto valor económico e industrial. La FES se ha aplicado con éxito para realizar biotransformaciones como biorremediación, producción de biocombustibles y biopesticidas, etc. La producción de etanol como biocombustible por FES, son investigaciones recientes, que presentan muchas ventajas, como:

- Eliminación de la operación de sacarificación de la celulosa, lo que implica ahorro de costes;
- Sin descarga de aguas residuales; y
- Bajo consumo de energía.

Existen muchos estudios con muy buenos resultados sobre la producción de etanol por FES.

Así como la producción de biopesticidas para el control de insectos plaga y patógenos, que están atrayendo una mayor atención, incluso los costos de producción son menores.

La aplicación de la FES de alimentos de origen vegetal (cereales, leguminosas, etc.) y sus residuos, son de mucho interés para mejorar su valor nutricional y económico. Las cepas que son utilizadas en este tipo de fermentación son los hongos de la podredumbre blanca. Por ejemplo, la yuca ampliamente consumida en algunas regiones de África, Asia y América del Sur, sin embargo, su contenido de proteínas, vitaminas y minerales es relativamente bajo. Varios estudios utilizaron la FES para mejorar su valor nutricional. Algunos residuos también podrían usarse para la producción de nuevos productos con alto valor proteico o proteínas unicelulares. La FES puede aumentar el contenido de proteínas de los alimentos, que es propicio para la alimentación de humanos y de animales (Chen y He 2012). La fermentación de los sustratos lignocelulósicos para piensos tiene muchas posibilidades de aplicación.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

El trabajo de investigación fue desarrollado en el Laboratorio de Micología y Biotecnología del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias, Programa Doctoral de Ciencias Biológicas e Ingeniería de la Universidad Nacional Agraria La Molina, ubicado en el distrito de la Molina, Región Lima.

3.2 MATERIALES

3.2.1 Microorganismo

- *Aspergillus niger* ATCC 10864
- Patrones de masa molecular de proteínas: 14, 30, 45, 60, 90 y 130 kDa.
- Soportes de crecimiento para fermentación en estado sólido y biopelículas
- Agrolita, nombre comercial o perlita nombre volcánico

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Preparación del inóculo y medio de cultivo

Las esporas *A. niger* ATCC 10864 fueron cultivadas en un medio sólido de agar papa dextrosa, en matraces de 250 mL por cinco días a 30°C. Luego las esporas fueron lavadas con 10 mL de solución Tween 80 al 0,1% (v/v) y se preparó un inóculo con una concentración de 1×10^6 esporas. mL⁻¹. El medio de producción de celulasas y xilanasas con *A. niger* contenía (g L⁻¹): 2 KH₂PO₄; 0.3 CaCl₂ 2H₂O; 0.3 MgSO₄ 7H₂O; 0.3 urea; 1.4 (NH₄)₂SO₄; 1 peptona; 10 lactosa; Tween 80, 0.2% (v/v); y (mg L⁻¹): 5 FeSO₄ · 7H₂O; 1.6 MnSO₄ · 2H₂O; 1.4 ZnSO₄ · 7H₂O; 2 CoCl₂ · 6H₂O (Villena y Gutiérrez – Correa 2006). El pH inicial del medio de cultivo fue de 5.5.

3.3.2 Soporte inerte para cultivo de *A. niger* en fermentación en estado sólido (FES) y en biopelículas (FB)

Se utilizaron perlitas como soporte para la adhesión de *A. niger*, las características de este material fueron los siguientes:

Nombre volcánico	:	Perlita
Nombre comercial	:	Agrolita
Composición química	:	75.8 % SiO ₂ ; 12.24% Al ₂ O ₃ y otros
Densidad	:	1.1 g/cm ³
pH	:	neutro
Inerte	:	no contiene sustancias tóxicas
Porosidad	:	buena
Beneficios en el suelo	:	mejora la aireación y estructura del suelo
Facilita enraizamiento	:	de plantas
Marca	:	Schultz Co., St. Louis, EE. UU

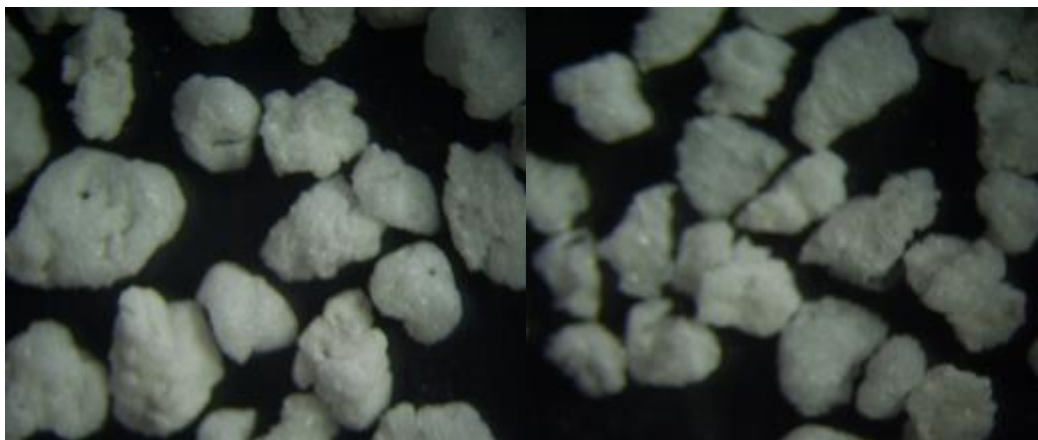


Figura 14: Perlita (Agrolita) volcánica

Las perlitas utilizadas para la FB y FES, fueron acondicionadas cuidadosamente. Se realizó un triturado y tamizado para seleccionar el tamaño de partícula de 1.7–2.5 mm (Figura 14), se hizo un lavado con agua potable tres veces y se enjuagó con agua destilada. Seguidamente fue secado a 90 °C durante 24 horas. Se utilizaron 4 g por matraz para FES y 0.48 g para FB.

3.3.3 Cultivos en fermentación sumergida (FS) y fermentación en biopelículas (FB)

Se utilizó el método de Villena y Gutierrez – Correa (2006) con algunas modificaciones. La fermentación sumergida (FS), se realizó en cinco matraces Erlenmeyer de 250 mL (Figura 21) con 70 mL de sustrato de producción. Se inocularon 3% (v/v) (2.1 mL) de una suspensión de 1×10^6 esporas.mL⁻¹ de *A. niger*. Una vez inoculados, los matraces se incubaron en un equipo de baño maría con agitación orbital a 125 rpm y 28 °C. La fermentación en biopelículas (FB) también se realizó en cinco matraces de 250 mL (Figura 21). Para la inoculación, se adicionaron 0,48 g de perlita como soporte de crecimiento en matraces conteniendo 20 mL de agua destilada estéril, al cual se inoculó las esporas en igual cantidad que la FS. Los matraces se incubaron en el equipo de baño maria orbital a 125 rpm por 30 min., a fin de adherir las esporas de *A. niger* en las perlitas, y el exceso de esporas no adheridas fueron eliminadas mediante dos lavados en agitación 125 rpm durante 30 min) con tampón de citrato 50 mM pH 4.8. Después de decantar la solución de lavado, se adicionaron 70 mL del sustrato a cada matraz y se incubaron a 28 °C y 125 rpm por cinco días. Cada 24 horas se retiraron tres matraces para determinar la cantidad de biomasa sustrato residual y la actividad de celulasas y xinalasas.

3.3.4 Cultivos en fermentación en estado sólido (FES)

Se utilizaron cinco matraces de 250 mL, conteniendo 4 g de perlita seca como soporte de crecimiento (Figura 21). A cada matraz se añadieron 9 mL del medio de cultivo y se dejó en reposo por 1 hora a fin de embeber por completo el soporte inerte. Luego se realizó la inoculación con 1.5 mL (% v/w) de esporas de *A. niger* con igual concentración de los anteriores sistemas de fermentación a un 74% de humedad (w/w). Seguidamente los matraces se incubaron a 28°C en una estufa con humedad controlada, para el cual se colocaron 50 mL de agua estéril en dos vasos de precipitados. Cada 24 horas se retiraron tres matraces para determinar la cantidad de biomasa, sustrato residual y la actividad de celulasas y xinalasas. Se trabajó en base al método de Villena y Gutierrez – Correa (2006) y Goulart *et al.* (2005) con algunas modificaciones.

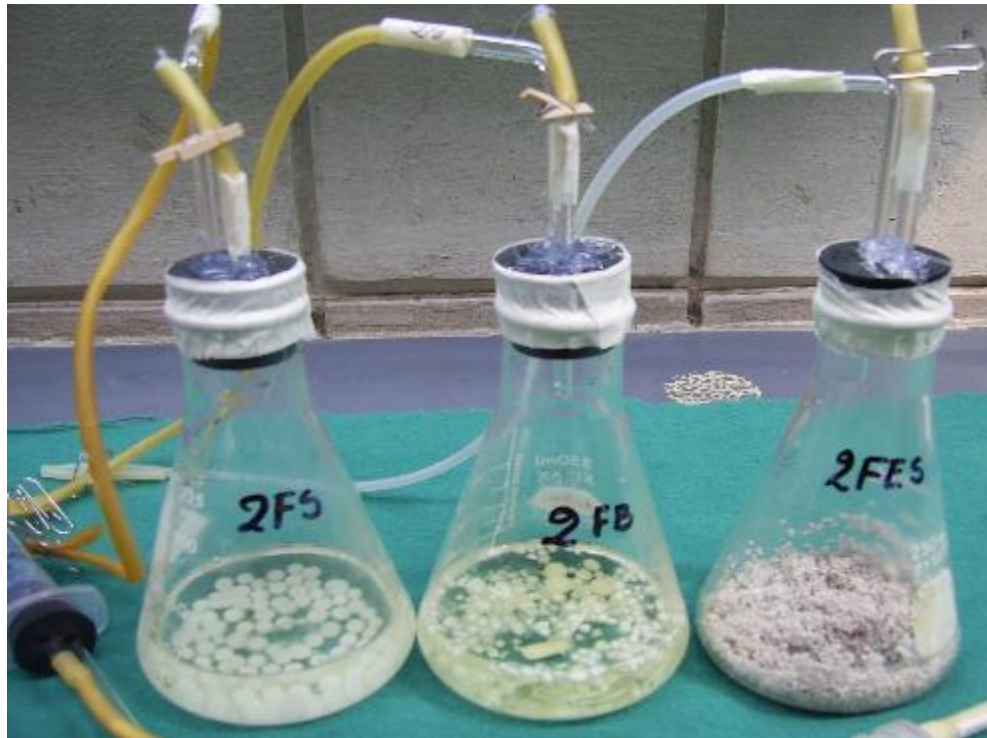


Figura 15: Cultivo de *A. niger* ATCC 10864 en fermentación sumergida (FS), fermentación en biopelículas (FB) y fermentación en estado sólido (FES)

3.3.5 Análisis con microscopía óptica y microscopía electrónica de criobarrido

Se realizó un estudio microestructural de la adhesión de las esporas a la superficie sólida de las perlitas y la estructura de formación de las biopelículas, microscopio electrónico de barrido, modelo LEO 1420 PV de presión variable (Cambridge, Reino Unido) utilizando la técnica de criopreparación de muestras. El análisis se basó en la generación de una señal a partir de un haz de electrones que se dispersan interactuando con la muestra en estudio y fue recogido por un detector que produce imágenes bidimensionales. Las muestras del soporte de perlita correspondientes a diferentes tiempos de inoculación con esporas de *A. niger* fueron colocadas en glicerol al 10% durante 2 h a 4°C. Luego fueron lavadas rigurosamente con tampón de fosfato 0,05 M (pH 7,4) y seguidamente sumergidas en nitrógeno líquido a -195,8°C. Inmediatamente, el agua superficial se eliminó por sublimación a -65 °C durante 10 min y finalmente la muestra fue transferida rápidamente a un criostato donde se metaliza con una corriente de ionización oro pulverizado (recubierto) (Ma *et al.* 2005, Villena y Gutiérrez-Correa 2007, Medina y Moreno, 2007). Después

de este tratamiento, se analizó la adhesión del *A. niger* en perlitas mediante el microscopio electrónico de barrido a -80°C , con voltaje y distancia de trabajo controlado.

Además, se analizó por microscopía óptica - estereoscopia el crecimiento, distribución, agrupación y coloración de *A. niger* cultivado en estado sólido, la observación se basa en el uso de una luz visible, reflejada por la muestra y observada a través de los objetivos y oculares.

3.3.6 Análisis del producto fermentado

3.3.6.1 Análisis de la biomasa

La cuantificación de la biomasa de *A. niger* se determinó por diferencia de peso seco (Reyes – Ocampo *et al.* 2013). La biomasa de la FS fue separada por filtración al vacío del medio de cultivo, usando un papel de filtro previamente pesado (Whatman No. 1; Whatman International Ltd, Kent, Reino Unido) secado a 80°C por 20 horas hasta un peso seco constante. El filtrado fue almacenado a -20°C para posteriormente analizar la actividad enzimática, proteínas solubles, y concentración de lactosa residual (Villena y Gutiérrez-Correa 2006).

Para la determinación de biomasa de la FB se siguió el mismo procedimiento que el de FS. Una vez separada la biopelícula (biomasa + soporte sólido), ésta fue lavada tres veces con agua destilada y secada hasta peso constante.

Para el caso de la FES, a cada matraz se adicionó 30 mL de solución de acetato 50 mM (pH 4,8) y fue incubado en agitación a 125 rpm durante 15 min; para la recuperación de proteínas, enzimas y lactosa residual. Luego, se filtró usando papel de filtro (Whatman No. 1), las biopelículas se secaron hasta peso constante y el sobrenadante fue almacenado en congelación.

3.3.6.2 Determinación de actividad celulasas y xilanasas

La actividad de celulasas totales se determinó como actividad sobre papel de filtro (FPA) (Ghose 1987). La actividad de endoglucanasas y xilanasas se midieron utilizando el método de Villena y Gutiérrez-Correa (2007) y Ncube (2013). Una unidad de celulasa, endoglucanasa o xilanasas (U) se define como la cantidad (volumen) de enzimas que libera 1 μmol de glucosa o xilosa equivalente

por minuto a 50 °C y pH 4.8. Se utilizó como sustrato carboximetilcelulosa y xilano. Los azúcares reductores liberados durante la hidrólisis del sustrato, reducen al ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), generando ácido 3-amino-5-nitrosalicílico de color anaranjado-marrón, el cual es analizado por espectrofotometría a 540 nm. Para la cuantificación de los azúcares liberados se preparó la curva de calibración con diferentes concentraciones de glucosa y xilosa estándar.

3.3.6.3 Determinación de lactosa residual

Para el crecimiento del *A. niger* durante el cultivo en los tres sistemas de fermentación se utilizó lactosa como fuente de carbono. La lactosa residual en el caldo fermentado fue determinada mediante el método de Miller (1959), basado en la reacción de oxidación – reducción de la glucosa y ácido dinitrosalicílico.

3.3.6.4 Determinación de proteína soluble

La cantidad de proteínas solubles secretada por *A. niger* durante la fermentación, se determinó mediante el método Lowry *et al.* (1951), el cual se basa en la reacción de los iones de Cu^{2+} , en medio alcalino con las proteínas y forman un complejo nitrogenado peptídicos y generan un color azul claro. El ácido fosfomolibdotúngstico del reactivo de Folin-Ciocalteu de color amarillo, es reducido por los compuestos fenólicos de la tirosina presente en las proteínas, dando lugar a un complejo de color azul intenso. La lectura se realizó a 580 nm por espectrofotometría. Previamente se elaboró una curva de calibración con Albúmina sérica de bovina.

3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL Y PROCESAMIENTO DE DATOS

Se planteó un Diseño Completo Aleatorio con tres tratamientos (modelos de fermentación), en cada uno se evaluó el rendimiento de la producción de biomasa (g.L^{-1}) y lactosa residual (g.L^{-1}). Respecto a la hipótesis, se planteó: hipótesis nula (H_0), las medias de los tres modelos de fermentación son iguales y la hipótesis alternante (H_a), por lo menos la media de un modelo de fermentación es diferente a los demás. Los datos obtenidos se analizaron mediante un Análisis de Varianza con un error del 1%. Los promedios de los tratamientos fueron evaluados mediante la prueba de Dunca. El procesamiento de datos se realizó con el software "Statistical Analysis System" (SAS[®]), versión 9.1.

3.5 MODELOS MATEMÁTICOS

3.5.1 Ecuación logística: Producción de biomasa

La producción de biomasa de *A. niger* en los tres sistemas de fermentación, se estimó como x (gL^{-1}), los datos experimentales fueron ajustados mediante la ecuación logística:

$$\frac{dx}{dt} = \mu_m \left[1 - \frac{x}{x_m} \right] x \quad (1)$$

Donde:

μ_m = tasa de crecimiento específica máxima (h^{-1})

x_m = es la concentración máxima de biomasa alcanzada cuando $dx/dt = 0$, para $x > 0$. La solución de la ecuación. 1 es:

$$x = \frac{x_m}{1 + C e^{-\mu_m t}} \quad (2)$$

Donde:

$C = (x_m - x_0)/x_0$ y x_0 es la condición inicial de x , cuando $t = 0$.

3.5.2 Ecuación de Luedeking y Piret: Producción de celulasas (E) y xilanasas

Al cabo de los procesos de fermentación se cuantificaron la actividad celulolítica y xilanolítica (UI^{-1}), los datos experimentales fueron modelados con la ecuación de Luedeking y Piret (1959) utilizando la siguiente ecuación:

$$\frac{dE}{dt} = Y_{E/x} \left[\frac{dx}{dt} + kx \right] \quad (3)$$

Donde:

$Y_{E/x}$ ($\text{Ug}^{-1}\text{h}^{-1}$) = rendimiento de la enzima en relación a la biomasa y k ($\text{Ug}^{-1}\text{h}^{-1}$) es el coeficiente de formación del producto ($k > 0$) o destrucción ($k < 0$).

Resolviendo la ecuación 3 como una función de x se obtiene

$$E = E_o + Y_{\frac{E}{x}}(x - x_o) \frac{kx_m}{\mu_m} \ln \left[\frac{x_m}{(x - x_o)} \right]$$

Donde:

$E_o = E$ cuando $x = x_o$; el valor de E (enzima) puede ser determinado como una función de x_t con la ecuación 4.

Esta ecuación fue utilizada para hacer el ajuste de los datos experimentales de la producción de celulasas, endoglucanasas y xilanasas.

3.5.3 Ecuación de Pirt: Lactosa residual

El consumo de lactosa por el *A. niger* y el residuo de esta fuente de carbono (S) (gL^{-1}) durante la fermentación en lote de los tres sistemas de cultivo, fue controlado y medido experimentalmente y modelado en la fase exponencial por la ecuación de Pirt (1975).

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{\frac{x}{s}}} \frac{dx}{dt} + mx \quad (5)$$

Donde:

$Y_{x/s}$ = rendimiento de biomasa en relación al consumo de sustrato.

m ($g/g_x \cdot h$) = coeficiente de mantenimiento celular. Resolviendo la ecuación 5 como una función de x:

$$S = S_o - \frac{1}{Y_{\frac{x}{s}}} (x - x_o) - \frac{mx_m}{\mu_m} \ln \left[\frac{(x_m - x_o)}{(x_m - x)} \right] \quad (6)$$

Donde:

$S = S_0$ cuando $x = x_0$, biomasa inicial en $t = 0$, el valor de S puede determinarse como una función de x_t con la ecuación 6.

Los parámetros del modelo matemático, como: μ_m , x_m , x_0 , $Y_{E/x}$, $Y_{x/s}$, m and k eran calculados usando el programa PROC NLIN, con el software SAS, V. 9.1, basado en el método de Gauss–Newton, el cual minimiza las variaciones entre los datos experimentales y estimados.

3.6 ANÁLISIS DE ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

3.6.1 Gel de Poliacrilamida nativa azul (DN – PAGE)

Se preparó el gel de poliacrilamida discontinuo (David 1964). El gel de concentración contenía 4% de acrilamida, 0.5 M Tris/HCl, pH 7.5 y el gel de separación con Tris/HCl 1.5 M, pH 8.8 y acrilamida al 12 %. Los extractos proteicos se solubilizaron en tampón no reductor no desnaturizante Tris/HCl 0.06 M, pH 7.5 y glicerol al 10% para preservar la conformación de las celulasas, las interacciones de las subunidades y la actividad biológica. La electroforesis se realizó en ausencia de agentes desnaturizantes, utilizando un tampón con Tris 0.025 M y glicina 0.2 M, pH 8.8. La acumulación de proteínas activas se realizó a 20 mA en el gel de concentración y la separación de estas mismas en el gel de separación se realizó a 35 mA. La tinción de este último gel se realizó con azul de Comassie coloidal por 12 y 24 horas.

3.6.2 Gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS – PAGE)

Se utilizó el método Laemmli (1970) con algunas modificaciones. Se preparó un gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio SDS – PAGE, en placas de vidrio de 13 x 14 cm, se dejó polimerizar la mezcla de reactantes y se obtuvo el gel de resolución con 12% de acrilamida. Luego se adicionó la segunda mezcla para el gel de apilamiento con 4% de acrilamida y se colocó un peine con 10 pocillos, después de la polimerización se retiró el peine y se añadió el extracto enzimático ultrafiltrado 15 uL en cada dos pocillos en forma consecutiva de cada sistema de fermentación. Previamente los extractos celulolíticos fueron tratados con un reductor del 2-mercaptoetanol a temperatura de ebullición por 5 min. Un volumen de 10 μ L del marcador estándar de peso molecular de proteína se colocó en dos pocillos, a los extremos del gel de poliacrilamida para comparar y determinar el peso molecular (PM) de las proteínas de los extractos enzimáticos. El sistema de electroforesis operó en 100 V hasta que el frente coloreado alcance el gel de

resolución y seguidamente se realizó la separación de las bandas proteicas en 200 V hasta que el frente coloreado alcance 0.5 cm del extremo del gel de resolución. Después de la electroforesis el gel de poliacrilamida fue teñido con solución de azul brillante de Coomassie R – 250, para visualizar los estándares de proteína y de los extractos enzimáticos.

El peso molecular de las sub unidades proteicas de los extractos enzimáticos en estudio fue calculado utilizando la movilidad electroforética relativa (Rf) y la ecuación lineal de la curva de calibración obtenida con los estándares de proteínas (Anexo 3.2). La Rf es inversamente proporcional al logaritmo del PM de las proteínas. La Rf se determinó dividiendo la distancia (mm) de migración de la banda proteica, entre la distancia recorrida entre el frente coloreado de azul de bromofenol. El peso molecular de las unidades polipeptídicas del extracto celulítico era determinado en unidades de kDa, utilizando los siguientes estándares: β -Fosforilasa (97 kDa), Albumina (66 kDa), Ovalbumina (45 kDa) y Anidrasa Carbónica (30 kDa).

$$Rf = \frac{\text{Distancia de migración de proteína en estudio}}{\text{Distancia del frente coloreado}}$$

3.6.3 Zimografía para la determinación de la actividad de Endoglucanasas (EG) en SDS-PAGE

Para este propósito, se preparó un gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio, al 12% de acrilamida con 1% de carboximetil celulosa (CMC). Después de la electroforesis el gel fue lavado para remover el SDS con tampón citrato de sodio pH 5 conteniendo isopropanol al 30%, se mantuvo por una hora a temperatura ambiente incubado por 30 min en 0.2 M de tampón acetato (pH = 5.0). Se renaturalizaron las enzimas colocando el gel en un tampón de citrato de sodio de pH 5 conteniendo 5 mmol.L⁻¹ β – mercaptoetanol y 1 mmol.L⁻¹ de EDTA a 4 °C toda la noche. Luego el gel se trasvasó en un recipiente de vidrio cubierto con una lámina de polietileno y se incubó a 50°C por cuatro horas (Coral *et al.* 2002, Schwarz *et al.* 1987). Las zonas de de hidrólisis de CMC por acción de las endoglucanasas fueron identificadas mediante la tinción del gel con rojo Congo al 0.05% (w/v) por 30 min en agitación a 40 rpm, el exceso de rojo Congo fue lavado con solución NaCl al 1 M por 20 min a la misma velocidad de agitación. La reacción enzimática fue detenida sumergiendo el gel en una solución de ácido acético al 0.5% (Ratanachomsri *et al.* 2002). El gel de

poliacrilamida con los estándares de peso molecular fue alineado con el zimograma para calcular el peso molecular de las enzimas endoglucanasas que realizaron la hidrólisis del CMC, finalmente se capturo la imagen con una cámara fotográfica de alta resolución.

3.6.4 Zimografía en PAGE para identificar la actividad de β – glucosidasa

El gel de poliacrilamida nativo obtenido de la electroforesis fue sumergido en tampón acetato 0.5 M y pH 5 conteniendo 0.1% (p/v) de esculina y 0.03 % (p/v) de cloruro férrico e incubado por 5 minutos a 50°C (Ki – Sung 1994). Durante la incubación se observaron bandas oscuras que correspondían a las β – glucosidasas. La reacción enzimática se detuvo con solución de glucosa al 10% (p/v), la cual actua como un inhibidor de la β – glucosidasa. Las bandas enzimáticas fueron analizadas para determinar su peso molecular y fotografiado colocando los geles en una cámara de luz ultravioleta.

3.6.5 Zimografía en SDS - PAGE para identificar la actividad de Xilanasasa

Se utilizó el método de Hong – Ge (2006) con algunas modificaciones. El PAGE fue sumergido en una solución tampón de acetato de sodio 0.2 M; pH 5.0 por 10 minutos, y luego colocado sobre una capa de agar – xilano (agar 1.5% y xilano 0.1%) e incubado a 50°C por 1 hora. Para identificar las zonas de hidrólisis, se realizó un teñido con rojo Congo al 0.1% por 30 min y se lavó con solución de NaCl 1 mol.L⁻¹ para remover el exceso de los reactivos. Las bandas enzimáticas obtenidas fueron fotografiadas colocando los geles en una cámara de luz ultravioleta, luego se cuantificó el valor Rf para determinar su peso molecular.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ÓPTICA Y CRIO MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Se realizó una evaluación inicial de la colonización y desarrollo del micelio de *A. niger* sobre el soporte de perlitas utilizando un estereoscopio. En la Figura 16, se muestra una microfotografía estereoscópica, en la cual se observa el crecimiento tanto del micelio vegetativo de color blanco con hifas delgadas y entrecruzadas como también el micelio aéreo conteniendo estructuras reproductivas como conidioforos y conidias de color negro – marrón oscuro, adheridos a la superficie e interface de las perlitas y ampliamente distribuidos en toda la superficie del soporte, donde los hongos se asientan, formando un sistema complejo, convirtiéndose en biopelículas con suficiente actividad fisiológica, dando lugar a un microambiente dentro y fuera del soporte sólido. Esto demuestra la capacidad del *A. niger* de adherirse y desarrollarse sobre la superficie de las partículas de perlita. Para analizar los detalles estructurales del crecimiento se utilizó microscopía electrónica de barrido (Figura 17). Estudios sobre cultivos en medios sólidos han permitido observar que los promedios de longitud y diámetro de las hifas distales difieren en relación contraria con la cantidad inicial de glucosa (Larralde - Corona *et al.* 1997, Reyes - Ocampo 2006) o fuente de carbono; aunque es un tanto complejo distinguir entre hifas aéreas, superficiales, y las que penetran el gel de agar (Rahaldjo *et al.* 2005) o soporte sólido.



Figura 16: Imagen al estereoscopio de *A. niger* en crecimiento sobre soporte de perlita. Con un aumento de la imagen de 10x40. Se observan conidióforos y conidias de color oscuro negros (flecha y círculos rojos) y micelio vegetativo con hifas hialinas (flecha y círculos blancos) adheridas a perlitas en FES.

