



ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar

ISSN: 0138-6204

revista@icidca.edu.cu

Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar
Cuba

Ferrer-Marcelo, Yoandy; León-Rodríguez, Marta; Michelena-Álvarez, Georgina; Dustet-Mendoza, Julio César; Duque-Ortiz, Arianna; Ibañez-Fuentes, My-Lai; Tortoló-Cabañas, Keyla
Selección de hongos aislados de bagazo de caña con actividad celulasa sobre celulosa cristalina para posibles aplicaciones industriales

ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, vol. 45, núm. 1, enero-abril, 2011, pp. 3-12
Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar
Ciudad de La Habana, Cuba

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223122251001>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Selección de hongos aislados de bagazo de caña con actividad celulasa sobre celulosa cristalina para posibles aplicaciones industriales

Yoandy Ferrer-Marcelo, Marta León-Rodríguez, Georgina Michelena-Álvarez, Julio César Dustet-Mendoza*, Arianna Duque-Ortiz*, My-Lai Ibañez-Fuentes, Keyla Tortoló-Cabañas

Instituto Cubano de Investigaciones sobre los Derivados de la Caña de Azúcar
Vía Blanca 804 y Carretera Central, San Miguel del Padrón, La Habana, Cuba
yoandy.ferrer@icidca.edu.cu

* Facultad de Ingeniería Química. Ciudad Universitaria
José Antonio Echevarría, La Habana, Cuba

RESUMEN

*Las enzimas comerciales necesarias en procesos de producción de bioetanol celulósico y enriquecimiento de forrajes, son excesivamente caras. La mayoría provienen de mutantes de *Trichoderma reesei* de baja actividad β -glucosidasa, con la velocidad y extensión de la hidrólisis reducida, y débil acción sobre la celulosa cristalina. A partir de bagazo, se aislaron varios hongos filamentosos con capacidad de degradación de la celulosa cristalina, para ello se diseñó un medio selectivo de celulosa agar. Del total de aislados, solo 9 microorganismos mostraron un halo definido de degradación de celulosa. Se determinó el coeficiente de degradación de celulosa cristalina a través de la medición del halo formado por las colonias, y se pre-seleccionaron 5 aislados. Posteriormente, se eligieron los tres mejores productores del complejo celulasa (6, 13 y 21) mediante una fermentación sumergida por determinación de la actividad sobre papel de filtro. Se realizó una fermentación en estado sólido sobre bagazo pretratado para aumentar la actividad celulasa. Se estudió la estabilidad relativa de los extractos enzimáticos y se realizó una caracterización parcial de los mismos. Estos presentaron poca estabilidad relativa después de 48 horas, luego de un prensado simple. El mejor rango de pH de hidrólisis estuvo entre 5,5 y 6,2 y presentaron actividad enzimática a una temperatura de 40 °C.*

Palabras clave: celulasas, hongos celulolíticos, celulosa cristalina, bagazo de caña.

ABSTRACT

*Commercial enzymes for cellulosic bioethanol production and forage enrichment are very expensive. Most of them come from *Trichoderma reesei* mutants with low β -glucosidase activity with a reduced hydrolysis velocity and extent, and a weak action over crystal-*

line cellulose. Several filamentous fungi with crystalline cellulose degradation ability were isolated from bagasse, for this purpose a cellulose agar selective medium was designed. Only 9 microorganisms showed a defined degradation halo and only 5 isolates were pre-selected for further characterization. After batch fermentation, three better cellulose complexes (6, 13, 21) were selected by filter paper activity determination. Solid state fermentation was carried out in order to increase cellulase activity. Relative stability of the enzymatic extracts was studied and their partial characterization was done. Extracts showed a poor relative stability after 48 hours after a single pressing process. The best pH range, for this study, was between 5,5 and 6,2 and a good enzymatic activity at 40 °C was observed.

Keywords: cellulase, cellulolytic fungi, crystalline cellulose, sugarcane bagasse.

INTRODUCCIÓN

La celulosa es el carbohidrato más abundante en la biomasa vegetal (1), forma el 40-60 % de la pared celular de las plantas (2). La celulosa en su forma nativa consiste en una cadena lineal de unidades de glucosa con enlaces glicosídicos β -1,4 (3). Por lo que constituye una abundante fuente de carbono limitada a los microorganismos capaces de hidrolizar este enlace, a expensas de un complejo sistema de enzimas denominadas celulasas o celulolíticas.

La susceptibilidad de la celulosa a la hidrólisis enzimática está afectada por la estructura natural de los materiales celulósicos, la celulosa está asociada a lignina y hemicelulosas, con una conformación capilar, un orden molecular variable y fuerte cristalinidad. Por ello, se considera el pretratamiento de los sustratos lignocelulósicos como un paso necesario para una hidrólisis enzimática óptima, por un aumento de la accesibilidad a la celulosa (4).

