



Universidad de Carabobo
Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología
Departamento de Biología
Centro de Biotecnología Aplicada (C.B.A)



**Producción de enzimas celulasas a partir de desechos de la
Industria papelera usando el hongo *Trichoderma reesei***

Presentado por: Br. María Silva

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

Tutor

Dr. Domenico Pavone

Valencia, Junio 2016



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



FACYT



ACTA

Mediante la presente se deja constancia que el (la) **Br. María Silva**, Cédula de Identidad N° 20.386.833, presentó ante el Jurado aprobado por el Consejo de Departamento de Biología de la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología (FACYT), de la Universidad de Carabobo, su Trabajo Especial de Grado (T.E.G.), titulado: **"Producción de enzimas celulasas a partir de residuos de la industria papelera usando el hongo *Trichoderma reesei*"**, en concordancia con los artículos 16, 17, 18 y 19 de las Normas de Interés Estudiantil. El jurado evaluador consideró que, luego de haber aprobado dicho trabajo el (la) bachiller cumple con los méritos académicos necesarios para obtener el Título de Licenciado en Biología.

En Valencia, a los diez días del mes de junio del año dos mil dieciseis.

Prof. Domenico Pavone
Tutor

Prof. Carlos Alvarado
Jurado Principal

Prof. Oscar Valbuena
Jurado Principal



DEDICATORIA

A Dios, por estar presente en todo momento bendiciéndome, guiándome y dándome fuerzas para seguir adelante durante mi formación como profesional.

A mi Padre Fredi Silva, quien en vida fue ejemplo de amor e inspiración para mi formación como profesional llena de valores y humildad en todo momento.

A mi Madre Ana Virginia Mujica y a Leonardo Arriaga, por su amor y por ser mi apoyo incondicional durante toda mi carrera.

A mis Hermanos Francisco Silva y Humberto Arriaga, quienes con amor han sido para mí ejemplo y apoyo para seguir adelante durante toda mi vida.

A Javier Escobar y su familia, por su amor incondicional, apoyo y compañía en todo momento.

A la Familia Mujica, quienes han demostrado su amor y apoyo incondicional, dedico este trabajo con esfuerzo y corazón a todos ellos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por estar presente en todo momento bendiciéndome, guiándome y dándome fuerzas para seguir adelante durante mi formación como profesional.

A mi Madre Ana Mujica y A Leonardo Arriaga, por ser mi apoyo incondicional durante mi vida y mi carrera.

A mi Novio Javier Escobar, por su apoyo y dedicación durante la elaboración de mi Trabajo Especial de Grado.

A mi casa de estudios, la Universidad de Carabobo por brindarme la oportunidad de egresar como profesional.

A todos mis Profesores del Departamento de Biología, por ser parte de mi formación académica.

Al Centro de Biotecnología Aplicada (C.B.A), por haberme concedido el espacio y todas las herramientas necesarias para la elaboración de este trabajo.

Al Profesor Domenico Pavone, Mi tutor, por haberme dado su apoyo, confianza y por brindarme todas las herramientas necesarias para la elaboración de mi proyecto. A usted profe mil gracias.

A mis compañeros de la carrera Maury, Alain Prepo y Lexi Briceño por todo el apoyo, el cariño y sus buenas intenciones brindadas durante mi carrera.

A todos muchas gracias

ÍNDICE GENERAL	pp.
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1.- INTRODUCCIÓN	2
2.- OBJETIVOS.....	6
Objetivo general	6
Objetivos específicos	6
3.- MARCO TEÓRICO	7
3.1. Proceso de fabricación de papel.....	7
3.2. Lodo papelero	8
3.3. Trichoderma reesei	9
3.4. Celulosa y celulasas	10
3.5. Fermentación	14
3.6. Precipitación de enzimas	18
4.- ANTECEDENTES.....	20
5.- MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1. Material biológico	24
5.2. Residuos de la industria papelera.....	24
5.3. Fermentaciones sumergidas para la obtención de enzimas celulasas.	24
5.3.4. Determinación de pH óptimo en fermentaciones sumergidas	25
5.3.5. Homogenización post-fermentativa	25
5.4. Escalamiento del proceso de producción de enzimas celulasas en un fermentador de tipo airlift.	25
5.5. Fermentaciones sólidas para la obtención de enzimas celulasas.	26
5.6. Precipitación de las enzimas celulasas.....	26
5.7. Determinación de la actividad celulasa.	26
5.8. Determinación de glucosa.....	27
5.9. Análisis estadísticos.	27

6.- RESULTADOS.	28
6.1. Fermentaciones sumergidas para la producción de enzimas celulasas.	28
6.2. Determinación de pH óptimo en fermentaciones sumergidas	32
6.3. Homogenización post-fermentativa	32
6.5.- Fermentaciones sólidas para la obtención de enzimas celulasas.	33
6.5. Escalamiento para la producción de enzimas celulasas por T.reesei.	34
6.6. Precipitación de las enzimas celulasas.	35
7.-DISCUSIÓN	36
7.1. Fermentaciones sumergidas para la producción de enzimas celulasas.	36
7.2. Determinación de pH óptimo en fermentaciones sumergidas	41
7.3. Homogenización post fermentativa	42
7.4. Fermentaciones sólidas para la obtención de enzimas celulasas.	42
7.5. Escalamiento para la producción de enzimas celulasas por T.reesei.	44
7.7. Precipitación de las enzimas celulasas.	45
8.-CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	47
9.-BIBLIOGRAFÍA	49
APÉNDICES 1.	60
APÉNDICES 2.	63

ÍNDICE DE FIGURAS

pp.

Figura 1. Esquema de producción industrial de papel.....	8
Figura 2. Molécula de celulosa. Mostrando los enlaces β -1,4 donde corta la enzima celulasa.....	10
Figura 3. Actividad celulasa producida por <i>T. reesei</i> (μ moles/mL.h) en medios con lodo paplero disgregado como fuente de carbono a diferentes concentraciones y tiempos de fermentación.....	29
Figura 4. Determinación de actividad celulasa (μ moles/mL.h) en medios con lodo paplero disgregado bajo diferentes concentraciones de sales a las 72 horas de fermentación. Tratamientos, control sin sales minerales. 0,1% de sales. 1% de sales. 2% de sales. 3% de sales.....	31
Figura 5. Determinación de actividad celulasa (μ moles/mL.h) en medios con lodo paplero sin disgregar bajo diferentes concentraciones de sales a las 72 horas de fermentación. Tratamientos, control sin sales minerales. 0,1% de sales. 1% de sales. 2% de sales. 3% de sales.....	31
Figura 6. Determinación de actividad celulasa (μ moles/mL.h) en medios con lodo paplero disgregado a las 72 horas de fermentación bajo diferentes condiciones de pH.	32
Figura 7. Determinación de actividad celulasa (μ moles/mL.h) en medios con lodo paplero disgregado bajo condiciones de procesos post-fermentativos. Tratamientos, 1 micelio no homogeneizado a 45°C. 2: micelio homogeneizado a 45°C.....	33
Figura 8. Determinación de la actividad enzimática celulasa de <i>T. asperellum</i> . En fermentaciones solidas para dos tiempos.	34
Figura 9. Determinación de actividad celulasa (μ moles/mL.h) por escalamiento del proceso fermentativo en función del tiempo.	35
Figura 10. Determinación de actividad celulasa (μ moles/mL.h) en medios con lodo paplero disgregado. Bajo diferentes concentraciones de etanol Tratamientos, control. 50% de etanol. 37,5% de etanol.....	36

ÍNDICE DE TABLAS

pp.

Tabla 1. Actividad celulasa producida por <i>T. reesei</i> ($\mu\text{moles/mL.h}$) en medios con lodo papelero disgregado como fuente de carbono a diferentes concentraciones y tiempos de fermentación.	29
---	----



Universidad de Carabobo
Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología
Departamento de Biología
Centro de Biotecnología Aplicada (C.B.A)



Producción de enzimas celulasas a partir de desechos de la Industria papelera usando el hongo *Trichoderma reesei*.

Autor: *María Silva*
Tutor: *Domenico Pavone*

RESUMEN

Los lodos papeleros son desechos abundantes generados durante la elaboración de papel, constituidos por celulosa, polímero degradable por diversos microorganismos entre ellos el hongo filamentoso *Trichoderma reesei* el cual posee un sistema enzimático de celulasas, enzimas utilizadas para la elaboración de productos de interés industrial. En este sentido es necesario buscar aplicaciones biotecnológicas para la degradación de la celulosa presente en los residuos de la industria papelera usando el hongo *T. reesei* con la finalidad de producir enzimas celulasas que puedan convertirse en un producto semicomercial. Con este fin se realizaron fermentaciones sumergidas y sólidas, evaluando en el primer caso las variables sustrato, tiempo de incubación, disgregación del sustrato, concentración de sales y pH, obteniéndose una actividad celulasa máxima de 0,22 μmoles de glucosa/mL.h. Del mismo modo se realizó una homogenización post fermentativa reportando la máxima actividad celulasa de 0,35 μmoles de glucosa/mL.h. Además, se demostró que en medios sólidos la producción de complejos enzimáticos, obtuvo un valor máximo de 0,16 μmoles glucosa/mL.h. En un escalamiento del proceso de producción de las enzimas, se obtuvieron rendimientos de 0,026 μmoles de glucosa/mL.h valores menores en comparación con los obtenidos en las fermentaciones sumergidas realizadas en matraces Erlenmeyer. Las enzimas se concentraron por precipitación con etanol al 50% con rendimientos bajos de 0,049 μmoles de glucosa/mL.h, se recomienda estandarizar el proceso evaluando las variables que afectan la precipitación para obtener mejores resultados.

Palabras claves: actividad celulasa, celulosa, lodo paplero, precipitación.



Universidad de Carabobo
Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología
Departamento de Biología
Centro de Biotecnología Aplicada (C.B.A)



Producción de enzimas celulasas a partir de desechos de la Industria papelera usando el hongo *Trichoderma reesei*.

Autor: *María Silva*

Tutor: *Domenico Pavone*

ABSTRACT

Paper sludge are abundant waste generated during the paper elaboration constituted by cellulose, degradable polymer by several microorganisms among them the filamentous fungus *Trichoderma reesei* which has a cellulase enzymatic system, enzymes used for the industrial interest products. In this sense is necessary looking for biotechnological applications for the cellulases degradation in the paper industry remaining using the to *Trichoderma reesei* fungus in order to produce cellulases enzymes may become in a semicommercial product. To this end were performed fermentations submerged and solid, evaluating in the first case the substrate variables, incubation time, disintegration of the substrate, salt concentration and pH, obtained an activity of 0.22 $\mu\text{moles glucose mL.h}$. Similarly, a post fermentation homogenization is performed reporting maximum cellulase activity of 0.35 $\mu\text{moles glucose / mL.h}$. In addition, it was shown that the production of solid enzyme complex media, obtained a maximum value of 0.16 $\mu\text{moles glucose / mL.h}$. In an escalation of the production process of enzymes, yields 0.026 $\mu\text{moles glucose / mL.h}$ lower values compared to those obtained in fermentations submersed performed in Erlenmeyer flask. the enzyme were concentrated by precipitation with etanol at 50 % with lower performance of 0.049 $\mu\text{moles glucose/ mL.h}$ is recommended assessing the variables of substrate that affect the precipitation to get better performances.

Keywords: cellulase activity, cellulose, paper sludge, precipitation.

1.- INTRODUCCIÓN

El papel es uno de los recursos más utilizados por el hombre desde hace décadas, es obtenido de fibras de celulosa que se entrecruzan formando una hoja resistente y flexible. Dependiendo de su longitud las fibras pueden ser largas, de aproximadamente 3 mm (generalmente obtenidas de pino insigne u otras coníferas) o fibras cortas de 1 a 2 mm obtenidas principalmente del eucalipto). Según el proceso de elaboración de la pulpa de celulosa, ésta se clasifica en mecánica o química cada una de las cuales da origen a diferentes tipos de papel en cuanto a rigidez y blancura (Velásquez, 2007).

En el proceso de producción de papel se utiliza gran cantidad de agua y se generan, a su vez, efluentes cargados de fibras de celulosa no utilizables en este proceso, que deben ser tratados para cumplir las políticas de gestión ambiental de las compañías. El material removido en el tratamiento de las aguas residuales forma un lodo con un contenido de sólidos entre 3% y 6% que se trata, con el fin de eliminar parte del agua y llevarlo al estado sólido para facilitar su manejo. Como resultado de este tratamiento, se produce una suspensión fibrosa conocida como “lodo papeler” en los procesos de pulpeo, destintado y en el tratamiento secundario de aguas residuales (Quinchía *et al.*, 2005).

Estos lodos básicamente contienen grandes cantidades de agua, fibras cortas de celulosa inservibles para hacer papel, cargas minerales, arcillas y cenizas, sin embargo no hay una composición precisa de éstos ya que existen variaciones sustanciales en la madera y en las otras materias primas utilizadas, así como los componentes que se emplean para hacer diferentes tipos de productos de papel (García y Quiroz, 2011).

Las características fisicoquímicas y mecánicas del lodo papeler le imprimen un comportamiento variable al estar expuesto a condiciones ambientales, dado su proceso normal de descomposición; esta situación genera riesgos de inestabilidad cuando se le dispone sobre zonas de ladera y aun en rellenos no específicos para un solo material, por lo que es necesario disponerlos en monorrellenos controlados y en ocasiones consolidados (Quinchía *et al.*, 2007).

La eliminación de este lodo se ha convertido en un problema constante para las fábricas de papel debido a su alta tasa de generación. La práctica actual consiste en someter

el lodo papелero a una operación de prensado mecánico como último proceso del tratamiento para eliminar el exceso de humedad. Sin embargo, el residuo resultante aún tiene gran proporción de agua y de los materiales mencionados anteriormente (García y Quiroz, 2011).

En promedio se producen alrededor de 200 toneladas de lodos diarios por empresa papелera, sobre este tipo de lodo se han hecho estudios para su utilización en la industria reportándose el uso en compostaje, mezclas con arcillas para elaboración de ladrillos, bloques de concreto, paneles para la construcción, absorbentes de aceites, base para alimento de animales (Quinchía *et al.*, 2007). Sin embargo, todos estos procesos no logran utilizar la cantidad total de lodo producido, por lo que se hace necesario implementar otras alternativas para aprovechar este subproducto. A pesar de que el lodo papелero tiene variedad de aplicaciones, ninguna cumple simultáneamente con los pilares del desarrollo sostenible donde se conjugue lo ambiental, con lo económico y social (García y Quiroz, 2011).

De esta forma, los lodos papелeros representan un problema de carácter ambiental, debido a que la acumulación de estos residuos al aire libre atrae una gran cantidad de animales que lo usan para distintas funciones como deposición de heces y otros productos perjudiciales, lo que genera un ambiente contaminado y dañino. Además, la disposición en el suelo afecta las propiedades de los mismos y genera contaminación de corrientes de aguas cercanas a causa de la lixiviación en épocas de lluvia (Quinchía *et al.*, 2007).

Por otro lado los lodos papелeros presentan 57,77% de sólidos totales, de los cuales un 82% representan fibras de celulosa (Mohammad *et al.*, 2010), convirtiéndose en un residuo atractivo para ser utilizado como fuente de carbono y energía para el crecimiento de microorganismos, además el contenido de celulosa se encuentra en su mayoría libre de hemilcelulosa y lignina (Martínez *et al.*, 2008), facilitando su degradación por microorganismos (Béguin y Aubert, 1994).

Entre los microorganismos productores de enzimas se encuentra el hongo *Trichoderma reesei*, el cual contiene un sistema de celulasas capaces de hidrolizar la biomasa celulolítica para la obtención de carbohidratos simples, además estas enzimas tienen la ventaja de ser

resistentes a inhibidores químicos y estables en reactores agitados bajo condiciones de pH 5 a 50 °C durante 48 horas (Seibothet *et al.*, 2011).

Así, las celulasas de *T. reesei* han sido ampliamente estudiadas y han servido como modelo de degradación de la celulosa. Estas enzimas se encuentran comercialmente disponibles como una mezcla de enzimas producida por diferentes empresas biotecnológicas entre ellas Novozimes® y Genencor® y los complejos enzimáticos obtenidos son conocidos bajo diferentes nombres tales como cellulase, cellubrix, celluclast entre otros, todas son enzimas producidas por *T. reesei* siendo la mayoría concentrados líquidos (Singhanian *et al.*, 2010).

La casa matriz de estas compañías está ubicada principalmente en Dinamarca y EE.UU. Otros países importan estas enzimas ya que no las producen localmente, siendo uno de ellos Venezuela, que utiliza estas enzimas en productos alimenticios, farmacéuticos, químicos que son desarrollados en el país (Castellanos *et al.*, 2006). Las enzimas se han convertido en herramientas insustituibles para la obtención industrial de productos de índole muy diversa. Enzimas de distinta naturaleza y actividad son utilizadas por muchas industrias. Los principales organismos productores de enzimas industriales se han estudiado en laboratorio con el fin de darle solución a diversos problemas, siendo estudiadas y explotadas sus características (Chacón, 2005)

La creciente demanda de enzimas celulolíticas por la industria, ha conducido a la búsqueda de una producción rentable de enzimas con elevada actividad y estabilidad biológica. Es por ello que teniendo evidencia de la aplicabilidad de este residuo papelerero, es importante destacar que para que sea parte de un desarrollo sostenible, es necesario aprovechar los residuos abundantes para fines industriales y esto a su vez permitirá disminuir la contaminación por su acumulación.

Así, esta investigación busca aplicaciones biotecnológicas al lodo papelerero usando el hongo *Trichoderma reesei*, basándose en su actividad celulolítica, para la degradación de la celulosa presente en estos residuos, generando sustratos glucosídicos que pueden convertirse en un producto semicomercial para su posterior aplicación en la industria.

2.- OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la producción de enzimas celulasas a partir del lodo paplero mediante fermentaciones sólidas y sumergidas usando el hongo *Trichoderma reesei*.

Objetivos específicos

1. Evaluar el crecimiento de *T. reesei* sobre el lodo paplero en fermentaciones sólidas y sumergidas.
2. Determinar la actividad de celulasas en fermentaciones sólidas y sumergidas.
3. Maximizar la actividad de celulasas en fermentaciones sumergidas.
4. Aplicar metodologías para la concentración de las celulasas producidas por *T.reesei*.