Para el caso de la FB, la adhesión de las esporas de *A. niger* en las perlitas (soporte inerte) ocurrió adecuadamente, debido a que el material posee buenas características de porosidad y rugosidad en la superficie (Figura 17a), que permitió una suficiente fijación de las esporas y crecimiento micelial. Las biopelículas de la FB y FES, dieron imágenes similares en las micrografías electrónicas de crio-escaneo, que indican similares procesos biológicos. La estructura rugosa de la superficie de los conidias del hongo, juega un papel importante en la primera etapa de adhesión fisicoquímica a la superficie del soporte sólido (Figura 17b), esta unión es favorecida por la producción de hidrofobinas (proteínas de superficie activa) y matrices extracelulares. Las hidrofobinas son utilizadas para la adhesión de las esporas y crecimiento aéreo. Gracias a sus propiedades biofísicas y bioquímicas las hidrofobinas presentan un comportamiento anfifílico o

anfipático, e interactuar con interfases reduciendo la tensión superficial. Las hidrofobinas tienen propiedades surfactantes (Motilva y Ñañas 2014, Wösten *et al.* 1999, Carpenter *et al.* 1992, Takai *et al.* 1980, Pedrós 2003).

En general los hongos expresan varios genes que codifican hidrofobinas, tres genes de hidrofobinas fueron encontrados en *Pleurotus ostreatus* (Asgeirsdottir *et al.* 1998) y otros cuatro en *Schizophyllum commune* (Schuren y Wessels 1990, Wessels *et al.* 1995). En las diferentes bases de datos, tanto del Repositorio Central de Datos de *Aspergillus* (CADRE) y de Uniprot encontraron un total de 74 secuencias de hidrofobinas putativas de *Aspergillus*. El número por especie varía, de seis para *Aspergillus oryzae* a diez para *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus fischeri*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus nidulans* y *Aspergillus niger*. Posibles ejemplos de proteínas que parecen ser formas intermedias, se encontraron entre la Clase I y II. Se cree que esta forma intermedia puede ser de mayor uso para aplicaciones alimentarias ya que presentan adecuadas propiedades fisicoquímicas de solubilidad y cinética de ensamblaje susceptibles de ser utilizadas en operaciones estándar de producción de alimentos. A través de las aplicaciones de bioinformática asistida por computadora para estudios de selección se discute el desarrollo de hidrofobinas para modelos de sistemas de producción (Littlejohn *et al.* 2012). Estudio bioinformático muy reciente realizado por Jensen *et al.* (2010), han identificado 50 proteínas de hidrofobina en *Aspergilli*, 20 de las cuales no habían sido identificados previamente dentro de este grupo. Curiosamente, algunas de las supuestas hidrofobinas recientemente identificadas no parecen clasificarse fácilmente como Clase I o Clase II usando el modelo de secuencia convencional descrito por Kershaw y Talbot (1998) y Whiteford y Spanu (2002). Esto se enfatiza por las gráficas de hidrofobicidad de la clase no identificada contra un ejemplo de clase I donde hay una diferencia clara en los patrones de hidropatía en los extremos N y C terminal. Por lo tanto, uno podría esperar diferencias en las propiedades físicas de estas proteínas cuando se exponen a interfaces aire/agua, aceite/agua. Esta significaría que estas proteínas podrían usarse en la industria alimentaria sin tener la etiqueta de "ingeniería genética" en ellos, como con aquellos identificados por Scholtmeijer *et al.* (2004). La presencia de uno o más genes, sugiere la expresión de hidrofobinas en diferentes estadios del desarrollo de los hongos (Kershaw *et al.* 1998).

En la formación de biopelículas de *Aspergillus niger*, se ha reportado que la adhesión de esporas y los primeros estadios de desarrollo de las hifas están favorecidos por la matriz extracelular (Villena y Gutiérrez - Correa 2007), lo cual se corrobora en este estudio. A las 12 h de crecimiento, en las criomicrografías aparecían hifas colonizadoras, rodeadas de un extenso material adhesivo extracelular, que forma una matriz de hifas-hidrofobinas-perlitas (HHP) (Figura 17c). Después de 18 h de crecimiento, se observa el desarrollo de microcolonias (Figura 17d) en la superficie del soporte inerte, cubriéndolo totalmente, resultando la formación de las biopelículas.

Tanto para FES y FB se utilizó el mismo soporte inerte, en el cual se produjo el crecimiento por adhesión a superficies de *A. niger*, con la diferencia que, en FB el soporte se encontraba en medio líquido (FB) (Figura 18). Los hongos filamentosos están por naturaleza crecen adheridos a superficies sólidas, esta condición favorece la absorción de nutrientes, anclaje y crecimiento de hifas y secreción de enzimas. El crecimiento de *A. niger* en perlitas de FES y FB siguió los mismos patrones de crecimiento de los hongos ascomicetos, lo que sugeriría que para este tipo de cultivo, subyace un mecanismo de adhesión celular y de expresión de genes que expresan proteínas de superficie activa, cuya función es adherir hifas a la superficie hidrofóbica (Wösten *et al.* 1994, Villena y Gutiérrez-Correa 2007, Gamarra *et al.* 2010) (Anexo 1).

La producción del material extracelular adhesivo (AECM) fue demostrado en estudios anteriores sobre biopelículas de *A. niger* desarrolladas en tela de poliéster (Villena y Gutiérrez-Correa 2007, Villena *et al.* 2010). Además, el crecimiento de *A. niger* en las superficies de perlitas siguieron los patrones morfológicos similares encontrados en otras biopelículas microbianas (Harding *et al.* 2009, Ramage *et al.* 2009, Wimpenny *et al.* 2000). El patrón morfológico de desarrollo de pellets de *A. niger* se caracteriza por una agregación de esporas y posterior crecimiento de hifas entrelazadas, correspondientes al tipo de configuración tal como ha sido informado en un artículo anterior (Villena y Gutiérrez-Correa 2007). Asimismo, la diferencia morfológica entre biopelículas y el crecimiento en pellets va más allá de las diferencias en la estructura física, sino que también implica diferentes patrones de transferencia de masa (Talabardon y Yang 2005, Villena y Gutiérrez-Correa 2006, Villena *et al.* 2010).

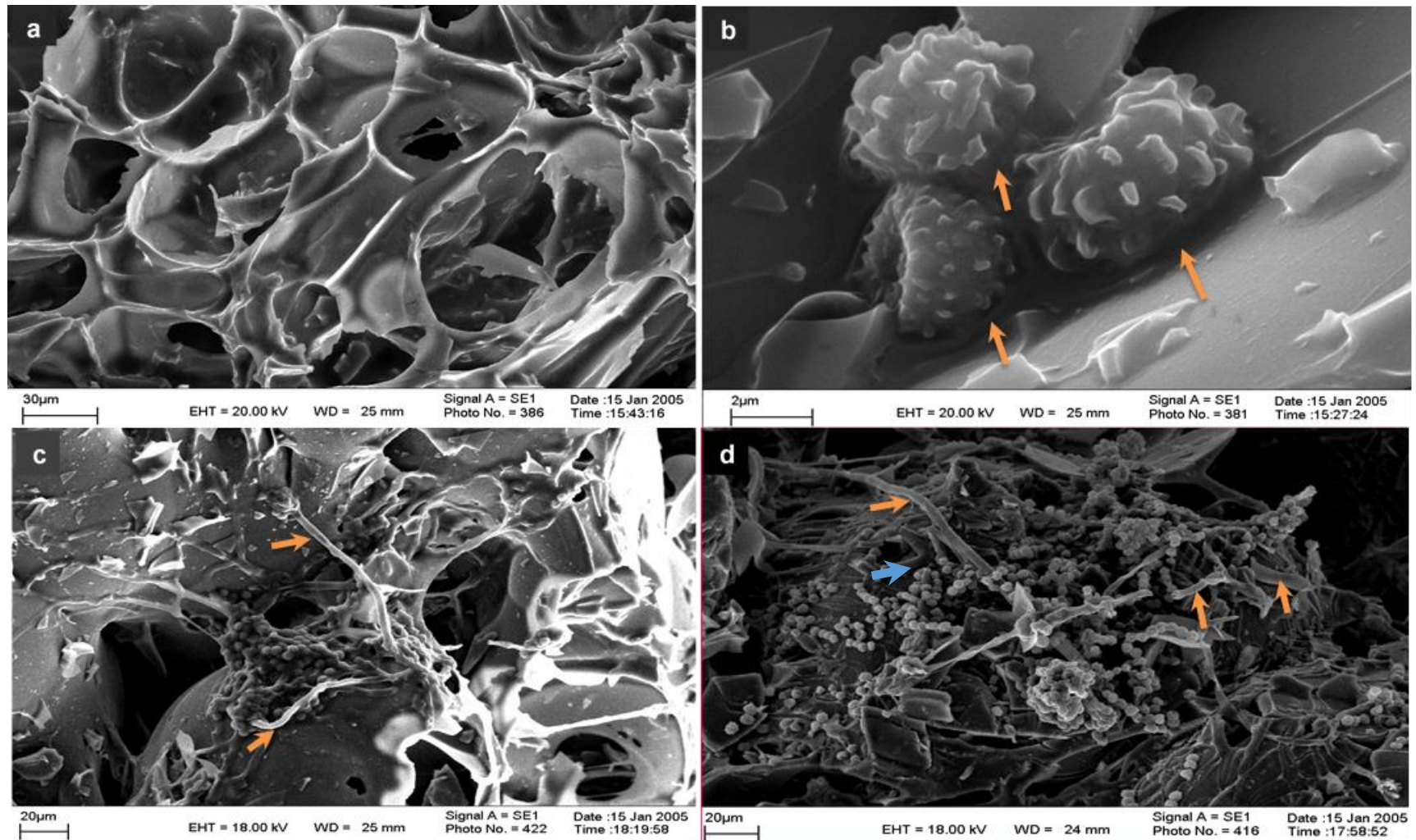


Figura 17: Micrografías electrónicas de crio-escaneo de perlitas y formación de biopelículas de *A. niger*. a) Perlita no inoculada, b) Esporas de *A. niger* adheridas a las perlitas (puntas de flecha), c) hifas colonizadoras (hifas indicadas con flechas) a 12 h de crecimiento (puntas de flecha), d) microcolonias desarrolladas a las 18 h (hifas indicadas con flechas).

4.2 PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *A. niger* Y CONSUMO DE SUSTRATO EN TRES SISTEMAS DE FERMENTACIÓN

El cultivo de *A. niger* ATCC 10864 en los tres sistemas de fermentación se realizó por 120 h (cinco días), sin embargo, a las 72 h se observó la máxima producción de biomasa (Cuadro 2) en FES, seguido en FS y en menor cantidad en FB. En este mismo sentido, en FES ocurrió un mayor rendimiento de biomasa en relación al consumo de lactosa comparado a FS y FB, comparando estadísticamente estos dos sistemas de fermentación (FS y FB) no presentan diferencia significativa ($p > 0.01$) en cuanto al rendimiento de biomasa, pero en la productividad volumétrica de biomasa difieren estadísticamente ($p < 0.01$). La productividad volumétrica de biomasa entre FS y FES no difiere significativamente ($p > 0.01$). En los cultivos sumergidos, el micelio libre creció en forma de pellets esponjosos de un diámetro promedio de 0.35 mm, que eran muy similares a las biopelículas adheridas a las perlitas producidas en FB, mientras que en FES las hifas crecieron en forma de espigas adheridas y distribuidas en la superficie de las perlitas. Respecto al consumo de lactosa por el *A. niger* no presentó diferencia significativa entre FS y FES, mientras que en FB se observó menor cantidad de lactosa residual (Cuadro 2), lo que indica que hubo mayor consumo de lactosa en esta condición de cultivo.

Cuadro 2: Comparación del crecimiento de *Aspergillus niger* ATCC 10864 en tres sistemas de fermentación

Sistemas de fermentación	Tiempo máximo producción de celulasas (APF) (h)	Biomasa Peso seco X(gL ⁻¹)	Lactosa Residual S (gL ⁻¹)	Rendimiento de biomasa en relación a lactosa (Y _{x/s})	Producción volumétrica de biomasa (gL ⁻¹ .h ⁻¹)
Sumergido (FS)	72	2.1 ±0.07 ^b	5.5 ±0.08 ^a	0.38 ±0.02 ^b	0.03± 0.001 ^a
Biopelículas (FB)	72	1.7 ±0.10 ^c	4.8 ±0.11 ^b	0.35 ±0.03 ^b	0.023±0.001 ^b
Estado sólido (FES)	72	2.4 ±0.12 ^a	5.4 ±0.1 ^a	0.44 ±0.02 ^a	0.03±0.002 ^a

Valores promedio de cuatro repeticiones, (±) DE. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.01$).

Los resultados de la producción de biomasa son consistentes con aquellos reportados por Viniegra-González *et al.* (2003) y Téllez- Jurado *et al.* (2006) quienes obtuvieron mayor producción de biomasa en relación a producción de enzimas de *A. niger* en FES que en FS. Un aspecto favorable de FES comparado a FS, es que no está sujeto a limitaciones de transferencia de oxígeno debido a

las consideraciones geométricas establecidas en FES, ya que en este sistema ocurre una mayor interface aire-líquido (Viniestra-González *et al.* 2003). Por otro lado, Villena y Gutiérrez-Correa (2006) obtuvieron mayor biomasa en el micelio libre de FS que en cultivos de biopelículas. Sin embargo, Papagianni *et al.* (2002) y Iqbal y Saeed (2005) reportaron similares y mayores cantidades de biomasa producida en cultivos de *A. niger* inmovilizados en superficie que en fermentación sumergida. Los cultivos con micelio libre están expuestos a altas fuerzas hidrodinámicas, mientras que los cultivos en estado sólido se limitan a la fuerza de la matriz sólida.

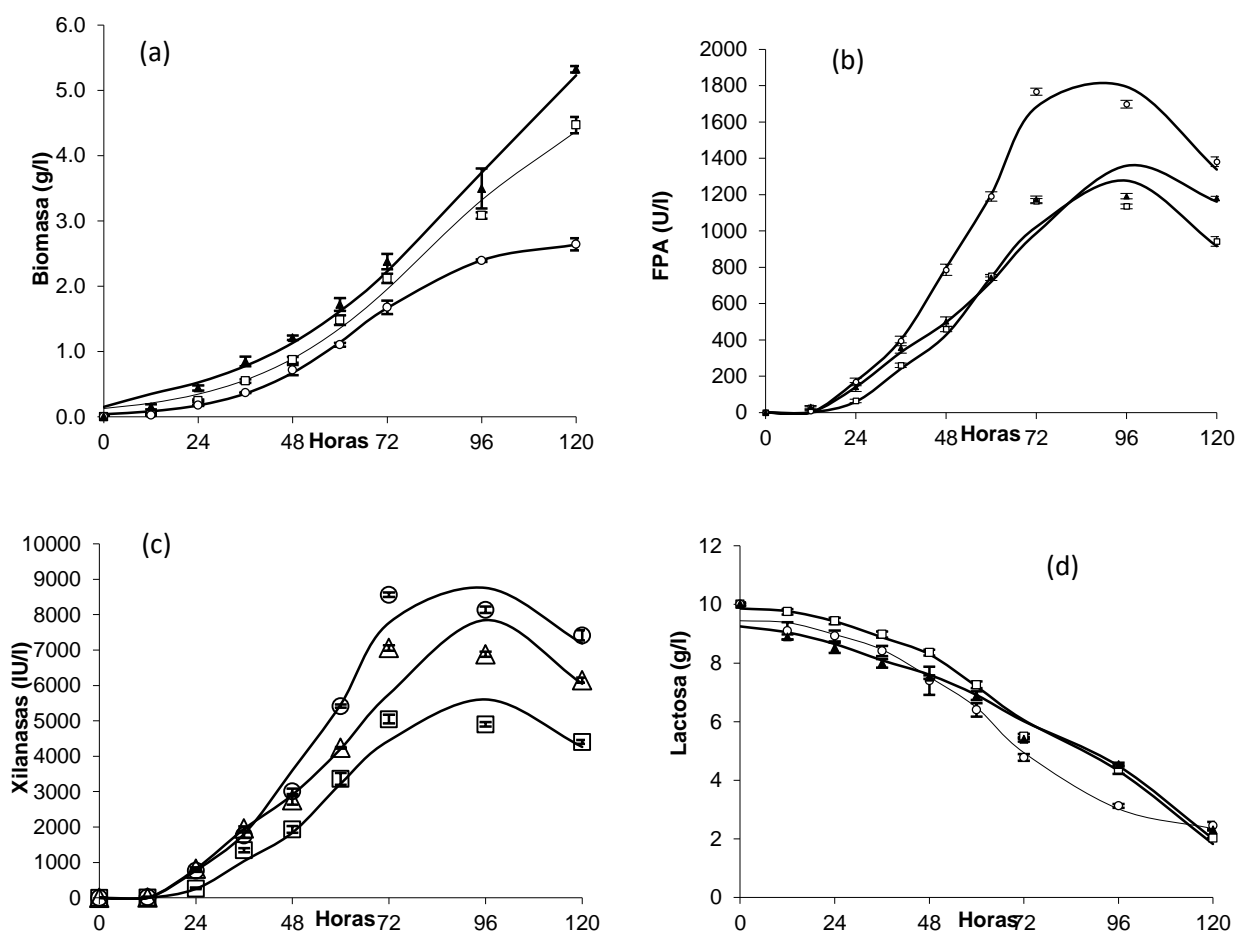


Figura 18: Cinética del proceso de cultivo de *Aspergillus niger*

a) Biomasa; (b) celulasas (FPA); (c) xilanasas; (d) lactosa residual fermentación: sumergida (cuadrados), biopelículas (círculos) y estado sólido (triángulos). Líneas continuas corresponden a los datos predictados con las ecuaciones 2, 4 y 6, respectivamente.

Las biopelículas de *A. niger* se caracterizan por el crecimiento coordinado de hifas con una estructura canalizada y baja densidad de biomasa, en este tipo de cultivo las limitaciones de transferencia de masa se reducen en comparación con FS (Villena y Gutiérrez-Correa 2007).

Kaup *et al.* (2008) mostraron que la inclusión de micropartículas de silicato de magnesio (comúnmente denominado talco) a los cultivos sumergidos de varios hongos, modificaron su morfología, desde pellets hasta pequeños grupos miceliares dispersos. Los estudios sobre la influencia del soporte en los patrones de crecimiento de cultivos en biopelículas son muy limitados en comparación a cultivos sumergidos, en los cuales el desarrollo morfológico de hongos ha sido ampliamente investigado (Villena y Gutiérrez-Correa 2007). La morfología de microorganismos filamentosos juega un papel importante en su metabolismo durante la fermentación (Grimm *et al.* 200, Papagiani y Matthey 2004).

Los cultivos basados en adhesión a superficies presentan una mejor productividad que los cultivos sumergidos (Wang y Chen 2009). La adhesión de los hongos a matrices sólidas presenta mejor performance en FB y en FES, a pesar de que en el presente estudio las partículas de biopelícula obtenidas en FB eran del mismo tamaño que los pellets miceliares encontrados en FS. En estudios anteriores se demostró que la formación de biopelículas de *A. niger* adherido a tela poliéster fue comparable con FES (Villena y Gutiérrez-Correa 2007).

La cinética de biomasa (X) de *A. niger* en los tres sistemas de cultivo se muestran en la Figura 18a. En todos los casos, se presenta una fase lag de 24 h seguida por un rápido crecimiento hasta las 120 h, a excepción de las biopelículas, en la cual el crecimiento se detiene a los 96 h Sin embargo, la producción de biomasa de *A. niger* en los tres sistemas de cultivo siguieron el modelo de ecuación logística con un alto coeficiente de correlación ($r^2 = 0.99$). Para hacer los ajustes de los datos experimentales del crecimiento del *A. niger* en los tres sistemas de fermentación se utilizó el software NLIN Procedure 9.1. La mayor concentración de biomasa máxima (x_m) se estimó en FES ($x_m = 7.3 \pm 0.05 \text{ gL}^{-1}$) (Anexo 2.13), seguida de FS ($x_m = 5.24 \pm 0.13 \text{ gL}^{-1}$) (Anexo 2.1) y FB ($x_m = 2.64 \pm 0.09 \text{ gL}^{-1}$) (Anexo 2.7). Por el contrario, la tasa específica máxima de crecimiento ($\mu = 0.065 \pm 0.003 \text{ h}^{-1}$) de FB fue más alta en comparación a FS y FES ($\mu = 0.044 \pm 0.005 \text{ h}^{-1}$ y $\mu = 0.036 \pm 0.004 \text{ h}^{-1}$, respectivamente). Con respecto al comportamiento de lactosa residual en FS (Figura 18d) era menor hasta las 48 h, a partir de este tiempo la reducción de este nutriente fue similar al de FES manteniéndose hasta las 120 h y no mostraron diferencia significativa en la

cantidad de fuente carbono residual (Cuadro 2) al finalizar el proceso de fermentación, mientras que monitoreando la cinética de lactosa residual en FB se observó una fuerte reducción a partir de las 48 h de cultivo y presenta diferencia significativa ($p < 0.05$) entre FS y FES.

Reyes - Ocampo *et al.* (2013) sostienen que el crecimiento del *A. niger* en FES esta en contacto con el medio sólido y gaseoso, en consecuencia, la cinética de crecimiento se ve influenciado a los fenómenos de transferencia de masa en ambos medios, que se traduce a un modelo de difusión - reacción. Reyes - Ocampo *et al.* (2013) analizaron el metabolismo de *A. niger* A10 en un sustrato sólido, cuantificaron el peso seco de biomasa en distintas cantidades de glucosa (de 25 a 250 gL⁻¹), obtuvieron la mayor cantidad de biomasa a 200 gL⁻¹. Analizaron que biomasa producida no era proporcional a la cantidad de glucosa inicial después de los 100 gL⁻¹. También utilizaron modelos matemáticos para la predicción de los datos experimentales, los cuales se ajustaban a dichos datos, concluyeron que los parámetros cinéticos pueden modificarse para obtener una mejor predicción. En el presente estudio realizado se midieron los metabolitos secretados en el medio, cuyos datos fueron utilizados el para el modelamiento matemático.

4.3 PRODUCCIÓN DE CELULASAS, ENDOGLUCANASAS Y XILANASAS DE *A. niger* ATCC 10864 EN TRES SISTEMAS DE FERMENTACIÓN

La producción de celulasas expresados en términos de actividad de papel de filtro (FPA) (Figura 18b). La producción de celulasas se ajustó al modelo predictivo de Luedeking y Piret (1959) con un coeficiente de determinación de $r^2 = 0.98$ en los tres sistemas de fermentación, lo que indica que existe una reducida variación entre los datos experimentales y el modelo ajustado; así mismo el porcentaje de variación ($r^2 = 98\%$) expresa que la producción de celulasas en relación a la biomasa de *A. niger* se ajusta al modelo, mostrando una adecuada capacidad predictiva. La máxima actividad de celulasas (E_{FPA}) se encontró en la fermentación en biopelículas (FB) a las 72 h de crecimiento, siendo 1.5 veces más alto que en FS y FES (Cuadro 3). En FB el rendimiento de celulasas por unidad de biomasa ($Y_{FPA/X}$) fue 1.5 y 2.6 veces más alto que en FS y FES, respectivamente. También, el rendimiento de celulasas respecto al sustrato consumido ($Y_{FPA/S}$), la actividad específica de las celulasas ($Y_{FPA/Pr}$) y la productividad volumétrica (I_{FPA}), fueron significativamente superiores en FB, similar a lo obtenido por Villena y Gutiérrez-Correa (2006,

2007) en biopelículas formadas en telas de poliéster con una producción de celulasas 70% más alta que la fermentación sumergida. Respecto a la ecuación 3, el coeficiente κ de formación del producto determinado en FES y FB fue negativo, siendo más bajo en este último sistema de cultivo, lo que indica que el coeficiente de degradación de las celulasas es menor en FB. Sin embargo, la tasa de formación específica de FPA fue similar en FS and FB pero más bajo en FES.

El rendimiento de celulasas (E_{FPA}) y los otros parámetros de productividad de $Y_{FPA/Pr}$, $Y_{FPA/s}$ y Γ_{FPA} comparado entre FS y FES no muestran diferencia significativa (Cuadro 3), en FS se utilizó un medio de cultivo líquido, mientras que en FES un soporte inerte volcánico. Sin embargo otros investigadores como Dutt y Kumar (2014) investigaron la producción de celulasas (FPA) de *A. flavus* AT - 2 y *A. niger* AT-3 utilizaron salvado de arroz en FES y FS; encontraron que la actividad de la FPasa de *A. flavus* AT-2 y *A. niger* AT-3 aumentó en 44 y 45.86%, respectivamente, en FES comparado con FS. Tappi Test Methods (2007) describe que la FES es una tecnología simple de fácil aplicación a pequeña escala y tiene muchas ventajas tecnológicas y económicas en comparación a la FS (Holker *et al.* 2004) y está diseñado predominantemente para la producción de enzimas fúngicas, ya que estos microorganismos están mejor adaptados para crecer en superficies sólidas que en cultivo líquido. Existe poca investigación sobre las ventajas de FES y los procesos fisiológicos que podrían ser mejorados mediante la adhesión celular o formación de biopelículas (Johansson 2006).

La FB es un sistema de adhesión a superficies presenta ventajas fisiológicas de la FES y las características operativas de la FS, en estas condiciones se logró una mejor producción de celulasas y xilanasas de *A. niger* ATCC 10864, sugiriendo que la adhesión celular al soporte sólido y el uso de un medio líquido, con una agitación constante, favoreció una mejor mezcla y por consiguiente un adecuado transporte de masa, lo cual habría una mejor actividad fisiológica y metabólica del hongo, así como una expresión diferencial de genes. Existen reportes al respecto. Por ejemplo, *Aspergillus fumigatus* forma biopelículas y presentan un gen de expresión diferencial, que puede ser responsable del aumento de su patogenicidad (Mowat *et al.* 2008, Seidler *et al.* 2008). Villena *et al.* 2009a encontraron algunos genes que codifican enzimas lignocelulolíticas de *A. niger*, que fueron diferencialmente expresados en biopelículas en comparación con pellets de micelio de cultivo sumergido. Por otra parte, los proteomas de las biopelículas y pellets de *A. niger* mostraron claras diferencias de proteínas expresadas diferencialmente en cada caso (Villena *et al.* 2009b).

Resultados similares en la expresión génica diferencial han sido reportados para *Aspergillus oryzae* en FES (Akao *et al.* 2002, Biesebeke *et al.* 2002). La adhesión celular a superficie es una característica común en FB y FES, y este tipo de interacción puede ser responsable de las ventajas de fermentación sobre FS a través de varios mecanismos biológicos incluyendo expresión génica diferencial (Gutiérrez-Correa y Villena 2003, Villena *et al.* 2009a, b).

Respecto a la transferencia de masa, Ncube (2013) en su estudio utilizó cuatro cepas de hongos (*A. niger* FGSC A733, *A. versicolor* EF23, *P. citrinum* AZ01 y *T. harzianum* NCGR 0509), los cuales exhibieron altos títulos de celulasa y xilanasas durante la FES en comparación con la FS, sugiriendo que los títulos más altos de enzimas producidas en FES se debe a la disponibilidad restringida de nutrientes en el sustrato sólido respecto a los cultivos líquidos, y de manera importante y en concordancia a lo descrito en el párrafo anterior, señala que probablemente los hongos desarrollan mecanismos más eficientes para la degradación del sustrato celulósico y en consecuencia, actúan con una presión selectiva para la mayor producción de enzimas, traduciéndose en que el título de enzimas en FES es alto (Pandey *et al.* 2000, Kazuhiro 2002, Tengerdy y Szakacs 2003). Además, Tengerdy and Szakacs (2003) y Nair y Sindhu (2008) observaron que la fisiología de los hongos es diferente en sustratos sólidos que en cultivos líquidos. En FES ocurre un crecimiento complejo para la colonización, penetración al sustrato y metabolismo, y se requieren de estructuras celulares especiales, de enzimas y sistemas regulatorios. Por lo tanto, la actividad hidrolítica de las enzimas en FES es mayor comparada a FS (Tengerdy y Szakacs 2003).