Cada complejo celulasa está compuesto por una variedad de enzimas con diferentes especificidades y modos de acción, que actúan en sinergismo para degradar la celulosa (5). Las enzimas del complejo celulasa han sido agrupadas en tres componentes principales. Las endo- β -glucanasa o 1,4- β -D-glucan glucanohidrolasas (EC 3.2.1.4) que hidrolizan aleatoriamente los enlaces β -glucosídicos en el interior de las moléculas de celulosa, con una rápida disminución del largo de las cadenas y un lento incremento en los grupos reductores. Como com-

plemento, las exo- β -glucanasas o 1,4- β -D-glucan celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) atacan los extremos terminales no reductores de la celulosa previamente fragmentada, liberando subunidades de celobiosa. Esta es escindida por las β -glucosidasas o celobiasas (EC 3.2.1.21) en dos moléculas de glucosa libre (3, 5).

Las celulasas son sintetizadas por una gran variedad de bacterias (6) y hongos (7, 8), pero relativamente pocos microorganismos pueden producir las enzimas necesarias para degradar la celulosa cristalina (9). Los hongos filamentosos son responsables de la mayor celulosis en la naturaleza, por la eficiencia y diversidad de sus sistemas celulolíticos, y sus ventajas adaptativas (10). Las especies de hongos celulolíticos más estudiados, pertenecen al género *Trichoderma*, considerado uno de los mejores productores de enzimas, aunque especies de *Aspergillus* (11), *Cladosporium* (12), *Fusarium* (13), *Penicillium* (14), *Neurospora crassa* (15), entre otras, son buenas productoras de celulasas.

La mayoría de los estudios concernientes a la naturaleza, modo de acción y aspectos generales de las celulasas han sido realizados usando el hongo *Trichoderma reesei* (*viridae*) como modelo de mejor productor (16-18). Sin embargo, la búsqueda de una eficiente y posiblemente mejor fuente de celulasa continúa debido a la baja actividad β -glucosidasa en *T. reesei*, limitante de la velocidad y extensión de la hidrólisis, por lo que algunos investigadores han orientado sus estudios al uso de cultivos mixtos (19, 20).

Es importante encontrar nuevas especies de microorganismos celulolíticos altamente productores, ya que no todos los aislados producen enzimas extracelulares que degradan *in vitro* la celulosa insoluble. Por ello, es necesario buscar nuevos productores activos de celulasas en ambientes naturales, y mejorar la producción de enzimas por optimización de las condiciones de cultivo y mutagénesis (21).

Esto permitirá contar con una fuente disponible de enzimas celulolíticas, como alternativa a las comerciales, extremadamente caras, para ser utilizadas en la hidrólisis y sacarificación de residuos lignocelulósicos. Los azúcares liberados del proceso pueden ser usados en varios propósitos, como el incremento de azúcares asimilables en los forrajes y la producción de etanol (22, 23).

MATERIALES Y MÉTODOS

Procesamiento de las muestras

Las muestras se colectaron a partir de bagazo, papel y corteza de árbol, con indicios de degradación. Se utilizó una pinza estéril para extraer aproximadamente 10 gramos por muestra de bagazo a 25 cm de profundidad. Las muestras de papel y corteza se extrajeron con pinzas estériles y se trituraron en un mortero. Posteriormente se sumergieron en frascos estériles con 50 mL de agua con Tween 80 al 0,1%, los que se sometieron a una agitación de 200 r.p.m. durante 15 minutos a 30 °C, para desprender las esporas y los fragmentos de hifa.

Aislamiento de hongos degradadores de la celulosa cristalina

Se sembró a profundidad diluciones decimales de las muestras colectadas de 5 y 6 órdenes en agua con Tween 80, en medio Celulosa Agar (CA) con la siguiente composición: celulosa cristalina 0,5%; sulfato de amonio 0,5%; KH_2PO_4 0,1%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%; Rosa de Bengala 0,001%; extracto de levadura 0,025% y agar 2%, se ajustó a pH final de 5,6. Las placas se incubaron durante 5 días a 30 °C y las colonias crecidas se sembraron en tubos de Agar Malta inclinado bajo estrictas condiciones de esterilidad.

Preselección de los mejores degradadores de celulosa cristalina

Los aislados se inocularon con asa estéril en medio CA, efectuando una punción triple en la superficie del agar. Las muestras se incubaron durante 72 horas a 30 °C, y luego se colocaron en una incubadora a 50 °C durante 48 horas para la visualización del halo degradativo. Se midió el diámetro de la colonia y el del halo degradativo. Se determinó un coeficiente experimental semi-cuantitativo, al que se denominó coeficiente de degradación de celulosa (DC). Para ello se procesaron los datos según la fórmula:

$$DC = (dh/dc) - 1 d$$

donde dh: diámetro halo degradativo
dc: diámetro colonia

Propagación y mantenimiento de microorganismos

Los microorganismos se propagaron en medio Agar Malta vertido en placas petri bajo condiciones de esterilidad e incubados a 30 °C durante 7 días para obtener una esporulación abundante. La manipulación durante el mantenimiento de los aislados, la preparación de inóculos y la inoculación se efectuó en un Gabinete de Seguridad Biológica (GSB).