3.- MARCO TEÓRICO

3.1. Proceso de fabricación de papel

El papel es una estructura obtenida con base en fibras vegetales de celulosa, las cuales se entrecruzan formando una hoja resistente y flexible. Según el proceso de elaboración de la pulpa de celulosa, ésta se clasifica en mecánica y química, cada una de las cuales da origen a diferentes tipos de papel (Velásquez *et al.*, 2005). La fabricación incluye la utilización de las fibras de celulosa, agua, electricidad y vapor. El primer paso es la preparación de pastas con las fibras de celulosa (pura o reciclada). En el caso de la fibra pura, se ha de extraer la celulosa de la madera, separando las fibras unidas entre sí con la lignina, lo que se consigue por procedimientos mecánicos, químicos o sintéticos. La celulosa obtenida mediante un proceso de separación de las fibras de celulosa por medios mecánicos se denomina pulpa mecánica. Este proceso debilita las fibras y no elimina parte de la lignina. Para la producción de las pulpas sintéticas, se agrega un agente alcalino que ayuda a la separación de las fibras. La celulosa obtenida disolviendo la lignina mediante agentes químicos combinados con presión y temperatura, se denomina pulpa química (Aidima *et al.*, 2011). El resto de lignina es eliminado mediante el blanqueo. Los procesos más utilizados son:

Proceso al sulfito: se trata de un proceso ácido que permite la eliminación de la lignina, pero no de las resinas.

Proceso al sulfato (kraft): es un proceso alcalino y permite eliminar lignina, resinas y hemicelulosa, además de dañar menos a la fibra que el proceso al sulfito, generando así papeles más resistentes.

Por último, sigue el refinado que es un proceso que busca la eliminación de fibras del material resultante de la digestión. La pulpa ya preparada se envía al circuito cabecero de la máquina de papel donde tiene lugar el proceso de fabricación de la hoja seguida de una sección de prensado (Aidima *et al.*, 2011). Posteriormente una sección de secado donde se elimina el agua situada en la pared de las fibras, seguido del paso de la hoja por la batería de secadores, en una última fase de acabado. De esta forma se logra presentar el papel como producto final en forma de bobinas (Aidima *et al.*, 2011) en la (Figura 1) se observa un esquema que sintetiza el proceso de elaboración de papel.

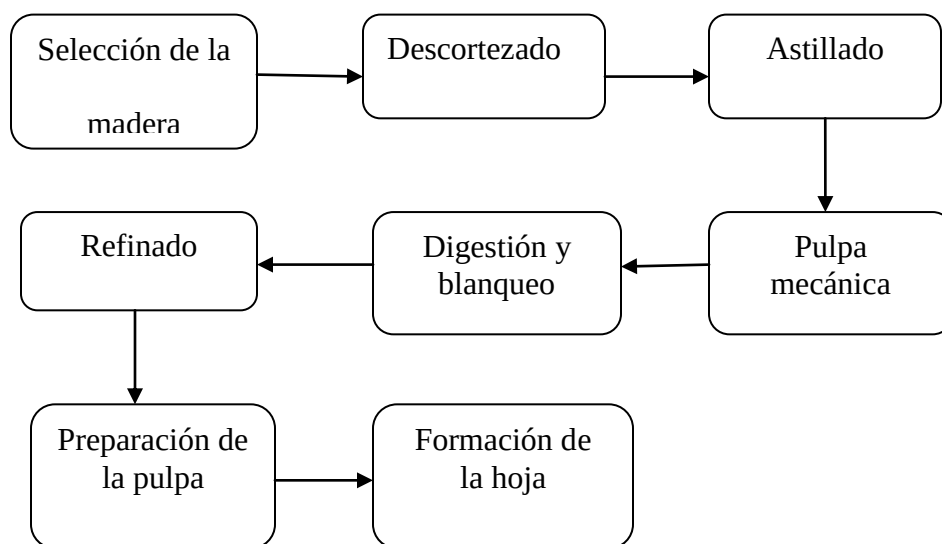


Figura 1. Esquema de producción industrial de papel.

3.2. Lodo papelerero

Los lodos papeleros se obtienen durante el proceso de elaboración del papel, ya que en todo el transcurso de producción hay consumo de agua sobre todo en la fabricación de la pulpa mecánica. Los lodos presentan un 57,77 % de sólidos, de los cuales el 82 % son fibras de celulosa y el 18 % hemicelulosa, ceniza, lignina (Bojórquez *et al.*, 2000) componentes inorgánicos como carbonato de calcio, caolinita y productos químicos residuales ligados con agua. Además, el lodo papelerero también contiene metales pesados de las actividades de entintado como la escritura y la pintura (Mohammad *et al.*, 2010). El contenido de humedad es típicamente de hasta 40 %. El material es viscoso, pegajoso y difícil de secar (Dunster, 2007). Existen procesos de reciclaje donde este desecho es usado en la tierra como fertilizante agrícola, en la fabricación de cemento y materiales para construcción (Mohammad *et al.*, 2010).

Los lodos papeleros tienen un contenido de energía que lo convierte en un candidato útil como materia prima para obtener combustibles alternativos (Mohammad *et al.*, 2010). Así, una aplicación importante es usarlos como sustrato para el crecimiento de microorganismos capaces de degradarlo y convertirlos en biomasa o productos secundarios indispensables en el sector industrial.

El crecimiento microbiano requiere primordialmente de una fuente de carbono para poder realizarse adecuadamente, ya que ésta le suministra la energía y la masa necesaria

para numerosas funciones celulares en relación a su crecimiento y con la producción de metabolitos secundarios. Por su cualidad natural y gran abundancia, muchos microorganismos han desarrollado mecanismos que le permiten aprovechar la celulosa en el lodo paplero para su crecimiento y a su vez liberar diferentes sustancias como enzimas (Seibothet *al.*, 2011).

3.3. *Trichoderma reesei*

Las especies del género *Trichoderma* son abundantes en la naturaleza y se encuentran frecuentemente en material en descomposición en el suelo, en donde comprenden una porción significativa de la biomasa total de hongos, atacan superficialmente y son los primeros colonizadores de la madera. Los organismos de este género son hongos filamentosos, anamórficos (asexual), heterotróficos, aerobios con una pared celular compuesta por quitina. Además pueden usar una gran variedad de sustratos complejos como: celulosa, quitina, pectina y almidón como fuente de carbono. Son relativamente tolerantes a un contenido bajo de humedad y viven en un medio relativamente ácido (Suesca, 2012).

El género *Trichoderma* agrupa alrededor de 80 especies, basados en datos moleculares que incluyen hasta 100 especies, en su mayoría asociadas a estados teleomórficos (sexuales). *T. reesei* es el nombre de la fase asexual del hongo filamentoso, que en su fase sexual es denominado *Hypocrea jecorina*. La clasificación taxonómica de este hongo es la siguiente: Reino: Fungí; Phylum: Ascomycota; Clase: Sordariomycetes; Orden: Hypocreales; Familia: Hypocreaceae; Género: *Trichoderma*; Especie: *Trichoderma reesei* (NCBI, 2011).

El micelio está formado por hifas septadas, los conidióforos por segmentos cortos que se hayan a lado y lado, la esporulación da sobre la colonia parches verdosos (Arias y Piñeros, 2008). En medio agar papa dextrosa (PDA) las colonias son de aspecto lanoso y liso con bordes irregulares y un crecimiento blancuzco del micelio al principio, el cual se torna verde manzana y verde amarillo intenso rápidamente (Noruby *et al.*, 2005). Los requerimientos nutricionales de este hongo filamentoso son pocos, aunque su crecimiento es favorecido por la materia orgánica, la humedad; con una temperatura óptima de crecimiento ubicada en un intervalo entre 25 y 30°C (Papavizas, 1985).

T. reesei fue aislado durante la II Guerra Mundial en el Pacífico Sur, en 1957 Mandels y Reese identificaron al hongo filamentoso *Trichoderma reesei* como agente causante del deterioro de gran parte del material militar del ejército de los Estados Unidos (hecho de algodón) esto debido a su capacidad para producir enzimas celulolíticas. Por lo tanto, su principal uso en el comercio mundial se deriva de su alta actividad celulolítica basada en la eficiencia para degradar la celulosa; aunque también es un eficiente degradador de heteropolisacáridos como el xilano, mediante la producción de diversas hemicelulasas. También puede ser usado en biorremediación, ya que degradan algunos pesticidas de alta persistencia en el ambiente (Suesca, 2012).

El uso de hongos filamentosos para la producción comercial de importantes metabolitos se ha incrementado rápidamente desde la mitad del siglo pasado, estableciéndose la producción de enzimas como uno de los productos más demandados. (Matute, 2011).

3.4. Celulosa y celulasas

La celulosa es la fuente de carbono renovable más abundante de la Tierra y es sintetizada en su mayoría por las plantas a través de la fotosíntesis, con una tasa de producción anual de 7.200 millones toneladas (Peters, 2006). Es un polímero lineal compuesto exclusivamente de moléculas de glucosa, es rígida e insoluble en agua y contiene desde varios cientos hasta varios miles de unidades de glucosa. La celulosa se forma por la unión de moléculas de β -glucopiranosas mediante enlaces β -1,4-O-glucosídicos (Suesca, 2012).

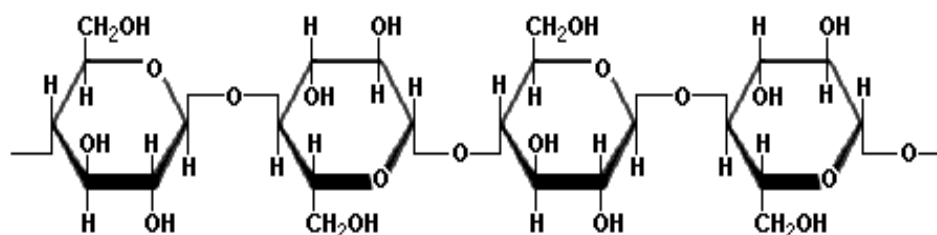


Figura 2. Molécula de celulosa mostrando los enlaces β -1,4.

El polisacárido está localizado en la pared celular de las plantas, donde se encuentra como unidades submicroscópicas de forma alargada llamadas micelas. Estas micelas se organizan en estructuras más grandes, las microfibrillas, las cuales se empaquetan formando una estructura cristalina altamente ordenada (mayor número de puentes de hidrógeno), que hacen a la celulosa insoluble en la mayoría de disolventes (incluido el agua), y dificultan que sea atacada por enzimas (Gutiérrez *et al.*, 2014).

Sin embargo, no toda la estructura de la celulosa es cristalina, ya que estas regiones están separadas por zonas amorfas, que se presentan en pequeños porcentajes (de 5 a 20%). Son menos ordenadas y compactas y tienen mayor capacidad para absorber moléculas de agua, lo que le confiere gran flexibilidad y cierta solubilidad (Cowling, 1975), además de hacerla más susceptible a la degradación enzimática (Beguin y Aubert, 1994).

Este arreglo asimétrico que caracteriza las regiones amorfas es crucial para la biodegradación de la celulosa. Además de estas regiones, las fibras de celulosa contienen varios tipos de irregularidades, como torceduras y espacios, en las cuales se forman microporos y capilares lo suficientemente amplios como para permitir la penetración de moléculas relativamente grandes, incluyendo las enzimas celulolíticas (Gutiérrez *et al.*, 2014).

La biomasa celulolítica puede ser tratada mediante el uso de métodos mecánicos como el licuado, que permite disgregar las fibras que contienen la celulosa lo que trae consigo la reducción del tamaño de partícula y la cristalinidad. La reducción del tamaño de partícula permite incrementar la superficie disponible y la reducción del grado de polimerización (DP), obteniendo así un sustrato más accesible para la hidrólisis (Suesca, 2012).

Se ha encontrado actividad celulolítica en una gran variedad de bacterias y hongos. Sin embargo, no todos son capaces de solubilizar la celulosa completamente. Los hongos son reconocidos como agentes de descomposición de la materia orgánica en general y de la celulosa en particular, para lo cual producen una gran variedad de enzimas hidrolíticas esenciales. La actividad celulolítica está ampliamente distribuida en el reino Fungí y los hongos pertenecientes al Phylum Ascomycota dominan, tanto en abundancia como en

actividad, en la comunidad microbiana responsable de la descomposición de residuos celulósicos (Gutiérrez *et al.*, 2014).

Los hongos pertenecientes a este Phylum son capaces de hidrolizar la celulosa quedando disponibles las moléculas de glucosa como fuente de energía. De ellos, es de destacar el hongo *Trichoderma reesei*. Debido a que la celulosa es un sustrato insoluble en medio acuoso, no puede penetrar la pared celular, así que no puede ser un componente inductor. Sin embargo, el hongo *T. reesei* se ha encontrado como un productor eficiente de enzimas xilanolíticas (xilanasas) y celulolíticas (celulasas) localizadas en la superficie de los conidios, lo cual parece facilitar el ataque inicial de la celulosa (Mangamuri *et al.*, 2011).

La hidrólisis enzimática de la celulosa implica la acción secuencial de un grupo de enzimas, conocidas como celulasas, que pertenecen a la superfamilia de las glicosilhidrolasas, llamadas así porque catalizan la hidrólisis del enlace glucosídico (Gutiérrez *et al.*, 2014). Estas enzimas presentan 2 módulos globulares independientes: un dominio catalítico, responsable de la reacción de hidrólisis, y un módulo de unión a la celulosa que desempeña tres funciones generales: la primera es mantener la enzima próxima al sustrato, la segunda es una función de reconocimiento y por último, una función disruptiva (Gutiérrez *et al.*, 2014).

El sistema de celulasas típico incluye 3 tipos de enzimas:

1) Endoglucanasas (EG, EC 3.2.1.4), hidrolizan aleatoriamente los enlaces glucosídicos internos de las regiones amorfas de la celulosa, generando oligosacáridos de diferentes longitudes y proporcionando nuevos extremos libres susceptibles de ser degradados por otras enzimas del sistema celulolítico (Aro *et al.*, 2005; Lynd *et al.*, 1991). Provocan una marcada reducción de la longitud del polímero, así como un incremento equivalente de la concentración de azúcares reductores.

2) Exoglucanasas, también llamadas celobiohidrolasas (CBH, EC 3.2.1.91), actúan progresivamente sobre los extremos de las cadenas de celulosa, liberando el dímero de glucosa (celobiosa) como principal producto. Las CBH se dividen en dos tipos: CBH I, que hidrolizan los extremos reductores, y CBH II, que actúan sobre los extremos no reductores

(Zhang y Lynd, 2004) Como resultado de su actuación se produce una rápida liberación de azúcares reductores aunque la longitud del polímero no disminuye significativamente.

3) β -glucosidasas, o β -1,4-glucosidasas (EC 3.2.1.21), catalizan la transformación de celobiosa y celooligosacáridos en glucosa. Este proceso completa la degradación de la celulosa y evita la acumulación de inhibidores de las CBH y las EG (celobiosa y oligosacáridos) (Emert y Brown, 1973; Workman y Day, 1982). Las β -glucosidasas también se pueden inhibir por su producto de hidrólisis (de Castro y Pereira, Jr., 2010; Leite *et al.*, 2008). Estas enzimas son especialmente importantes entre las celulasas por su distribución universal, su amplia especificidad de sustrato y su versatilidad para actuar en reacciones de hidrólisis o síntesis, dependiendo de las condiciones de reacción.

Los sistemas de celulasas no son simplemente una aglomeración de enzimas, ya que todas ellas actúan de manera coordinada y sinérgica para una hidrólisis eficiente. La eficiencia hidrolítica de estos complejos enzimáticos depende tanto de las propiedades individuales de cada enzima (eficiencia catalítica, estabilidad a temperatura alta y pH ácido), como de su proporción en la mezcla, lo que influye en el tipo de sinergia que se establece (Gutiérrez *et al.*, 2014).

Usualmente la actividad máxima de las enzimas de *Trichoderma* se presenta a pH 5 y temperaturas alrededor de 40 a 50°C. Las reacciones catalizadas por enzimas incrementan su velocidad conforme se incrementa la temperatura, por encima de una temperatura crítica, hay una rápida pérdida de la actividad por la desnaturalización de las proteínas (Albarran, 2008).

Mediante técnicas biotecnológicas se producen estas enzimas que pueden usarse en el reciclaje de papel, disminuyendo el costo económico, la contaminación y para la producción a nivel industrial de celulasas que provea de algún beneficio económico.

El proceso en el cual *T. reesei* (y todos los microorganismos) degradan la celulosa es el paso inicial de un proceso biotecnológico ampliamente usado denominado fermentación. La producción de celulasas a través de la fermentación sólida y sumergida se ha investigado en el uso de diferentes sustratos y microorganismos. La elección del sustrato apropiado es importante para el éxito de la producción de enzimas fúngicas, debido a que se

conocen las materias primas para inducir la expresión de complejos de enzimas que aseguren la hidrólisis completa del sustrato (Seibothet *al.*, 2011).

La producción de enzimas utilizando microorganismos tiene como ventaja un menor gasto económico. Además de que es posible incrementar el rendimiento de la producción enzimática, con sólo modificar las condiciones ambientales en las que se lleva a cabo el proceso. Adicionalmente, las enzimas obtenidas por fermentaciones microbianas, generalmente son excretadas al medio por el microorganismo lo que facilita la extracción de las mismas (Matute, 2011).

Las celulasas de *T. reesei* son de alto interés debido al potencial encontrado en la conversión de biomasa en glucosa y otros azúcares solubles. Esta actividad enzimática tiene aplicaciones en la industria textil (Ponce y Pérez, 2002). También como componentes de los detergentes. En la industria papelera se usa en el blanqueamiento de pulpas, en la industria alimenticia se utiliza en la maceración y extracción de jugos de frutas y verduras, en la filtración de mostos, en la extracción de aceites comestibles evitando así el uso de disolventes orgánicos, en la extracción de colorantes y antioxidantes. Además, se usa en la hidrólisis parcial de materiales lignocelulósicos para mejorar la digestión de rumiantes y elaboración de alimentos para aves disminuyendo los costos de producción (Chacón, 2005).