Cuadro 3: Comparación de los parámetros de productividad de celulasas (FPA) por *A. niger* en 72 horas de cultivo en diferentes sistemas fermentación

Sistemas de fermentación	E_{FPA} (UL ⁻¹)	Proteína secretada (gL ⁻¹)	$Y_{FPA/X}$ (Ug ⁻¹)	FPA/S (Ug ⁻¹)	$Y_{FPA/Pr}$ (Ug ⁻¹)	Γ_{FPA} (UL ⁻¹ .h ⁻¹)	q_{FPA} (U g ⁻¹ h ⁻¹)
Sumergido (FS)	1165±15 ^b	0.321±0.003 ^b	554. ±13 ^b	212 ±5 ^b	3629 ±84 ^c	16 ±0.20 ^b	8.5±0.4 ^a
Biopelículas (FB)	1768±20 ^a	0.4±0.002 ^a	1040 ±71 ^a	368 ±11 ^a	4420 ±31 ^a	25 ±0.3 ^a	7.1±0.3 ^a
Estado sólido (FES)	1174±19 ^b	0.305±0.003 ^b	489 ±3 ^c	217±3 ^b	3849 ±22 ^b	16 ±0.3 ^b	3.7±0.2 ^b

Parámetros de productividad: E_{FPA} = actividad de la celulasa en términos de actividad de papel de filtro (UL⁻¹). $Y_{FPA/X}$ (U g⁻¹) = Rendimiento de celulasa (UL⁻¹)/biomasa formada (gL⁻¹), $Y_{FPA/S}$ (U g⁻¹) = rendimiento de celulasa (UL⁻¹)/sustrato consumido (gL⁻¹), $Y_{FPA/Pr}$ (U g⁻¹) = Rendimiento de celulasa (UL⁻¹)/proteína secretada (gL⁻¹), Γ_{FPA} (U L⁻¹ h⁻¹) = productividad volumétrica de celulasa, q_{FPA} = tasa específica de formación de celulasas. Valores promedios de cuatro repeticiones ± SD. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.01).

Cuadro 4: Comparación de los parámetros de productividad de endoglucanasas y xilanasas de *A. niger* en 72 h de cultivo en diferentes sistemas de fermentación

Endoglucanasas						Xilanasas				
Sistemas de fermentación	Actividad (EG) (UL ⁻¹)	$Y_{EG/X}$ (Ug ⁻¹)	$Y_{EG/Pr}$ (Ug ⁻¹)	Γ_{EG} (UL ⁻¹ .h ⁻¹)	q_{EG} (Ug ⁻¹ h ⁻¹)	Actividad (Xyl) (UL ⁻¹)	$Y_{xyl/x}$ (Ug ⁻¹)	$Y_{xyl/Pr}$ (Ug ⁻¹)	Γ_{xyl} (UL ⁻¹ .h ⁻¹)	q_{xyl} (Ug ⁻¹ h ⁻¹)
Sumergido	1854±21c	882.8±28c	5806.8±81c	25.75±0.3c	12.3±0.02c	5051±125c	2405±6b	15735±453c	70±2c	33±0.5a
Biopelículas	6408±123a	3769.4±301a	16020±340a	89±1.7a	86±1.2a	8567±63a	5139±30a	21417±244 ^a	119±1a	71±0.3a
Estado sólido	5205±103b	2168.7±148b	17065.5±340b	72.2±1.4b	15±0.2b	7058±18b	2940±138c	23140±362b	98±1b	40±0.2b

Parámetros de productividad: EG = Endoglucanasas (UL⁻¹), $Y_{EG/X}$ (Ug⁻¹) = Rendimiento de EG (UL⁻¹) / biomasa formada (gL⁻¹), Y_{EGr} (Ug⁻¹) = Rendimiento de EG (UL⁻¹)/proteína secretada (gL⁻¹), Γ_{EG} (UL⁻¹ h⁻¹) productividad volumétrica EG, q_{EG} = tasa específica de formación de EG.

Xyl = Xilanasas (UL⁻¹), Y_{Xylr} (Ug⁻¹) = Rendimiento de Xyl (UL⁻¹)/biomasa producida (gL⁻¹), $Y_{Xyl/Pr}$ (Ug⁻¹) = Rendimiento de Xyl (UL⁻¹)/proteína secretada (gL⁻¹), Γ_{Xyl} (UL⁻¹ h⁻¹) productividad volumétrica Xyl, q_{Xyl} = tasa específica de formación de xilanasas. Valores promedios de cuatro repeticiones ± SD. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.01).

Los parámetros de productividad de endoglucanasas (EG) y xilanasas (Xyl) se presentan en el Cuadro 4. Ambas enzimas alcanzaron una máxima actividad catalítica en 72 h de crecimiento, siendo 1.2 y 3.5 veces más alta en FB. De forma similar, los rendimientos y productividades volumétricas fueron mayores en FB. El coeficiente de formación del producto (k) fue positivo para la producción de endoglucanasa en FB y FES, pero negativo para la producción de xilanasas indicando mecanismos fisiológicos complejos en la producción de estas enzimas en los tres sistemas de cultivo. En ocasiones las xilanasas se pueden adsorben fuertemente en el sustrato sólido insoluble de la FES y su rendimiento se reduce; contrariamente la recuperación de las enzimas en el extracto líquido en FB y FS no es dificultosa. Los hongos filamentosos, especialmente *A. niger*, tienen características fisiológicas importantes para producir simultáneamente celulasas y xilanasas (Ali *et al.* 2008, da Silva *et al.* 2005) y pueden actuar sinérgicamente durante la degradación de la biomasa lignocelulósica (Kumar y Wyman 2009, Robison 1984, Sánchez 2009, Selig 2008).

En la Figura 18c se presenta la cinética de producción de xilanasas, la cual fue ajustada con el modelo de Luedeking y Piret (1959) con una alta correlación ($r^2 > 0.987$) en los tres sistemas de fermentación. La fase Lag o de adecuación al medio de cultivo del *A. niger* ATCC 10864 en FS, FB y FES ocurrió hasta las 24 h de cultivo, donde no hubo producción de Xyl, seguidamente se inició la producción de la enzima en la fase de aceleración y exponencial hasta las 72 h., observándose los mayores títulos en FB, después de este tiempo ocurre una tendencia de disminución de la producción de esta enzima. El rendimiento de las xilanasas en la fermentación, está gobernado por algunos factores. Cuando se utiliza sustratos complejos heterogéneos, diversos factores influyen en la expresión de xilanasas, a este efecto también se incluye la accesibilidad al sustrato, composición química, tasa y cantidad de xilooligosacaridos liberados, que actúan como fuente de carbono e inhibidores de la producción de xilanasas (Kulkarni *et al.* 1999). Las proteasas y los transglicósidos, también afectan el rendimiento de las xilanasas (Chauthaiwale y Rao 1994). Las xilanasas son óptimamente expresadas al final de la fase exponencial o Log. Otros factores que afectan la productividad y actividad de las xilanasas en la fermentación, son el pH, temperatura y agitación (Kulkarni *et al.* 1999). Gomes *et al.* (2016) optimizaron la obtención de xilanasas en FES probando distintas cantidades de bagazo de caña de azúcar y temperaturas de incubación (40, 45,

50 y 55 °C), los máximos niveles de xilanasa obtuvieron después de 24 h a 45°C con un medio de cultivo de bagaso de caña y salvado de trigo en proporción de 1:1.

Las diferencias de los títulos de celulasas y xilanasas en el presente estudio se ven corroboradas por las distintas condiciones físicas de los tres sistemas de fermentación, a ello se suma los factores biológicos y químicos. Así las diferencias en actividad de agua y el tamaño de partícula del sustrato en estado sólido alteran significativamente la expresión de varios genes, que afectan a diversas expresiones fenotípicas tales como crecimiento, desarrollo, producción de micotoxinas y enzimas (Kazuhiro 2002). Las señales de estado sólido causan cambios morfológicos y fisiológicos en los hongos filamentosos en el crecimiento invasivo y formación de conidióforos. La producción específica de enzimas adheridas a superficie sólida, es superior a los métodos de fermentación sumergida (Morgan – Aguilar *et al.* 2021), es una consecuencia del aumento de la expresión génica y cambios drásticos en el citoesqueleto y la capacidad de secreción de los hongos filamentosos (Kazuhiro 2002). Otra característica biológica del cultivo en estado sólido es el cambio de localización de algunas enzimas, por ejemplo, en FS, algunas actividades enzimáticas son encontradas principalmente en la pared celular de micelio, mientras que, en FES, las mismas enzimas se secretan en el medio y hay poca actividad en la pared celular. Se deduce que hay relocalización de enzimas dependiendo de las condiciones de cultivo tanto en FES como en FS (Kazuhiro 2002).

4.4 CONSUMO DE LACTOSA DE *A. niger* ATCC 10864 EN LA PRODUCCIÓN DE CELULASAS Y XILANASAS EN TRES SISTEMAS DE FERMENTACIÓN

En la Figura 18d se presenta la cinética de lactosa residual (fuente de carbono) en el curso de 120 h de crecimiento de *A. niger* para la producción enzimas celulolíticas y xilanolíticas en FS, FB y FES. El modelo predictivo de Pirt (Ec. 6) correlaciona adecuadamente entre los valores predichos y los medidos experimentalmente en los tres sistemas de fermentación, con los cuales, es posible calcular la tasa máxima teórica de consumos de sustrato, la producción de biomasa y la actividad enzimática de interés. Mediante los modelos matemáticos se puede simular la respuesta de los procesos fermentativos y estimarse las condiciones óptimas de operación que maximicen los rendimientos y productividades volumétricas del metabolito de interés en determinadas condiciones ambientales; en recientes años nuevos modelos matemáticos se viene desarrollando

basado en la interacción intracelular (Mazaherí y Shojaosadati 2013). Estos modelos (de tipo estequiométricos) consideraron el metabolismo microbiano, las vías o rutas metabólicas y la regulación del metabolismo (Mazuti *et al.* 2010). En estos modelos, los balances de masa en estado estacionario fueron considerados en el interior de la célula, como resultado, se obtuvo los fenómenos extracelulares como son: la tasa de formación de biomasa, la absorción del sustrato y las tasas de formación del producto, que se relacionan con el flujo intracelular de carbono y energía (Mazaherí y Shojaosadati 2013). El uso de modelos tanto estequiométricos como cinéticos para investigar el metabolismo celular, ayudan a definir las condiciones óptimas de fermentación, así como en la dirección de los cambios genéticos que se pueden introducir para obtener y seleccionar una buena cepa productora o líneas celulares con características genotípicas deseables. El aumento y la disponibilidad de información genómica y potentes técnicas analíticas, junto a los modelos matemáticos están sirviendo como herramientas para comprender el metabolismo celular y la fisiología (Gombert y Nielsen 2000).

En FB se observa una mayor tendencia de consumo de lactosa por *A. niger*, desde las 48 a 96 h y aunque el consumo total fue menor en este sistema de cultivo. No toda la fuente de carbono y energía (FCE) que consume el microorganismo es utilizado para la producción de biomasa o productos. Una porción del sustrato es utilizada para obtener energía y mantener a las células viables (Jorge 2003), este principio se precisa con el postulado de Pirt (1975), quien sostiene que, existe una cantidad de FCE proporcional a la cantidad de biomasa, destinado al mantenimiento celular.

Villena y Gutiérrez – Correa (2012) analizaron la cinética de producción de celulasas y xilanasas en fermentación en biopelículas y en fermentación sumergida con *A. niger* en microbiorreactores oxigenados, observaron que el crecimiento y consumo de lactosa de *A. niger* siguió el modelo de crecimiento logístico y la de Pirt, respectivamente, con una correlación de $r^2 > 0,9$ en ambos sistemas de fermentación, aunque la producción máxima de biomasa fue ligeramente más alta en FS, sin embargo la tasa máxima específica de crecimiento (μ_m) y el rendimiento de biomasa por consumo de sustrato ($Y_{x/s}$) fueron aproximadamente 35% y dos veces más altas en FB, respectivamente, en este mismo sistema de cultivo los valores experimentales para el consumo de lactosa coincidieron en gran medida con los valores previstos, hecho que no ocurrió en la FS, pero

en ambos casos, el coeficiente de mantenimiento estimado fue insignificante ($m_s \approx 0$), estas estimaciones obtenidas por estos investigadores eran muy cercanos a los resultados obtenidos en el presente estudio, donde la FB podría convertirse en una tecnología promisoría para la producción de enzimas, ya que ofrece ventajas competitivas frente a los sistemas de FS y FES.

4.5 ELECTROFOREGRAMAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA NO DESNATURANTE (DN – PAGE) DE EXTRACTOS PROTEICOS DE *Aspergillus niger* EN TRES SISTEMAS DE FERMENTACIÓN

En el DN – PAGE de la Figura 19, se observa la separación de proteínas intactas del secretoma de *Aspergillus niger* ATCC 10864 a las 72 horas de crecimiento. En la fermentación sumergida (FS) se detectaron dos proteínas extracelulares con pesos moleculares aparentes de 67.4 y 12.4 kDa, en la fermentación en biopelículas (FB) tres proteínas de 93; 42.7 y 12.4 kDa y en fermentación en estado sólido (FES) cuatro de 174, 130, 97 y 57 kDa. En este último sistema de cultivo los complejos proteicos son de alto peso molecular. Se aprecia que en cada sistema de fermentación existe un patrón de proteínas característico de diferentes pesos moleculares, que puede estar asociado al tipo de cultivo y al crecimiento en adhesión.

Marzoa, (2010) señala que el análisis de proteínas complejas en DN-PAGE es una presentación fiable del proteoma de una muestra en estudio. En la FS y FB se observan proteínas complejas coloreadas con azul de Coomassie coloidal muy intensas de 67.4 y 42.4 kDa, que indican que se expresaron en concentraciones altas, así mismo en estos dos sistemas de fermentación se aprecia una proteína de baja masa molecular (12,4 kDa) que no se observa en FES. La migración de las proteínas en DN – PAGE ocurre por el tamaño de las proteínas al atravesar el gel de separación, su movilidad ocurre hasta alcanzar un tamaño de poro específico del gel de poliacrilamida. La electroforesis DN-PAGE, es un método relativamente simple y sensible para la identificación de proteínas de membranas y los complejos bacterianos solubles, a diferencia de otros métodos laboriosos, que reportan resultados falsos positivos y/o negativos; es aplicable a complejas proteínas que varían en pesos moleculares desde 10 a 10 000 kDa (Schagger *et al.* 1994), también es usado en combinación con otras técnicas para determinar el estado oligomérico, la estequiometría, la actividad enzimática y la estructura molecular de varios complejos multiproteicos (Poetsch *et al.* 2000, Dudkina *et al.* 2005, Sunderhaus y otros, 2006). Aufurth *et al.*

(2000) estudiaron la enzima transportadora de sodio Na⁺-F1F0-ATPasa que se asemeja a la H_b-F1F0-ATPasa de la bacteria homacetogénica *A. woodii* empleando BN-PAGE, 2D/SDS-PAGN, secuenciación N-terminal y métodos inmunológicos y detectaron el Complejo Na⁺-F1F0-ATPasa con 590 kDa con nueve subunidades a, c1, c2/3, b, d, a, g, b y e. Lazova y Stemier, (2008) mediante BN-PAGE identificaron una proteína de 160 kDa con actividad de Anhidrasa Carbónica (CA) complejada con Ribulosa-1.5-bisfosfato carboxylasa/oxygenasa (rubisco), que fue encontrado en la superficie externa de los tilacoides de arveja lavados con tampón, la enzima rubisco juega un rol importante en el primer paso de fijación del carbono, donde las plantas y otros organismos fotosintéticos convierten el dióxido de carbono en moléculas ricas en energía, como la glucosa.

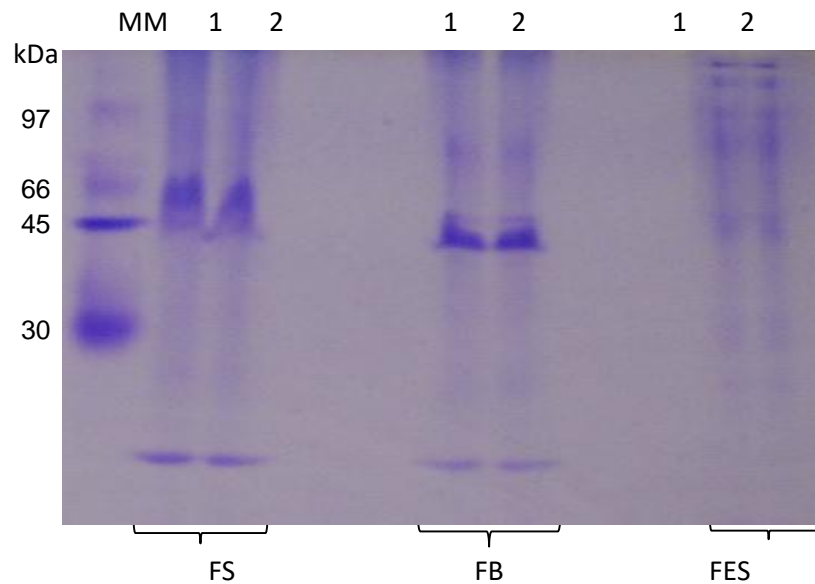


Figura 19: Perfil electroforético en gel de poliacrilamida no desnaturalante (DN – PAGE) de extractos proteicos de *Aspergillus niger* en tres sistemas de fermentación

El *A. niger* en su hábitat natural, secretan grandes cantidades de una amplia variedad de enzimas necesarias para liberar nutrientes de los biopolímeros. Esta alta capacidad secretora es explotada por la industria tanto en estado sólido como en fermentaciones sumergidas (Pandey *et al.* 1999, Berka *et al.* 1992). Además, estos hongos son utilizados como huésped para producir proteínas heterólogas (Punt *et al.* 2002, Archer y Tumer 2006) y otros metabolitos como ácido cítrico y ácido glucónico (Ruijter *et al.* 2002). Además, exhiben un metabolismo notablemente versátil, lo que le permite crecer en una amplia gama de sustratos en diversas condiciones ambientales; tiene

suficiente capacidad para degradar una gama de xenobióticos a través de diversas reacciones oxidativas, de hidroxilación y desmetilación, que ofrece un potencial de uso en procesos de biorremediación (Raj *et al.* 1992). Se ha demostrado que el *A. niger* es un secretor natural de proteínas mucho más efectivo que las levaduras *S. cerevisiae* que están muy bien estudiadas. Braaksma *et al.* (2010) sostienen que el secretoma fúngico esta referido al subproteoma de proteínas solubles secretadas, gran parte de este secretoma comprende muchas enzimas hidrolíticas extracelulares necesarias para digerir determinados sustratos. Otras proteínas extracelulares juegan papeles cruciales en interacciones hongo-huésped y en la patogenicidad fúngica. Por lo tanto, las clases de genes expresadas en el secretoma fúngico definen en gran medida el nicho ecológico ocupado por una especie fúngica y su impacto en la salud humana y agricultura y su utilidad como organismos productivos. Un ejemplo el *A. niger* tiene la capacidad innata para secretar ácidos orgánicos en cantidades altas y son esenciales como productores de citrato biotecnológico (Schuster *et al.* 2002, Odoni *et al.* 2017). El *A. niger* tipo silvestre en sustratos con glucosa secretan gluconatos, oxalatos y citrato (Odoni *et al.* 2017).

En eucariotas la secreción de proteínas involucra el transporte a través del retículo endoplasmático (ER), aparato de Golgi y vesículas a la membrana celular. La translocación del citoplasma al ER ocurre en *A. niger* a través del reconocimiento de señales de rutas establecidas dependientes e independientes de partículas (Pel *et al.* 2007).

4.6 ELECTROFOREGRAMAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON SULFATO DODECIL DE SODIO (SDS – PAGE) DE EXTRACTOS PROTEICOS DE *Aspergillus niger* EN TRES SISTEMAS DE FERMENTACIÓN

Los extractos proteicos crudos ultrafiltrados obtenidos de *A. niger* en los tres sistemas de fermentación a las 72 h de cultivo, también, fueron analizados mediante electroforesis en SDS – PAGE. Las proteínas previamente fueron reducidas en unidades polipeptídicas (UP), el SDS (anión) interacciona con las proteínas dotándoles de carga negativa y en el PAGE migran o se separan en relación a su peso molecular (García 2000, Garfin 2003) y para la cuantificación del peso molecular de las UP, previamente se cuantificó la movilidad electroforética (Rf) de los estándares de masa molecular (Anexo 3.1) y de las proteínas secretadas por el *A. niger* en el presente estudio (Anexos 3.3, 3.4 y 3.5). En los electroforegramas con extractos de FS, FB y FES (Figura 20) se aprecian las unidades polipeptídicas (UP); en FS se resolvieron cinco UP desde un

rango de 32,2 a 49,5 kDa (Cuadro 5) ésta última se presenta muy definida y coloreada. Los electroforegramas de FB presentaron diez UP de 26 a 103 kDa, de los cuales los polipéptidos de 34 y 49,5 kDa presentan una coloración muy intensa. En FES se separaron nueve en un rango de 38 a 107 kDa. Cuatro polipéptidos (98.1; 81.6; 71 y 38.3 kDa) de igual peso molecular fueron expresados en FB y FES, mientras que la UP de 42 kDa fue producida en los tres sistemas de fermentación (Figura 21).

La presencia y distribución de UP en cada sistema de fermentación, sugiere la influencia de los sistemas de cultivo en la producción de enzimas de *A. niger* ATCC 10864 siendo relativamente particular en FB y FES, donde el hongo creció adherido a una superficie sólida y por consiguiente las proteínas presentaron una mayor fracción de UP. Los electroforegramas de FS, FB y FES muestran un complejo número de polipéptidos que difieren en peso molecular, desde unos pocos cientos de kDa (Garfin 2003). Ferro – Luzzi (1974) evaluó el perfil proteico de *Salmonella typhimurium* en SDS-PAGE en diferentes condiciones de crecimiento, señala que en principio parecía que algunas proteínas de membrana no se habrían formado y otras serían inducidas, dependiendo de las condiciones de crecimiento, estos cambios fueron identificados, escaneados y visualizados fácilmente por electroforesis. Finalmente, determinó que hay diferencias en los perfiles proteicos de membranas, cuando la célula crece en fase estacionaria aeróbicamente comparado con células que crecen anaeróbicamente o en un determinado caldo nutritivo o pobre en fuente de carbono y nitrógeno, por ejemplo, cuando las células fueron cultivados en una fuente pobre de carbono y nitrógeno, no se observó un polipéptido principal (flagelina) de 50 kDa y cuando se cultivó en un medio anaeróbico el electroforegrama carecía de dos bandas de alta peso molecular de 86 y 81 kDa y otro de 43 y 36 kDa.

Respecto a los hongos *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus sojae*, han recibido una atención creciente por la alta producción de proteínas homólogas (Christensen *et al.* 1988, Gouka *et al.* 1997) y heterólogas (Hatamoto *et al.* 1999), muchas de estas proteínas eran recombinantes y fueron producidos en fermentación sumergida por su facilidad de manejo. Sin embargo, hubo un creciente interés por el cultivo en estado sólido, porque las cantidades de proteínas activas eran secretadas en mayor cantidad por los hongos filamentosos en FES y con frecuencia excedían a los biosintetizados en FS (Acuña-Arguelles *et al.* 1995, Díaz – Godínez *et al.* 2001, Elinbaum *et al.* 2002, Maldonado y Strasser 1998). Oda *et al.* (2006) realizaron el análisis proteómico de proteínas

extracelulares de *Aspergillus oryzae* obtenido en FS y en FES, en este último cultivo determinó que de 32 a 40 h secretó proteínas de cuatro a seis veces mayor que en FS, esto sugiere que el *A. oryzae* produce mayor cantidad de proteínas en FES, esto podría deberse a que paralelamente hubo alta secreción de enzimas para producir nutrientes esenciales, bajo estas condiciones donde la actividad de agua es baja y la composición de nutrientes es restringido.

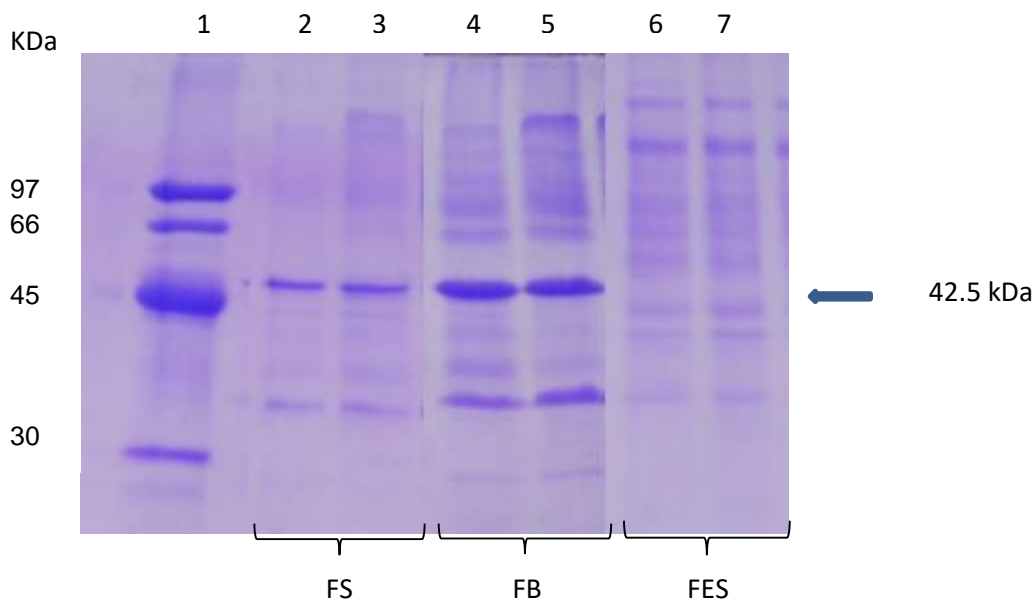


Figura 20: Perfil electroforético SDS –PAGE de polipéptidos del extracto fermentado de *Aspergillus niger*.

Obtenido en 72 h en tres sistemas de fermentación: Línea 1 estándares de peso molecular: 2, 3 FS; 4, 5 FB y 6, 7 FES.

La producción y secreción de proteínas en *A. niger* involucra un proceso complejo y ampliamente estudiado y con frecuencia se observan diferencias significativas en los títulos entre proteínas homólogas y heterólogas (Jacobs *et al.* 2009). Mientras que las proteínas homólogas se producen en un rango de 10–50 g.l⁻¹, las proteínas heterólogas a menudo se producen de 10 a 100 veces menos (van den Hondel *et al.* 1991), lo que revela, que *A. niger* presenta problemas severos en la expresión y/o secreción de proteínas extrañas. Las cepas que producen proteínas homólogas muestran altos flujos de proteínas y tienen una alta demanda de aminoácidos, mientras que la producción de proteínas heterólogas produce estrés por secreción y una respuesta típica de proteína de respuesta desplegada (UPR) (Jacobs *et al.* 2009). Recientes estudios de secuencias del genoma de especies industriales de *A. niger* han sido publicados, los cuales tienen alcance en la producción de enzimas como otros metabolitos (Pel *et al.* 2007, Baker 2006, Sun *et al.* 2007). Además, se han

desarrollado herramientas genómicas como la transcriptómica y diversas tecnologías proteómicas para hongos, que permiten mejorar las cepas, facilitar nuevas formas de trabajo y procesos de fermentaciones industriales (Jacobs *et al.* 2009).

Oda *et al.* (2006), también realizaron análisis de electroforesis en 2 - D, lograron separar las UP y seguidamente fueron analizadas por espectroscopia de masa y determinaron 85 UP producidas en FES, 43(50.5%) de estos eran identificados y expresados por 21 genes diferentes. En FS detectaron 110 UP y 37 (33.6%) eran asignados a 27 genes distintos, estas diferencias dependen de las condiciones y de la edad de los cultivos. La visualización diferencial de estas proteínas, reveló que *A. oryzae* secretaba varios tipos de proteínas de manera diferente en cada condición de cultivo. Los análisis comparativos de los proteomas, revelan que los procesos de regulación transcripcional y postranscripcional participan en la producción de proteínas en FES de *A. oryzae*. En hongos la secreción de proteína es regulada en varios pasos incluyendo la expresión de genes, modificación y rotación del ARNm, traducción, plegamiento de proteínas, modificación de proteínas, transporte de vesículas y movilidad a través de la pared celular (Conesa *et al.* 2001, Gouka *et al.* 1997, Iwashita 2002).