Preparación de inóculos

Las suspensiones de esporas inoculantes de las fermentaciones se prepararon mediante el arrastre de los microorganismos previamente crecidos en placas con Malta Agar. El arrastre mediante espátula de Drigalsky se realizó lavando con solución de elementos trazas de Mandels y Weber (24). Se filtró en lana de vidrio para eliminar los fragmentos de hifas y se cuantificaron las esporas por conteo directo en microscopio óptico utilizando una cámara de Newbauer.

Fermentación sumergida de los aislados preseleccionados

Con las cepas preseleccionadas se realizó una fermentación en solución trazas de Mandels y Weber (24), suplementado con urea y sales de amonio, con papel de filtro al 1% (w/v) como única fuente de carbono, al que se adicionó Tween 80 al 0,1% (v/v) como adyuvante de la secreción de proteí-

nas. El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos. Se inoculó con 0,2 mL de una solución de 10^7 esporas por mililitro.

Luego de 72 horas de incubación a 30 °C y 200 r.p.m de agitación, los cultivos se filtraron con lana de vidrio y se centrifugaron durante 20 minutos a 5000 r.p.m. para separar las esporas y las partículas de bagazo en suspensión.

Fermentación en Estado Sólido (FES) en bagazo pretratado

Se pesaron 5 g de bagazo pretratado de caña pretratado por hidrólisis alcalina con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ al 5%, en erlenmeyers de 500 mL como única fuente de carbono, se suplementó con urea al 2%, sulfato de amonio al 5% y dihidrógeno fosfato de potasio al 5%. El sustrato fue humedecido con una solución de elementos trazas de Mandels y Reese para una humedad final del 70%. El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos. Se inoculó cada erlenmeyer con 1 mL de una solución de 10^7 esporas por mililitro.

Se incubó durante 72 horas en estático a 30 °C. Luego, se realizó una extracción simple utilizando una prensa hidráulica (Carl Zeiss, Alemania) con la aplicación de una presión manométrica de 20 MPa. Los extractos crudos fueron los sobrenadantes obtenidos por centrifugación a 5000 r.p.m. durante 20 minutos.

Determinación de azúcares reductores y actividad celulasa en papel de filtro

Se determinó la actividad celulasa total de 0,5 mL del sobrenadante de la fermentación, por el cálculo en función de la liberación de azúcares reductores de una tira de papel de filtro Whatman No.1, incubado en tampón citrato pH 4,8 durante 60 minutos a 50 °C, leyendo la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro. Los resultados se expresan en Unidades de Papel de Filtro por mililitro (UPF/mL) (25, 26).

Ensayo de estabilidad de la actividad enzimática post-fermentación a diferentes temperaturas de conservación

Los extractos centrifugados se conservaron a dos temperaturas: temperatura ambiente (TA) de 30 °C y temperatura de refrigeración (TF) de 10 °C. La actividad

enzimática celulasa y el pH se midieron en las horas: 0, 1, 2, 3, 24, 48 y 72 respectivamente. La actividad enzimática se determinó por ensayo en papel de filtro y los valores de pH se obtuvieron con un pHmetro (Radiometer, Dinamarca).

Actividad enzimática de los aislados a diferentes temperaturas de reacción

Se empleó el ensayo en papel de filtro modificando la temperatura de reacción. Se ensayaron las temperaturas de 30, 40 y 50 °C respectivamente para los extractos de los aislados seleccionados. Se incubó en baño termostático (Janke & Kunkel, Alemania) durante 1 hora de reacción y pH 4,8.

Actividad enzimática de los aislados a diferentes pH de reacción

Se empleó el ensayo en papel de filtro descrito por Ghose (26) modificando el pH de reacción. Se ensayaron a los pH 5,5; 6,2; 7,2 y 8,3 respectivamente para los extractos de los aislados seleccionados. Se incubó en baño termostático (Janke & Kunkel, Alemania) durante 1 hora de reacción y temperatura de 50 °C.

RESULTADOS

Aislamiento y preselección en medio Celulosa Agar

De los 30 hongos filamentosos con crecimiento en medio CA, solo 9 presentaron un halo definido de degradación de celulosa, por aclaración del medio, como se observa en la figura 1. Se desecharon las colonias que presentaron crecimiento con biomasa, sin indicios visibles de degradación, debido a que la excreción de enzimas del complejo celulolítico es despreciable.