La glucosa producida a partir de la hidrólisis de la biomasa puede ser usada para la producción de etanol, ácido acético, acetona, butanol, ácido succínico y otros productos de fermentación; así como hidrógeno, metano y propanol por medio de una conversión microbiana. La cantidad y los tipos de enzimas requeridas para la sacarificación de la celulosa dependen de la naturaleza de la biomasa a ser hidrolizada y la selección de una u otra biomasa, depende de la viabilidad local y la economía del suministro. La variación en la severidad de los tratamientos, definida como la combinación entre la temperatura, acidez y concentración del sustrato, puede llegar a maximizar la compatibilidad durante la fermentación (Suesca, 2012).

3.5. Fermentación

Los procesos de obtención de celulasas consisten en la utilización de un microorganismo que tenga la habilidad de sintetizar las enzimas y un sustrato inductor que

propicie la formación del complejo enzimático, esto se logra por medio de un proceso fermentativo el cual realizan muchos microorganismos, efectuando reacciones sobre algunos compuestos orgánicos que forman parte del medio de cultivo, los cuales son transformados en metabólicos y/o biomasa. En términos de biomasa el microorganismo va aumentando su concentración, a la vez que el medio se va modificando pudiéndose formar productos nuevos como consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas (Merchuk, 2000).

En el curso de esta descomposición metabólica también son liberados varios compuestos adicionales, tales como dióxido de carbono, alcohol y agua. También pueden formarse metabolitos secundarios, los cuales pueden ser industrial y económicamente importantes. La producción comercial de productos por medio de procesos fermentativos ha empleado principalmente diversas especies de bacterias y hongos (Subramaniyam y Vimala, 2012).

La fermentación es la principal técnica para la producción de diversas enzimas, existen hongos que producen complejos enzimáticos de alto valor cuando fermentan sobre sustratos apropiados. La fermentación se ha clasificado en fermentación en estado sólido y fermentación en estado líquido basado principalmente en el tipo de sustrato usado durante el proceso (Subramaniyam y Vimala, 2012).

En la fermentación en fase líquida o sumergida, el medio de cultivo donde se inocula el hongo y se da el proceso fermentativo, presenta una cantidad determinada de sales minerales y/o agua en una proporción mayor que el sustrato sólido dando lugar a mayor contacto con el medio, además este tipo de fermentación es usada para la producción de enzimas debido a que la suspensión líquida obtenida con las enzimas hace más fácil la concentración del producto final.

Por otro lado, la fermentación en estado sólido implica el crecimiento del microorganismo en sustrato sólido en ausencia de agua libre (Garcés, 2004). En el pasado la fermentación en sustrato sólido se ha empleado en la maduración de quesos y en la actualidad se han hecho investigaciones con el fin de extraer enzimas, producción de sustancias químicas y compostaje de residuos celulósicos (Krishna, 1999). La fermentación

sólida posee ventajas debido a su bajo costo operacional, la cantidad de efluentes es menor, es de fácil aireación y el consumo de agua es limitado (Soccol y Vanderberghe, 2003).

En consecuencia, el comportamiento de un microorganismo en crecimiento es el resultado de la interacción que se produce entre éste y el medio donde se desarrolla, y que en rigor es el resultado de los llamados efectores intra y extracelulares del proceso fermentativo (Matute, 2011). Los cultivos sumergidos se ven influenciados por diversos factores; el tamaño del inóculo que inciden en el crecimiento celular, morfología y formación de metabolitos valiosos; el pH y la temperatura que pueden afectar la estructura celular, la solubilidad de las sales, el estado iónico de los sustratos, la toma de nutrientes y la biosíntesis de productos (Gallego y Giraldo, 2009). El oxígeno disuelto es el encargado de la oxidación de la fuente de carbono y su transformación en células, productos y CO_2 , siendo de esta manera una condición vital satisfacer la demanda de este sustrato mediante la aireación y mezclado del cultivo (Gallego y Giraldo, 2009).

La agitación ayuda a que las distintas fases presentes en el medio entren en contacto, en algunos fermentadores la agitación se logra únicamente con la introducción de gas de oxigenación. Durante la agitación, se busca dispersar el gas para asegurar su suministro y a su vez permite favorecer la transferencia de calor y nutrientes para obtener condiciones homogéneas, la agitación provoca la retención de burbujas de aire en suspensión, un burbujeo pequeño permite un aumento de permanencia del oxígeno en el medio en la fase gaseosa a la fase acuosa, ya que el microorganismo solo puede tomar el oxígeno de la fase acuosa. Existen múltiples factores que afectan la transferencia de oxígeno, siendo la eficiencia de la transferencia de oxígeno en muchos casos uno de los factores limitantes durante un proceso fermentativo (Menzela, 2013).

La aireación es un proceso de introducción de aire para incrementar la concentración de oxígeno de los líquidos, además cumple la función de eliminar gases tóxicos como el dióxido de carbono. El proceso de aireación puede llevarse a cabo burbujeando aire en el líquido, agitando para incrementar la superficie de absorción o combinando las dos anteriores.

Los fermentadores donde ocurre el proceso fermentativo están diseñados para maximizar la transferencia y satisfacer la demanda de oxígeno, ésta es una de las etapas más costosas de los procesos, tanto desde el punto de vista operativo como de capital, ya que la transferencia de oxígeno desde la burbuja hasta la célula pasa por diferentes etapas que hacen el proceso más complejo (Guevara, 2004).

Los factores externos están constituidos por las variables de manipulación física que se fijan o se programan en el curso del proceso de producción. Estos últimos pueden ser modificados por alteraciones del medio ambiente (Matute, 2011). La aireación y la agitación son factores fuertemente influyentes en la producción de enzimas de interés. La agitación del medio es necesaria para obtener una buena mezcla y por ende, promover la transferencia de masa y energía. Además, la agitación también crea la fuerza de cizallamiento, la cual puede causar daños a las hifas y provocar cambios morfológicos en el micelio; como consecuencia de ello se tienen variaciones en la tasa de crecimiento y formación de producto (Gallego y Giraldo, 2009). En cuanto a la aireación, ésta afecta tanto el crecimiento celular y morfología, como la absorción de nutrientes y la biosíntesis de metabolitos (Gallego y Giraldo, 2009).

Existen diferentes tipos de fermentadores que permiten una amplia diversidad de usos, algunos con agitación mecánica y otros aprovechan el aire suministrado con fines de mezclado (fermentadores con agitación neumática, como lo son los reactores de tipo airlift) (Guevara, 2004). Este tipo de fermentadores están diseñados para maximizar la transferencia de oxígeno, que pueden ser de circulación interna, agitados neumáticamente, teniendo un tubo colocado en el interior del tanque que proporciona una corriente gaseosa para facilitar el mezclado y una transferencia de sustancias gaseosas con la fase líquida.

Por lo general, la cantidad de aire necesario para la reacción biológica es suficiente para actuar como una fuente de movimiento del líquido. En estos fermentadores se pueden generar altas velocidades lineales sin la necesidad de un mecanismo de circulación externa, las características de los fermentadores airlift, dependen principalmente de la velocidad de inyección del gas y la velocidad de recirculación del líquido (Guevara, 2004).

El oxígeno debe ser suministrado tratando que las burbujas queden temporalmente retenidas en el seno del líquido para que el oxígeno se transfiera a la fase líquida. En comparación con los fermentadores clásicos que generan grandes gradientes de esfuerzo de corte que causan en las células tensión mecánica en áreas de alta turbulencia, en los reactores de tipo Airlift no hay puntos de disipación de energía y los esfuerzos de corte son homogéneos por lo que causan poco estrés celular, siendo ésta la principal ventaja de que sean ampliamente usados en bioprocesos ya que exhiben mayores tasas de aireación y menores costos energéticos. Además su construcción es simple debido a que no tienen partes mecánicas móviles para llevar a cabo la agitación. Es recomendable el uso de agentes antiespumantes cuando se suministra aire por inyección, estas son moléculas anfipáticas, que se ubican en torno a las burbujas y que disminuyen la transferencia de masa, debido a que la formación de espuma aumenta con la cantidad de aire suministrado (Guevara, 2004).

Estos fermentadores se han utilizado en procesos biotecnológicos siendo uno de los más empleados para llevar a cabo las fermentaciones sumergidas para la obtención de productos de interés industrial, debido a que provee de ciertas condiciones al medio con un buen mezclado y una transferencia de oxígeno eficiente (Guevara, 2004).

3.6. Precipitación de enzimas

Un paso importante para la producción de enzimas es conseguir la obtención de complejos purificados con una máxima actividad. Para ello se hacen precipitar las proteínas presentes en el medio de cultivo, lo cual se logra mediante la adición de un agente precipitante que produce un agregado suelto que puede eliminarse fácilmente por centrifugación o filtración. La floculación es un proceso barato y eficaz para precipitar las proteínas solubles, pero es esencial que los agentes utilizados no inhiban las enzimas de interés. Es importante tener en cuenta que la elección del floculante está determinada por el pH, la fuerza iónica de la solución y la naturaleza de las partículas (Chaplin, 2014).

Se han usado diferentes agentes que permiten obtener precipitados de las proteínas bajo diferentes principios maximizando su actividad enzimática. Entre ellas destacan:

(a) Precipitación por disminución de la solubilidad utilizando sulfato de amonio, (b) precipitación isoelectrica, (c) precipitación con polímeros no iónicos, (d) precipitación por desnaturalización selectiva, (e) precipitación por afinidad y (f) precipitación con disolventes, esta última técnica se basa en la disminución de la solubilidad mediante la adición de un solvente orgánico ligeramente polar como etanol, metanol, acetona, benceno y hexano (Chaplin, 2014).

La adición de un solvente orgánico (etanol) produce agregados de moléculas proteicas que tienden a precipitar, esto se debe a que el solvente presenta una constante dieléctrica menor que la del agua, lo cual produce un incremento en las fuerzas de atracción entre cargas opuestas y una disminución en el grado de ionización de los radicales de las proteínas, y en consecuencia una disminución en la solubilidad de ésta (Farinas *et al.*, 2011). Además la precipitación con etanol tiene costos de capital y operación bajos. El agente precipitante puede ser reciclado por destilación simple después de la separación de líquido y se precipitan las fases, reduciendo así el impacto medioambiental del efluente (Mariño y Freitas, 2015).

4.- ANTECEDENTES

En cuanto a los antecedentes que sustentan este trabajo se menciona a Ramírez *et al.*, (1996), que trabajaron con el género *Trichoderma* para producir celulasas a partir de la fibra prensada de la palma aceitera. Para ello utilizaron medios de cultivos a diferentes concentraciones de sustrato (9,09%, 12,5%, 25%, 44,4%) y temperaturas de 25 a 30 °C consiguiendo que a un 25% de sustrato y con una temperatura de 30°C se obtuvo una máxima producción de enzimas celulasas.

Por otro lado, un trabajo realizado por Juházet *al.*, (2005), tuvo como objetivo principal la caracterización celulasas y hemicelulasas producidas por *T. reesei* en varias fuentes de carbono (desechos de maíz y biomasa lignocelulósica deslignificada), demostrando que los desechos de maíz pretratados con ácido sulfúrico son un buen sustrato para la producción de celulasas y hemicelulasas de *T. reesei*.

En el año 2007, Ahamed y Vermette, realizaron un escalamiento para la producción de enzimas celulasas de *Trichoderma reesei* RUT-30 sobre altas concentraciones de celulosa y levadura, llevadas a cabo en un biorreactor de tanque agitado con una capacidad de 7 L, obteniendo rendimientos de 5,02U/mL, actividad celulasa reportada sobre papel de filtro y una actividad carboximetilcelulasa (CMCasa) de 4,2U/mL.

La producción de celulasas por parte de *T. reesei* se estudió usando pulpa de remolacha azucarera (PAS) como sustrato (Majdi-Nasab y Moosavi-Nasab, 2007). Se realizaron fermentaciones de 4-6 días, obteniéndose una actividad celulasa de hasta 0,46 UI/mL. Así, la pulpa de remolacha azucarera (PAS) es un sustrato adecuado para la producción celulasas por *T. reesei*. Sugieren que es necesario seguir trabajando para mejorar la actividad celulasa.

Dowe (2010), hizo uso de la biomasa lignocelulósica como sustrato para evaluar el rendimiento de las enzimas celulasas. Se describieron dos procedimientos que utilizan lavados de material celulósico pretratado para medir la eficacia de las enzimas celulasas. En primer lugar, se usó un ensayo que midió el rendimiento de sacarificación como una función de la cantidad de celulasas utilizada en el proceso. En segundo lugar, la sacarificación y fermentación simultaneas (SSF) que estableció el rendimiento de celulasas

por la cantidad de etanol producido a partir de la hidrólisis enzimática del material celulósico.

Por su parte Kanget *et al.*, (2010), trabajaron con residuos originados de la fabricación de papel, utilizando dos tipos diferentes de lodos de papel de molinos; lodo primario y lodo reciclado, que fueron evaluados como materia para la bioconversión a etanol. Los lodos se sometieron primero a la conversión enzimática de azúcares por enzimas celulasas comerciales, obteniendo rendimientos de 75-81% bajo condición estable con el pH cerca del óptimo para las celulasas.

Wang *et al.* (2010), trabajaron con los lodos de fábricas de papel, que se utilizaron como sustrato para la producción de celulasas. El lodo tratado era la única fuente de carbono para la producción de celulasas y los nutrientes inorgánicos como fuente de nitrógeno para este bioproceso. Las enzimas producidas a partir de los lodos mostraron una actividad celulasa de 8 unidades de papel de filtro (FPU) / ml, cerca de la que se obtiene a partir de sustratos celulósicos puros.

Con el fin de mejorar el rendimiento, estabilidad y actividad implicadas en hidrólisis de biomasa lignocelulósica; Farinas *et al.*, 2011, evaluaron la concentración de enzimas celulasas de *Aspergillus niger* obtenidas mediante fermentación sólida a través de la precipitación utilizando como agentes sulfato de amonio y etanol alcanzando valores de recuperación de la actividad enzimática de 65 a 61% lo cual permite obtener mejoras en la actividad enzimática dentro de las condiciones operativas adecuado para aplicaciones industriales.

Para el año (2011), Majarrez *et al.*, evaluaron los complejos enzimáticos producidos por *Aspergillus* sp. y *Trichoderma* sp mediante fermentación sólida sobre residuos de palma pretratados, con rendimientos máximos para la actividad enzimática de *Aspergillus* sp sobre papel de filtro y CM Casa mayores que los producidos por la cepa de *Trichoderma* sp., sin embargo la actividad β - glucosidasa de la cepa de *Trichoderma* sp reportó mayores rendimientos en comparación con la actividad β - glucosidasa de la cepa de *Aspergillus* sp

Por otro lado González (2012), realizó una conversión del lodo paplero por hidrólisis enzimática en etanol con un enfoque en baja inversión de capital, costos

operativos y el impacto ambiental, proponiéndolo como candidato de materia prima para la producción de bioetanol, comprobando que los lodos de papel tienen ciertas ventajas sobre otras materias primas como los residuos agrícolas o fuentes de madera. Los lodos fueron sometidos a tratamientos químicos y mecánicos, para aumentar la susceptibilidad de la hidrólisis enzimática por parte de microorganismos, teniendo mayor rendimiento en comparación con el material lignocelulósico.

Xiong *et al.* 2013, evaluaron la actividad enzimática de celulasas producidas por la cepa de *T. reesei* CH11, utilizando diferentes materias primas de bajo costo como fuentes de carbono y su aplicación en la hidrólisis enzimática de la mazorca de maíz. Entre todas las fuentes de carbono estudiadas, la paja de arroz era la más adecuada para producir enzimas celulolíticas por *T. reesei*. Además, la adición de salvado de trigo y sulfato de amonio mejoró la actividad celulasa. La actividad de la enzima llegó a 2,40 UI / mL, 21% por encima en comparación con el medio de cultivo original sin salvado de trigo o sulfato de amonio. Después de la optimización de la relación de sólido a líquido y la tasa de dilución de la enzima, se obtuvo 95,7% de rendimiento de la hidrólisis y un alto contenido de azúcares reductores.

En los trabajos realizados por Chen *et al.*(2013),se evaluó el efecto del pH con el fin de maximizar la actividad enzimática de celulasas de *Trichoderma reesei* evidenciando un aumento del 17,2 al 22% en comparación con los extractos obtenidos sin control del pH, además las enzimas obtenidas fueron usadas para la hidrólisis de mazorca de maíz pretratada obteniendo rendimientos significativamente altos.

Chen *et al.*(2014), también usaron los lodos de la industria papelera como fuente de carbono para la conversión a etanol. Utilizando un procedimiento de fraccionamiento de los lodos generados por una corriente eléctrica para su hidrólisis enzimática. Este procedimiento de fraccionamiento mostró rendimientos muy altos en la actividad enzimática en el proceso de fermentación de los lodos.

Albuquerque *et al.* (2014), optimizaron la producción de enzimas celulasas de *Penicillium funiculosum* ATCC 11797. Determinando las concentraciones óptimas de la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno, llevada a cabo en un biorreactor determinando

la velocidad de agitación que permitió obtener la máxima actividad enzimática de 50, 8U/L sobre papel de filtro (FPasa), 9,2 U/L para endoglucanasa y 2,3 U/L para β -glucosidasa.

Centeno y Pavone (2015) evaluaron varios tratamientos para aprovechar biotecnológicamente el lodo papelerero usando *T. reesei*. Para ello realizaron fermentaciones líquidas y sólidas, usando para el primer caso sales minerales y agua como tratamiento teniendo el lodo como única fuente de carbono. También aplicó tratamientos diferenciales al lodo disgregado y sin disgregar y pretratamientos con ácido (H_2SO_4) y álcali (NaOH). Para todos estos tratamientos se determinó la producción de azúcares reductores con el método del ácido dinitrosalicílico (DNS). Los resultados indicaron que los azúcares reductores (AR) obtenidos con el lodo higiénico fueron 1,67 veces superiores a los obtenidos con el no higiénico y que el tratamiento del lodo disgregado fue 1,220 veces superior al no disgregado. La máxima actividad celulasa obtenida fue de 2,6 mg/L /h. De la misma forma determinaron que el pretratamiento con ácidos (17mg de AR) arroja mejores resultados que el básico (7,4mg de AR).