Cuadro 5: Peso molecular (kDa) de proteínas secretadas de *Aspergillus niger* en tres sistemas de fermentación

N° de bandas polipépticas	FS	FB	FES
	PM	PM	PM
1	49.598 (± 3.485)	103.268 (± 0.545)	107.066 (± 1.882)
2	45.991 (± 1.617)	98.137 (± 0.345)	100.614 (± 1.769)
3	42.147 (± 0.445)	95.728 (± 0.673)	98.167 (± 3.451)
4	36.805 (± 2.586)	81.647 (± 0.574)	81.469 (± 2.864)
5	32.293 (± 1.986)	71.037 (± 0.499)	71.036 (± 0.250)
6		49.847 (± 0.438)	64.332 (± 2.261)
7		42.629 (± 1.274)	45.991 (± 1.617)
8		38.348 (± 0.539)	42.625 (± 3.144)
9		34.121 (± 0.600)	38.157 (± 0.268)
10		26.676 (± 0.375)	

PM= peso molecular (kDa). Promedio de tres repeticiones. FS= Fermentación Sumergida, FB= Fermentación en Biopelículas, FES= Fermentación en Estado Sólido.

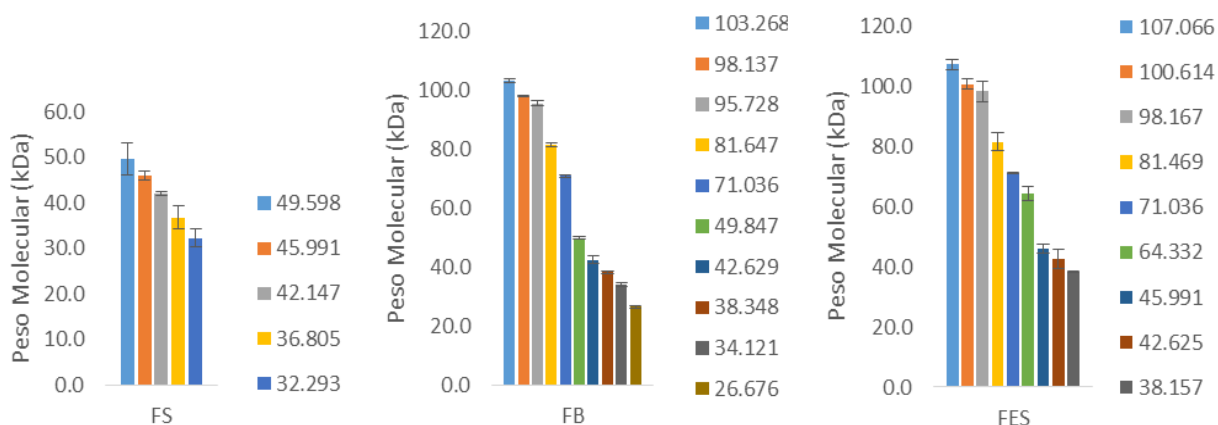


Figura 21: Unidades polipeptídicas secretadas por *Aspergillus niger* en tres sistemas de fermentación

4.7 ZIMOGRAMA DE ENDOGLUCANASAS DE *Aspergillus niger* ATCC 10864 PRODUCIDO EN TRES SISTEMAS DE FERMENTACIÓN

En los zimogramas correspondientes a la FS, FB y FES se observa el perfil de actividad catalítica de endoglucanasas (EGs) biosintetizados durante un periodo controlado de 120 h (Figura 22). A las 24 h en FS y FB no se observa hidrólisis de carboxil metil celulosa (CMC) por EGs, pero si en FES se observa en forma tenue dos bandas de EGs (Cuadro 6). A las 48 h en FS aparece cuatro bandas de EGs dos son claramente visibles y de gran actividad catalítica y dos de bajo peso molecular, relativamente tenues, en FB dos bandas tenues y en FES siete bandas de EGs, dos de éstas son muy intensas y el resto tenues. A las 72 h en FS se expresan cinco bandas de EGs dentro de un rango de 21 a 54 kD (Anexo 3.7), cuatro de estas son muy visibles, en FB aparecen ocho bandas desde 20 a 80 kDa (anexo 3.8) y en FES ocho bandas de EGs desde 23 a 54 kDa. A 96 h de cultivo en los electroforegramas de FS, las bandas de EGs de 54 y 38 kDa se aclaran y se visualizan mejor y se mantienen hasta 120 h de cultivo mientras que las otras bandas de EGs tienden a desaparecer o no muestran actividad hidrolítica del CMC. En FB a 96 h se mantienen las EGs de 42 y 38 kDa muy visibles y a las 120 h permanece la banda de EGs de 38 kDa y desaparece el resto de EGs. En FES desde las 72 h a 120 h se mantienen las ocho bandas de EGs, son más estables, de las cuales las que mostraron mayor actividad hidrolítica del CMC fueron de 54 y 42 kDa (Figura 22 y Cuadro 6).

El comportamiento de secreción de enzimas endoglucanasas de *A. niger* ATCC 10864 difiere en relación al sistema de cultivo. En FS donde el sustrato es líquido la expresión de EGs es menor comparado a la FB y FES. Las condiciones de FB es una combinación de FS y FES, donde el sustrato es líquido junto a un soporte sólido inerte para crecimiento del *A. niger*, sin embargo, tanto en FS y FB después de las 72 h de cultivo algunas EGs desaparecen, mientras que en FES se expresan desde las 24 h, incrementan su expresión en el transcurso de las horas y se mantienen hasta las 120 h de cultivo. Los zimogramas (Figura 23) de los extractos de FS, FB y FES revelan la máxima expresión y actividad catalítica de EGs producidas a las 72 h; en los tres sistemas de fermentación se produjeron EGs de 38 kDa con una banda delgada (2 mm) clara e intensa y la EGs de 42 kDa (Anexos 3.7 y 3.8) de banda ancha (4 mm) e intensa en FS y FB, mientras que en FES se aprecia ligeramente intensa; la EGs de 54 kDa en FES es ancha (4.5 mm) muestra buena actividad catalítica, pero en FS y FB la actividad enzimática es menor y aparece en forma tenue. Estas EGs con masas moleculares de 38 a 54 kDa de mayor permanencia y actividad hidrolítica son similares a los encontrados en los estudios de Ncube (2013) que obtuvo en los zimogramas de endocelulasas crudas y parcialmente purificadas de *Aspergillus niger* FGSC A733, seis bandas de celulasas extracelulares de 43, 34, 32, 28, 25 y 20 kDa. Las celulasas que tenían mayor actividad catalítica con bandas claras muy intensas eran de 34 y 32 kDa de los extractos parcialmente purificados, concluyeron que *A. niger* FGSC A733 en condiciones de FES presentó seis bandas activas con múltiples tamaños moleculares de celulasas. Este mismo hecho fue observado en *A. versicolor* EF23, donde las bandas de celulasas más intensas eran de los extractos crudos, mientras que de *P. citrium* y *T. harzianum* NCGR 0509 la intensidad de las bandas catalíticas de celulasas de extractos crudos y parcialmente purificados no diferían significativamente (Ncube 2013).

Las observaciones son consistentes, ya que los microorganismos que degradan la celulosa producen sistemas de múltiples enzimas con isoformas de celulasas que catalizan con una coordinación diferenciada la despolimerización la celulosa a glucosa (Waeonukul *et al.* 2007, Dutta *et al.* 2008). Por otro lado, Nobe *et al.* (2003) realizaron la purificación y caracterización de Laminarina hidrolasa de *T. viridae* U⁻¹ y encontraron que el hongo excreta varias enzimas micolíticas entre ellas quitinasas, laminarinasas (β - 1, 4- glucanasas) en fermentación sólida usando salvado de trigo, y también Vásquez – Garcidueñas *et al.* (1998) bioquímicamente demostraron que el *T. harzianum* produce al menos siete β - 1, 3 glucanasas extracelulares cuando crecen en algún tipo de polisacáridos o pared celular.

Así mismo, Ferdousi y Absar (2009) evaluaron la masa molecular de celulasas intracelulares purificadas de *Aspergillus oryzae* ITCC-4857.01 obtenidas en una fermentación sumergida. Las celulasas encontradas eran de 38 y 38.6 KDa de acuerdo a los resultados de PAGE - SDS y gel de filtración. En los extractos celulolíticos purificados podría encontrarse una sola sub unidad de celulasa; sus resultados eran muy cercanos a las celulasas purificadas de *T. viride* de 38 a 58 KDa (Berghem *et al.* 1975, Olama *et al.* 1993, Ogawa 1989); *Aspergillus sp.* de 31.2 KDa (Sultana, 1997). Los valores de peso molecular de las EGs purificadas parcialmente en el presente estudio, mostradas en los zimogramas (Figura 23) y gráfico de barras (Figura 24) de los tres modelos de fermentación FS, FB y FES, obtenidas a 72 h de cultivo, son similares a los encontrados por estos investigadores, aunque con algunas diferencias en los sistemas FB y FES que presentan mayor número de proteínas activas que podrían constituir isoformas de EGs. Recientes estudios reportados por Ahmed *et al.* (2015), quienes realizaron la purificación de extractos celulolíticos obtenidos en FS y la caracterización de endocelulasas de *A. niger* (van Tieghem 1867) en SDS – PAGE al 12% y determinaron una sola banda activa de masa molecular de 34 kDa; así mismo Akiba *et al.* (1995) reportó una celulasa de 40 kDa de *A. niger*, mientras que Mawadza *et al.* (2000) identificó endocelulasas de 25-45 kDa de *Bacillus sp.* Todas estas celulasas obtenidas por estos investigadores fueron producidas en FS, y se encuentran dentro del rango de EGs de 32 a 49 kDa que fue obtenido en el presente estudio.

El crecimiento de los hongos en estado sólido (FES) simula más cercanamente las condiciones naturales que el crecimiento en FS, por ello la secreción de enzimas en estas condiciones se asemeja más a la secreción de las enzimas en estadio natural, debido a que los hongos crecen adheridos a la superficie sólida (Oda *et al.* 2006). Leite *et al.* (2002) describieron un mecanismo potencial que impulsa la adhesión y agregación de microorganismos a células de plantas, y esto fue soportado a través de una hipótesis, en la que varios genes de adhesión fueron encontrados en el genoma de *Xylella fastidiosa*, identificando 11 genes, de los cuales cuatro tenían función endoglucanasas, uno tenía actividad celobiohidrolasa y otro endoxilanasas. De estos genes descritos, varios estaban potencialmente involucrados en la interacción planta-patógeno, que se encargaban de expresar las enzimas hidrolíticas y en consecuencia degradaban la pared celular de las plantas (Simpson *et al.* 2000). Esto revela que conforme los hongos y/o bacterias se adhieren a una superficie se activan sus genes para la expresión de enzimas hidrolíticas, así mismo dependiendo del tipo de sustrato utilizado en FS y FES, en estas condiciones ocurre la producción de cantidades variables de

celulasas. Ncube (2013) investigó la producción de celulasas en FES con *A. niger* FGSC A733, *A. versicolor* EF23, *P. citrinum* AZ01 y *T. harzianum* NCGR 0509, usando como sustrato paja de hierba común, semilla de jatropha y salvado de trigo, llegaron a producir celulasas en niveles variables durante la fermentación.

Las endoglucanasas que forman parte del complejo celulasas se diferencian por ser enzimas hidrolíticas de carbohidratos celulósicos, tienen la capacidad de fijarse al sustrato que esta mediado por una característica llamado dominio de unión de celulosa, que es independiente del dominio catalítico (Wulff *et al.* 2003). El sistema de enzimas celulolíticas de microorganismos a menudo difiere. Algunos microorganismos excretan grandes cantidades de enzimas celulolíticas en el medio de cultivo, mientras que otros, aunque crecen con suministro de celulosa, excretan poca o ninguna enzima en el medio. Esto explica claramente que las enzimas celulolíticas no solamente son extracelulares, sino también intracelulares. Los hongos son los principales microorganismos productores de celulasas, aunque algunas bacterias y actinomicetos también producen actividad celulasas (Ferdousi y Absar 2009). Microorganismos de los géneros *Trichoderma* y *Aspergillus* se estima que son los principales productores de celulasas (Peiz *et al.* 1998), y en condiciones crudas estas enzimas son comercialmente disponibles para uso agroganadero.

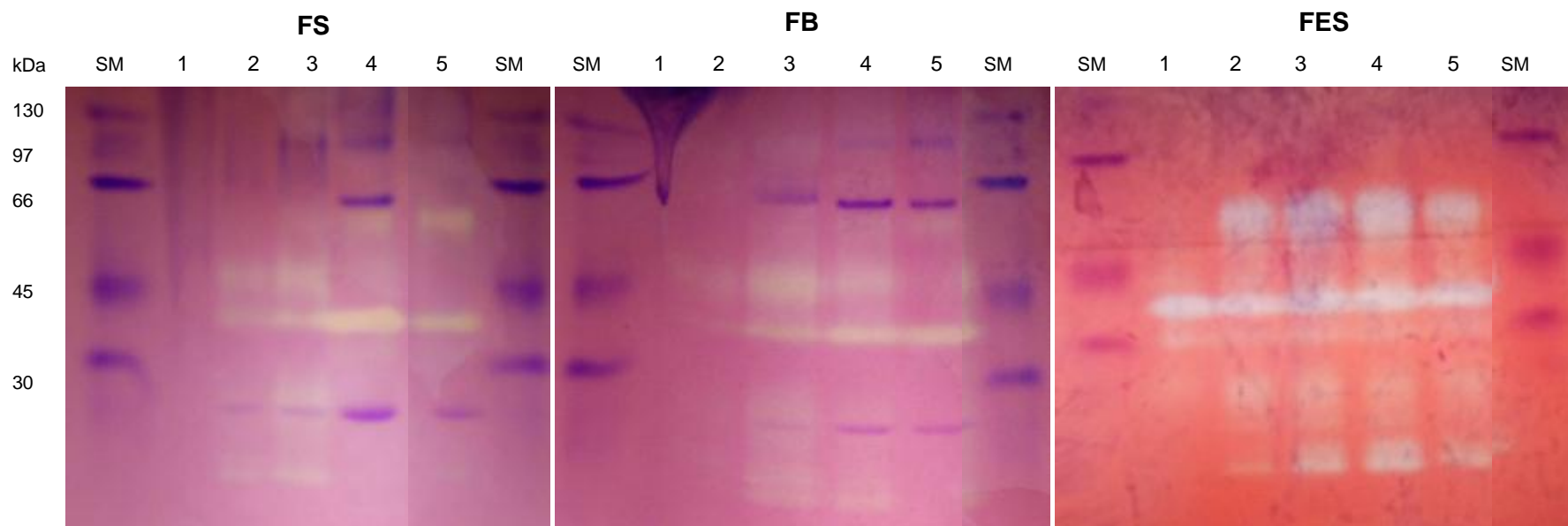


Figura 22: Zimograma de endoglucanasas obtenidos por: a) fermentación sumergida (FS), b) fermentación en biopelículas (FB), c) fermentación en estado sólido (FES). Línea 1 = 24 h, 2 = 48 h, 3 = 72 h, 4 = 96 h y 5 = 120 h

Cuadro 6: Identificación de endoglucanasas en relación a su peso molecular (KDa) producidas en tres sistemas de fermentación durante 120 horas

24 (h)			48 (h)			72 (h)			96 (h)			120 (h)		
<u>FS</u>	<u>FB</u>	<u>FES</u>	<u>FS</u>	<u>FB</u>	<u>FES</u>	<u>FS</u>	<u>FB</u>	<u>FES</u>	<u>FS</u>	<u>FB</u>	<u>FES</u>	<u>FS</u>	<u>FB</u>	<u>FES</u>
0	0	42.6(± 0.1) 38.6(± 0.4)	42.6(±0.1) 38.6(±0.4) 23.3(±0.3) 21.2(±0.2)	42.6(± 0.2) 38.6(± 0.2)	54(± 0.2) 42.6(±0.1) 38.6(± 0.4) 36 31 26.3(± 0.4) 23.3(± 0.1)	54(± 0.2) 42.6(± 0.1) 38.6(± 0.4) 23.3(± 0.3) 21.2(± 0.2)	80(± 0.1) 54(± 0.2) 42.6(± 0.2) 38.4(± 0.2) 26.3(± 0.1) 23.3(± 0.1) 21.2(± 0.2) 20.6(± 0.4)	54(± 0.2) 42.6(± 0.1) 38.6(± 0.4) 36 31 26.3(± 0.4) 24.3(± 0.4) 23.3(± 0.1)	54(± 0.2) 42.6(± 0.1) 38.6(±0.4)	80(± 0.1) 54(± 0.2) 42.6(±0.2) 38.4(±0.2) 26.3(±0.1) 23.3(±0.1)	54(± 0.2) 42.6(± 0.1) 38.6(±0.4)	54(± 0.2) 38.4(±0.4)	80(± 0.1) 54(± 0.2) 42.6(±0.2) 38.4(±0.2) 26.3(±0.1)	54(± 0.2) 42.6(± 0.1) 38.6(±0.4) 36 31 26.3(±0.4) 24.3(±0.4) 23.3(±0.1)

FS= Fermentación sumergida, FB = Fermentación en biopelículas, FES = Fermentación en Estado Sólido. Promedio de tres repeticiones.

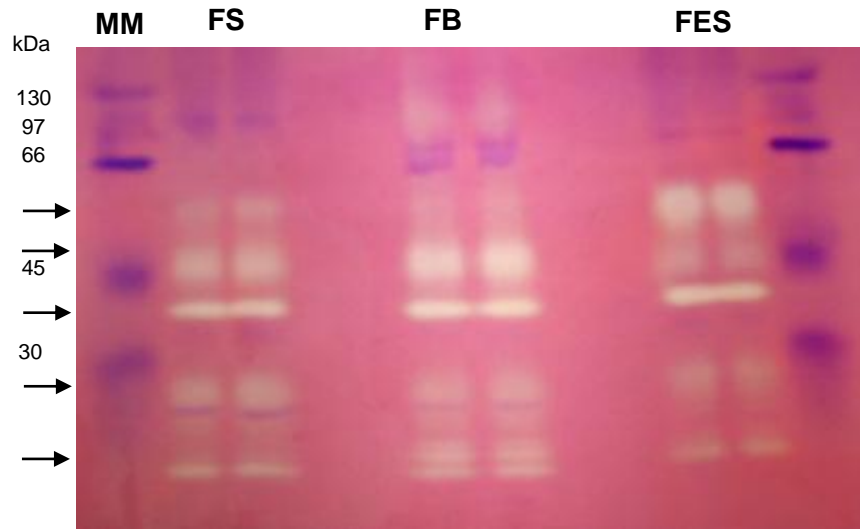


Figura 23: Zimograma de endoglucanasas de *A. niger* ATCC 1066, producidas en tres sistemas de fermentación en 72 horas de cultivo.

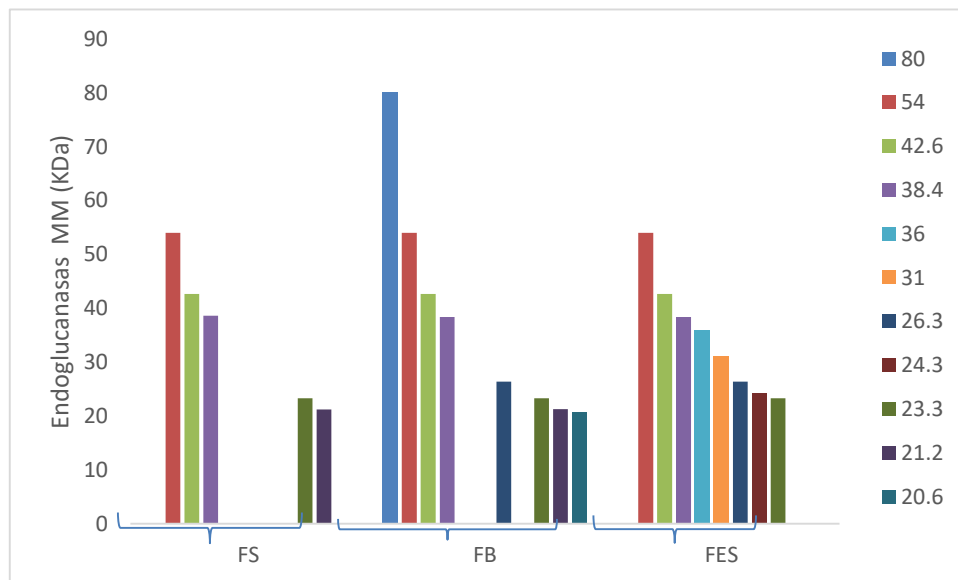


Figura 24: Endoglucanasas en relación a su peso molecular (kDa) producidas en tres sistemas de fermentación en 72 horas

4.8 ZIMOGRAMA DE β - GLUCOSIDASAS DE *Aspergillus niger* ATCC 10864 PRODUCIDO EN TRES SISTEMAS DE FERMENTACIÓN

En el zimograma de PAGE con los extractos enzimáticos de *A. niger* ATCC 10864 obtenidos en FS, FB y FES, se observa la actividad catalítica de dos β – glucosidasas (BGLs), uno de bajo PM aparente de 30.2 kDa y otra de 201.6 kDa (Anexo 3.9) de alto peso molecular (Figura 25), el de bajo peso molecular solo fue expresada en FS y FES, con muy baja intensidad. Las actividades catalíticas de las BGLs se revelan en el zimograma en forma de bandas de color gris oscuro, como producto de la hidrólisis de esculina en glucosa y 6.7 dihidroxycumarina (esculetina), esta última reacciona con hierro iónico del cloruro de hierro y forma un halo oscuro (Miskin y Edberg 1978).

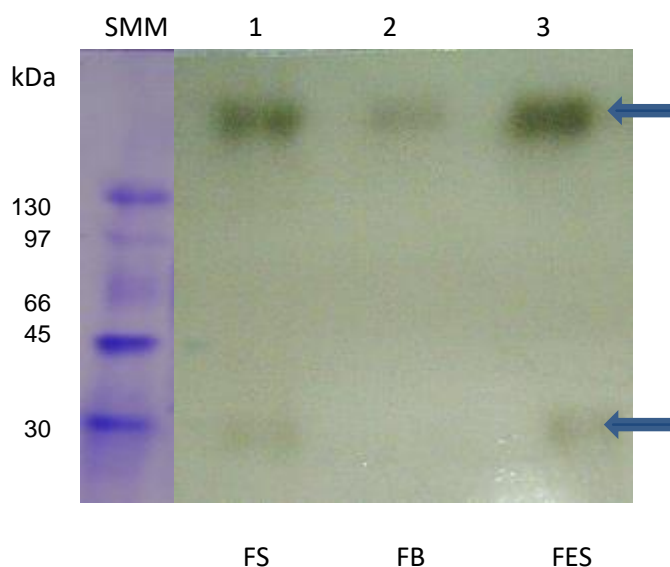


Figura 25: Zimograma de β – glucosidasa de *A. niger* producidas en tres sistemas de fermentación a las 72 horas

La xilanasas de alto peso molecular producida en FES (línea 3) presenta una coloración oscura más intensa, como resultado de su mayor expresión y actividad catalítica, seguida de la FS (1), mientras que en FB (2) la banda es tenue, lo que explica una menor expresión de la BGL en estas condiciones de fermentación. Además, la BGL de bajo peso molecular no se expresó en FB. Gunata y Vallier (1999) reportaron la producción de BGL de *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* tolerantes a glucosa, purificaron dos BGLs de *A. oryzae* por cromatografía, identificaron una de 80 kDa de mayor peso molecular y fuertemente inhibida por glucosa y la otra de menor peso de 30 kDa

tolerante a glucosa. Otros investigadores como Riou *et al.* (1998) y Johansson y Reczey (1998) utilizaron diferentes métodos para purificar, concentrar BGLs de *Aspergillus niger*, finalmente llegaron a establecer que los diferentes hongos de *Aspergillus* producen al menos dos BGLs, el primero expresado y secretado de mayor peso molecular, pero de menor tolerancia a la glucosa y el segundo tolerante a la glucosa, producido en menor cantidad y de baja masa molecular (Woodward y Wiseman 1982, Kwon *et al.* 1992, Gunata *et al.* 1993, Riou *et al.* 1998).

Dekker (1981) y Wood y McCrae (1982), sostienen que el peso molecular de β – glucosidasas producidas por hongos aerobios se encuentra en un rango de 40 a 480 kDa. La β –glucosidasa de mayor peso molecular identificada en el presente estudio se encuentra dentro de este rango mientras que la de baja masa molecular se encuentra por debajo del rango señalado. Zeng y Zhang (1989) identificaron BGLs de peso molecular de 195 kDa y 118 kDa en un gradiente de PAGE y SDS-PAGE, respectivamente, de *A. phoenicis*; Watanabe *et al.* (1992) de 240 kDa de *A. niger*; Riou *et al.* (1998) de 130 kDa de *A. oryzae* en FS; Ferreira (1996) identificó de 82 y 156 kDa de *Humicola grisea* var. *Thermoidea* cultivado en FES; Galas y Romanowska (1997) encontró un dímero de 200 kDa compuesto de dos sub unidades aparentes de 100 kDa de *Aspergillus niger* IBT-90 y Rashid y Siddiqui (1997) identificaron una BGL nativa y su sub unidad de peso molecular de 330 y 110 kDa, respectivamente, de *A. niger*.

Las β -glucosidasas están universalmente en los organismos vivos donde desempeñan muchas funciones (Ketudat y Esen 2010). Son importantes en las interacciones de microbios - vegetales y en la descomposición de la pared celular de plantas. La multiplicidad de β -glucosidasas se puede atribuir a la expresión de muchos genes o debido a modificaciones diferenciadas posteriores a la transcripción (Collins *et al.* 2007, Iwashita *et al.* 1999). La expresión diferencial de las diversas BGLs ocurre en respuesta a las fuentes de carbono suministradas en el sustrato o las condiciones de cultivo (Willick y Seligy 1985, Nazir *et al.* 2010) y podría ser una adaptación probable de los hongos para responder al cambio. Esta característica inherente podría explotarse para la expresión selectiva de una isoforma deseada de un hongo manipulando las condiciones de cultivo/fuente de carbono suministrado.

Rina (2011) investigó la expresión diferencial de β -glucosidasa de *A. niger* NII-08121 en respuesta a cinco fuentes de carbono (salvado de trigo, paja de arroz, glucosa, lactosa y celulosa al 1% de concentración) producidos en FS; en los zimogramas de PAGE nativo identificó la presencia de cuatro bandas diferentes de proteínas activas que presentaron actividad BGL en dos extractos enzimáticos producidos con lactosa y celulosa, que son inductores de celulasas en hongos. Tres de las bandas activas de bajo peso molecular eran visibles únicamente en las dos fuentes de carbono, mientras que la banda de alto peso molecular era visible al ser producidas en todas las fuentes de carbono probadas, esta isoforma de BGL se expresó en alta concentración, era evidente por la alta intensidad de la banda.

4.9 ZIMOGRAMA DE XILANASAS DE *Aspergillus niger* ATCC 10864 PRODUCIDO EN TRES SISTEMAS DE FERMENTACIÓN

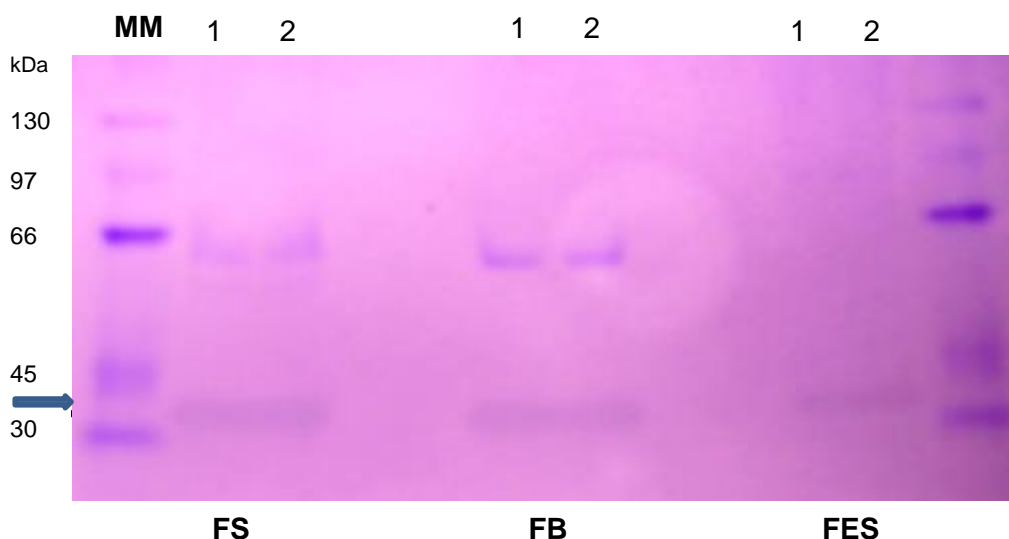


Figura 26: Zimograma de xilanasas de *A. niger* producidas en tres sistemas de fermentación en 72 horas de cultivo

En el zimograma SDS – PAGE (Figura 26) se presenta la actividad xilanolítica de las xilanasas en presencia de xilano, producida por *A. niger* ATCC 10864, durante 72 h de cultivo en tres sistemas de fermentación. La distancia de migración y R_f de las xilanasas aisladas en el gel de poliacrilamida fueron de 6.32 cm y 0.549, respectivamente (Anexo 3.9); el peso molecular de la xilanasas cuantificada fue de 31.6 kDa (Figura 26 y 27). Se expresó una enzima única en FS, FB y en FES.