Se seleccionaron 5 aislados (6, 7, 8, 13 y 21) para las etapas de estudio siguientes, por presentar un coeficiente de degradación celulolítica mayor que 0,3 como se ilustra en la figura 2. En todos los casos los mejores degradadores de celulosa se aislaron del bagazo enmohecido.

Selección en fermentación sumergida

Con los hongos preseleccionados como mejores degradadores de celulosa cristalina, se realizó una fermentación sumergida en

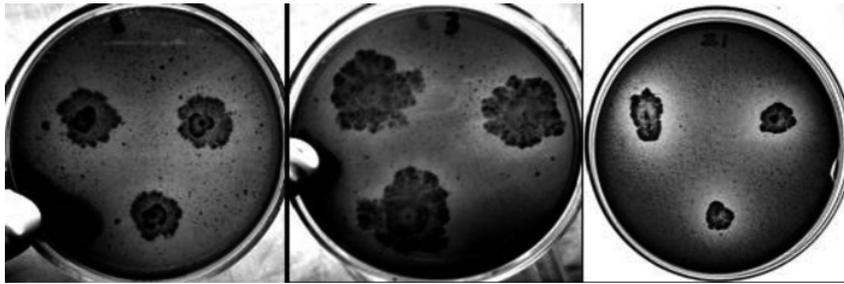


Figura 1. Degradación de celulosa en medio CA.

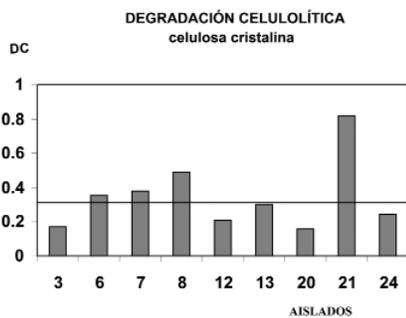


Figura 2. Preselección de los mejores degradadores de celulosa.

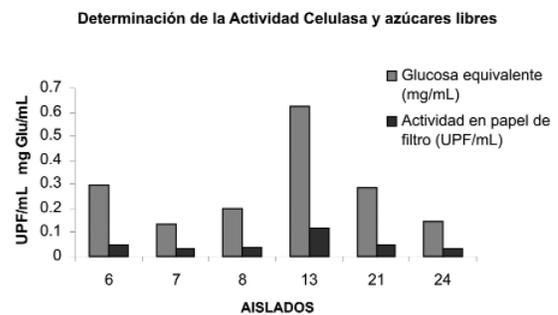


Figura 3. Determinación de azúcares liberados y actividad celulolítica total.

50 mL de medio Mandels, suplementado con urea y sales de amonio, con papel de filtro Whatman No.1 al 1% (w/v) como única fuente de carbono, suplementado con 0,1 % de Tween 80. De los microorganismos capaces de degradar el papel en 72 horas de incubación a 30 °C y 200 r.p.m. de agitación, se seleccionaron los de mayor actividad celulasa mediante la técnica de Ghose (26) calculada en función de la concentración de azúcares reductores según la técnica descrita por Miller (25). La cantidad de azúcares reductores liberados se expresa como concentración de glucosa equivalente libre, y la actividad celulasa correspondiente de la fermentación sumergida con papel de filtro se muestra en la figura 3. Los mejores productores de enzimas celulasas fueron los aislados 6, 13 y 21.

FES en bagazo pretratado por el método alcalino

Con el fin de elevar la concentración relativa de enzimas celulasas, se realizó

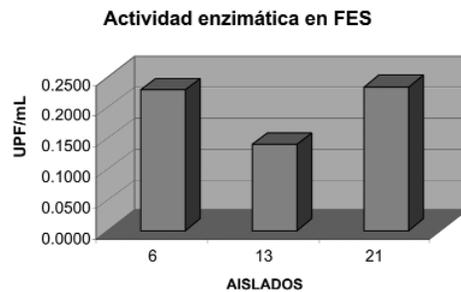


Figura 4. Actividad enzimática luego de FES en bagazo pretratado.

una fermentación en fase sólida con bagazo de caña pretratado, con los aislados seleccionados en la etapa anterior (6, 13 y 21). Se verificó un buen aprovechamiento de este sustrato, por un aumento de hasta 5 veces en la producción de enzimas celulasas excretadas por los hongos y recuperadas por prensado, como se puede observar en la figura 4.