En el (2015) Mariño *et al.*, evaluaron la capacidad de usar un disolvente orgánico como el etanol para precipitar los extractos enzimáticos obtenidos de *Trichoderma harzianum* P49P11 con el fin de concentrar los productos obtenidos del proceso fermentativo, las variables de prueba fueron diferentes concentraciones de etanol de 60, 75 y 90%, reportando la máxima recuperación de la actividad celulasa del 77% en una precipitación llevada a cabo a una concentración de 90% de etanol y a pH 5.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material biológico

Para los cultivos sumergidos se utilizó la cepa de *Trichoderma reesei* (teleo. *Hypocrea jecorina*) (TV219) Figura(A-1) perteneciente al Centro de Biotecnología Aplicada, Departamento de Biología de la FACYT-UC. La cepa proviene de campos de maíz del Estado Portuguesa, Venezuela (Pavone y Dorta, 2015). Mantenidas por subcultivos en medios agar papa dextrosa (PDA). Para la fermentación en estado sólido se usó una cepa de *Trichoderma asperellum* (TV190) Figura(A-1) aislada de campos de maíz del Estado Monagas (Pavone y Dorta, 2015).

5.2. Residuos de la industria papelera

Se utilizó como sustrato para la fermentación, un residuo de la industria papelera conocido como lodo paplero, proveniente de una planta procesadora de papel de Venezuela. Los mismos se colocaron en una estufa a 60 °C por tres días y posteriormente en un desecador hasta llegar a temperatura ambiente.

5.3. Fermentaciones sumergidas para la obtención de enzimas celulasas

Se realizaron cultivos sumergidos para la producción de enzimas celulasas a partir de *T. reesei* sobre lodo paplero como fuente de carbono. Los parámetros a evaluar fueron: concentración de sustrato (lodo), disgregación del sustrato, concentración de sales minerales, pH y homogenización post-fermentativa. Los ensayos se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad, los medios de cultivo se procesaron en un esterilizador a 121 °C durante 15 minutos y se inocularon con esporas de *T. reesei* a razón de 10^6 esporas/mL. Los recipientes fueron incubados en un agitador rotatorio a 90 rpm a temperatura ambiente.

5.3.1. Concentración del lodo paplero

Para ello se evaluaron tres concentraciones: 0,5; 1 y 3% (p/v) de sólidos iniciales y con una concentración de sales Nitrosol P[®] y Nitrosol K[®] al 0,5% (p/v) cada una. Para estos ensayos se tomaron muestras diariamente con el objeto de determinar el tiempo necesario para obtener la mayor actividad enzimática. Se determinó la actividad celulasa por quintuplicado.

5.3.2. Disgregación del sustrato

Se realizaron fermentaciones sumergidas con lodo intacto y disgregado en una licuadora marca Oster[®]. La concentración del sustrato fue del 3% y de sales Nitrosol P[®] y Nitrosol K[®] al 0,5% (p/v) cada una. El proceso fermentativo tuvo una duración de 72 horas. Se determinó la actividad celulasa por quintuplicado.

5.3.3. Concentración de sales minerales

Se evaluaron cuatro concentraciones de las sales minerales Nitrosol P[®] (fertilizante foliar alto en fósforo, nitrógeno y micro elementos) y Nitrosol K[®] (fertilizante foliar alto en potasio, nitrógeno, fósforo y micro elementos): 0,1; 1; 2 y 3% (p/v) de cada uno, en conjunto con lodo paplero disgregado (3%). El proceso fermentativo tuvo una duración de 72 horas. Se determinó la actividad celulasa por quintuplicado.

5.3.4. Determinación de pH óptimo en fermentaciones sumergidas

Bajo las condiciones óptimas de sales minerales y lodo paplero disgregado, el pH se valoró con un pH-metro y los medios se ajustaron usando NaOH 2M (Chen *et al.*, 2013). El proceso fermentativo tuvo una duración de 72 horas. Se determinó la actividad celulasa por quintuplicado.

5.3.5. Homogenización post-fermentativa

Se preparó un proceso fermentativo con las condiciones máximas obtenidas en los ensayos anteriores. El mismo fue homogeneizado en una licuadora Oster[®] a las 72 horas de iniciada la fermentación para liberar el contenido enzimático al medio extracelular. Se realizó un control sin homogeneizar. Se determinó la actividad celulasa por quintuplicado en cada tratamiento.

5.4. Escalamiento del proceso de producción de enzimas celulasas en un fermentador con agitación por burbujeo

Adicionalmente se realizó una fermentación sumergida en fermentadores con agitación por burbujeo (tipo airlift). Las mejores condiciones determinadas en los ensayos anteriores, fueron usadas en este ensayo. La producción de enzimas celulolíticas se llevó a cabo en un fermentador con agitación por burbujeo con capacidad de 20L con un volumen

de operación de 15L, equipado con un sistema de aireación mediante un dispersor de aire impulsado por una bomba (Chávez *et al.*, 2014)Figura(A-3). El fermentador fue mantenido a temperatura ambiente bajo aireación constante por 7 días. Se determinó la actividad celulasa por quintuplicado de forma diaria.

5.5. Fermentaciones sólidas para la obtención de enzimas celulasas

Sobre lodo papelero se realizaron fermentaciones sólidas para el crecimiento de *T. reesei*. El medio se preparó con 50 % de contenido de agua, sales minerales (Nitrosol P[®] y Nitrosol K[®]) cada una al 1 % p/p. El medio fue pasteurizado durante una hora a 95°C, luego se esperó a alcanzar la temperatura ambiente. El medio fue inoculado con una suspensión esporas de *T. asperellum* (10⁶ esporas/g) y servido en bandejas de aluminio que fueron tapadas con envoplast[®]. A las 72 y 120 horas de proceso fermentativo, se tomaron muestras y se resuspendieron por lavado en agua destilada, determinando la actividad celulasa por quintuplicado en el sobrenadante.

5.6. Precipitación de las enzimas celulasas

De los cultivos sumergidos obtenidos de las condiciones óptimas para la obtención de las enzimas celulasas, se distribuyó el volumen deseado del caldo fermentado en tubos Eppendorf de 2 mL, seguido se agregó etanol hasta alcanzar la concentración final deseada, 1mL de muestra en 1mL de etanol (50%) y 1,25mL de muestra en 0,75 ml de etanol (37,5%) y un grupo control sin etanol. Las muestras se homogeneizaron por inversión, se incubaron a -15°C durante 24 horas y luego se centrifugaron a 80 rpm durante 10min. Se determinó la actividad celulasa por quintuplicado en el precipitado.

5.7. Determinación de la actividad celulasas

Se tomaron alícuotas de 100μL del sobrenadante libre de células y lodo (centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos) de las fermentaciones sumergidas y sólidas y se mezclaron con 100μL de carboximetilcelulosa al 0,5% disuelto en 100μL de solución buffer citrato 0,05M pH 4,8 (Ghose, 1987), para obtener un volumen de reacción de 200 μL. De esta mezcla se tomaron 100 μL y se determinó la concentración de glucosa inicial y los restantes 100μL fueron incubados durante 24 horas a 45°C. Posterior a esto, se determinó la contracción de glucosa final. La actividad enzimática fue reportada como la

diferencia entre la cantidad de glucosa inicial y final, en términos de μmoles de glucosa/mL.h. Las determinaciones fueron hechas por quintuplicado.

5.8. Determinación de glucosa

Para la determinación de glucosa se usó el método de glucosa oxidasa GOP-PAP de determinación cuantitativa de glucosa (Trinder, 1969), utilizando el kit comercial BIOSCIENCE GLUCOSA. De cada mezcla de reacción enzimática se tomaron 20 μL y se mezclaron con 500 μL del reactivo incluido en el Kit. Paralelamente, se mezclaron 20 μL de la solución patrón (incluida en el Kit) con 500 μL de reactivo. Los tubos fueron incubados a 37 °C durante 10 min. Finalmente, se determinó la densidad óptica (DO) a 510 nm en un espectrofotómetro marca Thermo Spectronic modelo Genesys 2.0.

5.9. Análisis estadísticos

Todos los valores presentados en los gráficos y la tabla son los promedios de cinco repeticiones. Para los datos que cumplieron con los supuestos del análisis de varianza, se procedió a usar el análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias (Tukey), para determinar diferencias significativas entre los tratamientos aplicados. Para los datos no paramétricos se usó la prueba de Kruskal-Wallis para medir diferencias significativas.

6.- RESULTADOS

6.1. Fermentaciones sumergidas para la producción de enzimas celulasas

Con el fin de evaluar la capacidad para producir enzimas celulasas de *T. reesei* se realizó una optimización del proceso fermentativo, utilizando el lodo papelerero como fuente de carbono. Dicho proceso se llevó a cabo a través de fermentaciones sumergidas, determinando la actividad celulasa. Así, se procedió a mejorar el rendimiento en la producción de enzimas celulasas de *T. reesei*, variando la concentración de la fuente de carbono con lodo papelerero disgregado y la concentración de sales Nitrosol P[®] y Nitrosol K[®].

En la Figura 3y la Tabla I, se puede observar el estudio de dos variables: la concentración de la fuente de carbono y tiempo de fermentación, alcanzando el máximo de producción de celulasas a las 72 horas y con 3% p/v de concentración de sustrato, con una actividad celulasa promedio de $0,14 \pm 0,004$ $\mu\text{moles de glucosa/mL.h}$. Transcurridas las 96 horas de fermentación se puede evidenciar una disminución en la actividad enzimática ($0,039 \pm 0,0005 \mu\text{moles de glucosa/mL.h}$) con respecto al valor máximo obtenido en la concentración de sustrato anterior. Sin embargo, la actividad celulasa en las concentraciones de 0,5 y 1% p/v ($0,0005 \pm 0,0008$ y $0,022 \pm 0,001 \mu\text{moles de glucosa/mL.h}$, respectivamente), mostraron un aumento a las 96 horas de fermentación, pero no mayor al valor máximo obtenido a las 72 horas.

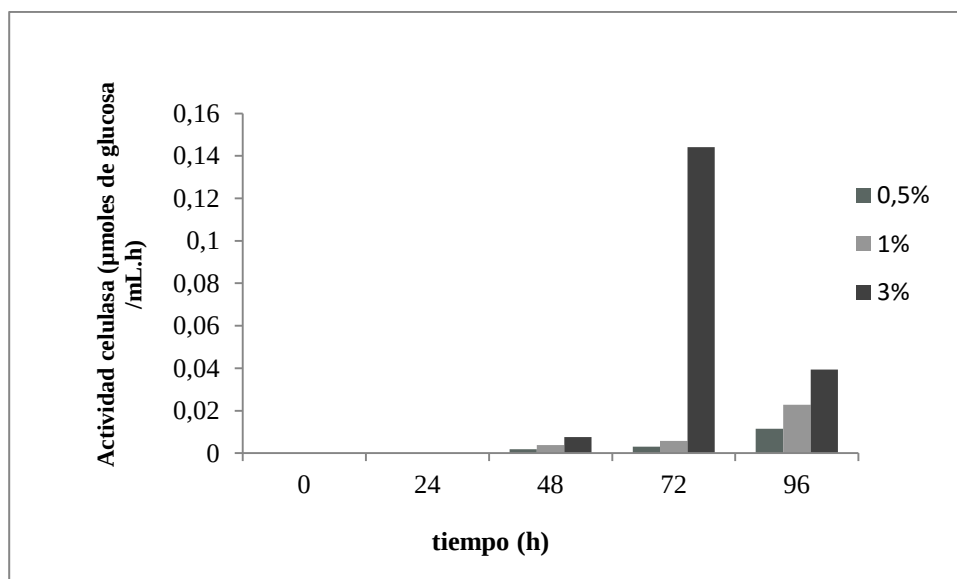


Figura 3. Actividad celulasica producida por *T. reesei* (μmoles de glucosa/mL.h) en medios con 0,5% de sales minerales lodo papelerero disgregado como fuente de carbono a diferentes concentraciones y tiempos de fermentación.

Tabla I. Actividad celulasica producida por *T. reesei* (μmoles/mL.h) en medios con lodo papelerero disgregado como fuente de carbono a diferentes concentraciones y tiempos de fermentación. Los tratamientos con letras distintas poseen diferencias significativas entre sí.

Tiempo (horas)	Actividad Celulasica(μmoles de glucosa/mL.h)		
	0,5% p/v	1% p/v	3% p/v
0	0a	0	0
24	0a	0	0
48	0,001±0,0002c	0,003±0,0004bc	0,007±0,0001b
72	0,003±0,0001e	0,005±0,001e	0,14±0,004d
96	0,0005±0,0008h	0,022±0,001g	0,039±0,0005f

El análisis estadístico entre los datos obtenidos arrojaron un $p < 0,05$; indicando que existen diferencias significativas entre tratamientos (apéndice-2), corroborando que a un período de fermentación de 72 horas y a una concentración del 3% (p/v) de lodo papelerero, se obtiene el mejor rendimiento en actividad celulasica bajo las condiciones estudiadas.

Por otro lado, se evaluó el tamaño de la partícula del lodo y el efecto de la concentración de sales minerales como condiciones para incrementar el rendimiento en la actividad enzimática, partiendo de la condición a la cual se obtuvo la máxima actividad enzimática en el ensayo anterior. Los resultados de los ensayos con lodo paplero sin disgregar y lodo paplero disgregado se muestran Figura 4 y 5 respectivamente. La mayor actividad enzimática se observó en el proceso con lodo disgregado con rendimientos promedios de $0,22 \pm 0,003 \mu\text{moles de glucosa/mL}$ a una concentración de 2% p/v de sales (Figura 4). Del mismo modo se obtuvieron resultados similares para el tratamiento con lodo sin disgregar, sin embargo las actividades enzimáticas son menores, reportándose valores máximos de $0,14 \pm 0,004 \mu\text{moles de glucosa/mL.h}$ (Figura 5). En ambos casos, concentraciones de sales de 3 % p/v disminuyeron drásticamente la actividad celulasa. Es importante señalar la necesidad del agregado de sales al medio, debido al bajo rendimiento obtenido en el tratamiento sin sales ($0,0052 \pm 0,0003 \mu\text{moles de glucosa/mL.h}$).

Los análisis estadísticos arrojaron diferencias significativas entre tratamientos con un $p < 0,05$, (apéndice-2) siendo el de mayor rendimiento el medio disgregado con una concentración del 2% de sales minerales (Figura 4). Los otros tratamientos estuvieron por debajo de estos valores con diferencias significativas reportadas por las letras (a, b y c).

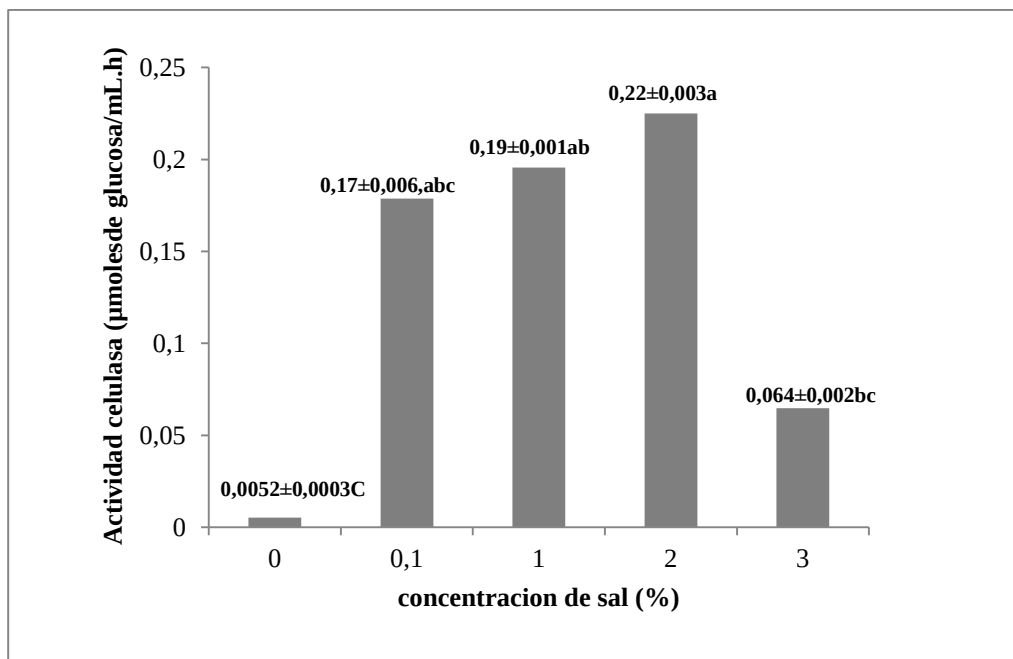


Figura 4. Determinación de actividad celulasa (μmoles de glucosa/mL.h) en medios con lodo paplero disgregado al 3% bajo diferentes concentraciones de sales a las 72 horas de fermentación. Tratamientos: control sin sales minerales. 0,1% de sales. 1% de sales. 2% de sales. 3% de sales.

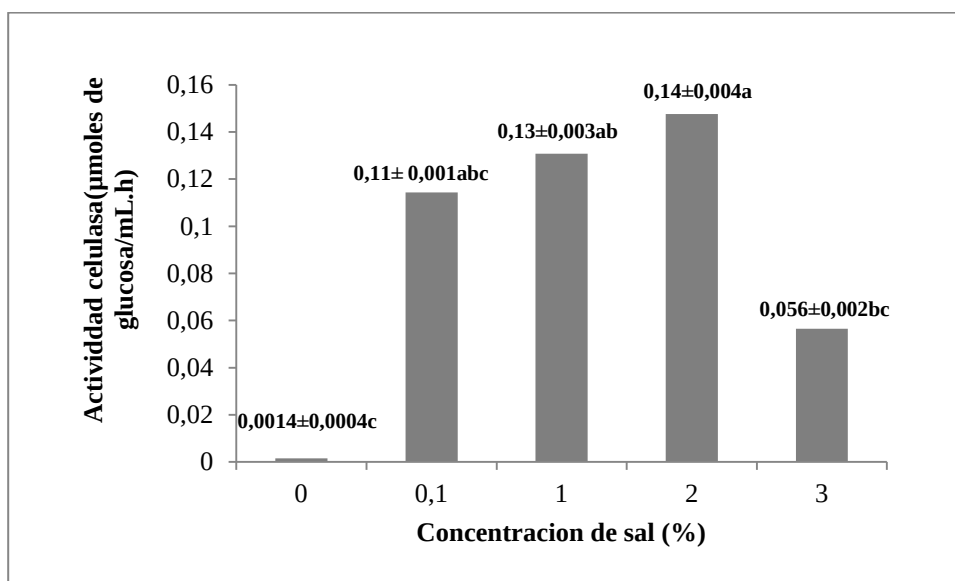


Figura 5. Determinación de actividad celulasa (μmoles de glucosa/mL.h) en medios con lodo paplero sin disgregar bajo diferentes concentraciones de sales a las 72 horas de fermentación. Tratamientos, control sin sales minerales. 0,1% de sales. 1% de sales. 2% de sales. 3% de sales.