En los zimogramas de FS y FB las bandas de xilanasas son más intensas en coloración, lo que revela mayor expresión y actividad catalítica de la proteína activa en estos dos tipos de fermentación a diferencia en FES, en este último sistema de fermentación la expresión de xilanasas es relativamente menor, en consecuencia, la hidrólisis del xilano fue menor y se revela con una banda o halo tenue.

Ncube (2013) en sus estudios de producción de enzimas celulolíticas para producir bioetanol de *A. niger* FGSC A733, identificó xilanasas por zimografía en SDS - PAGE incorporando xilano y obtuvo una banda activa de 31 kDa. La presencia de una única banda de xilanasas es consistente con el hecho de que estas enzimas son únicas con peso molecular dentro de un rango de 8-145 kDa (Kulkarni *et al.* 1999, Coral *et al.* 2002). Takahashi *et al.* (2013) realizaron el análisis funcional de xilanasas producidas por *A. niger* E-1 en xilano al 0.5% suplementado con 50 mM de succinato, los extractos enzimáticos obtenidos fueron purificados y caracterizados e identificaron en SDS-PAGE una única banda de peso molecular de 35 kDa. Hong-Ge *et al.* (2006) aislaron y purificaron en SDS-PAGE una nueva xilanasas (XynIII) bifuncional de *Aspergillus niger* A-25 con un peso molecular de 27.9 kDa; realizaron pruebas de hidrólisis en xilano de abedul, avena, liquenina y β - glucano de cebada con la enzima XynIII purificada (Hong - Ge *et al.* 2006).

Las xilanasas son producidas por microorganismos, principalmente por hongos, los cuales producen enzimas extracelularmente con una amplia gama de actividad catalítica. Así mismo el uso de diferentes tipos de sustratos como rastrojo de maíz (Kheng y Omar 2005, Kumar y Wyman 2009), salvado de trigo, tusa de maíz, salvado de lentejas y cáscaras de cacahuete (Kang *et al.* 2004) y diferentes procesos de fermentación, como en FES y FS permitieron producir xilanasas. Muchos de los microorganismos productores de xilanasas, expresan múltiples isoformas, que podrían deberse a muchas razones, tales como la heterogeneidad y la complejidad de la estructura del xilano (sustrato), dotación genética y modificaciones postraduccionales (Ghotora *et al.* 2006), las xilanasas producidas podrían variar en relación a su peso molecular, pH óptimo, especificidad sobre el polímero xilano. Las xilanasas rompen enlaces β -1,4 en la estructura carbonada del xilano produciendo xilooligómeros cortos. La hidrólisis completa de xilano requiere una acción sinérgica de endoxilanasas (EC 3.2.1.8), exoxilanasas (β -D-1,4 xilano xilohidrolasa), β - D xiloxidasa junto a

un grupo de enzimas desramificadoras, como α -L-arabinofuranosidasa, α - glucuronidasas y acetil esterasas (Min - Jen *et al.* 2002, Shallom y Shoham 2003, Maciel *et al.* 2008).

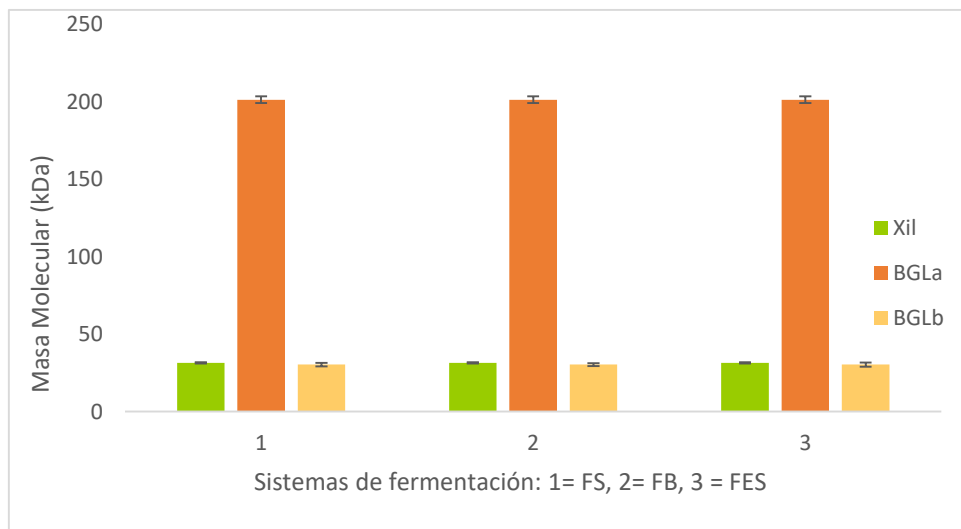


Figura 27: Xilanasas y β – glucosidasas en relación a su peso molecular producidas por *Aspergillus niger* en tres sistemas de fermentación

V. CONCLUSIONES

Las microfotografías ópticas y de microscopía electrónica de barrido permitieron observar las características morfológicas de biopelículas de *A. niger* ATCC 10864 desarrolladas sobre soporte sólido de perlita, evidenciando la adhesión de esporas e hifas, como base fundamental del mecanismo de formación de las biopelículas y/o colonización del *A. niger* y su aplicación en los modelos de fermentación en biopelículas y en estado sólido para la producción de celulasas y xilanasas.

El sistema de fermentación en biopelículas de *Aspergillus niger* adherido a superficie de perlita volcánica, permitió una mayor biosíntesis de celulasas (1768 UL^{-1}), endoglucanasas (6408 UL^{-1}) y xilanasas (8567 UL^{-1}) que la fermentación sumergida (APFasa = 1165 UL^{-1}), (EG = 1854 UL^{-1}), (Xyl = 5051 UL^{-1}) y en estado sólido (APFasa = 1174 UL^{-1}), (EG = 5205 UL^{-1}), (Xyl = 7058 UL^{-1}), respectivamente.

El crecimiento de biomasa, formación de producto y consumo de sustrato de *A. niger* en fermentación en biopelículas, demuestran que son sistemas morfológicamente eficientes para la producción de celulasas y eventualmente podrían reemplazar a la FES. También, es evidente que la adhesión a superficies sólidas, desencadenan un comportamiento metabólico diferencial. Una ventaja adicional es que la tecnología desarrollada para FS puede ser utilizada en FB.

Los valores experimentales del crecimiento de biomasa, producción de celulasas, xilanasas y consumo de lactosa del *A. niger* ATCC 10864 en los tres sistemas de fermentación correlacionaron adecuadamente ($r^2 > 0,9$) con los modelos Logístico, Ludeking y Piret y Pirt, respectivamente, los cuales, permitieron replantear las variables que gobiernan los cultivos celulares y/o rediseñar las condiciones óptimas de los procesos fermentativos para maximizar los rendimientos y productividades volumétricas de las enzimas de interés.

Aspergillus niger ATCC 10864 exhibió diferencias en la expresión proteómica activa en respuesta a los distintos sistemas de fermentación que fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida y su actividad enzimática revelados en zimogramas.

En los electroforegramas con gel de poliacrilamida no desnaturalante (DN-PAGE) se identificó proteínas nativas extracelulares de *A. niger* cultivados en tres sistemas de fermentación, donde la expresión de proteínas presenta diferencias y similitudes en pesos moleculares. En FS secretó de 12.4 y 67.4 kDa; en FB de 12.4; 42.7 y 93 kDa y FES de 57, 97; 130 y 174 kDa.

La electroforesis con SDS – PAGE, permitió identificar las unidades polipeptídicas (UP) de las proteínas excretadas por *A. niger*. En los extractos de FS se identificó cinco UP desde 32.5 a 49.5 kDa, en FB se revelaron diez UP de 26 a 103 kDa y en FES se resolvieron nueve UP de 38 a 107 kDa. Se evidencia que múltiples UP son expresados diferencialmente por el *A. niger* en respuesta al medio físico de cultivo, que afecta los procesos de regulación transcripcional y postranscripcional para la expresión proteómica del *A. niger*.

Los zimogramas de SDS-PAGE con adición de CMC mostraron actividad catalítica de las endoglucanasas (EGs), la máxima expresión de EGs fue a las 72 h en los tres sistemas de fermentación, en FS se expresó cinco bandas de EGs de 21 a 54 kDa, en FB ocho bandas desde 20 a 80 kDa y en FES ocho bandas de 23 a 54 kDa. Después de las 72 h de cultivo tanto en FS y FB algunas EGs desaparecieron, en FES se mantuvieron estables hasta las 120 h, en respuesta a la adhesión del *A. niger* en la superficie del soporte sólido que afecta directamente a su expresión diferencial genética y actividad metabólica.

El *A niger* ATCC 10864 en los sistemas de fermentación FB y FES expresaron mayor número de proteínas activas con múltiples tamaños moleculares que podrían constituir isoformas de EGs, responsables de la biodegradación de celulosa de la pared celular de plantas.

En el zimograma SDS – PAGE se reveló una enzima xilanolítica con peso molecular de 31.15 kDa, producida por *A. niger* en los tres sistemas de fermentación FS, FB y FES, las condiciones libres y adheridas de los modelos de fermentación no afectaron significativamente en la expresión diferencial de xilanasas. Los *A. niger* son microorganismos potencialmente productores de xilanasas, que son de interés en determinadas actividades agroindustriales.

Se expresaron dos isoformas de β – glucosidasas (BGLs) de *A. niger* en los tres sistemas de fermentación, que fueron revelados en un zimograma PAGE, uno de peso molecular de 205.5 kDa y otro de peso molecular de 30.4 kDa. La BGL de bajo peso molecular solo se expresó en FS y FES. La expresión diferencial de las dos BGLs ocurre en respuesta al medio físico durante el cultivo del *A. niger* con lactosa como fuente de carbono e inductor de crecimiento.

Aspergillus niger ATCC 10864 presenta un potencial para la producción de enzimas hidrolíticas entre ellas celulasas y xilanasas constituidas por muchas isoformas enzimáticas capaces de degradar los biopolímeros de celulosa y xilano, que merecen especial atención para posteriores aplicaciones en diferentes agroindustrias.

VI. RECOMENDACIONES

La FB y FES tienen similares mecanismos de adhesión del *A. niger* en superficie sólida, sin embargo, difieren en la expresión diferencial de genes, lo cual se evidencia en la producción de complejos multienzimáticos de celulasas, por lo que se requieren más estudios en este sentido para identificar los genes diferencialmente expresados.

Realizar pruebas de electroforesis y zimografías utilizando gel de acetato de celulosa en la matriz de separación para mejorar la calidad de los electroforegramas y zimogramas de celulasas, endoglucanasas, β - glucosidasas y xilanasas, ya que los geles de acetato de celulosa se usan en cantidades muy pequeñas en el orden de microlitros/ muestra/enzima y permiten mejor resolución para la identificación de isoenzimas y aloenzimas.

Desarrollar mayores pruebas de zimografía adaptando diversos sustratos de bajo costo para la identificación de endoglucanasas (EGs), para identificar el número y tipo de isoformas de EGs presentes en los extractos celulolíticos crudos y purificados de una misma clase, para obtener resultados de alta sensibilidad y precisión.

Seleccionar y desarrollar métodos zimográficos para mejorar la identificación de la actividad catalítica de celulasas y xilanasas, teniendo en cuenta la nitidez y estabilidad de las bandas de proteínas activas, modos de registro de las bandas y preservación de las matrices de zimogramas.

Desarrollar pruebas de electroforesis en dos dimensiones para separar e identificar unidades polipépticas de EGs, seguido de una cromatografía líquida de alta eficiencia con espectroscopia de masa para determinar la estructura molecular y cuantificar el peso molecular de las isoenzimas.

Desarrollar estudios de escalamiento a nivel piloto para la producción de celulasas y xilanasas por FB y FES de interés para la sacarificación de biomasa lignocelulósica proveniente de los rastrojos agrícolas para la producción de bioetanol de segunda generación.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aachary, AA; and Prapulla, SG. 2011. Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf* 10: 2–16.
- Acuña-Arguelles, ME; Gutierrez-Rojas, M; Viniegra-Gonzalez, G; Favela-Torres, E. 1995. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 43: 808–814.
- Adams, TH; Wleser, JK; Yu, JH. 1998. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and Molecular Biology Review* 62: 35 – 54.
- Aguilar, CN; Gutiérrez-Sánchez, G; Rado-Barragán, PA; Rodríguez-Herrera, R; Martínez-Hernández, JL. Contreras-Esquivel, JC. 2008. Perspectives of Solid State Fermentation for Production of Food Enzymes. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 4(4): 354-366.
- Ahmed, K; Munawar, S; Naz, SH. 2015. Purification and characterization of cellulase from *Aspergillus niger* (van Tieghem, 1867). *Sci.Int. (Lahore)* 27(5): 4341- 4344.
- Akao, T; Gomi, K; Goto, K; Okazaki, N; Akita, O. 2002. Subtractive cloning of cDNA from *Aspergillus oryzae* differentially regulated between solid-state culture and liquid (submerged) culture. *Curr Genet* 41:275–281.
- Akiba, S; Kimura, Y; Yamamoto, K; Kumagai, H. 1995. Purification and characterization of a protease-resistant cellulase from *Aspergillus niger*, *J. Ferm. Bioeng* 79(2): 125-130.
- Akhtar, M. 1994. Biochemical pulping of aspen wood chips with three strains of *Ceriporiopsis subvermispora*. *Holzforschung* 48: 199–202.
- Ali, UF; Saad El-Dein, HS. 2008. Production and partial purification of cellulase complex by *Aspergillus niger* and *A. nidulans* grown on water hyacinth blend. *J. Appl. Sci. Res.* 4: 875-891.
- Amartey, S.; Jeffries, T. 1996. An improvement in *Pichia stipitis* fermentation of acid-hydrolysed hemicellulose achieved by overliming (calcium hydroxide treatment) and strain adaptation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 12 (3): 281–283.

- Amor, A; Parameswaran, B; Kumar, R; Birolo, L; Vinciguerra, R; Marcolongo, L; et al. 2015. Application of a new xylanase activity from *Bacillus amyloliquefaciens* XR44A in brewer's spent grain saccharification. *J. Chem. Technol. Biotechnol* 93: 573 – 581.
- Andersen, MR; Salazaar, MP; Schaap, PJ; van de Vondervoort, PJI; Culley, P; et al. 2011. Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. *Genome Res* 21: 885–897.
- Anish, R; Rahman, MS; Rao, MA. 2007. Application of cellulases from an alkalothermophilic *Thermomonospora sp.* in biopolishing of denims. *Biotechnology and Bioengineering* 96:48-56.
- Anuradha, JS; Varma, S; Garre, P. 2014. Production and purification of cellulase from *Aspergillus nidulans* AJSU04 under solid-state fermentation using coir pith. *Chem. Biochem. Eng. Q* 28 (1): 143–151.
- Armenante, A; Longobardi, S; Rea, I; et al. 2010. The *Pleurotus ostreatus* hydrophobin Vmh2 and its interaction with glucans. *Glycobiology* 20: 594–602.
- Archer, DB; Turner, G. 2006. Genomics of protein secretion and hyphal growth in *Aspergillus*. in *The Mycota XIII* (ed. Brown, A.J.P.) 75–96.
- Aryal, S. 2019. Submerged fermentation. 28. <https://microbenotes.com/submerged-fermentation>.
- Ásgeirsdóttir, SA; de Vries, OM; Wessels, JG. 1998. Identification of three differentially expressed hydrophobins in *Pleurotus ostreatus* (*Oyster mushroom*). *Microbiology* 144:2961-2969.
- Aufurth, S; Schagger, H; Muller, V. 2000. Identification of subunits a, b, and c1 from *Acetobacterium woodii* Nap-F1F0- ATPase. Subunits c1, c2 and c3 constitute a mixed c-oligomer. *J Biol Chem* 275 (43): 33297–301.
- Baker, RA; Wicker, L. 1996. Current and potential applications of enzyme infusion in the food industry. *Trends in Food Science and Technology* 7:279-284
- Baker, SE. 2006. *Aspergillus niger* genomics: past, present and into the future. *Med.Mycol* 44 (1): 17– 21.
- Balat, M; Balat, H; Öz, C. 2008. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science* 34: 551-573.
- Bandikari, R.; Poondla, V.; Reddy Obulam, VS. 2014. Enhanced production of xylanase by solid state fermentation using *Trichoderma koeningi* isolate: effect of pretreated agro-residues. *3 Biotech* 4: 655 – 664.

- Basit, A; Liu, J; Miao, T; Zheng, F; Rahim, K; Lou, H; et al. 2018a. Characterization of two endo- β -1, 4-xylanases from *Myceliophthora thermophila* and their saccharification efficiencies, synergistic with commercial cellulase. *Front. Microbiol* 9: 233.
- Beauvais, A; Schmidt, C; Guadagnini, S; et al. 2007. An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*. *Cell Microbiol* 9: 1588–1600.
- Beech, IB; Sunner, J. 2004. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Curr Opin Biotechnol* 15:181- 6.
- Beg, QK; Kapoor, M; Mahajan, L; Hoondal, GS. 2001. Microbial xylanases and their applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56: 326- 338.
- Béguin, P; Aubert, JP. 1994. The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews* 13: 25-58.
- Bennett, JW. 2010. An overview of the genus *Aspergillus*. In: *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. (Machida M, Gomi K, eds) Caiser Academic Press, Portland 1–17.
- Berenger, J; Frixon, C; Creuzet, N; Bigliardi, J. 1985. Production, purification and properties of thermostable xylanase from *Clostridium stercorarium*. *Canadian Journal of Microbiology* 31: 635-643.
- Berghem, L; Pettersson, L; Asio-Fredriksson, U. 1975. The mechanism of enzymatic cellulose degradation, characterization and enzymatic properties of a β -1-4-glucan cellobiolydrolase from *Trichoderma viride*. *Eur. J. Biochem* 53- 55.
- Berka, RM; Dunn-Coleman, N; Ward, M. 1992. Industrial enzymes from *Aspergillus* species. in *Aspergillus Biology and Industrial Applications* (eds. Bennett, J.W. & Klich, M.A.) 155–202.
- Bhat, MK. 2000. “Cellulases and related enzymes in biotechnology,” *Biotechnology Advances* 18 (5): 355–383.
- Bhat, MK; Bhat, S. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances* 15: 583-620.
- Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol* 3: 286 – 90.
- Biely, P. 1993. Biochemical aspects of the production of microbial hemicellulases. In: Coughlan, M. P. & Hazlewood, G. P. Ed. *Hemicellulose and Hemicellulases*. Cambridge: Portland Press.

- Biesebeke, R; Ruijter, G; Rahardjo, YP; Hoogschagen, MJ; Heerikhuisen, M; Levin, A. et al., 2002. *Aspergillus oryzae* in solid state and submerged fermentations: progress report on a multidisciplinary project. FEMS Yeast Res 2: 245–248.
- Bigerelle, M; Anselme, K; Dufresne, E; Hardouin, P; Iost, A. 2002. An unscaled parameter to measure the order of surfaces: a new surface elaboration to increase cells adhesion. Biomol Eng 19: 79–83.
- Bisaria, VS; Mishra, S. 1989. Cellulase biosynthesis and regulation, CRCCrit.Rev. Biotechnol 5: 61–103.
- Bischoff, KM; Shi, L; Kennelly, PJ. 1988. The detection of enzyme activity following sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Anal Biochem 260(1): 1 – 17.
- Blankenship, JR; Mitchell, AP. 2006. How to build a biofilm: a fungal perspective. Curr Opin Microbiol 9: 588–594.
- Bonnin, E; Brunel, M; Gouy, Y; Lesage-Meesen, L; Asther, M; Tribault, JF. 2001. *Aspergillus niger* I-1472 and *Pycnoporus cinnabarinus* MUCL 39533, selected for the biotransformation of ferulic acid to vanillin, are also able to produce cell wall polysaccharide degrading enzymes and feruloyl esterases. Enzyme Microbial Technol 28: 70-80.
- Bothast, RJ; Saha, BC. 1997. Ethanol production from agricultural biomass substrates. Advances in Applied Microbiology 44: 261.
- Boutte, TT; Sargent, KL; Feng, G. 2009. Enzymatic dough conditioner and flavor improver for bakery products. US Patent. 20090297659.
- Braaksma, M; Martens-Uzunova, ES; Punt, PJ; Schaap, PJ. 2010. An inventory of the *Aspergillus niger* secretome by combining in silico predictions with shotgun proteomics data. BMC Genomics 11:584
- Breen, A; Singleton, FL. 1999. Fungi in lignocellulose breakdown and bio pulping. Current Opinion in Biotechnology 10(3): 252-258.
- Brozobohaty, B; Moore, I; Kristoffersen, P; Bako, I; Campos, N; Schell, J; Palme, K. 1993. Release of active cytokinin by a beta-glucosidase localized to the maize root meristem. Science 262:1051–1054.

- Bruns, S; Seidler, M; Albrecht, D; et al; 2010. Functional genomic profiling of *Aspergillus fumigatus* biofilm reveals enhanced production of the mycotoxin gliotoxin. *Proteomics* 10: 3097–3107.
- Business Wire. (2019). Industrial Enzymes Market Growth, Trends, and Forecast 2019-2024. Retrieved from <https://www.businesswire.com/news/home/20190329005262/en/Industrial-Enzymes-Market-Growth-Trends-Forecast-2019-2024>
- Buth, DG. 1990. Genetic principles and the interpretation of electrophoretic data, in electrophoretic and isoelectric focusing techniques in fisheries management, Whitmore, D.H., Ed., CRC Press, Boca Raton, FL 1 p.
- Carpenter, CE; Mueller, RJ; Kazmierczak, P; Zhang, L; Villalon, DK; Van Alfen, NK. 1992. Effect of a virus on accumulation of a tissue specific cell surface protein of the fungus *Cryphonectria (Endothia) parasitica*. *Mol. Plant-Microbe. Interact* 4:55-61.
- Carrillo, L. 2003. *Aspergillus*. In *Los hongos de los alimentos y forrajes*. 1st ed., 44–60 pp. <http://www.microbiota.com.ar/sites/default/files/4aspergilos.pdf>
- Chahal, DS. 1983. Foundations of biochemical engineering kinetics and thermodynamics in biological systems. In Blanch, H.W, Papontsakis, E.T., and G Stephanopoulos Ed. ACS Symposium Series, 207, American Chemical Society, Washington 42 p.
- Chandra, J; Kuhn, DM; Mukherjee, PK; Hoyer, LL; McCormick, T; Ghannoum, MA. 2001. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol* 183: 5385–5394.
- Charalampopoulos, D; Antonio, J; Pandiella, SS. 2009. Modelling and validation of *Lactobacillus plantarum* fermentations in cereal based media with different sugar concentrations and buffering capacities. *Biochemical Engineering Journal* 44: 96–105
- Chauthaiwale, J; Rao, M. 1994. Production and purification of extracellular D - xylose isomerase from an alkaliphilic, thermophilic *Bacillus sp.* *Applied Environmental Microbiology* 60: 4495-4499
- Chávez, R; Bull, P; Eyzaguirre, J. 2006. The xylanolytic enzyme system from the genus *Penicillium*. *J Biotechnol* 123:413–433.
- Chen, HZ. 2013. Modern solid state fermentation: theory and practice 1-324.

- Chen, HZ; He, Q. 2012 Value-added bioconversion of biomass by solid-state fermentation. *J Chem. Technol Biotechnol* 87(12):1619–25.
- Chen, HZ; Qiu, WH. 2010. Key technologies for bioethanol production from lignocellulose. *Biotechnol. Adv* 28: 556–62.
- Chen, HZ; Xu, J. 2004. *Modern solid state fermentation: theory and practice*. Beijing: Chemical Industry Press.
- Christensen, T; Woeldike, H; Boel, E; Mortensen, SB; Hjortshøj, K; Thim, L; Hansen, MT. 1988. High level expression of recombinant genes in *Aspergillus oryzae*. *Bio/Technology* 6:1419–1422.
- Chu, PW; Yap, MN; Wu, CY; Huang, CM; Pan, FM; Tseng, MJ; Chen. ST. 2000. A proteomic analysis of secreted proteins from xylaninduced *Bacillus* sp. strain K-1. *Electrophoresis* 21:1740–1745.
- Ciolacu, D; Ciolacu, F; Popa ,VI. 2011. Amorphous cellulose structure and characterization. *Cellulose Chemistry and Technology* 45 (1-2):13-21.
- Clutterbuck, AJ. 1969. A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 63: 317 – 327.
- Coherent Market Insighth (CMI). 2018. Cellulase Market Analysis
<https://www.coherentmarketinsights.com/market-insight/cellulase-market-2146>
- Collado - Fernández, M. 2003. Bread dough fermentation in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2 ed.
- Collins, T; Gerday, C; Feller, G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev* 29: 3–23.
- Collins, CM; Murray, PG; Denman, S; Morrissey, JP; Byrnes, L; Teeri, TT; Tuohy, MG. 2007. Molecular cloning and expressnalysision analysis of two distinct beta-glucosidase genes - bgl1 and aven1, with very different biological roles from the thermophilic, saprophytic fungus *Talaromyces emersonii*. *Mycol. Res* 111(7): 840-849.
- Coman, G; Bahrim, G. 2011. Minizing cellulase biosynthesis from cellulase free xylanase production with *Streptomyces* spp. P12-137 using optimization by response surface methodology. *Cellulose Chemistry and Technology* 45: 245-250.

- Comacho, NA; Aguilar, OG. 2003. Production, purification and characterisation of low molecular mass xylanase from *Aspergillus* spp. and its application in bakery. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 104: 159 -172.
- Conesa, AP; Punt, J; van Luijk, V; van den Hondel, CA. 2001. The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. *Fungal Genet. Biol* 33:155–171.
- Coral, G; Arikan, B; Naldi, MN; Venmez, HG. 2002. Some Properties of Crude Carboxymethyl Cellulase of *Aspergillus niger* Z10 Wild-Type Strain. *Tirk J. Biol.* 26: 209 – 213.
- Cortéz, JM; Ellis, J; Bishop, DP. 2001. Cellulase finishing of woven, cotton fabrics in jet and winch machines. *Journal of Biotechnology* 89:239 - 245.
- Coughlang, MP; Hazlewood, GP. 1993. 1, 4 - β -D-Xilan degrading enzymes systems, biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnol. Appl Biochem* 17: 259 – 289.
- Cristine, IS; Knob, A. 2014. Production of xylanases by an *Aspergillus niger* strain in wastes grain. *Acta Scientiarum. Biological Sciences, Maringá* 36 (3): 313-319.
- Cunliffe, D; Smart, CA; Alexander, C; Vulfson, EN. 1999. Bacterial adhesion at synthetic surfaces. *Appl Environ Microbiol* 65: 4995–5002.
- Dague, E; Alsteens, D; Latge, JP; Dufrene, YF. 2008. Highresolution cell surface dynamics of germinating *Aspergillus fumigatus* conidia. *Biophys J* 94: 656–660.
- Dalby, PA. 2007. Engineering enzymes for biocatalysis. *Recent Pat. Biotechnol* 1(1): 1-9.
- da Silva, R; Lago, ES; Merheb, CW; Macchione, MM; Park, YK; Gomes, E. 2005. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* Mische. *Braz. J. Microbiol* 36: 235-241.
- Davis, BJ. 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum. *Ann. NY Acad. Sci.* 121: 404-427.
- Dekker, RFH. 1981. Induction, localization and characterization of β -glucosidases produced by *Monilia*. *J Gen Microbiol* 127: 177–184.
- d’Enfert, C. 1997. Fungal spore germination: insights from the Molecular Genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology* 21: 163–172.
- Deshpande, V; Lachke, A; Mishra, C; Keskar, S; Rao, M. 1986. Mode of action and properties of xylanase and L-xylosidase from *Neurospora crassa*. *Biotechnological Bioengineering* 26: 1832-1837.