Estudio de la estabilidad de los crudos enzimáticos a dos temperaturas de conservación y monitoreo del pH

Se realizó un ensayo de estabilidad de los extractos crudos de la FES con bagazo pretratado (figura 5). Los crudos se conservaron inmediatamente después de la centrifugación a temperaturas de 10 °C (TF) y 30 °C (TA), simultáneamente. La mejor temperatura relativa de conservación fue de 10 °C. Sin embargo, con el método de extracción ensayado, los crudos pierden hasta un 20% de su actividad enzimática inicial en las primeras 48 horas de almacenamiento, lo que sugiere experimentar métodos de extracción con soluciones tampones y estabilizadores orgánicos, para una mejor conservación y recobrado de enzimas.

Se observó un incremento brusco del pH monitoreado durante los puntos de determinación de la actividad enzimática residual en las muestras conservadas a temperatura de 30 °C. Este aumento del pH se corresponde con los resultados obtenidos por otros autores, quienes lo asocian a la liberación de grupos amino debido a la acción de proteasas excretadas por los hongos, que hidrolizan las proteínas asociadas al material celulósico natural utilizado como sustrato (18).

Influencia de temperaturas inferiores en la hidrólisis enzimática

Mediante una modificación de la técnica de determinación de actividad enzimática en papel de filtro descrita por otros autores (26), se realizó un estudio de la influencia de las temperaturas cercanas a la temperatura ambiente (30 y 40 °C) sobre la actividad catalítica de los crudos enzimáticos. Como se observa en la figura 6, es posible una hidrólisis enzimática a temperatura de 40 °C, con solo una pérdida relativa de actividad del 10%, y un favorable ahorro de energía en un proceso de sacarificación de celulosa. El aislado 6 conserva su actividad enzimática por encima del 95% a 30 °C, por lo que puede ser un candidato interesante en un proceso a temperatura ambiente.

Influencia del pH en la hidrólisis enzimática

De igual modo que en el caso de la temperatura, se realizó un estudio de la influencia del pH en el rango desde de 4,8 (descrito para *Trichoderma reesei*) hasta la ligera alcalinidad de 8,3. Los resultados se muestran en la figura 7. Los tres crudos enzimáticos obtenidos de FES, presentan un pH óptimo en el entorno ligeramente ácido de 5,5 a 6,2. Estos valores permitirán ajustar

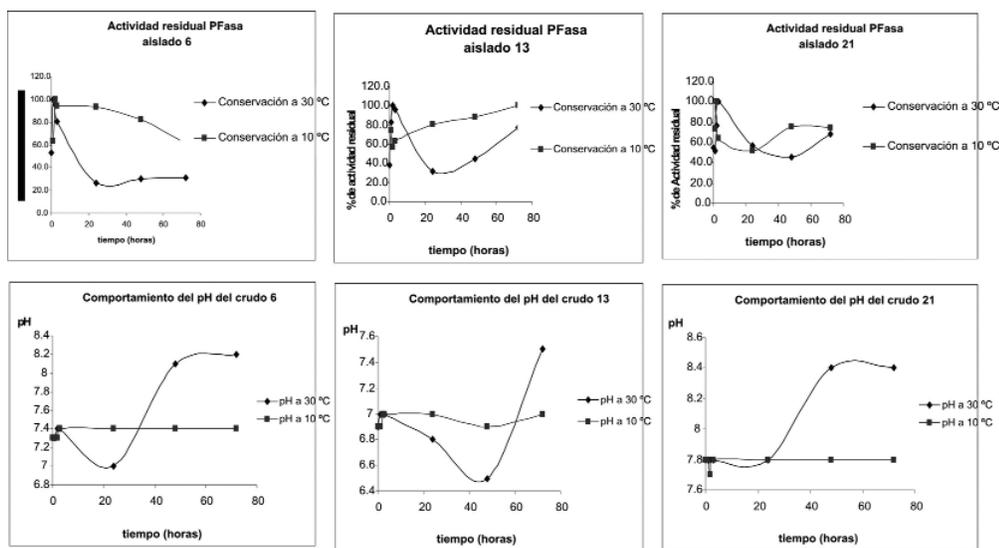


Figura 5. Estudio de la estabilidad de los crudos enzimáticos en actividad residual a dos temperaturas de conservación y monitoreo del pH de los extractos.