6.2. Determinación de pH óptimo en fermentaciones sumergidas

El pH es otro factor que puede incidir sobre la actividad enzimática. Partiendo de las condiciones obtenidas en los ensayos anteriores (tiempo de incubación 72 horas, sales minerales al 2% p/v y lodo papelerero disgregado al 3% p/v) se procedió a evaluar el efecto que tiene el pH sobre la actividad celulasa. Así, en la Figura 6, se puede observar un aumento gradual en la actividad enzimática hasta alcanzar un máximo a pH 5 que luego desciende en el medio con pH 6, observándose rendimientos promedios máximos de $0,057 \pm 0,002$ ($\mu\text{moles de glucosa/mL.h}$).

Los análisis estadísticos muestran que existen diferencias significativas entre tratamientos (apéndice-2), corroborándose que a pH 5 las enzimas presentan la máxima actividad.

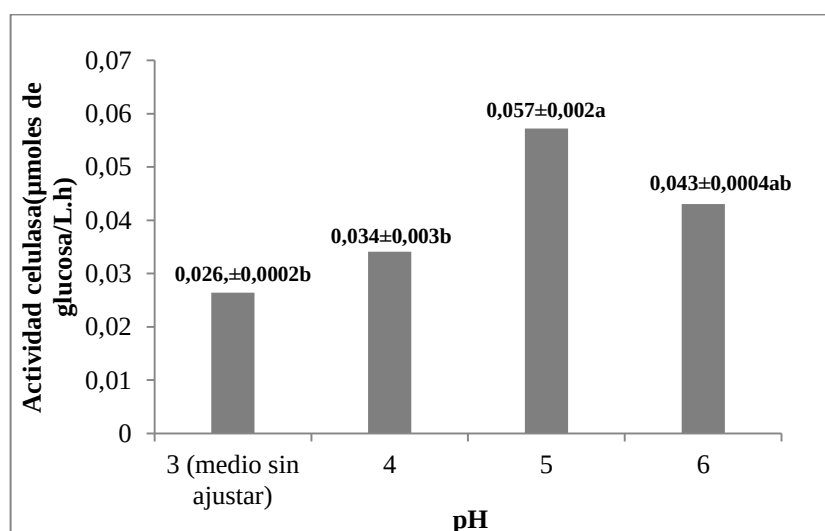


Figura 6. Determinación de actividad celulasa ($\mu\text{moles de glucosa/mL.h}$) en medios con lodo papelerero disgregado a las 72 horas de fermentación con diferentes pH.

6.3. Homogenización post-fermentativa

Una vez ocurrida la fermentación se procedió a evaluar el efecto que tiene la homogenización del micelio, pudiendo incidir en el aumento de la actividad celulasa. Se procedió a homogeneizar el producto de la fermentación (medio y micelio) obtenido bajo las condiciones máximas de los ensayos anteriores. Los resultados se muestran en la Figura 7, con rendimientos promedios de $0,35 \pm 0,006$ $\mu\text{moles de glucosa/mL.h}$ para el tratamiento de micelio homogeneizado, demostrando que bajo esta condición se alcanzó la máxima

actividad celulasa en comparación con el micelio no homogeneizado ($0,19 \pm 0,008 \mu\text{mol}$ de glucosa/mL.h). El análisis estadístico muestra diferencias significativas entre los tratamientos con un $p < 0,05$ (apéndice-2); indicando que la homogenización del micelio incide positivamente sobre el incremento de la actividad celulasa.

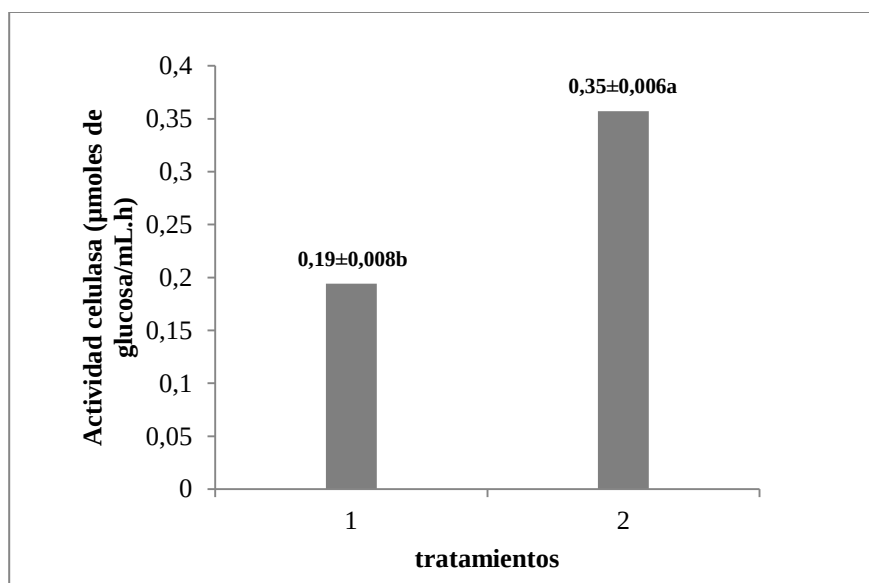


Figura 7. Determinación de actividad celulasa ($\mu\text{moles de glucosa/mL.h}$) en medios con lodo paplero disgregado al 3% p/v y 2% p/v sales minerales sin y con homogenización post- fermentativa.

Tratamientos: 1 micelio no homogeneizado; 2: micelio homogeneizado.

6.5.- Fermentaciones sólidas para la obtención de enzimas celulasas

Otra forma de producir enzimas celulasas es mediante fermentaciones con sustratos sólidos, este ensayo preliminar se realizó con la finalidad de evaluar y comparar los rendimientos de la actividad enzimática en medios sólidos y líquidos para posteriores investigaciones. Cabe destacar que para estos ensayos se utilizó la cepa *Trichoderma asperellum* como productor de celulasas ya que para *T.reesei* no se pudo estandarizar el método de crecimiento sobre el lodo paplero en medio sólido. En la Figura 8, se observan los valores de la actividad celulasa durante un período de fermentación de 120 horas, obteniendo rendimientos promedios de $0,169 \pm 0,006 \mu\text{moles de glucosa/mL.h}$ a las 72 horas y evidenciando una disminución de la actividad enzimática a las 120 horas. Los análisis estadísticos muestran que existen diferencias significativas entre los dos tiempos evaluados

con un $p < 0,05$ (apéndice-2); pudiéndose corroborar que a las 72 horas se obtuvo la máxima actividad celulasa sobre medio sólido.

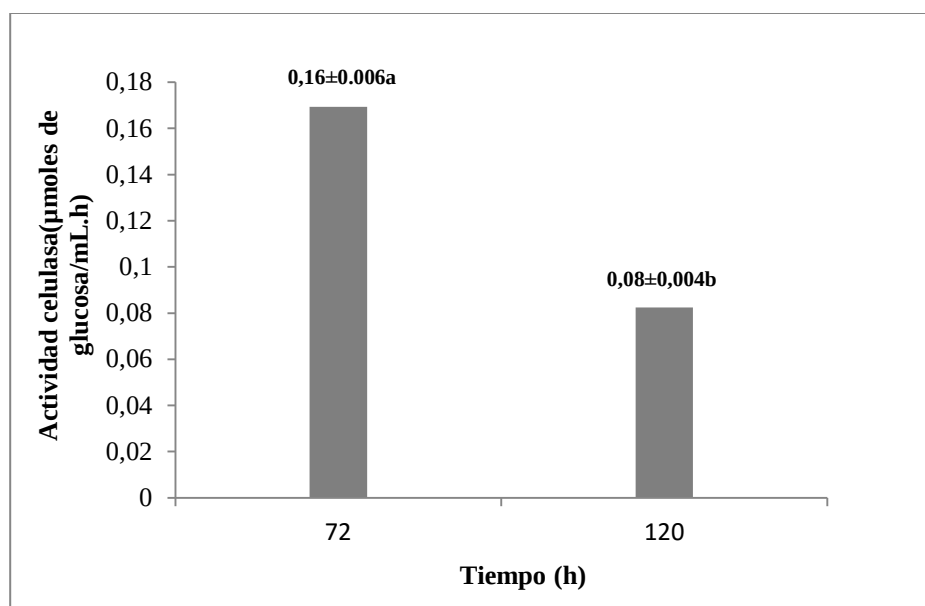


Figura 8. Determinación de la actividad enzimática celulasa de *T. asperellum* en fermentaciones sólidas para dos tiempos.

6.5. Escalamiento para la producción de enzimas celulasas por *T.reesei*

De las condiciones de máxima actividad obtenidas en los ensayos de fermentación sumergida mantenidas en matraces de 250 mL de capacidad, se procedió a realizar un escalamiento del proceso para la producción de celulasas.

Como estudio preliminar para escalar la producción de celulasas, se realizó un cultivo en un fermentador de 20 L de capacidad con 15 L de medio de cultivo bajo agitación por burbujeo. En la Figura 9, se comparan los valores de actividad celulasa obtenidos durante el tiempo de fermentación. Se observó un aumento en la actividad celulasa con valores máximos de $0,026 \pm 0,0004$ μmoles de glucosa/mL.h a las 120 horas de fermentación. El análisis estadístico estableció que existen diferencias significativas con un $p < 0,05$ (apéndice-2); sin embargo, son bajas con respecto a los rendimientos obtenidos en los matraces Erlenmeyer de 250 mL.

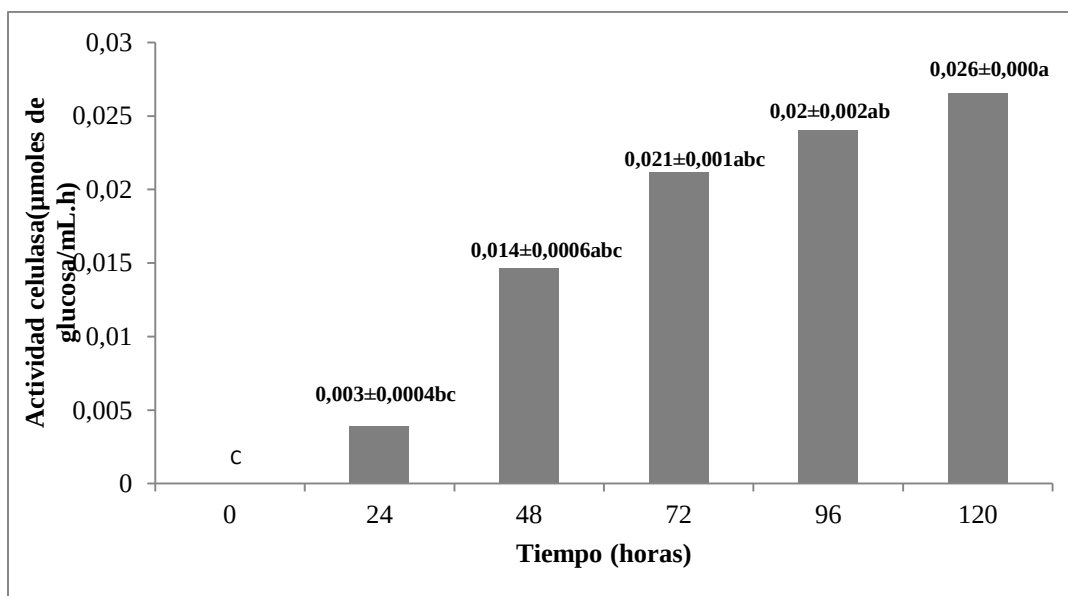


Figura 9. Determinación de actividad celulasa (μmoles de glucosa/mL.h) por escalamiento del proceso fermentativo en función del tiempo.

6.6. Precipitación de las enzimas celulasas

Se realizó una fermentación sumergida con las condiciones óptimas de los ensayos anteriores, con la finalidad de concentrar las enzimas obtenidas durante el proceso fermentativo. Para ello se utilizaron diferentes concentraciones de etanol.

En la Figura 10, se muestra la actividad celulasa para ambos tratamientos y el grupo control, con rendimientos promedios de $0,049 \pm 0,001$ μmoles de glucosa/mL a una concentración de etanol del 50%. Comparado a la actividad enzimática del tratamiento sin concentrar ($0,026 \pm 0,005$ μmoles de glucosa/mL.h), se observó una duplicación en la actividad celulasa. Sin embargo, a una concentración de etanol de 37,5%, disminuyó levemente la actividad celulasa en comparación con el control. Los análisis estadísticos reportan diferencias significativas entre grupos con un $p < 0,05$ (apéndice-2).

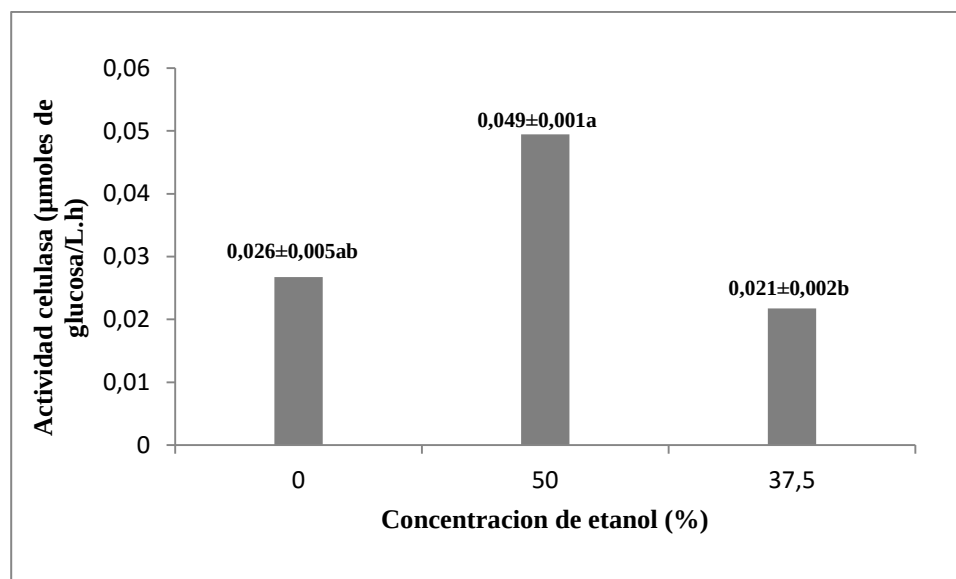


Figura 10. Determinación de actividad celulasa (μmoles de glucosa/mL.h) en medios con lodo papелero disgregado. Bajo diferentes concentraciones de etanol. Tratamientos, control. 50% de etanol. 37,5% de etanol.

7.-DISCUSIÓN

7.1. Fermentaciones sumergidas para la producción de enzimas celulasas

Para lograr la máxima actividad celulasa se estudiaron varios parámetros durante las fermentaciones sumergidas, se estimó que a un tiempo de 72 horas de incubación y a una concentración 3% (p/v) de sustrato, se obtuvo la máxima actividad enzimática sobre lodo papелero disgregado (0,0084U/mL.min). Gutiérrez *et al.*, 2012, comprobaron el potencial celulolítico de *T. reesei* sobre agar celulosa con una máxima actividad exoglucanasa de 0,0539 (U/mL.min), endoglucanasa de 0,022(U/mL.min) y β-glucosidasa de 0,000138(U/mL.min) en un tiempo de 8 días de incubación. Cabe destacar que en este trabajo se determinó solo glucosa como producto final de la degradación de la celulasa.

En el estudio realizado por Marques *et al.* (2007), Se evaluó la hidrólisis de lodo papелero llevada a cabo con la aplicación de celulasas comerciales (Celluclast 1,5 L) de *T. reesei*, obteniéndose una conversión del 100% de sustrato en glucosa a las 72 horas de incubación y al 3% (p/v) de lodo papелero, además, evidenciaron que a mayor tiempo de

incubación (hasta las 144 horas) la digestión del polisacárido disminuye con porcentajes menores de glucosa.

Los resultados de este trabajo fueron superiores a los reportados por Olsson *et al.*, (2003) con la cepa mutante *T. reesei* RutC-30 cuando utilizaron la pulpa de remolacha azucarera con dos pretratamientos distintos (0,09 UI/mL y 0,07 UI/mL) y son comparables con la actividad obtenida cuando se mezcló la pulpa de remolacha azucarera con celulosa comercial con una actividad máxima (0,45 UI/mL).

Según Mohagheghi *et al.*, (1999), es necesario para el crecimiento del hongo, mayor cantidad de sustrato en el menor volumen para mejorar las condiciones de cultivo. Así, cuanto mayor sea la accesibilidad del hongo al sustrato, más rápidamente crecerá sobre éste y en consecuencia el nivel de proteínas en el medio será mayor. La necesaria existencia de una suficiente cantidad de micelio ya desarrollado para degradar eficientemente el sustrato, está motivado por el requerimiento de distintas condiciones, tanto fisicoquímicas como nutricionales durante el crecimiento y la producción, con el objeto de garantizar la existencia de suficiente masa miceliar, estableciéndose dos etapas claramente diferenciadas en el proceso. Estos autores sugieren una instalación a dos niveles, uno de ellos destinado al crecimiento y desarrollo del micelio y otro destinado a la producción de enzimas estrictamente.

La tasa de producción de celulasas va a depender de la composición de las fuentes de carbono la cual desempeña un papel vital en el metabolismo celular y la síntesis de celulasas. Gautam *et al.*, (2011), estudiaron el efecto de diferentes fuentes de carbono; glucosa, sacarosa, celulosa, carboximetilcelulosa, y maltosa con concentraciones de 0,5 y 3,0% (p/v) para la producción de celulasas de *A. niger* y *Trichoderma* sp, encontrándose mayores rendimientos en sustratos como celulosa y carboximetilcelulosa siendo éstas las mejores fuentes de carbono.