- de Vries, RP de, 2003. Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide degrading enzymes; relevance for industrial production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61: 10–20
- de Vries, R P; Visser, J. 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:497–522.
- Díaz - Godínez, G; Soriano-Santos, J; Augur, C; Viniestra-Gonzalez, G. 2001. Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol* 26: 271–275.
- Dijksterhuis, AP; Maarten, WB; Loran, F. N.; van Baaren RB. 2006. On Making the Right Choice: The Deliberation-Without-Attention Effect. *Science* 311: 1005 – 1007.
- Donlan, RM. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 8: 881–890.
- Dudkina, NV; Heinemeyer, J; Keegstra, W; Boekema, EJ; Braun, HP. 2005. Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: an angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane. *FEBS Lett* 579(25): 5769 –72.
- Dufrene, YF. 2000. Direct characterization of the physicochemical properties of fungal spores using functionalized AFM probes. *Biophys J* 78: 3286–3291.
- Dupres, V; Alsteens, D; Andre, G; Dufrene, YF; 2010. Microbial nanoscopy: a closer look at microbial cell surfaces. *Trends Microbiol* 18: 397–405.
- Dutta, T; Sahoo, R; Sengupta, R; Ray, SS; Bhattacharjee, A; Ghosh, S. 2008. Novel cellulases from extremophilic filamentous fungi *Penicillium citrium*: Production and characterisation. *Journal of Industrial Microbial Biotechnology* 35: 275-282.
- Dutt, D; Kumar, A. 2014. Optimization of cellulase production under solid-state fermentation by *Aspergillus flavus* (at-2) and *Aspergillus niger* (at-3) and its impact on stickies and ink particle size of sorted office paper. *Cellulose chemistry and technology cellulose, Chem. Technol* 48 (3-4): 285-298.
- Elinbaum, S; Ferreyra, H; Ellenrieder, G; Cuevas, C. 2002. Production of *Aspergillus terreus* alpha-L-rhamnosidase by solid state fermentation. *Lett. Appl. Microbiol* 34:67–71.
- Eriksson, KE; Wood, TM. 1985. Biodegradation of cellulose, p. 469-503. In T. Higuchi (ed.), *Biosynthesis and biodegradation of wood components*. Academic Press, Inc., Orlando, Fla.

- Esen, A. 1993. β -Glucosidases: overview. in β -glucosidases - biochemistry and molecular biology; Esen, A.; Ed.; ACS. Symposium series 533; American Chemical Society, Washington, DC, 1 p.
- Everleigh, DE. 1987. Cellulase: A perspective. Philosophical Transactions of the Royal Society of London 321: 435-447.
- Fenchel, T; King, GM; Blackburn, TH. 2012. Bacterial Biogeochemistry Book 3 ed.
- Fernández, N; Díaz, EE; Amils, R; Sanz, JL. 2008. Analysis of microbial community during biofilm development in an anaerobic wastewater treatment reactor. Microb Ecol 56:121-32.
- Ferro-Luzzi, AG. 1973. Resolution of bacterial proteins by polyacrylamide gel electrophoresis on slabs membrane, soluble, and periplasmic fractions. The Journal of Biological Chemistry 249 (2): 634-644.
- Ferdousi, BM; Absar, N. 2009. Purification and Characterization of Intracellular Cellulase from *Aspergillus oryzae* ITCC-4857.01. Mycobiology 37(2): 121-127.
- Ferreira Filho, EX. 1996. Purification and characterization of a beta-glucosidase from solid-state cultures of *Humicola grisea* var. *Thermoidea*. Can J Microbiol 42(1):1-5
- Filler, S; Sheppard, D. 2006. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. PLOS Pathogens.
- Finkelstein, DB; Rambosek, J; Crawford, MS; Soliday, CL; McAda, PC. 1989. Protein secretion in *Aspergillus niger*. In: Genetics and Molecular biology of industrial microorganisms. (Hershberger CL, Queener SW, Hegeman G, eds) American Society of Microbiology, Washington DC 295–300.
- Fournier, R; Frederick, MM; Frederick, JR; Reilly, PJ. 1985. Purification and characterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger*. III. an enzyme of pI 3.65. Biotechnol Bioeng 27:539–546.
- Frederick; MM; Frederick, JR; Fratzke, AR; Reilly, PJ. 1981. Purification and characterization of a xylobiose-producing and xylose-producing endoxylanase from *Aspergillus niger*. Carbohydr Res 97:87–103.
- Frederick, MM; Kiang, CH; Frederick, JR; Reilly, PJ. 1985. Purification and characterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger*. I. Two isozymes active on xylan backbones near branch-points. Biotechnol Bioeng 27:524–532.

- Furukawa, S; Akiyoshi, Y; O'Toole, GA; Ogihara, H; Morinaga, Y. 2010. Sugar fatty acid esters inhibit biofilm formation by food-borne pathogenic bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 138:176–180.
- Furukawa, S; Nojima, N; Nozaka, S; Hirayama, S; Satoh, A; Ogihara, H; Morinaga, Y. 2012. Mutants of *Lactobacillus plantarum* ML11-11 deficient in co-aggregation with yeast exhibited reduced activities of mixed-species biofilm formation. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 76:326–330.
- Furukawa, S; Hirayama, S; Morinaga, Y. 2014. Co-existence and symbiosis of microorganisms and traditional fermentation. *J. Brew. Soc. Japan* 109: 228–238. Japanese
- Galas, E; Romanowska, I. 1997. Purification and some properties of beta-glucosidase from *Aspergillus niger* IBT-90. *Acta Microbiol Pol* 46(3):241-52.
- Gamarra, MN; Villena, GK; Gutiérrez-Correa, M. 2010. Cellulase production by *Aspergillus niger* in biofilm, solid-state, and submerged fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol* 1 – 7.
- Garfin, D. 2003. Essential cell biology. Gel electrophoresis of proteins. Oxford University Press. Ed. John Dave. Chap 3(1): 197-268.
- García, P. HM. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Laboratorios Beterá. Univ Diag* 1(2):31- 41.
- Gasperini. 1887. *Atti della Societa Toscana di Scienze Naturali* 2: 326. Published by Robert A. Samson, János Varga and Jens C. 2011. Taxonomic studies on the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 69: 1–103.
- Geiser, DM; Klich, MA; Frisvad, JC; Peterson, SW; Varga, J; Samson, RA 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 59: 1–10.
- Geiser, DM. 2009. Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics. *Medical Mycology* 47: S21–S26.
- Ghose, T. 1987. Measurement of cellulolytic activities. *Pure Appl Chem* 59:257–258.
- Ghotora, SK; Chada, BS; Badhan, AK; Saini, HS. 2006. Identification and characterisation of diverse xylanases from thermophilic and thermotolerant fungi. *BioResources* 1: 18-33.
- Gírio, FM; Fonseca, C; Carvalheiro, F; Duarte, LC; Marques, S; Bogel-Lukasik, R. 2010a. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, 101: 4775 - 4800.
- Gómez, R; Schnabel, I; Garrido, J. 1988. Factores que afectan la producción de ácido cítrico en cultivo sumergido por *Aspergillus niger* 110 p.

- Gomes, A. FS; dos Santos, B. SL; Franscison, EG; Baffi, MA. 2016. Efeito da temperatura e do substrato na produção de xilanase por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais de baixo custo. *Biosci. J.*, Uberlândia 32(4): 915-921.
- Gombert, AK; Nielsen, J. 2000. Mathematical modelling of metabolism. *Current Opinion in Biotechnology* 11; 180–186.
- Gorbacheva, IV; Rodionova, NA. 1977. Studies on xylan degrading enzymes. I. purification and characterization of endo-1,4-beta-xylanase from *Aspergillus niger* STR-14. *Biochim Biophys Acta* 484:79–93.
- Götz, F. 2002. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* 43:1367- 78.
- Gouka, RJ; Punt, PJ; van den Hondel, CA. 1997. Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*
- Goulart, AJ; Cano, CE; Monti, R. 2005. Partial purification and properties of cellulase-free alkaline xylanase produced by *Rhizopus stolonifer* in solid - state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology an International Journal* 48 (3): 327-333.
- Gray, KA; Zhao, L; Emptage, M. 2006. Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology* 10: 141-146.
- Gravelat, FN; Ejzykowicz, DE; Chiang, LY; et al. 2010. *Aspergillus fumigatus* MedA governs adherence, host cell interactions and virulence. *Cell Microbiol* 12: 473–488.
- Grimm, LH; Kelly, S; Völkerding, II; Krull, R; Hempel, DC. 2005a. Influence of process parameters on the aggregation of *Aspergillus niger* conidia. *Biotechnol. Bioeng* 92: 879 - 888.
- Grimm, LH; Kelly, S; Krull, R; Hempel, DC. 2005. Morphology and productivity of filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 69: 375–384.
- Guangtao, Z; Hartl, L; Schuster, A; Polak, S; Schmoll, M; Wang, T; Seidl, V; Seiboth, B. 2009. Gene targeting in a nonhomologous end joining deficient *Hypocrea jecorina*. *J. Biotechnol.* 139(2): 146-151.
- Gunata, Z; Vallier, MJ. 1999. Production of a highly glucose-tolerant extracellular β -glucosidase by three *Aspergillus* strains. *Biotechnol. Lett* 21: 219–223.
- Günata, Z; Dugelay, I; Sapis, JC; Baumes, R; Bayonove, C. 1993. Role of enzymes in the use of flavour potential from grape glycosides in winemaking. In: Schreier P, Winterhalter P,

- eds. Progress in flavour precursor studies. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation 219–234 p.
- Gutiérrez-Correa, M; Villena, GK. 2003. Surface adhesión fermentation: a new fermentation category. *Rev Peru Biol* 0: 113 –124.
- Hagemann, T; Ringel, A; Hempel DC; Krull. R. 2007. Changes of *Aspergillus niger* morphology towards shifted pH values. *Biospektrum* 2007, Sonderausgabe, VAAM-Jahrestagung, Osnabrück.
- Harding, MW; Marques, LLR; Howard, RJ; Olson, ME. 2009. Can filamentous fungi form biofilms *Trends Microbiol* 17:475–480.
- Haruta, S; Ueno, S; Egawa, I; Hashiguchi, K; Fujii, A; Nagano, M; Ishii, M; Igarashi, Y. 2006. Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol* 109:79–87.
- Harris, SD; Momany, M. 2004. Polarity in filamentous fungi: moving beyond the yeast paradigm. *Fungal Genetics and Biology* 41: 391–400.
- Harris, H; Hopkinson, DA. 1976. Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics, North-Holland, Amsterdam.
- Hatamoto, O; Sekine, H; Nakano, E; Abe, K. 1999. Cloning and expression of a cDNA encoding the laccase from *Schizophyllum commune*. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 63:58–64.
- Hawksworth, DL. 2011. Naming *Aspergillus* species: progress towards one name for each species. *Medical Mycology* 49: 70–76.
- Hebeish, A; Ibrahim, NA. 2007. The impact of frontier sciences on textile industry. *Colourage* 54:41- 55.
- Heikinheimo, L; Buchert, J; Miettinen-Oinonen, A; Suominen, P. 2000. Treating denim fabrics with *Trichoderma reesei* cellulases. *Textile Research Journal* 70:969-973.
- Henrissat, B; Bairoch, A. 1993. New families classification of glycosyl hydrolases bases amino acid sequence similarietis. *Biochem. J.* 293: 781 – 788.
- Hilden, L; Johansson, G. 2004. Recent developments on cellulases and carbohydrate-binding modules with cellulose affinity. *Biotechnol Lett* 26: 1683-93.
- Holker, U; Hofer, M; Lenz, J. 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid- state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64 (12): 175-186.

- Hong-Ge, C; Xin, Y; Xin-Yu, L; Ming-Dao, W; Hui-Min, H; Xin-Cheng, J; Jin-An, W. 2006. Purification and characterization of novel bifunctional xylanase, XynIII, isolated from *Aspergillus niger* A-25. *J. Microbiol. Biotechnol* 16(7): 1132–1138.
- Hou, Y; Wang, T; Long, H; Zhu, H. 2007. Cloning, sequencing and expression analysis of the first cellulase gene encoding cellobiohydrolase 1 from a cold-adaptive *Penicillium chrysogenum* FS010. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 39: 101-7.
- Ibrahim, NA; El-Badry, KB; Eid, M; Hassan, TM. 2011. A new approach for bio finishing of cellulosecontaining fabrics using acid cellulases. *Carbohydrate Polymers* 83(1):116-121.
- Illingworth, CD; Cook, SD. 1998. Acanthamoeba keratitis. *Survey of Ophthalmology* 42:493-508.
- INSHT (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo). 2012. Notas técnicas de prevención, NTP: 299, 313, 335, 351, 488, 539, 597, 700, 771, 781, 802, 805, 806, 822.
- Iqbal, M; Saeed, A. 2005. Novel method for cell immobilization and its application for production of organic acid. *Lett Appl Microbiol* 40:178–182.
- Iwashita, K; Nagahara, T; Kimura, H; Takano, M; Shimoi, H; Ito, K. 1999. The bglA gene of *Aspergillus kawachii* encodes both extracellular and cell wall-bound β -glucosidases, *Appl. Environ. Microbiol* 65(12): 5546-5553.
- Iwashita, K. 2002. Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. *J. Biosci. Bioeng* 94:530–535.
- Jacobs, DI; Olsthoorn, MM. A; Maillet, I; Akeroyd, M; Breestraat, S; Donkers, S; van der Hoeven, R. AM; et al. 2009. Effective lead selection for improved protein production in *Aspergillus niger* based on integrated genomics. *Fungal Genetics and Biology* 46; 141–152.
- Jayasekara, S; Ratnayake, R. 2019. Cellulose: microbial cellulases: An overview and applications. *Cellulose*. 1 – 21. <https://www.intechopen.com/chapters/66517> .
- Jenkinson, HF; Lappin-Scott, HM. 2001. Biofilms adhere to stay. *Trends Microbiol* 9: 9 - 10.
- Jensen, BG; Anderson, MR; Pedersen, MH; Frisvad, JC; Søndergaard, I. 2010. Hydrophobins from *Aspergillus* species cannot be clearly divided into two classes. *BMC Research Notes* 3: 344.
- Johansson, G; Reczey, K. 1998. Concentration and purification of beta-glucosidase from *Aspergillus niger* by using aqueous two-phase partitioning. *J Chromatogr. B. Biomed Sci. Appl* 711(1-2):161-72.

- Johansson, M. 2006. A comparison between cellulolytic activity of white and brown rot fungi. I. The activity on insoluble cellulose. *Physiol. Plant* 19:709-722.
- Jordan, DB.; Wagschal, K. 2010. Properties and applications of microbial β -D-xylosidases featuring the catalytically efficient enzyme from *Selenomonas ruminantium*. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:1647–58.
- Jorge, BD. 2003. Estudio del metabolismo energético de *Geotrichum klebahnii*. Seminario de Investigación. Departamento de ciencia y tecnología licenciatura en biotecnología. Universidad de Quilmes. Bernal. Argentina 1-51 p.
- Juturu, V; Wu, JC. 2014. Microbial cellulases: engineering, production and applications. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 33: 188–203.
- Juturu, V; Wu, JC. 2012. Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances* 30: 1219-1227.
- Kang, SW; Park, YS; Lee, JS; Hong, SI; Kim, SW. 2004. Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 91: 153-156.
- Kaup, BA; Ehrich, K; Pescheck, M; Schrader, J. 2008. Microparticle enhanced cultivation of filamentous microorganisms: increased chloroperoxidase formation by *Caldariomyces fumago* as an example. *Biotechnol Bioeng* 99: 491–498.
- Kazuhiro, I. 2002. Recent studies of protein secretion by filamentous fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 94: 530-535.
- Keerti; Gupta, A; Kumar, V; Dubey, A; Verma, AK. 2014. Kinetic characterization and effect of immobilized thermostable β -glucosidase in alginate gel beads on sugarcane juice. *ISRN. Biochemistry* 1-8.
- Kelly, JA; Sielecki, AR; Sykes, BD; Philips, DC. 1979. X-ray crystallography of the binding of the bacterial cell wall trisaccharide NAM-NAG-NAM to lysozyme. *Nature* 282: 875 - 878.
- Kershaw, MJ; Wakley, G; Talbot, NJ. 1998. Complementation of the *mpg1* mutant phenotype in *Magnaporthe grisea* reveals functional relationships between fungal hydrophobins. *EMBO J.* 17: 3838-3849.
- Kershaw, MJ; Talbot, NJ. 1998. Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. *Fungal Genet Biol* 23: 18–33.
- Ketudat, JR; Esen, A. 2010. β -Glucosidases, *Cell. Mol. Life Sci* 37: 3389-3405

- Kheng, PP.; Omar, IC. 2005. Xylanase production by a local fungal isolate, *Aspergillus niger* USM A11 via solid state fermentation using palm kernel cake (PKC) as substrate. *Songklanakarin J. Sci. Technol* 27: 325-336.
- Ki-Sun, K; Jaehoon, L; Hyung, GK; Yung, CH. 1994. Detection of 3-glucosidase activity in polyacrylamide gels with esculin as substrate. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (12): 4584-4586.
- Knob, A; Terrasan, CR; Carmona, EC. 2010. β - xylosidase from filamentous fungi: an overview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26 (3): 389 – 407
- Kohli, U; Nigam, P; Singh, D; Chaudhary, K. 2001. Thermostable, alkalophilic and cellulase free xylanase production by *Thermoactinomyces thalophilus* subgroup C. *Enzyme Microb Technol* 28(7–8):606–610.
- Kozak, M. 1989. Published by Robert A. Samson, János Varga and Jens C. 2011. Taxonomic studies on the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 69: 1–103.
- Krijghsheld, P; Bleichrodt, R; van Veluw, G. J; Wang, F; Müller, WH; Dijksterhuis, J; Wösten, H. AB. 2012. Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 74: 1–29.
- Krisana, A; Rutchadaporn, S; Jarupan, G; Lily, E; Sutipa, T; Kanyawim, K. 2005. Endo-1,4- β -xylanase from *Aspergillus cf. niger* BCC14405 isolated in Thailand: purification, characterization and gene isolation. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 38 (1): 17-23.
- Krisch, J; Tako, M; Papp, T; Vagvölgyi, C. 2010. Characteristics and potential use of β -glucosidases from zygomycetes. in current research, technology and education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology; Mendez- Vilas, A.; Ed.; FORMATEX Research Centre: Badajoz, Spain
- Krishna, C. 2005. Solid-state fermentation systems—an overview. *Crit Rev Biotechnol* 25: 1–30.7
- Kulkarni, N; Shendye, A; Rao, M. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* 23: 411-456.
- Kumar, CG; Anand, SK. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J Food Microbiol* 42: 9 - 27.
- Kumar, D; Sangwan, P; Singh, D. 2014. Global scenario of industrial enzyme market. DOI: 10.13140/2.1.3599.0083.

- Kumar, V; Khokhar, D; Sangwan, P; Agrawal, S. 2012a. Role of phytate and phytase in human health. *Indian Farmers Digest* 45(5): 42-44
- Kumar, PA; Rani, SR; Pandey, A., 2017. Production, purification, and application of microbial enzymes. *Biotechnology of Microbial Enzymes* 13 – 41.
- Kumar, R.; Mago, G.; Balan, V.; Wyman, CE. 2009. Physical and chemical characterization of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. *BioresourTechnol* 100:3948–3962.
- Kumar, R; Wyman, CE. 2009. Effect of xylanase supplementation of cellulase on digestion of corn stover solids prepared by leading pre-treatment technologies. *Bioresource Technolog*, 100: 4203-4213.
- Kwon-Chung, KJ; Bennett, Jhon. 1992. *Medical Micology*. Filadelfia-London: Lea & Febiger 223-234 p.
- Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lamed, R; Bayer, EA. 1988. The cellulosome concept: Exocellular enzyme reactor centers for efficient binding and cellulolysis, pp. 101-116. In J. P. Aubert, P. Beguin, and J. Millet (eds.), *Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*. Academic Press, London.
- Larralde-Corona, CP; López-Isunza, F; Viniegra-González, G. 1997. Morphometric evaluation of the specific growth rate of *Aspergillus niger* grown in agar plates at high glucose levels. *Biotechnology and Bioengineering* 56: 287-294.
- Lazova; Stemier, A. 2008. A 160 kDa protein with carbonic anhydrase activity is complexed with rubisco on the outer surface of thylakoids. *Cell Biology International* 32(6):646-53.
- Leber, TM; Balkwill, FR. 1997. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Anal Biochem* 249:24–28.
- Lecleric, M; Arnaud, A; Ratomahenina, R; Galaxy, P. 1987. Yeast β -Glucosidases. *Biotechnology & Genetic Engineering. Reviews* 5: 269.
- Leeuwen, MR. van; Krijgheld, P; Bleichrodt, R; Menke, H; Stam, H; Stark, J; Wösten, HAB; Dijksterhuis, J. 2013. Germination of conidia of *Aspergillus niger* companied by major changes in RNA profiles *Studies in Mycology* 74.

- Leite, B; Ishida, ML; Alves, E; Carrer, H; Pascholati, SF; Kitajima, EW. 2002. Genomics and X-ray microanalysis indicates that Ca²⁺ and thiols mediate the aggregation and adhesion of *X. fastidiosa*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 35: 645-650.
- Lewis, MJ. 2001. Biochemistry fermentation. Brewing© Aspen Publishers, Inc. Cap. 18: 319 – 320.
- Lin, LL; Thomson, JA. 1991. An analysis of the extracellular xylanases and cellulases of *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c. FEMS Microbiol. Lett 84: 197-204.
- Lin, PJ; Hagemann, T; Stintzing, A; Appel, C; Hempel, DC; Krull, R. 2008. Effect of agitation and aeration on pelleted morphology and product formation of filamentous microorganisms. European Bioprocesses, Hanover, Germany.
- Linares - Pasten, JA; Aronsson, A; Karlsson, EN. 2018. Structural considerations on the use of endo-xylanases for the production of prebiotic xylooligosaccharides from biomass. Curr. Protein Pept. Sci 19: 48 – 67.
- Linder, MB; Szilvay, GR; Nakari-Setälä, T; Penttilä, ME. 2005a. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. FEMS Microbiol Rev 29: 877–896.
- Littlejohn, KA; Hooley, P; Coxa, PW. 2012. Bioinformatics predicts diverse *Aspergillus* hydrophobins with novel properties. Food hydrocolloids 27: 503 – 516.
- Liu, G; Zhang, L; Qin, Y; Zou, G; Li, Z; Yan, X et al., 2013a. Long-term strain improvements accumulate mutations in regulatory elements responsible for hyper-production of cellulolytic enzymes. Sci. Rep 3: 1569.
- Liu, W; Fan, AW; Huang, XM. 2006. Heat transfer qualitative theory and application of porous media. Beijing: Science Press.
- Lord, KM; Read, ND. 2011. Perithecial morphogenesis in *Sordaria macrospora*. Fungal Genet Biol 48: 388–399.
- Luedeking, R; Piret, EL. 1959. A kinetic study of the lactic acid fermentation batch process at controlled pH. J Biochem Microbiol Tech Eng 1:393–412
- Loussert, C; Schmitt, C; Prevost, MC, et al. 2010. In vivo biofilm composition of *Aspergillus fumigatus*. Cell Microbiol 12: 405 – 410.
- Lowry, OH; Rosebrough, NJ; Farr, AL; Randall, RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265–275

- Mai, C; Kues, U; Militz, H. 2004. "Biotechnology in the wood industry," *Applied Microbiology and Biotechnology* 63 (5): 477–494.
- Maciel, GM; Vandenberghe, LP; Fendrich, RC; Bianca, B. ED; Brandalize, T. QS; Pandey, A; Soccol, RC. 2008. Xylanase production by *Aspergillus niger* LPB 326 in solid-state fermentation using experimental design. *Food Technology and Biotechnology* 46:181-187.
- Maldonado, MC; Strasser de Saad, AM. 1998. Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol* 20: 34–38.
- Mandels, M. 1985. Applications of cellulases. *Biochemical Society Translations* 13: 414 - 415.
- Maragkoudakis, PA; Mountzouris, KC; Psyrras, D; Cremonese, S; Fischer, J; Cantor, MD; Tsakalidou, E. 2009. Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology* 130: 219-226.
- Martínez, D; Berka, RM; Henrissat, B; Saloheimo, M; Arvas, M; Baker, SE et al. 2008. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat. Biotechnol* 26(5): 553-560.
- Martino, A; Schiraldi, C; di Iazaro, A; Fume, I; Spagna, G; Piffers, PG; De Rosa, M. 2000. Improvement of the flavor of falanghina white wine using a purified glucosidase preparation from *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry* 36: 93.
- Maryan, AS; Montazer, MA. 2013. Cleaner production of denim garment using one step treatment with amylase/cellulase/laccase. *Journal of Cleaner Production* 57: 320-326.
- Marzoa, FJ. 2010. Complejos proteicos de membrana externa de *Neisseria meningitidis*: análisis estructural y capacidad antigénica. Tesis para optar el grado de doctor en Biología. Universidad de Compostela, España. 203 p.
- Mathew, GM; Sukumaran, RK; Singhanian, RR; Ashok, P. 2008. Progress in research on fungal cellulase for lignocellulose degradation. *Journal of Scientific and Industrial Research* 67: 898-907.
- Matsukawa, R; Hayakawa, M; Araya, M; Imamura, T; Takiguchi, H. 1994. *Int. J. Biochem* 26: 287–293.

- Mawadza, C; Rahni, H; Zvauya, R; Bo, M. 2000. "Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains." *J. Biotechnol* 83:177 - 187.
- Mazaheri, D; Shojaosadati, SA. 2013. Mathematical models for microbial kinetics in solid – state fermentation. *Iranian journal of Biotechnology* 11(3): 156 – 67.
- Mazutti, MA; Zobot, G; Boni, G; Skovronski, A; de Oliveira, D; Di Luccio, M; et al. 2010. Mathematical modeling of *Kluyveromyces marxianus* growth in solid-state fermentation using a packed-bed bioreactor. *J Ind Microbiol Biotechnol* 37(4):391-400.
- McDougald, D; Rice, SA; Barraud, N; Steinberg, PD; Kjelleberg, S. 2012. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol* 10:39 - 50.
- McMullan, G; Meehan, C; Connely, M. 2001. Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56 (1,2): 81-87.
- Medina, VOJ; Moreno, BLM. 2007. Microestructura de harinas tratadas con glucosa oxidasa y amiloglucosidasa. *BISTUA* 5(2): 106 -115.
- Meijer, M; Houbraken, MP, JA; Dalhuijsen, S; Samson, RA; de Vries, RP. 2011. Growth and hydrolase profiles can be used as characteristics to distinguish *Aspergillus niger* and other black *Aspergilli*. *Studies in Mycology* 69; 19–30.
- Membrillo, I; Sánchez, C; Meneses, M; et al. 2011. Particle geometry affects differentially substrate composition and enzyme profiles by *Pleurotus ostreatus* growing on sugar cane bagasse. *Bioresour Technol* 102:1581–6.
- Mendez, C; Salas, JA. 2001. Altering the glycosylation pattern of bioactive compounds. *Trends in Biotechnology* 19: 449–456.
- Metz, B; Kossen, NW. 1977. The growth of molds in the form of pellets a literature review. *Biotechnol. Bioeng* 14: 781 - 799.
- Meyer, V; Wu, B; Ram, AFJ. 2011. *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives. *Biotechnology Letters* 33: 469–476.
- Miller, GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem* 31: 426 – 428.
- Min-Jen, T.; Mee-Nagan, Y.; Khanok, R.; Khin, LK.; Shui-Tein, Ch. 2002. Purification and characterization of two cellulase free xylanases from an alkaliphilic *Bacillus firmus*. *Enzyme and Microbial Technology* 30: 590–595

- Miskin, A; Edberg, S. 1978. Esculin hydrolysis reaction by *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol* 7: 251,
- Mishra, C; Keskar, S; Rao, M. 1984. Production and properties of extracellular endoxylanases from *Neurospora crassa*. *Appl. Environ. Microbiol* 48: 224 - 228.
- Mojsov, K. 2011. Application of enzymes in the textile industry: A review In: Proceedings of the II international congress on engineering, ecology and materials in the processing industry, cellulose 20 jahorina, University of East Sarajevo Faculty of Technology, Zvornik, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina.
- Momany, M. 2002. Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. *Current Opinion in Microbiology* 5: 580–585.
- Morgan, NK; Wallace, A; Bedford, MR. and Choct, MG. 2017. Efficiency of xylanases from families 10 and 11 in production of xylooligosaccharides from wheat arabinoxylans. *Carbohydr. Polym* 167: 290–296.
- Moran-Aguilar, MG; Costa-Trigo, I; Calderon-Santoyo, M; Domínguez, JM; Aguilar-Uscanga, MG. 2021. Production of cellulases and xylanases in solid-state fermentation by different strains of *Aspergillus niger* using sugarcane bagasse and brewery spent grain. *Biochemical Engineering Journal* 172: 1 – 11.
- Moslem, MA.; Mashraqi, A.; Abd-Elsalam, KA.; Bahkali, AH. y Elnagaer, MA. 2010. Molecular detection of ochratoxigenic *Aspergillus* species isolated from coffee beans in Saudi Arabia. *Genetics and Molecular Research*, 9(4): 2292–2299.
- Motilva, SC; Blanca Mañas, PB. 2014. Estudios sobre las hidrofobinas de clase II. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza.
- Motta, V; Angelici, L; Nordio, F; Bollati, V; Fossati, S; Frascati, F et al. 2013. Integrative analysis of mi RNA and inflammatory gene expression after acute particulate matter exposure. *Toxicol. Sci.* 132: 307–316.
- Moure, A; Gullón, P; Domínguez, H; Parajó, JC. 2006. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochemistry* 41(9): 1913-1923.