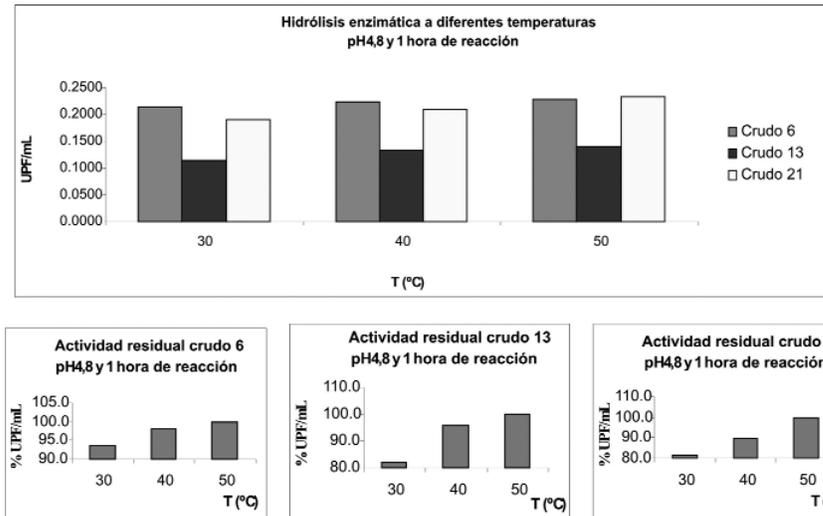


Figura 6. Influencia de temperaturas económicas en la hidrólisis enzimática.

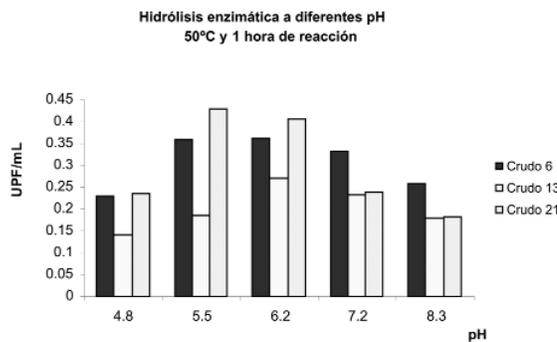


Figura 7. Influencia del pH en la hidrólisis enzimática.

las condiciones fisico-químicas a procesos donde intervengan levaduras con valores de pH favorables para su crecimiento en este rango.

DISCUSIÓN

Para el aislamiento primario de hongos celulolíticos presuntivos, se utilizó el medio de crecimiento selectivo CA, con celulosa cristalina como única fuente de carbono, con ello fue posible limitar el crecimiento a los microorganismos capaces de degradar este sustrato, esto significa un avance en los esfuerzos por aumentar el número de candi-

datos capaces de producir las enzimas necesarias para degradar la celulosa cristalina. Otros autores, aislaron actinomicetos con actividad celulolítica, procedentes de compost, suelo y estiércol, utilizando el medio Agar Czapeck-Dox (Difco) modificado, cambiando la sacarosa por celulosa cristalina al 1%, con buenos resultados (27). En el presente trabajo se utilizó un medio similar con la adición de un 0,001% de pigmento Rosa de Bengala, este componente no solo permitió disminuir el tamaño excesivo de las colonias de hongos crecidos sobre la celulosa cristalina, también permitió una evaluación semi-cuantitativa en la preselección de los mejores aislados, mediante la observación contrastada del halo de hidrólisis sobre la celulosa. Para ello se calculó un coeficiente de degradación que determina la magnitud relativa del halo respecto al diámetro de la colonia.

Otro autor, evaluó la actividad exoglucanasa de cepas aisladas de suelo con hojarasca, previamente reactivadas en papa dextrosa agar (PDA), cultivadas en medio Czapeck con papel de filtro como fuente de carbono y medio Mandels, con mejores resultados en este último. En dicho trabajo se seleccionaron las cepas con niveles mayores a 0,1 UPF/mL, pero con resultados inferiores a 0,3 UPF/mL (28). Por este motivo, para la selección de los mejores hongos celulolíticos del presente trabajo, se utilizó el medio

Mandels con papel de filtro y un 0,1% de Tween 80 como adyuvante de la secreción de proteínas solubles en los hongos, según se recomienda en un trabajo anterior (27), con resultados en la actividad enzimática similares a los obtenidos en actinomicetos termófilos.

Se seleccionaron 3 hongos con buena degradación de celulosa cristalina y la correspondiente secreción de celulasas al medio extracelular, para un 10% del total de aislados.

Para incrementar la concentración de enzimas y aprovechar un residual abundante en la industria azucarera, se realizó una FES con los microorganismos seleccionados, utilizando como sustrato bagazo pretratado por hidrólisis química con 0,5% de hidróxido de calcio. El pretratamiento se utiliza para reducir la cristalinidad de la biomasa lignocelulósica, permitir el acceso de las enzimas a la red de celulosa y remover la lignina (29).

Varios investigadores han utilizado la fermentación en estado sólido para producir celulasas utilizando residuos ligno-celulósicos como sustratos (30-32).

En el presente trabajo, a pesar de incrementar los niveles de celulasas detectados en el crudo obtenido de bagazo fermentado en estado sólido a 0,3 UPF/ mL, estos son insuficientes para los estimados de un proceso tecnológica y económicamente viable de sacarificación de bagazo para la producción de etanol o en el enriquecimiento nutricional del forraje para el alimento animal. Esto se debe fundamentalmente al método de tratamiento previo del bagazo para su deslignificación. Algunos investigadores, analizaron el rendimiento de enzimas celulasas en una FES con *Trichoderma reesei* utilizando explosión al vapor (steam explosion) y NaOH al 0,1 y 0,3%, como métodos de pretratamiento. Encontraron que el mejor pretratamiento fue el de explosión a vapor, mientras que los pretratamientos químicos no muestran incrementos significativos, debido a la adsorción de las enzimas sobre la lignina o a la acumulación de inhibidores liberados en el proceso (32).