La tendencia general es que mientras más celulosa se encuentre en el sustrato los rendimientos de la mezcla de enzimas serán más elevados. Muthuvelayudhamy Viruthagiri, 2006; evaluaron fuentes naturales de celulosa como el bagazo de la caña de azúcar, el cual contiene 41% de celulosa con una buena producción de celulasas. Del mismo modo la paja

de arroz, con un 35% de celulosa mostró un buen rendimiento para la producción de celulasas, indicando que estos sustratos ricos en celulosa representan una buena elección para su aprovechamiento en la producción de enzimas celulasas.

En esta investigación se evaluó la producción de celulasas utilizando como fuente de carbono lodos provenientes de la industria papelera, los cuales poseen una ventaja para la producción de enzimas celulasas frente a otros sustratos debido a su bajo contenido de lignina. Según Berlín *et al.*, (2006) se ha demostrado que la lignina causa impedimento estérico de la celulosa limitando su hidrólisis y la adsorción no productiva de celulasas. Lo cual concuerda con el estudio realizado por (Pečar y Goršek, 2015), quienes evaluaron los lodos papeleros y determinaron que poseen aproximadamente 57% de los componentes orgánicos, principalmente de celulosa, lo que confirmó que la celulosa encontrada en estos residuos es mucho más susceptible a la digestión enzimática que los materiales lignocelulósicos. Debido a su alto contenido de celulosa y su composición heterogénea, (Byeong *et al.*, 2015).

En este trabajo, se demostró que por encima de las 72 horas de incubación, la actividad enzimática disminuye considerablemente, semejante a los resultados reportados por Lisboa *et al.* (2015), quienes evaluaron el tiempo de incubación de enzimas celulasas de *Lichtheimiaramosa* donde se mostró que la actividad enzimática se redujo después de las 96 horas de cultivo.

También (Ikram-ul-Haq *et al.*, 2006), evaluaron el tiempo de incubación del complejo enzimático de *A. niger* y *T. viride* de 0 hasta 168 horas, mostrando una tasa de producción máxima a las 72 horas con rendimientos de 2,90; 1,76 y 4,67 (U/mL.min), observando un descenso luego de 96 horas de incubación.

Según Nochure *et al.*, (1993) esta disminución se debe al posible agotamiento de macro y micronutrientes en el medio de fermentación con el transcurso del tiempo, lo que hizo hincapié en la fisiología fúngica que resulta en la inactivación de la maquinaria secretoria de las enzimas. Además, las sustancias eran inicialmente más susceptibles, por el rápido aumento de la biosíntesis de las enzimas. Sin embargo, con la prolongación del tiempo de cultivo, las porciones susceptibles fueron completamente hidrolizadas por

microorganismos, lo que inhibe la secreción de enzimas. También pudieran estar actuando enzimas degradadoras de celulasas (proteasas), impidiendo su función.

MohsinJaved *et al.*, (2006), reportaron que esta disminución luego de las 72 horas, probablemente se explica por el consumo de los nutrientes del cultivo y la excreción de subproductos por parte del microorganismo utilizado para la fermentación. Estos subproductos, como proteasas y las sustancias que reducen los macro y micronutrientes pueden interferir con la síntesis de proteínas, así como con la actividad enzimática.

Por otro lado, el efecto de las sales minerales y la homogenización del sustrato también fueron parámetros evaluados para optimizar la actividad de enzimas celulasas de *T. reesei*, determinándose la importancia crucial de las sales minerales en la producción de enzimas celulasas por parte de *T. reesei*. Cuando se disgrega el lodo paplero se obtiene un efecto positivo sobre la actividad celulasa. En el trabajo realizado por Centeno y Pavone (2015), se determinó la actividad de enzimas celulasas de *T. reesei* bajo diferentes condiciones de cultivo en medios con sales minerales y partículas de lodo paplero disgregadas, obteniéndose los mayores rendimientos $2,64 \pm 0,04$ (mg de AR/L.h). Cabe destacar que en el caso del trabajo de Centeno y Pavone, se determinaron azúcares reductores totales, mientras que en este trabajo se determinó la cantidad de glucosa.

Rodríguez y Piñeros, (2007) Evaluaron la actividad enzimática de celulasas de *T. viride* en función de la fuente de nitrógeno, observando un incremento de la actividad usando como suplemento nitrato de sodio (NaNO_3) con rendimientos promedios de (0,374 U/mL) comparado con el tratamiento sin sales, los cuales obtuvieron rendimientos menores de (0,044 U/mL). En ese estudio, se utilizó una fuente de carbono lignocelulósica pretratada biológicamente con *Pleurotus ostreatus* y papel de filtro como sustrato para incrementar la actividad de las enzimas, lo que implica un aumento de los costos y mayor tiempo para la producción de las enzimas en comparación con este trabajo.

Centeno y Pavone (2015), aseguran que el tamaño de la partícula resulta fundamental para el desarrollo de la fermentación ya que está estrechamente relacionado con la accesibilidad del hongo al sustrato. Esto permitiría que el lodo sea mucho más aprovechado por el hongo durante la fermentación. Cuando en la fermentación se utiliza

lodo disgregado como sustrato, se presentan dos factores que afectan el desarrollo de los hongos filamentosos que tienen que ver en primer lugar con la macromorfología de las partículas (tamaño, forma, relación superficie-masa, porosidad, propiedades de adsorción, entre otros) y la actividad de las enzimas involucradas en la hidrólisis de la macromolécula (pH, temperatura, humedad, entre otros).

Todos los factores antes mencionados afectan la velocidad a la cual los distintos compuestos asimilables se hacen disponibles. Si el sustrato debe estar disuelto para poder ser utilizado por el microorganismo, en la medida en que su solubilización se haga más rápida que su consumo su concentración en la fase acuosa del medio será saturante (Centeno y Pavone, 2015). Por lo tanto, los mayores rendimientos en la actividad celulasa, en los tratamientos disgregados en comparación con los no disgregados, pudieran estar relacionados con los factores que afectan la accesibilidad del sustrato al hongo, evidenciando que al disminuir el tamaño de la partícula del lodo se obtiene un aumento en la actividad enzimática.

Al aumentar la concentración de sales a 3% (p/v) la actividad enzimática disminuyó, lo cual puede ser evidencia de que el crecimiento del hongo está siendo afectado por las altas concentraciones de sales. Una mayor cantidad de sales minerales asimilable a menudo limitará el crecimiento del micelio. La concentración de iones hidrógeno en un medio podría afectar el crecimiento ya sea indirectamente por su efecto sobre la disponibilidad de nutrientes o directamente por la acción sobre las superficies celulares (Montoya, 2014)

Si bien Abdullah *et al.* (2015), determinaron que los lodos papeleros contienen nitrógeno y fósforo, siendo estos componentes esenciales para el metabolismo microbiano, es necesario adicionar sales minerales que permiten maximizar el aprovechamiento del hongo, con el fin mejorar los rendimientos para la producción de enzimas.

7.2. Determinación de pH óptimo en fermentaciones sumergidas

Según los resultados obtenidos, el pH óptimo para la producción de las enzimas celulasas de *T. reesei* fue de 5. El efecto del pH sobre la actividad de las enzimas celulasas ha sido reportado por Ikram-ul-Haq *et al.* (2006), quienes evaluaron diferentes pH (3-8) para la producción de celulasas por *A. niger* y *T. viride* sobre diferentes fuentes de carbono, reportando que un medio ácido de 5,5 es ideal para la producción del complejo enzimático, mostrando efectos negativos a pH básico o alcalino.

Montoya (2014), evaluó el pH de muestras de lodo papelerero reportando un valor de 7,7. De igual forma para esta investigación se comprobó que el pH del medio solo con lodo papelerero disgregado, sin sales minerales, fue de 7 (resultados no mostrados) lo que indica que este sustrato presenta un pH cercano a la neutralidad.

La mayoría de los hongos crecen bien sobre un amplio rango de pH que va desde ácido a cerca de la neutralidad, es decir 4-7. *T.reesei* es un hongo que puede crecer en un amplio intervalo de pH, sin embargo su máximo crecimiento se experimenta en medios ácidos (Hendy *et al.*, 1984). Se observó una estimulación en presencia de sales minerales indudablemente, debido a la acidificación del medio pero con rendimientos bajos comparado con los obtenidos en el ensayo para la determinación de sales minerales.

Lo antes expuesto indica que debido al contenido de sales minerales presentes en los fertilizantes foliares como fósforo, potasio, nitrógeno y otros micro elementos que fueron usados para la fermentación, el medio de cultivo se torna ácido lo que influyó sobre el aumento de la actividad enzimática pues los hongos requieren medios de cultivo ligeramente ácidos para su crecimiento y biosíntesis de enzimas (Haltrich *et al.*, 1996).

Estos resultados fueron similares a los de Li *et al.* (2013), quienes evaluaron el efecto que tiene el control del pH durante el proceso de la síntesis de celulasas por *Trichoderma reesei* con valores óptimos de 4,5 para endoglucanasas, 5,5 para β -glucosidasa y 5,0 para exoglucanasas. Además estudios realizados por Pečar y Goršek, 2015 sugieren que a pH 5 las enzimas pueden hidrolizar completamente el lodo papelerero con una conversión del 83% de glucosa empleada para la conversión a etanol.

7.3. Homogenización post fermentativa

La mayoría de los hongos del genero *Trichoderma*, especialmente la especie *T. reesei* tienen una alta actividad endoglucanasas (EG) y celobiohidrolasas (CBH), sin embargo, los niveles de β - glucosidasas (BGL) presentes son insuficientes para una sacarificación eficiente, paso crucial en la producción de bioetanol a partir de biomasa lignocelulósica (Berlín *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2008).

Al realizar la homogenización del micelio se busca incrementar la actividad del complejo enzimático. A pesar que la mayoría de las enzimas identificadas son excretadas al medio extracelular, se ha reportado que la mayoría de las β -glucosidasas producidas por *T. reesei* son intracelulares, asociadas a la membrana celular, la cual es una de las razones por las que las β -glucosidasa extracelulares del hongo son insuficientes para completar la conversión de celobiosa y otros celooligosacáridos en glucosa (Gil *et al.*, 2015).

La homogenización post fermentativa implica la ruptura mecánica del micelio obtenido de la fermentación, en este ensayo se evidenció claramente cómo se obtuvo un incremento sustancial de la actividad enzimática (figura 7), encontrándose una mayor conversión a glucosa.

7.4. Fermentaciones sólidas para la obtención de enzimas celulasas

El cultivo en medio sólido es un método usual para el crecimiento de hongos y es un medio utilizado para la producción de metabolitos de interés (Montoya, 2014). El sistema de medio sólido con lodo paplero fue óptimo para el crecimiento de *Trichoderma asperelluma* temperatura ambiente, los primeros signos de crecimiento miceliar se vieron 24 horas después de la inoculación y el medio fue completamente colonizado por el hongo luego de 72 horas de incubación Figura (A-2). En la inoculación del lodo paplero, el área de contacto del micelio con el sustrato fue adecuado para la asimilación de nutrientes, la invasión del sustrato por parte de *T. asperellum* se evidenció en las zonas de ataque formándose una masa compacta verde-algodonosa en todas las bandejas inoculadas con el hongo Figura (A-2).

Los cultivos en estado sólido han sido considerados como un método eficiente para la producción de enzimas debido a sus beneficios potenciales de alta producción y bajo

costo (Pandey *et al.*, 1999). De acuerdo a esta investigación, cuando se utilizan residuos de la industria papelera en fermentaciones sólidas se observan buenos rendimientos (0,16 $\mu\text{moles/mL.h}$) (Figura 8) sin embargo estos fueron menores a los reportados en las fermentaciones sumergidas (0,35 $\mu\text{moles/mL.h}$)(Figura 7). Las características del medio pudieron haber influido mejor en estas últimas.

Una limitante que incide sobre la síntesis y la excreción de enzimas en fermentaciones solidas es la humedad, la presencia de agua libre entre las partículas del sustrato reduce la porosidad del medio, interfiriendo con la transferencia de gas y la temperatura (Lisboa *et al.*, 2015). Cabe destacar que por ser un estudio preliminar, faltó confirmar la actividad celulasa en tiempo menores a 72 horas, además no se trabajó con la optimización del medio con *T. reesei*, lo cual queda como objetivo para estudios posteriores.

La producción de celulasas con cepas de *Trichoderma* sp se han estudiado de manera amplia en fermentaciones sólidas utilizando sustratos como madera (Reczey *et al.*, 1996) residuos de maíz (Xia y Shen, 2004) y residuos de trigo (Smith *et al.*, 1996), todos apropiados para este proceso. Diferentes investigaciones han utilizado cultivos de *Trichoderma* sp, sobre residuos lignocelulósicos tales como bagazo de caña, salvado de trigo, cascarillas de arroz y residuos de la industria láctea (Gutiérrez *et al.*, 1999; Kang *et al.*, 2004; Zhiyou *et al.*, 2005).

Actualmente se han usado nuevas cepas entre ellas mutantes para la producción de celulasas reportándose como una de ellas a la especie *T. asperellum*, aunque este hongo es conocido por su uso básicamente como agente de biocontrol de hongos fitopatógenos. En el trabajo reportado por (Sanjeev *et al.*, 2014), se evidenció su potencial como productor de enzimas celulasas optimizadas en fermentaciones sólidas, obteniendo altos rendimientos del complejo enzimático sobre mazorca de maíz pretratada, paja de trigo y bagazo de caña.

Otros trabajos recientes (Marx *et al.*, 2013; Qun *et al.*, 2015) reportan que *Trichoderma asperellum*, ha demostrado ser un candidato excelente para la degradación de material lignocelulósico, siendo mayor que la cepa representante industrial *Trichoderma reesei*, mostrando crecimientos más robustos, mayor producción de esporas, rápida

secreción de enzimas y una mayor tolerancia a variaciones de pH en fermentaciones sólidas, sin embargo la secreción del complejo enzimático se ve fuertemente inhibida por la glucosa, lo que sugiere la existencia de la vía de represión de la fuente de carbono.

7.5. Escalamiento para la producción de enzimas celulasas por *T.reesei*

El resultado del proceso de escalamiento preliminar, marca el inicio de aplicación de técnicas que generen un aumento en la producción de enzimas. Debido a la importancia de las enzimas celulolíticas en sectores como la industria de los biocombustibles y alimentaria es necesario implementar procesos de obtención a gran escala de manera eficiente. Para ello, el primer paso consiste en abordar su producción a escala biorreactor de laboratorio.

Teniendo en cuenta investigaciones anteriores, para este ensayo se implementó el diseño de un fermentador con agitación por burbujeo la capacidad principal de suministrar aire a través de un difusor situado en la parte inferior del tanque con la finalidad de agitar y airear el medio de cultivo Figura (A-3). De este modo, se consigue asegurar la homogeneidad del medio de cultivo a la vez que se aporta el oxígeno necesario para realizar las funciones metabólicas (Sieira, 2013).

La producción de celulasas en el fermentador con agitación por burbujeo, al igual que en el estudio en matraces Erlenmeyer, fue creciente en la actividad enzimática reportada durante la fermentación (figura 9), sin embargo en el fermentador se observaron rendimientos menores a los obtenidos en los estudios en fiolas. Una posible razón para explicar este hecho podría ser una limitación en el suministro de oxígeno y la disipación de calor metabólico, parámetros que típicamente afectan estos procesos pero que no fueron medidos en la fermentación. La implementación de un proceso a mayor escala requiere el análisis exhaustivo de la influencia de las condiciones operacionales claves para asegurar una adecuada transferencia de materia (nutrientes y oxígeno) como son la agitación y la aireación (Sieira *et al.*, 2013). Estos parámetros serán objeto de estudio en posteriores investigaciones en nuestro Laboratorio.

En este ensayo se obtuvo una disminución a casi la mitad en la actividad enzimática con respecto al estudio en fiolas, lo cual también ha sido reportado por otros autores como

Colina *et al.*, (2009), que trabajaron con *T.reesei* en un fermentador de 4L y evidenciaron una disminución en la actividad de enzimas celulasas sobre paja de arroz reportando valores de 0,38 UI/mL inferiores a los obtenidos en el estudio en fiolas 0,51 UI/mL, indicando que esto se debió a problemas en la agitación del medio de cultivo. Cabe destacar que para estos ensayos se utilizaron cepas de *T. reesei* mutantes. También Knapp y Legg (1986), observaron variaciones en los escalamientos, entre el 41% y 49% menos de la actividad inicial de las celulasas empleando paja de trigo como sustrato inoculado con *T. reesei* QM 9123. Todo esto conlleva a la necesaria estandarización del proceso para poder escalarlo.

7.7. Precipitación de las enzimas celulasas

Una etapa importante en la producción de enzimas es obtener concentrados con una máxima actividad. El principio básico de esta técnica es provocar una alteración de alguna propiedad del solvente original que promueva la precipitación de la proteína, afectando su solubilidad la cual depende de cuatro factores principales: composición, distribución de sus aminoácidos, la estructura tridimensional y entorno de la propia proteína. Además de la importancia de concentrar las enzimas, las moléculas de proteína en el estado precipitado tienen alta estabilidad debido a su movilidad restringida, y éste es el estado ideal para el almacenamiento y el transporte (Schmidt, 2011).

En este ensayo se realizaron pruebas preliminares para la precipitación de enzimas celulasas con etanol, las actividades enzimáticas obtenidas fueron comparadas con un grupo control (sin etanol), reportando niveles bajos de actividad enzimática respecto a los obtenidos en los ensayos de optimización, sin embargo la muestra concentrada con etanol al 50% incrementó su actividad enzimática casi al doble con respecto a las muestra tratadas con 37% de etanol y con el control (figura 10). Es necesario evaluar y controlar el tiempo, la temperatura y la concentración de etanol durante la precipitación ya que estas variables influyen directamente sobre la recuperación óptima de las enzimas (Bokhari *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Jabbar *et al.*, 2008; Ninawa *et al.*, 2008; Saha, 2004; Oikawa *et al.*, 1997).

En el trabajo realizado por Mariño *et al.*, (2015) se pudieron obtener precipitados de enzimas celulasas de *Trichoderma harzianum* con concentraciones de etanol a un 90%,

evaluando tanto la concentración del agente como la temperatura y el tiempo de precipitación. Cabe destacar que la adición de solventes orgánicos miscibles como el etanol o acetona disminuye la solubilidad de la mayor parte de las proteínas, de tal manera que precipitan de la disolución, siendo el efecto principal la disminución de la actividad del agua(Queiroz *et al.*, 2001).