- Mowat, E; Butcher, J; Lang, S; Williams, C; Ramage, G. 2007. Development of a simple model for studying the effects of antifungal agents on multicellular communities of *Aspergillus fumigatus*. J Med Microbiol 56: 1205–1212.
- Mowat, E; Williams, C; Jones, B; McChlery, S; Ramage, G. 2008. The characteristics of *Aspergillus fumigatus* mycetoma development: is this a biofilm. Med Mycol 47 (1):1–7.
- Murugan, S; Arnold, D; Pongiya, UD; Narayanan, PM. 2011. Production of xylanase from *Arthrobacter* sp. MTCC 6915 using saw dust as substrate under solid state fermentation. Enzyme Research 1-7.
- Muthezhilan, R; Ashok, R; Jayalakshmi, S. 2007. Production and optimization of thermostable alkaline by *Penicillium oxalicum* in solid state fermentation. African Journal of Microbiology 020-028.
- Nair, SG; Sindhu, RS. 2008. Fungal xylanase production under solid state and submerged fermentation conditions. African Journal of Microbiology 2:82-86.
- Nakahara, T; Sano, A; Yamaguchi, H; Sugimoto, K; Chilkata, H; Kinoshita, E; Uchida, R. 2010. Antihypertensive effect of peptide-enriched soy sauce-like seasoning and identification of its angiotensin converting enzyme inhibitory activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58: 821-827.
- Nazir, A; Soni, R; Saini, HS; Kaur, A; Chadha, BS. 2010. Profiling differential expression of cellulases and metabolite footprints in *Aspergillus terreus*. Appl. Biochem. Biotechnol 162: 538–547.
- Ncube, T. 2013. Development of a fungal cellulolytic enzyme combination for use in bioethanol production using *hyparrhenia spp* as a source of fermentable sugars. Thesis for the degree of Doctor of Philosophy in Microbiology. University of Limpopo 200p.
- Ndou, SP; Kiarie, E; Agyekum, AK; Heo, JM; Romero, LF; Arent, S; et al. 2015. Comparative efficacy of xylanases on growth performance and digestibility in growing pigs fed wheat and wheat bran or corn and corn DDGSbased diets supplemented with phytase. Anim. Feed Sci. Tech 209: 230–239.
- Nidtzky, B.; Steiner, W. 1993. A new approach for modeling cellulase -cellulose adsorption and the kinetics of the enzymatic hidrolysis of microcrystalline cellulose, Biotechnology Bioengineering 42. 469 – 479.

- Nieto - Domínguez, M; de Eugenio, LI; York-Durán, MJ; Rodríguez-Colinas, B; Plou, FJ; Chenoll, E; et al. 2017. Prebiotic effect of xylooligosaccharides produced from birchwood xylan by a novel fungal GH11 xylanase. *Food Chem* 232: 105–113.
- Nobe, R.; Sakakibara, Y.; Fukuda, N.; Yohida, N.; Ogawa, K. and Suiko, M. 2003. Purification and characterization of Laminaran hidrolasas de *Trichoderma viridae*. *Biosci.Biotechnol. Biochem* 67(6), 1349 – 1357.
- Nordberg - Karlsson, E; Schmitz, E; Linares-Pastén, JA and Adlercreutz, P. 2018. Endo-xylanases as tools for production of substituted xylooligosaccharides with prebiotic properties. *Appl.Microbiol. Biotechnol* 102: 9081–9088.
- Oda, K; Kakizono, D; Yamada, O; Lefuji, H; Akita, O; Iwashita, K. 2006. Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (5): 3448–3457.
- Odoni, DI; van Gaal, MP; Schonewille, T; Tamayo-Ramos, JA; Vitor A. P. Martins dos Santos 1, 3, Suarez-Diez, M; y Schaap, PJ. 2017. *Aspergillus niger* secretes citrate to increase iron bioavailability. *Frontier in microbiology* 8: 1 -13.
- Ogawa, K. 1989. Fractionation and purification of cellulases from *Trichoderma viride*. *Bull. Fac. Agr. Myazaki Univ* 36: 271-280.
- Olama, ZA; Hamza, MA; El-Sayed, MM; Abdel-Fattah, M. 1993. Purification, properties and factors affecting the activity of *Trichoderma viride* cellulase. *Food Chem* 47:221- 226.
- Ooijkaas, LP; Weber, FJ; Buitelaar, RM; Tramper, J; Rinzema, A. 2000. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems. *Trends Biotechnol* 18:356–360.
- Osharov, N; May, GS. 2001. The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiology Letters* 199: 153–160
- O’Toole, G; Kaplay, HB; Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54:49–79.
- Paës, G; Berrin, JG; Beaugrand, J. 2012. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. *Biotechnology Advances* 30: 564 - 592.
- Palmeri, R; Spagna, G. 2007. β -glucosidase in celular and acellular form for winemaking application. *Enzyme Microb Technol* 40: 382-9.
- Pandey, A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13: 81–84

- Pandey, A; Soccol, RC; Larroche, C. 2007. General and fundamentals aspect SSF. Current development Solid – state fermentation. Springer 1 - 468.
- Pandey, A; Selvakumar, P; Soccol, CR; Nigam, P. 1999. Solid state fermentation for production of Industrail enzymes. Current Science 77: 149-162
- Pandey, A; Soccol, CR; Mitchell, DA. 2000. New developments in solid-state fermentation. I. Bioprocesses and products, Process Biochem. 35 (10): 1153–1169.
- Pansuriya, RC; Singhal, RS. 2010. Response surface methodology for optimization of production of lovastatin by solid state fermentation. Brazilian Journal of Microbiology 41: 164-172.
- Papagianni, M. 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. Biotechnol Adv 22:189–259.
- Papagianni, M; Joshi, N; Moo-Young, M. 2002. Comparative studies on extracellular protease secretion and glucoamylase production by free and immobilized *Aspergillus niger* cultures. J. Ind. Microbiol. Biotechnol 29: 259–263.
- Papagianni, M; Matthey, M. 2004. Physiological aspects of free and immobilized *Aspergillus niger* cultures producing citric acid under various glucose concentrations. Proc Biochem 39:1963–1970
- Papagianni, M. 2007. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. Biotechnology Advances 25 p.
- Pastor, FI; Gallardo, O; Sanz, AJ; Pilar, D. 2007. Xylanases: molecular properties and applications. J. Polaina and A.P. MacCabe (eds.), Industrial Enzymes, 65–82
- Paudel, HK; Carlson, GM. 1988. Arch. Biochem. Bio-phys 264: 641– 646
- Pedrós, MB. 2003. Clonación y caracterización de una hidrofobina de clase II (CaHPB) de *Candida albica*. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. España 1 – 178.
- Peiz, N; Gielkens, MM. C; Veries, RP; Visser, J; Graaff, LH. 1998. The transcriptional activator XlnR regulates both xylanolytic and endoglucanase gene expression in *Aspergillus niger*. Appl. Environ. Microbiol 64: 3615-3619.
- Pel, HJ; de Winde, JH; Archer, DB; Dyer, PS; Hofmann, G; Schaap, PJ et al., 2007. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88 Nature biotechnology 25: 221–231.
- Pérez, A; Ramage, G; Blanes, R; Murgui, A; Casanova, M; Martinez, JP. 2011. Some biological features of *Candida albicans* mutants for genes coding fungal proteins.

- Pérez-Guerra, N; Torrado-Agrasar, AC; López, M; Pastrana, L. 2003. Main characteristics and applications of solid state fermentations. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 2 (3): 343-350.
- Peterson, R; Nevalainen, H. 2012. *Trichoderma reesei* RUT-C30-thirty years of strain improvement. *Microbiology* 158(1): 58-68.
- Pey – Jin, L; Krull. 2009. Influence of the volumetric power input on morphology and productivity of *Aspergillus niger* <https://www.researchgate.net/publication/268427977>.
- Pirt, SJ. 1975. Principles of microbe and cell cultivation. John Pirt (ed.) Blackwell Scientific Publications.
- Poetsch, A; Neff, D; Seelert, H; Schagger, H; Dencher, NA. 2000. Dye removal, catalytic activity and 2D crystallization of chloroplast H(p)-ATP synthase purified by blue native electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 1466(1–2): 339–49.
- Polizeli, ML TM; Rizzatti, ACS; Monti, R; Trrenzi, HF; Jorge, JA; Amorim, DS. 2005b. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67: 577-591.
- Prabhu, AA; Jayadeep, A. 2015. Enzymatic processing of pigmented and non pigmented rice bran on changes in oryzanol, polyphenols and antioxidant activity. *J. Food Sci. Technol.* 52, 6538–6546.
- Prasad, S; Singh, A; Joshi, HC. 2007. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources, Conservation and Recycling* 50: 1-39.
- Pritchard, SR; Phillips, M; Kailasapathy, K. 2010. Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food Research Journal* 43: 1545-1548.
- Punt, PJ; et al. 2002. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnol* 20: 200–206.
- Qureshi, N; Annous, BA; Ezeji, TC; Karcher, P; Maddox, IS. 2005. Biofilm reactors for industrial bioconversion processes: employing potential of enhanced reaction rates. *Microb Cell Fact* 4:24.
- Rahaldjo, Y. 2005. Fungal mats in solid-state fermentation. Tesis Doctoral, Universidad de Wageningen, Holanda.

- Raj, HG; Saxena, M; Allameh, A. 1992. Metabolism of foreign compounds by fungi. In Handbook of Applied Mycology vol. 4: Fungal Biotechnology (ed. Arora, D.K., Elander, R.P. & Mukerji, K.G.) 881– 904.
- Ramage, G; Mowat, E; Jones, B; Williams, C; Lopez-Ribot, J. 2009. Our current understanding of fungal biofilms. *Crit Rev Microbiol* 35:340–355.
- Ramage, G; Rajendran, R; Gutierrez- Correa, M; Jones, B; Williams, C. 2011. *Aspergillus* biofilms: clinical and industrial significance. *FEMS Microbiol Lett* 324: 89 – 97.
- Raper, KB; Fennell, DI. 1965. The genus *Aspergillus*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Rashid, MH; Siddiqui, KS. 1997. Purification and characterization of a beta-glucosidase from *Aspergillus niger*. *Folia Microbiol (Praha)* 42(6): 544-50.
- Ratanachomsri, U; Spriprang, R; Sornlek, W; Buaban, VC; Tanapongpipat, S; Eurwilaichitr, L. 2002. Thermostable xylanase from *Marismus sp*: Purification and characterisation. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 39: 105-110.
- Reilly, PJ. 1981. Xylanases: structure and function. *Basic Life Sci.* 18:111-129.
- Reyes – Ocampo, I. 2006. Difusión y crecimiento microbiano de *Aspergillus niger* sobre un medio sólido. Tesis de maestría en ciencias en ingeniería química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.
- Reyes - Ocampo, I; González-Brambila, M; López-Isunza, F. 2013. An analysis of the metabolism of *Aspergillus niger* growing over a solid substrate. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12 (1): 41-56.
- Richardson, BJ; Baverstock, PR; Adams, M; 1986. Allo- zyme Electrophoresis: A handbook for animal systematics and population studies, Academic Press, Sydney.
- Rina, RS. 2011. Beta - Glucosidase from *Aspergillus niger* NII 08121- Molecular characterization and applications in bioethanol production. Thesis for the award of the degree of Doctor of Philosophy Biotechnology. Faculty of Science of the University of Science and Technology.
- Riou, C; Salmon, JM; Vallier, MJ; Gunata, Z; Barre, P. 1998. Purification, characterization, and substrate specificity of a Novel Highly Glucose-Tolerant β -Glucosidase from *Aspergillus oryzae*, *Appl. Environ. Microbiol* 64: 3607–3614.

- Riseh, NS; Ghadamyari, M; Motamediniya, B. 2012. Biochemical characterisation of α - and β -glucosidases and α - and β -galactosidases from red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Col.: Curculionide). *Plant Protect. Sci* 48 (2): 85–93.
- Robison, PD. 1984. Cellulase and xylanase production by *Trichoderma reesei* RUT C-30. *Biotechnol. Letters* 6: 119-122.
- Roitner, M; Schalkhammer, T; Pittner, F. 1984. Characterization of naringinase from *Aspergillus niger*. *Monatshe fur. Chemie* 115: 1255.
- Ruijter, JG; Kubicek, CP; Visser, J. 2002. Production of organic acids by fungi in the mycota. *Industrial Applications* (ed. Osiewacz, H.D.) 213–230.
- Ruiz-Sanchez, J; Flores-Bustamante, ZR; Dendooven, L; Favela-Torres, E; Soca-Chafre, G; Galindez-Mayer, J; Flores-Cotera, LB. 2010. A comparative study of taxol production in liquid and solid state fermentation with *Nigrospora sp.*, a fungus isolated from *taxus globosa*. *Journal of Applied Microbiology* 109: 2144- 2150.
- Sakon, J; Irwin, D; Wilson, DB; Karplus, PA. 1997. Structure and mechanism of endo/exocellulase E4 from *Thermomonospora fusca*. *Nat.Struct. Mol. Biol* 4: 810-818.
- Samson, RA; Varga, J. 2009. What is a species in *Aspergillus*. *Medical Mycology* 47: 13–20.
- Sánchez, C. 2009. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol. Adv* 27: 185–194.
- Sarrouh, B; Santos, TM; Miyoshi, A; Dias, R; Azevedo, V. 2012. Up-To - Date Insight on Industrial Enzymes: Applications and Global market. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques* <https://www.researchgate.net/publication/25982171>
- Schagger, H; Cramer, WA; von Jagow, G. 1994. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem* 217(2): 220–30.
- Scholtmeijer, K; Janssen, MI; van Leeuwen, M. BM; van Kooten, TG; Hektor, H; Wosten, H. AB. 2004. The use of hydrophobins to functionalize surfaces. *Bio - Medical Materials and Engineering* 14(4): 447- 454.
- Scholtmeijer, K; Wessels, JG; Woster, HA. 2001. Fungal hydrophobins in medical and technical applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 56: 1–8.

- Schuren, FH; Wessels, JG. 1990. Two genes specifically expressed in fruiting dikaryons of *Schizophyllum commune*: homologies with a gene not regulated by mating type genes. *Gene* **90**:199-205.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J., and Van Dijck, P. 2002. On the safety of *Aspergillus niger*. A review. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 59: 426–435.
- Schwarz, WH; Bronnenmeier, K; Grabnitz, F; Staudenbauer, WL. 1987. *Anal. Biochem.* 164: 72.
- Seidler, MJ; Salvenmoser, S; Müller, F. MC. 2008. *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* 52:4130–4136.
- Selig, MJ; Knoshaug, EP; Adney, WS; Himmel, ME; Decker, SR. 2008. Synergistic enhancement of cellobiohydrolase performance on pretreated corn stover by addition of xylanase and esterase activities. *Biores. Technol.* 99: 4997–5005.
- Shah, SR. 2013. Chemistry and applications of cellulase in textile wet processing. *Research Journal of Engineering Sciences* 2: 1-5.
- Shallom, D; Shoham, Y. 2003. Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology* 6: 219-228.
- Sharma, A; Tewari, R; Rana, SS; Soni, R; Soni, SK. 2016. Cellulases: Classification, methods of determination and industrial applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 8: 179
- Shaw, BD; Carroll, GC; Hoch, HC. 2006. Generality of the prerequisite of conidium attachment to a hydrophobic substratum as a signal for germination among *Phyllosticta* species. *Mycologia* 98: 186–194.
- Shaw, CR. 1964. The use of genetic variation in the analysis of isozyme structure, *Brookhaven Symp. Biol* 17: 117.
- Shei, JC; Fratzke, AR; Frederick, MM; Frederick, JR; Reilly, PJ. 1985. Purification and characterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger*. II. An enzyme of pI 4.5. *Biotechnol Bioeng* 27:533–538.
- Shikata, S; Nisizawa, K. 1975. Purification and properties of an exo-cellulase component of novel type from *Trichoderma viride*. *J. Biochem.* 78:499-512.
- Simpson, AJ; Reinach, FC; Arruda, P; Abreu, FA; Acencio, M; Alvarenga, R *et al.* 2000. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature* 406: 151-159.

- Sindhu, R; Binod, P; Pandey, A. 2016. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass - An overview. *Bio Resource Technology* 199:76-82.
- Singh, A; Kuhad, RC; Ward, OP. 2017. "Industrial application of microbial cellulases," in lignocellulose biotechnology: future prospects, R. C. Kuhad and A. Singh, ed. I. K. International Publishing House, New Delhi, India 345 – 358 p.
- Singhania, RR; Patel, AK; Soccol, CR; Pandey, A. 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 44: 13-18.
- Singhania, RR; Sukumarana, RK; Patel, AK; Larroche, Ch; Pandeya, A. 2010. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*. 46, 541–549.
- Sinnot, ML. 1990. Catalytic mechanisms of enzymic glucosyl transfer. *Chem. Rev* 90: 1171- 1202.
- Skowronek, M; Fiedurek, J. 2006. Inulinase biosynthesis using immobilized mycelium of *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb Technol* 38:162–167.
- Sreenath, HK; Shah, AB; Yang, VW; Gharia, MM; Jeffries, TW. 1996. Enzymatic polishing of jute/cotton blended fabrics. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 81:18-20.
- Stanier, RY; Ingram, JL; Wheelis, ML; Painter, PR. 1987. In the microbial world, 5 ed. Macmillan Education, London.
- Statista: The Statistics Portal. 2018. Market statistics of paper industry. Available from: <https://www.statista.com/topics/1701/paper-industry/>[Accessed: Nov 2, 2018]
- Steiger, MG; Vitikainen, M; Usko nen, P; Brunner, K; Adam, G; Pakula, T et al. 2011. Transformation system for *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) that favors homologous integration and employs reusable bidirectionally selectable markers. *Appl. Environ. Microbiol* 77(1): 114-121.
- Stintzing. A; Pilz, R; Hempel, DC; Krull, R. 2008. Mechanische Beanspruchungen in Mehrphasenreaktoren. *Chem. Ing. Tech.* 80 p.
- Stutzenberger, FJ; Bodine, AB. 1992. Xylanase production by *Thermomonospora curvata*. *Journal of Applied Bacteriology* 72: 504-511.
- Sue, M; Yamazaki, K; Yajima, S; Nomura, T; Matsukawa, T; Iwamura, H; Miyamoto; T. 2006. Molecular and structural characterization of hexameric β -D-glucosidases. *Wheat and Rye Plant Physiology* 141: 1237-1247.

- Sukharnikov, LO; Cantwell, BJ; Podar, M; Zhulin, IB. 2011. Cellulases: ambiguous nonhomologous enzymes in a genomic perspective. *Trends in Biotechnology* 29: 473-479.
- Sukumaran, RK; Singhanian, RR; Ashok, P. 2005. Microbial cellulases- Production, applications and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research* 64 (11): 832-844.
- Sultana, S. 1997. Isolation of cellulolytic microorganism and their activities. M. Phil. Thesis. Biochemistry Department, Rajshahi. Univ. Bangladesh.
- Sun, J; Lu, X; Rinas, U; Zeng, AP. 2007. Metabolic peculiarities of *Aspergillus niger* disclosed by comparative metabolic genomics. *Genome Biol* 8: 182.
- Tafalo Riveiro, PA; Queirós Barbosa R; Delerue-Matos, CM; Sales Ferreira, MG. 2010. Control and comparison of the antioxidant capacity of beers. *Food Research Journal* 43: 1702-1709.
- Takahashi, Y; Kawabata, H; Murakami, Sh. 2013. Analysis of functional xylanases in xylan degradation by *Aspergillus niger* E-1 and characterization of the GH family 10 xylanase XynVII. *SpringerPlus* 2 (1): 447.
- Takai, S; Hiratsuka, Y; Krywienczyk, J; Richards, WC; Davies, YP. 1980. Evidence for the presence of the toxin cerato-ulmin in the synnema head fluid of *Ceratocystis ulmi*. *Can. J. Bot* 58: 669-675.
- Talabardon, M; Yang, ST. 2005. Production of GFP and glucoamylase by recombinant *Aspergillus niger*: effects of fermentation conditions on fungal morphology and protein secretion. *Biotechnol Prog* 21:1389–1400.
- Tamime, AY; Robinson's, RK. 2007. Biochemistry of fermentation. *Yoghurt science and technology*. Woodhead publishing series in food science, Technology and Nutrition. 3 ed. 535-607.
- TTM (Tappi Test Methods) 2007. Standard methods for pulp and paper, technical association of pulp and paper ind, Tappi Press, Technology Park, P.O. box 105113, Atlanta, GA-330348-5113, USA.
- Téllez – Jurado, A; Arana-Cuenca, A; González-Becerra, AE; Viniestra-González, G; Loera, O. 2006. Expression of a heterologous laccase by *Aspergillus niger* culture by solid-state and submerged fermentations. *Enzyme Microb Technol* 38: 665–669.
- Tengerdy, RP; Szakacs, G. 2003. Bioconversion of lignocellulose in solid substrate fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13: 169-179.

- Thomas, L; Sindhu, R; Binod, P; Pandey, A. 2015. Production of an alkaline xylanase from recombinant *Kluyveromyces lactis* (KY1) by submerged fermentation and its application in bio-bleaching. *Biochem. Eng. J.* 102: 24–30.
- Thomson, JA. 1993. Molecular biology of xylan degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 104: 65 - 82.
- Todorov, D. G.; Yordanova, Z. B. 2012. Biosynthesis, purification and characterization of endoglucanase from xylanase producing strain *Aspergillus niger* B03. *Brazilian Journal of Microbiology* 70-77.
- Tomme, PR; Warren, AJ; Gilkes, NR. 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi, *Adv. Microbiol. Physiol* 37: 1–81.
- Van den hondel, CAMJJ.; Punt, P.J. and Van Gorcom, R.F.M. 1991. Heterologous gene expression in filamentous fungi. In *More Genetic Manipulation of Filamentous Fungi* (J.W. Bennett and L.L. Lasure, Eds). Academic Press, Orlando. 396-428.
- Van Rensburg, P; Pretorius. IS. 2000. Enzymes in winemaking, harnessing natural catalyst for efficient biotransformations – a review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 21: 52-73.
- Varga, J; Frisvad, JC; Samson, RA. 2007b. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Candidi* based on molecular, morphological and physiological data. *Studies in Mycology* 59: 75–88. Published by Robert A. Samson, János Varga and Jens C. 2011. Taxonomic studies on the genus *Aspergillus*. *StudieS in Mycology* 69: 1–103.
- Vasco-Correa, J; Ge, Y; Li, J. 2016. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass. In *biomass fractionation technologies for a lignocellulosic feedstock based biorefinery*. Elsevier Science; Chapter 24: 561-585.
- Vázquez - Garcidueñas, S; Leal-Morales, CA; Herrera-Estrella, A. 1998. Analysis of theb-1,3 - glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *American Society for Microbiology. Applied and Environmental Microbiology* 64 (4): 1442–1446.
- Villena, GK; Gutierrez-Correa, M. 2006. Production of cellulase by *Aspergillus niger* biofilms developed on polyester cloth. *Lett Appl Microbiol* 43: 262–268.
- Villena, GK; Gutierrez-Correa, M. 2007b. Morphological patterns of *Aspergillus niger* biofilms and pellets related to lignocellulolytic enzyme productivities. *Lett Appl Microbiol* 45: 231–237.

- Villena, GK; Fujikawa, T; Tsuyumu, S; Gutierrez-Correa, M. 2010. Structural analysis of biofilms and pellets of *Aspergillus niger* by confocal laser scanning microscopy and cryo scanning electron microscopy. *Bioresour Technol* 101: 1920–1926.
- Villena, GK; Fujikawa, T; Tsuyumu, S; Gutiérrez-Correa, M. 2009a. Differential gene expression of some lignocellulolytic enzymes in *Aspergillus niger* biofilms. *Rev Peru Biol* 15:97–102.
- Villena, GK; Venkatesh, L; Yamazaki, A; Tsuyumu, S; Gutiérrez-Correa, M. 2009b. Initial intracellular proteome profile of *Aspergillus niger* biofilms. *Rev Peru Biol* 16:101–108.
- Villena, GK; Gutiérrez-Correa, M. 2012. Kinetic analysis of *Aspergillus niger* cellulase and xylanase production in biofilm and submerged fermentation. *J. Microbiol. Biotech. Res* 2 (5): 805-814
- Viniegra-González, G; Favela-Torres, E; Aguilar, CN; Romero-Gómez, SJ; Díaz-Godínez, G; Augur, C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid-state over liquid fermentation systems. *Biochem Eng. J.* 13: 157–167.
- Vocadlo, DJ; Davies, GJ. 2008. Mechanistic insights into glycosidase chemistry. *Current Opinion in Chemical Biology* 12: 539-555.
- Waeonukul, R; Kyu, KL; Ratanakhanokchai, K. 2007. Multiple cellulases and xylanases from *Bacillus circulans* B6 during growth on avicel under an aerobic condition. *Thai Journal Biotechnology* 27-32.
- Wang, L; Ridgway, D; Gu, T; Moo-Young, M. 2003. Effects of process parameters on heterologous protein production in *Aspergillus niger* fermentation. *J Chem Technol Biotechnol* 78: 1259–1266
- Watanabe, T; Sato, T; Yoshioka, S; Koshijima, T; Kuwahara, M. 1992. Purification and properties of *Aspergillus niger* beta-glucosidase. *Eur. J. Biochem* 209(2): 651-659.
- Webb, JS; Van der Mei, HC; Nixon, M; et al. 1999. Plasticizers increase adhesion of the detritogenic fungus *Aureobasidium pullulans* to polyvinyl chloride. *Appl Environ Microbiol* 65: 3575–3581.
- Wessels, JG; Ásgeirsdóttir, SA; Birkenkamp, KU; de Vries, OM; Lugones, LG. 1995. Genetic regulation of emergent growth in *Schizophyllum commune*. *Can. J. Bot* 73:237-281.
- Whiteford, J; Spanu, P. 2002. Hydrophobins and the interactions between fungi and plants. *Molecular Plant Pathology* 3(5): 391- 400.