El método de extracción mediante prensado simple del crudo enzimático en el presente trabajo resultó ineficiente, por la baja recuperación de enzimas y la inestabilidad en la actividad enzimática y el pH. La mayor

parte de las enzimas quedan atrapadas en el propio sustrato y solo se recuperan con el prensado las celulasas presentes en el agua libre. Otros autores realizaron la extracción de celulasas adicionando tampón citrato a 0,05 M (pH 4,8) y 0,1% de Tween 80, sometiendo el cultivo a una agitación de 250 r.p.m. por 2 horas a 30 °C, para desprender las enzimas y mantener una acidez consecuente (32). Así también, algunos utilizaron 100 mL de tampón fosfato 0,2 M (pH 7,0) con agitación en zaranda orbital por 1 hora (31). Esto sugiere la necesidad de optimizar el medio de fermentación y el método de extracción para elevar los rendimientos y la estabilidad enzimática.

Se logró utilizar temperaturas de hidrólisis enzimática inferiores a 50 °C, lo que sugiere un posible ahorro en los indicadores energéticos y la disminución del costo de futuras aplicaciones industriales.

El rango óptimo de pH de hidrólisis de los crudos resultantes del crecimiento de los microorganismos seleccionados como buenos degradadores de la celulosa cristalina, fue compatible con un proceso de fermentación alcohólica con levaduras, lo que permite implementar en el futuro un proceso de sacarificación y fermentación simultánea, en la producción de bioetanol celulósico.

CONCLUSIONES

De 30 hongos aislados en medio CA, solo 9 formaron halo de hidrólisis sobre celulosa cristalina, de los cuales 5 aislados presentaron un $DC > 0,30$. De ellos se seleccionaron tres aislados (6, 13 y 21) como buenos productores del complejo celulasas, para un 10 % del total de aislados.

La FES con bagazo pretratado como sustrato, resultó efectiva en la producción del complejo celulolítico en laboratorio, con aumento de actividad enzimática y factibilidad en estudios de estabilidad.

Con el método de extracción utilizado hay poca estabilidad relativa del crudo, con tendencia a perder más del 20% de la actividad enzimática en las primeras 48 horas y la mejor temperatura de conservación fue de 10 °C.

A 40 °C se pierde solamente 10% de actividad enzimática, lo que puede representar un ahorro energético.