La ventaja que posee la adición de etanol en comparación con el sulfato de amonio para concentrar enzimas, es su bajo costo y además puede ser reciclado por destilación simple después de la separación de líquido, reduciendo así el impacto medioambiental del efluente, lo cual no ocurre con el sulfato de amonio ya que su desventaja principal es que la concentración resultante de sal como efluente compromete el medio ambiente (Farinas *et al.*, 2011).

8.-CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El hongo *T. reesei* fue capaz de degradar la celulosa de los lodos papeleros, bajo las condiciones de temperatura, pH, tiempo de incubación, concentración de sustrato, disgregación de sustrato y sales minerales, en fermentaciones sumergidas reportando buenos rendimientos en las actividades enzimáticas reportadas.

La concentración de sustrato disgregado al 3% p/v, sales minerales al 2% p/v a 72 horas de incubación fueron las condiciones donde se obtuvo la máxima producción de enzimas celulasas en fermentaciones sumergidas con rendimientos promedios de 0,22 μ moles de glucosa/mL.h.

La homogenización post fermentativa reportó los rendimientos más altos de actividad enzimática de 0,35 μ moles de glucosa/mL.h en fermentaciones sumergidas, esto se atribuye a que la ruptura del micelio incide sobre el aumento de la actividad celulasa.

La actividad enzimática celulasa obtenida del proceso de optimización podría ser una metodología adecuada a ser utilizada en la generación de productos comerciales.

Las enzimas celulasas poseen una actividad máxima en medios ácidos, reflejando un pH óptimo de 5. Sin embargo se observó un buen rendimiento a pH 3 (medio sin modificación de pH) el cual favoreció la transformación del sustrato y biosíntesis de las enzimas.

Las fermentaciones sólidas representan un medio importante para la producción de enzimas celulasas obteniendo rendimientos de 0,16 μ moles de glucosa/mL.h, lo que abre las puertas para la optimización de dicho proceso. Se recomienda evidenciar la fermentación desde el inicio de la inoculación de la cepa con la finalidad de monitorear el crecimiento del hongo sobre el sustrato y garantizar la estandarización del proceso.

Con el escalamiento del proceso de producción de enzimas celulasas se obtuvieron actividades promedio de 0,026 μ moles de glucosa/mL/h, indudablemente por ser un estudio preliminar se recomienda estandarizar el escalamiento así como el control de las variables que lo afectan como la agitación y aireación.

La precipitación de las enzimas obtenidas de las fermentaciones sumergidas con etanol, a pesar de no haber una recuperación máxima, se probó que a una concentración del 50% incrementó la actividad enzimática a casi el doble. Se recomienda estandarizar el proceso de concentración de enzimas analizando las variables tiempo, temperatura de precipitación y concentración del agente precipitante para obtener mejores resultados.

9.-BIBLIOGRAFÍA

- Abdullah, R. Ishak, C. Kadir, W. Bakar, R. (2015). Characterization and Feasibility Assessment of Recycled Paper Mill Sludges for Land Application in Relation to the *International Journal Environmental Research and PublicHealth* 12:9314-9329.
- AIDIMA, ITENE e IPE bajo la supervisión de FEDIT y ASPAPEL. (2011). Observatorio Industrial del sector de papel: percepciones y opciones. Centro de tecnología de España p6-8.
- Ahamed A, Vermette P. (2008). Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. *Biochemical Engineering Journal* 40: 399–407.
- Albarran, M. (2008). Ajuste y validación de un procedimiento de determinación de actividad enzimática celulasas en suelos a partir de la valoración espectrofotométrica de azúcares reductores. Trabajo de grado, Universidad de los Andes facultad de ciencias. Departamento de química. Laboratorio de investigación de análisis químico, industrial y agropecuario. Mérida Venezuela:6.
- Arias, E. González, R. Sumoza, C. Valera, A. W, Tovar, Zulenia, M. (2005). Caracterización de suelos-plantas-patógenos de la hacienda Evelio Pérez. Sector. Guácaro Estado Carabobo. Trabajo de grado, Universidad experimental Rómulo Gallegos. Decanato de investigación y extensión. Centro de investigación y extensión en suelos y aguas. Guárico.p15.
- Aro, N. Saloheimo, A. Ilmen, M. Penttilä, M. (2001). ACEII, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. *Journal of Biological Chemistry* 276: 24309-24314.
- Béguin, P. Aubert, J. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews*: 13, 25-58.

- Berlin, A. Balakshin, M. Gilkes, N. Kadla, J. Maximenko, V. Kubo, S. Saddler, J. (2006). Inhibición de las actividades de celulasas, xilanasas y beta-glucosidasas por preparaciones de lignina de madera blanda. *Journal. Biotechnol* 125: 198-209.
- Berlin, A. Maximenko, V. Gilkes, N. Saddler, J. (2007). Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering* 97: 287-296.
- Bojórquez, G. Luna, A. Gallegos, R. (2000). Sílice y lodos de papel, uso de residuos industriales como agregados en un concreto ligero. *Ciencia y Tecnología* (4) 10: 3-9.
- Bokhari, S. Latif, A. Rajoka, M. (2009). Purification and characterization of xylanases from *Thermomyces lanuginosus* and its mutant derivative possessing novel kinetic and thermodynamic properties. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 493.
- Byeong, C. Bhayani, B. Jampana, V. Ramarao, B. (2015). Enhancement of the enzymatic hydrolysis of fines from recycled paper mill waste rejects. *Bioresources and Bioprocessing* 2:40.
- Castellanos, O. Jimenez, C. Sinitsyna, O. Montañés, V. (2006). Análisis del desarrollo tecnológico en la aplicación de enzimas en la industria textil. Trabajo de grado Grupo de Investigación BioGestión. Departamento de Ingeniería de Sistemas e Industrial. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Colombia Bogotá D.C.
- Chaplin, M. (2014). Enzyme Technology. Recuperado de <http://www1.lsbu.ac.uk/water/enztech/index.html>.
- Chávez, G. Manani, M. Espinal, C. Tenorio, R. Crespo, C. Álvarez, M. (2014). Potencial de cepas fúngicas aisladas en el área de biotecnología fúngica segunda parte: biocontroladores fúngicos. *Con-ciencia* (1)2: 47-54.

- Chen, H. Han, Q. Daniel, K. Venditti, R. Jameel, H. (2014). Conversion of Industrial Paper Sludge to Ethanol: Fractionation of Sludge and Its Impact. Department of Forest Biomaterials, North Carolina State University, 1204 Biltmore Hall, Campus Box 8005, Raleigh, NC: 27695-8005.
- Colina, A. Ferrer, A. Urribarri, L. (2009). Cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 from different cellulosic substrates. *Revista Técnica Ingeniería Universidad Zulia*. (32)2: 152 -159.
- Cowling, E. (1975). Physical and in hydrolysis of cellulose and lignocellulosic materials. *Biotechnology and Bioengineering* (5): 163-181.
- Dunster, A. (2007). Characterisation of Mineral Wastes, Resources and Processing technologies – Integrated waste management for the production of construction material Case Study: Paper sludge and Paper sludge ash in portland cement manufacture. Recuperado de http://www.smartwaste.co.uk/filelibrary/Portland_cement_paper_sludge.pdf.
- Emert, G. Brown, R. (1973). Purification and characterization of cellobiase from *Trichoderma viride*. *Federation Proceedings* (32): 528-535.
- Farinas, C. Scarpelini, L. Miranda, E. Bertucci, V. (2011). Evaluation of operational parameters on the precipitation of endoglucanase and xylanase produced by solid state fermentation of *Aspergillus niger*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*.(28)1:17-26.
- Farinas, C. Scarpelini, L. Miranda, E. Bertucci, V. (2015). Evaluation of operational parameters on the precipitation of endoglucanasa and xylanase produced by solid state fermentation of *Aspergillus niger*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 1: 17-26.
- Garcés, A. (2004). Detoxificación del banano verde. *Revista Lasillista de Investigación* (1) 1: 48-55.
- García, A. Quiroz, E. (2011). Proceso para fabricar materiales de construcción a partir de residuos celulósicos. Universidad tecnológica de Pereira. Colombia.
- García, José. (2007). Fibras Papeleras. Barcelona. Edicions UPC.

- Gallego, S. Giraldo, G. (2009). Obtención de biomasa y exopolisacaridos de *Humphreyacoffeata* en cultivo sumergido. Universidad Giraldo. Departamento de ingeniería de procesos. Medellín. Colombia.
- Garnica, C. (2013). Alternativas de gestión de lodos papeleros en la industria de papel tisú y kraft. Pontificia universidad javeriana facultad de estudios ambientales y rurales. Bogotá, Colombia.
- Gautam, S. Bundela, P. Pandey, A. Jamaluddin, K. Awasthi, M. Sarsaiya, S. (2011). Optimization for the Production of Cellulase Enzyme from Municipal Solid Waste Residue by Two Novels Cellulolytic Fungi. *Biotechnology Research International*: 2-8.
- Gil, J. (2015). Estudio de las β -glucosidasas del complejo celulolítico de *talarom y cesamestolkiae*: caracterización y aplicaciones biotecnológicas. Trabajo de grado, centro de investigaciones biológicas consejo superior de investigaciones científicas. Universidad complutense de Madrid, España p 15-16.
- Gonzalez, R. (2012). Ethanol Production from Paper Industry Sludge Examined.
- Ghose, V. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry* 59: 257- 268.
- Guevara, E. (2004). Diseño, construcción y caracterización hidrodinámica de un biorreactor multifuncional. Universidad tecnológica de la mixteca. Huajuapán de león. Oaxaca. México.
- Gutiérrez, M. Portal, L. Moreno, P. Tengerdy, P. (1999). Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. *Bioresource Technology* 68: 173–178.
- Gutiérrez, I. Rojas, N. Montoya, D. (2014). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos Instituto de Biotecnología. Trabajo de grado, Universidad Nacional de Colombia. Laboratorio de Biotecnología Aplicada, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI), Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana(PUJ), Bogotá, D. C.

- Haltrich, D. Nidetzky, B. Kulbe, K. Steiner, W. Zupancic S *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. *Bioresource Technology* 68: 173-178.
- Hayward, T. Hamilton, J. Jennings, E. Ruth, M. Tholudur, A. D. McMillan, J. Tucker, M. Mohagheghi, A. Enzyme Production, Growth, and Adaptation of *T. reesei* Strains QM9414, L-27, RL-P37, and Rut C-30 to Conditioned Yellow Poplar Sawdust Hydrolysate. Scientific Note Affiliated with National Renewable Energy Laboratory. P 293-309.
- Ikram-ul-Haq, Mohsin Javed, M. Saleem, Khatun, T. (2006). An innovative approach for hyperproduction of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes by consortium of *Aspergillus niger* MSK-7 and *Trichoderma viride* MSK-10. *African Journal of Biotechnology* 8: 609-614.
- Jabbar, A. Rashid, M. Javed, M. Perveen, R. Malana, M. (2008). Kinetics and thermodynamics of a novel endoglucanase (CMCase) from *Gymnoascus citrinus* produced under solid-state condition. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35: 515.
- Juhász, T. Szengel, Z. Réczey, K. Siika-Aho, M. Viikari, L. (2005). Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry*: 3519-3525.
- Kadla, J. and Gilbert, R. 2000. Cellulose structure: A review. *Cellulose Chem Technol.* 34, 197-216.
- Kang, S. Park, Y. Lee, J. (2004). Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* K2 from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 91:153-156.
- Kang, L. Lee, Y. Wang, W. (2010). Bioconversion of kraft paper mill sludges to ethanol by SSF and SSCF. Department of Chemical Engineering, Auburn University, Auburn, AL 36849, USA.

- Knapp, J. Legg, M. (1986). The effect of different cellulosic growth substrates and pH on the production of cellulolytic enzymes by *Trichoderma reesei*. *Journal and Applied Bacteriology* 61: 319-329.
- Krishna. (1999). Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana waste. *Bioresource Technology*. 69: 231-239.
- Li, Y. H, Yin, Q. Ding, M. Zhao, F. (2009). Purification, characterization and molecular cloning of a novel endo-beta-1, 4-glucanase AC-EG65 from the mollusk *Ampullaria crosseana*. Comparative biochemistry and physiology b-biochemistry & molecular biology 153: 149.
- Lisboa, N. Silva, F. Avelino, F. Fossa, M. Graciano G, Ribeiro R. (2015). Production of β -glucosidase on solid-state fermentation by *Lichtheimia ramosa* in agroindustrial residues: Characterization and catalytic properties of the enzymatic extract. *Electronic Journal of Biotechnology* 18:314-319.
- Lin, Y. Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 69, 627-642
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H. y Pretorius, I.S., (2002). Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 506-516.
- Majdinasab, M. Moosavi - Nasab, M. (2007). Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from sugar beet pulp.
- Mariño, M. Freitas, S. Miranda, E. (2015). Ethanol precipitation of glycosyl hydrolases produced by *Trichoderma harzianum* 49p11. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* (32) 02: 325 – 333.

- Martínez, Y. Rivero, C. (2007). Efecto del uso de lodo paplero sobre el contenido de N, P, K en dos suelos de importancia en la Cuenca del Lago de Valencia. *Revista Técnica de Ingeniera Universidad del Zulia*: 30.
- Martínez, C. Balcázar, L. Datan. Folch, J. (2008). Celulasas fúngicas: *Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética* 50:119-131. http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2008/mi08-3_4i.pdf•
- Martins, L. Kolling, D. Camassola, M. Dillon, A. Ramos, L. (2008). Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* cellulases in relation to their activity against various cellulosic substrates. *Bioresource Technology* 99: 1417-1424.
- Marx, I. Wyk1, N. Smit, S. Jacobson, D. Viljoen-Bloom, M. Volschenk, H. (2013). Comparative secretome analysis of *Trichoderma asperellum* S4F8 and *Trichoderma reesei* Rut C30 during solid-state fermentation on sugarcane bagasse. *Biotechnology for Biofuels* 6:172.
- Matute, L. (2011). Estudio comparativo del proceso de obtención de un aditivo enzimático mediante fermentaciones microbianas sólida y sumergida de afrechillo de trigo. Universidad de Carabobo. Facultad de ingeniería área de estudios de postgrado en Ingeniería de procesos.
- Menzela, H. (2013). Desarrollo de enzimas industriales utilizando herramientas de biología sintética. Departamento de tecnología facultad de ciencias bioquímicas y farmacéuticas universidad nacional del rosario.
- Merchuk, J. (2000). Microbiología Industrial. Versión en español. Ben Gurion University. BeerSheva, Israel.
- Mohagheghi, K. Wyman, C. (1999). Production of cellulase on mixtures of xylose and cellulose. *Applied Biochemistry Biotechnology* 17: 263–277.

- Mohammad, I. Bala, M. Zaiton, M. (2010). Fabrication of Bricks from Paper Sludge and Palm Oil Fuel Ash. Faculty of Civil Engineering, University Technologic Malaysia. Malaysia.
- Montoya, M. (2014). Degradación de lignina en lodos provenientes de la industria papelera mediante el empleo de *ganoderma lucidum*. Universidad tecnológica de Pereira facultad de tecnología escuela de química programa de química industrial. Pereira, Colombia.
- Muthuvelayudham, R. Viruthagiri, T. (2006). Fermentative production and kinetics of cellulase protein on *Trichoderma reesei* using sugarcane bagasse and rice straw. *African Journal of Biotechnology* 20: 1873-1881.
- NCBI: National Center of Biotechnology Information. USA.
LINK: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?lvl=0&id=51453>.
- Ninawe, S. Kappor, M. Kuhad, R. (2008). Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. *Bioresource Technology* 99: 1252.
- Nochure, S. Roberts, M. Demain, A. (1993). True cellulase production by *clostridium thermocellum* grown on different carbon sources. *Biotechnology Letters* (15) 6: 41- 646.
- Noruby, M. Suarez, A. Montiel, X. Mesa, L. León, G. (2007). Crecimiento de *T. reesei* en medio con base en el exudado gomoso de *Enterolobium cyclocarpum*. *Boletín del centro de investigaciones biológicas* 39: 43–54.
- Olsson, L. Centeno, R. Pavone, D. (2015). Producción de celulasas y biomasa del hongo *Trichoderma reesei* utilizando lodo papelerero como fuente de carbono. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 35:40-46.
- Christensen, T. Hansen, K. Palmqvist, E. (2003). Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme Microbiology Technology* 33: 612-619.

- Oikawa, T. Kamatani, T. Kaimura, T. Ameyama, M. Soda, K. (1997). Endo-b-Glucanase from *Acetobacter xylinum*: Purification and Characterization. *Current Microbiology* 34: 309.
- Chacón, S. y Waliszewski, K. (2005). Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*, 42: 113-122.
- Pandey, A. (2003). Solid-stated fermentation. *Biochemichal engineering journal*13: 81-84.
- Papavizas, G. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. *Annuaire. Journal Phytopathology*. 23: 23-54.
- Pavone, D. Dorta, B. (2015). Diversidad del hongo *Trichoderma* sp. En plantaciones de maíz de Venezuela. *Interciencia*40:23-31.
- Peters, D. (2006). Carbohydrates for fermentation. *Biotechnol Journal*. 1, 806-814.
- Pečar, D. Goršek, A. (2015). Enzymatic Treatment of Paper Sludge. *Chemical engineering transactions* 43:631-636.
- Ponce, T. Pérez, O. (2002). Celulasas y xilanasas en la industria. Avance y perspectiva. 21.
- Queiroz, J. Tomaz, C. Cabral, J. (2001). Hydrophobicinteractionchromatography of proteins.J. *Biotechnol* 87:143-159.
- Quinchía, A. Restrepo, C. y Betancourt, G. (2007). Análisis prospectivo deaprovechamiento y disposición de lodos provenientes de industrias papeleras.Escuela de Ingeniería de Antioquia. Medellin. 180.
- Qun, W. Hui, L. Qi, S. Xiaoping F. Naling, B. Yuhua, Z. (2015).Characterization of Cellulase Secretion and Cre1-Mediated Carbon Source Repression in the Potential Lignocellulose-Degrading Strain *Trichoderma asperellum*. *PlosONE* 10(3):

- Ramírez, O. Urrego, F. (1996). Producción de celulasa a partir del hongo *sp*, y aprovechamiento de la fibra prensada de palma como medio de cultivo. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Facultad de Ingeniería de Alimentos.
- Reczey, K. Szenyel, Z. Eklund, R. Zach, G. (1996). Cellulase production by *T. reesei*. *Bioresource Technology* 57: 25-30.
- Rodríguez, I. Piñeros, Y. (2007). Producción de complejos enzimáticos celulolíticos mediante el cultivo en fase sólida de *Trichoderma sp*. Sobre los racimos vacíos de palma de aceite como sustrato. *Vitae, revista de la facultad de química farmacéutica* 2:35-42.
- Saha, B. C. (2004). Production, purification and properties of endoglucanase from a newly isolated strain of *Mucor circinelloides*. *Process Biochemistry*, 39:1871.
- Sanjeev, R. Deepa, D. Matti, K. Ramesh, C. (2014). Bioprocessing of enhanced cellulase production from a mutant of *Trichoderma asperellum* RCK2011 and its application in hydrolysis of cellulose. *Elsevier Ltd* 124: 183–189.
- Schmidt, K. (2011). Spray drying of protein precipitates and evaluation of the nano spray dryer B-90. Ph. D. Thesis, University Ludwig-Maximilians, Munich.
- Seiboth, B. Ivanova, C. Seidl-Seiboth, V. (2012). *Trichoderma reesei*: A Fungal Enzyme Producer for Cellulosic Biofuels, Biofuel Production-Recent Developments and Prospects, Dr. Marco Aurelio Dos Santos Bernardes. Vienna University of Technology. Austria 309-311.
- Singhania, R. Sukumaran, R. Patel, A.K. Larroche, C. Pandey, A. (2010). Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbiology Technology* 46: 541-549.
- Soccol, C. Vanderberghe, L. (2003). Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal* 13: 205-218.