- Willick, GE; Seligy, VL. 1985. Multiplicity in cellulases of *Schizophyllum commune* derivation partly from heterogeneity in transcription and glycosylation, *Eur. J. Biochem* 151: 89-96.
- Wilson, DB. 2009. Cellulases and biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 20: 295- 299.
- Wimpenny, J; Manz, W; Szewzyk, U. 2000. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev* 24:661 – 71.
- Withers, SG. 2001. Mechanisms of glycosyl transferases and hydrolases. *Carbohydr Polym* 44: 325-337.
- Woessner, JF. 1995. Quantification of matrix metalloproteinases in tissue samples. *Methods Enzymol* 248:510–528
- Wolschek, MF; Kubicek, ChP. (1999) Biochemistry of citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. En: *Citric Acid Biotechnology* (B. Kristiansen, M. Matthey y Linden J, ed.), Taylor & Francis, London 11-32 p.
- Wong, KK; Saddler, JN. 1992. Applications of hemicellulases in the food, feed, and pulp and paper industries, In: *Hemicellulose and Hemicellulases* (ed. Coughlen, P.P. and Hazlewood, G.P.), Portland Press, London 127-143 p.
- Wong, KK; Tan, LU; Saddler, JN. 1988. Multiplicity of $\beta - 1, 4$ -xylanase in microorganisms: Functions and applications. *Microbial Reviews* 52: 305-317.
- Wood, TM. 1985. Properties of cellulolytic enzyme systems. *Biochem. Soc. Trans* 13:407-410.
- Wood, TM; McCrae, SI. 1982. Purification and some properties of the extracellular β -glucosidase of the cellulolytic fungus *Trichoderma koningii*. *J Gen Microbiol* 128: 2973–2982.
- Woodward, J; Wiseman, A. 1982. Fungal and other beta –glucosidases: Their properties and applications. *Enzyme Microb. Technol* 4: 73–79
- WBC (Worthington Biochemical Corporation, USA). 2014. Cellulase. Accessed on 2014-07- 03.
- Wosten, HA. 2001. Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annu Rev Microbiol* 55: 625–646.
- Wösten, HA; Schuren, FH; Wessels, JG. 1994 a. Interfacial self assembly of a hydrophobin into an amphipathic membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. *EMBO J.* 13: 5848-5854.
- Wösten, HAB; Van Wetter MA; Lugones, LG; van der Mei, HC; Busscher, HJ; Wessels, JGH. 1999. How a fungus escapes the water to grow into the air. *Current Biology* 9:85–88.
- Wu, Z; Lee, YY. 1997. Inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose by ethanol. *Biotechnology Letters* 19: 977-979.

- Wu, ZQ. 2006. The technology and application of solid state fermentation. Beijing: Chemical Industry. Press.
- Wulff, NA; Carrer H; Pascholati, SF. 2003. Cloning and expression of cellulase XF-818 OF *Xylella fastidiosa* IN *Escherichia Coli*. *Scientia Agricola* 60 (4) 715-721.
- WWF (Worldwildlife) 2018. www.worldwildlife.org/industries/pulp-andpaper (Accessed: Nov 2, 2018)
- Xia, L; Cen, P. 1999. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. *Process Biochemistry* 34: 909 - 912
- Xiao, Z; Gao, P; Qu, Y; Wang, T. 2001. Cellulose-binding domain of endoglucanase III from *Trichoderma reesei* disrupting the structure of cellulose. *Biotechnol Lett* 23: 711-715.
- Xiao-Zhou, Z; Yi-Heng, PZ. 2013. Cellulases: characteristics, sources, production, and applications. *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers*, John Wiley & Sons, Inc.
- Xie, X; Tang, Y. 2007. Efficient Synthesis of Simvastatin by Use of Whole-Cell Biocatalysis. *Applied and Environmental Microbiology* 73(7): 2054-2060.
- Xin, LJ; Li, MC. 1999. Ordinary mycology. Beijing: Higher Education Press.
- Xin, Z; Yinbo, Q; Peiji, G. 1993. Acclimation of ethanol production from paper mill waste fiber by supplementation with β -glucosidase. *Enzyme Microbial Technology* 15, 62.
- Yang, SQ; Yan, QJ; Jiang, ZQ; Li, LT; Tian, HM; Wang, YZ. 2006. High-level of xylanase production by the thermophilic *Paecilomyces thermophila* J18 on wheat straw in solid-state fermentation. *Bioresource Technology* 97: 1794-1800.
- Zambra, C; Moraga, N; Escudey, M. 2011. Heat and mass transfer in unsaturated porous media: moisture effects in compost piles self-heating. *Int J Heat Mass Transf* 54: 2801–10.
- Zeng, YC; Zhang, SZ. 1989. Purification and properties of beta-glucosidase from *Aspergillus phoenicis*. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 29(3): 195 - 9.
- Zhang, J; Xia, W; Liu, P. 2010. Chitosan modification and pharmaceutical/ biomedical applications. *Marine Drugs* 8: 1962-1987.
- Zhang, ZJ; Chen, YZ; Hu, HR; Sang, YZ. 2013. The beatability-aiding effect of *Aspergillus niger* crude cellulase on bleached simao pine Kraft pulp and its mechanism of action. *BioResources* 8: 5861-5870.
- Zhu, BY; Zhao, ZG. 1996. Chemical basis of interface. Beijing: Chemical Industry Press

VIII. ANEXOS

Anexo 1

Publicación:

Cellulase production by *Aspergillus niger* in biofilm, solid-state, and submerged fermentations

Norma N. Gamarra & Gretty K. Villena & Marcel Gutiérrez-Correa

Appl Microbiol Biotechnol

DOI 10.1007/s00253-010-2540-4

Abstract

Cellulase production by *Aspergillus niger* was compared in three different culture systems: biofilm, solidstate, and submerged fermentation. Biofilm and solid-state fermentations were carried out on perlite as inert support, and lactose was used as a carbon source in the three culture systems. In cryo-scanning electron microscopy, biofilm and solid-state cultures gave similar morphological patterns and confirmed that both spore first attachment and hyphal adhered growth are helped by the production of an adhesive extracellular matrix. Biofilm cultures produced higher cellulase activities than those in submerged and solid-state cultures (1768, 1165, and 1174 U l⁻¹, respectively). Although biofilm cultures grew less than the other cultures, they produced significantly higher cellulase yields (370.212, and 217 U g⁻¹ lactose, respectively) and volumetric productivities (24, 16, and 16 U l⁻¹h⁻¹, respectively). Likewise, endoglucanase and xylanase activities were higher in biofilm cultures. Under the conditions tested, it seems that fungal attached growth on perlite may favor better enzyme production. Biofilms are efficient systems for cellulase production and may replace solid-state fermentation. Biofilm fermentation holds promise for further optimization and development. The results of this work reveal that fungal biofilms may be used for the commercial production of cellulase employing the technology developed for submerged fermentation at high cell densities.

Keywords Cellulase, *Aspergillus niger*, Biofilm, Solid-state fermentation, Submerged fermentation

Anexo 2

Para el ajuste entre los datos experimentales y predictados de la producción de biomasa de *A. niger*, producción de celulosa y consumo de sustrato en tres sistemas (FS, FB y FES) de fermentación se ha utilizado el software NLIN PROCEDURE- SAS/STAT®13.1, el cual permite ajustes en modelos de regresión no lineal y permite estimar los parámetros por mínimos cuadrados no lineales o mínimos cuadrados no lineales ponderados. La estimación de los parámetros para el presente estudio se realizó mediante un proceso iterativo que comienza a partir de valores iniciales.

Fermentación sumergida (FS), Fermentación en Biopelículas (FB) y Fermentación en estado sólido (FES)

Anexo 2.1: Parámetros de ajuste y matriz de correlación aproximada de producción de biomasa (Xt) de *A. niger* ATCC 10864 en fermentación sumergida

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence	
x_0	0.1241	0.0402	0.0256	0.2226
x_m	5.2472	0.5168	3.9828	6.5117
$m_{1,m}$	0.0444	0.00556	0.0308	0.0580

Anexo 2.2: Análisis de regresión de la predicción de biomasa (Xt) producida por *A. niger* ATCC 10864 en fermentación sumergida

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	3	37.0815	12.3605	466.44	<.0001
Residual	6	0.1590	0.0265		
Uncorrected Total	9	37.2405			
Corrected Total	8	18.8765			

Anexo 2.3: Predicción de producción de biomasa (X_t) de *Aspergillus niger* ATCC 10864 en fermentación sumergida

Obs	hours	p_t	s_t	x_t	PRED	RES	SRES
1	0	0.00	10.000	0.000	0.12408	-0.12408	-0.78663
2	12	25.50	9.751	0.052	0.20798	-0.15598	-1.01546
3	24	63.75	9.435	0.245	0.34480	-0.09980	-0.67406
4	36	259.19	8.973	0.546	0.56160	-0.01560	-0.10904
5	48	458.81	8.358	0.869	0.88996	-0.02096	-0.14831
6	60	753.53	7.258	1.478	1.35480	0.12320	0.88078
7	72	1164.47	5.501	2.117	1.95359	0.16341	1.28521
8	96	1135.21	4.365	3.080	3.31986	-0.23986	-2.30737
9	120	941.86	2.018	4.469	4.37300	0.09600	2.37899

Anexo 2.4: Parámetros de ajuste y matriz de correlación aproximada de producción de celulasas (P) de *A. niger* ATCC 10864 en fermentación sumergida

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
vp_x	1012.5	93.4669	783.8	1241.2
k	-20.2329	2.4727	-26.2835	-14.1823
pp	64.1917	40.3487	-34.5380	162.9

Anexo 2.5: Análisis de regresión para la predicción de celulasas (P) de *A. niger* ATCC 10864 en fermentación sumergida

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	3	4340488	1446829	128.49	<.0001
Residual	6	41512.3	6918.7		
Uncorrected Total	9	4382000			
Corrected Total	8	1819525			

Anexo 2.6: Predicción de la producción de celulasas (P) de *A. niger* ATCC 10864 en fermentación sumergida

Obs	hours	p_t	s_t	x_t	PRED	RES	SRES
1	0	0.00	10.000	0.000	-23.90	23.902	0.34092
2	12	25.50	9.751	0.052	6.87	18.634	0.26205
3	24	63.75	9.435	0.245	119.29	-55.544	-0.75022
4	36	259.19	8.973	0.546	288.69	-29.503	-0.38533
5	48	458.81	8.358	0.869	461.56	-2.747	-0.03562
6	60	753.53	7.258	1.478	757.83	-4.296	-0.05802
7	72	1164.47	5.501	2.117	1015.98	148.494	2.18327
8	96	1135.21	4.365	3.080	1254.20	-118.994	-1.89591
9	120	941.86	2.018	4.469	921.81	20.054	1.42375

Anexo 2.7: Parámetros de ajuste y matriz de correlación aproximada de producción de biomasa (Xt) de *A. niger* ATCC 10864 en fermentación en biopelículas

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence	
x_0	0.0380	0.00590	0.0235	0.0524
x_m	2.7079	0.0423	2.6043	2.8115
m_{11}	0.0656	0.00274	0.0588	0.0723

Anexo 2.8: Análisis de regresión de la predicción de biomasa (Xt) de *A. niger* ATCC 10864 en fermentación en biopelículas

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	3	17.3829	5.7943	4168.18	<.0001
Residual	6	0.00834	0.00139		
Uncorrected Total	9	17.3912			
Corrected Total	8	8.2123			

Anexo 2.9: Predicción de la producción de biomasa (Xt) de *A. niger* ATCC 10864 en fermentación en biopelículas

Obs	hours	p_t	s_t	$x_{t,t}$	PRED	RES	SRES
1	0	0.00	10.000	0.000	0.03797	-0.037970	-1.03139
2	12	7.32	9.101	0.023	0.08201	-0.059014	-1.64315
3	24	169.31	8.924	0.174	0.17382	0.000179	0.00528
4	36	394.01	8.410	0.367	0.35452	0.012479	0.40014
5	48	785.93	7.397	0.715	0.67317	0.041831	1.37817
6	60	1190.39	6.400	1.103	1.13954	-0.036539	-1.22247
7	72	1767.51	4.778	1.675	1.66467	0.010334	0.41392
8	96	1698.53	3.122	2.390	2.39649	-0.006487	-0.22863
9	120	1380.81	2.449	2.642	2.63682	0.005176	0.28529

Anexo 2.10: Parámetros de ajuste y matriz de la correlación aproximada de la producción de celulasas (P) de *A. niger* ATCC 10864 en fermentación en biopelículas

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
vp_x	1609.0	69.7669	1438.3	1779.8
k	-26.7244	1.8428	-31.2337	-22.2151
pp	15.2748	29.9300	-57.9613	88.5109

Anexo 2.11: Análisis de varianza de la predicción de celulasas (P) de *A. niger* ATCC 10864 en fermentación en bipelículas

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	3	10114919	3371640	621.28	<.0001
Residual	6	19511.3	3251.9		
Uncorrected Total	9	10134430			
Corrected Total	8	4060152			

Anexo 2.12: Predicción de producción de celulasas (P) de *A. niger* ATCC 10864 en fermentación en biopelículas

Obs	hours	p_t	s_t	x_t	PRED	RES	SRES
1	0	0.00	10.000	0.000	-23.27	23.2698	0.48541
2	12	7.32	9.101	0.023	4.62	2.6935	0.05568
3	24	169.31	8.924	0.174	185.84	-16.5346	-0.32647
4	36	394.01	8.410	0.367	412.22	-18.2127	-0.34877
5	48	785.93	7.397	0.715	802.51	-16.5776	-0.31789
6	60	1190.39	6.400	1.103	1201.75	-11.3576	-0.23193
7	72	1767.51	4.778	1.675	1678.28	89.2307	2.08590
8	96	1698.53	3.122	2.390	1790.41	-91.8790	-2.00461
9	120	1380.81	2.449	2.642	1341.45	39.3675	1.70621

Fermentación en FES

Anexo 2.13: Parámetros de ajuste y matriz de correlación aproximada de la producción de biomasa (Xt) de *A. niger* ATCC 10864 en fermentación en estado sólido

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence	
x_0	0.2300	0.0596	0.0842	0.3758
$x_{0.0}$	7.3773	1.1730	4.5070	10.2477
$\mu_{0.0}$	0.0361	0.00472	0.0245	0.0476

Anexo 2.14: Análisis de regresión de la predicción de biomasa (P) de *A. niger* ATCC 10864 en fermentación en estado sólido

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	3	51.3364	17.1121	490.69	<.0001
Residual	6	0.2092	0.0349		
Uncorrected Total	9	51.5456			
Corrected Total	8	24.6372			

Anexo 2.15: Predicción de la producción de biomasa (Xt) de *A. niger* ATCC 10864 en fermentación en estado sólido

<u>Obs</u>	hours	<u>p_t</u>	<u>s_t</u>	<u>x_t</u>	PRED	RES	SRES
1	0	0.00	10.000	0.000	0.23002	-0.23002	-1.29964
2	12	30.45	8.893	0.151	0.34879	-0.19779	-1.14743
3	24	139.77	8.517	0.440	0.52440	-0.08440	-0.50266
4	36	355.65	7.991	0.848	0.77863	0.06937	0.41931
5	48	500.96	7.520	1.210	1.13568	0.07432	0.44887
6	60	743.14	6.884	1.719	1.61635	0.10265	0.62689
7	72	1173.52	5.398	2.376	2.22785	0.14815	0.98073
8	96	1191.51	4.536	3.496	3.74086	-0.24486	-2.06344
9	120	1180.44	2.304	5.322	5.23650	0.08550	2.20253

Anexo 2.16: Parámetros de ajuste y matriz de correlación aproximada de la producción de celulasas (P) de *A. niger* ATCC 10864 en fermentación en estado sólido

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence Limits	
<u>YDX</u>	598.4	63.1913	443.8	753.0
<u>k</u>	-6.6654	1.1638	-9.5131	-3.8176
<u>DD</u>	51.5918	52.0016	-75.6516	178.8

Anexo 2.17: Análisis de regresión de la predicción de celulasas (P) de *A. niger* ATCC 10864 en fermentación en estado sólido

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Regression	3	5079839	1693280	96.04	<.0001
Residual	6	60615.5	10102.6		
Uncorrected Total	9	5140455			
Corrected Total	8	2001133			

Anexo 2.18: Predicción de la producción de celulasas (P) de *Aspergillus niger* ATCC 10864 en fermentación en estado sólido

<u>Obs</u>	hours	<u>p_t</u>	<u>s_t</u>	<u>x_t</u>	PRED	RES	SRES
1	0	0.00	10.000	0.000	-17.10	17.102	0.20565
2	12	30.45	8.893	0.151	52.14	-21.695	-0.25216
3	24	139.77	8.517	0.440	183.04	-43.269	-0.48039
4	36	355.65	7.991	0.848	363.81	-8.153	-0.08760
5	48	500.96	7.520	1.210	519.66	-18.695	-0.19982
6	60	743.14	6.884	1.719	730.14	13.000	0.14215
7	72	1173.52	5.398	2.376	982.73	190.789	2.24222
8	96	1191.51	4.536	3.496	1335.62	-144.114	-2.02311
9	120	1180.44	2.304	5.322	1165.41	15.034	1.57459

Anexo 3

Anexo 3.1: Determinación de la movilidad electroforética (Rf) de los estándares de peso molecular (PM) de proteínas

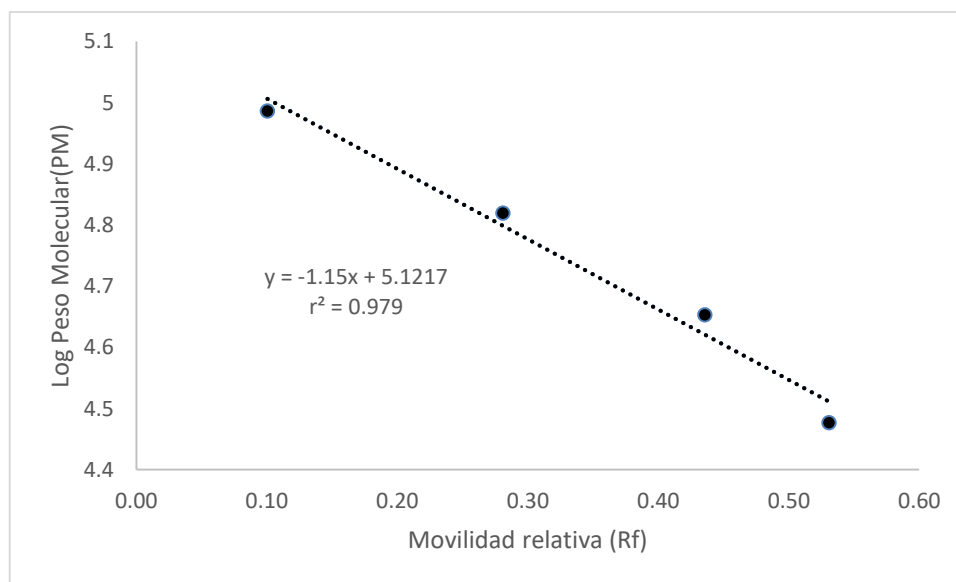
DM* (cm)	Rf *	Peso Molecular Estándar (kDa)	Log10 (PM)
0.975 (± 0.035)	0.101 (± 0.004)	97.00	4.987
2.725 (± 0.106)	0.281 (± 0.011)	66.00	4.820
4.225 (± 0.106)	0.436 (± 0.011)	45.00	4.653
5.150 (± 0.141)	0.531 (± 0.015)	30.00	4.477

DM = distancia de migración de los estándares de proteínas,

* = promedio de tres repeticiones, PM = Peso Molecular

Expresión para la determinación de la movilidad electroforética (Rf)

$$\text{Movilidad electroforética (Rf)} = \frac{\text{Distancia de movilidad de la proteína estándar (o en estudio)}}{\text{Distancia de la movilidad del colorante de azul de bromofenol}}$$



Anexo 3.2: Curva de calibración de los estándares de peso molecular de proteínas en relación a Rf.

Anexo 3.3: Determinación del peso molecular de las unidades polipeptídicas (UP) del extracto fermentado en FS con *A. niger* ATCC 10864 en 72 h de cultivo

DM* (cm)	Rf *	Log 10 (PM*)	PM (kDa*)
3.6 (±0.283)	0.323 (±0.025)	1.695 (±0.031)	49.598 (±3.485)
3.9 (±0.141)	0.350 (±0.013)	1.663 (±0.015)	45.991 (±1.617)
4.25 (±0.042)	0.381 (±0.004)	1.625 (±0.005)	42.147 (±0.445)
4.8 (±0.283)	0.430 (±0.025)	1.565 (±0.031)	36.805 (±2.586)
5.3 (±0.247)	0.478 (±0.022)	1.509 (±0.027)	32.293 (±1.986)

DM = Distancia de migración, Rf = Movilidad relativa, * = promedio de tres repeticiones, PM = Peso Molecular

Anexo 3.4: Determinación del peso molecular de las unidades polipeptídicas del extracto fermentado en FB con *A. niger* ATCC 10864 en 72 h de cultivo

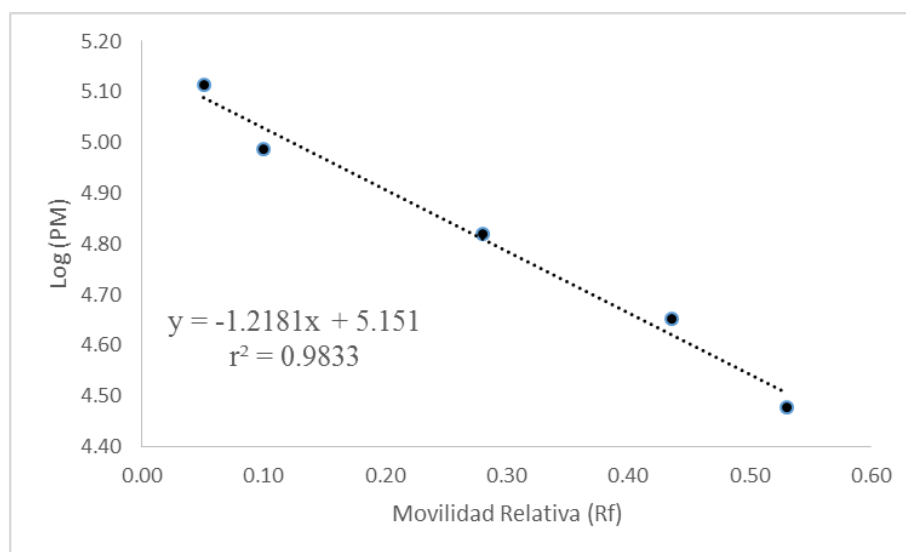
DM* (cm)	Rf *	Log 10 (PM*)	PM (kDa)*
0.645 (±0.021)	0.058 (±0.002)	2.014 (±0.002)	103.268 (±0.545)
0.850 (±0.014)	0.076 (±0.001)	1.992 (±0.002)	98.137 (±0.345)
0.950 (±0.028)	0.085 (±0.003)	1.981 (±0.003)	95.728 (±0.673)
1.590 (±0.028)	0.143 (±0.003)	1.912 (±0.003)	81.647 (±0.574)
2.150 (±0.028)	0.193 (±0.003)	1.851 (±0.003)	71.037 (±0.499)
3.575 (±0.035)	0.321 (±0.003)	1.698 (±0.004)	49.847 (±0.438)
4.205 (±0.120)	0.377 (±0.011)	1.630 (±0.013)	42.629 (±1.274)
4.630 (±0.057)	0.415 (±0.005)	1.584 (±0.006)	38.348 (±0.539)
5.100 (±0.071)	0.457 (±0.006)	1.533 (±0.008)	34.121 (±0.600)
6.090 (±0.057)	0.546 (±0.005)	1.426 (±0.006)	26.676 (±0.375)

DM = Distancia de migración, Rf = Movilidad relativa, * = promedio de tres repeticiones, PM = Peso Molecular

Anexo 3.5: Determinación del peso molecular de las unidades polipeptídicas del extracto fermentado en FES con *A. niger* ATCC 10864 en 72 h de cultivo

DM* (cm)	Rf *	Log 10 (PM*)	PM (kDa)*
0.50 (±0.071)	0.045 (± 0.006)	2.030 (± 0.008)	107.066 (± 1882)
0.75 (±0.071)	0.067 (± 0.010)	2.003 (± 0.008)	100.614 (± 1.769)
0.85 (±0.141)	0.076 (± 0.013)	1.992 (± 0.015)	98.167 (± 3.451)
1.60 (±0.141)	0.143 (± 0.013)	1.911 (± 0.015)	81.500 (± 2.864)
2.15 (±0.014)	0.193 (± 0.001)	1.851 (± 0.002)	71.036 (± 0.250)
2.55 (±0.141)	0.229 (± 0.013)	1.808 (± 0.015)	64.332 (± 2.261)
3.90 (±0.141)	0.350 (± 0.013)	1.663 (± 0.015)	45.991 (± 1.617)
4.21 (±0.297)	0.378 (± 0.027)	1.629 (± 0.032)	42.625 (± 3.144)
4.65 (±0.028)	0.417 (± 0.003)	1.582 (± 0.003)	38.200 (± 0.268)

DM = Distancia de migración, Rf = Movilidad relativa, * = promedio de tres repeticiones, PM = Peso Molecular



Anexo 3.6: Curva de calibración de los estándares de peso molecular de proteínas para determinar endoglucanasas, β - glucosidasas y xilanasas

Anexo 3.7: Determinación de la movilidad electroforética (Rf) y peso molecular de las endoglucanasas (EGs) de los extractos fermentados de FS en 72 h de cultivo

DM* (cm)	Rf*	Log 10 (PM)*	PM (kDa)*
3.8 (± 0.283)	0.33 (± 0.025)	4.732 (± 0.03)	54.062 (± 3.536)
4.8 (± 0.424)	0.42 (± 0.037)	4.632 (± 0.04)	42.950 (± 4.210)
5.25 (± 0.014)	0.46 (± 0.001)	4.587 (± 0.00)	38.609 (± 0.126)
7.4 (± 0.566)	0.65 (± 0.049)	4.371 (± 0.06)	23.575 (± 3.077)
7.8 (± 0.106)	0.68 (± 0.009)	4.328 (± 0.01)	21.278 (± 0.522)

DM = Distancia de migración, Rf = Movilidad relativa, * = promedio de tres repeticiones,
PM = Peso Molecular

Anexo 3.8: Determinación de la movilidad electroforética (Rf) y peso molecular de las endoglucanasas (EGs) de los extractos fermentados de FB en 72 h de cultivo

DM* (cm)	Rf*	Log 10 (PM)*	PM (kDa)*
2.1 (±0.141)	0.183 (±0.012)	4.903 (±0.014)	80.059 (±2.619)
3.8 (±0.283)	0.332 (±0.025)	4.732 (±0.028)	54.062 (±3.536)
4.8 (±0.424)	0.419 (±0.037)	4.632 (±0.043)	42.950 (±4.210)
5.25 (±0.014)	0.459 (±0.001)	4.587 (±0.001)	38.609 (±0.126)
6.9 (±0.424)	0.603 (±0.037)	4.421 (±0.043)	26.417 (±2.589)
7.4 (±0.566)	0.646 (±0.049)	4.371 (±0.057)	23.575 (±3.077)
7.8 (±0.141)	0.681 (±0.012)	4.330 (±0.014)	21.404 (±0.700)
7.95 (±0.354)	0.694 (±0.031)	4.315 (±0.036)	20.703 (±1.692)

DM = Distancia de migración, Rf = Movilidad relativa, * = promedio de tres repeticiones, PM = Peso Molecular

Anexo 3.9: Determinación de la movilidad electroforética (Rf) y peso molecular de β - glucosidasas y xilanasas de los extractos fermentados de FS, FB y FES en 72 h de cultivo

Características	β -glucosidasas (bPM)	β - glucosidasas (aPM)	Xilanasas
DM (cm)*	7.1 (±0.212)	1.40 (±0.247)	6.32 (±0.042)
Rf*	0.680 (±0.020)	0.137 (±0.023)	0.549 (±0.004)
Log 10 (PM)*	4.481 (±0.031)	5.304 (±0.036)	4.499 (±0.004)
PM (kDa)*	30.273 (±2.162)	201.678 (±16.80)	31.562 (±0.320)

DM = Distancia de migración, Rf = Movilidad relativa, * = promedio de tres repeticiones, PM = Peso Molecular, a= alto peso molecular y b = bajo peso molecular