Las variaciones de pH influyen en la actividad enzimática de manera que el mejor rango de actividad enzimática es el ligeramente ácido (5,5-6,2), que difiere del pH óptimo de las enzimas comerciales obtenidas a partir de *Trichoderma reesei* mutadas (pH 4,8). Este rango es más apropiado para el crecimiento y la fermentación de las levaduras alcohológenas en una futura aplicación, en un proceso de sacarificación y fermentación simultáneos, en la producción de bioetanol celulósico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Han, Y.W.; Dunlap, C.E.; Callihan, C.D. Single cell protein from cellulosic wastes. *Food Technology*. 130(25):p. 32-35, 1971.
2. Fan, L.T.; Lee, Y.; Gharapuray, M.M. The nature of lignocellulosics and their pre-treatments for enzymatic hydrolysis. *Microbial reactions*. 157(23). Reprint from *Advances in Biochemical Engineering*, 1982.
3. Fan, L.T.; Lee, Y. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: effects of major structural features of cellulose in enzymatic hydrolysis. *Biotech. and Bioeng.* 22: p. 177-199, 1980.
4. Ladisch, M.R.; Lin, K.W.; Voloch, M.; Tsao, G.T. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme Microb. Technol.* 5: p. 82-102, 1983.
5. Béguin, P. Molecular biology of cellulose degradation. *Annu. Rev. Microbiol.* 44: p. 219-248, 1990.
6. Stutzerberger, F.J. Cellulolytic activity of *Thermomonospora curvata* : Nutritional requirements for cellulase production. *Appl. Microbiol.* 24 (1): p. 77-82, 1972.
7. Ceroni, A.; Gutiérrez-Correa, M. Producción de celulasas por hongos: estudios cinéticos en hongos silvestres. *Boletín Lima*. 55:p. 13-20, 1988.
8. Barbosa, E.; de Queiroz, M.A. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. *Rev. De Microbiol. São Paulo*. 27 (1):p. 7-9, 1996.
9. Focher, B.; Marzetti, Á.; Beltrame, P. L.; Carniti, P. In: *Biosynthesis and Biodegradation of Cellulose*; New York, Marcel Dekker Inc.: NY. p. 293-310, 1991.
10. Ramos, A.M.; Forchiassin, F. Producción de endoglucanasa en cuatro especies del género *Saccolobus*. *Rev. Argentina de Microbiología*. 28:p. 55-62, 1996.
11. Bastawde, K.B. Cellulolytic enzymes of a thermotolerant *Aspergillus terreus* strain and their action on cellulosic substrates. *World J. Microbiol. and Biotech.* 8: p. 45-49, 1992.
12. Abrha, B.; Gashe, B.A. Cellulase production and activity in a species of *Cladosporium*. *World J. Microbiol. and Biotech.* 8: p. 164-166, 1992.
13. Murali, H.S.; Mohan, M.S.; Manja, K.S.; Sankaran, R. Cellulolytic activity of four *Fusarium* spp. *World J. Microbiol. and Biotech.* 10: 487, 1994.
14. Keskar, S.S. Cellulase Production from *Penicillium janthinellum*. *World J. Microbiol. and Biotech.* 8:p. 534-535, 1992.
15. Yazdi, M.T.; Woodward, J.R.; Radford, A. The cellulose complex of *Neurospora crassa* : activity, stability and release. *Journal General Microbiol.* 136:p. 1313-1319, 1990.
16. Illanes, A.; Rossi, M.C. Inducción de celulasas de *Trichoderma reesei* en medios de cultivo definidos. *Rev. Argentina de Microbiología*. 12 (3):p. 79-86, 1980.
17. Maheswari, D.K.; Jahan, H.; Paul, J.; Varma, A. Wheat straw a potential substrate for cellulase production using *Trichoderma reesei*. *World J. Microbiol. and Biotech.* 9:p. 120-121, 1993.
18. Colina, A.; Ferrer, A.; Urribirri, L. Cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30 from different cellulosic substrates. *Rev. Tec. Ing. Univ. Zulia*. 32 (2):p. 152-159, 2009.
19. Madamwar, D.; Patel, S. Formation of cellulases by co-culturing of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* on cellulosic waste. *World J. Microbiol. and Biotech.* 8:p. 183-186, 1992.
20. Dueñas, R.; Tengerdy, R.P.; Gutierrez-Correa, M. Cellulase production by mixed fungi in solid-state fermentation of bagasse. *World J. Microbiol. and Biotech.* 11:p. 133-137, 1995.
21. Ali, S.; Sayed, A.; Sarker, R.I.; Alam, R. Factors affecting cellulose production by *Aspergillus terreus* using water hyacinth. *World J. Microbiol. and Biotech.* 7:p. 62-66, 1991.

22. Gutiérrez-Correa, M. Producción de etanol y proteína. En Primer Simposium Nacional de Biotecnología. CONCYTEC. Lima, julio 1986.
23. Prasertsan, P.; Oi, S. Production of cellulolytic enzymes from fungi and use in saccharification of palm cake and palm fibre. *World J. Microbiol. and Biotech.* 8: p. 536-538, 1992.
24. Mandels, M.; Weber, J. The Production of cellulases. *Adv. Chem. Series.* 95:p. 391-414, 1969.
25. Miller, G. L. Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* 31:p. 426-428, 1959.
26. Ghose, T. K. Measurement of Cellulase Activities Pure and Applied Chemistry. 59:p. 257-268, 1987.
27. Ramírez, P., Cocha, J. Enzimatic degradation of cellulose for thermophilic actinomycete: isolation, characterization and cellulolytic activity determination. *Rev. peru. biol.* 10 (1):p. 67-77, 2003.
28. Vilchez, L. Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz. [Tesis de diploma] Lima. UNMSM, Facultad de Ciencias Biológicas, 2003.
29. Sun, Y.; Cheng, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology.* 83:p. 1-11, 2002.
30. Rodríguez, I.; Piñeros, Y. Producción de complejos enzimáticos celulolíticos mediante el cultivo en fase sólida de *Trichoderma* sp. sobre los racimos vacíos de palma de aceite como sustrato. *Vital, Rev. Fac. quím. Farmacéutica.* 14(2):p. 35-42, 2007.
31. Singhanian, R.; Sukumaran, R.; Pillai, A.; Prema, P.; Szakacs, G.; Pandey, A. Solid-state fermentation of lignocellulosic substrates for cellulose production by *Trichoderma reesei* NRRL 11460. *Indian J Biotechnol.* 5:p. 332-336, July 2006.
32. Xin, F., Geng, A. Horticultural waste as the substrate for cellulose and hemicellulase production by *Trichoderma reesei* under Solid-State Fermentation. *Appl Biochem Biotechnol.* 162: p. 295-306, 2010.