- Subramaniyam, R. Vimala, R. (2012). Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. School of Biosciences and technology, VIT University, Vellore - 632014, Tamil Nadu, India I.J.S.N3 (3): 480-486.
- Suesca, A. (2012). Producción de enzimas celulolíticas a partir de cultivos de *Trichoderma sp*, con biomasa lignocelulósica Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química y Ambiental. Bogotá Colombia.
- Trinder, P. (1969). Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annual Review of Biochemistry* 6: 24-30.
- Velásquez, J. Cuartas, P. Henao, E. Castro, C. Chris, D. Quintana, G. Garcés, B. (2005). Aprovechamiento no convencional de los lodos primarios y del licor negro resultante de la fabricación de papel. Universidad Pontificia Bolivariana. Medellín Colombia.
- Xia, L. Shen, X. (2004). High- yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. *Bioresour Technol* 91: 259-262.
- Xiong, L. Chao, H. Wan-feng, P. Lv-rong, T. Xiao-yan, Y. Xue-fang, C. Xin-de, Chen. Long-long, M. Yong, C. (2013). Efficient cellulase production from low-cost substrates by *Trichoderma reesei* and its application on the enzymatic hydrolysis of corn cob College of Food Science Agriculture, University of Hebei China. People's Republic of China.
- Zhang, Y. Lynd, L. (2004). Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering* 88: 797-824.
- Zhiyou, W. Wei, L. Shulin, C. (2005). Production of cellulase/ β - glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry* 40: 3087-3094.

APÉNDICE 1

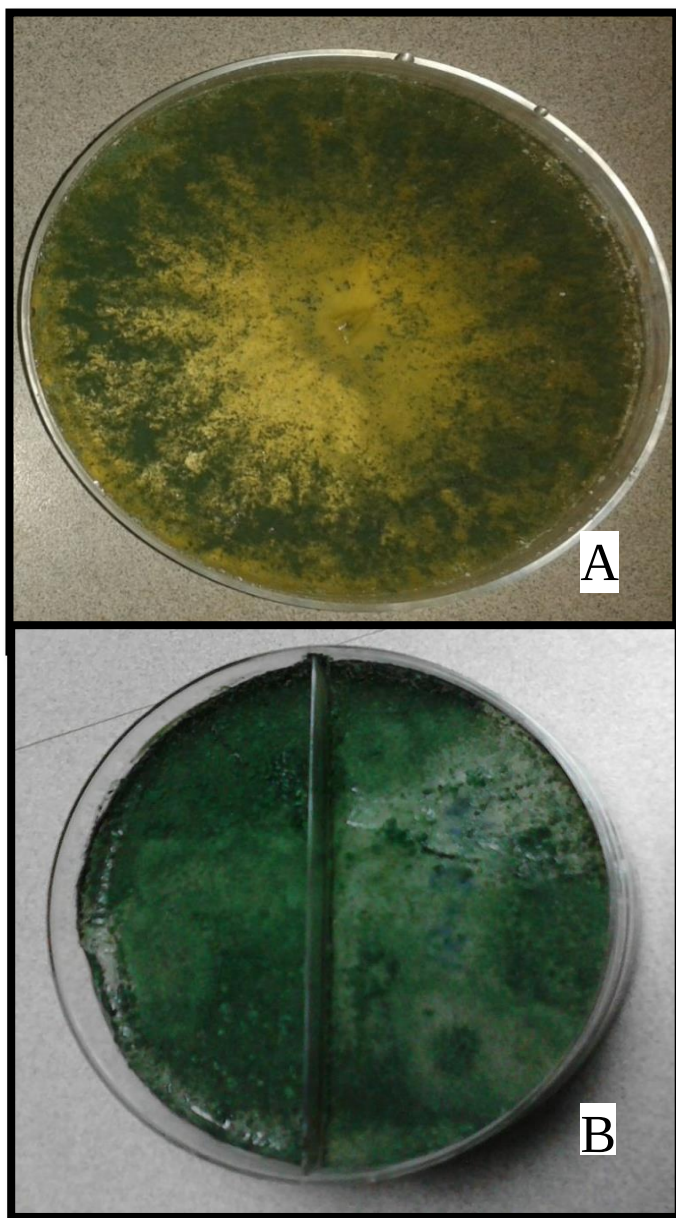


Figura A-1 Material biológico usado para las fermentaciones sumergidas y sólidas A) cepa de *Trichoderma reesei* (TV 219) Proveniente de campos de maíz del Estado Portuguesa, Venezuela. B) cepa de *Trichoderma. Asperellum* (TV190) aislada de campos de maíz del Estado Monagas. Pertenecientes al Centro de Biotecnología Aplicada, Departamento de Biología de la FACYT-UC.

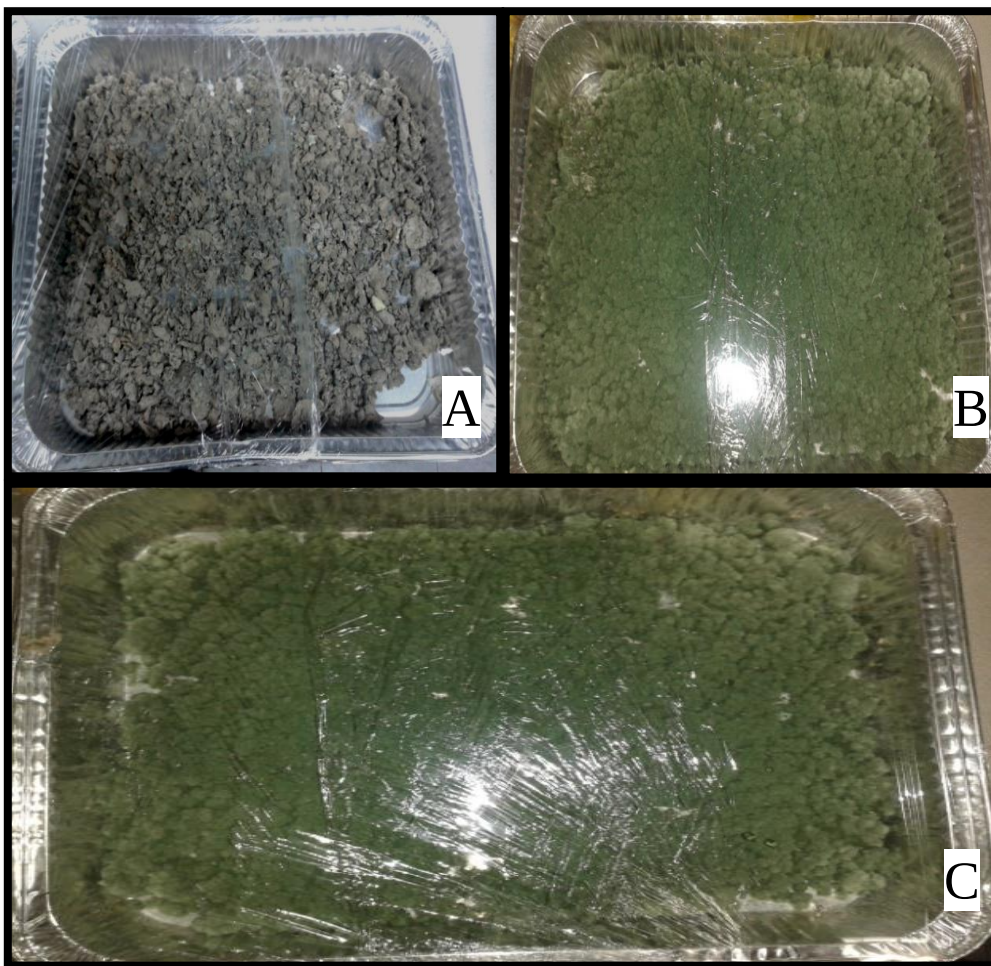


Figura (A-2) Fermentaciones solidas con *Trichoderma asperellum* a partir de lodo papelero como sustrato para la producción de enzimas celulasas. A) lodo papelero inoculado con de *T. asperellum* tiempo inicial B) crecimiento de *T. asperellum* sobre lodo papelero pasada 72 horas de inoculación C) crecimiento de *T. asperellum* sobre lodo papelero pasada 120 horas de inoculación.



Figura(A-3) Escalamiento de la fermentación sumergida para la producción de enzimas celulasas de *Trichoderma reesei*. Fermentador con sistema de aireación airlift al inicio del proceso fermentativo.

Apéndice 2. Análisis estadísticos

Kruskal-Wallis para concentración de sustrato 48 horas (Tabla I)

One-Way Nonparametric AOV for substrate concentration by time 48

Mean	Sample		
Time	48	Rank	Size
0.5	3.2		5
	1	7.8	5
	3	13.0	5
Total		8.0	15

Kruskal-Wallis Statistic 12.1283

P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0023

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	240.400	120.200	38.9	0.0000
Within	12	37.100	3.092		
Total	14	277.500			

Total number of values that were tied 5

Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 15 Missing Cases 0

Prueba a posteriori

Comparisons Test of by substrate concentration by time 48 (Tabla I)

Time48	Mean	Homogeneous Groups
3	13.000	B
1	7.8000	BC
0.5	3.2000	C

Alpha 0.05

Critical Z Value 2.394 Critical Value for Comparison 6.7712

Kruskal-Wallis para concentración de sustrato 72 horas (Tabla 1)

One-Way Nonparametric AOV for substrate concentration by time 72

Mean Sample

Time 72	Rank	Size
0	4.0	5
1	7.0	5
3	13.0	5
Total	8.0	15

Kruskal-Wallis Statistic 10.5188

P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0052

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	2	210.000	105.000	18.1	0.0002
Within	12	69.500	5.792		
Total	14	279.500			

Total number of values that were tied 2

Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 15 Missing Cases 0

Prueba a posteriori

Comparisons Test of substrate concentration by time 72

Time 72 Mean Homogeneous Groups

3	13.000	D
1	6.0000	E
0.5	5.0000	E

Alpha 0.05

Critical Z Value 2.394 Critical Value for Comparison 6.7712

There are 2 groups (A and B) in which the means
are not significantly different from one another.

ANOVA para concentración de sustrato a las 96 horas (Tabla 1)

One-Way AOV for substrate concentration by time 96

Source	DF	SS	MS	F	P
tiempo96	2	0.00196	9.821E-04	245	0.0000
Error	12	0.00005	4.013E-06		
Total	14	0.00201			
Grand Mean	0.0247	CV 8.11			

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	2.30	2	0.3169
Cochran's Q	0.5834		
Largest Var / Smallest Var	5.3517		

Tukey HSD

Comparisons Test of AR3 by tiempo96

Time 96	Mean	Homogeneous Groups
3 0.0394	F	
1 0.0233	G	
0 0.0114	H	

Alpha	0.05	Standard Error for Comparison	1.266E-03
Critical Q Value	3.783	Critical Value for Comparison	3.389E-03

Kruskal-Wallis Para concentración de sales sobre lodo paplero disgregado
(Figura 4)

One-Way Nonparametric AOV for substrate disintegrated by salt concentration

Mean Sample

Salt	Rank	Size
1	3.0	5
2	13.8	5
3	17.2	5
4	23.0	5
5	8.0	5
Total	13.0	25

Kruskal-Wallis Statistic 22.4566

P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0002

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	4	1216.40	304.100	72.8	0.0000
Within	20	83.60	4.180		
Total	24	1300.00			

Total number of values that were tied 0

Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 25 Missing Cases 0

Prueba a posteriori

Comparisons Test of substrate disintegrated by salt concentration

Salt Mean Homogeneous Groups

4	23.000	A
3	17.200	AB
2	13.800	ABC
5	8.0000	BC
1	3.0000	C

Alpha 0.05

Critical Z Value 2.807 Critical Value for Comparison 13.066

**Kruskal-Wallis Para concentración de sales sobre lodo paplero sin disgregar
(Figura 5)**

One-Way Nonparametric AOV for not disintegrated substrate by salt concentration

Mean Sample		
Salt	Rank	Size
1	3.0	5
2	13.0	5
3	18.2	5
4	22.8	5
5	8.0	5
Total	13.0	25

Kruskal-Wallis Statistic 22.8997

P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0001

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	4	1240.40	310.100	104	0.0000
Within	20	59.60	2.980		
Total	24	1300.00			

Total number of values that were tied 0

Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 25 Missing Cases 0

Prueba a posteriori

Comparisons Test of not disintegrated substrate by salt concentration

Salt Mean Homogeneous Groups

4	22.800	A
3	18.200	AB
2	13.000	ABC
5	8.0000	BC
1	3.0000	C

Alpha 0.05

Critical Z Value 2.807 Critical Value for Comparison 13.066

Kruskal-Wallis para ensayo de pH fermentaciones sumergidas (Figura 6)

Mean Sample

pH	Rank	Size
3	4.0	5
4	7.9	5
5	18.0	5
6	12.1	5
Total	10.5	20

Kruskal-Wallis Statistic 15.4144

P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0015

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	3	539.100	179.700	22.9	0.0000
Within	16	125.400	7.838		
Total	19	664.500			

Total number of values that were tied 2

Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 20 Missing Cases 0

Prueba a posteriori comparación de grupos

pH	Mean	Homogeneous Groups
----	------	--------------------

5	18.000	A
6	12.100	AB
4	7.9000	B
3	4.0000	B

Alpha	0.05
-------	------

Critical Z Value	2.638	Critical Value for Comparison	9.8715
------------------	-------	-------------------------------	--------

Kruskal-Wallis para ensayo de homogenización post-fermentativa a las 72 horas. (Figura 7)

Mean	Sample
------	--------

tratalis	Rank	Size
1	3.0	5
2	8.0	5
Total	5.5	10

Kruskal-Wallis Statistic	6.8182
--------------------------	--------

P-Value, Using Chi-Squared Approximation	0.0090
--	--------

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	1	62.5000	62.5000	25.0	0.0011
Within	8	20.0000	2.5000		
Total	9	82.5000			

Total number of values that were tied	0
---------------------------------------	---

Max. diff. allowed between ties	0.00001
---------------------------------	---------

Cases Included	10	Missing Cases	0
----------------	----	---------------	---

Prueba a posteriori comparación de grupos

Comparisons Test of glutralis by tratalis

Tratalis Mean Homogeneous Groups

2 8.0000 A

1 3.0000 B

Alpha 0.05

Critical Z Value 1.960 Critical Value for Comparison 3.7530

All 2 means are significantly different from one another.

ANOVA para ensayo de fermentación sólida (Figura 8)

One-Way AOV for glusolido by solido

Source	DF	SS	MS	F	P
solido	1	41297.4	41297.4	53.1	0.0000
Error	24	18652.5	777.2		
Total	25	59949.9			

Grand Mean 147.55 CV 18.89

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	3.25	1	0.0714
Cochran's Q	0.8261		
Largest Var / Smallest Var	4.7507		

Component of variance for between groups 4389.69

Effective cell size 9.2

Tukey HSD Comparisons Test of glusolido by solido

solido Mean Homogeneous Groups

1 169.38 A

2 74.783 B

Alpha 0.05

Critical Q Value 2.912

Kruskal-Wallis para el ensayo de escalamiento en la producción de enzimas celulasas (Figura 9)

One-Way Nonparametric AOV for Gluferment by fer

Mean Sample

fer	Rank	Size
0	3.0	5
1	8.0	5
2	13.5	5
3	19.1	5
4	23.9	5
5	25.5	5
Total	15.5	30

Kruskal-Wallis Statistic 25.9811

P-Value, Using Chi-Squared Approximation 0.0001

Parametric AOV Applied to Ranks

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	5	2000.10	400.020	41.3	0.0000
Within	24	232.40	9.683		
Total	29	2232.50			

Total number of values that were tied 20

Max. diff. allowed between ties 0.00001

Cases Included 30 Missing Cases 0

Prueba a posteriori

Comparisons Test of Gluferment by fer

	Mean	Homogeneous Groups
5	25.500	A
4	23.900	AB
3	19.100	ABC
2	13.500	ABC
1	8.0000	BC
0	3.0000	C

Alpha 0.05

Critical Z Value 2.935 Critical Value for Comparison 16.342

ANOVA para ensayo de Precipitación (Figura 10)

One-Way AOV for Glupreci by preci

Source	DF	SS	MS	F	P
preci	2	2184.97	1092.48	4.23	0.0408
Error	12	3100.99	258.42		
Total	14	5285.95			

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	5.76	2	0.0561
Cochran's Q	0.7567		
Largest Var / Smallest Var	14.682		

Component of variance for between groups 166.814

Effective cell size 5.0

Tukey(HSD) Comparisons Test of Glupreci by preci

preci	Mean	Homogeneous Groups
2	49.484	A
1	26.714	AB
3	21.770	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 10.167

Critical Q Value 3.783 Critical Value for Comparison 27.198